

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität

Würzburg

Lehrstuhl für Anatomie II

Vorstand: Professor Dr. med. Detlev Drenckhahn

**Morphologische und molekularbiologische  
Untersuchungen zur Bedeutung der Serin-Threonin-  
Proteinkinase SRPK79D in *Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Sonja Dippacher**

aus Würzburg

Würzburg, August 2011

Autorin:  
Sonja Dippacher  
Hunsingerweg 11  
97084 Würzburg  
Sonja.Dippacher@web.de

Referentin:  
Professorin Dr. med. Esther Asan

Koreferent:  
Professor Dr. med. Manfred Heckmann

Dekan:  
Professor Dr. med. Matthias Frosch



Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2012

Die Promovendin ist Ärztin.

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus zum Studium der         Funktion spezifischer Gene und Genprodukte</b>	<b>1</b>
<b>1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus für Erkrankungen         insbesondere des Nervensystems</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Aufbau des Nervensystems in Embryo, Larve und Imago von         <i>Drosophila melanogaster</i></b>	<b>5</b>
<b>1.4 Die neuromuskuläre Synapse und Aufbau der Aktiven Zone: T-bars         und das Protein Bruchpilot</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Axonaler Transport</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Die Rolle von SR-Proteinen und SR-Protein-spezifischen Kinasen         beim Spleißen</b>	<b>22</b>
<b>1.7 Die SR-Protein-spezifische Kinase SRPK79D in <i>Drosophila</i></b>	<b>31</b>
<b>1.8 Zielsetzung</b>	<b>33</b>

<b>2 MATERIAL</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Lebendmaterial</b>	<b>35</b>
<b>2.2 Vektoren</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Chemikalien</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Antikörper</b>	<b>39</b>
<b>2.5 Enzyme und übrige Reagenzien</b>	<b>39</b>
<b>2.6 Puffer und Lösungen</b>	<b>40</b>
<b>2.7 Medien und Platten</b>	<b>46</b>
<b>2.8 Geräte</b>	<b>48</b>
<b>3 METHODEN</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Fliegenzucht</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Gewinnung von gereinigtem Protein für Affinitätsreinigung eines Antikörpers</b>	<b>49</b>
<b>3.2.1 Transformation hitzekompetenter Bakterienzellen</b>	<b>49</b>
<b>3.2.2 Induktion der Proteinsynthese</b>	<b>50</b>
<b>3.2.3 Isolierung des Proteins</b>	<b>52</b>
<b>3.2.4 Chloroform-Methanol-Fällung des aufgereinigten Proteins</b>	<b>52</b>
<b>3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	<b>53</b>

3.2.6 Proteinfärbung mit Coomassie und Konservierung des Gels	54
3.2.7 Westernblot	54
3.3 In-situ-Hybridisierung an Embryonen	56
3.3.1 Transformation hitzekompetenter Bakterienzellen	56
3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> – Bakterien	57
3.3.3 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA	58
3.3.4 In-vitro-Transkription der Digoxigenin-markierten mRNA-Sonde	59
3.3.5 Konzentrationsbestimmung der Digoxigenin-markierten mRNA-Sonde	60
3.3.6 Sammlung und Konservierung von Embryonen	61
3.3.7 In-situ-Hybridisierung	62
3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Wildtyp- und <i>SrpK79D</i> -Larven	64
3.4.1 Präparation der Larven und Einbettung in Epon	64
3.4.2 Herstellung der Ultradünnschnitte	65

3.4.3 Durchführung der quantitativen elektronenmikroskopischen Untersuchung	67
3.5 Immunfluoreszenz an Wildtyp- und <i>Srpk79D</i> -Larven	68
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>70</b>
4.1 Gewinnung von gereinigtem Protein für Affinitätsreinigung eines Antikörpers	70
4.1.1 Induktion der Proteinsynthese	70
4.1.2 Isolierung des His-Tag-Proteins	71
4.1.3 Chloroform-Methanol-Fällung des gereinigten Proteins	73
4.2 In-situ-Hybridisierung an Embryonen	73
4.2.1 Digoxigenin-Markierung der Sonden	73
4.2.2 In-situ-Hybridisierung an Embryonen	74
4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Wildtyp- und <i>Srpk79D</i> -Larven	76
4.3.1 Morphologie der Aggregate	79
4.3.1.1 Morphologie der Aggregate in der <i>Srpk79D</i> -Nullmutante	79
4.3.1.2 Ähnlichkeit zu T-bars	81
4.3.1.3 Beschreibung der Vesikel, die den ED Bereich des Aggregats umgeben	87

4.3.1.4 Beschreibung der Aggregate im Wildtyp	90
4.3.2 Quantitative Auswertung	91
4.3.2.1 Dichte und Größe der Aggregate	91
4.3.2.2 Beziehung zwischen Entfernung des Aggregats zum Ventralganglion und Aggregatgröße	94
4.3.2.3 Assoziation der Aggregate mit Mitochondrien	95
4.3.2.4 Auszählung von Mitochondrien pro Axonfläche	95
4.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Wildtyp- und <i>Srpk79D</i> - Larven	97
4.4.1 Färbung mit dem N-terminalen BRP-Antikörper	97
4.4.2 Färbung mit dem DVGlut-Antikörper	101
5 DISKUSSION	104
5.1 Gewinnung von gereinigtem Protein für die AK-Aufreinigung	104
5.2 In-situ-Hybridisierung an Embryonen	105
5.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Wildtyp- und <i>Srpk79D</i> -Larven	106
5.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Wildtyp- und <i>Srpk79D</i> -Larven	111

<b>5.5 Funktion der SRPK79D</b>	<b>113</b>
<b>5.6 Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>116</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>117</b>
<b>7 LITERATUR</b>	<b>120</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	
<b>LEBENS LAUF</b>	



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BRP	Bruchpilot
CAZ	Cytomatrix der aktiven Zone
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DV	dense core vesicle
DVGlut	<i>Drosophila</i> vesikulärer Glutamatttransporter
ED	elektronendicht
ev.	eventuell
g	Gramm
His-Tag	Polyhistidin-Tag
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar = mol / Liter
Min.	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N-Terminus	Amino-Terminus
PBS	Phosphate buffered Saline
PBT	RNase-free phosphate buffered saline

	with Tween
pH	potentia Hydrogenii - Wert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
µL	Mikroliter
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	standard error of the mean, Standard- fehler des Mittelwerts
snRNP	kleines nukleäres Ribonukleoprotein
SR-Protein	Serin-Arginin-reiches Protein
SRPK	SR-Protein-spezifische Kinase
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
x (nach Zahl)	-mal
z. B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird eine Mutante in *Drosophila melanogaster* untersucht, die Akkumulationen eines präsynaptischen Proteins in peripheren Nerven zeigt. Das durch das ausgeschaltete Gen kodierte Protein ist homolog zu Enzymen, die beim Spleißen der Vorläufer-Boten-Ribonukleinsäure (RNA) beteiligt sind.

Daher werden hier die Vorteile von *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus zur Erforschung der Funktion bestimmter Gene und Genprodukte vorgestellt, insbesondere auch solcher Gene, die möglicherweise bei Erkrankungen des Nervensystems eine Rolle spielen. Es folgen Beschreibungen der Neuroanatomie, des Aufbaus der neuromuskulären Synapse und der präsynaptischen aktiven Zone bei *Drosophila*. Da Akkumulationen von Molekülen oder Organellen in Nerven auf Defekten des axonalen Transports beruhen können, werden dessen Mechanismen und einige *Drosophila*-Mutanten zur Erforschung von axonalen Transportdefekten kurz vorgestellt. Da das untersuchte Gen möglicherweise eine Rolle bei Spleißvorgängen spielt, werden darüber hinaus das Spleißen und seine Regulation erklärt.

### 1.1 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus zum Studium der Funktion spezifischer Gene und Genprodukte

*Drosophila melanogaster*, die schwarzbäuchige Taufliege, ist einer der am häufigsten in der Forschung verwendeten Modellorganismen, weil die Arbeit mit ihr viele Vorteile bietet. Die Haltung der Fliegen ist wenig aufwändig, kostengünstig und die Arbeit mit den Tieren ist unter CO<sub>2</sub>-Betäubung einfach und

ungefährlich möglich. So sind Anatomie und Physiologie von *Drosophila* bereits gut untersucht.

Die hohe Fertilität und kurze Generationszeit von zehn Tagen (Ashburner et al., 2005) ermöglichen eine rasche Einführung von genetischen Manipulationen und die Untersuchung mehrerer Generationen der Fliegen in kurzen Zeiträumen. Genetische Manipulationen sind unter anderem deswegen leicht durchführbar, weil *Drosophila* nur vier Chromosomenpaare hat, drei Autosomen und ein Geschlechtschromosomenpaar (Weibchen: 2 X-Chromosome, Männchen: X- und Y-Chromosom) (Greenspan, 2004) und weil Männchen keine meiotische Rekombination zeigen (Venken & Bellen, 2005). Für *Drosophila* einzigartig ist die Möglichkeit, rezessiv letale Mutationen stabil in heterozygotem Zustand zu züchten durch den Einsatz von Balancer-Chromosomen. Diese rezessiven Mutationen, die in heterozygotem Zustand in der Regel nicht sichtbar sind, können so untersucht werden (Greenspan, 2004). Auch können mit *Drosophila* großflächig angelegte genetische Screeninguntersuchungen in relativ kurzer Zeit und kostengünstig durchgeführt werden (Leysen & Hassan, 2007).

Für die gezielte Expression bestimmter Gene in bestimmten Geweben kann das GAL4/UAS-System verwendet werden: UAS (upstream activator sequence) ist der Enhancer des nachgeschalteten Gens von Interesse, GAL4 ist ein gewebespezifischer Transkriptionsfaktor (Ashburner, 2005). Darüber hinaus stehen vielfältige weitere Techniken der Genmanipulation zur Verfügung: durch DNA-Transposons wie das P-Element oder piggyBacs können Gene selektiv ausgeschaltet werden, wobei gekoppelte sichtbare genetische Marker (z. B. Augenfarbe) die Mutationen leicht erkennen lassen. Durch den Einbau eines Inteins, welches temperaturabhängig aus dem Protein gespleißt wird, ist ein konditionelles Anschalten eines Gens möglich. Weitere Techniken des

Gen-Knockouts sind die homologe Rekombination, das sogenannte TILLING (targeting-induced local lesions in genomes) und die RNA-Interferenz. Umgekehrt kann durch genomische Rettungskonstrukte das ausgeschaltete Gen wieder in das Genom eingeführt werden, um dessen Funktion noch genauer zu charakterisieren. Dies kann durch P-Element vermittelte Transgenese oder durch sogenanntes Recombineering (recombinogenic engineering) erfolgen (Venken & Bellen, 2005).

Seit dem Jahr 2000 ist das Genom von *Drosophila* vollständig sequenziert, annotiert und öffentlich zugänglich auf der Website [www.flybase.org](http://www.flybase.org). Es kodiert für ungefähr 13600 Gene (Adams et al., 2000).

## **1.2 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus für Erkrankungen insbesondere des Nervensystems**

Auch wenn *Drosophila* ein Insekt ist, ist die Homologie der Gene und des Proteoms zwischen Fliege und Mensch hoch. Molekulare Signalwege, welche die Entwicklung eines komplexen tierischen Organismus steuern, sind ebenfalls hoch konserviert. Dies gilt insbesondere auch für das Nervensystem. So ist das Gehirn von *Drosophila* und Mensch grundlegend ähnlich aufgebaut und es besteht aus den gleichen Grundbausteinen. Neurone und Gliazellen bilden die Hauptbestandteile und viele Eigenschaften dieser Zellen stimmen überein (Leyssen & Hassan, 2007). Das Nervensystem von *Drosophila* besteht aus zahlreichen spezialisierten Zelltypen, die alle Hauptklassen von Ionenkanälen, Rezeptoren und Neurotransmittern nutzen, die auch im Menschen gefunden werden (Celotto & Palladino, 2005). Ebenfalls konserviert sind die Strukturen, die der neuronalen Funktion zu Grunde liegen, wie die Maschinerie für die Erzeugung und Fortleitung von Aktionspotentialen oder die Enzyme und moleku-

laren Komplexe, die an der Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt sind (Reiter et al., 2001).

Wegen dieser grundlegenden Ähnlichkeit der Organismen und der Vorteile der Taufliede liegt es nahe, diese als Modell für menschliche Krankheiten einzusetzen. So stimmen in einer systematischen Blast-Analyse bei 714 untersuchten menschlichen Krankheitsgenen die Gensequenz zu ungefähr 77% mit genomischen Sequenzen in *Drosophila* überein, d.h. ungefähr drei Viertel der menschlichen Krankheitsgene haben eindeutig ein verwandtes Gen in der Taufliede (Reiter et al., 2001). Da die Funktionen der Genprodukte in den allermeisten Fällen ebenfalls ähnlich sind, können in *Drosophila* die Grundlagen menschlicher Krankheiten einschließlich neuronaler Erkrankungen gut modelliert werden.

Die Arbeit mit *Drosophila* ist bereits ein fester Bestandteil in der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Huntington, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Spinozerebellärer Ataxie (Bilen & Bonini, 2005). Diese sind neuropathologisch gut beschrieben. Vielen dieser Krankheiten ist gemeinsam, dass es zu abnormen Akkumulationen von Proteinen kommt, die oft Aggregate ausbilden, und dass spezifische Regionen des Gehirns vornehmlich von der Degeneration betroffen sind (Marsh & Thompson, 2004). Jedoch ist die Pathogenese dieser Krankheitsbilder, also die Entstehung des neuropathologischen Bildes und die Ursache des selektiven Neuronenverlusts, noch relativ unklar. So steht bislang für neurodegenerative Erkrankungen keine effektive und kausale Therapie zur Verfügung.

Es sind bereits viele Fliegenmodelle für Morbus Huntington, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer hergestellt worden, indem das mutierte menschliche Krankheitsgen in *Drosophila* eingeschleust worden ist. Diese Fliegenmodelle weisen tatsächlich eine ähnliche Pathologie zu den menschlichen Erkrankun-

gen auf. Damit kann das Verhalten des veränderten Proteins in vivo charakterisiert und es können Hypothesen über die Pathogenese der Erkrankungen generiert werden. In *Drosophila* können genetische Screeninguntersuchungen durchgeführt werden, um Interaktionspartner von krankheitsrelevanten Proteinen zu identifizieren (Celotto & Palladino, 2005).

In einem Fliegenmodell für die humane Adrenoleukodystrophie führt die Gabe von „Lorenzos Öl“, das Therapeutikum der Wahl für betroffene Patienten, zu einer Reduzierung des neurodegenerativen Phänotyps. Retrospektive Studien zeigen für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, dass ein entsprechender Wirkstoff sowohl in Säugetieren als auch bei Fliegen wirksam ist (Marsh & Thompson, 2004). Damit ist die Taufliege prinzipiell zur Testung therapeutischer Substanzen geeignet. Sie kann als ein schnelles pharmakologisches Screeningsystem genutzt werden, um die Toxizität und Effizienz möglicher neuroprotektiver Substanzen zu erproben (Celotto & Palladino, 2005).

### **1.3 Aufbau des Nervensystems in Embryo, Larve und Imago von *Drosophila melanogaster***

Voraussetzung für die Untersuchung der beschriebenen neurodegenerativen Erkrankungen beziehungsweise der Funktionsweise des Nervensystems ist die genaue Kenntnis des natürlichen Aufbaus des Nervensystems von *Drosophila*. An dieser Stelle wird die Neuroanatomie mit Schwerpunkt auf dem peripheren motorischen Nervensystem beschrieben.

In ihrem Lebenszyklus durchlaufen Taufliegen eine komplette Metamorphose. Nach 17 Embryonalstadien schlüpft die Larve und durchläuft durch Häutungen drei Larvenstadien. Die dritte Larve verpuppt sich und es findet die Metamorphose zur Fliege statt, die schließlich aus der Puppe schlüpft. Dabei gibt es zwei Phasen der Neurogenese: in der Embryonalentwicklung und in der

zwei Phasen der Neurogenese: in der Embryonalentwicklung und in der Metamorphose.

Der Körper des *Drosophila* Embryos ist segmental gegliedert (heteronome Metamerie). Die metameren Regionen bestehen aus drei gnathalen (Mandibula, Maxilla, Labium) Segmenten des Kopfes, drei thorakalen (Pro-, Meso- und Metathorax) und neun abdominalen Segmenten. Ebenso ist das Nervensystem segmental organisiert, s. Abb. 1.1.

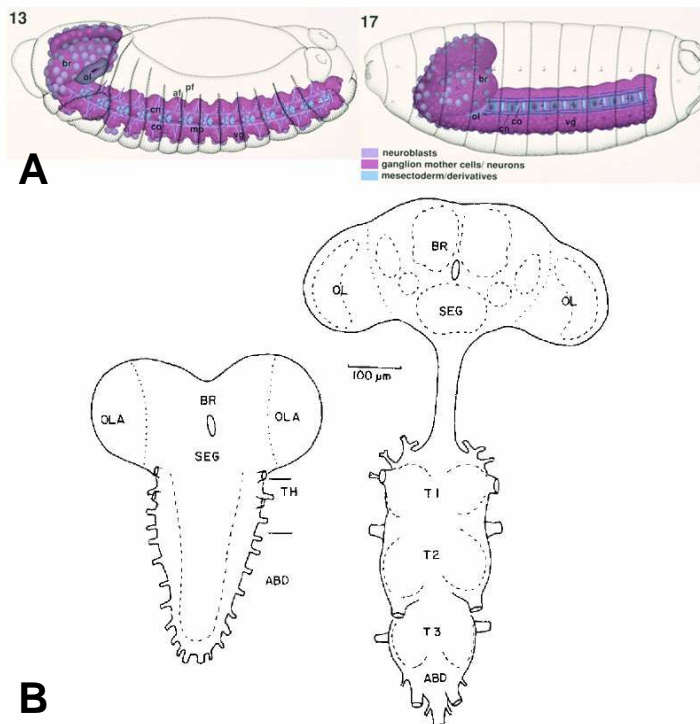


Abb. 1.1 Darstellung des Zentralnervensystems in verschiedenen Entwicklungsstufen mit Kennzeichnung der segmentalen Gliederung. A links Embryo im Stadium 13, rechts Embryo im Stadium 17, B links ZNS im dritten Larvenstadium, rechts adultes ZNS; af anterior fascicle = intersegmentaler Nerv (ISN), br brain, cn connective, co commissure, mp midline neuronal precursors, ol optic lobe, pf posterior fascicle = segmentaler Nerv (SN), vg ventral nerve cord; ABD abdominal neuromeres, BR brain, SEG suboesophageal neuromeres, OL optic lobes, OLA optic lobe anlagen, TH thoracic neuromeres, T1 prothoracic, T2 mesothoracic, T3 metathoracic neuromeres. A aus Hartenstein (1993); B aus Truman (1990).



In der Embryonalentwicklung entsteht das Zentralnervensystem durch die Proliferation von Neuroblasten. Es besteht aus zwei Gehirnhemisphären und dem Ventralganglion, die über paarige Konnektiven verbunden sind. Das Gehirn beinhaltet das supra- und subösophageale Ganglion und an der basalen Oberfläche der Hemisphären liegt auf jeder Seite die Anlage des optischen Lobus. Das Ventralganglion besteht entsprechend der Körpergliederung aus drei thorakalen (pro-, meso- und metathorakalen,  $t_1$ - $t_3$ ) und neun abdominalen ( $a_1$ - $a_9$ ) Segmenten und entspricht dem Rückenmark des Menschen (Hertweck, 1931, beschreibt nur acht Abdominalsegmente und dazugehörige Nerven). Im Kortex des Ventralganglions befinden sich die Zellkörper von Motor- und Interneuronen. Zentral liegt das Neuropil, in das sich die dendritischen Fortsätze der Neurone erstrecken und synaptische Kontakte ausbilden. Dort erhalten die Motoneurone Input von cholinergen Interneuronen. Dabei enthält jedes Neuromer ungefähr 600 Neurone, darunter 35 Motoneurone pro Hemisegment, welche die dazugehörigen 30 Körperwandmuskeln innervieren. Die Segmente sind untereinander durch longitudinale Konnektiven verbunden. Beide Seiten jedes Neuromers werden durch transversale Fasern verbunden, die in einer anterioren und einer posterioren Kommissur verlaufen. Aus jedem Neuromer entspringen ein segmentaler und ein intersegmentaler Nerv. Beide Nerven haben jeweils eine anteriore und eine posteriore Wurzel, die kurz vor Verlassen des Kortex fusionieren. Segmentaler und intersegmentaler Nerv verlassen das Ventralganglion dorsolateral eng aneinander geheftet und sind von einer gemeinsamen Gliahülle umgeben, die aus zwei seriell angeordneten Exitgliazellen besteht. Dieser Nerv wird nach dem Segment des Ventralganglions benannt, in dem die zugehörigen Zellkörper der Neurone liegen. Beim Eintritt in die ventrale schräge Muskulatur verlieren die Nerven ihre gemeinsame Gliahülle und divergieren. Dabei innerviert der intersegmentale Nerv motorisch die

ventrale schräge und longitudinale und die dorsale Muskulatur und sensorisch die dorsalen und lateralen Sensilla. Der segmentale Nerv innerviert motorisch Teile der ventralen und die laterale transverse und schräge Muskulatur und sensorisch die ventralen Sensilla und eines der lateralen Sensilla. Die abdominalen Segmente  $a_2$ - $a_7$  entsenden zusätzlich einen transversalen Nerv, der aus dem Ventralganglion an der dorsalen Mittellinie austritt. Dieser führt die Axone von Motoneuronen und neuroendokrinen Neuronen. Er verläuft ventral an der Segmentgrenze entlang und innerviert die ventrale transverse Muskulatur. Dabei wird jede Muskelfaser durch mindestens zwei Motoneurone polyinnerviert. Die Muskelgruppe, die durch denselben Nervenast innerviert wird, teilt eine gruppenspezifische Innervation durch ein exzitatorisches und ein neuromodulatorisches Neuron (Landgraf & Thor, 2006). Dieses Innervationsmuster spiegelt wieder, dass bei der Larve der gesamte Körper, insbesondere die abdominalen Segmente, mit seinen Muskeln die lokomotorische Funktion trägt.

Die Nerven des Kopfes unterscheiden sich in ihrer Gliederung von den Körpernerven. So entspringen aus dem subösophagealen Ganglion des Gehirns der Labial-, Maxillar- und Lateropharyngealnerv. Mit dem supraösophagealen Ganglion sind der Antennal-, Labral- und Hypopharyngealnerv assoziiert.

Dies ist die Grundorganisation des peripheren Nervensystems; Besonderheiten einzelner Körpersegmente werden bei Campos-Ortega & Hartenstein (1997) im Detail beschrieben.

Die Nerven entwickeln sich, indem motorische Axone aus dem Ventralganglion aussprossen und dabei auf dem transversen Segmentast des Trachealbaums als Trägermaterial entlang zu den Muskelvorläufern wachsen. Aus den peripher entstandenen Sensilla, wo auch die Zellkörper der sensorischen Neurone liegen, sprossen sensorische Axone aus, die ungefähr auf halben Weg zwischen dorsaler und ventraler Mittellinie mit den einwachsenden motorischen

Fasern faszikulieren. So entstehen die gemischt sensorisch-motorischen Körpernerven, s. Abb. 1.2. Erst im Stadium 16 des Embryos, wenn die sensorischen Fasern bereits das ZNS erreicht haben, bildet sich eine gemeinsame Gliahülle um die entstandenen Nerven. Die Nerven werden von den Fortsätzen der peripheren Gliazellen umhüllt und mögen damit eine gewisse Isolierung erfahren, obwohl individuelle Axone nicht umhüllt sind (Burrows, 1996). Die Gliahülle ist wiederum von einer Schicht aus extrazellulärer Matrix umgeben (Hurd & Saxton, 1996; Campos-Ortega & Hartenstein, 1997; Hartenstein, 1993; Truman et al., 1993, Jan & Jan, 1993; Ruiz-Canada & Budnik V, 2006).

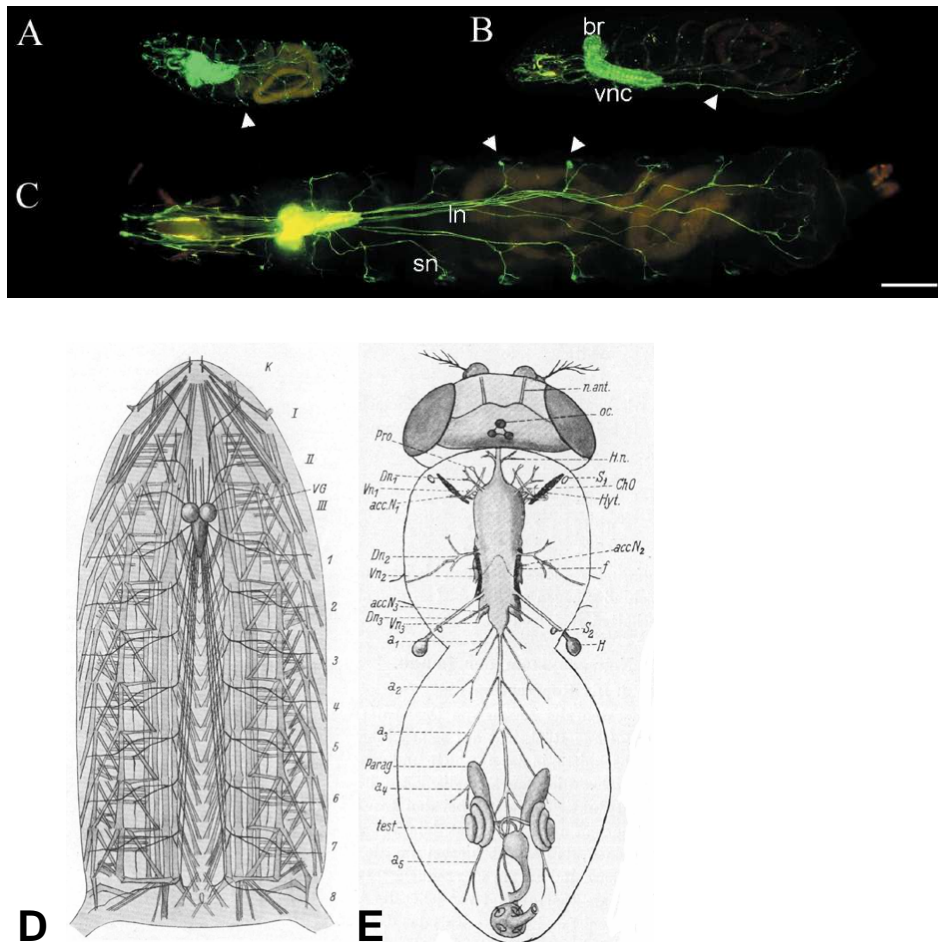


Abb. 1.2 Darstellung des peripheren Nervensystems in verschiedenen Entwicklungsstufen. A-C Expression von grün fluoreszierenden Protein im Nervensystem von *Drosophila*, A erstes Larvenstadium, ventrale Ansicht, B zweites Larvenstadium, Seitenansicht, C drittes Larvenstadium, ventrale Ansicht. br brain, In longitudinal nerve, sn segmental nerve, vnc ventral nerve cord, Pfeilspitzen zeigen auf mutmaßliche periphere Gliazellen, Messbalken 100  $\mu\text{m}$ ; D, E Schematische Zeichnung des Nervensystems im dritten Larvenstadium (D) und der Imago (E). K Kopf, I,II,III thorakale Segmente, 1-8 abdominale Segmente 1-8, VG Ventralganglion. A, B, C aus Sun et al. (1999); D, E aus Hertweck (1931).

Die embryonal entstandenen Sinnesorgane bleiben bei der Entwicklung bis ins dritte Larvenstadium unverändert. Am Ventralganglion ist äußerlich nun keine Segmentierung in die drei thorakalen und neun abdominalen Segmente mehr zu erkennen. Ab dem Embryonalstadium 14 verkürzt sich das Ventralganglion, so dass im dritten Larvenstadium seine posteriore Spitze auf Höhe der Segmente  $a_4$ - $a_5$  zu liegen kommt. Dies verlängert den Verlauf insbesondere der abdominalen Nervenpaare, die ohne Abzweigungen bis zu ihrem entsprechenden Segment verlaufen. Dabei werden sie jeweils von einer Trachee begleitet, die erst in der äußeren Ganglienzellschicht des Ventralganglions endet. Das Gehirn bleibt erhalten, doch es wird eine große Zahl neuer unreifer Neurone gebildet (zweite Neurogenese), die während der Metamorphose reifen (Hertweck, 1931; Hartenstein, 1993; Truman et al., 1993).

Die Larve des dritten Stadiums bildet die Puppe und es findet die Metamorphose zur Fliege statt. Dabei bleibt das zentrale Nervensystem erhalten, verändert jedoch seine Form und enthält schließlich die zehn bis 20-fache Anzahl an Neuronen. Die erhaltenen larvalen Neurone werden in für adulte Tiere spezifische Neuronengruppen integriert. Die optischen Lobi proliferieren und bilden die inneren und äußeren optischen Anlagen. Auch die antennalen Lobi und die Pilzkörper wachsen besonders stark. Der Übergang vom Unterschlundganglion zu den thorakalen Segmenten wird deutlich eingeschnürt. Die drei thorakalen Segmente wachsen stark durch eine massive postembryonale Neuroblastenproliferation und bilden die Hauptmasse des adulten thorako-abdominellen Ganglions. Dies spiegelt die Übertragung der lokomotorischen Funktion von den abdominalen auf die thorakalen Segmente wieder. Der Thorax trägt die sechs Beine und Flügel der Imago, die von entsprechenden Nerven innerviert werden. So werden die abdominalen Segmente zurückgebildet,

wobei die Neurone teilweise absterben. Zurückbleibt ein „Kegel“, der an das dritte thorakale Segment angeheftet ist, s. Abb. 1.2 E.

Die Kopfstrukturen mit den komplexen Sinnesorganen, die bei der Larve invertiert im Thorax verborgen sind, werden umgestülpt. Mit wenigen Ausnahmen degenerieren alle larvalen Sensilla während der Metamorphose und es werden mit der adulten Epidermis neue adulte Sensilla gebildet. Teilweise faszikulieren die auswachsenden Axone der neuen Sinnesorgane mit den entsprechenden larvalen Nerven. Wenn die larvalen Muskeln degenerieren, ziehen einige der larvalen Motoneurone ihre Axone zurück und senden diese später wieder aus, um eine Untergruppe der adulten Muskeln zu innervieren (Hertweck, 1931; Hartenstein, 1993; Truman et al., 1993; Jan & Jan, 1993).

#### **1.4 Die neuromuskuläre Synapse und Aufbau der Aktiven Zone: T-bars und das Protein Bruchpilot**

Der Verlauf der peripheren Nerven ist im vorangehenden Abschnitt beschrieben worden. Nach zentral zum Ventralganglion projizieren die Axone der sensorischen Neurone, die vorwiegend cholinerg sind (Bowman et al., 1999). Nach distal ziehen die Motoneurone, deren Ziel die Aktivierung der Muskulatur durch die Freisetzung von Neurotransmittern an der neuromuskulären Endplatte ist. Hierzu verlassen die Axone der efferenten Neurone an spezifischen Stellen den Nervenast und zweigen sich in der Muskulatur auf, wo sie verschiedene Muskelfasern innervieren. Das Axon verzweigt sich nach Eintritt in den Muskel weiter in terminale Äste, welche die synaptischen Boutons ausbilden. Hier endet die Gliazellhülle und die Boutons werden nur noch von einer Basalmembran bedeckt (Schuster et al., 1996; Prokop et al., 1996). Diese beherbergen hunderte Synapsen mit ihren aktiven Zonen (Wairkar et al., 2009),

s. Abb.1.3. Aktive Zonen sind gekennzeichnet durch das Vorkommen von elektronendichten Strukturen, so genannten T-bars, siehe unten.

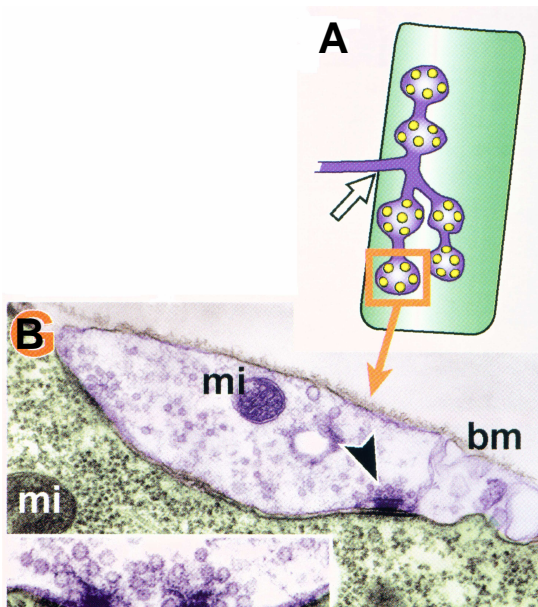


Abb. 1.3 Terminale Aufzweigung der motorischen Nerven und die neuromuskuläre Synapse A Schematische Darstellung der präsynaptischen Boutons: der weiße Pfeil zeigt den Eintritt des Nerven in den Muskel (grün), wo er sich in drei terminalen Äste aufzweigt; jeder Ast bildet zwei synaptische Boutons aus, welche die Synapsen beinhalten (gelbe Kreise), C Ultrastruktur eines Typ-1b-Boutons, Nerventerminale in Blau hervorgehoben, die Pfeilspitze zeigt auf eine Synapse mit T-bar und synaptischen Vesikeln, mi Mitochondrium, bm Basalmembran, das Einsetzbild zeigt eine weitere neuromuskuläre Synapse in stärkerer Vergrößerung. A, B aus Prokop (2006).

Elektronenmikroskopisch werden drei Typen neuromuskulärer Synapsen unterschieden. Dabei werden alle Muskelfasern durch Typ-1-Terminalen innerviert, die den erregenden Transmitter L-Glutamat freisetzen. Diese unterteilt man in Typ-1b-Terminalen mit einem Durchmesser von 3-5  $\mu\text{m}$  (big), die klare Vesikel enthalten, und Typ-1s-Terminalen mit einem Durchmesser von 1-1,5  $\mu\text{m}$  (small), die weniger aktive Zonen beherbergen. Sie enthalten eine Mi-

schung von klaren Vesikeln und Vesikeln mit elektronendichtem Kern (dense core vesicles, DV). Typ-2- und Typ-3-Terminalen haben neuromodulatorische Funktionen und innervieren eine Untergruppe der Muskelfasern. Typ-2-Terminalen enthalten Glutamat und Octopamin und zeigen in der Ultrastruktur klare Vesikel und große elliptische Vesikel mit elektronendichtem Kern, die vermutlich das Octopamin enthalten. Typ-3-Terminalen enthalten Leukokinin-1-like und Insulin-like Peptide (Prokop 2006) und zeigen in der Ultrastruktur vor allem Vesikel mit elektronendichtem Kern, s. Abb. 1.4.

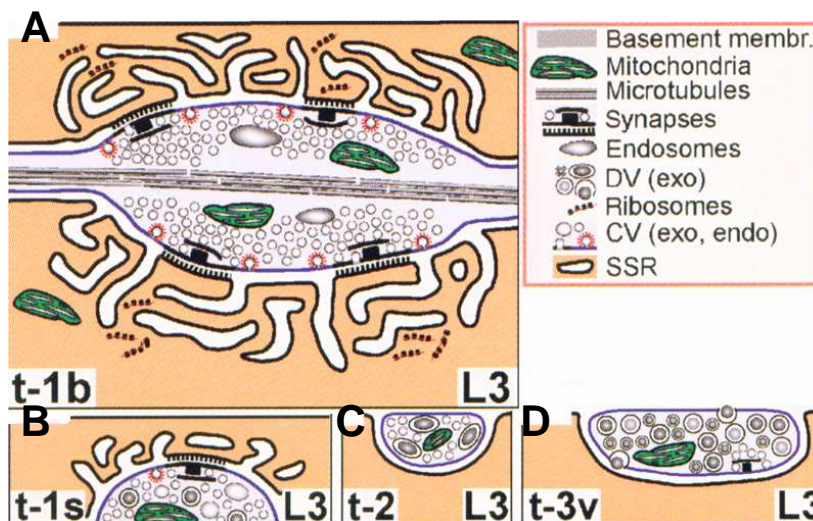


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Ultrastruktur neuromuskulärer Synapsen im dritten Larvenstadium (L3) A Synapse vom Typ-1b und Legende, B Synapse vom Typ-1s, C Synapse vom Typ-2, D Synapse vom Typ-3 CV klare Vesikel, DV dense core Vesikel, SSR subsynaptisches Retikulum. Abb. modifiziert aus Prokop (2006).

Die Transmission an der neuromuskulären Synapse der Taufliede arbeitet nach den gleichen Prinzipien wie die chemische Transmission der Wirbeltiere. Doch im Gegensatz zur neuromuskulären Synapse in Vertebraten, bei der ein Aktionspotential des motorischen Axons durch die Ausschüttung und Wirkung des Transmitters Acetylcholin ein Aktionspotential des Muskels mit nachfol-



gender Kontraktion auslöst, erfolgt in *Drosophila* eine unterschwellige abgestufte Antwort. Somit ähnelt die neuromuskuläre Synapse der Taufliege eher zentralen Synapsen von Vertebraten, auch weil ihr erregender Neurotransmitter L-Glutamat (und nicht Acetylcholin) ist (Schuster et al., 1996; Koh et al., 2000; Prokop, 2006; Schwarz, 2006).

Aktive Zonen mit T-bars (T-bars siehe unten), die von synaptischen Vesikeln umgeben sind, bilden sich in Embryonen nicht nur an der neuromuskulären Schnittstelle, sondern auch an anderen Stellen in Axonen der Motoneurone. Diese können sich ohne postsynaptische Struktur ausbilden, so dass sie nur durch eine Basalmembran von der Hämolymphe getrennt sind und neurohämale aktive Zonen genannt werden. Vermutlich entsprechen sie den Typ3-Terminalen der Larven. Andere aktive Zonen sind in engem Kontakt zu anderen Neuronen als neuroneuronale aktive Zonen. Diese ektopen Synapsen liegen bevorzugt in axonalen Schwellungen und vorwiegend am Axonende (Prokop et al., 1996).

Ein wichtiges Thema in der Erforschung synaptischer Funktionen ist die Aufklärung des molekularen Aufbaus der Cytomatrix der aktiven Zone (CAZ) sowie der Bedeutung dieser Moleküle für die Freisetzung von Neurotransmittern. In Vertebraten kennt man unter anderen sechs große Nicht-Membranproteine der aktiven Zone: Munc13, RIM1, Piccolo, Bassoon, ELKS/CAST/ERC und  $\alpha$ -Liprin. Diese binden aneinander, bilden so einen Komplex an der aktiven Zone und sind mit synaptischen Vesikeln verbunden. Mitunter binden Piccolo und Bassoon aneinander und ERCs binden RIM, Piccolo, Bassoon und  $\alpha$ -Liprin (Südhof, 2004), s. Abb. 1.5. In hippocampalen Synapsen von Vertebraten verbinden Filamente, die CAST und Bassoon enthalten, synaptische Vesikel mit der aktiven Zone oder mit den präsynaptischen Verdichtungen (Ribbons) (Siksou et al., 2007). Diese präsynaptischen Ribbons enthalten unter anderem

Bassoon, Piccolo, RIM und Ribeye (Prokop & Meinertzhagen, 2006). In *Drosophila* gibt es keine Proteine, die homolog zu Piccolo oder Bassoon sind (Zhen & Jin, 2004).

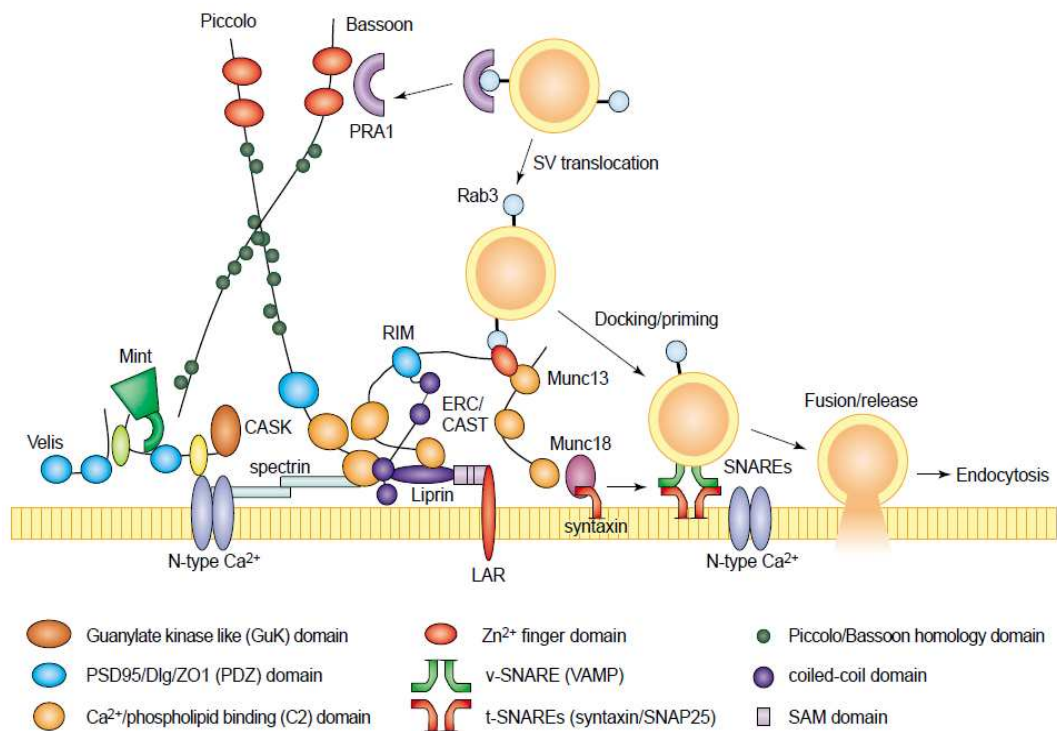


Abb. 1.5 Schema der molekularen Struktur einer glutamatergen Synapse im Zentralnervensystem von Vertebraten. Die gezeigten Proteine sind beteiligt an der Bindung von Calcium-Kanälen und vermitteln das Andocken und die Fusion der synaptischen Vesikel. Abb. aus Zhen & Jin (2004).

Andere Proteine der Exozytosemaschinerie der neuromuskulären Synapse von *Drosophila* entsprechen homologen Proteinen in Vertebraten: So enthalten die synaptischen Vesikel all dieser Organismen eine vesikuläre ATPase, die als Protonenpumpe eine Membranpotentialdifferenz und einen Protonengradienten aufbaut, was die Energie für die Aufnahme der Neurotransmitter in

die Vesikel liefert (Südhof, 2004; Schwarz, 2006). An der neuromuskulären Synapse von *Drosophila* wird L-Glutamat über einen vesikulären Glutamat-transporter in die Vesikel aufgenommen (Mahr & Aberle, 2006). Auch enthalten die Vesikel Cystein String Protein, Synaptotagmin, Synapsin und Synaptobrevin. Synaptotagmin gilt als Sensor für die cytosolische Calcium-Konzentration, der die Freisetzung der Vesikel als Reaktion auf ein Aktionspotential auslöst. Wie bei Vertebraten sind SNARE-Proteine an der Vesikelfusion beteiligt: das vesikuläre SNARE-Protein ist Synaptobrevin und auf der Membran der aktiven Zone befinden sich die Zielmembran-SNARE-Proteine Syntaxin und SNAP25. Unc-13 reguliert Syntaxin und beeinflusst damit seine Fähigkeit, SNARE-Komplexe auszubilden. Unc-13 wiederum bindet an RIM1 (Schwarz, 2006).

In der Ultrastruktur zeigt sich die aktive Zone als Membranverdickung, die mit synaptischen Vesikeln bestückt und von zusätzlichen Ansammlungen synaptischer Vesikel umgeben ist. Bei einigen Synapsen ragen elektronendichte Strukturen in das präsynaptische Zytoplasma (Wagh et al, 2006): diese elektronendichten Projektionen oder synaptischen „Ribbons“ sind evolutionär konserviert. Sie sind bandförmig oder kugelig, ragen 0,5 - 1  $\mu\text{m}$  von der Membran ins Zytoplasma hinein und synaptische Vesikel sind an ihrer Oberfläche angeheftet (Zhai & Bellen, 2004), s. Abb.1.6. Die elektronendichte Projektion in *Drosophila* wird aufgrund ihrer Form T-bar genannt, wobei ungefähr 2/3 der Synapsen einen einzelnen solchen T-bar aufweisen. Aktive Zonen mit T-bars findet man erstmals ab dem Embryonalstadium 17 (Schuster et al., 1996).

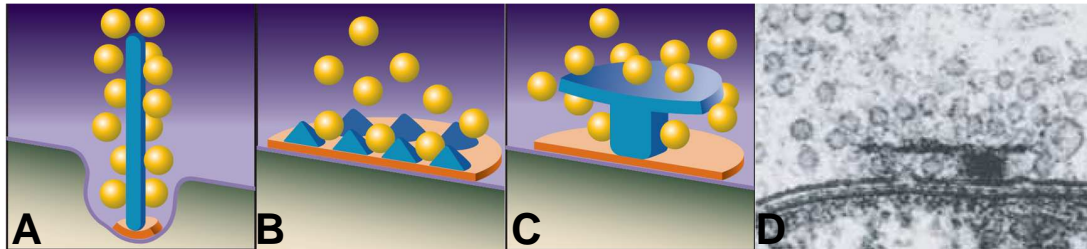


Abb. 1.6 Darstellung von elektronendichten Projektionen in aktiven Zonen verschiedener Organismen. A Ratte, B Mensch: exzitatorische Synapse im Hippocampus, C *Drosophila*: neuromuskuläre Synapse, D elektronenmikroskopisches Bild der neuromuskulären Synapse im dritten Larvenstadium von *Drosophila*. A, B, C aus Zhai & Bellen (2004); D aus Prokop & Meinertzhagen (2006).

Ein T-bar besteht aus einem schmalen oder breiten Podest, das senkrecht auf der Membran der aktiven Zone steht und etwa 50 nm hoch ist. Dieses Podest wird von einer 230 nm breiten Plattform bedeckt, die parallel zur Plasmamembran ausgerichtet ist, wobei zwischen beiden Komponenten eine kleine Lücke besteht. In Verlauf der Embryonalentwicklung ist zunächst das Podest nachweisbar, das dann von der Plattform bedeckt wird. Umgeben wird der T-bar von synaptischen Vesikeln, die einen Durchmesser von 40-45 nm haben (Jia et al., 1993; Prokop et al., 1996; Südhof, 2004). Vesikel in einem Bereich von 150-200 nm um den T-bar sind über elektronendichte Filamente an den T-bar, insbesondere an dessen Plattform, gebunden (Koenig & Ikeda, 1999). Es können auch pleiomorphe und Vesikel mit elektronendichten Kern unter den umgebenden Vesikeln sein. Es gibt Synapsen ohne T-bar oder mit zwei oder drei T-bars. Man hält T-bars für eine Spezialisierung, die der schnellen Zulieferung von synaptischen Vesikeln zur präsynaptischen Membran dienen, beispielsweise indem sie wie ein Förderband arbeiten. Dabei können sich erfahrungsbasiert zumindest in Photorezeptorsynapsen Größe und Anzahl der T-bars innerhalb von Minuten verändern (Fröhlich & Meinertzhagen, 1982; Pro-

Prokop et al., 1996; Prokop & Meinertzhagen, 2006; Prokop, 2006; Fouquet et al., 2009). Bislang ist als Bestandteil dieser elektronendichten Strukturen nur Bruchpilot identifiziert worden (Fouquet et al., 2009).

Bruchpilot ist ein ungefähr 200 kDa großes Nervensystem-spezifisches Protein, das in Insekten hochkonserviert ist. Entdeckt wurde es als Antigen des monoklonalen nc82-Antikörpers (Hofbauer, 1991), der sehr gut aktive Zonen markiert, s. Abb. 1.7, und ein Epitop des C-Terminus von Bruchpilot erkennt.

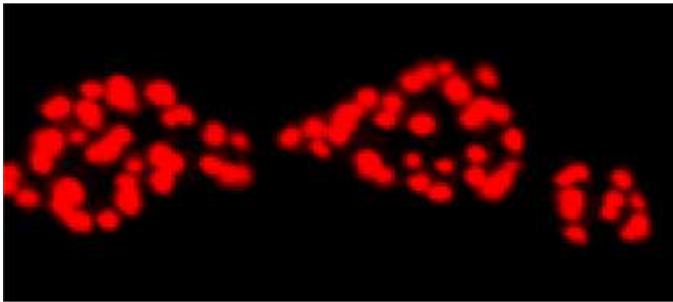


Abb. 1.7 Darstellung der synaptischen Boutons durch den nc82-Antikörper. Abb. aus Wagh (2005).

Der N-Terminus von Bruchpilot ist homolog zu ELKS/CAST/ERC in Vertebraten, so dass Bruchpilot als Mitglied der ERC/CAST-Proteinfamilie gilt, und enthält keine Transmembrandomänen. Der C-Terminus ist in seiner Struktur ähnlich zu Cytoskelettproteinen, wie Plektin oder Myosin-schwere-Kette. Bruchpilot ist notwendig für die histaminerge Transmission in den Synapsen der Lamina adulter *Drosophila*e und für die evozierte Glutamatfreisetzung an der neuromuskulären Synapse (Wagh et al., 2006). Ohne Bruchpilot fehlen in der Ultrastruktur die T-bars in den Photorezeptoren und an der neuromuskulären Synapse. Der Abstand zwischen Calciumkanälen und synaptischen Vesikeln ist für die Vesikelexozytose bedeutsam. Bruchpilot fördert die Anhäufung von Calciumkanälen an der Membran der aktiven Zone und bringt diese

damit in die Nähe der synaptischen Vesikel (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006). Das Bruchpilot-Molekül weist eine lang gestreckte filamentöse Konformation auf und ist Bestandteil der T-bars. Die N-Termini befinden sich nahe an der Plasmamembran eng beieinander und interagieren mit den Cacophony-Calcium-Kanälen. Die C-Termini ragen ungefähr 100 nm weit ins Zytoplasma und fächern sich auf, so dass sich eine trichterförmige Struktur ergibt, s. Abb.1.8. Dabei ist der N-Terminus wichtig für die Ausbildung regelrechter vollständiger T-bars, während der C-Terminus notwendig für den Zusammenbau des T-bars selbst ist (Fouquet et al., 2009).

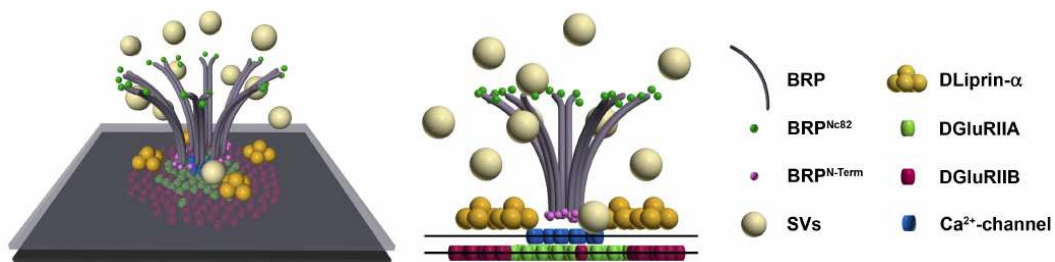


Abb. 1.8 Modell des Aufbaus der aktiven Zone an der neuromuskulären Synapse. Abb. modifiziert aus Fouquet et al. (2009).

Fehlen die letzten 17 C-terminalen Aminosäuren des Bruchpilot-Proteins, sind die T-bars an der neuromuskulären Synapse weiterhin regelrecht aufgebaut, jedoch ohne dass synaptische Vesikel über elektronendichte Brücken daran angebunden sind (Hallermann et al., 2010).

## 1.4 Axonaler Transport

Hier werden Mechanismen des axonalen Transports besprochen, weil die in dieser Arbeit untersuchte *Drosophila*-Mutante Proteinansammlungen in ihren larvalen Nerven aufweist, die gegebenenfalls durch einen axonalen Transportdefekt entstehen könnten.

Die axonale Transportmaschinerie dient dem Transport von Proteinen, Organellen, Membranen und Ähnlichem vom Zellkörper, dem Ort der Proteinsynthese, in das Axonende und vermittelt auch den retrograden Transport von der axonalen Endigung zum Soma. Hierbei werden entlang der Mikrotubuli vollgepackte Transportvesikel durch das Motorprotein Kinesin vom Zellkörper zu den synaptischen Endigungen transportiert (anterograder Transport). Kinesin ist ein Heterotetramer aus zwei leichten und zwei schweren Ketten (Gindhart et al., 1998). Der Transport vom Axonende zum Zellkörper (retrograder Transport) erfolgt mit Hilfe des Motorproteins Dynein, s. Abb.1.9.

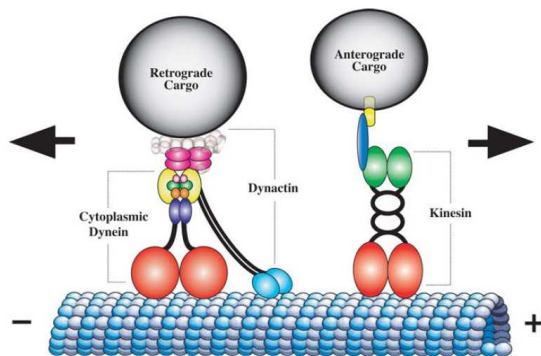


Abb. 1.9 Schematische Darstellung der Maschinerie des axonalen Transports. Abb. aus Duncan & Goldstein (2006).

Der Phänotyp von *Drosophila*-Mutanten, bei denen der axonale Transport beeinträchtigt ist, ist gut charakterisiert. Mutationen jeweils der leichten oder schweren Kette von Kinesin, des mit der schweren Kette von Kinesin assoziierten Proteins UNC-76, des mit Dynein assoziierten Proteins LC7 (roadblock), der schweren Kette von Dynein oder Liprin- $\alpha$ , einem Gerüstprotein das auch den axonalen Transport reguliert, zeigen vergleichbare Phänotypen (Hurd & Saxton, 1996, Gindhart et al., 1998, Gindhart et al., 2003, Bowman et al., 1999, Martin et al., 1999, Miller et al., 2005). In den Axonen akkumulieren Proteine der Präsynapse wie Synaptotagmin, Cystein String Protein, Cholin-Acetyltransferase oder Motorproteine der Kinesin I und II Familie. Bei allen Mutationen werden der anterograde und der retrograde Transport beeinträchtigt und es kommt zur posterior betonten Paralyse der Larven. In der Ultrastruktur sieht man axonale Schwellungen, die mit Mitochondrien, kleinen klaren Vesikeln, zisternalen Membranen, prälysosomalen Vakuolen und multivesikulären Körpern gefüllt sind (Hurd & Saxton, 1996, Bowman et al., 1999, Martin et al., 1999, Miller et al., 2005).

### **1.5 Die Rolle von SR-Proteinen und SR-Protein-spezifischen Kinasen beim Spleißen**

Die Genexpression der Zellen eines Organismus muss genau reguliert und auf die Gewebeart, äußere Signale und Entwicklungsprozesse abgestimmt werden (Fu, 1995). Hierfür ist unter Anderem der nukleäre Prozess des Spleißens von Prä-Boten-RNA verantwortlich, der kotranskriptionell durch das Spleißosom statt findet. Beim konstitutiven Spleißen werden internale nicht-kodierende Sequenzen (Introns) aus dem Vorläufer der Boten-RNA (mRNA) entfernt und somit deren Translation ermöglicht. Alternatives Spleißen führt durch Entfernung von unterschiedlichen Exons zur Herstellung verschiedener Proteiniso-



formen eines Gens und wird zeitlich und örtlich reguliert (Long & Cáceres, 2009; Misteli et al., 1998; Izquierdo & Valcárcel, 2006; Hastings & Krainer, 2001).

Das Spleißosom ist eine dynamische Ribonuklein-Protein-Nanomaschine, die aus über 100 Proteinen und RNAs aufgebaut ist. Fünf Uridin-reiche kleine nukleäre Ribonukleoproteine (snRNP) U1, U2, U4, U5 und U6 bilden den Hauptbestandteil des (Major-)Spleißosoms, das sich schrittweise aufbaut, die Spleißstellen erkennt und die Spleißreaktion katalysiert (Staley & Woolford, 2009; Wahl et al., 2009). (Auf das Minor-Spleißosom möchte ich hier nicht näher eingehen, s. Wahl et al. 2009.) An jedem Intron bildet sich das Spleißosom von neuem.

Ein Intron besteht aus der 5'-Spleißstelle, der eigentlichen Intronsequenz, die beim Menschen durchschnittlich 10-20-mal so lang ist wie die zugehörigen Exonsequenzen, der Verzweigungsstelle (branchpoint), gefolgt von der Polypyrimidinsequenz, und endet mit der 3'-Spleißstelle, s. Abb. 1.10 A (Izquierdo & Valcárcel, 2006; Wahl et al., 2009; Hastings & Krainer, 2001). Die Entfernung des Introns erfolgt durch zweifache Umesterung. Zuerst wird die Phosphodiesterbindung an der 5'-Spleißstelle von der 2'-Hydroxylgruppe des Adenosins der Verzweigungsstelle angegriffen, wodurch ein freies 5'-Exon und ein 3'-Exon mit Intron-„Lasso“ entsteht. Die 3'-Hydroxylgruppe des 5'-Exons attackiert die Phosphodiesterbindung an der 3'-Spleißstelle, wodurch die beiden Exons miteinander verbunden und das Intron-„Lasso“ herausgeschnitten werden (Wahl et al., 2009). Die Intron-RNA wird rasch abgebaut.

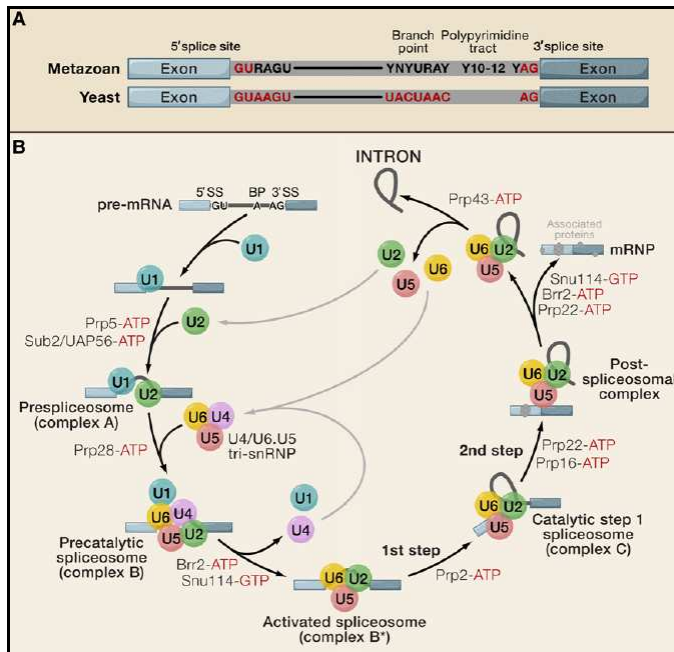


Abb. 1.10 Aufbau des Spleißosoms. A Konservierte Sequenzelemente der mRNA in Metazoen und Hefe. Exons in blau, Introns in grau; A Adenosin, C Cytosin, G Guanin, N beliebiges Nukleotid, R Purin, U Uracil, Y Pyrimidin, B Auf- und Abbauzyklus des Spleißosoms. 5'ss 5'-Spleißstelle, BP Verzweigungsstelle, 3'ss 3'-Spleißstelle, GTPase Snu114, RNA-abhängige ATPasen / Helikasen vom DExD/H-Typ: Sub2 / UAP56, Prp5, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22, Prp43. Abb. aus Wahl et al. (2009).

Der Aufbau des Spleißosoms beginnt mit der Bindung von U1 an die 5'-Spleißstelle des Introns durch Basenpaarung und unter Beteiligung von Kofaktoren. Der U2 snRNP Hilfsfaktor U2AF und das branchpoint-binding-Protein binden an die Verzweigungsstelle, die Polypyrimidinsequenz und die 3'-Spleißstelle. Diese Konstellation wird E(early)-Komplex genannt. Durch ATP-abhängige Bindung von U2 an den Verzweigungspunkt entsteht der A-Komplex. U4, U5 und U6 verbinden sich zu einem U4/U6/U5-tri-snRNP und binden an den Komplex. Damit entsteht der katalytisch noch inaktive Komplex B und es kommt zur starken Umgestaltung des RNA-Protein-Komplexes: U6

ersetzt U1 an der 5'-Spleißstelle; U6 interagiert mit U2, U5 und überbrückt die Spleißstellen und U1 und U4 werden destabilisiert oder freigesetzt. Dies ist der B\*-Komplex. Nun führt das aktivierte Spleißosom den ersten katalytischen Schritt aus, wodurch der C-Komplex entsteht. Nach weiteren Umlagerungen erfolgt der zweite katalytische Schritt und das Spleißosom dissoziiert, s. Abb. 1.10 B (Wahl et al., 2009; Bourgeois et al., 2004; Graveley 2000).

Die beschriebenen Reaktionen laufen nur durch das Zusammenspiel der snRNP mit vielen weiteren Hilfsfaktoren ab. Eine Gruppe dieser Spleißfaktoren sind Serin-Arginin-reiche(SR)-Proteine. Dies sind evolutionär hochkonservierte Phosphoproteine, die essentiell sind für konstitutives Spleißen und alternatives Spleißen regulieren (Roth et al., 1991; Izquierdo & Valcárcel, 2006). Sie enthalten alle eine C-terminale Domäne mit einem hohen Anteil an Arginin-Serin-(RS)-Dipeptiden, RS-Domäne genannt, welche Proteininteraktionen, z. B. der SR-Proteine untereinander (Xiao & Manley, 1997), vermittelt. N-terminal befinden sich eine oder zwei RNA-Bindungsdomänen, die RNA-Sequenzen erkennen. Unterschiedliche SR-Proteine erkennen teilweise die gleichen RNA-Sequenzen (Zahler et al., 1992; Manley & Tacke, 1996; Long & Cáceres, 2009; Graveley, 2000). Dabei ähnelt ein individuelles SR-Protein eher dem entsprechenden SR-Protein in einer anderen Spezies als anderen Mitgliedern der SR-Proteinfamilie (Cáceres et al., 1998). Das Genom von *Drosophila* kodiert für sieben SR-Proteine (SC35, ASF/SF2, B52, RBP1, RBP1-like, X16, SRp54), die alle ein homologes Protein im Menschen haben (Ge et al., 1991; Fu, 1995; Mount & Salt, 2000; Barbosa-Morais et al., 2006; Wan et al., 2008).

Während viele Proteine bei der Umlagerung der Komplexe des Spleißosoms ausgetauscht werden, bleiben SR-Proteine während des gesamten Spleißzyklus am Spleißosom gebunden (Wahl et al., 2009). SR-Proteine sind essentiell für konstitutives Spleißen, weil sie notwendig für den Aufbau des E-

Komplexes sind (Bourgeois et al., 2004). Sie sind an der Bindung von U1 an die 5'-Spleißstelle (Zahler et al., 1995) und der Brückenbildung zwischen der 5'- und 3'-Spleißstelle beteiligt (Fu, 1995). Sie wirken an der Rekrutierung von U4/U6/U5-tri-snRNP zur 5'-Spleißstelle mit (Xiao & Manley, 1998). Auch sind sie notwendig für die Spaltung der 5'-Spleißstelle und die Ausbildung der „Lasso“-Struktur des Introns (Krainer et al., 1990). SR-Proteine erkennen exoni-sche Spleißverstärker (exonic splicing enhancer), welche die Förderung des konstitutiven und alternativen Spleißens vermitteln (Hastings & Krainer, 2001; Allemand et al., 2002). Dabei wird die Verwendung der aufwärts gelegenen 3'-Spleißstelle begünstigt (Izquierdo & Valcárcel, 2006). Bei der Mitwirkung am konstitutiven Spleißen sind SR-Proteine in ihrer Funktion vermutlich redundant, zumindest in-vitro (Bourgeois et al., 2004; Fu, 1995).

Die Auswahl alternativer Spleißstellen hängt von der kompetitiven Bindung von SR-Proteinen und ihren Antagonisten, in *Drosophila* z. B. Repressor Splicing Factor 1 (RSF1), an die Prä-mRNA ab. Die Konzentration der Gegenspieler im Zellkern kann verändert werden, z. B. durch genotoxischen Stress, was die Auswahl der Spleißstellen verändert (Hastings & Krainer, 2001; Allemand et al., 2002). SR-Proteine beeinflussen die Auswahl der 5'-Spleißstelle beim alternativen Spleißen, indem sie die Bindung von U1 an die Vorläufer-mRNA vermitteln, und wirken an der Auswahl der 3'-Spleißstelle mit (Fu et al., 1992; Fu, 1995). Die Funktion der SR-Proteine beim alternativen Spleißen ist nicht redundant, sondern sie zeigen unterschiedliche Substratspezifitäten. Die starke Konservierung der SR-Proteine über Speziesgrenzen hinweg spricht auch gegen eine funktionelle Redundanz (Fu et al., 1992; Fu, 1993; Long & Cáceres, 2009). Die Bedeutung der akkuraten Regulation und Funktionsfähigkeit des alternativen Spleißens für den Organismus zeigt sich in dessen Störun-

gen, die zu menschlichen Erkrankungen wie der Neurofibromatose Typ 1 führen können (Hastings & Krainer, 2001).

Die beschriebenen Funktionen der SR-Proteine unterliegen der zellulären Regulation. Neben der Steuerung ihrer gewebespezifischen Expression bzw. ihres Abbaus (Gui et al., 1994b), ist die reversible Phosphorylierung der Serinreste in der RS-Domäne ein weiterer Regulationsmechanismus. Dabei wird nur Serin und kein Threonin oder Tyrosin phosphoryliert (Roth et al., 1991; Manley & Tacke, 1996). SR-Protein-spezifische Kinasen (SRPK) phosphorylieren SR-Proteine (Gui et al., 1994a; Gui et al., 1994b; Colwill et al., 1996; Kuroyanagi et al., 1998; Wang et al., 1998). Neben SRPKs phosphorylieren weitere Kinasen SR-Proteine, wie die Cdc2-like (Clk/Sty)-Kinasen (gehören zur Familie der LAMMER-Kinasen, Bullock et al., 2009) (Wang et al., 1998), DNA-Topoisomerase 1 (Rossi et al., 1996), Prp4 Kinase (Wahl et al., 2009), Glykogen-Synthase-Kinase 3, Proteinkinase B (Akt2) und Proteinkinase A $\alpha$  und A $\beta$  (Stamm 2008).

SR-Proteine befinden sich regulär im Zellkern, wobei einige zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln (Cáceres et al., 1998). Die Aufnahme in den Kern erfolgt über Transportin TRN-SR1/2, die zur Importin- $\beta$ -Familie gehören und nur an der RS-Domäne phosphorylierte SR-Proteine in den Kern importieren (Allemand et al., 2002). Im Zellkern werden Spleißfaktoren in den sogenannten Kernflecken (nuclear speckles) gespeichert, dynamischen membranfreien Strukturen (Ma et al., 2009). Dabei enthält die RS-Domäne das Zielsignal für die Lokalisation der SR-Proteine zu den Kernflecken (Misteli et al., 1998; Gui et al., 1994a). Die Transkription findet außerhalb der Kernflecken statt. Die SR-Proteine werden durch Phosphorylierung der RS-Domäne durch SRPK1/2 oder Clk-Kinasen (Stojdl & Bell, 1999) aus den Kernflecken freigesetzt und zu den Stellen der aktiven Transkription rekrutiert, wo sie über ihre RNA-

Bindungsdomäne mit der Prä-mRNA interagieren (Gui et al., 1994a; Xiao & Manley, 1997; Modell als Abb. bei Stamm 2008). Die Phosphorylierung ist auch wichtig für die Interaktion mit der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II, um die Transkription mit dem Spleißen zu koordinieren (Ding et al., 2006). Der Spleißvorgang und seine Regulation erfordern einen gut abgestimmten Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Zyklus (Xiao & Manley, 1997). Phosphorylierte SR-Proteine sind notwendig für den Aufbau des Spleißosoms (Fu 1995; Cao et al., 1997) und den Übergang von Komplex A in Komplex B (Xiao & Manley, 1998), wobei die Phosphorylierung der RS-Domäne unspezifische Interaktionen mit RNA verhindert und Protein-Protein-Interaktionen fördert (Xiao & Manley, 1997). Damit die erste Umesterung stattfinden kann, muss eine Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase 1 (Shi et al., 2006; Stamm, 2008), die ein entsprechendes homologes Protein in *Drosophila* aufweist (Morrison et al., 2000), erfolgen (Cao et al., 1997). Allerdings inhibiert sowohl Hyper- als auch Hypophosphorylierung der SR-Proteine den Spleißvorgang. Dies spricht für die Notwendigkeit eines bestimmten Phosphorylierungsniveaus, das reguliert werden kann (Prasad et al., 1999). SRPK1/2 sind notwendig für den Aufbau und die katalytische Aktivierung des Spleißosoms (Mathew et al., 2008). Phosphorylierung verändert auch das alternative Spleißen (Cao et al., 1997; Cáceres et al., 1998).

Nach dem Spleißen wirken SR-Proteine als Adaptoren für den Export der gespleißten mRNA aus dem Zellkern, von der sie im Zytoplasma dissoziieren. Dabei wirkt die Phosphorylierung der SR-Proteine im Zytoplasma als Umschalter (switch) zwischen Abladen der mRNA und Reimport in den Zellkern (Cáceres et al., 1998; Ding et al., 2006).

Die beschriebenen Phosphorylierungsreaktionen erfolgen neben anderen Kinasen durch SRPKs. In Säugern gibt es drei SRPK-Formen: in der Maus

kommt SRPK1 ubiquitär vor; SRPK2 wird vorwiegend in Lunge, Hoden und Gehirn exprimiert (Kuroyanagi et al., 1998), während SRPK3 muskelspezifisch ist und ihre Elimination zu einer centronucleären Myopathie führt (Nakagawa et al., 2005). In *Drosophila* gibt es vier *Srpk*-Gene: *CG8174*, *CG9085* (*Srpk79D*), *CG8565* und *CG1658* (*Doa*) (Mount & Salz, 2000; Morrison et al., 2000; Nieratschker et al., 2009). SRPKs haben zwei hochkonservierte Domänen jeweils am N- und am C-Terminus, welche zusammen die Kinasedomäne bilden (Lukasiewicz et al., 2007; Liu et al., 2009). Dazwischen liegt eine besondere 250-300 Aminosäuren lange Zwischensequenz (spacer / insert), in der sich die SRPKs unterscheiden und die für die subzelluläre Lokalisation der Kinasen verantwortlich ist (Aubol et al., 2002; Ding et al., 2006). Dabei enthalten SRPK1/2 wohl auch Kernlokalisationssequenzen (Kuroyanagi et al., 1998). Die Clk-Kinasen und SRPK1/2 sind im Zellkern lokalisiert, SRPK1 zusätzlich in den Kernflecken und SRPK1/2 auch im Zytoplasma (Wang et al., 1998). Elemente der Zwischensequenz vermitteln die Verankerung der Kinasen im Zytoplasma (Ding et al., 2006) und nach deren Elimination häufen sie sich in den Kernflecken an (Ma et al., 2009). Die Zwischensequenz dient darüber hinaus als Andockregion für Co-Chaperone, die den Eintritt von SRPK1 in den Zellkern regulieren. Stress-Signale führen zur Freisetzung von SRPK1 aus dem Chaperonkomplex mit Hsp90 (heat shock protein 90) und zu ihrer Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern. Dort führt die Kinase über eine veränderte Phosphorylierung von SR-Proteinen zur Auswahl alternativer Spleißstellen (Ma et al., 2009; Zhong et al., 2009).

Obwohl die RS-Domäne von SR-Proteinen gleichartig erscheint, binden verschiedene Kinasen an individuelle Regionen und phosphorylieren diese (Stamm, 2008). So haben SRPK1 und SRPK2 in vivo unterschiedliche Substratspezifitäten (Mathew et al., 2008). Außerdem phosphorylieren SRPKs nur

Serinreste, die direkt neben Arginin liegen, während Clk-Kinasen auch Serin neben Lysin oder Prolin als Substrat verwenden (Colwill et al., 1996; Bullock et al., 2009). Dabei phosphoryliert SRPK1 nur 10-12 der N-terminalen Serinreste in ASF/SF2, während Clk/Sty die gesamte RS-Domäne phosphorylieren kann (Lukasiewicz et al., 2007; Long & Cáceres, 2009).

Neben den SR-Proteinen können SRPKs auch den LaminB-Rezeptor, ein Protein der Kernlamina, phosphorylieren (Nakagawa et al., 2005).



### 1.7 Die SR-Protein-spezifische Kinase SRPK79D in *Drosophila*

Das Protein Bruchpilot wurde in den Arbeitsgruppen von E. Buchner und S. Sigrist identifiziert und gründlich untersucht. Auf der Suche nach Interaktionspartnern von Bruchpilot wurden verschiedene *Drosophila* Mutanten mit P-Element-Insertionen auf Veränderungen im Verteilungsmuster dieses Proteins untersucht. In den Larven einer dieser Mutanten wiesen die Nervenfaserbündel immunhistochemisch Akkumulationen von Bruchpilot-Protein auf, s. Abb. 1.11 (Nieratschker et al., 2009; Johnson et al., 2009).

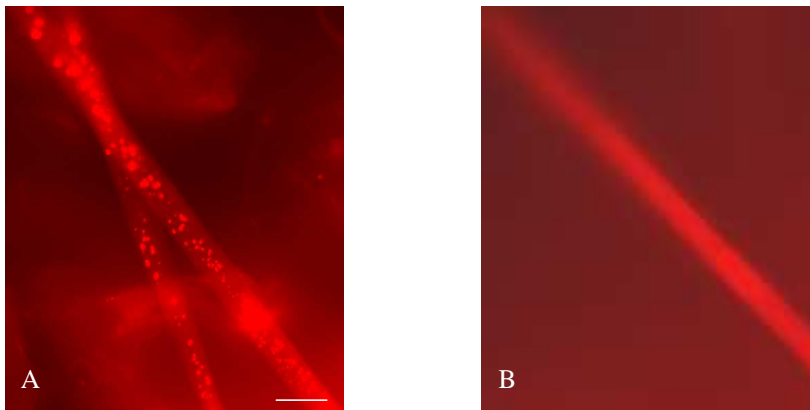


Abb. 1.11 Larvale ventrale Nerven mit Färbung gegen Bruchpilot (nc82). A hypomorphe *Srpk79D*<sup>P1</sup> mit Akkumulationen von Bruchpilot-Protein, B Wildtyp, Größenbalken 10  $\mu$ m. A, B aus Nieratschker Workgroup Seminar Mai 2008.

So wurde das Gen eines Enzyms entdeckt, das homolog zu den SR-Protein-spezifischen Kinasen (SRPK) in Säugetieren ist. Entsprechend wird dieses Gen *Srpk79D* (= *CG11489*) genannt, denn es befindet sich auf dem linken Arm des dritten Chromosoms in der genomischen Region 79D4. Von dem Gen werden vier alternativ gespleißte Transkripte RC, RF, RB und RE hergestellt, die in die Proteine PC, PF, PB und PE translatiert werden. Die Struktur des

Genlokus, die Transkripte der vier Isoformen und die Deletionsstelle der Nullmutante zeigt Abb. 1.12.

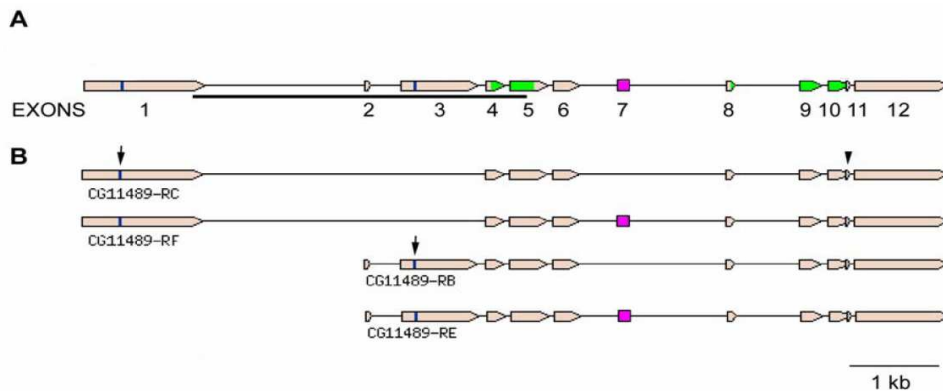


Abb. 1.12 Struktur des Genlokus von *Srpk79D* und Darstellung der Transkripte. A Darstellung des Gens von *Srpk79D* mit Exons und Introns, die schwarze Linie darunter zeigt die Deletion in der *Srpk79D*-Nullmutante an; B Darstellung der vier Transkripte der *Srpk79D*, die zwei Gruppen der Transkripte RC/RF und RB/RE benutzen unterschiedliche Transkriptions- und Translationsstartpunkte, auf die der Pfeil weist, und werden alternativ gespleißt; die Pfeilspitze weist auf das Stop-Codon; das rosa Quadrat markiert das neu identifizierte Exon 7. Abb. modifiziert aus Nieratschker et al. (2009).

Die Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit der menschlichen SRPK3 beträgt 65% und mit der SRPK2 54% (Nieratschker et al., 2009).

Es wurde eine Nullmutante der *Srpk79D* hergestellt (Nieratschker, 2008). Die Ausschaltung der *Srpk79D* führt zu einer reduzierten Lebenserwartung der Fliegen und beeinträchtigt das Laufen und die Flugfähigkeit. Immunhistochemisch gibt es keinen Hinweis dafür, dass die Bruchpilot-Akkumulationen in den Nerven durch eine generelle Beeinträchtigung des axonalen Transports verursacht werden, weil keine Ansammlungen anderer Proteine (Synaptotagmin, Cystein String Proteins, Synapsin oder Synaptobrevin) in den Nerven nachzuweisen sind. Auch weisen die Larven keine posteriore Paralyse auf (Bowman et al., 1999; Miller et al., 2005).

Die Struktur der neuromuskulären Synapse und die Anzahl der aktiven Zonen ist in der *Srpk79D*-Nullmutante nicht verändert. Auch zeigen elektrophysiologische Untersuchungen keine Beeinträchtigung in der synaptischen Transmission (Nieratschker et al., 2009; Johnson et al., 2009).

Die Lokalisation der Kinasen im Nervensystem kann nicht durch Antiseren gezeigt werden, weil ihre Expression dafür vermutlich zu gering ist. Aber im Nervensystem überexprimierte PC- und PF-Isoformen kolokalisieren mit Bruchpilot an der präsynaptischen aktiven Zone und finden sich homogen verteilt im Perikaryon. Die überexprimierte PB-Isoform befindet sich in diskreten Strukturen der Perikarya (Nieratschker et al., 2009). In einer anderen Arbeitsgruppe wurde ebenfalls gefunden, dass die SRPK79D mit Bruchpilot in den Nerven und in der präsynaptischen aktiven Zone kolokalisiert (Johnson et al., 2009).

### **1.8 Zielsetzung**

Im animalischen Nervensystem kommunizieren zwei Nervenzellen bzw. Nerv und Muskel mittels Synapsen miteinander. Dies erfordert neben vielen anderen Bedingungen eine funktionsfähige präsynaptische aktive Zone. Im Nervensystem von *Drosophila melanogaster* ist das präsynaptische Protein Bruchpilot, das homolog zu ELKS/CAST/ERC in Vertebraten ist, Bestandteil der T-bars und wichtig für die Exozytose der synaptischen Vesikel. Bislang ist nicht bekannt, wie es reguliert wird und mit welchen anderen Proteinen der CAZ es interagiert. Auf der Suche nach Interaktionspartnern wurde die SR-Proteinspezifische Kinase SRPK79D identifiziert. Ohne dieses Enzym akkumuliert Bruchpilot-Protein in den ventralen Nervenfaserbündeln von *Drosophila* Larven. Zur Identifizierung der diesem Phänotyp zu Grunde liegenden Mechanis-

men und der physiologischen Funktion der SRPK79D im Nervensystem soll diese Arbeit beitragen.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen soll die zelluläre Verteilung des SRPK79D-Proteins bzw. der Kinase-Isoformen mit verschiedenen Methoden untersucht werden. Hierfür soll der vorliegende Antikörper gegen die PB-Isoform der SRPK79D affinitätsgereinigt werden. Die Expression von *Srpk79D*-mRNA im Nervensystem von Embryonen soll mittels in-Situ-Hybridisierung aufgeklärt werden.

Zum anderen sollen die Akkumulationen von Bruchpilot in den Nervenfaserbündeln von Larven untersucht werden. Es erfolgt eine genaue morphologische Analyse der Ultrastruktur der Bruchpilot-Akkumulationen in den larvalen Nervenfaserbündeln der *Srpk79D*-Nullmutante mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und ein Vergleich mit der Ultrastruktur des Wildtyps. Dabei werden die Unterschiede zwischen Wildtyp und der *Srpk79D*-Nullmutante auch quantifiziert.

Zusätzlich soll die Verteilung von synaptischen Komponenten in den larvalen Nervenfaserbündeln analysiert und nach weiteren Komponenten der Bruchpilot-Aggregate mit Hilfe immunhistochemischer Methoden gesucht werden. Dabei wird auch untersucht, ob Bruchpilot in den Aggregaten trunkiert oder als vollständiges Protein vorliegt.

## 2 Material

### 2.1 Lebendmaterial

Fliegenstämme:

*Drosophila melanogaster* w<sup>1118</sup>

*Drosophila melanogaster* *SrpK79D*<sup>VN100</sup> Vanessa Nieratschker

Bakterienstämme:

*E. coli* BL 21

### 2.2 Vektoren

pET-28a (3. Exon der *RB*-Isoform  
der *SrpK79D*)

Novagen, modifiziert von V.  
Nieratschker (Nieratschker 2008)

pCR®II-TOPO® (letztes Exon der  
*SrpK79D*)

Invitrogen, TOPO TA Cloning,  
modifiziert von V. Nieratschker  
(Nieratschker 2008)

### 2.3 Chemikalien

Acrylamid 4K-Lösung (30 %) Mix 29 : 1

AppliChem, Darmstadt

Agar, bacteriological grade

BioMedicals, Inc.

Ampicillin-Natriumsalz

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Ammoniumpersulfat, f. d. Molekularbiologie

AppliChem, Darmstadt

BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)

Roche, Mannheim

Bleicitrat

Agar Scientific, Berkshire;

Blocking reagent (für in situ)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roche, Mannheim
	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
Natrium-Cacodylat	AppliChem, Darmstadt
Chloroform, p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant G Blue R250	Sigma, St. Louis
D(+)-Glucose-Monohydrat, reinst Ph. Eur.	AppliChem, Darmstadt
DEPC	AppliChem, Darmstadt
Dig RNA Labeling Mix	Roche, Mannheim
Dig-labeled Control-RNA	Roche, Mannheim
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
	AppliChem, Darmstadt
EDTA, p. a.	AppliChem, Darmstadt
EGTA, f. d. Molekularbiologie	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Epon	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 100 %, Ph. Eur., reinst	AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolut, p.a.	AppliChem, Darmstadt
37% Formaldehyd, für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Formvar	Plano, Wetzlar
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerol, p.a., ≥ 99,5 % wasserfrei	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Harnstoff	AppliChem, Darmstadt

Hefe ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Deutsche Hefewerke GmbH, Nürnberg
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfuronsäure)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
n-Heptan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat $K_2HPO_4$	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid KCl, p. a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat $KH_2PO_4$	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver, Blotting Grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Maleinsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol, p. a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumdichlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat $Na_2HPO_4$ , p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid p.a.	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat $NaH_2PO_4$	AppliChem, Darmstadt
NaOH-Plätzchen, p. a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natronlauge, 1 N (pH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NBT (Nitro blue tetrazolium chloride)	Roche, Mannheim

Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Normal Horse Serum	Vector laboratories Inc., Burlingham, USA
Osmiumtetroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd – powder	Polysciences inc., Warrington
Peptone aus Casein, tryptisch verdaut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol, Roti®-Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PIPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2-Propanol, p.a. (Isopropanol)	AppliChem, Darmstadt
Propylenoxid	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
Restriktionsverdaupuffer R+ with BSA	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase-freie DNase	Qiagen, Hilden
RNeasy-Kit	Qiagen, Hilden
Saccharose	AppliChem, Darmstadt
Salmon Sperm DNA	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure, rauchend 37 %	AppliChem, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylenediamin)	AppliChem, Darmstadt
10x Transkriptionspuffer	Roche, Mannheim
Tris, ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Triton-X 100	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
t-RNA	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt
Uranylacetat	Serva Electrophoresis GmbH,



Heidelberg

**2.4 Antikörper**

$\alpha$ -Penta-His-Antikörper, mouse monoclonal	Qiagen, Hilden
Anti-Bruchpilot, N-terminal	Fouquet et al. (2009)
Anti-Digoxigenin-Antikörper, $F_{ab}$ -fragments	Roche, Mannheim
Anti-DVGlut	Mahr & Aberle (2006)
Anti-mouse-IgG-HRP	BioRad, München
Goat-anti-mouse-IgG Alexa 488	Dianova, Hamburg
Goat-anti-mouse-IgG Cy3	Dianova, Hamburg
Goat-anti-rabbit-IgG Alexa 488	Invitrogen, Carlsbad California, USA
Goat-anti-rabbit-IgG Cy3	Jackson ImmunoResearch Inc., Wesgroove, USA
nc82 (anti-Bruchpilot)	Würzburg Hybridoma Library (Hofbauer, 1992)

**2.5 Enzyme und übrige Reagenzien**

Chemiluminiscent HRP substrate	Millipore Corporation, Billerica
Einmachhaut	Alba, Bielefeld
Hind III	Fermentas, St. Leon-Rot
Mini-PROTEAN Electrophoresis System	BioRad, München
Membrane Filters Nylon	Hartenstein, Würzburg
Nitrocellulose-Transfermembran	Whatman GmbH, Dassel
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

Polyprep-Chromatography columns	BioRad, München
Proteinase K, recombinant PCR grade	Roche, Mannheim
Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilm, XBA blauempfindlich	Fotochemische Werke GmbH, Berlin
Sp6-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T7-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
The QIAexpressionist™	Qiagen, Hilden
Vectashield mounting medium for fluorescence H-1000	Vecta laboratories Inc., Burlingame, USA
Xho I	Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.6 Puffer und Lösungen

Blocklösung für Immunfluoreszenz- Färbungen	5 % Normal Horse Serum
	2 % BSA
	0,2 % Triton-X 100
	in PBS
Cacodylatpuffer	50 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,2
Calcium-freie Saline	130,05 mM Natriumchlorid
	35,99 mM Saccharose
	4,96 mM Kaliumchlorid
	1,87 mM Magnesiumdichlorid
	5,46 mM HEPES

	0,51 mM EDTA in dH <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	0,42 % (w/v) Coomassie Brilliant G Blue R250 41,67 % Methanol 16,67 % Essigsäure in dH <sub>2</sub> O, 3 h rühren, filtrieren
Coomassie-Entfärbelösung	30 % Methanol 10 % Essigsäure in ddH <sub>2</sub> O
Detektionspuffer	100 mM Tris 100 mM Natriumchlorid in ddH <sub>2</sub> O, pH 9,5
Elektrophorese-Laufpuffer	49,53 mM Tris 38,36 mM Glycin 3,47 mM SDS in dH <sub>2</sub> O, pH 8,9
Fixierlösung für Immunfluoreszenz	4 % Paraformaldehyd, pH 7,0 2 g Paraformaldehyd wurden in 25 mL ddH <sub>2</sub> O bei 60°C gelöst (5 Minuten), 100 µL 1N Natronlauge zugefügt, so dass die Lösung aufklart. Nach dem

Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden 25 mL 2x PEM dazugegeben und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Gel-Trockungslösung

20 % Methanol  
3 % Glycerol  
in ddH<sub>2</sub>O

Glutaraldehyd, 2,5 % gepuffert

2,5 % Glutaraldehyd  
50 mM Kaliumchlorid  
2,5 mM Magnesiumdichlorid  
in 50 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,2

Kanamycin-Lösung

2,5 % (w/v) Kanamycin  
in ddH<sub>2</sub>O

Magermilchlösung

5 % (w/v) Magermilchpulver  
in TBST

Maleinsäurewaschpuffer

100 mM Maleinsäure  
150 mM Natriumchlorid  
0,3 % Tween® 20  
in ddH<sub>2</sub>O, pH 7,5

Maleinsäure-Blocklösung

100 mM Maleinsäure  
150 mM Natriumchlorid  
1 % (w/v) Blocking reagent

	in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,5
Osmiumtetroxid, gepuffert	2 % Osmiumtetroxid in 50 mM Natrium-Cacodylat, pH 7,2
PEM	100 mM PIPES 2 mM EGTA 1 mM Magnesiumsulfat in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,0
2x PEM	200 mM PIPES 4 mM EGTA 2 mM Magnesiumsulfat in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,0
Phosphate buffered saline (PBS) 9,83 mM	136,89 mM Natriumchlorid 2,86 mM Kaliumchlorid 8,09 mM Dinatriumhydrogen- phosphat 1,74 mM Natriumdihydrogen- phosphat in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4
PBS, RNase-frei (RNase-free phosphate buffered saline)	8,32 mM Dinatriumhydrogen- phosphat 3,16 mM Kaliumdihydrogenphosphat 123,2 mM Natriumchlorid

	in RNase-freien ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4 - 7,6
PBS-T	0,1 % Triton-X 100 in PBS
PBT, RNase-frei (RNase-free phosphate buffered saline with Tween)	8,32 mM Dinatriumhydrogenphosphat 3,16 mM Kaliumdihydrogenphosphat 123,2 mM Natriumchlorid 0,1 % Tween® 20 in RNase-freien ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4 - 7,6
Puffer B	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 10 mM Tris 8 M Harnstoff in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,0
Puffer C	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 10 mM Tris 8 M Harnstoff in ddH <sub>2</sub> O, pH 6,3
Puffer D	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 10 mM Tris 8 M Harnstoff in ddH <sub>2</sub> O, pH 5,9

Puffer E	100 mM Natriumdihydrogenphosphat 10 mM Tris 8 M Harnstoff in ddH <sub>2</sub> O, pH 4,5
RNase-freies ddH <sub>2</sub> O	0,1 % DEPC in ddH <sub>2</sub> O auf Magnetrührer über Nacht rühren, autoklavieren
SDS-Gel-Auftragepuffer	125 mM Tris-HCl, pH 6,8 6 % Glycerol 2 % (w/v) SDS 0,025 % Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol in ddH <sub>2</sub> O
TBST	10 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 0,05 % Tween® 20 in dH <sub>2</sub> O, pH 7,6
Westernblot-Transferpuffer	24,76 mM Tris 191,82 mM Glycin 20 % Methanol in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,3

## 2.7 Medien und Platten

Eiablageplatten	2,25 % (w/v) Agar 25 % Apfelsaft 72,27 mM Saccharose in ddH <sub>2</sub> O frisch am Verwendungstag Bäcker- hefe mit ein paar Tropfen Leitungs- wasser verrühren und in die Mitte der Platte einen Klecks setzen
LB-Medium	257 mM Natriumchlorid 1 % (w/v) Peptone aus Casein 0,5 % (w/v) Hefeextrakt in ddH <sub>2</sub> O, autoklaviert
LB-Medium-Variante	1,2 % (w/v) Peptone aus Casein 2,4 % (w/v) Hefextrakt 0,4 % Glycerol 0,413 mM Dikaliumhydrogen- phosphat 0,125 mM Kaliumdihydrogen- phosphat
LB-Platten	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium



Nährmediumgläser für *Drosophilazucht* 3600 g Maisgrieß  
in 17 L Leitungswasser aufkochen  
und über Nacht quellen lassen,  
800 g Gerstenmalzextrakt  
800 g Zuckerrübensirup  
dazugeben und erneut aufkochen,  
200 g Sojamehl  
370 g Biohefe-Pulver  
150 g Agar-Agar  
in 3 L Leitungswasser lösen und  
unter den Brei rühren.  
50 g Methyl-4-hydroxybenzoat  
dazugeben, wenn der Brei auf 80°C  
abgekühlt ist. Brei 2 cm hoch in  
Plexigläser füllen und einen Saug-  
papierstreifen in den Brei stecken.  
Lagerung bis Verwendung bei 4°C.

SOC-Medium  
2 % (w/v) Peptone aus Casein  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
0,4 % (w/v) Glucose  
10 mM Natriumchlorid  
2,5 mM Kaliumchlorid  
10 mM Magnesiumdichlorid  
10 mM Magnesiumsulfat  
in ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert

## 2.8 Geräte

Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Stratalinker™ 1800	Stratagene, Santa Clara, USA
Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München
Minutien	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Präparierschere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
J2-21-Zentrifuge	Beckman, Krefeld
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Binokularmikroskop SteREG	Zeiss, Oberkochen
Leica TCS NT/SP Konfokalmikroskop	Leica, Wetzlar
Stereolupe	Wild, Heerbrugg
Apollo-Rasierklingen	Plano, Wetzlar
Ultracut-Schneidemaschine E	Reichert-Jung, Nussloch
Nickel-Netzchen	Plano, Wetzlar
Elektronenmikroskop Leo 912 AB	Zeiss, Oberkochen
iTEM	Soft Imaging System, Münster

## **3 Methoden**

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie (Prof. Dr. E. Buchner) und am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg (Prof. Dr. E. Asan) durchgeführt.

### **3.1 Fliegenzucht**

Die Fliegen werden in durchsichtigen Plexigläsern mit Nährmedium gezüchtet, die durch einen Schaumstoffstöpsel verschlossen werden. Für die Herstellung des Nährmediums werden „Bio-Produkte“ verwendet, um eine Kontamination mit Insektiziden oder unerwünschten Chemikalien zu verhindern. Damit der Brei nicht verschimmelt, wird das Fungizid Methyl-4-Hydroxybenzoat zugesetzt.

Die Fliegenkulturen werden in Klimaräumen mit konstanter Temperatur von 18°C oder 25°C und einem Tag-Nachtrhythmus von 12 S tunden gehalten. Bei 25°C ist der Regenerationszyklus der Fliegen etwas schneller als bei 18°C. Das Umsetzen der Fliegen in neue Futtergläser erfolgt je nach Bedarf an neuen Larven oder Fliegen, aber spätestens nach zehn Tagen, damit der Fliegenschwarm weiter überlebt.

### **3.2 Gewinnung von gereinigtem Protein für Affinitätsreinigung eines Antikörpers**

#### **3.2.1 Transformation hitzekompetenter Bakterienzellen**

Für die Synthese von PB-Protein lag bereits der pET-28a-c(+) Vektor mit der Sequenz des dritten Exons der RB-Isoform vor (Nieratschker 2008). Dadurch

erhält das synthetisierte Protein einen N-terminalen Polyhistidin-Tag, ein Erkennungsmotiv aus sechs aufeinander folgenden Histidinresten. Die Synthese des Proteins kann mit IPTG induziert werden, weil ein LacZ-Konstrukt vorliegt. Aufgrund des His-Tags kann das Protein mit Hilfe von Nickel-Agarose isoliert werden, weil Histidinreste an die an Agarose gekoppelten Nickelionen binden. Für die Affinitätsreinigung des Antikörpers wird 1 mg des reinen Proteins benötigt.

Für die Proteinproduktion liegen bereits hitzekompetente *E. coli* BL21-Zellen vor, die als 200 µL-Aliquots bei -80°C gelagert werden. Für die Transformation wird ein 200 µL Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 1 µL Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien für 90 Sekunden bei 42°C inkubiert, wobei sie durch den Hitzeschock das Plasmid aufnehmen, und danach wieder für fünf Minuten auf Eis gestellt. Es werden 400 µL zimmerwarmes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese auf einen Schüttler bei 1000 rpm und 37°C vermehrt. Die Selektion der Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, erfolgt mit Kanamycin. Hierzu wird auf eine LB-Agar-Platte kurz vor Verwendung 50 µL Kanamycinlösung aufgetragen. Auf diese Platten werden die transformierten Bakterien ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkolonien werden bei 4°C gelagert.

### **3.2.2 Induktion der Proteinsynthese**

Weil im Vektor ein LacZ-Konstrukt vorliegt, kann die Synthese des PB-Exons mit IPTG induziert werden. Hierzu wird eine Einzelkolonie der transformierten BL21-Zellen in 200 mL flüssigen LB-Medium mit 1 mM Kanamycin in einen sterilen Erlenmeyer-Kolben gegeben und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wird eine 600 mL Flüssigkultur mit 1 mM Kanamycin angeimpft und auf den Schüttler bei 37°C inkubiert, bis

die optische Dichte  $OD_{600}$  etwa 0,5-0,7 beträgt. Es wird eine 1 mL-Probe der Bakterienkultur entnommen und die Bakterien für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert; die Bakterienprobe wird in 50  $\mu$ L 2x-SDS-Auftragepuffer resuspendiert.

Nun wird die Synthese des Proteins durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Bakterien werden nach vorliegendem Protokoll für fünf Stunden bei 37°C inkubiert. Um eine quantitativ ausreichende Proteinsynthese zu erzielen, wurden verschiedene Wachstumsbedingungen ausprobiert, die in Tab. 3.1 aufgelistet sind.

offener Schüttler im 37°C-Raum + geschlossener Schüttler mit 37°C mit LB-Medium
LB-Medium + LB-Medium-Variante
Zugabe von 2 mM IPTG zu Beginn + nach 2 und nach 4 Stunden
Proteinexpression für 5 Stunden bei 37°C + Proteinexpression über Nacht bei Raumtemperatur
LB-Medium + SOC-Medium
LB-Medium + SOC-Medium über Nacht bei Raumtemperatur
neuer Stamm von BL21-Zellen in SOC-Medium

Tab. 3.1 Wachstumsbedingungen der Bakterienkultur

Nach der Proteinproduktion wird wiederum eine 1 mL-Probe entnommen und wie oben zentrifugiert. Resuspendiert werden die Bakterien in 100  $\mu$ L 2x-SDS-Auftragepuffer, da sie sich inzwischen vermehrt haben. Die Kultur wird in Zentrifugenröhrchen überführt und die Bakterien werden in der J2-21-Zentrifuge bei

4 K für 30 Minuten sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Mit den entnommenen Proben wird in einem Westernblot die Induktion des PB-Proteinfragments mit einem Antikörper gegen den His-Tag nachgewiesen.

### **3.2.3 Isolierung des Proteins**

Das Bakteriensediment wird für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nun werden 5 mL Puffer B pro Gramm Sediment dazugegeben und das Sediment möglichst ohne Schaumbildung resuspendiert. Die Lösung wird für eine Stunde langsam bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Bakterienzellen zu lysieren. Anschließend wird bei 5 K für 30 Minuten zentrifugiert. Dadurch befindet sich das von den Bakterien synthetisierte Protein im Überstand, während die Zelltrümmer pelletiert werden. Der Überstand wird in einem 50 mL Falcon Tube gesammelt und pro mL Lysat werden 4 mL Nickelagarose hinzugegeben. Damit der His-Tag an die Nickelagarose binden kann, wird die Mischung bei Raumtemperatur und 150 rpm auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Nun wird die Suspension auf eine Poly-prep Säule gegeben und 2x mit 4 mL Puffer C gewaschen. Die Proteine werden 4x mit 0,5 mL Puffer D und 6x mit 0,5 mL Puffer E eluiert. Von jeder dieser Fraktionen werden 15 µL entnommen und mit 15 µL 2x SDS-Auftragepuffer vermischt, um die Proteinmenge auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel mit einer Coomassiefärbung darzustellen.

### **3.2.4 Chloroform-Methanol-Fällung des aufgereinigten Proteins**

Um das Protein aus der Pufferlösung auszufällen, wird zum einfachen Volumen der Proteinlösung das dreifache Volumen ddH<sub>2</sub>O, das vierfache Volumen Methanol und das einfache Volumen Chloroform gegeben. Diese Lösung wird

sorgfältig gemischt und bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen aus, wobei sich das Protein an der Phasengrenze befindet. Nun wird die obere Phase vorsichtig abgenommen und mit dem dreifachen Volumen Methanol, bezogen auf das Ausgangsvolumen der Proteinlösung, überschichtet. Dadurch vermischt sich das Chloroform mit dem Methanol und es gibt keine Phasenbildung mehr. Das Protein wird nun bei 13000 rpm für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Proteinpellet 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wird in 100 µL Methanol gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

### **3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Das Verfahren der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das Acrylamid und Bisacrylamid polymerisieren zu einer netzartigen Struktur. Die Polymerisation benötigt freie Radikale, die durch das Ammoniumpersulfat gebildet werden. Die Radikalbildung aus Ammoniumpersulfat wird durch TEMED katalysiert. Das negativ geladene Detergens Dodecylsulfat lagert sich an hydrophobe Bereiche der Proteine an, wodurch diese denaturiert und mit einem Überschuss an negativer Ladung versehen werden. Damit wandern die Proteine im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Das Polyacrylamid bildet Maschen, welche die Proteine dabei durchwandern müssen. Daher wird in Abhängigkeit der Größe des untersuchten Proteins eine entsprechende Konzentration des Polyacrylamids gewählt. Weil das exprimierte PB-Exon ungefähr 26 kDa groß ist, werden 12,5 %ige SDS-Gele verwendet.

Für die SDS-PAGEs wird das Mini-PROTEAN Electrophoresis System (BioRad) verwendet. Die Gelkammern werden vor Verwendung mit 70 %igen Ethanol gereinigt und in die dazugehörige Apparatur eingespannt. Zuerst wird

das 12,5 %ige Laufgel in die Kammer pipettiert und mit Wasser bedeckt, bis es vollständig polymerisiert ist. Danach wird das Wasser abgeschüttet und das Sammelgel darauf pipettiert, in das 10-Well-Kämme gesteckt werden. Das Gel kann nach Polymerisation des Sammelgels sofort verwendet oder feucht bei 4°C einige Tage aufbewahrt werden. Nun werden die Proteinproben, die mit 2x SDS-Auftragepuffer vermischt wurden, bei 95°C für fünf Minuten denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Es wird stets in einer Tasche des Gels der Größenmarker Page Ruler Prestained Protein Ladder aufgetragen, um so ungefähr das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine zu bestimmen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in Elektrophorese-Laufpuffer bei 100 Volt für etwa 90 Minuten.

### **3.2.6 Proteinfärbung mit Coomassie und Konservierung des Gels**

Das Gel wird vorsichtig aus der Gelkammer entnommen und in eine Schale überführt. Die Färbung der Proteine erfolgt für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung bei langsamem Schütteln. Das Gel wird kurz mit dH<sub>2</sub>O abgespült und so lange in Coomassie-Entfärbelösung gelegt (in der Regel über Nacht), bis das Gel entfärbt und nur noch die blauen Proteinbanden gut sichtbar sind. Um das Gel zu konservieren, wird es über Nacht in Coomassie-Trocknungslösung entwässert. Es wird in Einmachhaut (Alba) eingeschlagen und unter Anlegen eines Vakuums und mit Wärme getrocknet.

### **3.2.7 Westernblot**

Der Westernblot dient dem Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern. Hier wird das Wet-Blot-Verfahren in der Mini Trans-Blot Cell (BioRad) angewendet. Dabei werden die Nitrocellulosemembran und die Schaumstoffe



für 20 Minuten in Westernblot-Transferpuffer eingeweicht. Für den Transfer werden in der aufgeführten Reihenfolge ein Schaumstoff, ein Whatman-Filterpapier, das Gel, die Nitrocellulosemembran, ein Whatman-Filterpapier und ein Schaumstoff in die Kammer eingespannt. Der Transfer der Proteine erfolgt unter Kühlung mit einem Eisakku und auf einem Magnetrührgerät für ungefähr 80 Minuten bei 100 Volt. Dabei wandern die negativ geladenen Proteine durch das elektrische Feld aus dem Gel auf die Membran, an die sie fest binden. Die Membran wird in einer Schale mit Magermilchlösung bei 4°C über Nacht inkubiert, um unspezifische Bindestellen der Proteine zu blocken. Die Membran wird einmal 20 Minuten und zweimal fünf Minuten mit TBST bei Raumtemperatur gewaschen. Nun wird sie mit dem Erstantikörper  $\alpha$ -Penta-His-Antikörper, der 1 : 1000 in TBST eingesetzt wird, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Waschvorgang wie oben wiederholt, um ungebundene und schwach bindende Antikörper zu entfernen. Die Membran wird für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper anti-mouse-IgG-HRP, der 1 : 5000 in TBST eingesetzt wird, inkubiert. Dieser richtet sich gegen den artspezifischen F<sub>c</sub>-Teil des Erstantikörpers und ist mit dem Enzym horse radish peroxidase gekoppelt. Es folgt ein weiterer Waschschritt.

Der Nachweis des Zweitantikörpers erfolgt mit dem Chemiluminescent HRP substrate-Kit. Die Lösungen werden im Verhältnis 1 : 1 vermischt und eine Minute bei Raumtemperatur angewärmt. Anschließend wird die Membran mit der Luminolreagenz für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Enzym Peroxidase oxidiert Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Das dabei entstehende oxidierte Produkt befindet sich in einem angeregten Zustand und emittiert blaues Licht, wenn die angeregten Elektronen wieder in den Grundzustand übergehen. Diese Strahlungsabgabe ist eine Chemolumi-

neszenz, weil die Anregung der Elektronen durch eine chemische Reaktion erfolgt. Die dabei entstehenden Photonen können durch Schwärzung eines Röntgenfilms detektiert werden. In Abhängigkeit von der Stärke der Lichtemission, wird die Membran unterschiedlich lange auf den Röntgenfilm aufgelegt.

### 3.3 In-situ-Hybridisierung an Embryonen

Die Expression von Genen kann man nachweisen, indem man die mRNA eines Gens mit einer markierten komplementären RNA-Testsonde hybridisiert. Hier ist von Interesse, wo im Nervensystem von *Drosophila* Embryonen die *Srpk79D* exprimiert wird.

#### 3.3.1 Transformation hitzekompetenter Bakterienzellen

Es liegt bereits ein Plasmid vor, das in seiner TOPO® Cloning site das letzte Exon der *Srpk79D* enthält (Nieratschker, 2004), s. Abb. 3.1.

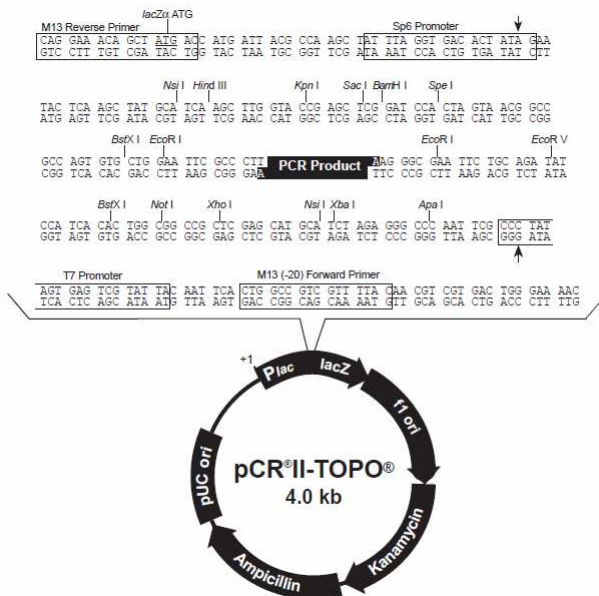


Abb. 3.1 Transkriptionsstartpunkte und Cloning site des pCR-II-TOPO-Vektors

Weil die Plasmid-DNA bereits lange Zeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert worden ist und um sie zu vermehren, werden hitzekompetente *E. coli* BL21-Zellen mit den Plasmiden transformiert und „frische“ Plasmid-DNA durch eine Plasmid-Midi-Präparation gewonnen. Hierfür wird ein 200  $\mu\text{L}$  Aliquot der hitzekompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Bakterien für 90 Sekunden bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert, wobei sie durch den Hitzeschock das Plasmid aufnehmen sollen, und wieder für fünf Minuten auf Eis gestellt. Es werden 400  $\mu\text{L}$  zimmerwarmes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese auf einen Schüttler bei 1000 rpm und  $37^{\circ}\text{C}$  vermehrt. Die Selektion der Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, erfolgt mit Ampicillin. Hierzu wird auf jede LB-Agar-Platte kurz vor Verwendung 50  $\mu\text{L}$  Ampicillinlösung aufgetragen. Auf diese Platten werden die transformierten Bakterien ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### **3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* – Bakterien**

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wird das Plasmid Midi Kit von Qiagen verwendet. Es wird von den transformierten *E. coli* eine Kolonie gepickt und in 250 mL LB-Medium mit 1 mM Ampicillin über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter schnellem Schütteln vermehrt. Die Bakterienkultur wird in zwei Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 6 K in der J2-21-Zentrifuge sedimentiert. Jedes Pellet wird in 4 mL kalten Puffer P1 resuspendiert. Dazu werden 4 mL Puffer P2 gegeben und die Zentrifugenröhrchen schnell invertiert bis die Bakterienlösung schleimig ist. Nun werden 4 mL Puffer P3 dazugegeben, woraufhin die Lösung ausflockt. Sie wird für 15 Minuten auf Eis inkubiert und durch einen Faltenfilter jeweils in ein autoklaviertes Zentrifugenröhrchen filtriert. Zwei Qiagen-tip 100-Säulen werden mit je 4 mL Puffer QBT äquilibriert. Danach wird jeweils das Filtrat auf die Säulen gegeben und zweimal mit 10 mL Puffer

QC gewaschen. Nun wird die DNA mit je 5 mL Puffer QF in autoklavierte Zentrifugenröhrchen eluiert. Um die DNA auszufällen, werden jeweils 3,5 mL zimmerwarmer Isopropanol dazugegeben und bei 15 K und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet wird in 2 mL zimmerwarmen 70 %igen Ethanol gewaschen. Nun wird bei 15 K und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wird 20 Minuten luftgetrocknet und in jeweils 150 µL ddH<sub>2</sub>O auf einem Horizontal-schüttler bei 150 rpm gelöst. Die DNA beider Ansätze wird in ein gemeinsames Eppendorf Cap überführt. Zur photometrischen Bestimmung des DNA-Gehalts wird 1 µL Plasmid-DNA in 99 µL ddH<sub>2</sub>O in einer UVette<sup>®</sup>-Messküvette verdünnt. Gemäß der Messung im Photometer beträgt der DNA-Gehalt 896 ng/µL.

### **3.3.3 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA**

Das Plasmid enthält in seiner TOPO<sup>®</sup> Cloning site das letzte Exon der *Srpk79D*. Zur Synthese der sense- und der antisense-Sonde werden die RNA-Polymerasen Sp6 und T7 verwendet, deren Promotoren bei diesem Vektor jeweils am anderen Ende der TOPO<sup>®</sup> Cloning site liegen, s. Abb. 3.1. Um kurze sequenzspezifische mRNA-Stücke herzustellen, wird das Plasmid mit Restriktionsenzymen so geschnitten, so dass der DNA-Strang linear vorliegt und kurz nach der Sequenz des eingebauten Exons abbricht. Dies bedeutet hier, dass bei Synthese der Sonde mit der Sp6-Polymerase das Restriktionsenzym Xho I verwendet wird. Die T7-Polymerase wird nach dem Schneiden mit Hind III eingesetzt. Es ist überprüft worden, ob die flankierenden Sequenzen des Vektors komplementär zu Sequenzen im Genom von *Drosophila* sind: in der Datenbank flybase sind keine Übereinstimmungen gefunden worden. Damit sollte die Sequenz der synthetisierten mRNA spezifisch für die *Srpk79D* sein.

Aufgrund der Orientierung der inklonierten DNA stellt die mit T7 synthetisierte Sonde die antisense-Sonde dar, die komplementär zu der mRNA des letzten Exons der *Srpk79D* ist. Dementsprechend stellt die mit der Sp6-Polymerase synthetisierte Sonde die sense-Sonde dar, welche als Negativkontrolle dienen soll.

Für den Restriktionsverdau werden jeweils 34  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA (ungefähr 30  $\mu\text{g}$  DNA) mit 6  $\mu\text{L}$  Restriktionsverdaupuffer R+ with BSA, 17  $\mu\text{L}$  autoklavierten  $\text{ddH}_2\text{O}$  und 3  $\mu\text{L}$  Xho I bzw. Hind III angesetzt. Diese Ansätze wurden zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert. Um daraus die linearisierte DNA zu isolieren, wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu werden die Ansätze mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf 200  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und mit 200  $\mu\text{L}$  Phenol und 200  $\mu\text{L}$  Chloroform sorgfältig vermischt. Die obere Phase wird vorsichtig abgenommen und der Rest mit dem 2,5-fachen Volumen reinen Ethanol versetzt und für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz bei 4°C und 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das DNA-Pellet wird für 8 Minuten luftgetrocknet. Die linearisierte DNA wird jeweils in 15  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser durch Schütteln bei 800 rpm für 20 Minuten gelöst. Der DNA-Gehalt wird erneut spektrometrisch bestimmt und beträgt für die mit Xho I verdauten Plasmide 4006 ng/ $\mu\text{L}$  und für die mit Hind III verdauten Plasmide 785 ng /  $\mu\text{L}$ .

#### **3.3.4 In-vitro-Transkription der Digoxigenin-markierten mRNA-Sonde**

RNA wird durch RNasen verdaut, die ubiquitär vorkommen. Daher ist steriles Vorgehen beim Arbeiten mit RNA wichtig. Es werden ausschließlich RNase-freies DEPC-Wasser bzw. RNase-freies Wasser aus einem Qiagen-Kit und autoklavierte Caps verwendet. Der Arbeitsplatz wird zu Beginn jeder Arbeit mit 70 %igen Ethanol gereinigt.

Um die Digoxigenin-markierte mRNA-Sonde durch in-vitro-Transkription herzustellen, werden 1  $\mu\text{L}$  mit der Xho I verdauten DNA bzw. 1,3  $\mu\text{L}$  der mit Hind III verdauten DNA (entspricht ungefähr 1  $\mu\text{g}$  DNA) verwendet. Der Ansatz enthält jeweils 2  $\mu\text{L}$  10x Dig RNA labeling mix, 2  $\mu\text{L}$  10x Transkriptionspuffer und je 2  $\mu\text{L}$  Sp6-RNA-Polymerase bzw. T7-RNA-Polymerase. Die Ansätze werden mit RNase-freiem Wasser auf 20  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wird die DNA verdaut, indem zu jedem Ansatz 1  $\mu\text{L}$  RNase-freie DNase dazugegeben und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert wird. Die Aufreinigung der Digoxigenin-markierten mRNA-Sonde erfolgt mit dem RNeasy Kit von Qiagen gemäß der Anleitung „RNA Cleanup“ im Handbuch. Die Sonde wird mit 30  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

### **3.3.5 Konzentrationsbestimmung der Digoxigenin-markierten mRNA-Sonde**

Zur Überprüfung, ob die in-vitro-Transkription erfolgreich gewesen ist, und zur Bestimmung der Menge der Digoxigenin-markierten mRNA-Sonde wird ein sogenannter Dot-Blot durchgeführt. Hierbei wird eine Verdünnungsreihe der mRNA-Sonden und einer Digoxigenin-markierten Kontroll-RNA auf eine Nylonmembran aufgetragen und mit Anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen. Die Verdünnung A besteht aus 2  $\mu\text{L}$  RNA und 38  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser. Für die Verdünnung B werden 5  $\mu\text{L}$  Verdünnung A mit 45  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser vermischt. Entsprechend besteht Verdünnung C aus 5  $\mu\text{L}$  Verdünnung B und 45  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser und Verdünnung D aus 5  $\mu\text{L}$  Verdünnung C in 45  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser. In dieser Verdünnungsreihe enthält die Verdünnung A der Digoxigenin-markierten Kontroll-RNA 1 ng RNA, Verdünnung B 100 pg RNA, Verdünnung C 10 pg RNA und Verdünnung D 1 pg RNA.

Von jeder Verdünnung der sense-, antisense-Sonde und der Kontroll-RNA wird 1 µL auf eine Nylonmembran aufgetragen und für zwei Minuten antrocknen lassen. Durch UV-Licht-Crosslinking werden die Nukleinsäuren auf der Membran immobilisiert. Die Membran wird kurz in Maleinsäurewaschpuffer gewaschen. Zur Blockung unspezifischer Bindestellen wird die Membran für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Blocklösung langsam geschüttelt. Die Blocklösung wird kurz mit Maleinsäurewaschpuffer abgespült. Der Anti-Digoxigenin-Antikörper wird 1 : 5000 in Maleinsäurewaschpuffer verdünnt und die Nylonmembran wird damit für 30 Minuten unter langsamen Schütteln inkubiert. Anschließend wird zweimal für 15 Minuten mit Maleinsäurewaschpuffer gewaschen. Die Nylonmembran wird zweimal kurz mit Detektionspuffer benetzt. Für die Färbereaktion werden NBT 0,45 % und BCIP 0,35 % in Detektionspuffer eingesetzt. Die Färbereaktion muss im Dunkeln erfolgen und dauert ungefähr 30 Minuten. Sie wird mit ddH<sub>2</sub>O abgestoppt.

### **3.3.6 Sammlung und Konservierung von Embryonen**

Die Embryonen werden mit Hilfe von Eiablageplatten gesammelt. Hierzu wird ein Schwarm adulter Fliegen auf eine Eiablageplatte gesetzt und bei 25°C gehalten. So können die Weibchen ihre Eier auf den Apfelsaftagar und in die Hefe ablegen. Hier werden für Wildtyp- und *Srpk79D*-Fliegen je 3 Fliegen Schwärme morgens und abends drei Tage lang auf neue Eiablageplatten gesetzt. Die gewonnen Embryonen werden zunächst auf der Platte bei 4°C gelagert.

Für das Einsammeln der Embryonen wird als „Sieb“ ein Gazestreifen in ein abgeschnittenes 50 mL-Falcon Tube gespannt. Die Embryonen werden mit RNase-freiem PBT (PBT) von der Platte in das Gazesieb gespült und mit PBT gewaschen. Zur Dechorionisierung werden die Embryonen vier Minuten mit 5

%igen Natriumhypochlorid (NaOCl) inkubiert. Nun wird mit PBT gewaschen und Heptan zu den Embryonen gegeben. Darin werden sie in ein Schnappdeckelglas überführt. Sie werden in Heptan und 10 % Formaldehyd in RNase-freien PBS im Verhältnis 1 : 1 für 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Nun befinden sich die Embryonen als Gallerte zwischen zwei wässrigen Phasen. Um sie zu devitellinisieren wird das meiste Heptan unten und die wässrige Phase oben abgezogen und der Rest mit Methanol überschichtet. Nun werden die Gläser 15-mal kräftig geschüttelt, so dass die devitellinierten Embryonen zu Boden sinken. Die restlichen Embryonen werden verworfen. Die devitellinierten Embryonen werden mit Methanol gewaschen und in ein Eppendorf Cap überführt. Um sie lagern zu können, wird der Methanol durch reinen Ethanol ersetzt. So können die Embryonen bei -20°C aufbewahrt werden.

### **3.3.7 In-situ-Hybridisierung**

Die konservierten Wildtyp-Embryonen werden auf drei, die *Srpk79D*-Embryonen auf zwei Eppendorf-Caps aufgeteilt. Es werden je zwei Caps für die sense- bzw. antisense-Sonde benötigt. Das dritte Cap mit Wildtyp-Embryonen ist für die Präabsorption des Anti-Digoxigenin-Antikörpers bestimmt, um unspezifisch an die Embryonen bindende Antikörper zu entfernen.

Die Embryonen werden dreimal kurz mit RNase-freien PBT gewaschen und ein zweites Mal mit 5 % Formaldehyd in PBT für 20 Minuten fixiert. Es wird 3x zwei Minuten mit RNase-freien PBT gewaschen. Nun werden die Wildtyp-Embryonen für die Präabsorption des Antikörpers mit 1 : 100 in PBT verdünnten Anti-Digoxigenin-Antikörper überschichtet und über Nacht bei 4°C unter Drehung in einem Rotor inkubiert. Die übrigen Embryonen werden mit 50 µL 1 : 1000 verdünnter Proteinase K für 3-5 Minuten verdaut. Um den Proteinverdau abzustoppen, werden die Embryonen erst eine Minute und dann fünf Mi-



nuten mit 10% (w/v) Glycin in PBT gewaschen. Es wird zweimal kurz mit PBT gewaschen und das Gewebe mit 5 % Formaldehyd in PBT für 15 Minuten fixiert. Nun wird dreimal 5 Minuten mit PBT und einmal mit PBT und Hybridisierungslösung im Verhältnis 1 : 1 gewaschen. Es wird kurz mit Hybridisierungslösung gewaschen und dann mit neuer Hybridisierungslösung mindestens eine Stunde bei 55°C vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit der mRNA-Sonde findet über Nacht statt. Es werden 2 µL der Sonde in 18 µL Hybridisierungslösung für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Nun werden jeweils Wildtyp- und *Srpk79D*-Embryonen mit der sense- bzw. der antisense-Sonde über Nacht bei 55°C und leichtem Schütteln hybridisiert. Die Embryonen werden kurz mit 55°C warmer Hybridisierungslösung gewaschen und danach mit PBT und Hybridisierungslösung im Verhältnis 1 : 1 bei 55°C für 30 Minuten inkubiert. Nun wird fünfmal für 15 Minuten mit PBT bei 55°C und einmal 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Die Lösung mit den präabsorbierten Anti-Digoxigenin-Antikörpern wird 1 : 20 in PBT verdünnt. Die Embryonen werden damit für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird viermal für 20 Minuten mit PBT und zweimal kurz mit Detektionspuffer gewaschen. Nun wird 0,45 % NBT und 0,35 % BCIP in Detektionspuffer zum Färben auf die Embryonen gegeben. Weil die Färbereaktion im Dunkeln erfolgt, werden die Caps mit Alufolie umwickelt. Die Färbereaktion wird nach 5-120 Minuten mit PBT abgestoppt, wenn die Embryonen sich lila verfärben. Nun wird dreimal mit PBT gewaschen. Die Embryonen werden in 50 % Glycerin in PBT auf einem Objektträger eingebettet.

### **3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven**

#### **3.4.1 Präparation der Larven und Einbettung in Epon**

Die Larven werden in Calcium-freier Saline auf Eis betäubt. Der Mangel an Calcium verringert Muskelkontraktionen der Larven und erleichtert so die Präparation. Die Präparation erfolgt auf Eis unter einem Binokularen Mikroskop in nach Genotypen getrennten Präparierschalen. Dabei wird die Larve zunächst an ihrem Vorderende mit einer Minutie festgesteckt. Die zweite Minutie wird unter schwachen Zug durch das Hinterende der Larve gesteckt. Nun wird in der Mitte des Körpers mit einer Präparierschere ein Querschnitt gesetzt, von dem ausgehend die Larve längs zwischen den Tracheae entlang der dorsalen Mittellinie aufgeschnitten wird. Die Cuticula wird nach beiden Seiten aufgeklappt und beidseitig mit je einer Minutie vorne und hinten fixiert. Die Larven werden für eine Stunde auf Eis bei 4°C mit 2,5 % gepufferten Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wird fünfmal mit 50 mM Cacodylatpuffer gewaschen, wobei während dem Waschen die Eingeweide der fixierten Larven herauspräpariert werden. Mit dem letzten Waschschrift werden die Minutien von den Larvenfilets entfernt und die Larven nach Genotyp getrennt in Eppendorff Caps überführt. Die Larven werden mit 2 % gepufferten Osmiumtetroxid für 90 Minuten auf Eis fixiert. Sie werden fünfmal mit ddH<sub>2</sub>O für drei Minuten auf Eis gewaschen und mit 0,5 %igen wässrigem Uranylacetat über Nacht bei 4°C kontrastiert. Nun wird wieder fünfmal mit ddH<sub>2</sub>O für drei Minuten auf Eis gewaschen. Das Gewebe wird mit einer aufsteigenden Ethanolreihe bei 4°C entwässert. Dabei wird 50 %iges, 70 %iges, 90 %iges, 96 %iges und zweimal 100 %iges Ethanol verwendet, wobei das Gewebe in jeder Ethanolverdünnung für 30 Minuten belassen wird. Bei Raumtemperatur wird noch einmal mit 100 %igen Ethanol für 30 Minuten entwässert. Anschließend wird das Gewebe bei

Raumtemperatur dreimal 30 Minuten in Propylenoxid inkubiert, das die Einbettung des Gewebes in Epon ermöglicht. Bei jedem Entwässerungsschritt muss etwas Flüssigkeit im Gefäß verbleiben, damit das Gewebe nicht vertrocknet. Diese Gefahr ist besonders groß bei dem flüchtigen Propylenoxid. Die Larven werden für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Mischung aus Propylenoxid und Epon im Verhältnis 1 : 1 inkubiert. Damit werden sie in ein Schnappdeckelglas überführt und mit Propylenoxid und Epon im gleichen Verhältnis über Nacht inkubiert. Das Glas wird über Nacht offen stehen gelassen, so dass bereits ein Teil des Propylenoxids verdampfen kann. Die Larven werden zweimal für zwei Stunden in Epon inkubiert. Sie werden in den Deckel eines Reaktionsgefäßes für die Einbettung überführt, mittig und flach ausgerichtet und das Gefäß wird mit Epon aufgefüllt. Damit das Epon auspolymersiert, werden die Präparate für mindestens 48 Stunden bei 60°C inkubiert.

### **3.4.2 Herstellung der Ultradünnschnitte**

Die Plastikhülse des Reaktionsgefäßes wird mit einer Rasierklinge aufgeschnitten und das Präparat wird herausgelöst. Mit einer frischen Rasierklinge wird unter einer Lupenlampe ein Rechteck um den posterioren Abschnitt des Ventralganglions und dem daraus entspringenden Nervenfaserbündel eingezeichnet, s. schematische Darstellung in Abb. 3.2, und das überschüssige Epon außen herum weggetrimmt. Nun werden mit der Ultracut-Schneidemaschine mit dem Glasmesser solange Semidünnschnitte des Gewebeblocks geschnitten bis die Ebene mit den Nervenfaserbündeln erreicht ist. Ab hier werden mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte in Längsrichtung der Nerven von ungefähr 70 nm Dicke angefertigt. Diese werden mit Chloroform gestreckt und auf Formvar-beschichtete Nickel-Netzchen (Mulisch & Welsch, 2010) aufgezogen.

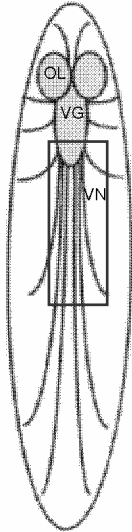


Abb. 3.2 Schematische Darstellung des larvalen Nervensystems; der Rahmen kennzeichnet den relevanten Bereich, der herausgetrimmt worden ist. OL optischer Lobus, VG Ventralganglion, VN ventrale Nerven. Abb. modifiziert aus Saxton et al. (1991).

Für die Schnittkontrastierung wird ddH<sub>2</sub>O frisch abgekocht, damit dieses kein Kohlendioxid mehr enthält. Die Bleicitratlösung nach Reynolds (Reynolds, 1963) wird mit dem abgekochten ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Diese ist empfindlich gegen Kohlendioxid, mit dem es Bleicarbonatpräzipitate bilden kann, welche die Qualität der Schnitte beeinträchtigen. Die Schnittkontrastierung wird in einer Dunkelkammer durchgeführt. Dazu werden die Netzchen mit der Schnittseite für 20 Minuten auf Tropfen einer 2 %igen Uranylacetatlösung gelegt und anschließend einmal mit 50 %igem Ethanol und viermal mit abgekochtem ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Kontrastierung mit der Bleicitratlösung werden Natronlauge-Plätzchen um die Bleicitrattropfen in der Dunkelkammer gelegt, die das Kohlendioxid der Luft absorbieren. Wegen des erhöhten Kohlendioxidgehalts des Atems sollte nicht geatmet werden, solange mit den

Netzchen hantiert wird. Die Kontrastierung mit der Bleicitratlösung erfolgt für sieben Minuten und es wird fünfmal mit abgekochten ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

Nun können die Ultradünnschnitte im Transmissionselektronenmikroskop Leo 912 AB analysiert werden.

### **3.4.3 Durchführung der quantitativen elektronenmikroskopischen Untersuchung**

Für die quantitative Analyse der larvalen Nervenfaserbündel werden alle kontrastierten Netzchen eines Tieres gesichtet und die Schnitte schematisch aufgezeichnet. Anhand der Zeichnungen und des Abstandes der Schnitte zueinander werden die Nerven für die Analyse ausgewählt. Dabei werden nur längere Nervenanschnitte miteinbezogen und darauf geachtet, dass Nerven, die auf den Schnitten in ähnlicher Lage waren, mindestens einen Abstand von 1,5 µm Schnitt-Tiefe zueinander hatten, um eine Doppelauswertung von Aggregaten zu verhindern. Von den ausgewählten Nervenanschnitten wird bei 630-facher Vergrößerung ein Bild aufgenommen und ihr Flächeninhalt mit dem Polygon-Werkzeug der Software iTEM (Soft Imaging System, Münster) bestimmt. Nun wird zufällig ein Punkt in dem Anschnitt ausgewählt und im Goniometermenü des Elektronenmikroskops gespeichert. Von diesem Punkt aus werden bei 31500-facher Vergrößerung drei Fotos des Nervs in Nervenlängsrichtung aufgenommen. Dies ergibt sechs oder neun Fotos je nach Breite des getroffenen Nervenbündels. Diese Fotos werden mit Adobe PhotoShop zu einem Bild zusammengesetzt und für die Auszählung von Mitochondrien in den Axonen verwendet. Aufgrund der höheren Vergrößerung und geringeren Fläche wird direkt der Flächeninhalt der angeschnittenen Axone mit ImageJ bestimmt.

Die Nerven werden bei 40000-facher Vergrößerung auf das Vorhandensein von Aggregaten untersucht. Wird ein Aggregat entdeckt, wird es fotografiert

und seine Lage auf dem Schnitt bei 16-facher Vergrößerung markiert für die Lagebestimmung. Der Durchmesser der Aggregate und die Distanz eines Aggregats zum Ventralganglion werden mit der Software iTEM vermessen. Als Durchmesser eines Aggregats wird die längste Distanz im elektronendichten Bereich bestimmt. Die Distanz zum Ventralganglion wird als direkte Verbindung von der Lagemarkierung des Aggregats bis zum posterioren Ende des Ventralganglion gemessen. Bei sämtlichen Vermessungen und Auswertungen ist die Untersucherin verblindet für den Genotyp der Larve, von dem das jeweilige Präparat stammte.

Zur Berechnung der Mittelwertsunterschiede werden einseitige T-Tests für unabhängige Stichproben verwendet.

### **3.5 Immunfluoreszenz an Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven**

Es werden Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven in einer gemeinsamer Schale präpariert, so dass sie identischen Puffern und Antikörperlösungen ausgesetzt sind. Dabei werden die Larven für die Immunfluoreszenzfärbungen genauso präpariert wie für die elektronenmikroskopische Untersuchung beschrieben. Zur Fixierung wird frisch hergestellte Fixierlösung für Immunfluoreszenz verwendet. Hiermit werden die Larven für 90 Minuten bei 4°C fixiert. Das Fixativ wird zweimal mit PEM-Puffer abgewaschen, wobei die Eingeweide der Larven herauspräpariert werden. Zur Blockung unspezifischer Bindestellen für die Antikörper wird eine Stunde bei Raumtemperatur mit frisch angesetzter Blocklösung für Immunfluoreszenzfärbungen inkubiert. Zu dieser Blocklösung wird der Erstantikörper in entsprechender Verdünnung (nc82 1 : 100; anti-BRP-N-term 1 : 1000; anti-DVGlut C-term 1 : 1000) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird viermal für 45 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die Inkubati-

on mit dem Zweiantikörper (Goat-anti-mouse-IgG Alexa 488 1 : 1000; Goat-anti-mouse-IgG Cy3 1 : 1000; Goat-anti-rabbit-IgG Alexa 488 1 : 1000; Goat-anti-rabbit-IgG Cy3 1 : 600) erfolgt in PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird wieder viermal für 45 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die Minutien werden unter mikroskopischer Kontrolle aus den Larven gelöst, die Larven auf einen Objektträger überführt und mit Vectashield überschichtet. Nun werden sie mit einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack luftdicht eingeschlossen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gewinnung von gereinigtem Protein für Affinitätsreinigung eines Antikörpers

Für die Herstellung von PB-Protein liegt bereits der pET-28a-c(+) Vektor mit der Sequenz des dritten Exons der RB-Isoform vor. Es ist bereits nachgewiesen, dass die DNA mit dem Exon des RB-Konstrukts korrekt in den Vektor inkloniert sind (Bloch, 2007). Die Größe dieses PB-Exons beträgt ungefähr 26 kDa zuzüglich des His-Tags. Die Synthese des Proteins wird mit IPTG induziert und das Protein mit Hilfe von Nickel-Agarose aufgereinigt. Das gereinigte Protein wird durch Chloroform-Methanol-Fällung aus der Elutionsflüssigkeit ausgefällt, damit es für eine spätere Affinitätsreinigung des Antikörpers rein vorliegt.

#### 4.1.1 Induktion der Proteinsynthese

Es wird vor und nach der Induktion der Proteinsynthese mittels IPTG eine Probe der transformierten *E. coli* BL21-Zellen entnommen und in einem Westernblot das Protein mit einem Antikörper gegen den Histag nachgewiesen. Abb. 4.1 zeigt exemplarisch, dass die Bakterien vor der IPTG-Zugabe kein Histag-Protein synthetisieren, dies jedoch nach IPTG-Zugabe tun.



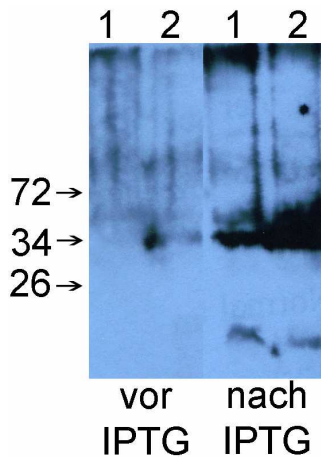


Abb. 4.1 Westernblot mit Anti-His-Antikörper von zwei Bakterienkulturen 1 und 2 vor und nach Zugabe von IPTG, Zahlen mit Pfeilen links bezeichnen den Größenmarker in kDa

Nach der Induktion sieht man neben der Bande bei ungefähr 34 kDa, die dem erwünschten Protein entspricht, noch Banden kleinerer Proteine zwischen 17 und 26 kDa.

#### 4.1.2 Isolierung des His-Tag-Proteins

Das His-Tag-Protein wird mit Hilfe einer Nickel-Agarose-Säule gereinigt und in mehreren Fraktionen von der Säule eluiert. Von jeder Elutionsfraktion wird eine Probe auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassieblau gefärbt. So kann die Menge des synthetisierten Proteins abgeschätzt werden. Die Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch vier Coomassie-gefärbte Gele verschiedener Wachstumsbedingungen. Relativ am meisten Protein wird hergestellt, wenn die Bakterien bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert werden (Abb. 4.2 D). Gleichbleibend gering fällt die Proteinmenge in den Bedingungen geschlossener Schüttler oder offener Schüttler, Wachstum mit zusätzlicher IPTG-Zugabe (Abb. 4.2 B), Wachstum in SOC-Medium (Abb. 4.2 C) und bei Ver-

wendung eines neuen BL21-Stamms aus. Bei der Verwendung der LB-Mediumvariante ist überhaupt keine Proteinbande zu sehen (Abb. 4.2 A). Auch ist auf allen Gelen neben den interessierenden Proteinbanden noch viel anderes Hintergrundprotein zu sehen.

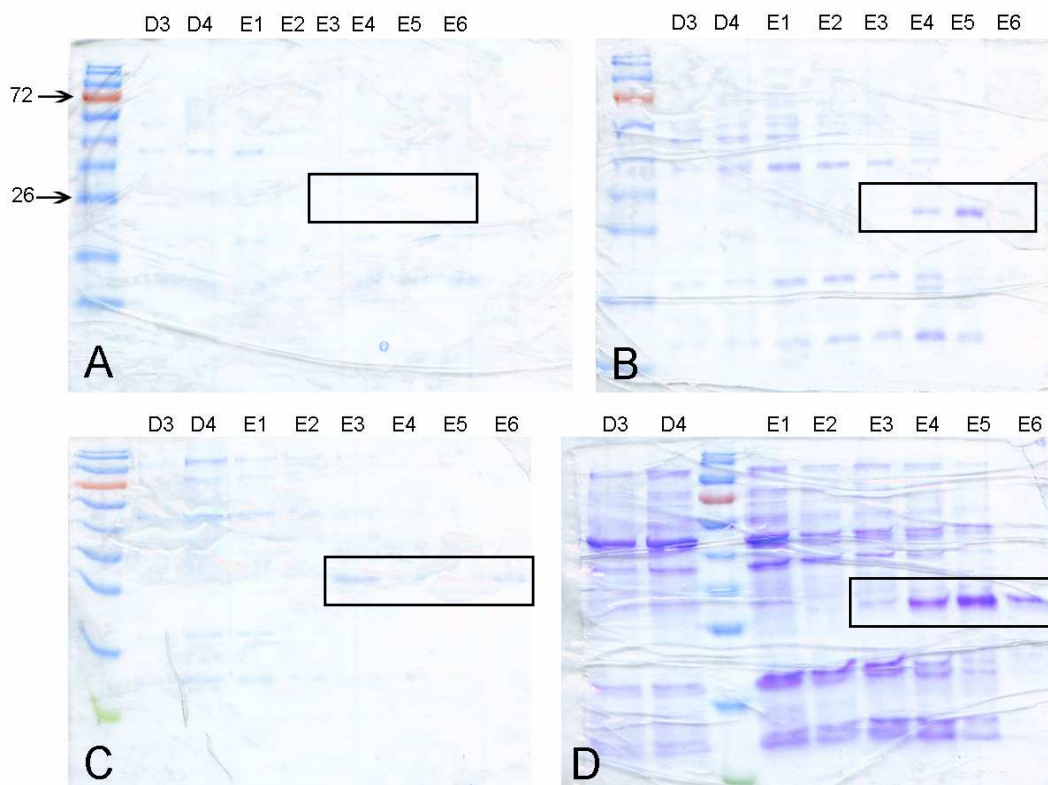


Abb. 4.2 Coomassie-gefärbte SDS-Gele der gereinigten Proteine. A Verwendung der LB-Mediumvariante, B Zugabe von IPTG, C Verwendung von SOC-Medium, D Wachstum in LB-Medium bei Raumtemperatur über Nacht. Pfeile in A: Angabe des Größenmarkes in kDa. Rote Bande = 72 kDa, danach absteigend 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 11 kDa., D3-E6 Elutionsfraktionen.

Im Vergleich zur Synthese anderer Proteine mit dieser Methode in der Arbeitsgruppe Buchner fällt die Proteinmenge sehr gering aus.

#### **4.1.3 Chloroform-Methanol-Fällung des gereinigten Proteins**

Um das Protein in Reinform zu gewinnen wird es mit einer Chloroform-Methanol-Fällung aus dem Elutionspuffer ausgefällt. Dabei zeigt sich allerdings gar keine bis sehr geringe Ausbeute des Proteins: es gibt höchstens einen geringen Proteinbeslag im Eppendorf-Cap oder es ist gar kein Protein zu sehen. Daher ist es auf diese Weise nicht möglich, die benötigte Menge von 1 mg gereinigten Protein zu gewinnen.

#### **4.2 In-situ-Hybridisierung an Embryonen**

Mit einer in-situ-Hybridisierung sollte die Expression des *Srpk79D*-Gens im Nervensystem von *Drosophila* Embryonen gezeigt werden.

##### **4.2.1 Digoxigenin-Markierung der Sonden**

Um die in-situ-Hybridisierung durchführen zu können, werden die Digoxigenin-markierten RNA-Sonden benötigt. Daher soll nach der in-vitro-Transkription deren Erfolg und die Menge der Digoxigenin-markierte RNA-Sonden überprüft werden. Hierzu wird ein DotBlot durchgeführt, mit dem ungefähr die produzierte RNA-Menge abgeschätzt werden kann, s. Abb. 4.3.

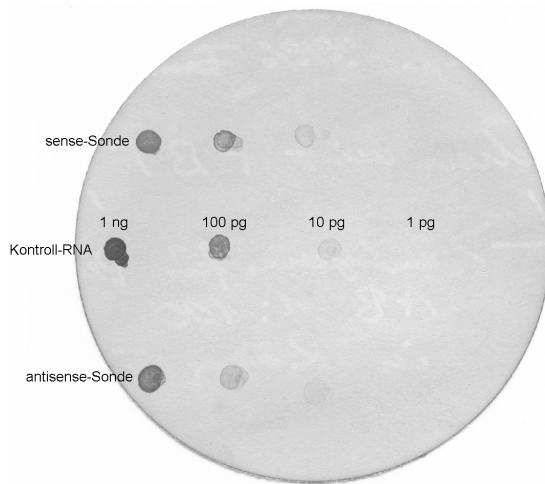


Abb. 4.3 Dot-Blot der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden; obere Reihe: Verdünnungsreihe der sense-Sonde, mittlere Reihe: Verdünnungsreihe der Kontroll-RNA, untere Reihe: Verdünnungsreihe der antisense-Sonde.

Man erkennt durch den Vergleich der Sonden mit der Kontroll-RNA, dass von beiden Sonden ungefähr 1 ng RNA /  $\mu$ L hergestellt worden ist. Somit liegt genug Material für die Durchführung der in-situ-Hybridisierung vor.

#### 4.2.2 In-situ-Hybridisierung an Embryonen

Die in-situ-Hybridisierung ist wie beschrieben durchgeführt worden. Leider zeigt sich keine spezifische Färbereaktion im Nervensystem der Wildtypembryonen, die mit der antisense-Sonde hybridisiert worden sind. Dies ist natürlich ebenfalls nicht bei den Wildtypembryonen der Fall, die mit der sense-Sonde hybridisiert worden sind, s. Abb. 4.4.

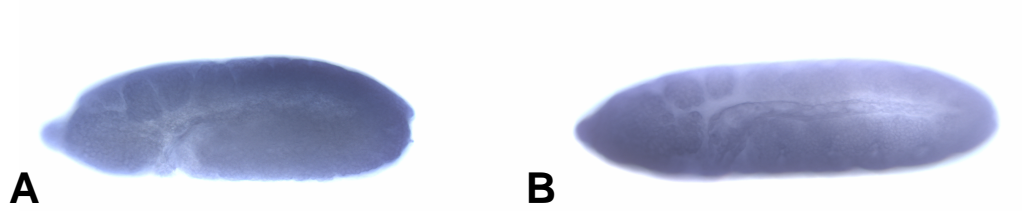


Abb. 4.4 In-situ-Hybridisierung gegen *Srpk79D*-mRNA mit Digoxigenin-markierter RNA-Sonde an Wildtypembryonen. A Hybridisierung mit der antisense-Sonde, B Hybridisierung mit der sense-Sonde

Die *Srpk79D*<sup>-</sup>Embryonen, die als zusätzliche Negativkontrolle dienen sollten, zeigen ein gleichartiges Aussehen

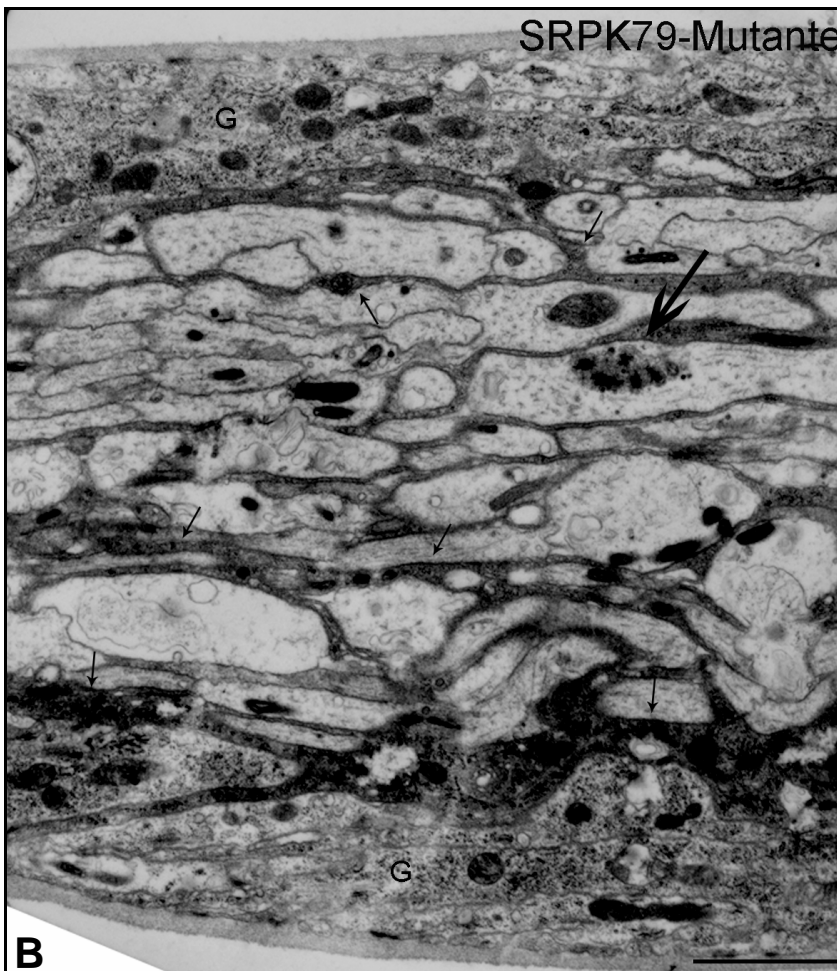
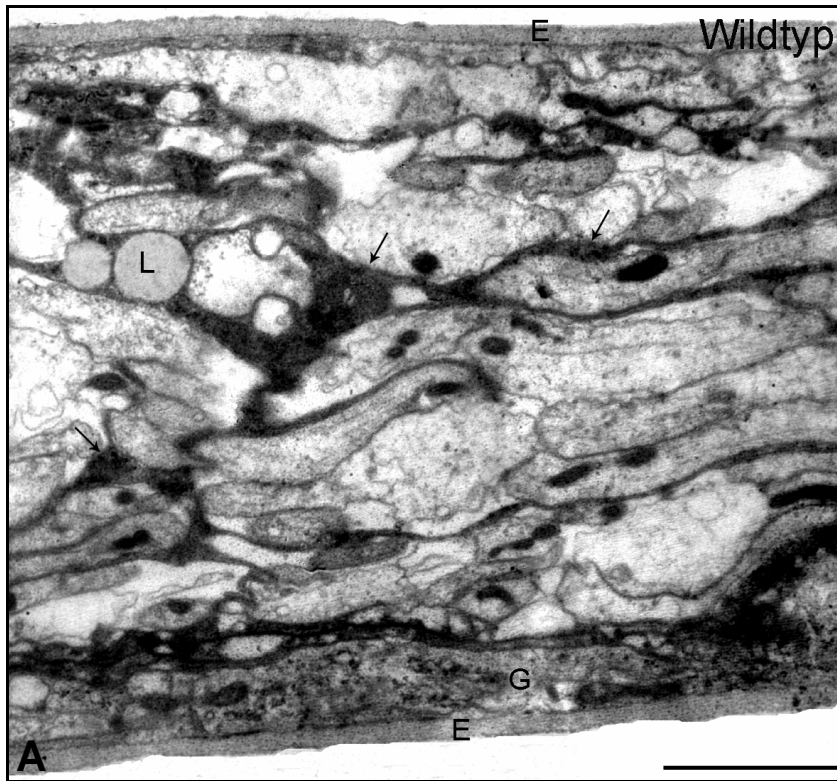
Die Färbung lässt die segmentale Gliederung der Embryonen erkennen.

### 4.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven

Es werden Längsschnitte der ventralen Nervenfaserbündel von acht Wildtyp- und neun *Srpk79D*-Nullmutanten-Larven untersucht.

**Wildtyp** Die Ultrastruktur der ventralen Nervenfaserbündel von Wildtyp-Larven ist in einer Übersichtsvergrößerung in Abb. 4.5 gezeigt. Die ventralen Nerven haben einen Durchmesser von 8-12  $\mu\text{m}$  (in Abhängigkeit von der Anschnittebene) (Johnson et al., 2009). Sie bestehen aus einem Bündel unmyelinisierter Axone, die zwischen den zytoplasmatischen Ausläufern von Gliazellen (glia support cells, Hurd & Saxton, 1996) liegen und von einer weiteren Gliazellschicht (Hurd & Saxton, 1996; Bao et al., 2007) eingehüllt sind. Axone und Gliazellen wiederum sind von einer dicken äußeren Schicht extrazellulärer Matrix umgeben (Hurd & Saxton, 1996).

Die äußeren Gliazellen weisen ein helles Zytoplasma auf und bedecken vollständig eine innere Schicht von dunkleren Gliazellen, deren kleine Zytoplasmaausläufer sich zwischen die Axone erstrecken. Die Gliafortsätze umhüllen teils einzelne Axone und teils mehrere Axone zusammen. Dabei liegen die axonalen Membranen einer Axongruppe direkt aneinander an. Der Durchmesser der Axone variiert zwischen ungefähr 400-900 nm. In den Gliazellen befinden sich gelegentlich Lipidtropfen. Die Axone enthalten zahlreiche in Längsrichtung verlaufende Mikrotubuli, Mitochondrien, klare und dense core Vesikel und auch andere Organellen (Hurd & Saxton, 1996; Bao et al., 2007).



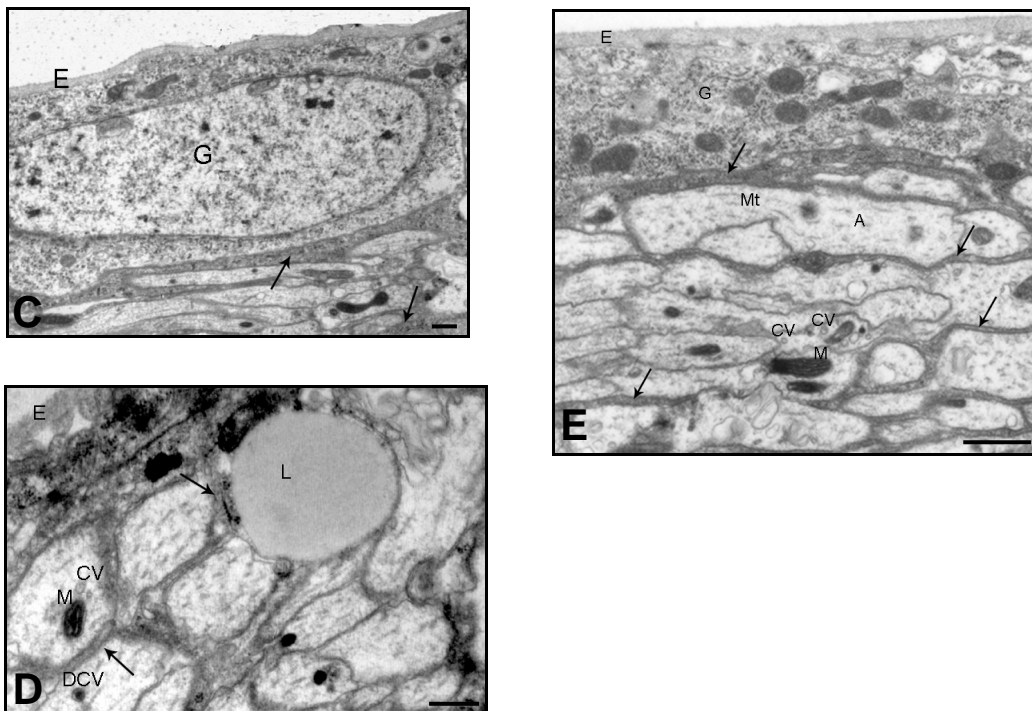


Abb. 4.5 Ultrastruktur eines Nervenfaserbündels. A, D, E Wildtyp, B, C *Sprk79D*-Nullmutante, B großer Pfeil zeigt auf Aggregat im Axoplasma. Pfeile weisen auf dunkle Gliazellfortsätze zwischen den Axonen. A Axonanschnitt, DCV dense core Vesikel, E äußere extrazelluläre Matrix, G äußere Gliazelle, L Lipidtropfen, M Mitochondrium, Mt Mikrotubulus, CV klare Vesikel. Größenbalken in A, B 2000 nm, in C, D 500 nm, in E 1000 nm.

Einmalig findet sich im Wildtyp ein membranständiger T-bar, s. Abb. 4.6, der einer neuroneuronalen oder neuroglialen Synapse entsprechen könnte (Prokop et al., 1996). Doch trotz Suche werden im Wildtyp keine weiteren membranständigen T-bar-ähnlichen Strukturen gefunden.



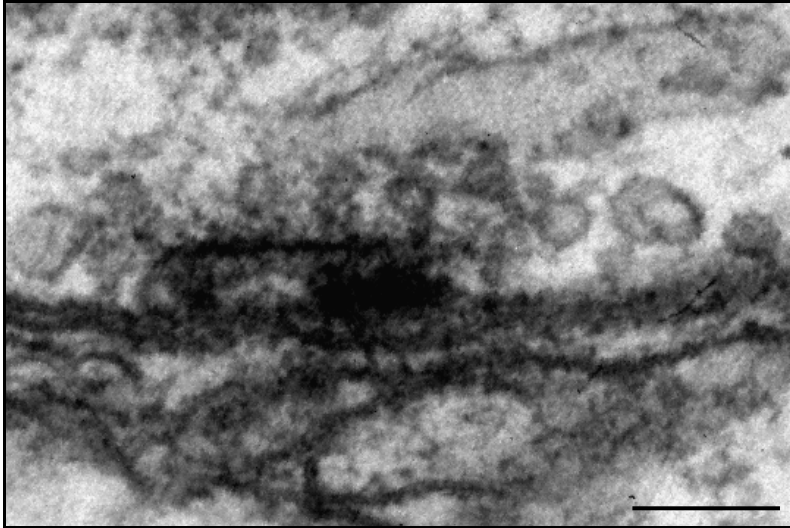


Abb. 4.6 Membranständiger T-bar in einem Axon des Wildtyps, Größenbalken 100 nm.

***Srpk79D*-Nullmutante** Die allgemeinen Merkmale der Ultrastruktur (Durchmesser der ventralen Nervenfaserbündel und der Axone, innerer zellulärer Aufbau, Inhalt der Gliazellen und des Axoplasmas) unterscheiden sich nicht zwischen Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutanten und entsprechen den Beschreibungen in der Literatur (Hurd & Saxton, 1996; Bao et al., 2007). Allerdings finden sich in den Axonen der Mutante regelmäßig auffällige elektronendichte (ED) Strukturen, die wir als Aggregate bezeichnen, und die nicht in gleichartiger Form in den Wildtypen vorkommen.

#### **4.3.1 Morphologie der Aggregate**

##### **4.3.1.1 Morphologie der Aggregate in der *Srpk79D*-Nullmutante**

Die auffällige ED Struktur aus Abb. 4.5 B wird bei stärkerer Vergrößerung in Abb. 4.7 gezeigt. Hieran werden die typischen Merkmale eines Aggregats beschrieben.

Ein Aggregat besteht aus einzelnen oder zu größeren Komplexen verbundenen Ansammlungen ED Materials, die häufig an T-bars erinnern, die zum Teil miteinander verbunden sind. Der ED Bereich ist stets von Vesikeln unterschiedlicher Anzahl, Größe und Art (s. unten) umgeben. Die Aggregate liegen frei ohne eine abgrenzende Membran im Axoplasma. Die ED Struktur hat an ihrer Oberfläche einen filamentösen Filz, wobei einige Vesikel über filamentöse Strukturen an den ED Bereich gebunden scheinen. Dabei treten in einem Aggregat auch Kombinationen der unten beschriebenen Formen des ED Bereichs auf. In unmittelbarer Nähe eines Aggregats ist oft ein Mitochondrium zu sehen und gelegentlich eine Zisterne des glatten endoplasmatischen Retikulums.

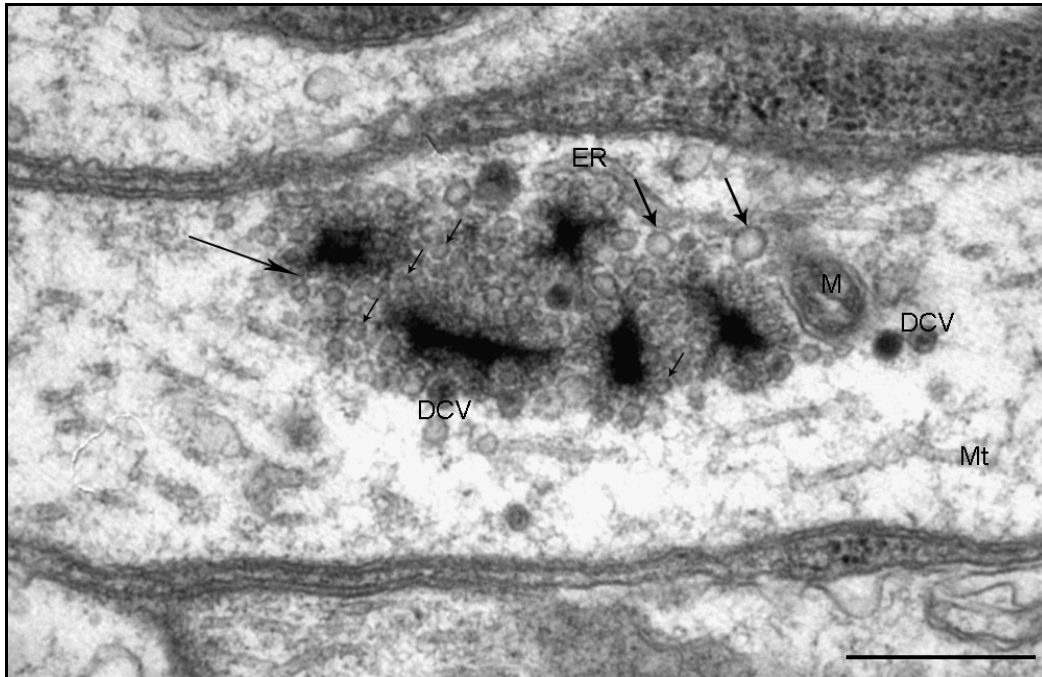


Abb. 4.7 Vergrößerung des Aggregats aus Abb. 4.5 B Es besteht aus mehreren getrennt liegenden ED Zentren, die von kleinen (kurze Pfeile) und großen (große Pfeile) klaren Vesikeln umgeben sind; es finden sich darunter auch dense core Vesikel (DCV), ein kleines Mitochondrium (M) und eine Zisterne des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER); die ED Bereiche sind von einem filamentösen Filz bedeckt, wobei einige der Vesikel durch filamentöse Strukturen (langer Pfeil) an den ED Bereich gebunden scheinen. Mt Mikrotubulus. Größenbalken 500 nm.

#### **4.3.1.2 Ähnlichkeit zu T-bars**

Die ED Zentren der Aggregate sind unterschiedlich ausgeformt, aber insgesamt sehen sie stets aus wie einer oder mehrere T-bars, die auch teilweise miteinander verschmolzen sind.

Ein Aggregat gleicht zwei T-bars, die mit ihren Podesten an die axonale Plasmamembran binden wie reguläre präsynaptische T-bars. Ihre unregelmäßigen Plattformen, die parallel zur Plasmamembran verlaufen, sind miteinander verschmolzen. Daneben im Axoplasma liegen noch weitere ED Anteile ohne Bin-

dung an die Plasmamembran, die gezackt oder wie eine Plattform geformt sind. Die ED Zentren weisen einen filamentösen Filz auf und es sind Vesikel damit assoziiert, s. Abb. 4.8.

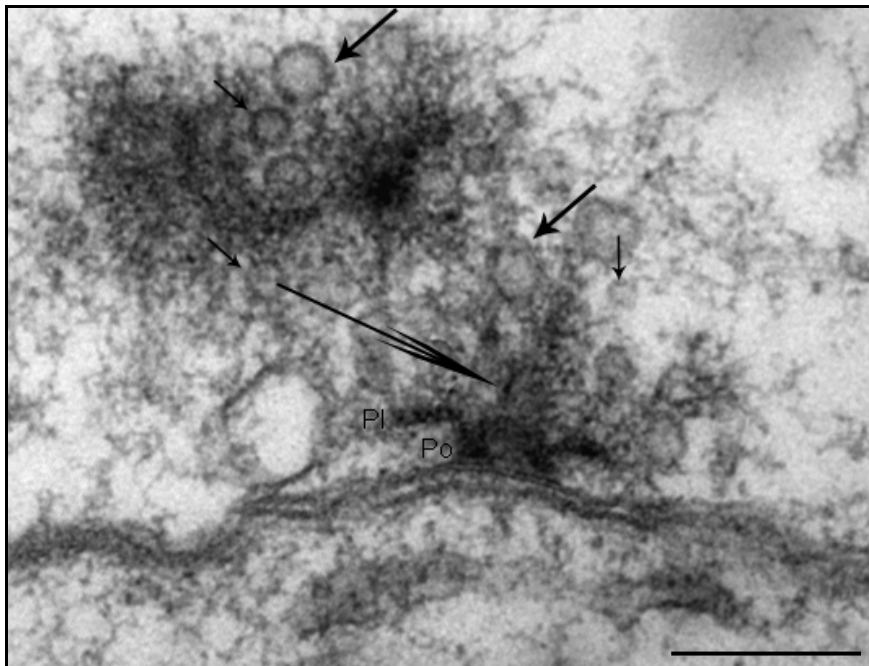


Abb. 4.8 Aggregat mit zwei membranständigen T-bars (aus Srpk79D-2). PI unregelmäßig geformte Plattform, Po Podest der T-bar-ähnlichen Struktur, kleine Pfeile kleine klare Vesikel, große Pfeile große klare Vesikel, langer Pfeil weist auf den filamentösen Filz. Größenbalken 250 nm.

Die übrigen Aggregate liegen ungebunden im Axoplasma. Bei einigen scheinen die Podeste von zwei T-bars aneinander angebunden zu sein und vier oder mehr solcher Doppelstrukturen liegen nebeneinander. Dabei sind die Plattformen beider Seiten teilweise miteinander verbunden und verlaufen parallel. Diese Variation könnte man als „marschierende T-bars“ („marching T-bars“) bezeichnen, s. Abb. 4.9.

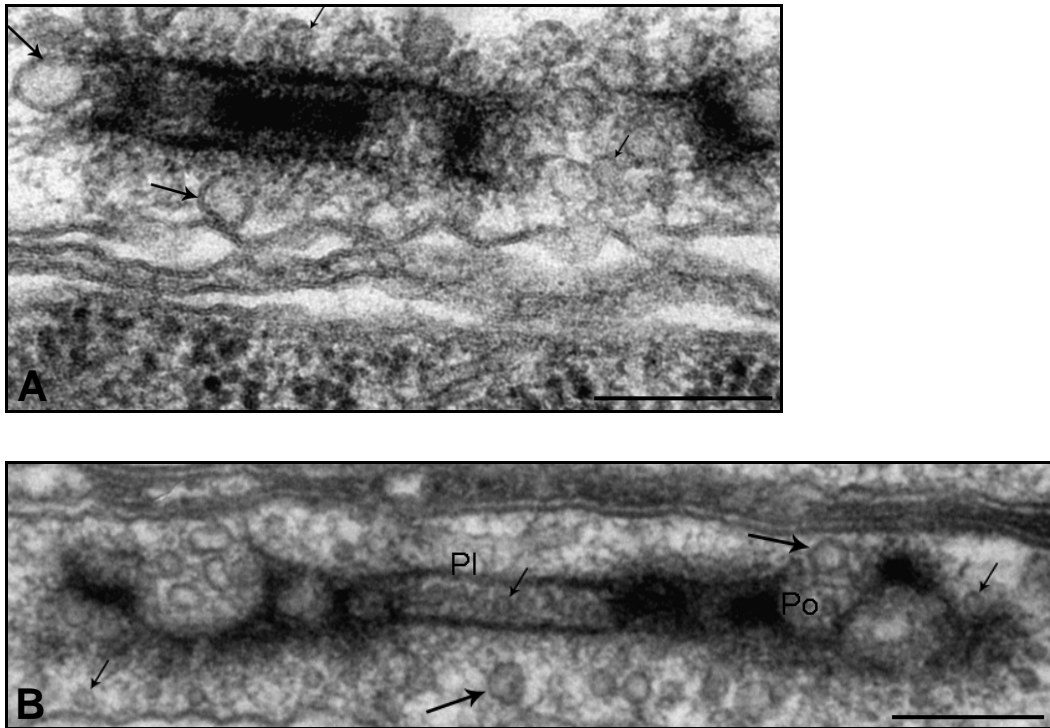


Abb. 4.9 Aggregate vom Typ „marching T-bars“ A aus Srpk79D-2; B aus Srpk79D-5, kleine Pfeile kleine klare Vesikel, große Pfeile große klare Vesikel, PI verbundene Plattformen Po Podeste der T-bar-ähnlichen Strukturen, Größenbalken in A 200 nm, in B 250 nm.

Bei weiteren Aggregaten ist der ED Bereich mehrzackig geformt, wie ein Sternchen, s. Abb. 4.10 A, B.

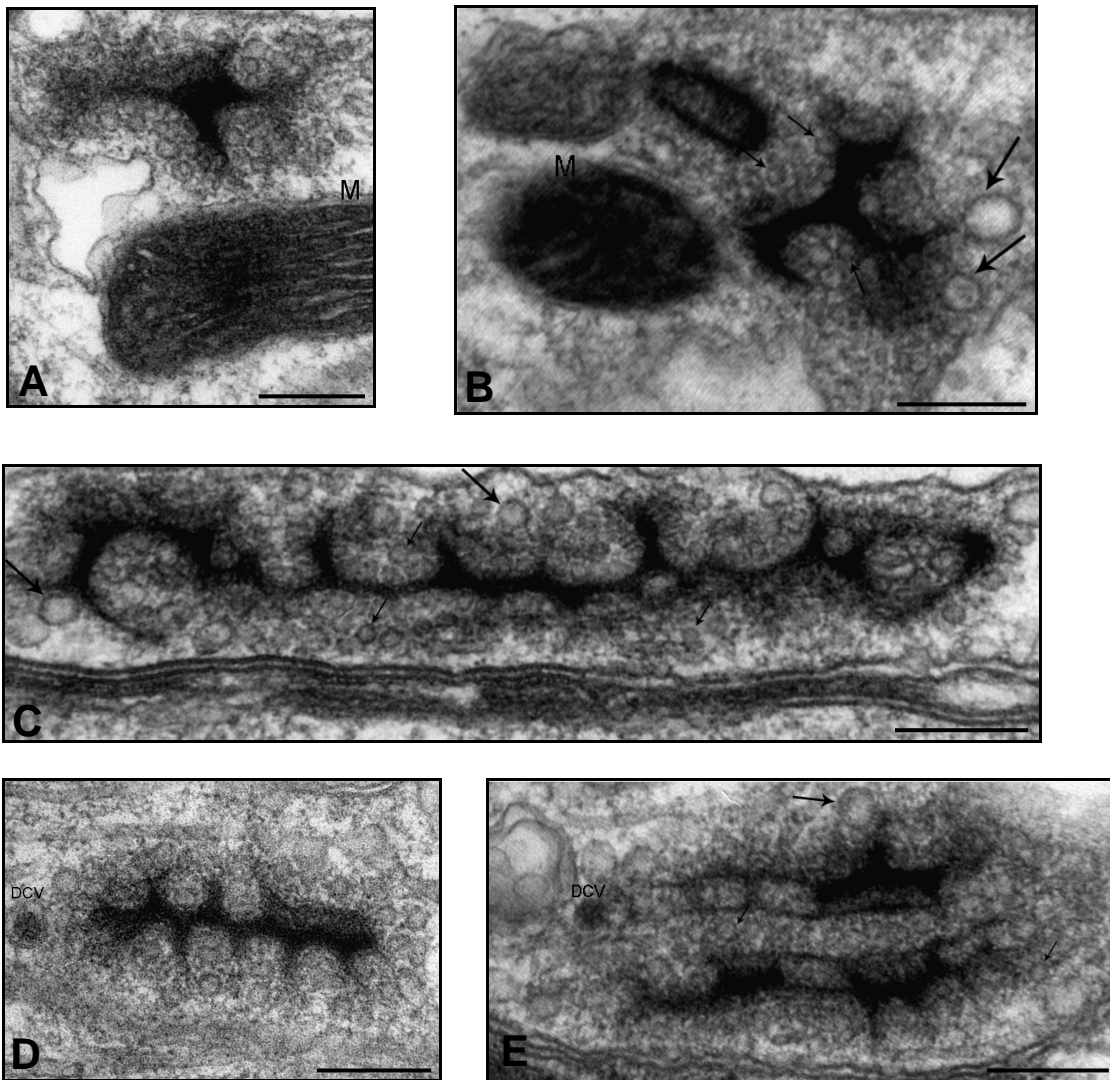
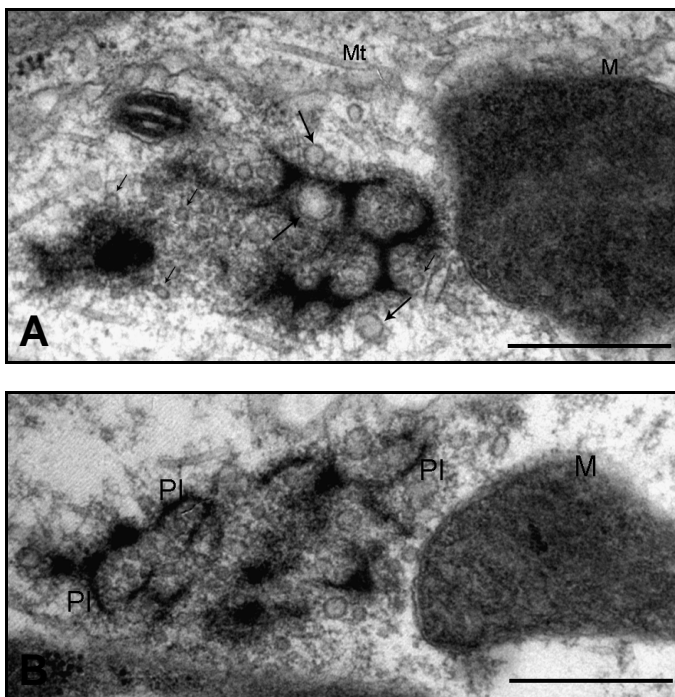


Abb. 4.10 Aggregate, die tangentialen T-bar-Anschnitten ähneln. A, B aus Srpk79D-1, C, D aus Srpk79D-5, D aus Srpk79D-4, E aus Srpk79D-3. kleiner Pfeil kleine klare Vesikel, großer Pfeil große klare Vesikel, DCV dense core Vesikel, M Mitochondrium, Größenmarker in A, D 200 nm, in B, C, E 250 nm.

Diese Sternchen sehen aus wie Tangentialanschnitte von synaptischen T-bars, wie sie Atwood et al. (1993) beschrieben haben. Die schräg getroffene Plattform des T-bars erscheint als drei- oder vierzackige Figur. Die Aggregate sind zum Teil allerdings größer, wenn sie mehrere aneinander gereihte T-bars enthalten, s. Abb. 4.10 C.

In anderen Fällen bilden einzeln liegende T-bars den ED Bereich, s. Abb. 4.11 A. Bei weiteren Aggregaten sind nur noch einzelne T-bar-Bestandteile, wie die Plattformen, zu erkennen und der restliche ED Bereich stellt eine undifferenzierte Masse dar, s. Abb. 4.11 B.



4.11 Aggregate, die wie T-bar-Bestandteile wirken. A einzelne T-bars, aus Srpk79D-2, B aus Srpk79D-6 einzelne Plattformen (PI), M Mitochondrium, Mt Mikrotubulus, kleiner Pfeil kleine klare Vesikel, großer Pfeil große klare Vesikel. Größenmarker in A, B 500 nm.

Andere Aggregate sind klein und zeigen keine differenzierte ED Struktur: diese ist rundlich oder oval, drei- oder viereckig und ev. ausgefranst, s. Abb. 4.12.

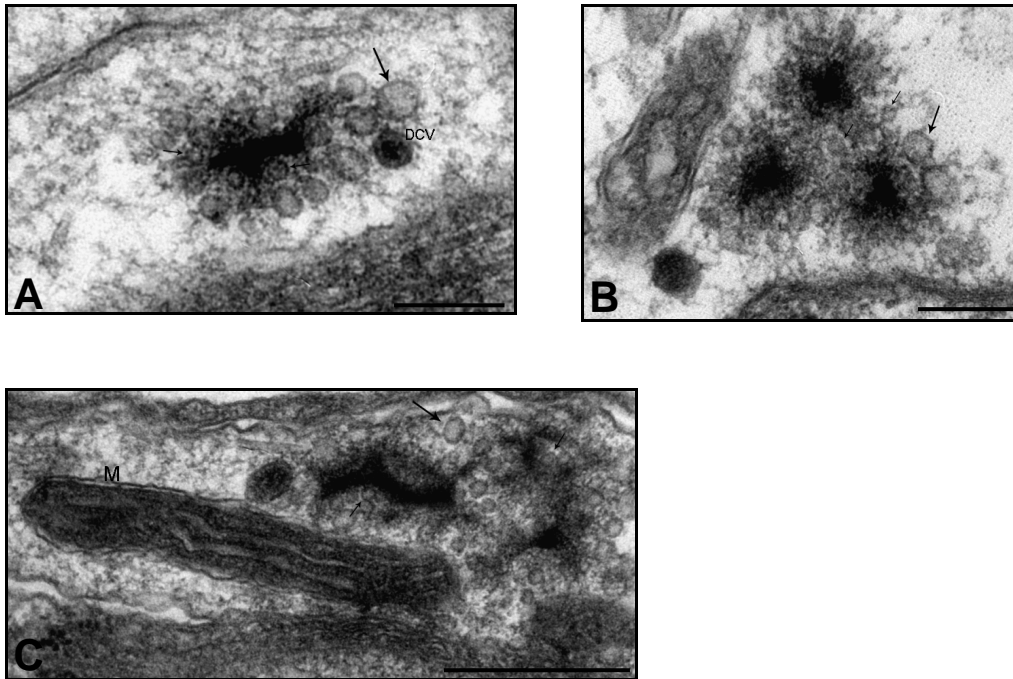


Abb. 4.12 Aggregate ohne differenzierte ED Struktur A aus Srpk79D-1 B aus Srpk79D-3, C aus Srpk79D-5, DCV dense core Vesikel, M Mitochondrium, kleiner Pfeil kleine klare Vesikel, großer Pfeil große klare Vesikel. Größenbalken in A, B 200 nm, in C 500 nm.



Es kommen auch außergewöhnlich große Aggregate vor, s. Abb. 4.13.

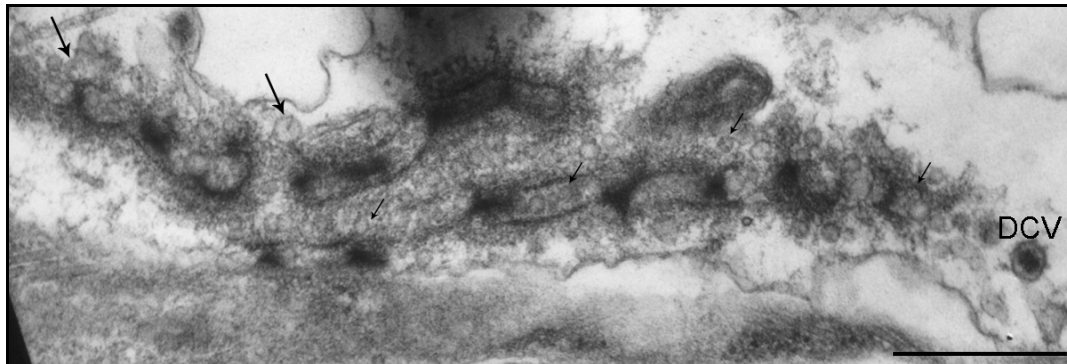


Abb. 4.13 Beispiel für ein außergewöhnlich großes Aggregat aus Srpk79D-6. DCV dense core Vesikel, kleiner Pfeil kleine klare Vesikel, großer Pfeil große klare Vesikel. Größenbalken 500 nm

#### **4.3.1.3 Beschreibung der Vesikel, die den ED Bereich des Aggregats umgeben**

Der ED Kern eines Aggregats ist stets von Vesikeln umgeben. Direkt um den ED Kern herum finden sich kleinere Vesikel mit einem Durchmesser von ungefähr 40 nm, die zum Teil über filamentöse Verbindungsbrücken an den ED Bereich gebunden zu sein scheinen. Außen herum befinden sich weitere verschieden große, runde, klare Vesikel, deren Durchmesser in der Regel zwischen 40 und 80 nm liegen. Bei einem Teil der Vesikel kann man die Doppelmembran als Ausdruck der Phospholipiddoppelschicht deutlich erkennen. Bisweilen finden sich auch dense core Vesikel, die ungefähr 70 nm groß sind, s. Abb. 4.14 A und B. Die Menge der umgebenden Vesikel variiert stark: es gibt Aggregate mit sehr wenigen Vesikeln, s. Abb. 4.14 C und mit vielen Vesikeln, s. Abb. 4.14 D.

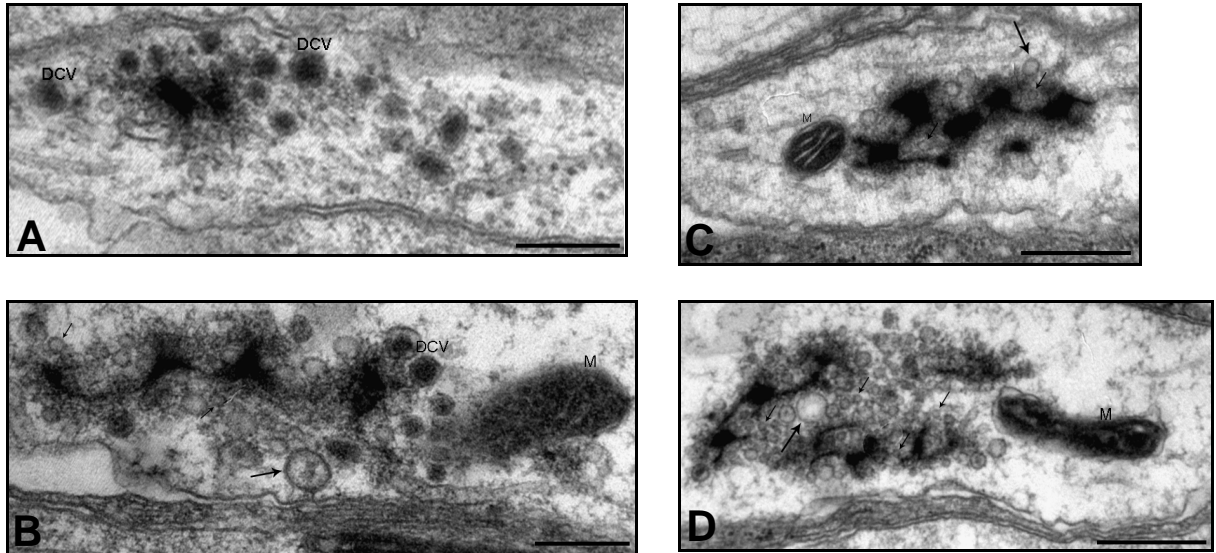


Abb. 4.14 Unterschiede in den Vesikeln, welche die ED Zentren umgeben A aus Srpk79D-1 mit dense core Vesikeln (DCV), B aus Srpk79D-6 mit DCV, C aus Srpk79D-3 mit wenigen Vesikel, D aus Srpk79D-2 mit vielen Vesikel. M Mitochondrium, kleiner Pfeil kleine klare Vesikel, großer Pfeil große klare Vesikel. Größenbalken in A, B 250 nm, in C, D 500 nm.

Es wurden zwei Aggregate gefunden, die außergewöhnlich viele Vesikel enthalten, die sich wie ein Schweif in Axonlängsrichtung anordnen, s. Abb. 4.15.

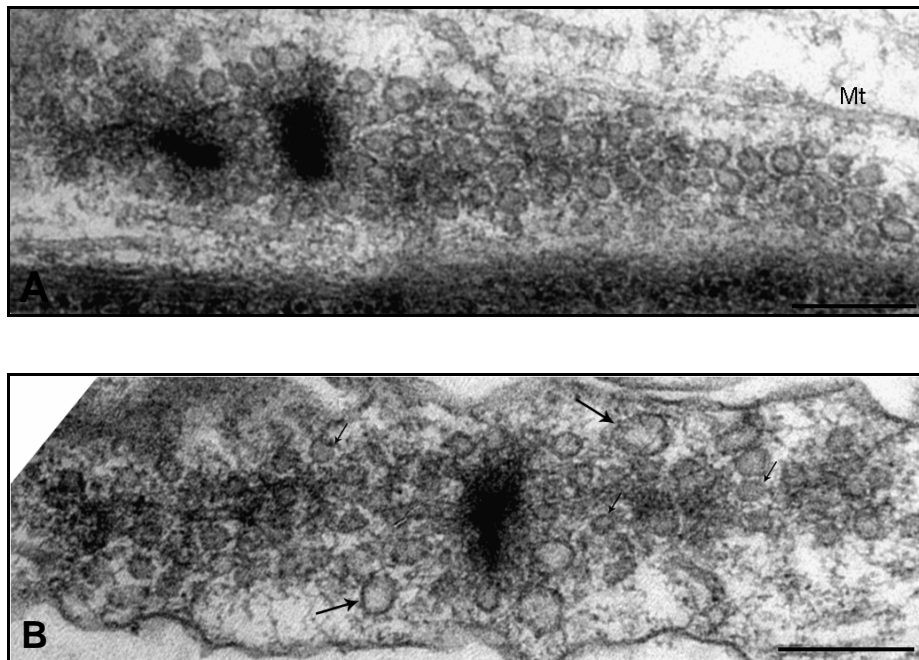


Abb. 4.15 Aggregate mit sehr vielen Vesikeln A aus Srpk79D-5, B aus Srpk79D-6. Mt Mikrotubulus, kleiner Pfeil kleine klare Vesikel, großer Pfeil große klare Vesikel. Größenbalken in A, B 250 nm.

#### **4.3.1.4 Beschreibung der Aggregate im Wildtyp**

In den Wildtypen sind viel seltener aggregat-ähnliche Strukturen zu finden, die deutlich kleiner sind als die Aggregate in den Mutanten, s. Abb. 4.16. Die ED Strukturen sind überwiegend einfach mit nur einem ED Zentrum geformt und zeigen keine differenzierte, zu T-bars ähnliche Form. Sie sind aber ebenfalls von klaren Vesikeln unterschiedlicher Anzahl umgeben, wobei die Vesikel im Vergleich zur Mutante eher einheitlich groß wirken. Auch hier scheinen die Vesikel teils über ED Brücken an den ED Bereich angebunden, s. Abb.4.16 A.

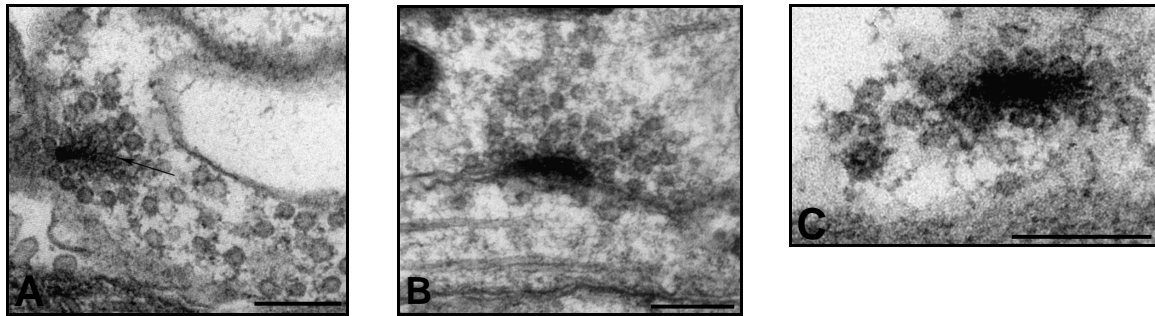


Abb. 4.16 Aggregate im Wildtyp A aus wt-6, Pfeil zeigt auf filamentöse Anbindung eines Vesikels, B aus wt-8, C aus wt-2. Größebalken in A, B, C 200 nm.

### 4.3.2 Quantitative Auswertung

Für die quantitative Analyse werden drei Wildtyp- und drei *Srpk79D*-Nullmutanten ausgewertet, die zufällig dafür ausgewählt worden sind.

#### 4.3.2.1 Dichte und Größe der Aggregate

Beim Wildtyp wird je Tier eine Fläche zwischen 6842  $\mu\text{m}^2$  und 9750  $\mu\text{m}^2$  der längs angeschnittenen Nervenfaserbündel untersucht. Dabei finden sich in einem Tier zwischen einem und drei Aggregaten. In der *Srpk79D*-Nullmutante werden zwischen 6470  $\mu\text{m}^2$  und 8717  $\mu\text{m}^2$  untersucht und zwischen acht und 15 Aggregate je Tier gefunden, s. Tab. 4.1.

Tier	Fläche der angeschnittenen Motornerven ( $\mu\text{m}^2$ )	Anzahl der Aggregate	Spannweite des Aggregatdurchmessers (nm)
Wildtyp 2	9241,95	2	131,81 – 208,30
Wildtyp 6	6842,00	1	129,21
Wildtyp 8	9750,15	3	115,19 – 210,60
<i>Srpk79D</i> 1	8717,17	14	148,47 – 886,03
<i>Srpk79D</i> 7	6674,47	15	122,01 – 794,88
<i>Srpk79D</i> 9	6470,25	8	252,20 – 1400,41

Tab. 4.1 Übersicht über die untersuchte Fläche der Nervenfaserbündel, Anzahl der gefundenen Aggregate und Ausmaß des Aggregatdurchmessers.

Damit kommt im Wildtyp durchschnittlich ein Aggregat auf 4904,3 ( $\pm$  1047 SEM)  $\mu\text{m}^2$  Fläche, während es in der Mutante 625,7 ( $\pm$  105,0 SEM)  $\mu\text{m}^2$  sind.

Dieser Mittelwertsunterschied ist statistisch signifikant ( $\alpha = 2,7 \%$ , einseitiger T-Test für unabhängige Stichproben), s. Abb. 4.17. Aggregate kommen also in der Mutante signifikant häufiger vor.

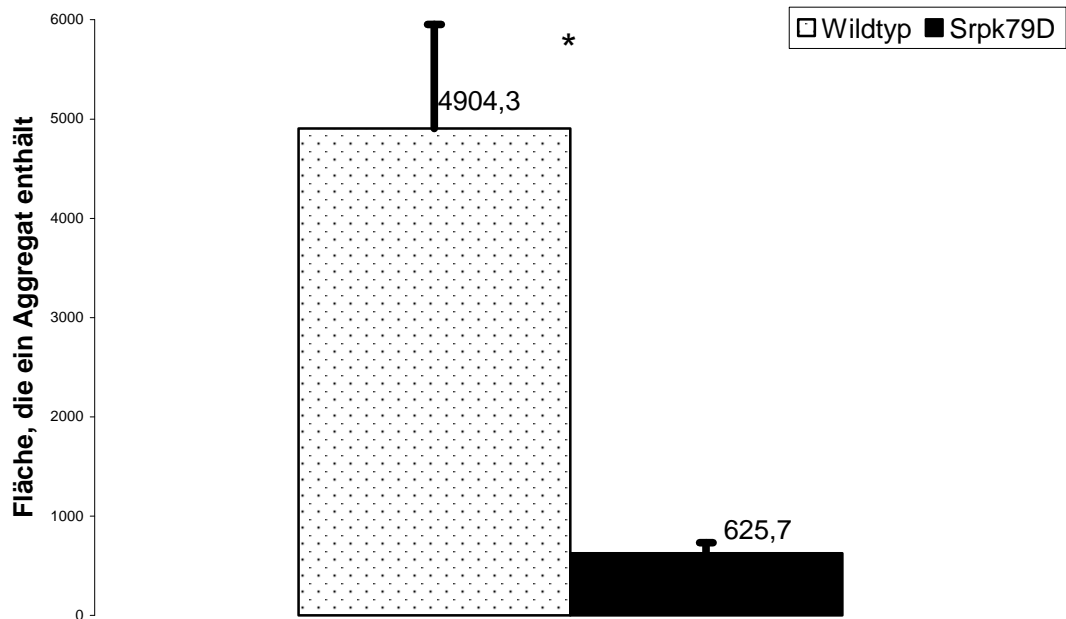


Abb. 4.17 Vergleich der Fläche in Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante, die durchschnittlich ein Aggregat enthält, Fehlerbalken gibt SEM an.

Zur Bestimmung der Größe eines Aggregats wird die längste Strecke im ED Bereich mit der Software iTEM gemessen. Der Durchmesser eines Aggregats im Wildtyp beträgt durchschnittlich 155,6 nm ( $\pm 17,3$  nm SEM;  $n = 6$ ) und in der Mutante 449,0 nm ( $\pm 43,5$  nm SEM;  $n = 37$ ). Dieser Mittelwertsunterschied ist statistisch hochsignifikant ( $\alpha = 0,000$ , zweiseitiger T-Test für unabhängige

Stichproben), s. Abb. 4.18. Die Aggregate sind also in der Mutante hochsignifikant größer.

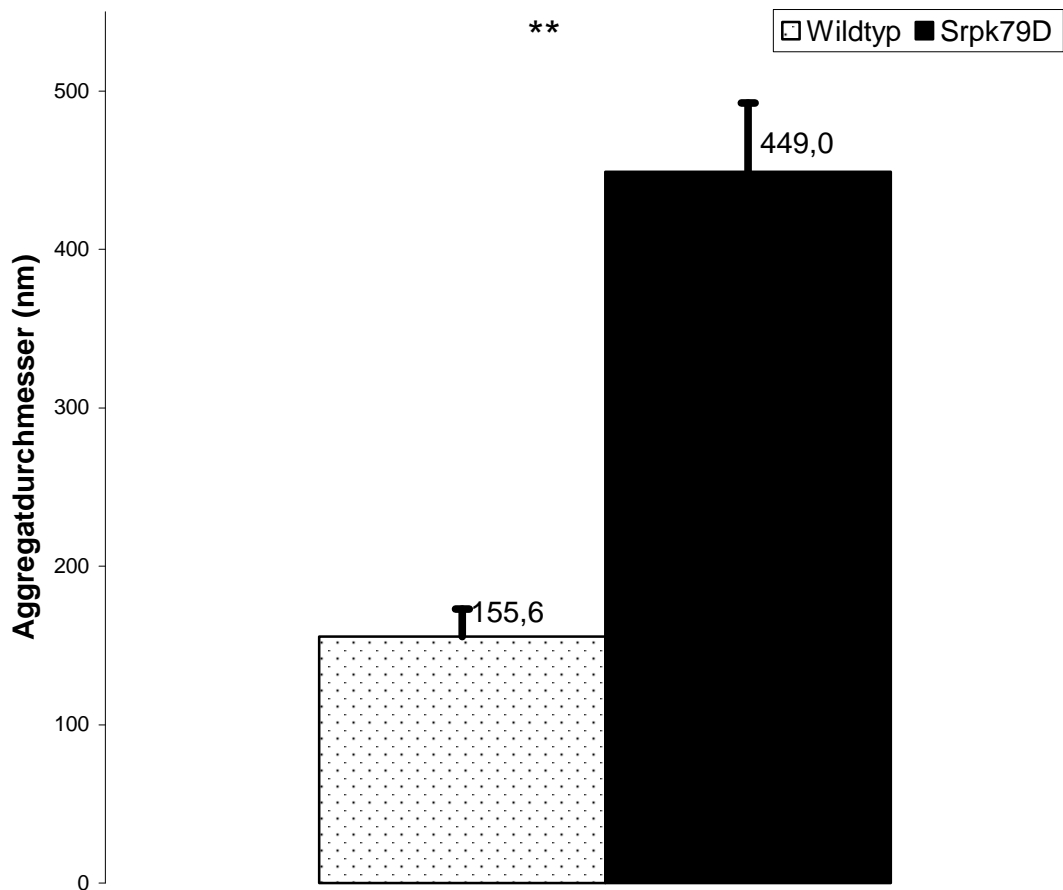


Abb. 4.18 Vergleich des mittleren Durchschnitts der Aggregate in Wildtyp und *Srpk79D*-Nullmutante, Fehlerbalken gibt SEM an.

#### 4.3.2.2 Beziehung zwischen Entfernung des Aggregats zum Ventralganglion und Aggregatgröße

Bei zwei Mutanten (Srpk79D-1 und Srpk79D-7) wird explorativ untersucht, ob die Größe eines Aggregats von der Distanz des Aggregats zum Ventralganglion abhängt. Hierfür werden Aggregatdurchmesser und Distanz zueinander in Beziehung gesetzt. Doch es zeigt sich keinerlei systematische Beziehung zwischen der Aggregatgröße und der Lage, s. Abb. 4.19.

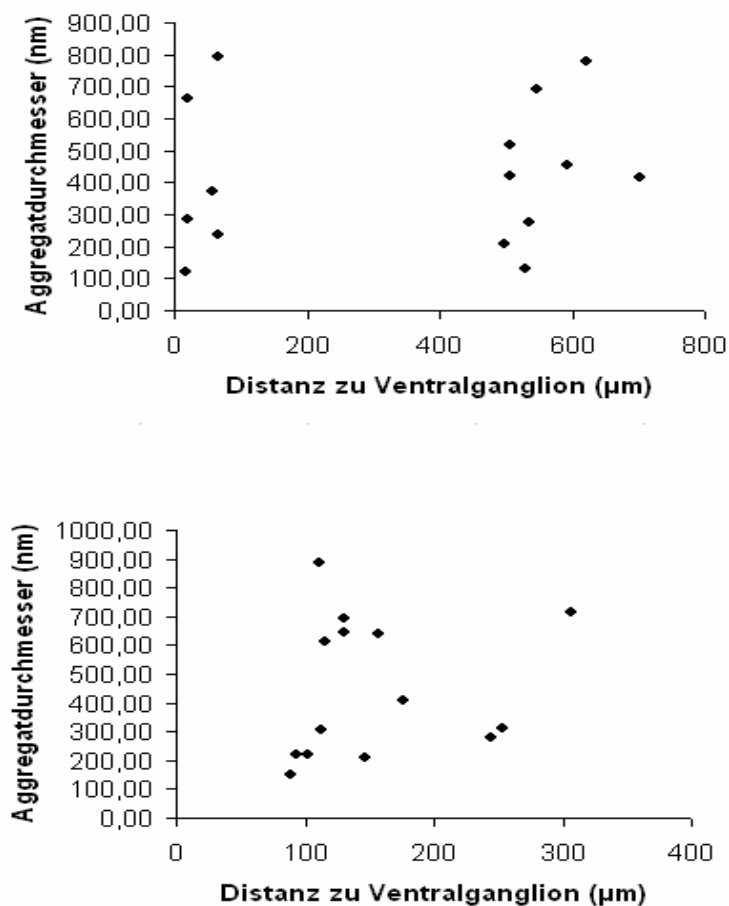


Abb. 4.19 Beziehung zwischen Aggregatdurchmesser und Entfernung zum Ventralganglion (oben Srpk79D-7, unten Srpk79D-1).



#### **4.3.2.3 Assoziation der Aggregate mit Mitochondrien**

Rund 43% (16/37) der Aggregate in der Mutante sind mit einem Mitochondrium assoziiert. Im Wildtyp ist dies bei 33% (2/6) der Fall.

#### **4.3.2.4 Auszählung von Mitochondrien pro Axonfläche**

Da während der qualitativen Untersuchung der Nerven der Eindruck entstand, als ob in den Axonen der Mutante vermehrt Mitochondrien vorkommen, werden bei der quantitativen Auswertung je sechs Stichproben des Nervenfaserbündels fotografiert. In den zusammengesetzten Nervenstichproben wird der Flächeninhalt der Axone bestimmt und die darin gelegenen Mitochondrien gezählt. In den drei Wildtypen werden zwischen  $323,4 \mu\text{m}^2$  und  $573,1 \mu\text{m}^2$  untersucht, wobei 21 bis 31 Mitochondrien gezählt werden. In den drei Nullmutanten werden zwischen  $279,4 \mu\text{m}^2$  und  $346,0 \mu\text{m}^2$  untersucht, wobei 18 bis 19 Mitochondrien gezählt werden. Im Durchschnitt enthält ein Axon im Wildtyp damit  $0,0615 \text{ Mitochondrien} / \mu\text{m}^2$  ( $\pm 0,0064 \mu\text{m}^2 \text{ SD}$ ) und in der Mutante  $0,0599 \text{ Mitochondrien} / \mu\text{m}^2$  ( $\pm 0,0071 \mu\text{m}^2 \text{ SD}$ ), s. Abb. 4.20. Somit gibt es zwischen Wildtyp und Mutante keinen Unterschied in der Dichte der Mitochondrien.

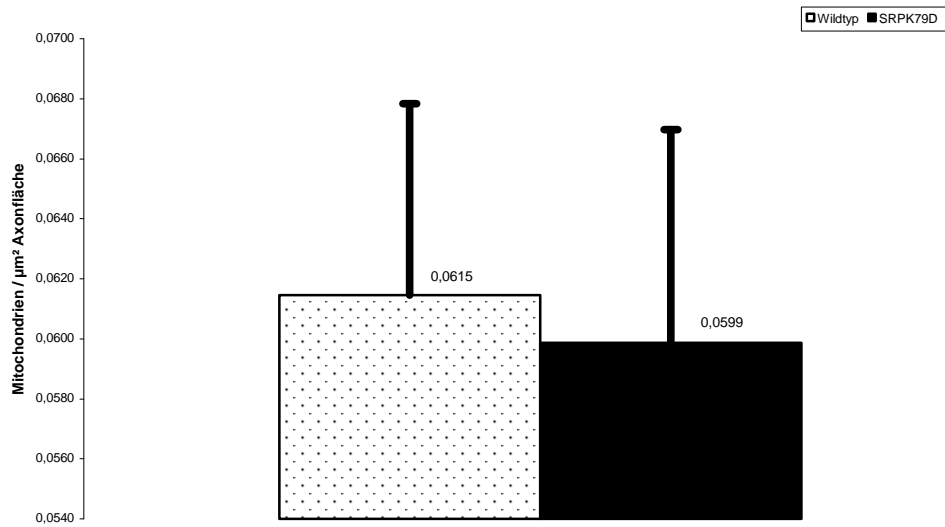


Abb. 4.20 Stichprobenartige Auszählung von Mitochondrien pro Axonfläche, Fehlerbalken gibt Standardabweichung an.

#### **4.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven**

Angeregt durch die Funde der Aggregate als T-bar ähnliche Strukturen in der elektronenmikroskopischen Untersuchung, soll versucht werden, weitere Proteine dieser Strukturen zu identifizieren. Dafür werden Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

##### **4.4.1 Färbung mit dem N-terminalen BRP-Antikörper**

Die Färbung der larvalen Nerven und der synaptischen Boutons erfolgt in der Arbeitsgruppe Buchner mit dem nc82-Antikörper, der den C-Terminus des Proteins Bruchpilot erkennt. Von der Arbeitsgruppe Sigrist wird freundlicherweise ein polyklonaler Antikörper zur Verfügung gestellt, der sich gegen den N-Terminus von Bruchpilot richtet (Fouquet et al., 2009). Hier wird mit einer Doppel-Immunfluoreszenzfärbung untersucht, ob dieser N-terminale BRP-Antikörper (BRP N-term) ebenfalls die nc82-positiven BRP-Spots in den Nervenfaserbündeln der *Srpk79D*-Nullmutante erkennt. Als Positivkontrolle der Färbung kann die Erkennung der präsynaptischen Boutons der neuromuskulären Synapse dienen, weil dies von der Arbeitsgruppe Sigrist bereits gezeigt worden ist.

In Abb. 4.21 ist die Doppelfärbung der Nervenfaserbündel im Wildtyp dargestellt, Abb. 4.22 zeigt synaptische Boutons. N- und C-terminaler BRP-Antikörper erkennen die Nervenfaserbündel und die synaptischen Boutons.

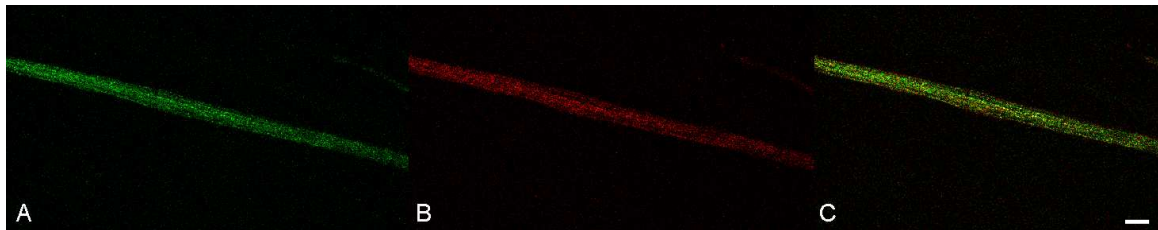


Abb. 4.21 Nervenfaserbündel des Wildtyps. A Färbung mit BRP-AK C-term (nc82), B Färbung mit BRP-AK N-term, C Überlagerung von A und B. Messbalken 10  $\mu\text{m}$ .

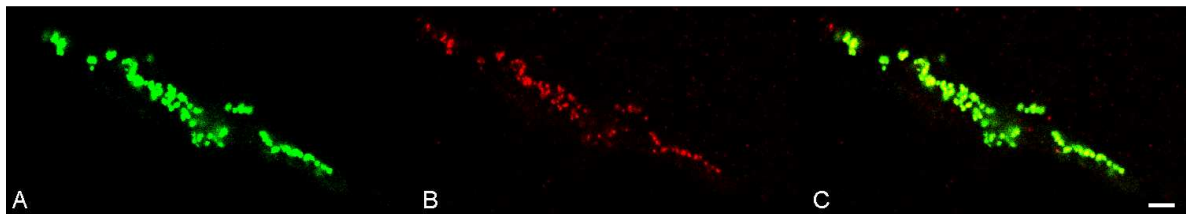


Abb. 4.22 Synaptische Boutons des Wildtyps. A Färbung mit BRP-AK C-term (nc82), B Färbung mit BRP-AK N-term, C Überlagerung von A und B. Größenbalken 1  $\mu\text{m}$ .

Die Färbung mit dem nc82-Antikörper zeigt ein intensiver gefärbtes Bild mit einer geringeren Erkennung von Hintergrund.

Dieser Intensitätsunterschied bleibt auch gleich wenn die Fluoreszenzfarbstoffe der jeweiligen Sekundärantikörper miteinander vertauscht werden.

In den Abb. 4.23 und 4.24 wird die Doppelfärbung der beiden BRP-Antikörper in den Nervenfaserbündeln und synaptischen Boutons der *Srpk79D*-Nullmutante gezeigt.

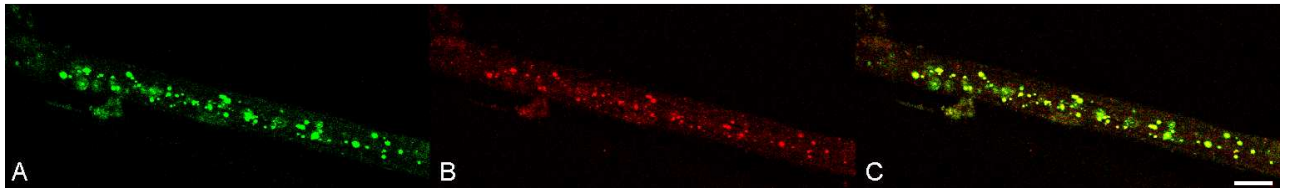


Abb. 4.23 Nervenfaserbündel der *Srpk79D*-Nullmutante. A Färbung mit BRP-AK C-term (nc82), B Färbung mit BRP-AK N-term, C Überlagerung von A und B, Größenbalken 10  $\mu$ m.

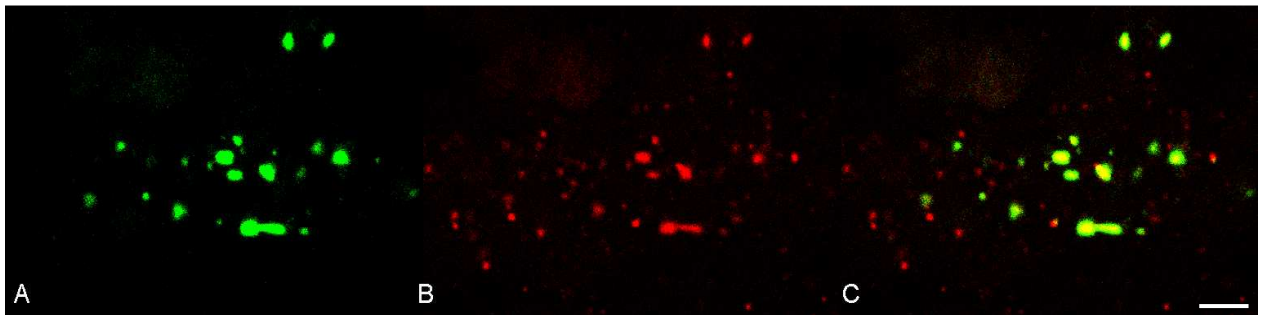


Abb. 4.24 Synaptische Boutons der *Srpk79D*-Nullmutante. A Färbung mit BRP-AK C-term (nc82), B Färbung mit BRP-AK N-term, C Überlagerung von A und B, Größenbalken 1  $\mu$ m.

Der N-terminale Antikörper erkennt wieder die Nervenfaserbündel und die synaptischen Boutons. Des Weiteren färbt er die BRP-Akkumulationen in den Nerven. Die beiden Antikörper kolokalisieren. Auch hier ist die Färbung des N-terminalen Antikörpers weniger intensiv als mit dem nc82-Antikörper und zeigt mehr Hintergrundfärbung. Man kann teils eine gewisse seitliche Verschiebung

der mit den beiden Antikörpern markierten BRP-Akkumulationen und der synaptischen Boutons erkennen.

Daneben gibt es wenige synaptische Boutons, die jeweils nur von einem der beiden Antikörper erkannt werden, also Punkte, die hier nur grün bzw. rot dargestellt werden.

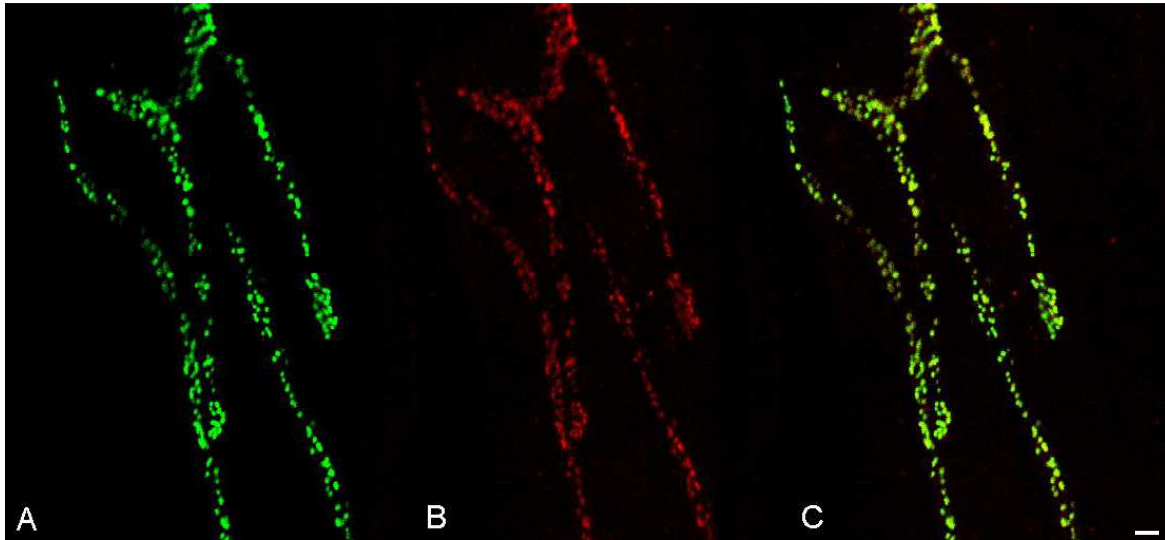
#### **4.4.2 Färbung mit dem DVGlut-Antikörper**

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung sind die mutmaßlichen BRP-Anhäufungen von vesikulären Strukturen umgeben, die präsynaptische Vesikel darstellen könnten. Dies ist auch bei den physiologischen T-bars an einer Synapse der Fall. So ergibt sich die Frage, ob die BRP-Spots mit Markern der Präsynapse oder synaptischer Vesikel kolokalisieren.

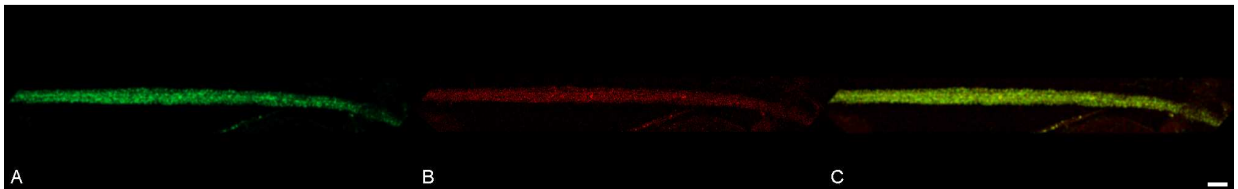
Es ist bereits gezeigt worden, dass generelle Marker der Präsynapse wie Synapsin, Cysteine String Protein oder Synaptotagmin nicht mit den Aggregaten kolokalisieren (Nieratschker et al., 2009; Johnson et al., 2009).

Hier wird untersucht, ob die BRP-Spots mit einem Marker der glutamatergen Vesikel der motorischen Endplatte kolokalisieren. Dazu wird eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit dem BRP-Antikörper nc82 und dem Antikörper gegen den C-Terminus des vesikulären Glutamatransporters DVGlut durchgeführt, der von Mahr und Aberle (Mahr & Aberle, 2006) freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden ist. Sie haben bereits gezeigt, dass dieser Antikörper zuverlässig die glutamatergen neuromuskulären Synapsen von *Drosophila* markiert. Daher dient der Nachweis der synaptischen Boutons als Positivkontrolle der Färbung.

In den Abb. 4.25 und 4.26 werden die synaptischen Boutons und die Nervenfaserbündel im Wildtyp gezeigt.



4.25 Synaptische Boutons des Wildtyps. A Färbung mit BRP-AK C-term (nc82) (2. AK Alexa488), B Färbung mit DVGlutAK C-term (2. AK Cy3), C Überlagerung von A und B. Messbalken 1  $\mu$ m.



4.26 Nervenfaserbündel des Wildtyps. A Färbung mit BRP-AK C-term (nc82) (2. AK Alexa488), B Färbung mit DVGlutAK C-term (2. AK Cy3), C Überlagerung von A und B. Messbalken 10  $\mu$ m.

Beide Antikörper zeigen eine homogene unspezifische Färbung der Nervenfaserbündel im Wildtyp und Kolokalisation deutlich spezifischer Reaktivität in den synaptischen Boutons, was unerwartet ist, da die Vesikel im Lumen des Boutons vorliegen sollten, während die von nc82 markierten T-bars der präsynaptischen aktiven Zone mit der Membran assoziiert sind.



Abb. 4.27 zeigt, dass Bruchpilot und DVGlut an den synaptischen Boutons in der *Srpk79D*-Nullmutante ebenfalls komplementär lokalisiert sind. Doch eine Darstellung der BRP-Spots in den Nervenfaserbündel der Mutante, die deutlich von nc82 gefärbt werden, ist mit dem Antikörper gegen DVGlut nicht möglich, s. Abb. 4.28. Bei sehr starker Verstärkung des Signals mit dem Laser des konfokalen Mikroskops werden einzelne Aggregate in der DVGlut-Reaktion mit dem Cy3-Antikörper erkennbar (nicht gezeigt).

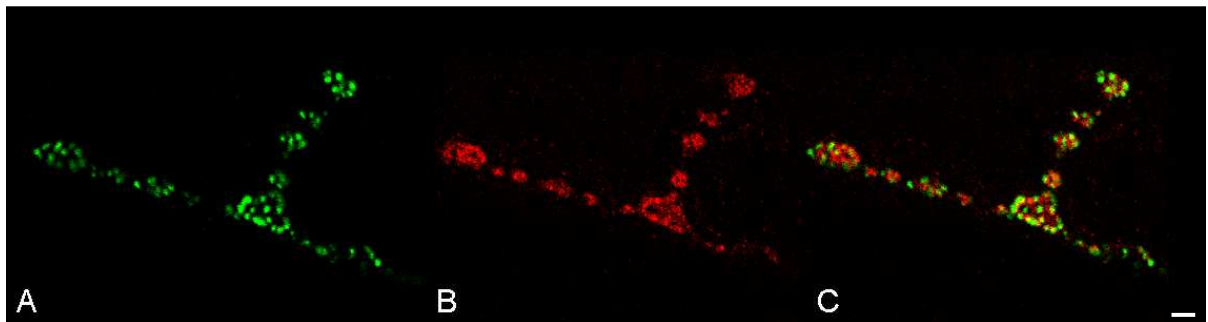


Abb. 4.27 Synaptische Boutons der *Srpk79D*-Nullmutante. A Färbung mit BRP-AK C-term (nc82) (2. AK Alexa488), B Färbung mit DVGlut-AK C-term (2. AK Cy3), C Überlagerung von A und B. Größenbalken 1  $\mu\text{m}$ .

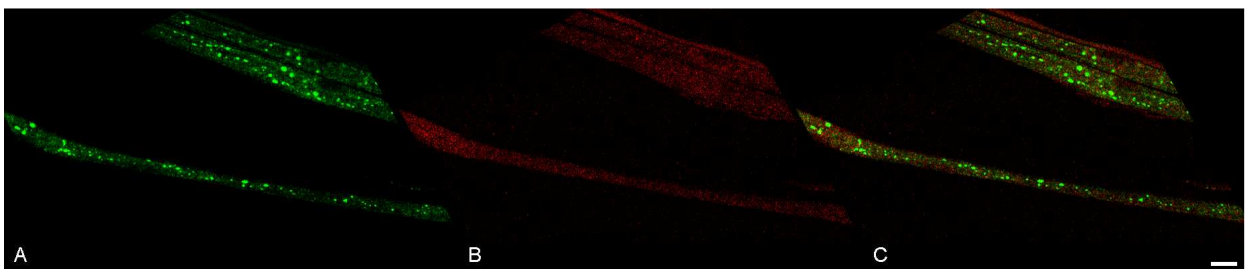


Abb. 4.28 Nervenfaserbündel der *Srpk79D*-Nullmutante. A Färbung mit BRP-AK C-term (nc82) (2. AK Alexa488), B Färbung mit DVGlut-AK C-term (2. AK Cy3), C Überlagerung von A und B. Messbalken 10  $\mu\text{m}$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Gewinnung von gereinigtem Protein für die AK-Aufreinigung

Die Expression des PB-Proteinfragments mit His-Tag in den BL21-Zellen ist erfolgreich gewesen, wie die Westernblots gezeigt haben. Die kleinen Banden, die dort zwischen 17 und 26 kDa zu erkennen sind, entsprechen wohl Abbauprodukten des His-Tag-Proteins. Insgesamt ist es jedoch nicht möglich gewesen, eine entsprechende Menge herzustellen, die für die Affinitätsreinigung des Antikörpers gegen die PB-Isoform der SRPK79D ausreicht. Auch ist eine solche Reinigung damit nicht sinnvoll, da trotz der Nickel-Agarose-Aufreinigung noch viel zusätzliches Hintergrundprotein eluiert worden ist, wie die Coomassie-Färbung der Gele gezeigt hat.

Die Ursache für die geringe Produktion ist unklar. Ein toxischer Effekt des eingeschleusten Proteinfragments erscheint unwahrscheinlich, da die Bakterienkulturen sehr gut gewachsen sind. Es scheint auch kein vorzeitiger Abbau des Proteins vorzuliegen, weil die Banden des abgebauten Proteins viel kleiner sind als die Bande des Histag-Proteins. Allerdings könnte man durch Zusatz eines Proteaseinhibitors dies möglicherweise verhindern. Durch Zusatz von Imidazol zu den Elutionspuffern könnte eventuell eine größere Menge des His-Tag-Proteins von den Nickel-Agarosesäulen eluiert werden (Wiley et al., 2002).

Zur Verringerung des Hintergrunds kann eventuell der Einsatz einer anderen Aufreinigungsmethode statt Nickel-Agarose sinnvoll sein.

## 5.2 In-situ-Hybridisierung an Embryonen

Es wurde erfolgreich die mit Digoxigenin markierte sense- und antisense-Sonde hergestellt. Damit ist allerdings keine spezifische Färbung der Embryonen gelungen. Eine zu geringe Expression von *Srpk79D*-mRNA in Embryonen kann als Ursache ausgeschlossen werden, weil zwei andere Arbeitsgruppen diese bereits gezeigt haben, s. Abb. 5.1 (Kopczynski et al., 1998; Johnson et al., 2009). Diese finden die *Srpk79D* vorwiegend im Nervensystem exprimiert.

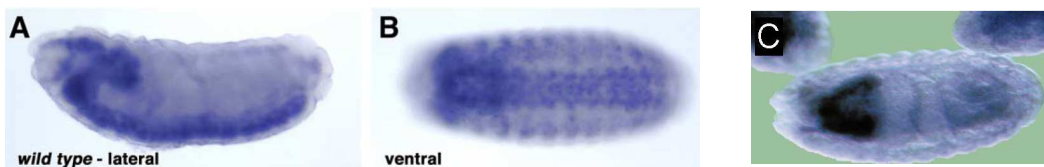


Abb. 5.1 In-Situ-Hybridisierung gegen die *Srpk79D* in Embryonen A, B Hohes Expressionsniveau der *Srpk79D* im embryonalen Ventralganglion und geringer Expression außerhalb des Nervensystems (aus Johnson et al., 2009), C Expression der *Srpk79D* im embryonalen Gehirn, früheres Embryonalstadium als A und B (aus Kopczynski et al., 1998).

Man sollte testen, ob die hier benutzte Sonde prinzipiell an die Ziel-mRNA bindet. Man könnte hierzu ein Lysat aus Embryonen auf einer Membran immobilisieren und daran die Funktionsfähigkeit der Sonde testen.

### **5.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung von Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven**

In der elektronenmikroskopischen Untersuchung der ventralen Nerven in Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven finden sich nur in der Mutante auffällige große Aggregate ED Materials, die von verschiedenartigen Vesikeln und gelegentlich von anderen Organellen umgeben sind.

Die ED Bereiche wirken, als ob es zu einem kompletten oder fehlgeschlagenen vorzeitigen Aufbau von mehreren T-bars gekommen ist. Dabei kommen einzelne oder mehrere miteinander verschmolzene T-bars in vielen verschiedenen Anordnungen vor. Die sternförmigen Strukturen der ED Zentren entsprechen schrägen Tangentialschnitten von T-bars, wie sie bereits Atwood et al. (1993) beschreiben. Die schräg getroffene Plattform des T-bars erscheint als drei- oder vierzackige Figur. Von der Größe her enthalten die gefundenen Aggregate wohl viele aneinander gereihete oder miteinander verschmolzene T-bars. Auch sind bei diesen T-bars Vesikel über ED Filamente an den ED Filz der T-bar-Oberfläche gebunden, wie dies bei T-bars der Präsynapse der Fall ist (Koenig & Ikeda, 1999). Die Vesikel direkt am ED Bereich entsprechen mit ungefähr 40 nm Durchmesser der Größe nach synaptischen Vesikeln (Jia et al., 1993; Südhof, 2004). Allerdings sind es wohl keine reifen synaptischen Vesikel, weil sie keinen Marker synaptischer Vesikel wie Synaptotagmin oder Cysteine String Protein enthalten (Nieratschker et al., 2009; Johnson et al., 2009). Es ist unklar, wie die Vesikel, die nicht über ED Filamente angebonden sind, zu den T-bar-Strukturen der Aggregate rekrutiert und festgehalten werden.

Das Aggregat, das einen an die Plasmamembran gebundenen T-bar enthält, könnte man für eine ektopische Synapse vom neuroneuronalen Typ halten, wie sie

Prokop et al. (1996) beschreiben. Jedoch ist die T-bar-Struktur irregulär geformt und es liegen daneben noch weitere ED Anteile im Axoplasma vor, so dass die Morphologie nicht einer neuronalen aktiven Zone entspricht. Auch sind verschiedene große Vesikel vorhanden, wie sie an einer regulären aktiven Zone nicht vorkommen. So ist dies ein *Srpk79D*-Nullmutantenspezifisches Aggregat, das durch einen anderen Mechanismus entstehen muss als die ektopen aktiven Zonen. Im Wildtyp wurde nur einmal eine Struktur gefunden, die einer neuronalen aktiven Zone entsprechen könnte trotz der intensiven Suche nach T-bar-ähnlichen Gebilden während der gesamten Analyse.

Die quantitative elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt, dass die Aggregate in der Mutante signifikant häufiger vorkommen und hochsignifikant größer sind im Vergleich zum Wildtyp. Bereits die Ultrastruktur mit ihrer Ähnlichkeit zu T-bars, deren Bestandteil BRP ist (Fouquet et al., 2009) legt nahe, dass dies die Äquivalente zu den BRP-Akkumulationen der Immunfluoreszenzfärbungen sind. Ebenso entsprechen die unterschiedlichen Durchmesser der ED Aggregate den verschiedenen großen BRP-Akkumulationen in der Immunfluoreszenz. Pre-embedding Immunogold-elektronenmikroskopische Untersuchung mit dem nc82-Antikörper hat gezeigt, dass die gefundenen Aggregate wirklich BRP enthalten (Nieratschker et al., 2009). Dabei zeigen die Goldkörner an, dass der C-Terminus von BRP im äußeren Bereich der T-bar-Strukturen lokalisiert ist, wie es für physiologische T-bars der neuromuskulären Synapse mit STED-Mikroskopie gezeigt worden ist (Kittel et al., 2006).

Aufgrund der Morphologie vieler Aggregate, welche die differenzierte Struktur eines synaptischen T-bars aufweisen, muss notwendigerweise der gesamte „Kompositionsapparat“, der die T-bars an der aktiven Zone aufbaut, in den Axonen wirksam sein. Dies erfordert auch den Einbau anderer unbekannter

Proteine, die neben BRP Bestandteil von T-bars sind. Des Weiteren sind all diese elektronendichten Strukturen von vesikulären Strukturen umgeben, die morphologisch und der Größe nach nicht von regulären synaptischen Vesikeln der Präsynapse unterschieden werden können. Teils ist die typische Lipiddoppelschicht zu erkennen und teils erfolgt eine Anheftung der Vesikel über ED Brücken an den ED Bereich, wie dies bei synaptischen Vesikel an der neuromuskulären Synapse der Fall ist (Koenig & Ikeda 1999). Ebenso kommen unter den umgebenden Vesikel dense core Vesikel vor, die es auch an der neuromuskulären Synapse gibt (Prokop 2006). Allerdings finden sich keine morphologischen Anhaltspunkte dafür, dass sich eine deplatzierte Synapse bzw. Präsynapse am Axon direkt neben dem Aggregat ausgebildet hätte.

Die Morphologie liefert des Weiteren keinen Hinweis, dass das BRP-Protein in den Axonen „stecken bleibt“ und nicht weiter transportiert wird. Die explorative Untersuchung der Aggregatgröße in Bezug auf den Abstand zum Ventralganglion hat keinen korrelativen Zusammenhang ergeben. Denkbar wäre gewesen, dass die Aggregate bereits im Soma zusammengebaut sind und danach im Axon nach peripher wandern: dann würde man erwarten, dass große Aggregate somanah und peripher kleinere zu finden sind, die schneller wandern. Das Umgekehrte könnte man erwarten, wenn die Aggregate nach und nach durch „Abladen“ von Material entstehen. Auch sprechen die Befunde gegen eine schrittweise Anhäufung oder den Abbau von Aggregatkomponenten im Laufe des Transports im Axon.

Da es keine Korrelation zwischen Größe und Axonlokalisierung der Aggregate gibt, ist zu vermuten, dass die Aggregate in ihrer Form vor Ort gebildet werden. Prokop & Meinertzhagen (2006) halten es für wahrscheinlich, dass der Zusammenbau der T-bars an den Photorezeptorterminals vor Ort geschieht. Zur Bekräftigung dieser Vermutung könnte man elektronenmikroskopisch noch

einmal genauer dem Ventralganglion nahe Aggregate mit Aggregaten in den Nerven am hinteren Larvenende, welche die längsten Axone enthalten, vergleichen. Ergänzt wird diese Ansicht durch den Befund, dass nur kleine BRP-Punkte entlang der Axone in den Larven einer anderen *Srpk79D*-Nullmutante transportiert werden, während große BRP-Aggregate fixiert scheinen. Dabei entspricht die Gesamtmenge an BRP-Protein eines Neurons in der Mutante der des Wildtyps, jedoch mit einer Erhöhung des axonalen BRP-Gehalts bei gleichzeitiger Verringerung der Menge im synaptischen Bouton (Johnson et al., 2009).

Die explorative Untersuchung der Mitochondriendichte der Axonfläche erfolgte, da bei der qualitativen Analyse der Eindruck entstand, als ob in den Axonen der Mutanten mehr Mitochondrien zu finden sind. Das Ergebnis der Untersuchung, die auf Zufallsstichproben und blinder Auswertung beruht, spricht eindeutig für eine gleiche Mitochondriendichte in den Axonen von Wildtyp und Mutante. Auch immunhistochemisch sind die Mitochondrien in den Neuronen wie im Wildtyp verteilt (Johnson et al., 2009). Darüber hinaus sind keine axonalen Auftreibungen und Ansammlungen von Organellen gefunden worden, wie sie in Mutanten des axonalen Transports vorkommen (Hurd & Saxton, 1996, Bowman et al., 1999, Martin et al., 1999, Miller et al., 2005). Diese beiden Befunde unterstützen die Ansicht, dass der axonale Transport nicht generell beeinträchtigt ist.

Insgesamt gibt es keinen offensichtlichen Defekt in der Ultrastruktur der larvalen Axone der *Srpk79D*-Nullmutante. Eine Arbeitsgruppe, die mit einer anderen *Srpk79D*-Mutante arbeitet, hat zudem gezeigt, dass die Ultrastruktur an der neuromuskulären Synapse dem Wildtyp entspricht (Johnson et al., 2009).

Die Aggregate enthalten neben Vesikeln, die zumindest in der Größe synaptischen Vesikeln entsprechen, auch größere Vesikel. Deren Herkunft, Inhalt und

Funktion ist unbekannt. In einer Syntaxin-Mutante kommen an der neuromuskulären Synapse neben normalen synaptischen Vesikeln auch vergrößerte Vesikel vor (Broadie et al., 1995). Eine Erklärung und mögliche Bedeutung kennen auch diese Autoren nicht.

In den Axonen des Wildtyps kommen ebenfalls Aggregate vor, wenn auch seltener, kleiner und nicht mit einer ausgeprägten T-bar-Struktur des ED-Bereichs. Allerdings sind auch da einige Vesikel über ED-Brücken an den ED-Bereich gebunden wie dies an der Präsynapse der Fall ist (Koenig & Ikeda, 1999). Diese ähneln am ehesten den einfach aufgebauten Aggregaten in der Mutante. Die Übereinstimmungen zu den Aggregaten in den *SrpK79D*-Larven weisen darauf hin, dass der Vorgang der Aggregatbildung zu einem bestimmten Ausmaß auch unter physiologischen Bedingungen möglich sein könnte, aber durch die Gegenwart der SRPK79D nur in geringem Ausmaß stattfindet. Der Mangel an SRPK79D führt offensichtlich entweder zu einer Stimulation der Bildung der Aggregate oder zu einer Beeinträchtigung der Auflösung dieser Strukturen.

Um die Identität dieser Aggregate des Wildtyps mit denen der *SRPK79D*-Nullmutante zu sichern, müsste man sie ebenfalls mit der immunelektronenmikroskopischen Untersuchung nachweisen. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Aggregate aus anderen Proteinen bestehen. Doch dann stellt sich die Frage, welche Proteine es sind, die ebenfalls in der Lage sind, Vesikel zu rekrutieren und über ED-Filamente zu binden, und ob diese Proteine auch physiologische Bestandteile eines T-bars sind.



#### **5.4 Immunfluoreszenzfärbungen von Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven**

Es wurde die Färbung der ventralen Nerven mit C- und N-terminalen Bruchpilot-Antikörpern in Wildtyp- und *Srpk79D*-Larven untersucht.

Sowohl der C-terminale als auch der N-terminale Bruchpilot-Antikörper färben die synaptischen Boutons und die Bruchpilot-Akkumulationen in den ventralen Nerven der *Srpk79D*-Larven an. Damit ist gezeigt, dass auch in den Akkumulationen Bruchpilot als vollständiges Protein vorliegt. Dieser Befund ergänzt die Westernblotuntersuchungen, die gegen ein verändertes Spleißen der BRP-Isoformen in der Mutante sprechen (Nieratschker et al., 2009). Die letzten 17 Aminosäuren des C-Terminus von Bruchpilot sind notwendig für die Anbindung von Vesikeln über ED Strukturen an die T-bars (Hallermann et al., 2010): diese ED Verbindungen sind ebenfalls in den Aggregaten in der Elektronenmikroskopie zu sehen, so dass offenbar diese Funktion des C-Terminus intakt ist.

Die gewisse seitliche Verschiebung von C- und N-terminaler Färbung entspricht den Ergebnissen der STED-Mikroskopie (Fouquet et al., 2009), wurde hier allerdings nicht systematisch untersucht. Dass diese Verschiebung auch in den BRP-Akkumulationen auftritt, könnte darauf hinweisen, dass BRP auch in den Akkumulationen „physiologisch aufgebaut“ ist.

Es gibt einzelne synaptische Boutons, die nur durch einen der BRP-Antikörper erkannt werden. Dies könnte der Färbung verschiedener BRP-Isoformen entsprechen oder lediglich Hintergrundfärbung darstellen. Es ist bekannt, dass manche BRP-Isoformen nur vom C-terminalen und andere nur durch den N-terminalen BRP-Antikörper erkannt werden (E. Buchner, persönliche Mitteilung). Doch man müsste noch andere *Drosophila*-Mutanten, wie die *BRP*-Nullmutante, genauer untersuchen, um festzulegen, ob die beobachtete Färbung BRP-Isoformen oder Hintergrund entspricht.

Bei der Immunfluoreszenzuntersuchung der Nervenfasern mit dem vesikulären Glutamatttransporter dient die Anfärbung der synaptischen Boutons als Positivkontrolle. Weil bei einem Teil der Boutons das Signal nicht wie erwartet komplementär zum Bruchpilotprotein auftrat (z. B. Abb. 4.25), musste in Betracht gezogen werden, dass die Anfärbung eine unspezifische Bindung des Antikörpers an BRP widerspiegelte.

Daher wiederholte eine Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Buchner die Färbung mit einem neuen Aliquot des DVGlut-Antikörpers und fand hierbei eine korrekte Anfärbung der synaptischen Boutons komplementär zu BRP. Ein Signal in den BRP-Aggregaten fand sich nur bei starker Verstärkung des Lasers des konfokalen Mikroskops Signale und in höchstens 10% der BRP-Aggregate (A. Schubert, persönliche Mitteilung).

Somit halten wir die geringen Signale in den BRP-Aggregaten für eine unspezifische Reaktion des Antikörpers und gehen davon aus, dass der vesikuläre Glutamatttransporter nicht signifikant in den Aggregaten lokalisiert ist. Falls er dennoch darin vorkommen sollte, läge er jedoch in einer sehr viel geringeren Konzentration vor als dies in den synaptischen Boutons der Fall ist.

So ergänzt diese Untersuchung die Versuche mit den anderen präsynaptischen Markern (Synaptotagmin, Synbrevin), die nahe legen, dass die Vesikel der Aggregate keine reifen synaptischen oder synaptischen Vorläufervesikel darstellen.

Damit ist weiter unklar, welcher Natur die Vesikel in den Aggregaten sind und woher sie stammen. Eine Fraktion der synaptischen Vesikel in der Präsynapse stammt aus dem Golgiapparat und wird entsprechend als synaptische Vorläufervesikel axonal zur Synapse transportiert. Die übrigen synaptischen Vesikel entstehen durch Vesikelrückgewinnung von der Plasmamembran durch Endozytose (Prokop, 2006; Prokop & Meinertzhagen, 2006). Doch bislang gibt es

keinen Hinweis, wie die T-bar-Strukturen der Aggregate die Vesikel rekrutieren und in welchen Kompartiment diese synthetisiert werden.

### 5.5 Funktion der SRPK79D

Insgesamt kann man diesen Befunden entnehmen, dass die SRPK79D notwendig ist für die regelrechte axonale Verteilung von BRP-Protein, indem sie den vorzeitigen Aufbau von nicht funktionsfähigen T-bars in Axonen verhindert. Bislang ist unklar, ob dieser Mechanismus unter Beteiligung von BRP auch die Verhaltensdefekte und die reduzierte Lebenserwartung verursacht.

SRPK79D hat dabei wohl die Funktion einer SR-Protein-spezifischen Kinase. Sie kann SR-Proteine *in vitro* phosphorylieren und ihre Kinaseaktivität ist erforderlich für ihre Funktionsfähigkeit (Nieratschker et al., 2009; Johnson et al., 2009). Bruchpilot selbst ist allerdings kein Substrat der Kinase, weil es keine RS-Domäne aufweist. Allerdings müssen die (SR-)Proteine, die ihr *in vivo* als Substrat dienen, noch identifiziert werden. Der nahe liegende Gedanke, dass die SRPK79D beteiligt ist am Spleißen der BRP-prä-mRNA, trifft nicht zu, weil die Expression der BRP-Isoformen in der *Srpk79D*-Nullmutante keinen Unterschied zum Wildtyp aufweist (Nieratschker et al., 2009).

Da Kinase-Isoformen auch an den präsynaptischen aktiven Zonen zu finden sind, besteht die Möglichkeit, dass RNA-Spleißen auch dort statt findet. Daraus ergibt sich, dass man untersuchen muss, ob SR-Proteine und die Bestandteile der Spleißmaschinerie dort lokalisiert und aktiv sind.

Alternativ könnten die axonalen BRP-Akkumulationen in der *Srpk79D*-Nullmutante durch die Phosphorylierung eines anderen Proteins bzw. anderer Proteine der aktiven Zone vermittelt sein. So phosphorylieren SRPKs nicht nur SR-Proteine, sondern zum Beispiel auch den LaminB-Rezeptor (Nakagawa et

al., 2005). Ebenso gibt es aktive Kinasen in der Präsynapse: in Vertebraten ist die Calcium-Calmodulin-abhängige Serin-Proteinkinase (CaMK), deren Homolog in *Drosophila* CAKI ist, an der Präsynapse lokalisiert und phosphoryliert den C-Terminus von Neurexin (Zordan et al., 2005; Kannan & Taylor, 2008). So könnte die SRPK79D, die auch teilweise in der Präsynapse lokalisiert ist (Nieratschker et al., 2009; Johnson et al., 2009), dort Proteine phosphorylieren, während sie im Soma an der Regulation des Spleißens beteiligt ist. Allerdings bleibt weiterhin offen, welches präsynaptische Protein Substrat der SRPK79D sein könnte und wie die Signale zum Aufbau von T-bars in die Axone weitergeleitet werden.

Es gibt einige Publikationen über ähnliche oder verwandte Phänotypen, die wohl über andere Mechanismen verursacht werden. So berichten Wairkar et al. (2009), dass die Ausschaltung der Serin-Threonin-Kinase Unc-51 zu großen Akkumulationen von Bruchpilot und dem vesikulären Glutamatransporter in larvalen Nervenfaserbündeln, zur Reduktion von Synapsen und zur Beeinträchtigung der Transmitterfreisetzung führt. Die Autoren vermuten als Ursache hierfür einen spezifischen Transportdefekt.

Li et al. (2007) berichten über eine Neurexin-Nullmutante, die eine verringerte Anzahl an synaptischen Boutons und kolokalisierte Akkumulationen von Bruchpilot und Synaptotagmin in den larvalen Nerven aufweist. Die Anzahl der T-bars pro Bouton ist erhöht, vermutlich als eine Form der Kompensation. Denn durch die Verringerung der Boutonanzahl besteht insgesamt das gleiche Verhältnis von T-bars pro neuromuskulärer Endplatte. So spielt Neurexin eine Rolle beim Aufbau der Cytoarchitektur der aktiven Zonen.

Eine Überlappung der kausalen Mechanismen in der Unc51- oder Neurexinmutante mit denen in der *Srpk79D*-Mutante ist nicht plausibel, da in den Synapsen (ausreichend) Bruchpilot vorhanden und deren Zahl nicht reduziert ist.

Auch enthält diese keine Akkumulationen von DVGlut oder Synaptotagmin in den Axonen. Im Gegensatz zu der Unc51-Mutante zeigt sie auch keine Beeinträchtigung der synaptischen Transmission an der neuromuskulären Synapse (Nieratschker et al., 2009).

Eine Kinesin-3-Mutante, *immaculate connections (imac)*, weist einen spezifischen Transportdefekt auf mit der Folge, dass es keine synaptischen Vesikel in den Axonen gibt und keine synaptischen Boutons ausgebildet werden (Pack-Chung et al., 2007). Die wenigen aktiven Zonen, die an den Nervenenden entstehen, enthalten T-bars, die jedoch nicht von synaptischen Vesikel umgeben sind. Imac scheint direkt für den Transport eines Teils der Proteine der aktiven Zone verantwortlich zu sein. Weil die T-bars an der neuromuskulären Synapse der *Srpk79D*-Nullmutante unbeeinträchtigt sind (Johnson et al., 2009), bekräftigt dies die Ansicht, dass auch kein Transportdefekt, der spezifisch für synaptische Komponenten ist, dem Phänotyp der *Srpk79D*-Nullmutante zu Grunde liegt.

In Vertebraten sind Piccolo und Bassoon beteiligt an der Organisation der aktiven Zone. Ohne Bassoon sind die Ribbons von der präsynaptischen Membran abgelöst und verbinden sich im Zytoplasma der Präsynapse zu Stapeln, die von Vesikel umgeben sind (Dick et al., 2003). Diese weisen eine gewisse Ähnlichkeit zu den Aggregaten in der *Srpk79D*-Nullmutante auf. Eventuell tendieren nicht fest verankerte präsynaptische Ribbons zur Selbstaggregation. Dann würde die SRPK79D nicht nur den vorzeitigen Aufbau von T-bars inhibieren bzw. den Abbau solcher vorzeitig entstandenen synaptischen Strukturen fördern, sondern dabei insbesondere die Zusammenlagerung von T-bars verhindern.

## **5.6 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Kinase SRPK79D eine wichtige Rolle bei der regelrechten Verteilung des aktiven Zonen Proteins Bruchpilot einnimmt. Fehlt die Kinase, kommt es zur Bildung von großen BRP-enthaltenden T-bar-ähnlichen Aggregaten in den Nerven der Mutante. Daraus ergibt sich, dass die SRPK79D an der Kontrolle des Aufbaus von T-bars beteiligt ist und deren verfrühten Aufbau in den Axonen verhindert bzw. den Abbau solcher bereits gebildeter Strukturen fördert. Durch die Homologie zu SR-Protein spezifischen Kinasen und ihrer eigenen Kinaseaktivität (Nieratschker et al., 2009) sind ihre mutmaßlichen Substrate SR-Proteine, die nun identifiziert werden müssen. Es gilt, die molekularen Mechanismen zu verstehen, wie die Entstehung der Bruchpilot-Aggregate im Wildtyp verhindert wird. Damit eröffnet sich die Möglichkeit zu lernen, wie die zeitgerechte und korrekt lokalisierte Ausbildung einer Präsynapse gesteuert wird.

## 6 Zusammenfassung

Die intakte Signalübertragung im animalischen Nervensystem erfordert eine an richtiger Stelle ausgebildete funktionsfähige Synapse zwischen zwei Nervenzellen bzw. zwischen Nerv und Muskel. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutante von *Drosophila melanogaster* untersucht, bei der es zu Veränderungen der Verteilung eines wichtigen Organisationsproteins der synaptischen aktiven Zone kommt. Ein wichtiges Ergebnis der Untersuchungen ist die Beobachtung, dass es in der Mutante zu einer ektopen Ausbildung von Elementen aktiver Zonen in Axonen kommt.

In den Arbeitsgruppen von E. Buchner und S. Sigrist ist bereits das Protein Bruchpilot (BRP) charakterisiert worden, das Bestandteil der präsynaptischen Ribbons, bei *Drosophila* als T-bars bezeichnet, ist. Bei der Suche nach Interaktionspartnern von BRP, ist eine Serin-Arginin-Protein spezifische Kinase SRPK79D entdeckt worden, die offenbar an der Regulation des Aufbaus der T-bars beteiligt ist (Nieratschker et al., 2009). Es gibt vier verschiedene Isoformen der Kinase. Werden nur zwei Isoformen der Kinase (*SRPK79D*-RB und -RE) exprimiert bzw. das Gen der Kinase komplett ausgeschaltet, findet man Ansammlungen von BRP als immunreaktive Aggregate in der Immunfluoreszenz-Färbung von larvalen Motoneuron-Axonon (Nieratschker, 2008). Es ist unser übergeordnetes Ziel, die Funktion und den molekularen Signalweg der Kinase SRPK79D zu entschlüsseln.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, PB-Protein in Reinform für eine Affinitätsreinigung eines PB-Antikörpers zu gewinnen, um in nachfolgenden Untersuchungen die Lokalisation dieser Kinase-Isoform zu untersuchen. Die Proteinreinigung war erfolgreich, aber es gelang nicht, eine für eine Affinitätsreini-

gung ausreichende Menge des Proteins zu isolieren. Ein weiterer Versuch, Lokalisationsuntersuchungen zur Expression der Kinase in *Drosophila-Embryonen* durchzuführen, war ebenfalls nicht erfolgreich. Obwohl die Herstellung einer für die *SRPK79D* mRNA spezifischen RNA Sonde für die in-Situ-Hybridisierung gelang, war die Sensitivität dieser Sonde nicht hoch genug, um die Lokalisation vornehmen zu können.

Eindeutige und aufschlussreiche Ergebnisse dagegen ergab die Untersuchung der Ultrastruktur der BRP-Ansammlungen in den larvalen Motornerven. Als deren Korrelat fanden sich elektronenmikroskopisch charakteristische Ansammlungen elektronendichter intraaxonaler Strukturen, deren Form Ähnlichkeiten zu T-bars aufwies und die von Vesikeln umgeben waren. Die elektronendichten Strukturen zeigten zahlreiche Formvariationen, die wie Ansammlungen von T-bars nebeneinander bzw. „miteinander verklebte“ T-bars oder wie zerstörte T-bars aussahen. In einer nachfolgenden Studie wurde durch eine immun-elektronenmikroskopische Untersuchung gezeigt, dass diese Strukturen in der Tat BRP enthalten (Nieratschker et al., 2009). Ergebnis der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war der Nachweis, dass prinzipiell ähnliche Aggregate auch im Wildtyp gelegentlich gefunden werden, dass sie aber in Mutanten signifikant häufiger vorkommen und auch einen signifikant höheren Durchmesser aufweisen.

Doppelimmunreaktionen mit Antikörpern, die den C- bzw. N-terminalen Bereich von BRP erkennen, belegten darüber hinaus, dass in den Aggregaten das vollständige BRP-Protein vorliegt. Angeregt durch die Ultrastrukturbefunde von mit den elektronendichten Strukturen in den Aggregaten assoziierten Vesikeln wurde in weiteren Doppelimmunreaktionen untersucht, ob ein typisches Protein synaptischer Vesikel neuromuskulärer Synapsen in *Drosophila*, der vesikuläre Glutamattransporter (DVGlut), in den BRP-Ansammlungen nach-



weisbar ist. Während Kollokalisierung von BRP und DVGlut in aktiven Zonen präsynaptischer Boutons nachgewiesen werden konnte, war der Vesikelmarker in BRP-Aggregaten nicht kollokaliert.

Die Ergebnisse belegen, dass die Kinase *SRPK79D* für die Vermeidung einer ektopen Bildung von BRP-enthaltenden, elektronenmikroskopisch atypischen aktiven Zonen ähnelnden Strukturen in larvalen Motoneuronaxonen notwendig ist. Die in diesen Aggregaten regelmäßig zu beobachtenden Vesikel ähneln morphologisch synaptischen Vesikeln, besitzen aber keine dafür typischen Vesikelmarker.

## 7 Literatur

**Adams MD et al.** (2000) The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287: 2185-2195

**Allemand E, Dokudovskaya S, Bordonné R, Tazi J** (2002) A Conserved *Drosophila* Transportin-Serine/Arginine-rich (SR) Protein Splicing Factors and Their Antagonist Repressor Splicing Factor 1. Molecular Biology of the Cell 13: 2436-2447

**Ashburner M, Golic KG, Hawley RS** (2005) *Drosophila*: a laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

**Atwood HL, Govind CK, Wu C-F** (1993) Differential Ultrastructure of Synaptic Terminals on Ventral Longitudinal Abdominal Muscles in *Drosophila* Larvae. Journal of Neurobiology 24 (8): 1008-1024

**Aubol BE, Nolen B, Vu D, Ghosh G, Adams JA** (2002) Mechanistic Insights into Sky1p, a Yeast Homologue of the Mammalian SR Protein Kinases. Biochemistry 41: 10002-10009

**Bao H, Berlanga ML, Xue M, Hapip SM, Daniels RW, Mendenhall JM, Alcantara AA, Zhang B** (2007) The atypical cadherin flamingo regulates synaptogenesis and helps prevent axonal and synaptic degeneration in *Drosophila*. Molecular and cellular neurosciences 34 (4): 662-678

**Barbosa-Morais** NL, Carmo-Fonseca M, Aparício S (2006) Systematic genome-wide annotation of spliceosomal proteins reveal differential gene family expansion. *Genome Research* 16: 66-77

**Bilen** J, Bonini NM (2005) *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annual Review of Genetics* 39: 153-171

**Bloch** A (2007) Identifizierung und Charakterisierung der Bruchpilot-related-protein-kinase-Nullmutante *BRPKVN100* in *Drosophila*. Diplomarbeit; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Bourgeois** CF, Lejeune F, Stévenin J (2004) Broad Specificity of SR (Serine/Arginine) Proteins in the Regulation of Alternative Splicing of Pre-Messenger RNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 78: 37-88

**Bowman** AB, Patel-King RS, Benashski SE, McCaffery JM, Goldstein LSB, Stephen M, King SM (1999) *Drosophila* roadblock and *Chlamydomonas* LC7: A conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility, and mitosis. *The Journal of Cell Biology* 146(1): 165-179

**Broadie** K, Prokop A, Bellen HJ, O’Kane CJ, Schulze KL, Sweeney ST (1995) Syntaxin and Synaptobrevin Function Downstream of Vesicle Docking in *Drosophila*. *Neuron* 15: 663-673

**Bullock** AN; Das S, Debreczeni JE, Rellos P, Fedorov O, Niesen FH, Guo K, Papagrigoriou E, Amos AL, Cho S, Turk BE, Ghosh G, Knapp S (2009) Kinase

Domain Insertions Define Distinct Roles of CLK Kinases in SR Protein Phosphorylation. *Structure* 17 (3): 352-362

**Burrows** M (1996) *The Neurobiology of an Insect Brain*. Oxford University Press, New York

**Cáceres** JF, Sreaton GR, Krainer AR (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes & Development* 12: 55-66

**Campos-Ortega** JA, Hartenstein V (1997) *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

**Cao** W, Jamison SF, Garcia-Blanco (1997) Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA* 3: 1456-1467

**Celotto** AM, Palladino MJ (2005) *Drosophila* - A “model” model system to study neurodegeneration. *Molecular Interventions* 5 (5): 292-303

**Colwill** K, Feng LL, Yeakley JM, Gish GD, Cáceres, Pawson T, Fu XD (1996) SRPK1 and Clk/Sty Protein Kinases Show Distinct Substrate Specificities for Serine/Arginine-rich Splicing Factors. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24569-24575

**Dick** O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2003) The Presynaptic Active Zone Bassoon is

Essential for Photoreceptor Ribbon Synapse Formation in the Retina. *Neuron* 37: 775-786

**Ding** JH, Zhong XY, Hagopian JC, Cruz MM, Ghosh G, Feramisco J, Adams JA, Fu XD (2006) Regulated Cellular Partitioning of SR Protein-specific Kinases in Mammalian Cells. *Molecular Biology of the Cell* 17: 876-885

**Duncan** JE, Goldstein LSB (2006) The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS Genetics* 2(9): 1275-1284

**Fouquet** W, Oswald D, Wichmann C, Mertel S, Depner H, Dyba M, Hallermann S, Kittel RJ, Eimer S, Sigrist SJ (2009) Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *The Journal of cell biology* 186 (1): 129-145

**Fröhlich** A, Meinertzhagen IA (1982) Synaptogenesis in the first optic neuropile of the fly's visual system. *Journal of Neurocytology* 11: 159-180

**Fu** XD (1993) Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. *Nature* 265: 82-85

**Fu** XD (1995) The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* 1: 663-680

**Fu** XD, Meyeda A, Maniatis T, Krainer AR (1992) General splicing factors SF2 and SC35 have equivalent activities in vitro, and both affect alternative 5' and 3' splice site selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Biochemistry* 89: 11224-11228

**Ge H, Zuo P, Manley JL (1991)** Primary Structure of the Human Splicing Factor ASF Reveals Similarities with *Drosophila* Regulators. *Cell* 66, 373-382

**Gindhart JG Jr, Chen J, Faulkner M, Gandhi R, Doerner K, Wisniewski T, Nandlestadt A (2003)** The Kinesin-associated Protein UNC-76 is required for axonal transport in the *Drosophila* nervous system. *Molecular Biology of the Cell* 14: 3356-3365

**Gindhart JG Jr, Desai CJ, Beushausen S, Zinn K, Goldstein LSB (1998)** Kinesin light chains are essential for axonal transport in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology* 141(2): 443-454

**Graveley BR (2000)** Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6: 1197-1211

**Greenspan RJ (2004)** Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

**Gui JF, Lane WS, Fu XD (1994a)** A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature* 369: 678-682

**Gui JF, Tronchère H, Chandler SD, Fu XD (1994b)** Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Biochemistry* 91: 10824-10828

**Hastings** ML, Krainer AR (2001) Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 302-309

**Hallermann** S, Kittel RJ, Wichmann C, Weyhersmüller A, Fouquet W, Mertel S, Oswald D, Eimer S, Depner H, Schwärzel M, Sigrist S, Heckmann M (2010) Naked dense bodies provoke depression. *The Journal of Neuroscience* 30 (43): 14340-14345

**Hartenstein** V (1993) *Atlas of Drosophila Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

**Hertweck** H (1931) Anatomie und Variabilität des Nervensystems und der Sinnesorgane von *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 139: 560-663

**Hofbauer** A (1991) Eine Bibliothek monoklonaler Antikörper gegen das Gehirn von *Drosophila melanogaster*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Hurd** DD, Saxton WM (1996) Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. *Genetics* 144: 1075-1085

**Izquierdo** JM, Valcárcel J (2006) A simple principle to explain the evolution of pre-mRNA splicing. *Genes & Development* 20:1679-1684

**Jan** YN, Jan LY (1993) The peripheral nervous system. In Bate M, Arias AM (Hrsg.): The Development of *Drosophila melanogaster*. Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1207-1244

**Jia** XX, Gorczyca M, Budnik V (1993) Ultrastructure of neuromuscular junctions in *Drosophila*: comparison of wild type and mutant with increased Excitability. *Journal of Neurobiology* 24 (8): 1025-1044

**Johnson** EL III, Fetter RD, Davis GW (2009) Negative Regulation of Active Zone Assembly by a Newly Identified SR Protein Kinase. *PLoS Biology* 7 (9): e1000193.doi:10.1371/journal/pbio.1000193

**Kannan** N, Taylor SS (2008) Rethinking Pseudokinases. *Cell* 133: 204-205

**Kittel** R, Wichmann C, Rasse T, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh D, Pawlu C, Kellner R, Willig K, Hell S, Buchner E, Heckmann M, Sigrist S (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca<sup>2+</sup>-channel clustering, and vesicle release. *Science* 312: 1051-1054

**Koenig** JH, Ikeda K (1999) Contribution of active zone subpopulation of vesicles to evoked and spontaneous release. *Journal of Neurophysiology* 81: 1496-1505

**Koh** YH, Gramates LS, Budnik V (2000) *Drosophila* Larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microscopy Research and Technique* 49:14-25



**Kopczynski** CC, Noordermeer JN, Serano TL, Chen WY, Pendleton JD, Lewis S, Goodman CS, Rubin GM (1998) A high throughput screen to identify secreted and transmembrane proteins involved in *Drosophila* embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Genetics 95: 9973-9978

**Krainer** AR, Conway GC, Kozak D (1990) Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. Genes & Development 4: 1158-1171

**Kuroyanagi** N, Onogi H, Wakabayashi T, Hagiwara M (1998) Novel SR-Protein-Specific Kinase, SRPK2, Disassembles Nuclear Speckles. Biochemical and biophysical research communications 242: 357-364

**Landgraf** M, Thor S (2006) Development of *Drosophila* motoneurons: specification and morphology. Seminars in cell & developmental biology 17: 3-11

**Leysen** M, Hassan BA (2007) A fruitfly's guide to keeping the brain wired. EMBO reports 8 (1): 46-50

**Li** J, Ashley J, Budnik V, Bhat MA (2007) Crucial Role of *Drosophila* Neurexin in Proper Active Zone Apposition to Postsynaptic Densities, Synaptic Growth and Synaptic Transmission. Neuron 55 (5): 741-755

**Liu** S, Kang K, Zhang J, Ouyang Q, Zhou Z, Tian S, Xing M (2009) A novel *Physarum polycephalum* SR protein kinase specifically phosphorylates the RS

domain of the human SR protein, ASF/SF2. *Acta biochimica et biophysica sinica* 41 (8): 657-667

**Long** JC, Cáceres JF (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Journal of Biochemistry* 417: 15-27

**Lukasiewicz** R, Velazquez-Dones A, Huynh N, Hagopian J, Fu XD, Adams J, Ghosh G (2007) Structurally Unique Yeast and Mammalian Serine-Arginine Protein Kinases Catalyze Evolutionary Conserved Phosphorylation Reactions. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (32): 23036-23043

**Ma** CT, Hagopian JC, Ghosh G, Fu XD, Adams JA (2009) Regiospecific Phosphorylation Control of the SR Protein ASF/SF2 by SRPK1. *Journal of Molecular Biology* 390: 618-634

**Mahr** A, Aberle H (2006) The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. *Gene Expression Patterns* 6: 299-309

**Manley** JL, Tacke R (1996) SR proteins and splicing control. *Genes & Development* 10: 1569-1579

**Marsh** JL, Thompson LM (2004) Can flies help humans treat neurodegenerative disease. *BioEssays* 26 (5): 485-496

**Martin** M, Iyadurai SJ, Gassman A, Gindhart JG Jr, Hays TS, Saxton WM (1999) Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interde-

pendent and essential for fast axonal transport. *Molecular Biology of the Cell* 10: 3717-3728

**Mathew R**, Hartmuth K, Möhlmann S, Urlaub H, Ficner R, Lührmann R (2008) Phosphorylation of human PRP28 by SRPK2 is required for integration of the U4/U6-U5 tri-snRNP into the spliceosome. *Nature structural & molecular biology* 15 (5): 435-443

**Miller KE**, DeProto J, Kaufmann N, Patel BN, Duckworth A, Van Vactor D (2005) Direct observation demonstrates that Liprin-alpha is required for trafficking of synaptic vesicles. *Current Biology* 15: 684-689

**Misteli T**, Cáceres JF, Jade QC, Krainer AR, Wilkinson MF, Spector DL (1998) Serine Phosphorylation of SR Proteins Is Required for Their Recruitment to Sites of Transcription In Vivo. *The Journal of Cell Biology* 143 (2): 297-307

**Morrison DK**, Murakami MS, Cleghon V (2000) Protein Kinases and Phosphatases in the *Drosophila* Genome. *The Journal of Cell Biology* 150 (2): F57-F62

**Mount SM**, Salz HK (2000) Pre-messenger RNA Processing Factors in the *Drosophila* Genome. *The Journal of Cell Biology* 150 (2): F37-F43

**Mulisch M**, Welsch U (2010) *Romeis – Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

**Nakagawa O**, Arnold M, Nakagawa M, Hamada H, Shelton JM, Kusano H, Harris TM, Childs G, Campbell KP, Richardson JA, Nishino I, Olson EN (2005) Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific protein kinase transcriptionally regulated by MEF2. *Genes & Development* 19: 2066-2077

**Nieratschker V** (2004) Identifizierung und molekulare Charakterisierung des Crpk-Gens von *Drosophila*, das für die Verhinderung von CAST-Aggregaten in Axonen verantwortlich ist. Diplomarbeit; Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Nieratschker V** (2008) Charakterisierung der Serin-/Threonin-Proteinkinase SRPK3 in *Drosophila melanogaster* und Phosphorylierungsstudien an Synapsin. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Nieratschker V**, Schubert A, Jauch M, Bock N, Bucher D, Dippacher S, Krohne G, Asan E, Buchner S, Buchner E (2009) Bruchpilot in Ribbon-like Axonal Agglomerates, Behavioral Defects and Early Death in SRPK79D Kinase Mutants of *Drosophila*. *PLoS Genetics* 5 (10): e1000700. doi:10.1371/journal.pgen.1000700

**Pack-Chung E**, Kurshan PT, Dickman DK, Schwarz TL (2007) A *Drosophila* kinesin required for synaptic bouton formation and synaptic vesicle transport. *Nature Neuroscience* 10 (8): 980-989

**Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL (1999)** The Protein Kinase Clk/Sty Directly Modulates SR Protein Activity: Both Hyper- and Hypophosphorylation Inhibit Splicing. *Molecular and cellular biology* 19 (10): 6991-7000

**Prokop A, Landgraf M, Rushton E, Broadie K, Bate M (1996)** Presynaptic Development at the *Drosophila* Neuromuscular Junction: Assembly and Localization of Presynaptic Active Zones. *Neuron* 17: 617-626

**Prokop A (2006)** Organization of the efferent system and structure of neuromuscular junctions in *Drosophila*. *International Review of Neurobiology* 75: 71-90

**Prokop A, Meinertzhagen IA (2006)** Development and structure of synaptic contacts in *Drosophila*. *Seminars in cell & developmental biology* 17 (1): 20-30

**Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001)** A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research* 11: 1114-1125

**Reynolds ES (1963)** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque-stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212

**Roth MB, Zahler AM, Stolk JA (1991)** A Conserved Family of Nuclear Phosphoproteins Localized to Sites of Polymerase II Transcription. *The Journal of Cell Biology* 115 (3): 587-596

**Rossi F**, Labourier E, Forné T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J (1996) Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature* 381: 80-82

**Ruiz-Canada C**, Budnik V (2006) Introduction on the use of the *Drosophila* embryonic/larval neuromuscular junction as a model system to study synapse development and function, and a brief summary of pathfinding and target recognition. *International Review of Neurobiology*, 75: 1-31

**Saxton WM**, Hicks J, Goldstein LSB, Raff EC (1991) Kinesin Heavy Chain is essential for viability and neuromuscular functions in *Drosophila*, but mutants show no defects in mitosis. *Cell* 64: 1093-1102

**Schuster CM**, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS (1996) Genetic Dissection of Structural and Functional Components of Synaptic Plasticity I. Fasciclin II Controls Synaptic Stabilization and Growth. *Neuron* 17: 641-654

**Schwarz TL** (2006) Transmitter release at the neuromuscular junction. *International Review of Neurobiology*, 75: 105-144

**Shi Y**, Reddy B, Manley JL (2006) PP1/PP2A Phosphatases Are Required For The Second Step of Pre-mRNA Splicing and Target Specific snRNP Proteins. *Molecular Cell* 23: 819-829

**Siksou L**, Rostaing P, Lechaire JP, Boudier T, Ohtsuka T, Fejtová A, Kao HT, Greengard P, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S (2007) Three-dimensional

architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *The Journal of Neuroscience* 27(26): 6868-6877

**Staley** JP, Woolford JL Jr (2009) Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Current Opinion in Cell Biology* 21: 109-118

**Stamm** S (2008) Regulation of Alternative Splicing by Reversible Protein Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (3): 1223-1237

**Stojdl** DF, Bell JC (1999) SR protein kinases: the splice of life. *Biochemistry and cell biology* 77: 293-298

**Südhof** TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience* 27: 509-547

**Sun** B, Xu P, Salvaterra PM (1999) Dynamic visualization of nervous system in live *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Neurobiology* 96: 10438-10443

**Truman** JW (1990) Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *Journal of Neurobiology* 21 (7): 1072-1084

**Truman** JW, Taylor BJ, Awad TA (1993) Formation of the adult nervous system. In Bate M, Arias AM (Hrsg.): *The Development of Drosophila melanogaster*. Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1245-1275

**Venken** KJT, Bellen HJ (2005) Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. Nature Reviews Genetics 6: 167-178

**Wagh** DA (2005) "Bruchpilot" – molecular and functional characterization of a novel active zone protein at the *Drosophila* synapse. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Wagh** DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck H, Buchner S, Dabauvalle M, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E (2006) Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. Neuron 51: 275-275

**Wahl** MC, Will CL, Lührmann R (2009) The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. Cell 136: 701-718

**Wairkar** YP, Toda H, Mochizuki H, Furukubo-Tokunaga, Tomoda T, DiAntonio A (2009) Unc-51 Controls Active Zone Density and Protein Composition by Downregulating ERK Signaling. The Journal of Neuroscience 29 (2): 517-528

**Wan** Y, Sun M, Wang S, Liu L, Yuan L, Xie W (2008) DX16 is a novel SR protein phosphorylated by DOA. Molecular and cellular biochemistry 307: 177-183

**Wang** HY, Lin W, Dyck JA, Yeakley JM, Songyang Z, Cantley LC, Fu XD (1998) SRPK2: A Differentially Expressed SR Protein-specific Kinase Involved



in Mediating the Interaction and Localization of Pre-mRNA Splicing Factors in Mammalian Cells. *The Journal of Cell Biology* 140 (4): 737-750

**Wiley J & sons** (2002) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA

**Xiao SH, Manley JL** (1997) Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes & Development* 11: 334-344

**Xiao SH, Manley JL** (1998) Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *The EMBO Journal* 17 (21): 6359-6367

**Zahler AM, Lane WS, Stolk JA, Roth MB** (1992) SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes & Development* 6: 837-847

**Zahler AM, Roth MB** (1995) Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Biochemistry* 92: 2642-2646

**Zhai RG, Bellen HJ** (2004) The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology* 19: 262-270

**Zhen M & Jin Y** (2004) Presynaptic terminal differentiation: transport and assembly. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 280-287

**Zhong** XY, Ding JH, Adams JA, Ghosh G, Fu XD (2009) Regulation of SR protein phosphorylation and alternative splicing by modulating kinetic interactions of SRPK1 with molecular chaperones. *Genes & Development* 23: 482-495

**Zordan** MA, Massironi M, Ducato MG, te Kronnie G, Costa R, Reggiani C, Chagneau C, Martin JR, Megighian A (2005) *Drosophila* CAK1/CMG Protein, a Homolog of Human CASK, Is Essential for Regulation of Neurotransmitter Vesicle Release. *Journal of Neurophysiology* 94: 1074-1083

## **Danksagung**

Herzlich danke ich Frau Prof. Dr. Esther Asan und Herrn Prof. Dr. Erich Buchner für die engagierte Betreuung meiner Arbeit und für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und unermüdliche Unterstützung. Die freundliche und anregende Zusammenarbeit war stets eine große Freude und ermöglichte mir den größten Lerngewinn.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. D. Drenckhahn für seine freundliche Unterstützung.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie und des Lehrstuhls für Genetik des Biozentrums für die Einarbeitung, ihre Hilfsbereitschaft und praktische Unterstützung bei den Versuchen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Heckmann, der sich als Koreferent zur Verfügung gestellt hat.

Schließlich bedanke ich mich herzlich bei meiner Mutter und meinem Lebensgefährten für die Unterstützung im Studium, bei der Doktorarbeit und bei Krankheit.

## Lebenslauf

### Zur Person:

Name: Sonja Dippacher  
Geboren: 26.02.1983 in Würzburg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1989-1993 Walther-Grundschule in Würzburg-Heidingsfeld  
1993-2002 Röntgen-Gymnasium Würzburg,  
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulbildung:

2002-2004 Studium der Psychologie an der Bayerischen  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Erwerb des Vordiploms  
2004-2011 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
06/2011 Approbation  
seit 2007 Förderung durch die Studienstiftung des deutschen  
Volkes  
Seit 01.07. 2011 Ärztin in der Abteilung für Kinder- und Jugendmedi-  
zin des Caritas-Krankenhauses Bad Mergentheim

Würzburg, den 27.03.2012

Sonja Dippacher