

**Molekulare und phänotypische Charakterisierung von
Drosophila melanogaster Synapsin Mutanten
und
In-vivo Calcium Imaging**

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

**vorgelegt von
Sören Diegelmann
aus Fulda**

Würzburg, 2003

Eingereicht am:18.12.2003.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Scheer

Gutachter : Prof. Dr. Buchner

Gutachter: Prof. Dr. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:07.04.2004.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1	Einleitung	6
1.1	<i>Drosophila melanogaster</i> in der Neurobiologie	6
1.2	Allgemeine Vorgänge in der Synapse.....	7
1.3	Synapsine	8
1.3.1	Vertebraten Synapsine	8
1.3.2	Synapsin von <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.3.3	Synapsin Mutanten in <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1.4	RNA-Editing	16
1.5	Assoziatives Lernen in <i>Drosophila</i>	17
1.6	In-vivo Calcium Imaging	18
1.7	Aufgabenstellung	20
2	Material.....	21
2.1	Chemikalien.....	21
2.2	Enzymatische Manipulation der DNA.....	21
2.3	Southern Blotting	22
2.4	Western Blotting	22
2.5	Kits.....	22
2.6	Nukleotide	23
2.7	DNA-Größenstandards	23
2.8	Protein-Gößenstandards	23
2.9	Oligonukleotide	23
2.10	Sequenzierungen	25
2.11	Immunoglobuline	25
2.12	Plasmide	25
2.13	Bakterienstämme	25
2.14	Fliegenstämme	25
2.15	Software	26
2.16	Laborgeräte	26
2.17	Verbrauchsmittel	27
2.18	Medien.....	28
2.19	SDS-Polyacrylamidgele	28
2.20	Lösungen.....	29

3 Methoden.....	33
3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	33
3.1.1 Isolierung von genomischer DNA.....	33
3.1.2 Verdau der genomischen DNA.....	33
3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	33
3.1.3.1 Alkalische Plasmid-DNA-Minipräparation.....	33
3.1.3.2 Plasmid-DNA-Minipräparation mit QIAprep Spin Miniprep.....	34
3.1.3.3 Plasmid-DNA-Midipräparation mit QIAGEN Midiprep.....	34
3.1.4 Phenolextraktion der DNA.....	34
3.1.5 DNA-Fällung.....	34
3.1.5.1 Ethanolfällung.....	34
3.1.5.2 Isopropanolfällung.....	35
3.1.6 Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung.....	35
3.1.7 Gelaufreinigung.....	35
3.1.8 PCR-Aufreinigung.....	35
3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
3.1.10 Transformation.....	36
3.1.10.1 Transformation in elektrokompetente Zellen.....	36
3.1.10.2 Transformation in hitzekompetente Zellen.....	36
3.1.11 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	36
3.2 Southern Blot.....	37
3.2.1 Southern Blotting.....	37
3.2.2 Labeln der DNA-Sonden.....	38
3.2.3 Hybridisierung/ Waschen.....	38
3.2.4 Exposition/ Strippen.....	38
3.3 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	39
3.4 Single-fly PCR.....	39
3.5 Sequenzierungen.....	39
3.6 Western Blot.....	40
3.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	40
3.6.2 Western Blotting.....	40
3.6.3 Antikörper Inkubation/ ECL-Reaktion.....	41
3.7 In-vitro-Mutagenese.....	41
3.8 Inverse PCR.....	42

3.9	Methoden auf RNA-Ebene	43
3.9.1	Totale RNA Isolation.....	43
3.9.2	mRNA Isolation.....	44
3.9.3	Reverse Transkription.....	44
3.10	Keimbahntransformation.....	44
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Molekulare Charakterisierung des <i>Synapsin</i> Lokus.....	46
4.1.1	Untersuchung der Deletionsbruchpunkte in regulatorischen Mutanten von <i>Synapsin</i>	46
4.1.2	Untersuchung der Phosphorylierungsstelle(n) für Ca ²⁺ / Calmodulin I/ IV Kinase (CaMK I/ IV) und Protein Kinase A in <i>Synapsin</i>	49
4.1.2.1	Ebene der genomischen DNA	49
4.1.2.2	Ebene der Ribonukleinsäure.....	50
4.1.2.3	Vergleich etablierter Wildtypen zu neu gefangenen <i>Drosophila</i> Fliegen.....	51
4.1.2.4	Protein Kinase Erkennungsstelle in verschiedenen Entwicklungsstadien und Körpergeweben von <i>Drosophila melanogaster</i>	52
4.1.2.5	Zweite Protein Kinase A Phosphorylierungsstelle in <i>Synapsin</i>	53
4.1.3	Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen in der <i>Synapsin</i> cDNA	54
4.1.4	<i>Synapsin</i> Rescue-Konstrukt.....	57
4.2	Phänotypische Charakterisierung der <i>Synapsin</i>-Nullmutante	59
4.2.1	Rückkreuzung der <i>Syn</i> ⁹⁷ Mutante in den CantonS Hintergrund.....	59
4.2.2	<i>Syn</i> ^{97CS} in verschiedenen Verhaltensassays	62
4.2.2.1	<i>Syn</i> ^{97CS} Flügelschlagfrequenz, Jump Response , Ethanol-Toleranz.....	62
4.2.2.2	Objektfixierung.....	64
4.2.2.3	Optomotorik.....	66
4.2.3	Lernen in <i>Syn</i> ^{97CS} Mutanten.....	67
4.2.3.1	Olfaktorisches Lernen in <i>Syn</i> ^{97CS} Larven.....	67
4.2.3.2	Visuelles larvales Lernen.....	71
4.2.3.3	Olfaktorisches Lernen in adulten Fliegen.....	73
4.2.3.4	<i>Syn</i> ^{97CS} Lernverhalten in der Hitzebox.....	74
4.2.3.5	Courtship Suppression in <i>Syn</i> ^{97CS} Männchen	77
4.3	In-vivo Calcium Imaging	79
4.3.1	Lokalisation der Transgen-Insertion in Cameleon 2.0 Fliegen.....	79
4.3.1.1	Kreuzungen.....	79
4.3.1.2	Inverse PCR.....	80

4.3.2	Cameleon 2.0 Konstrukt.....	82
4.3.3	Mutation Cameleon 2.0 zu Cameleon 2.1	83
4.3.4	Cameleon 2.1 Fliegen.....	84
4.3.5	Lokalisation der Insertion in den neu etablierten Cameleon 2.1 Linien	84
4.3.5.1	Kreuzungen.....	84
4.3.5.2	Inverse PCR.....	85
4.3.5.2.1	Cameleon 2.1/ 53.....	85
4.3.5.2.2	Cameleon 2.1/ 65.....	86
4.3.5.2.3	Cameleon 2.1/ 72.....	87
4.3.5.2.4	Cameleon 2.1/ 76.....	88
4.3.5.2.5	Cameleon 2.1/ 82.....	89
4.3.6	Elektrophysiologische Untersuchung der Cam 2.1/ 82 Linie.....	90
4.3.7	Untersuchung zur Expressionsstärke der etablierten Cameleon 2.1 Linien.....	91
4.3.8	Expression von Cameleon 2.1 in <i>Drosophila melanogaster</i>	91
5	Diskussion.....	93
5.1	Molekulare Analysen.....	93
5.2	RNA-Editing in <i>Synapsin</i>	94
5.3	Mutation der Protein Kinase A Stelle(n) im <i>Synapsin</i>	98
5.4	Rescue-Konstrukt von <i>Synapsin</i>	99
5.5	Phänotypen der <i>Synapsin</i> -Nullmutanten.....	100
5.6	Calcium Imaging	103
5.7	Perspektiven	104
6	Zusammenfassung	106
7	Summary	108
8	Literaturverzeichnis	110
9	Anhang	120
9.1	Deletionskartierung von regulatorischen Mutanten von <i>Synapsin</i>	120
9.2	Sequenz des Cameleon 2.0 Konstruktes.....	121
9.3	Inverse PCR der Cameleon Fliegen.....	125
9.3.1	Cameleon 2.0 Linie C2-6I/ STM.....	125
9.3.2	Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 53.....	125
9.3.3	Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 65.....	126

9.3.4	Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 72.....	126
9.3.5	Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 76.....	126
9.3.6	Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 82.....	127
9.4	Lage der Primer.....	127
9.5	Verwendete Vektoren.....	127
10	Abkürzungen.....	129
11	Danksagung.....	131

1 Einleitung

1.1 *Drosophila melanogaster* in der Neurobiologie

Der Funktion von Nervenzellen, ob nun aus dem Gehirn des *Homo sapiens* oder aus dem Ganglienbündel eines „primitiven“ Tieres, liegen weitgehend die gleichen prinzipiellen Mechanismen und Bausteine zugrunde. Um die Komplexität des Nervensystems als Ganzes zu erfassen ist es aber vorrangig nötig die einzelnen Komponenten des intra- und interzellulären Kommunikationsapparates zu verstehen. Ein typisches Neuron erzeugt als Antwort auf einen Stimulus elektrische Signale, welche durch seinen Fortsatz, das Axon, weitergeleitet werden und am Ende auf ein weiteres Neuron oder auf ein Effektororgan (z.B. eine Muskelzelle) übertragen werden. Bei diesem stark vereinfachten Schaltschema müssen verschiedene Mechanismen ineinander greifen um eine erfolgreiche Kommunikation zu gewährleisten. Die Entschlüsselung der einzelnen Abläufe und Mechanismen, sowie der daran beteiligten Komponenten ist eine Hauptaufgabe der Neurobiologie.

Obwohl der phylogenetische Abstand zwischen dem Menschen und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* groß ist, kann auf der Ebene der Proteine, welche für den ordnungsgemäßen Ablauf der Erregungsweiterleitung verantwortlich sind, ein hohes Maß an Konservierung und Homologie aufgezeigt werden. Aufgrund dieser Gemeinsamkeit dient das „Haustier der Genetiker“ auch in der Neurobiologie und Neurogenetik als Modellorganismus für prinzipielle Fragestellungen.

Der Siegeszug der Fruchtfliege als wissenschaftliches Untersuchungstier erfolgte nach ersten Publikationen von L.O. Howard (1900), W.E. Castle (1906) und E.E. Unwin (1907), in denen *Drosophila* Arten als Versuchstiere für verschiedene Forschungsvorhaben eingeführt wurden. Den endgültigen Durchbruch als genetischer Modellorganismus bewirkten die Untersuchungen zur Chromosomenvererbung durch T.H. Morgan an der Columbia University. Die Vorteile der Fruchtfliege gegenüber anderen Versuchstieren liegen in ihrer kurzen Generationsdauer, den leichten und kostengünstigen Aufzucht- und Lebensbedingungen, sowie einer großen Nachkommenschaft. Durch moderne molekulargenetische Methoden ist die Fliege auch zugänglich für gezielte Mutagenese (Ballinger und Benzer, 1989; Kaiser und Goodwin, 1990), Keimbahntransformationen (Spradling und Rubin, 1982) oder die gezielte Expression von Transgenen, wie in der Enhancer-Trap Methode (O’Kane und Gehring, 1987; Kretschmar et al., 1992). Auch bei der Erforschung der Gehirnprozesse, die verschiedenen Lernleistungen zugrunde liegen, können Mutanten von *Drosophila melanogaster* verwendet werden (z.B. Benzer und Quinn, 1974; Schwaerzel et al., 2002). Ebenso trägt die Grundlagenforschung an der Fruchtfliege zur Klärung einzelner Fragen im Bereich menschlicher Krankheiten bei. So können molekulare Ursachen für die Parkinson’sche Krankheit oder Chorea Huntington am Modell der Fliege untersucht werden (Auluck et al., 2002; Steffan et al., 2001). In der Neurobiologie besteht ein Vorteil von *Drosophila* darin, dass sie trotz der Komplexität des Nervensystems eine mit ca. $2 \cdot 10^5$ Neuronen überschaubare Anzahl von Nervenzellen aufweist (*Homo sapiens* ca. 10^{10} - 10^{12} Neurone). Diese können mit verschiedenen Versuchsmethoden, wie z.B. neuroanatomisch, entwicklungsbiologisch, elektrophysiologisch, verhaltensanalytisch, untersucht werden. Durch gezielte Expression von Neurotoxinen können einzelne Neurone bzw. Nervenbahnen ausgeschaltet werden (Keller et al., 2002, Martin et al., 2002). Durch die

Entwicklung des Calcium-Imaging ist eine in-vivo Untersuchung an spezifischen Schaltzentren im Gehirn der Fliege möglich (Fiala et al., 2002).

Somit steht mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* der Forschung in Genetik und Neurobiologie ein ideales und vielseitiges Versuchstier zu Verfügung, welches zur Klärung der Vorgänge im molekularen Zusammenspiel der einzelnen Komponenten bei der Weiterleitung der Impulse zwischen Nervenzellen eingesetzt werden kann.

1.2 Allgemeine Vorgänge in der Synapse

Synapsen (griech.: Verbindungen) sind die Umschaltstellen für die Erregungsweiterleitung von einem Neuron auf ein anderes oder auf ein Erfolgsorgan, z.B. eine Muskelzelle. Die Signalübertragung kann auf einem chemischen oder auf einem elektrischen Weg geschehen. Die elektrische Weiterleitung stellt zwar den schnelleren Weg in der Übertragung dar, dennoch ist die chemische Synapse die vorherrschende Art der Kommunikation zwischen Neuronen. Dabei laufen in allen Neuronen prinzipiell die gleichen Vorgänge zur Erregungsübertragung ab.

Eine typische Nervenzelle nimmt an seinen Dendriten chemische Signale von Transmittern vorgeschalteter Neurone auf und wandelt sie in ein elektrisches Potential um. Wenn dieses Potential einen bestimmten Schwellenwert am Axonhügel, dem Übergang vom Soma zum Axon, überschreitet, entstehen Aktionspotentiale die in Richtung der Endverzweigungen weitergeleitet werden. Im Bereich der Endknöpfchen kommt es zu einer Umschreibung des elektrischen Signals in ein chemisches Signal, welches auf nachfolgende Nervenzellen übertragen werden kann. Durch das Auflaufen eines Aktionspotentials in die Endigung eines Axons kommt es zu einer Depolarisation der präsynaptischen Membran. Innerhalb dieser Membran liegen spannungsabhängige Calcium²⁺-Kanäle, welche sich aufgrund der Depolarisation öffnen, wodurch es zu einem Influx von Ca²⁺-Ionen in das Zellinnere kommt. Dieser Anstieg der Ca²⁺-Konzentration führt zur Fusion von bereits gepimten und angedockten Vesikeln mit der präsynaptischen Membran, so dass der Neurotransmitter aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt abgegeben wird. Der Botenstoff kann nun über diesen Spalt an die postsynaptische Membran gelangen und an die in sie eingebetteten Rezeptoren binden. Je nach Rezeptortyp kommt es zur direkt oder indirekt zur Öffnung von Ionenkanälen auf der postsynaptischen Seite und somit nun auch hier zu einer Depolarisation bzw. Hyperpolarisation, die in der nachgeschalteten Nervenzelle ebenfalls weitergeleitet werden kann.

Die synaptischen Vesikel (SV) durchlaufen innerhalb der Neuronendigung einen Zyklus der wie folgt vereinfacht dargestellt werden kann: der initiale Kontakt der SV, auch *docking* genannt, erfolgt nur an der aktiven Zone der präsynaptischen Membran. Auf diesen Schritt folgt ein Vorbereitungsschritt (*priming*), bei welchem die SV für die Calcium gesteuerte Fusion mit der Membran kompetent gemacht werden. Während des *primings* wird ein Komplex aus drei Proteinen gebildet. Dieser *core complex* besteht aus den Plasmamembranproteinen Syntaxin und SNAP-25 und dem SV-Protein Synaptobrevin/ VAMP. Durch weitere molekulare Vorgänge unter ATP-Verbrauch werden die SV kompetent für ihre nachfolgende Fusion. Exocytose kann nun durch einlaufende Aktionspotentiale und den dadurch hervorgerufenen Calcium-Einstrom ausgelöst werden. Entleerte Vesikel können durch einen Clathrin vermittelten Vorgang wieder der Endocytose zugeführt werden. Die vollständig von der Membran abgeschnürten Vesikel werden translokalisiert und fusionieren zu Endosomen. Aus diesen Endosomen können durch Abschnürung (*budding*) einzelne synaptische Vesikel entstehen, die nun wieder mit Neurotransmitter befüllt werden können. Diese Vesikel stehen

nun der Translokalisierung zur aktiven Zone oder in den Reserve-Pool der SV zur Verfügung. Dieser Pool, der abseits von der Plasmamembran in der Endigung des Neurons liegt, besteht aus einem Netzwerk von SV und Zytoskelettpartnern, das vermutlich durch die Funktion des SV assoziierten Proteins Synapsin aufgebaut wird. Durch Phosphorylierung können die SV aus diesem Netzwerk entlassen werden und so ebenfalls einem neuen synaptischen Vesikel-Zyklus zu geführt werden. Der Reserve-Pool der SV erlaubt dem Neuron eine größere Reaktionsbandbreite über einen weiten Aktivitätsbereich. Der schematische Aufbau und die Vorgänge in der Synapse sind in der folgenden Graphik dargestellt.

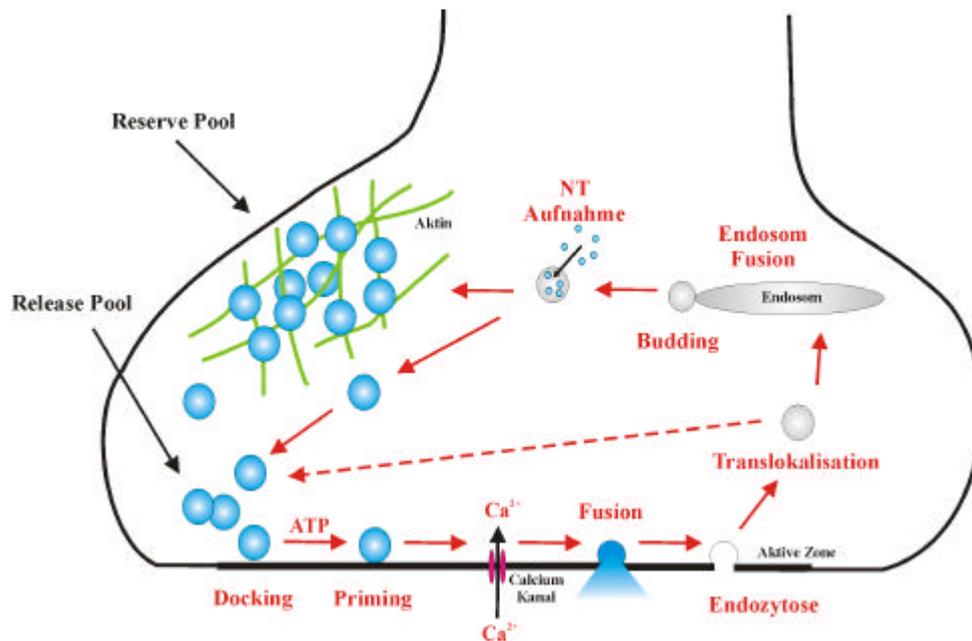


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des synaptischen Vesikel Zyklus. (Abbildung modifiziert nach Südhof, 1995).

Aufgezeigt sind die Prozesse des SV Zyklus, genauere Details siehe Text 1.2. Nach der Neurotransmitter (NT) Aufnahme können die Vesikel in den Reserve Pool oder in den Release Pool translokalisiert werden. Von beiden Pools können die Vesikel an einem neuen Zyklus teilnehmen.

1.3 Synapsine

1.3.1 Vertebraten Synapsine

Synapsine sind abundante Phosphoproteine, welche mit den synaptischen Vesikeln assoziiert sind (Greengard et al., 1993). Sie binden an die zytoplasmatische Seite der SV-Membran. In einer Nervenendigung sind die Synapsine mit ca. 9% am gesamten Proteinrepertoire beteiligt. In Vertebraten wurden bisher drei *synapsin* Gene identifiziert und charakterisiert (Hilfiker et al., 1998; Hosaka et al., 1998; Kao et al., 1998). Aus diesen *Synapsin* Genen (*SynI*, *SynII*, *SynIII*) können durch alternatives Splicing ihrer prä-mRNA verschiedene Proteinisoformen entstehen. Dabei entstehen durch das Splicing jeweils zwei Isoformen für die Gene *SynI* und *SynII*, nämlich *SynIa* und *SynIb*, bzw. *SynIIa* und *SynIIb*. Für das dritte *synapsin* Gen konnte die Isoform *SynIIIa* entdeckt werden (Kao et al., 1998), weitere Isoformen für die dritte

Variante werden diskutiert (SynIIIb-f). Die einzelnen Gene und Isoformen weisen in verschiedenen Neuronen unterschiedliche Expressionsmuster auf (Mandell et al., 1990; 1992; Südhof et al., 1989).

Die Isoformen setzen sich aus einem Mosaik von gemeinsamen und individuellen Domänen zusammen, so dass ein Domänen-Modell für die Synapsin Formen aufgestellt werden konnte (Abb. 1.2).

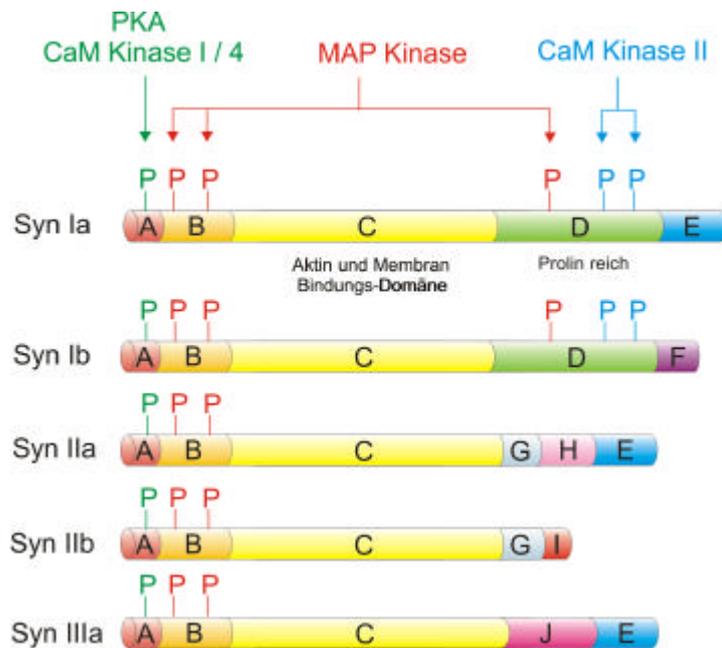


Abbildung 1.2:
Domänenmodell der Synapsin Isoformen.
Dargestellt sind die verschiedenen Domänen der Synapsin Isoformen und die konservierten Phosphorylierungsstellen verschiedener Kinasen. Aufgrund von Bindungsstellen in der C-Domäne wird dieser Domäne eine Funktion bei der Bindung des Proteins an Aktin und Membranen zugeteilt. Details zu den einzelnen Domänen finden sich im Text.

In allen Synapsinen können am NH₂-Terminus des Proteins die konservierten Domänen A, B und C lokalisiert werden. Der C-Terminus der Isoformen setzt sich aus den variableren Domänen D bis J zusammen. Den a-Isoformen ist das Vorhandensein der E-Domäne gemeinsam. Die einzelnen Domänen weisen unter den Synapsinen unterschiedliche Konservierungsgrade und Phosphorylierungsstellen auf.

Die am NH₂-Terminus gelegene A-Domäne ist zwischen den einzelnen Synapsinen hoch konserviert. Sie besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen. So befindet sich in ihrer Aminosäureabfolge eine Konsensussequenz für die cAMP-abhängige Proteinkinase A, sowie für die Ca²⁺/ Calmodulin-abhängige Proteinkinase I und IV (CaM Kinase I / IV) (Czernik et al., 1987; Nichols et al., 1990; Benfenati et al., 1992; Greengard et al., 1993).

Die folgende B-Domäne ist weniger stark konserviert und zeigt mehrere Stellen auf, welche durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) phosphoryliert werden können (Kao et al., 1998).

Die zentral lokalisierte C-Domäne weist den höchsten Konservierungsgrad auf (SynI zu SynII bis zu 78% identisch in der C-Domäne) (Südhof et al., 1989; Kao et al., 1998). In entsprechenden Untersuchungen konnte eine Bindung der Domäne an Aktin und an die Membran der synaptischen Vesikel aufzeigt werden (Benfenati et al., 1989; 1991). Eine ATPase Funktion der Domäne wird aufgrund von struktureller Homologie diskutiert (Esser et al., 1998). Nachgewiesen wurde, dass ATP an die Synapsine in einer von Ca²⁺ beeinflussten Reaktion binden kann. Diese Bindung ist im Falle von SynI Ca²⁺ abhängig, im Falle von

SynapsinII Ca^{2+} unabhängig (Hosaka et al., 1998). Calcium Ionen haben bei SynIII einen inhibitorischen Effekt auf die ATP-Bindung (Hosaka et al., 1998).

Die sich an die C-Domäne anschließenden Abschnitte, mit Ausnahme der terminalen E-Domäne, zeigen nur noch eine schwächere Konservierung. Die D-Domäne zeichnet sich durch ihr hohes Prolin-Aufkommen aus. In ihr finden sich ebenfalls Phosphorylierungsstellen für die MAP-Kinase, sowie Konsensussequenzen für CaM-Kinase II und die Prolin-gesteuerte Proteinkinase (Cdc2-Cyclin A) (Czernik et al., 1987; Hall et al., 1990; Matsubara et al., 1996).

Eine mögliche Erkennungssequenz für die CaM-Kinase II wird auch für die Domäne J im SynIII Protein diskutiert (Kao et al., 1998).

Die für die α -Isoformen charakteristische E-Domäne weist unter den verschiedenen Synapsinen ebenfalls einen hohen Konservierungsgrad auf.

Die verschiedenen Domänen, sowie deren mögliche Funktionen führen zu einem Modell der Funktion des Synapsin Proteins in der Nervenendigung. So kann Synapsin, sowohl an die Membran der SV, als auch an Komponenten des Zytoskelett binden und so SV mit dem Gerüst der Zelle verankern. Dadurch wäre Synapsin in der Lage SV nach der Neurotransmitteraufnahme in einem Reserve-Pool zu binden und so aus dem direkten Zyklus der Vesikel zu entnehmen. Aufgrund von Phosphorylierungen reduziert sich die Affinität des Proteins zu SV und Aktin (Llinas et al., 1991; Hackett et al., 1990; Nichols et al., 1992; Pieribone et al., 1995), wodurch die Vesikel erneut frei wären für den Transport an die aktive Zone und die anschließende Fusion mit der präsynaptischen Membran. Kürzlich durchgeführte Experimente mit an Synapsin gekoppeltem GFP zeigen, dass nach neuronaler Aktivität eine Dissoziation des Proteins von den SV und dem Aktin-Zytoskelett erfolgt (Chi et al., 2001; 2003). Das mögliche Funktionsmodell von Synapsin ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

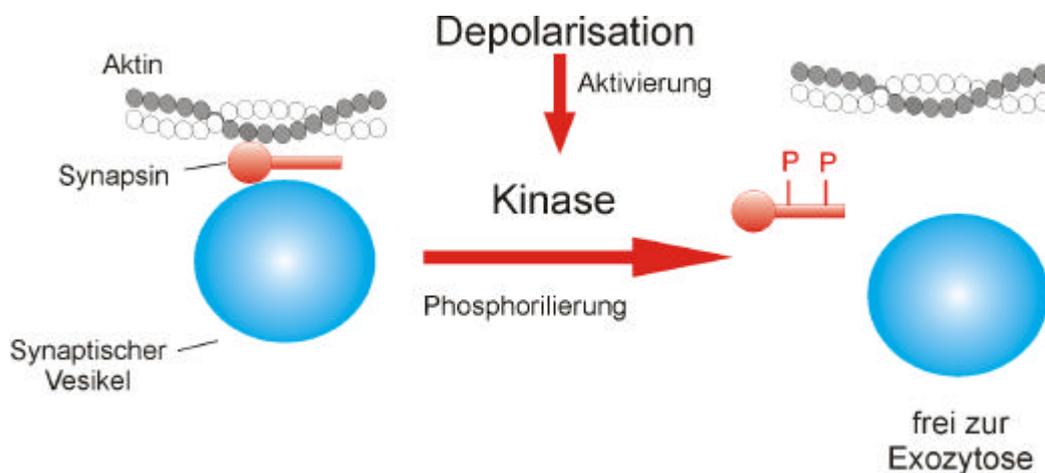


Abbildung 1.3: Funktionsmodell des Synapsins.

Dargestellt ist vereinfacht das Modell zur Funktion des Synapsin Proteins in der Nervenendigung. Im Ruhezustand bindet Synapsin sowohl an synaptische Vesikel als auch an Aktinfasern. Dadurch baut das Protein einen Reserve-Pool der SV auf. Durch eine Depolarisation kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Kinasen, welche unter anderem auch Synapsin phosphorylieren können. Durch diesen Prozess verringert sich die Affinität des Proteins zu Aktin und den SV und es dissoziiert von seinen Bindungspartnern. Die SV sind nun frei für weitere Prozesse und für die Fusion mit der Plasmamembran.

Die Daten weisen darauf hin das Synapsin bei der Organisation bzw. Aufrechterhaltung des Reserve-Pools proximal zu der Plasmamembran eine Rolle spielen und durch ihre reversible Bindungsmöglichkeit die SV nach Phosphorylierung wieder freigeben für den Übergang in den Releasable-Pool der Vesikel. So scheint der proximale Pool für die Transmitterfreisetzung bei hochfrequenter Reizung (18-20Hz) und der distale Pool für die niederfrequente Ausschüttung (0,2Hz) verantwortlich zu sein (Li et al., 1995).

In Untersuchungen mit Knock-out Mäusen für Synapsin wurden weitere Erkenntnisse gewonnen.

Dabei zeigten Mäuse denen das *SynI*, *SynII* oder beide Gene fehlten, keine Beeinträchtigung in ihrer Lebensfähigkeit oder Fertilität, auch ihre Entwicklung verläuft wildtypisch (Rosahl et al., 1993; 1995). Jedoch können in ihnen verschiedene Defekte entdeckt werden, welche die synaptische Plastizität betreffen.

So zeigen Synapsin I Knock-out Mäuse eine Reduzierung des Vesikelpools und der freigesetzten Neurotransmittermenge, sowie eine Beeinträchtigung bei der Bildung von Vesikelclustern (Chin et al., 1995; Li et al., 1995; Ryan et al., 1996). In elektrophysiologischen Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass die Paired Pulse Facilitation (PPF) in den Mutanten ansteigt (Rosahl et al., 1993). Die PPF zeigt sich in einer gesteigerten Transmitterausschüttung auf einen zweiten Reiz, wenn dieser innerhalb von 50-100 msec auf einen ersten Reiz folgt. Ebenfalls ist die Zeitspanne zur Wiedererlangung des alten Niveaus nach einer synaptischen Depletion in *SynI* Knock-out Mäusen deutlich erhöht (Li et al., 1995). In Long Term Potentiation (LTP) manifestierten sich keine Veränderungen in der Mutante (Rosahl et al., 1993). Die *SynI* Knock-out Mäuse zeigten aber auf elektrische Impulse eine gesteigerte Anzahl von epileptischen Anfällen (Li et al., 1995).

Die Mäuse, in denen das Gen *SynII* oder beide *SynI* + *SynII* durch die Knock-out Technik ausgeschaltet wurden, zeigten ebenfalls Veränderungen in elektrophysiologischen Untersuchungen. Die PPF wies in diesen Mutanten keine Abweichungen auf, jedoch konnte in der posttetanischen Potenzierung (PTP) eine Reduktion nachgewiesen werden (Rosahl et al., 1995). Auch hier war die LTP unverändert (Rosahl et al., 1995; Spillane et al., 1995; Takei et al., 1995). Die Anzahl der synaptischen Vesikel in der *SynII* Knock-out Maus zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp um ca. 50% verringert, ebenfalls war die Verteilung der Vesikel verändert (Rosahl et al., 1993; 1995; Chin et al., 1995; Li et al., 1995; Takei et al., 1995).

In SynapsinIII Knock-out Mäusen sind die synaptische Depression und inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) deutlich reduziert (Feng et al., 2002). Eventuell scheint *SynIII* einen größeren Einfluss auf inhibitorische als auf exzitatorische Synapsen zu haben.

Weitere Veränderungen in *Synapsin* Mutanten sind Beeinträchtigungen im Lernen (Silva et al., 1996). In Zellkulturen mit Nervenzellen aus dem Hippocampus von *SynI* Knock-out Mäusen konnte ein verlangsamtes Wachstum nachgewiesen werden (Chin et al., 1995). Eine ähnliche Verzögerung zeigt sich in *SynIII* Knock-out Hippocampus-Zellen, deren Axone in Zellkultur langsamer wachsen (Feng et al., 2002).

1.3.2 *Synapsin von Drosophila melanogaster*

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* konnte ein homologes Protein zu den Synapsinen der Vertebraten nachgewiesen werden (Heimbeck et al., 1990; Klagges et al., 1996). Das *Drosophila* Synapsin zeigte in immunhistochemischen Untersuchungen eine Expression im gesamten Nervensystem der Fliege mit wenigen Ausnahmen. Die Photorezeptoren R1–R6 und die Schicht M5 der Medulla enthalten offenbar nur sehr wenig

Synapsin (Klagges et al., 1996), in den TypII und III Boutons der larvalen Motorneurone lässt sich kein Synapsin nachweisen (Reisch et al., 2000).

Das Synapsin Gen konnte auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms lokalisiert werden in der Region 85F16-86A1 innerhalb des Klons AE003686 des Berkeley Drosophila Genom Project (BDGP). Seine Exon-Intron-Struktur umfasst ca. 30 kb und gliedert sich in 14 Exons und 13 Introns. Innerhalb des größten Introns 9 und teilweise mit den Exons 8 und 9 überlappend befindet sich auf dem Gegenstrang die codierende Sequenz des Gen für *TIMP* (Tissue inhibitor of metalloproteinase) (Pohar et al., 1999). Diese Lage des *TIMP* Gens innerhalb des *Synapsin* Gens ist auch bei den Vertebraten konserviert, hier liegen die Gene *SynI-TIMP1*, *SynII-TIMP4* und *SynIII* mit *TIMP3* verschachtelt vor, nur für *TIMP2* konnte eine solche Anordnung nicht nachgewiesen werden. Einen Überblick über die genomische Anordnung der Exons und Introns zeigt die Abbildung 1.6.

Für das *Drosophila Synapsin* konnten zwei cDNAs identifiziert werden. Die lange cDNA Syn1 enthält zwei ORFs mit einer Länge von 626 bzw. 443 Aminosäuren. Der Translationsstart erfolgt an einem unkonventionellen CTG Start-Codon innerhalb des dritten Exons. Die beiden Leseraster sind durch ein einzelnes Stop-Codon voneinander getrennt. Dieses kann eventuell durch eine Supressor tRNA umgangen werden (Godenschwege et al., 1995; Klagges et al., 1995; Samson et al., 1995; Hattenfield, 1990) oder durch einen alternativen Spleißvorgang innerhalb eines Exons entfernt werden, sodass eine Proteinisoform beide ORFs enthalten kann. Eine weitere cDNA Syn2 enthält weitgehend das erste offene Leseraster, wobei am C-Terminus 95 Aminosäuren verändert sind (Klagges et al., 1996).

In proteinanalytischen Untersuchungen konnten vier Isoformen mit dem monoklonalen Antikörper IIC11 nachgewiesen werden. Darunter fanden sich drei kleinere Isoformen mit 70, 74 und 80 kDa und eine Isoform mit einem molekularen Gewicht von 143 kDa (Godenschwege et al., 1995; Klagges et al., 1996). Letztere wird auch von einem Antiserum gegen das zweite ORF erkannt, so dass sie vermutlich durch ein Durchlesen des erwähnten Stop-Codons oder durch alternatives Spleißen entsteht, bei dem innerhalb des Exons gelegene 5'- und 3'-Spleißstellen verwendet werden, um so den Bereich mit dem Stop-Codon aus der RNA zu entfernen. Eine Ansequenzierung der 70 und 74 kDa Bande mit Hilfe einer Edman-Degradation zeigte die ersten N-terminalen Aminosäuren dieser Proteinisoformen auf (Dissertation M. Schaupp, 1998). Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

Position im Synapsin	1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10
Aminosäuren	? - Lys - Arg/Gly - Asp/Gly - Phe/Leu - Ser/Ala - Ser/Ala - Gly/Glu - Arg/Asp - Leu
cDNA syn-1	CTG-AAG- AGA - GGA - TTC - AGC - TCG - GGA - GAC - TTG

Abbildung 1.4:

Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung des Synapsin Proteins. Die erste Aminosäure blieb unklar, den Positionen 3 bis 9 ließen sich jeweils zwei Aminosäuren zuordnen. Darunter ist die Sequenz der cDNA Syn1 angegeben. In rot sind Übereinstimmungen der Sequenz mit der postulierten Aminosäurereihenfolge angezeigt. Die Aminosäuren 3 bis 6 geben die mögliche Erkennungssequenz für die Protein Kinase A CaMKinase 1 und 4 wieder.

Wie bei den Vertebraten kann auch das *Drosophila Synapsin* in verschiedene Domänen aufgeteilt werden. So findet sich auch im Synapsin der Fliege eine A-Domäne mit einer potentiellen Phosphorylierungsstelle für CaM-PKII und Protein Kinase A. Innerhalb des ORF 1 liegt eine Folge von 350 Aminosäuren, die 50% Identität bzw. 89% Ähnlichkeit mit der C-Domäne von Vertebraten aufweist. Die C-terminale Domäne E der Vertebraten Synapsine kann ebenfalls in *Drosophila* aufgezeigt werden. Beim Vergleich der genomischen Sequenz des BDGP mit der publizierten cDNA (Klagges et al., 1996) beobachtet man im Bereich der

A-Domäne an einer Base ein Abweichung, welche zu einem Austausch auf der Ebene der Aminosäuren führt. So wird im *Drosophila Synapsin* Gen die konservierte Phosphorylierungsstelle Arg-Arg-Phe-Ser (R-R-X-S, Konsensussequenz der Protein Kinase A, X= variable Aminosäure) kodiert, die cDNA kodiert jedoch für die Sequenz Arg-Gly-Phe-Ser, die durch die Ansequenzierung des Proteins bestätigt wurde. Für die Protein Kinase A Stelle in der A-Domäne konnte in anderen Versuchen eine Rolle in der Synapsin Funktion aufgezeigt werden (Chi et al., 2001; 2003; Kuromi et al., 2002). Einen Überblick über den Konservierungsgrad der PKA Stelle in der A-Domäne gibt die Abbildung 1.5 wieder.

<i>Homo sapiens</i>	Synla	---MNYLR RR LSDSNF---
<i>Homo sapiens</i>	Synlla	---MMN FLR RR LS DSS---
<i>Homo sapiens</i>	Synllla	---MN FLR RR LS DSSF---
<i>Mus musculus</i>	Synla	---MNYLR RR LSDSNF---
<i>Mus musculus</i>	Synlla	---MMN FLR RR LS DSS---
<i>Mus musculus</i>	Synllla	---MN FLR RR LS DSSF---
<i>Xenopus laevis</i>	Synla	---MMNYLR RR LSDSNF---
<i>Xenopus laevis</i>	Synlla	---MNYL K RR LS DSGF---
<i>Xenopus laevis</i>	Synllla	---MN FLR RR LS DSSF---
<i>C.elegans</i>		---FS FLL RSKRKEKPS---
<i>D. mel. genom.</i>		---L K RR F S---
<i>D. mel. cDNA</i>		---L K RG F S---

Abbildung 1.5:
Protein Kinase A Erkennungsstelle in verschiedenen Synapsine von unterschiedlichen Spezies. Angegeben sind nur die unmittelbar umgebenden Aminosäuren. Die Konsensussequenz ist in rot dargestellt, die dritte Aminosäure kann dabei variieren. In der genomischen Sequenz von *Drosophila* findet sich die Abfolge R-R-F-S, während im Protein und in der cDNA ein Austausch zu Gly an der zweiten Position erfolgt.

Ausgehend von der Charakterisierung und Klonierung des *Synapsin* Gens (Heimbeck et al., 1990; Klagges et al., 1996) wurde eine Linie mit einem Transposons identifiziert, welches ca. 1kb aufwärts des ersten *Synapsin* Exons inseriert ist. Diese Linie (*Syn^{P1}*) zeigte keine Unterschiede in der Expression des Proteins im Vergleich zum Wildtyp (Klagges, 1995). Die *Syn^{P1}* Fliegen dienten als Ausgangsmaterial für eine Local-Hopp Mutagenese, die in einer weiteren Linie *Syn^{P1+P2}* resultierte. Hier liegt neben dem P-Element am alten Insertionsort ein weiteres innerhalb des Introns 9 vor (vgl. Abb.1.6) (Dissertation T.A. Godenschwege, 1999). Die *Syn^{P1+P2}* Linie diente wiederum als Ausgangspunkt für eine Jump-out Mutagenese. Diese Mutagenese resultierte in mehreren Deletionsmutanten, welche im folgenden Abschnitt kurz charakterisiert werden.

1.3.3 *Synapsin* Mutanten in *Drosophila melanogaster*

Die aus der Jump-out Mutagenese hervorgegangenen Linien wurden auf ihre Vitalität, Fertilität und die Expression des Synapsin Proteins untersucht. Dabei zeigten sich einige interessante Fliegenlinien, die in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können.

Eine Gruppe von Fliegen zeigte keine Synapsin Expression auf Western Blots und immunhistochemischen Schnitten, waren jedoch homozygot lebensfähig und fertil. In diese Kategorie fallen z.B. die Linien *Syn⁷⁹*, *Syn⁹⁷* und *Syn¹⁴³*. Die Linie *Syn⁷⁹* zeigt zusätzlich einen Flügelphänotyp, ist jedoch flugfähig. In allen drei Stämmen ist das P-Element stromauf des transkribierten Bereiches des Synapsin Gens herausgesprungen und hat verschieden große Deletionen verursacht. Die Größe der Deletionen wurde in den Linien durch Southern Blot Analysen untersucht und konnte im Fall der Linien *Syn⁹⁷* und *Syn¹⁴³* auf ca. 1,5 kb bzw. 3 kb festgelegt werden. In der Linie *Syn⁷⁹* ist eine Deletion von ca. 10 kb entstanden, innerhalb der aber ein 3 kb Fragment unbekannter Herkunft inserierte. Aufgrund des Fehlens der Expression von Synapsin wurde die Linien *Syn⁷⁹* und *Syn⁹⁷* als funktionelle Synapsin

Nullmutanten eingestuft. Eine schematische Darstellung der Deletionen, sowie die Expression auf Gehirnschnitten zeigt die Abbildung 1.6.

Eine weitere Gruppe von Mutanten, die aus der Jump-out Mutagenese hervorgegangen sind, umfasst die Linien *Syn*¹⁶⁸, *Syn*¹⁷⁸ und *Syn*³²⁵. Diese Linien zeigten auf immunhistochemischen Untersuchungen und auf Western Blots eine Reduktion der Expression des Proteins und waren homozygot lebensfähig und fertil. In der Linie *Syn*¹⁶⁸ fand sich zusätzlich zu einer allgemeinen Abschwächung der Färbung des Neuropils ein verändertes Expressionsmuster. So waren die Lamina und in die mittlere Schichten der Medulla kaum gefärbt. Ein ähnliches Muster zeigte sich auch in der Linie *Syn*³²⁵. Auch in diesen Stämmen wurden die Deletionen durch Southern Blot analysiert. Dabei zeigten sich verschiedene Deletionsgrößen die vor dem ersten Exon des *Synapsin* Gens lagen. Einen Überblick über die Deletionen und über die Expressionsmuster der Linien auf Gehirnschnitten zeigt die folgende Abbildung (nach Godenschwege, 1999).

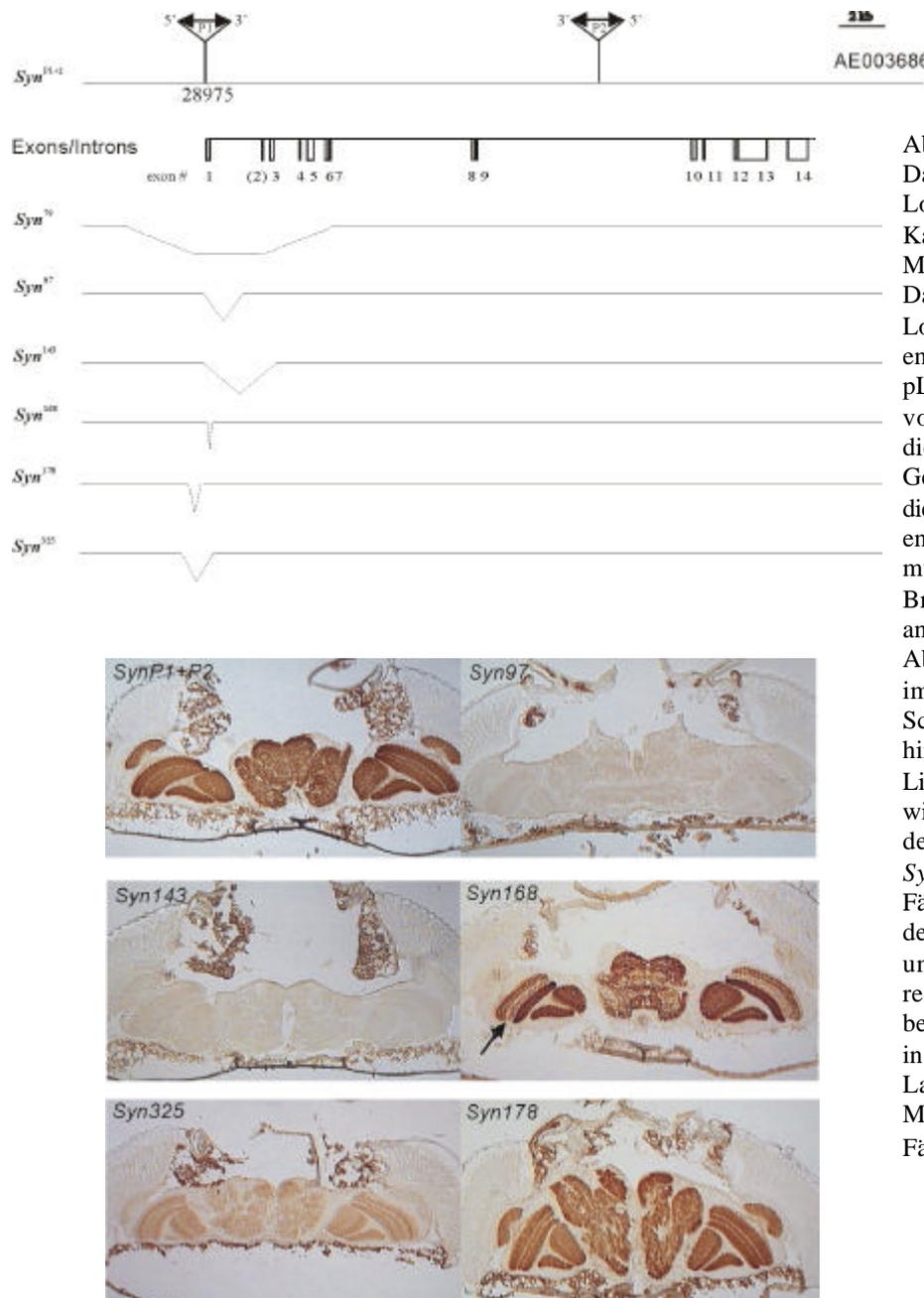


Abbildung 1.6: Darstellung des Synapsin Lokus und die genomische Karte der verschiedenen Mutanten. Dargestellt sind die durch die Local-Hopp Mutagenese entstandenen Insertionen des pLacW Elementes im Locus von *Synapsin*. Darunter ist die Exon-Intron Struktur des Gens angegeben. Die durch die Jump-out Mutagenese entstandenen Deletionsmutanten sind mit ihren Bruchpunkten schematisch angegeben. Im unteren Abschnitt befinden sich die immunhistochemischen Schnitte durch das Fliegengehirn. Die Expression der Linie *Syn*^{P1+P2} entspricht der wildtypischen Expression. In den Mutanten *Syn*⁹⁷ und *Syn*¹⁴³ findet man keine Färbung des Neuropils. In den Mutanten *Syn*¹⁶⁸, *Syn*¹⁷⁸ und *Syn*³²⁵ ist die Expression reduziert. Zu beachten ist das besondere Expressionsmuster in der Linie *Syn*¹⁶⁸ in der die Lamina und die distale Medulla sehr schwache Färbung aufweisen (Pfeil).

Die Untersuchung auf Veränderungen in der Ultrastruktur der Synapse zeigte in den Mutanten keinen Unterschied zum Wildtyp auf. Die Verteilung der SV in der unmittelbaren Nähe der aktiven Zone, sowie in der Umgebung wies ebenfalls keine Abweichungen auf. Die elektrophysiologische Untersuchung der Amplitude der EJPs (Excitatory Junction Potential) konnte in der Mutante keine quantitativen Einfluss des Fehlens von Synapsin nachweisen (Abbildung 1.7, aus Reisch, 2000).

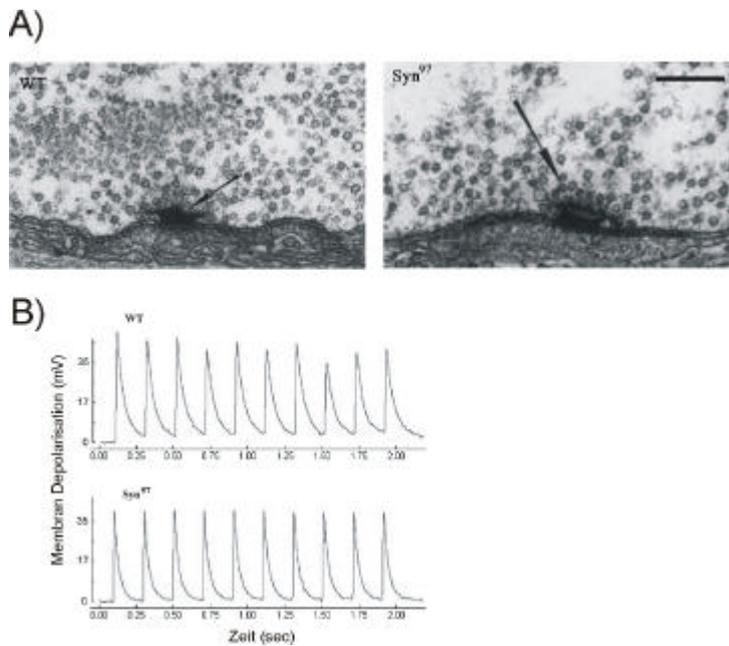


Abbildung 1.7:

Vergleich von Ultrastruktur und EJPs-Messung an Wildtyp und *Syn⁹⁷* Mutanten.

A) Dargestellt sind EM-Aufnahmen der aktiven Zone eines synaptischen Boutons. Die Auszählung der SV zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung. (Pfeil= aktive Zone, Skala= 300 nm).

B) Gemessene EJPs am Muskel 6 und 7 bei Wildtyp Larven im Vergleich zur Nullmutante bei einer 5 Hz Stimulation. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied aufgedeckt werden.

Mit der Nullmutante *Syn⁹⁷* wurden bereits einige Verhaltensversuche zur phänotypischen Charakterisierung durchgeführt (Godenschwege, 1999), welche hier kurz zusammengefasst werden.

Bei einer einfachen visuell gesteuerten Verhaltensreaktion (schnelle Phototaxis, Benzer, 1967) ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen *Syn⁹⁷* Fliegen und WT Oregon R bzw. *Syn^{P1}* Fliegen nachweisen. Im operanten Lernparadigma der Hitzebox (Wustmann et al., 1996; Wustmann und Heisenberg, 1997) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *Syn⁹⁷* und *Syn^{P1}* im Erinnerungstest. Im Flugsimulator (Heisenberg und Wolf, 1979; 1991) zeigte die Linie *Syn⁹⁷* zwar im Vergleich zum Wildtyp Oregon R einen Lerndefekt, eine eindeutige Zuordnung dieses Defektes zum Fehlen von Synapsin war jedoch nicht möglich, da sich die als Kontrollstamm verwendete Linie *Syn^{P1}* (normale *Synapsin* Expression) ebenfalls als lerngestört erwies. Die lokomotorische Aktivität (Martin et al., 1998) der Nullmutante war jedoch signifikant erhöht im Vergleich zur *Syn^{P1}* Linie.

Als Parameter mit deutlicher Relevanz für die biologische Fitness der Mutante wurde schließlich die Kopulationslatenz (Reif, 1998), d.h. die Zeit zwischen dem ersten Kontakt von Männchen und Weibchen und der erfolgreichen Kopulation, bestimmt. Dieser Wert ist in *Syn⁹⁷*-Männchen signifikant größer, als bei Wildtyp Oregon R Männchen. Allerdings fehlten hier geeignete Kontrollen.

1.4 RNA-Editing

Unter dem Begriff des RNA-Editings versteht man eine Form der Weiterverarbeitung der RNA. Dieses Redigieren der RNA besteht darin, dass die Nukleotidsequenz der RNA durch Einbau, Entfernen oder Verändern von Nukleotiden abgewandelt wird. Entdeckt wurde der RNA-Editing Prozess in den Mitochondriengenomen des Protozoen *Trypanosoma brucei*, bei dem es an mehreren Stellen zu einem Einbau von Uracil-Nucleotiden in die RNA kommt (Benne et al., 1986). Mittlerweile wird der Begriff RNA-Editing auf mehrere Prozesse angewandt, welche eine Modifikation der RNA Sequenz von ihrer durch die DNA vorbestimmten Sequenz bewerkstelligen. Dabei können als Substrat sowohl mRNAs, als auch tRNAs und rRNAs dienen. Bei mRNA-Editing kann die Veränderung zu einem Wandel in der Funktion des Proteins führen. Die molekularen und zellulären Prozesse sind in einigen Fällen relativ gut charakterisiert worden (Benne et al., 1993; Grosjean und Benne, 1998; Gott und Emeson, 2000).

In diesem Abschnitt sollen nur die zu Grunde liegenden Prinzipien im Falle des RNA-Editings auf dem Niveau der mRNA erläutert werden. Diese Form der Weiterverarbeitung ist der in der Natur am häufigsten vorkommende Prozess vor Editing an tRNA oder rRNA. Die Veränderungen können vielseitige Effekte hervorrufen. So können neue Start- und Stop-Codons kreiert werden (Chang et al., 1998), neue offene Leseraster (ORF) entstehen (Miller et al., 1993; Benne et al., 1994), Aminosäurewechsel im Protein hervorgerufen werden (Sharma et al., 1994; Skuse et al., 1996; Rueter et al., 1998), sowie Splicing-Erkennungsstellen verändert und Stop-Codons entfernt werden (Yoshinaga et al., 1996; Rueter et al., 1999). Basenveränderungen in 5'- oder 3'untranslatierten Bereich kommen weitaus seltener vor, können aber dennoch Einfluss auf die Stabilität des mRNA-Konstruktes haben (Schuster et al., 1991).

Die Mechanismen zur Umwandlung von Nukleotiden beruhen weitgehend auf Deaminierungen (Adenosine zu Inosine und Cytidine zu Uridine) und Aminierungen (Uridine zu Cytidine) (Chang et al., 1998; Sharma et al., 1994; Rueter et al., 1998), aber auch Umwandlungen von Purin- zu Pyrimidinbasen und umgekehrt wurden beschrieben (Price und Gray et al., 1998; 1999).

Die Umwandlung eines Cytidin zu einem Uridin wurde zuerst in der messenger RNA des Apolipoproteins B entdeckt und aufgeklärt. Das RNA Editing erfolgt unter der Mithilfe eines Multiprotein-Komplexes, des Editosomes. Dieses Enzym katalysiert die Deaminierung am C4-Kohlenstoff des Cytidins (Chang et al., 1998; Smith et al., 1997).

Auch die gegensätzliche Umänderung eines Uridins zu einem Cytidins wurde beschrieben. Ein solches RNA Editing Ereignis wird, z.B. in mRNA von Neuropeptiden in Amphibien (Nagalla et al., 1994) und in der mRNA des in der Entstehung des Wilms-Tumor involvierten Gens WT1 bei Säugern beobachtet (Sharma et al., 1994). Der genaue Mechanismus ist noch weitgehend unklar, jedoch scheint eine CTP Synthetase (Yamauchi et al., 1990) an der Übertragung einer Aminogruppe auf Uridin beteiligt zu sein.

Eine andere Form des Editing ist das Austauschen eines Adenosins (A) durch ein Inosin. Diese Base hat Paarungseigenschaften wie Guanodin (G), weshalb nun bei der cDNA-Synthese ein Cytidin als Gegenbase eingebaut wird. Dieses Editing wird daher meistens durch den Unterschied A zu G zwischen der genomischen und der cDNA Sequenz identifiziert. Die Reaktion ist eine hydrolytische Deaminierung an der C6 Position des Purinrings, welche durch das Enzym ADAR (Adenosine Deaminase that acts on RNA) durchgeführt wird (Melcher et al., 1995; Polson et al., 1991; Rueter et al., 1995). Für die Erkennung der zu editierenden Base benötigt dieses Enzym eine bestimmte Struktur der RNA. Das Editing erfolgt vor dem Spleißvorgang (Rueter et al., 1995), zu dieser Zeit kann es zu einer

komplementären Basenpaarung innerhalb der mRNA kommen. Dabei paart sich in der Regel die zu editierende Sequenz mit einem Bereich, der innerhalb des folgenden Introns liegt. Die komplementäre Sequenz im Intron wird daher auch Editing site Complementary Sequences (ECS) genannt (Higuchi et al., 1993; Herb et al., 1996; Rueter et al., 1999). Ein mRNA Editing eines solchen Typus zeigt sich z.B. in einer Untereinheit des Glutamat Rezeptors in Säugern (Rueter et al. 1995, Rueter und Emeson, 1998), aber auch in *Drosophila melanogaster* konnten in verschiedenen Genen und in der dazugehörigen mRNA Umwandlungen von A zu G nachgewiesen werden. So weisen die Produkte der Gene *paralytic* (Natrium-Kanal) (Palladino et al., 2000), *cacophony* (spannungsabhängiger Calcium-Kanal) (Palladino et al., 2000) und *DrosGluCl-a* (Chlorid-Kanal) (Semenov et al., 1999) einen solchen Austausch auf. Auch das für die Reaktion verantwortliche Enzym dADAR konnte in *Drosophila* identifiziert werden.

1.5 Assoziatives Lernen in *Drosophila*

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist in ihrem natürlichen Habitat von sich ständig ändernden Umweltfaktoren umgeben. Um in dieser Umwelt zu überleben haben die Fliegen die Fähigkeit des Lernens erlangt. Als Lernen bezeichnet man eine kurz- bis mittelfristige adaptive Verhaltensmodifikation, deren einfachste Form die Habituation, d.h. die Fähigkeit sich an einen wiederholend auftretenden Reiz zu gewöhnen, ist. Eine höhere Stufe des Lernens stellt das assoziative Lernen dar (Rescorla, 1988). Hierbei wird eine Assoziation zwischen einem biologisch signifikanten Stimulus, unconditionierter Stimulus (US), und einem am Beginn des Lernens neutralen (konditionierten) Stimulus (CS) aufgebaut. In Folge dessen kommt es durch bei Präsentation des CS zu einer Verhaltensweise, die vor der Lernphase nicht auftrat. Das assoziative Lernen benötigt einen engen zeitlichen Zusammenhang zwischen den Stimuli, während das nicht assoziative Lernen ohne diese Verknüpfung auskommt (Lukowiak et al., 1996). Zwei Formen des assoziativen Lernens sind die klassische und die operante Konditionierung. Das klassische Konditionieren wurde vor allem durch die Versuche des russischen Physiologen Pawlow geprägt (Pawlow, 1927). Hierbei wird ein neuer Reiz mit einer bereits bestehenden Reaktion gekoppelt. In der letzten Zeit wurden verschiedene Experimente zur Klärung der molekularen und neuronalen Vorgänge in dieser Art des Lernens durchgeführt (Tully et al., 1994; Menzel und Müller, 1996; Kim et al., 1998). Die operante Konditionierung oder auch instrumentelles Lernen genannt zeichnet sich dadurch aus, das eine neue Reaktion mit einer bestimmten Reizsituation in Verbindung gebracht wird (Wolf und Heisenberg, 1991). In Vertebraten wird das operante Konditionieren vor allem mit Versuchen mit der so genannten Skinner-Box (Skinner, 1938) und der in ihr erlernten Reiz-Reaktions-Assoziation in Verbindung gebracht.

Für die Untersuchung des assoziativen Lernen und Gedächtnis wurden für *Drosophila melanogaster* einige Verhaltensparadigmen entwickelt in denen das veränderte Verhalten der Fruchtfliege aufgezeigt werden kann (Wolf et al., 1998). So entwickelten Tully und Quinn ein Paradigma, in dem die Fliege eine Assoziation zwischen einem olfaktorischen Stimulus (CS) und der Bestrafung durch einen elektrischen Reiz (US) herstellt (Tully und Quinn, 1985). Ein weiteres operantes Konditionierungs-Paradigma ist der Flugsimulator, in dem ein visuelles Muster mit einer Bestrafung mittels Hitze verbunden wird. Die Verhaltensreaktion kann in einer Veränderung des Drehmomentes der Fliege nachgewiesen werden (Wolf und Heisenberg, 1997; Ernst und Heisenberg, 1999). In diesem Paradigma konnten auch Verhaltensanalysen über Vorgänge in der Gedächtnisbildung durchgeführt werden (Wolf und Heisenberg, 1997; Xia et al., 1997a; 1997b; 1999). Ein anderes operantes Lernexperiment

wird z.B. in der Hitzebox durchgeführt, in der die Fliege darauf konditioniert wird, eine Hälfte der Box zu vermeiden durch gezielte Bestrafung durch Hitze (Wustmann et al., 1996). In diesem Paradigma zeigten schon bereits bekannte Gedächtnis-Mutanten, wie *rutabaga* oder *dunce* eine Reduktion im Performance Index (Wustmann et al., 1996; Zars et al., 2000). Erst kürzlich konnte ein operantes Lernparadigma für Larven von *Drosophila melanogaster* etabliert werden (Gerber et al., 2003). Auch hier kommt es zu einer Assoziation eines olfaktorischen bzw. visuellen Stimulus mit einem gustatorischen Reiz.

1.6 In-vivo Calcium Imaging

Die Darstellung neuronaler Aktivität am lebenden Organismus ist eines der sich am rasantesten entwickelnden Teilbereiche der Neurobiologie. Der elektrophysiologische Ansatz der Ableitung einzelner Nervenzellen eignet sich kaum für die Funktionsanalyse von Nervenzellverbänden. Um diese Beschränkungen zu überwinden ist die Methode des In-vivo Calcium Imaging entwickelt worden.

Die verschiedenen Vorgehensarten nutzen alle die Schlüsselrolle des Calcium-Ions bei der Zellaktivität und insbesondere bei der Freisetzung der Transmitter in den synaptischen Spalt aus. Ein Aktionspotential, welches ein synaptisches Endknöpfchen erreicht, löst durch Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle einen Einstrom von Calcium-Ionen aus dem extrazellulären Medium in das Cytosol aus. Dieser Anstieg der Ionenkonzentration sorgt durch verschiedene Prozesse für die Verschmelzung der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran und somit zu der Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt (siehe Abb. 1.2). Dadurch ist die Übertragung des elektrischen Signals auf das nächste Neuron gewährleistet. Eine bildgebende in-vivo Darstellung des Calcium-Einstroms kann so die Aktivität intakter neuronaler Netzwerke aufzeigen.

Die optische Registrierung des Calcium Einstroms kann durch verschiedene Indikatoren erfolgen. Synthetische fluoreszierende Chelatoren und Aequorin werden häufig eingesetzt (Kendall et al., 1992; Brini et al., 1994), stoßen aber bei einigen Anwendungen an ihre Grenzen. So sind die verschiedenen Chelatoren meist nicht gezielt intrazellulär zu applizieren und Aequorin lässt sich aufgrund seiner geringen Lumineszenzabgabe und der unbefriedigenden Membrangängigkeit des benötigten Kofaktors nur schwer messen (Kendall et al., 1996). Um diese Probleme zu überwinden wurde ein Fluoreszenzindikator entwickelt, der eine hohe Lichtabgabe mit der Möglichkeit einer gezielten Expression in genetisch definierten Zellen oder Geweben kombiniert. Der Calciumsensor „Cameleon“ (Miyawaki et al., 1997) erfüllt beide Voraussetzungen.

Das Proteinkonstrukt besteht aus zwei Green Fluorescent Protein (GFP) Mutanten, im Fall von Cameleon 2.0 bzw. 2.1 sind dies ECFP (Enhanced Cyano Fluorescent Protein) und EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein). Die Fluoreszenzproteine stammen ursprünglich aus der Meduse *Aequorea victoria* und wurden durch gezielte Mutagenesen in ihrer Anregungs- bzw. Emissions-Wellenlänge verändert. Beide GFPs sind über Calmodulin (4 Calcium-Bindungsstellen) und die Calmodulin-Bindungssequenz des M13-Peptids miteinander verbunden. Das ECFP kann durch Licht mit der Wellenlänge 430 nm angeregt werden und emittiert so Licht bei einer Wellenlänge von 480 nm. Steigt nun die Konzentration der Calcium-Ionen an, so bindet Ca^{2+} an Calmodulin, woraufhin das M13-Peptid sich nun an Calmodulin anlagert. Durch diese Bindung kommt es zu Konformationsänderungen im Fusionsprotein, so dass nun das ECFP in räumliche Nähe zum EYFP kommt. Durch diese Nähe ist ein strahlungsfreier Energietransfer vom angeregten ECFP zum EYFP möglich. Dieser Transfer wird auch FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) genannt, durch

ihn wird das flankierende EYFP angeregt und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 530 nm. Durch die Berechnung des Verhältnisses 530 nm/480 nm (EYFP/ ECFP) kann nun eine Aussage über die intrazelluläre Calciumkonzentration und damit über die neuronale Aktivität getroffen werden. Eine schematische Darstellung des Fusionsproteins und der Reaktion auf Calcium-Ionen ist in der Abbildung 1.8 dargestellt.

Der Vorteil der genetischen Exprimierbarkeit dieses Indikators für neuronale Aktivität kommt besonders bei der Arbeit mit *Drosophila melanogaster* zum Tragen. So kann die codierende cDNA des Fusionsproteins direkt hinter eine Abfolge von UAS (Upstream Activation Sequence)-Elemente, in einen Transformationsvektor kloniert werden. Durch das aus der Hefe stammende Gal4/UAS- System (Perrimon et al., 1999) ist es so möglich, die Expression nur in bestimmten Geweben der Fliege anzuschalten. Dazu werden gewebespezifisch Gal4 exprimierende Linien mit den UAS-cDNA (Cameleon) Fliegen gekreuzt. Die Nachkommenschaft dieser Kreuzung steht dann für Calcium Imaging Experimente zur Verfügung. Dabei wird das im neuronalen Gewebe exprimierte Cameleon-Konstrukt durch eine Öffnung in der Kopfkapsel mit Licht angeregt und die vom Calcium-Einstrom abhängige emittierte Fluoreszenz mittels einer CCD-Kamera detektiert. In den Calcium Imaging Experimenten der Arbeitsgruppe wird beispielsweise Cameleon in den sog. „Projektionsneuronen“ exprimiert und deren Aktivität bei der Reizung der Antennen mit verschiedenen Duftstoffen registriert (siehe Fiala et al. 2002).

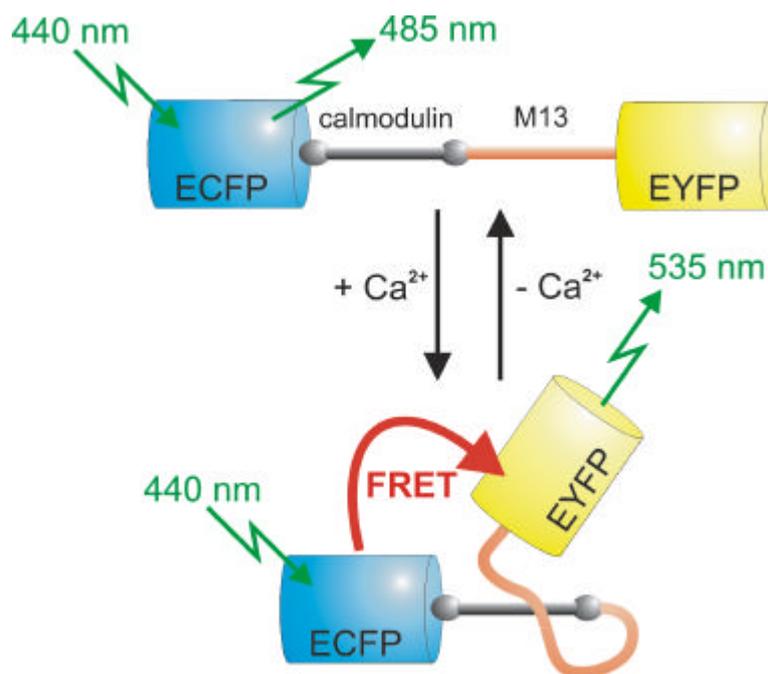


Abbildung 1.8:
Schematische Darstellung von Cameleon 2.1 (nach Miyawaki et al., 1997).

Die ECFP und EYFP sind über Calmodulin und dem M13 Peptide miteinander verbunden. Bindung von Calcium führt zu einer Konformationsänderung und zu einem Energietransfer (FRET), wodurch eine Veränderung im Emissionsverhältnis 535/ 485 erfolgt.

Ausgehend von dem Grundplan des Cameleon-Konstrukts sind mittlerweile verschiedene verbesserte Versionen des Moleküls entwickelt worden. So zeigt das ursprünglich beschriebene Cameleon 2.0 (Miyawaki et al., 1997) eine unvorteilhafte pH-Abhängigkeit in seinen Emissionseigenschaften. Diese konnten in einer neuen Version, dem Cameleon 2.1 verbessert werden (Miyawaki et al., 1999). Vom Cameleon 2.0 unterscheidet sich die neue Version nur durch zwei Aminosäuresubstitutionen. Der Austausch findet im EYFP des Fusionsproteins statt, hier werden die Aminosäuren Valin (Position 68 im EYFP) gegen Leucin und die Aminosäure Glutamin (Position 69 im EYFP) gegen Lysin ausgetauscht.

1.7 Aufgabenstellung

Wie erwähnt konnte das *Synapsin* Gen in *Drosophila melanogaster* in vorangegangenen Arbeiten kloniert und charakterisiert werden und in einer auf diesen Erkenntnissen aufbauenden Doktorarbeit gelang es durch eine gezielte Jump-out Mutagenese sowohl funktionelle Nullmutanten, als auch regulatorische Mutanten zu erzeugen (Heimbeck, 1990; Klagges, 1995; Godenschwege, 1999). Diese Mutanten wurden in einzelnen Verhaltensexperimenten untersucht, wobei sich einige relativ schwache Phänotypen ergaben. Allerdings wurde die *Synapsin* Nullmutante im genetischen Hintergrund des w^{1118} Stammes gehalten, der auch als Ausgangslinie für P(w^+ , lacZ) Mutagenese verwendet wird. *Synapsin* wildtypische Fliegen dieses Hintergrundes zeigen aber in mehreren Verhaltensversuchen bereits einen Phänotyp, so dass der für die *Synapsin* Mutanten beobachtete Verhaltensphänotyp nicht eindeutig der *Synapsin* Mutation zugewiesen werden kann.

Um das Problem des genetischen Hintergrundes der Fliegen zu überwinden, sollte in dieser Arbeit der Stamm *Syn*⁹⁷ mit dem Wildtyp CantonS extensive rückgekreuzt und ein neuer „cantonisierter“ *Syn*^{97CS} Stamm etabliert werden. Dieser kann dann als Teststamm in verschiedenen Verhaltens- und Lernexperimenten mit adulten und larvalen Tieren eingesetzt werden, wobei der Wildtyp CantonS als Kontrollstamm dient. Als weiterer Test dafür, ob alle Aspekte des Phänotyps der *Synapsin* Mutanten tatsächlich auf das Fehlen des *Synapsin* Gens zurückzuführen sind und nicht z.B. auf Mutationen oder Polymorphismen in der Nachbarschaft der *Synapsin* Locus beziehen, sollte eine neue „Rescue“ Strategie entwickelt werden. Kann ein Defekt in der Mutante durch transgene Expression von *Synapsin* wieder aufgehoben („gerettet“) werden, so ist die *Synapsin* Defizienz als Ursache für den Defekt nachgewiesen.

Auf die Diskrepanz zwischen genomischer Sequenz und cDNA bzw. Proteinsequenz wurde bereits hingewiesen. Es war jedoch unklar, ob es sich hier um Sequenzierfehler, Sequenzpolymorphismen zwischen verschiedenen Wildtypstämmen, oder um eine systematische Abweichung handelt, die beispielsweise auf RNA Editierung beruhen könnte. Daher sollte die betreffende Region molekular näher untersucht und die mögliche Abweichung von der optimalen Protein Kinase A Konsensussequenz in verschiedenen Wildtypstämmen nachgeprüft werden.

Als weitere Aufgabe in dieser Doktorarbeit ergab sich die Mitarbeit bei der Etablierung des in-vivo Calcium Imaging Verfahrens am Lehrstuhl. Hierzu sollte das Konstrukt Cameleon 2.0 molekular untersucht und die zugehörigen transgenen Fliegen charakterisiert werden. In einem nächsten Schritt sollte eine Mutation in das betreffende Fusionsprotein eingebracht werden, um die weiterentwickelte Form Cameleon 2.1 herzustellen. Dieses Konstrukt sollte in einer Keimbahntransformation in das Genom von *Drosophila melanogaster* eingebracht werden und eine Fliegenlinie mit Cameleon 2.1 Konstrukt etabliert werden. Diese Linie sollte als Ausgangspunkt für Calcium Imaging Experimente an adulten Fliegen dienen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden kommerziellen Anbietern bezogen: Amersham, Appligene, BIO RAD, Boehringer Mannheim, Gibco BRL, Merck, MBI Fermentas (MBI), New England Biolabs (NEB), Peqlab, Pharmacia, Sigma, United States Biochemicals und Roth.

2.2 Enzymatische Manipulation der DNA

Restriktionsendonukleasen

Nachfolgend eine Aufstellung der verwendeten Enzyme, ihrer Anbieter und den jeweiligen verwendeten Puffern

Enzyme	Anbieter	Benutzter Puffer
BamHI	Gibco	BRL3
EcoRI	NEB	Orange ⁺
HaeIII	Gibco	BRL2
HindIII	NEB	Orange ⁺
HpaII	Gibco	BRL8
KpnI	Gibco	BRL4
NotI	MBI	Orange ⁺
PshAI	NEB	NEB4
SalI	Gibco	BRL10
SstI	Gibco	BRL2
SstII	Gibco	BRL2
XbaI	Gibco	BRL2
XhoI	Gibco	BRL2

Andere Enzyme

Enzym	Anbieter
DNA Polymerase I Klenow Fragment	Amersham, Gibco BRL
T4 DNA Ligase	NEB, MBI
RNase A	Sigma
Taq Polymerase	Peqlab, QIAGEN
Shrimp Alkaline Phosphatase	MBI
Calf Intestine Alkaline Phosphatase	MBI
Protease K	Boehringer
Rnase Inhibitor	MBI
Omniscript™ Reverse Transkriptase	QIAGEN

Die jeweiligen Enzyme wurden mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffern verwendet.

2.3 Southern Blotting

Verwendete Gerätschaften

Mini Oven MK II	Hybaid
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Biotech VacuGene Pump	Pharmacia
Vacuum blotter	Appligene
Exponierkammern	Dr. Goos Suprema

Verbrauchsmaterial

Positive Nylontransfermembran	Appligene
Nytran N Nylontransfermembran	Schleicher & Schuell
X-Ray Retina Röntgenfilme	Noras
Whatman 3mm Filterpapier	Schleicher & Schuell

2.4 Western Blotting

Verwendete Gerätschaften

Exponierkammern	Dr. Goos Suprema
Glasplatten, Spacer	Biometra
Gelkammer	Biometra
Transferkammer	Peqlab

Verbrauchsmaterial

Positive Nylontransfermembran	Appligene
Nytran N Nylontransfermembran	Schleicher & Schuell
X-Ray Retina Röntgenfilme	Noras
Whatman 3mm Filterpapier	Schleicher & Schuell

2.5 Kits

ECL Western blotting analysis system	Amersham
Hexa Label DNA Labeling System	MBI
Oligotex mRNA Mini Kit	QIAGEN
Omniscript Reverse Transcriptase Kit	QIAGEN
Opti-Prime TM PCR Optiization Kit	Stratagene
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAGEN® Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gelextraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QuickChange TM Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen
Vectastain ABC-Kit	Vector Lab Inc.

2.6 Nukleotide

[α -³²P] dCTP (3000 Ci/mMol)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Amersham
Peqlab

2.7 DNA–Größenstandards

1 kb plus DNA ladder
Gene Ruler 1 kb DNA ladder
100 bp DNA ladder
2-log DNA ladder

NEB
MBI
Gibco BRL
NEB

2.8 Protein–Größenstandards

prestained Marker

NEB

2.9 Oligonukleotide

Hersteller: MWG Biotech AG

in-vivo Calcium Imaging Projekt		
Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung (Anhang)
72-Hae-5	5'- CTT GTT TTT ATT GGC AC -3'	Inverse PCR (9.4)
Cam2.1-76	5'- AGC CGC AAT ATG TCA AGC -3'	Inverse PCR
Cham10	5'- CAG CAG AAC ACC CCC ATC -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham11	5'- GCC CTC GAA CTT CAC CTC -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham12	5'- CTA CCA GCA GAA CAC CCC -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham13	5'- CTG ATG TAG CCG TTC CCA -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham3	5'- GAC GTA AAC GGC CAC AGG -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham4	5'- CAC ATG AAG CAG CAC GAC -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham5	5'- CCG ACA AGC AGA AGA ACG -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham6	5'- CTG CTG GAG TTC GTG ACC -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham7	5'- GCA TTC CGT GTT TTT GAC -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham8	5'- GAC GTA AAC GGC CAC AAG -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham9	5'- ACG GCA ACT ACA AGA CCC -3'	Sequenzierung Cam (9.2)
Cham-MT1	5'- CCT TCG GCT ACG GCT TGA AATGCT TCG CCC GCT ACC CC -3'	Mutation von Cam 2.0 zu Cam 2.1 (9.2)
Cham-MT2	5'- GGG GTA GCG GGC GAA GCA TTT CAA GCC GTA GCC GAA GG -3'	Mutation von Cam 2.0 zu Cam 2.1 (9.2)
Inverse PCR am pUAST-Vektor		
Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung (Anhang)
UAST-5	5'- CGC CTT GGT CTC GTC -3'	Inverse PCR (9.4)
UAST-HaeIII-3	5'- AGT GGA TGT CTC TTG CCG -3'	Inverse PCR (9.4)
UAST-HaeIII-4	5'- CAA ATA AAC AAG CGC AGC -3'	Inverse PCR (9.4)
UAST-Hpall-1	5'- ATG AAC CAC TCG GAA CCA -3'	Inverse PCR (9.4)
UAST-Hpall-2	5'- CGC ACA CAA CCT TTC CTC -3'	Inverse PCR (9.4)
Synapsin-Projekt		
Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung (Anhang)
csyn-2	5'- GTC GGC TGA TCT TGG AT -3'	RNA-Editing (9.4)
del 143 5R	5'- AGA GGA AGA TTC CAA CAA AGC T -3'	Deletionskartierung (9.4)

del-143F	5'- TTT TCA TGG CCG TCG CAG AA -3'	Deletionskartierung (9.4)
del143F3	5'- CGC CAT GCT TGC TGA TAA -3'	Deletionskartierung (9.4)
del-143R	5'- CTT TTG TGT GGC GCA TAA CG -3'	Deletionskartierung (9.4)
del143R3	5'- TTT ATT ATC GTG GCC CGC -3'	Deletionskartierung (9.4)
Edi-1	5'- GGG CAA ATA ACG AGG ACC -3'	RNA-Editing (9.4)
Edi-2	5'- CGG ATA GCC TGC GAT TCG -3'	RNA-Editing (9.4)
Edi-3	5'- TTG TCC TTG CTG AAT GCC -3'	RNA-Editing (9.4)
Edi-4	5'- TTC GCC CAG CCA AAT CTC -3'	RNA-Editing (9.4)
PKA2-F	5'- GTG GGT GGG GTG CGT CGT GAT GCG CAG ACT TCC CAG -3'	Mutation PKA site 2 in Synapsin
PKA2-R	5'- CTG GGA AGT CTG CGC ATC ACG ACG CAC CCC ACC CAC -3'	Mutation PKA site 2 in Synapsin
PKA1-MT4	5'-TTT CCT GAA GAG AAG ATT CGC CTC GGG AGA C-3'	Mutation PKA site 1 in Synapsin
PKA1-MT5	5'-AAT TTC CTG AAG AGA AGA TTC AGC TCG GGA GAC-3'	Mutation PKA site 1 in Synapsin
PKA1-MT6	5'-CGC CAA AGA GCT CGG ATA TCT CAT CCA ACC-3'	Mutation PKA site 1 in Synapsin
s168Fthree	5'- TTG TGC TGC TCT TTT TGG -3'	Deletionskartierung (9.4)
s168Rone	5'- GCT GAA CTG TCA ACG ACG -3'	Deletionskartierung (9.4)
s325Ftwo	5'- TTT TGC ATG AAG TTG GCT -3'	Deletionskartierung (9.4)
Seq. Exon12R	5'-CGA CTT GCT GGG CTC CTT -3'	RNA-Editing (9.4)
Seq-Exon-12	5'- GCT CCT CGG TCT CTT CCC -3'	RNA-Editing (9.4)
syn143F2	5'- TCG CTC TCT TTG TGC TGC -3'	Deletionskartierung (9.4)
syn168F4	5'- TTC GCC ATG CTT GCT GAT -3'	Deletionskartierung (9.4)
syn97-CS-1F	5'- AGA AAA TTT GGC TTG CAT GG -3'	Genotypbestimmung (9.4)
syn97-CS-2R	5'- CGG GGT CTC AGT TTT GTT T -3'	Genotypbestimmung (9.4)
syn97-CS-3R	5'- CCT CTA CTT TTG GCT GCC TG -3'	Genotypbestimmung (9.4)
syn97-CS-4F	5'- TTG ATG GAA CTC GTA GCG -3'	Genotypbestimmung (9.4)
syn97-CS-5R	5'- TCA AAA CCG CCA CTC AGG -3'	Genotypbestimmung (9.4)
syn97-CS-6R	5'- ACG GAC TAA CTC GCA GG -3'	Genotypbestimmung (9.4)
WTsyn-down	5'- TGT ATT TTC CGC TGC CGC -3'	RNA-Editing (9.4)
WTsyn-up	5'- TCG GCG CAC TGA CAC CAC -3'	RNA-Editing (9.4)
allgemeine Primer		
Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
PM001	5'- CGT TAG AAC GCG GCT ACA AT -3'	pcDNA3- Vektor
Sp6	5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3'	pcDNA-Vektor
T3-Primer	5'- AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG -3'	pKSBluescript- Vektor
T7-Primer	5'- GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C -3'	pKSBluescript- Vektor
pUAST-up	5'-TCT CTG TAG GTA GTT TGT CCA-3'	pUAST-Vektor
pUAST-down	5'-AAA TCA ACT GCA ACT ACT GAA-3'	pUAST-Vektor
pW8-1	5'- TCG TTT AGA GCA GCA GCC -3'	pW8-Vektor
pW8-2	5'- CGC ACA CAA CCT TTC CTC -3'	pW8-Vektor

2.10 Sequenzierungen

Verwendetes Kit:

ABI PRISM™ *BigDye*™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
(PE Applied Biosystems)

Die Sequenzierungen wurden im vollautomatischen ABI 310 durchgeführt nach der Methode von F. Sanger (1977) durchgeführt.

2.11 Immunoglobuline

Polyklonaler anti- GFP	Molecular Probes
MAK IIIC11(SYN ORF1)	Godenschwege, 1995
MAK nc46 (SAP)	Hofbauer, 1991
MAK ab49 (CSP)	Hofbauer, 1991
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	
Horseradish Peroxidase Conjugate	BIO-RAD
Goat Anti-Rabbit IgG	
Horseradish Peroxidase Conjugate	BIO-RAD

2.12 Plasmide

pBlueskript KS+/-	Stratagene
pP{UAST}	Brand und Perrimon, 1993
pP{W8}	Klemenz et al., 1987
pCR® 4-TOPO®	Invitrogen

2.13 Bakterienstämme

Alle verwendeten Stämme sind in Sambrook et al., 1989 beschrieben

<i>E. coli</i> XL- 1 Blue	Stratagene
<i>E. coli</i> SURE2	Stratagene
<i>E. coli</i> DH5a	Stratagene

2.14 Fliegenstämme

Die Aufzucht der Fliegenstämme erfolgte bei 18° C und 25° C. Die Stammhaltung wurde bei 18° C durchgeführt.

Linie	Beschreibung	erhalten von
201y	Gal4 Linie	Yang et al., 1995
Bad Salzschlirf	Wildtyp Stamm	neu etabliert
Berlin	Wildtyp Stamm	Institut-Stammsammlung
Cam2.1/ 53	pUAST-Cameleon 2.1	S. Diegelmann
Cam2.1/ 65	pUAST-Cameleon 2.1	S. Diegelmann
Cam2.1/ 72	pUAST-Cameleon 2.1	S. Diegelmann

Cam2.1/ 76	pUAST-Cameleon 2.1	S. Diegelmann
Cam2.1/ 82	pUAST-Cameleon 2.1	S. Diegelmann
Cameleon C2/6I	Cameleon 2.0	Dr. C. Schuster
CantonS	Wildtyp Stamm	Institut-Stammsammlung
<i>Cyo/ Sco</i>	Markerlinie	Institut-Stammsammlung
Fulda	Wildtyp Stamm	neu etabliert
GH146	Gal4 Linie	Stocker et al., 1997
Lindelbach	Wildtyp Stamm	Institut-Stammsammlung
OregonR	Wildtyp Stamm	Institut-Stammsammlung
<i>Syn</i> ¹⁴³	Deletionsmutante für <i>Syn</i>	T.A. Godenschwege
<i>Syn</i> ¹⁶⁸	Deletionsmutante für <i>Syn</i>	T.A. Godenschwege
<i>Syn</i> ¹⁷⁸	Deletionsmutante für <i>Syn</i>	T.A. Godenschwege
<i>Syn</i> ³²⁵	Deletionsmutante für <i>Syn</i>	T.A. Godenschwege
<i>Syn</i> ^{97CS}	Deletionsmutante für <i>Syn</i> im gen. Hintergrund von CS	S. Diegelmann
<i>Syn</i> ⁹⁷	Deletionsmutante für <i>Syn</i> im gen. Hintergrund von <i>w</i> ¹¹¹⁸	T.A. Godenschwege
<i>Syn</i> ^{P1}	P-Element im <i>Syn</i> Lokus	Klagges, 1995
<i>w</i> ¹¹¹⁸	Wildtyp Stamm	Institut-Stammsammlung
<i>w</i> ¹¹¹⁸ ; TM3 / TM6	Doppelbalancer für das 3. Chromosom	Institut-Stammsammlung
Westerwald	Wildtyp Stamm	neu etabliert

2.15 Software

Excel 97
 GCG Version 8
 Microsoft Word 97
 Vector NTI
 Dnasis Version 5.0
 Photoshop Version 7.0
 CorelDraw Version 11.0
 Oligo DNA analysis Software Version 3.5
 Statistica Kernel Version 5.5

Microsoft
 Genetics Computer Group
 Microsoft
 Informax
 Pharmacia
 Adobe System Incorp.
 Corel
 NBI
 StatSoft Incorporation

2.16 Laborgeräte

ABI PRISM Sequencer
 Autoklav
 Beckmann DU-40 Photospektrometer
 Beckmann Zentrifuge J2-21
 Binocular Stemi SV 6
 BioPhotometer
 Brutschrank
 Bunsenbrenner
 Clean-Bench

Perkin Elmer
 Tecnomara
 Beckmann Instruments
 Beckmann Instruments
 Zeiss
 Eppendorf
 Memmert
 Sartorius
 Gelaire

CO ₂ -Anlage	Institutswerkstatt
Elektrophorese Powersupply	Pharmacia
Elektroporator	Institutswerkstatt
Elektrotransformationsküvetten	Peqlab
Feinwaage	Sartorius
Gelelektrophorese- Kammern:	
Sub-Cell- DNA	BIO RAD
Electro-4	Hybaid
Gel electrophoresis apparatus GNA 100	Pharmacia
Heizblock	Liebisch
Homogenisator	Institutswerkstatt
Magnetrührer + Heizplatte TMA 2071	Jahnke & Kunkel
Mastercycler® Gradient	Eppendorf
Mikroskop	Leitz
Mikrowelle	LG
Omnigene Thermocycler	Hybaid
pH-Meter WTW pH 521	Hanna-Instruments
Schüttler Vibrio L-40	Jahnke & Kunkel
Spektralphotometer	Eppendorf
Thermoblock	Eppendorf
Thermocycler	bio- med, MWG
Tischtaumler	Heidolph
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
UV-Illuminator	Vetter GmbH
Video Print Processor	Intas
Vortexer Genie 2	Scientific Instruments
Wasserbad	Köttermann Labortechnik
Waage	Kern
Zentrifugen	Beckmann, Heraeus

2.17 Verbrauchsmittel

Aluminiumfolie	Haushaltsware
Einweghandschuhe, gepudert oder ungepudert	Baxter, Maxter
Faltenfilter	Schleicher & Schuell
Frischhaltefolie	Haushaltsware
Gefrierbeutel	Melitta
Glasfaserfilter	Schleicher & Schuell
Glaswaren	Schott
Multipipette	Eppendorf
Nitrilhandschuhe	Ansell
Parafilm	American National Can.
Petrischalen	Greiner
Plastikpipettenspitzen	Brand, Eppendorf
Plastikreaktionsgefäße	Brand, Eppendorf
Sterilfilter	Schleicher & Schuell
Zentrifugenröhrchen	Beckmann

2.18 Medien

LB-Medium
 10 g NaCl
 10 g Select Peptone 140 (Casein Hydrolysat)
 5 g Select Yeast Extract
 Zugabe von 1 l deionisiertem Wasser

2x YT-Medium
 5 g NaCl
 16 g Select Peptone 140 (Casein Hydrolysat)
 10 g Select Yeast Extract
 Zugabe von 1 l deionisiertem Wasser

Das verwendete Antibiotikum war Ampicillin oder Carbenicillin (Sigma), welches den Medien nach dem Autoklavieren in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben wurde.

Agarplatten mit LB-Medium und Ampicillin/ Carbenicillin:

Zu dem entsprechenden Medium wurde zusätzlich 15 g Select Agar (Bacto Agar) gegeben und verrührt. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 1ml Ampicillin oder Carbenicillin (50 mg/ml) zugesetzt.

NYZ-Medium
 10 g NZ Amin (Casein Hydrolysat)
 5 g NaCl
 5 g Select Yeast Extract
 mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
 Zugabe von 1 l deionisiertem Wasser

NYZ⁺
 für 10 ml NYZ-Medium:
 125 µl 1 M MgCl
 125 µl 1 M MgSO₄
 100 µl 20% Glucose

Eiablageplatten
 30 g Agar in 1 l H₂O lösen
 33 g Saccharose in 330 ml Apfelsaft lösen
 nach Abkühlung Vereinigung der Lösungen
 und ausplattieren in Petrischalen

2.19 SDS- Polyacrylamidgele

Angegebene Mengen reichen jeweils für zwei kleine Gele :

Trenngellösungen	12,5%ig	10%ig
Acrylamid/Bisacrylamis (29:1)	6,25 ml	5,0 ml
1,88 M Tris pH 8,8	3,0 ml	3,0 ml
0,5% SDS	3,0 ml	3,0 ml
H ₂ O	2,75 ml	4,0 ml
APS 10%ig	75 µl	75 µl
TEMED	12,5 µl	12,5 µl

Sammelgellösungen	12,5%ig
Acrylamid/Bisacrylamis (29:1)	2,0 ml
0,625 M Tris pH 6,8	2,4 ml
0,5% SDS	2,4 ml
H ₂ O	5,2 ml
APS 10%ig	70 µl
TEMED	12 µl

2.20 Lösungen

0,25 N HCl (für Southern Blotting)	20,8 ml HCl konz. in 1 l H ₂ O
10x TBE	151,4 g TRIS base 77,3 g Borsäure 23,3 g EDTA in 2,5 l H ₂ O lösen
1M Tris-HCl	121,1 g TRIS base Zugabe von 800 ml H ₂ O pH einstellen auf 8,0 auffüllen mit H ₂ O auf 1 l
20x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g NaCitrat pH einstellen auf 7,0 mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
20x SSPE (pH 7,4)	175,3 g NaCl 27,6 g NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O 7,4 g EDTA pH einstellen auf 7,4 auffüllen mit H ₂ O zu 1 l
Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)	192 ml Chloroform 8 ml Isoamylalkohol
Denaturierungslösung (für Southern Blotting)	1,5 M NaCl / 0,5 N NaOH 40 g NaOH 175,2 g NaCl lösen in 2 l H ₂ O
GTE- Puffer	20 ml 0,5 M Glucose 10 ml 0,2 M EDTA 5 ml 1M Tris- Cl (8,0) auffüllen mit H ₂ O zu 200 ml

HCl-Lösung (für Einbaunachweis)	1 N HCl / 10 mM NaPP _i 21,5 ml HCl konz. 12,5 ml 200 mM NaPP _i mit H ₂ O auf 250 ml auffüllen
Kalium-Acetat 8 M	235,5 g Kaliumacetat mit H ₂ O auf 300 ml auffüllen
Kalium-Acetat Lösung für Miniprep (100ml)	37,5 ml KAcetat 8 M 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H ₂ O
Natrium-Acetat 3 M	40,82 g Natriumacetat lösen in 60 ml H ₂ O
10 x PBS	75,97 g NaCl 12,46 g Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat) 4,68 g NaH ₂ PO ₄ (Dihydrat) Zugabe von 500 ml H ₂ O pH einstellen auf 7,4 auffüllen mit H ₂ O auf 1 l
3,5% PCA/ 100 mM NaPP _i	11,15 g Na ₄ P ₂ O ₇ + 10 H ₂ O 12,5 ml 70% PCA mit H ₂ O auf 250 ml auffüllen
Southern Filter Waschpuffer	0,2x SSC / 0,1x SDS 20 ml 20x SSC 10 ml 20% SDS mit H ₂ O auffüllen auf 2 l
Southern Hybridisierungspuffer	200 ml deion. Formamid 50% 20 ml Denhardt (100fach) 100 ml SSPE (20fach) 2 ml SDS (20%) 4 ml denat. DNA 40 g Dextransulfat mit H ₂ O auf 400 ml auffüllen
Southern-Neutral (für Southern Blotting)	1 l 1 M Tris (7,5-8,0 pH) 175,2 g NaCl mit H ₂ O auf 2 l auffüllen
TE (pH 8,0)	50 ml 1 M Tris- HCl (pH 8,0) 2 ml 1 M EDTA 948 ml H ₂ O

10x Ligationsbuffer	2,5 ml 1 M Tris. HCL pH 7,6 0,5 ml 1 M DTT 0,4 ml 0,25 M rATP 0,5 ml 1 M MgCl ₂ 250 µl 10 mg/ml BSA 850 µl H ₂ O
1 M EDTA	186,1 g EDTA in 500 ml H ₂ O lösen
Laemmli-Proben-Puffer 4x	10% β-Mercaptoethanol 0,05% Bromphenolblau 12% Glycerin (86%iges); 4% SDS 250 mM Tris-HCl pH 6.8
Western Blot Transferpuffer	25 mM Tris 150 mM Glycin 10% Methanol pH einstellen auf 8,3 mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Blocklösung (Western Blot)	5% Milchpulver (fettfrei) in TBST lösen und durch Filter filtrieren
TBST 10x	100 mM Tris 1,5 M NaCl 0,5% Tween 20 pH einstellen auf 7,6
SDS-Gel-Laufpuffer 5x	30 g Tris-HCl 144 g Glycin 5 g SDS pH einstellen auf 8,9 mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
Stoppuffer 5x	15% Ficoll 5% SDS 0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylencyanol
Denhardt 100x	2% Ficoll 2% Polyvinylpyrrolidon (PG350) 2% BSA

Homogenisierungspuffer	1 ml 5 M NaCl 2,5 ml 2 M Tris HCl pH 8,0 10 ml 0,25 M EDTA 1,25 µl 20% SDS mit H ₂ O auffüllen auf 50 ml vor Gebrauch Zugabe von: 5,5 µl/ ml RNase A (10 mg/ ml) 20 µl/ ml Protease K (10 mg/ ml)
Squishing Buffer (single-fly PCR)	2 ml 0,5 M Tris HCl pH 8,3 0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 1 ml 2,5 M NaCl mit H ₂ O auffüllen auf 100 ml vor Gebrauch Zugabe von: 20 µl Proteinase K (10 µg/ ml)
alkalische SDS-Lösung	500 µl 5 N NaOH 9,1 ml H ₂ O 400 µl 20% SDS
4% Paraformaldehyd	2 g Paraformaldehyd in 17,5 ml H ₂ O (60 ⁰ C) lösen mit 1 N NaOH klären 20 ml 1/15 M NaHPO ₄ /H ₂ O mit 1/15 M KHPO ₄ pH auf 7,4 einstellen
Injektionspuffer	5 mM KCl 0,1 mM NaPO ₄
Injektionslösung	60 µg Transformationsvektor 20 µg Helferplasmid: pUCHsp?2-3 in 100 µl Injektionspuffer

3 Methoden

3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Die genomische DNA von jeweils ca. 50 adulten Fliegen wurde nach folgendem Schema isoliert:

1. Homogenisierung der Fliegen in 500 μ l Homogenisierungspuffer mittels eines eingeschliffenen Glaspotters bzw. motorgetriebenen Teflonstößels
2. Inkubation des Homogenisats bei 68° C für 30 Minuten
3. Fällung (Protein/SDS) durch Kaliumacetat 8 M
4. Ethanol-fällung der DNA
5. RNase-Verdau für 10 Minuten bei 37° C
6. Natriumacetat-Endkonzentration einstellen auf 0,3 M und anschließende Phenolisierung
7. Ethanol-fällung der DNA
8. Resuspendieren in 50 μ l TE

Bei der Isolierung der genomischen DNA gilt die Näherung: 50 Fliegen = ca. 15 μ g gDNA

3.1.2 Verdau der genomischen DNA

Die gewonnene genomische DNA wurde je nach Experiment mit den jeweiligen Restriktionsenzymen nach folgendem Muster verdaut. Im Allgemeinen gilt, pro μ g DNA 5 Units des Enzyms, wobei der Anteil des Enzyms am Gesamtvolumen 10% nicht übersteigen soll.

15 μ l gDNA (d.h. ca. 10 ng)
2 μ l Restriktionsenzym
2 μ l jeweiliger Buffer
1 μ l H₂O
20 μ l Verdauansatz für 2h bei 37° C inkubiert

Nach dem Verdau können ca. 7 μ l entnommen werden für den Auftrag auf ein Testgel.

3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.1.3.1 Alkalische Plasmid-DNA-Minipräparation

Zur analytischen Untersuchung der aufgenommenen Plasmid-DNA wurde eine alkalische Minipräparation durchgeführt (Birnbiom und Doly, 1979).

Dazu wurde am Vortag eine 3 ml LB + Antibiotika Lösung mit den Bakterien angeimpft.

1. Abzentrifugation der Übernachtskultur
2. Resuspendieren der Bakterien in 100 µl GTE Puffer (vortexen)
3. Zugabe von 200 µl alkalischer-SDS-Lösung, invertieren und 3 Minuten Inkubation auf Eis
4. Zugabe von 150 µl Acetat-Lösung, vortexen und 5 Minuten Inkubation auf Eis
5. Zentrifugation und Überführung des Überstandes in neues Eppendorfgefäß (EG)
6. Zugabe von 1 ml Ethanol (100%), 5 Minuten Inkubation
7. Zentrifugation und Waschen der DNA mit 500 µl Ethanol (70%)
8. Resuspendieren des Pellets in 50 µl TE pH 8,0

3.1.3.2 Plasmid-DNA-Minipräparation mit QIAprep Spin Miniprep

Die Isolation der DNA folgte den Angaben des Herstellerprotokolls, jedoch wurde auf den optionalen Schritt verzichtet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch die Säule Proteine und RNA als kontaminierende Faktoren eliminiert werden. Die DNA kann direkt einer Sequenzreaktion zugeführt werden.

3.1.3.3 Plasmid-DNA-Midipräparation mit QIAGEN Midiprep

Die Isolation der DNA folgte den Angaben des Herstellerprotokolls. Die Bakterien werden aus einer 100-200 ml Übernachtskultur isoliert. Das mit Ethanol gewaschene DNA-Pellet wird an der Luft getrocknet und anschließend in 200 ml dH₂O resuspendiert und kann direkt einer Sequenzreaktion zugeführt werden.

3.1.4 Phenolextraktion der DNA

Um die DNA von Proteinen zu trennen wird eine Phenolextraktion nach folgendem Muster durchgeführt.

1. Volumen der Lösung auffüllen auf 300 µl mit TE und 1/10 Volumen 3 M NaAc
2. Zugabe von 400 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)-Mix
3. Zentrifugation 2 Minuten und Überführung des Überstandes in neues EG
4. Zugabe von 1 ml Ethanol (100%), Fällung bei -20° C mindestens 90 Minuten
5. Zentrifugation und Waschen der DNA mit Ethanol (70%)
6. Resuspendieren der DNA in H₂O oder TE

3.1.5 DNA-Fällung

3.1.5.1 Ethanolfällung

Diese Methode ist besonders geeignet für geringe DNA-Konzentrationen, dabei gilt allgemein:

1 Volumen + 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat + 2,5 Volumen Ethanol (100%)

1. Pipettieren der Lösung nach oben beschriebenen Muster
2. Fällung der DNA bei -20° C für mindestens 90 Minuten oder über Nacht

3. Zentrifugation für mindestens 15 Minuten, danach Überstand entfernen
4. Waschen der DNA mit 1 Volumen Ethanol (70%)
5. Zentrifugation und Entfernung des Überstandes
6. Lufttrocknung und Resuspendieren der DNA in H₂O oder TE

3.1.5.2 Isopropanolfällung

Diese Methode ist besonders geeignet bei hohem DNA-Anteil mit wenig RNA und Proteinen, dabei gilt allgemein:

1 Volumen + 0,7-0,8 Volumen Isopropanol

1. Pipettieren der Lösung nach oben beschriebenen Muster
2. Fällung der DNA bei RT für mindestens 10 Minuten
3. Zentrifugation für 30 Minuten, danach Überstand entfernen
4. Waschen der DNA mit 1 Volumen Ethanol (70%)
5. Zentrifugation und Entfernung des Überstandes
6. Lufttrocknung und Resuspendieren der DNA in H₂O oder TE

3.1.6 Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und so analytische Aussagen treffen zu können wurde das Verfahren der Gelelektrophorese angewandt. Die Konzentration der Gele variierte zwischen 0,8 und 1% und dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 10 und 1kb. Dabei wurde die jeweilige Menge Agarose (2g für ein 200 ml großes Gel) in TBE- oder TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Nach der Abkühlung auf 60° C wird dem Gel die jeweilige Menge Ethidiumbromid (10mg/ml) zugegeben. Dabei gilt für ein kleines Gel (60 ml) 3 µl und für ein großes Gel (200 ml) die Menge 15 µl. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wird der Gelschlitten in die mit TBE oder TAE gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Das Gel wurde bei einer Spannung von 20 bis 150 V die entsprechende Zeit laufen gelassen.

3.1.7 Gelaufreinigung

DNA-Fragmente, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, können durch diese Methode wieder aus dem Gel eluiert werden. Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe des QIAquick Gelextraction Kit. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt, lediglich der optionale Schritt wurde umgangen und die DNA in 30 µl dH₂O aufgelöst.

3.1.8 PCR-Aufreinigung

PCR-Fragmente können durch diese Methode aufgereinigt werden und weiterführenden Schritten zugeführt werden. Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit. Dabei wurden die Angaben des Herstellers befolgt, lediglich der optionale Schritt wurde umgangen und die DNA in 30 µl dH₂O aufgelöst.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der Ligation können DNA-Fragmente in Vektoren ligiert oder im besonderen Fall selbstligiert werden. Dabei wurden ca. 50 ng der Vektoren-DNA und ein ca. dreifacher molarer Überschuss an Insert-DNA verwendet. Ein Ligationsansatz enthielt allgemein:

linearer Vektor
Insert-DNA
2 µl 10x Ligationspuffer
1 µl T4 Ligase
20 µl Gesamtvolumen

3.1.10 Transformation

Die verwendeten kompetenten *E.coli*-Zellen wurden nach der von Niklaus Walter (1991) beschriebenen Methode in „Site-selected P element mutagenesis“ Methods-Booklet hergestellt.

3.1.10.1 Transformation in elektrokompetente Zellen

Die Vorgehensweise bei der Elektro-Transformation folgt dem oben erwähnten Methods-Booklet bei einem Puls von 1800 V. Dabei wurde 1-2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes zu den Zellen in die Elektroporations-Küvette überführt. Nach der Entladungszeit wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen bei 37° C für ca. eine Stunde inkubiert. Danach wurden die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Carbenicillin oder Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

3.1.10.2 Transformation in hitzekompetente Zellen

Es wurde 1-5 µl des jeweiligen Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock (90 Sekunden bei 42° C) und eine sofortige Inkubation auf Eis für ca. 2 Minuten. Nach einer Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37° C gehalten und danach auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Carbenicillin oder Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

3.1.11 DNA-Konzentrationsbestimmung

Gewonnene DNA wurde 1:50 verdünnt (8 µl H₂O und 2 µl der Probe) und mit dem Eppendorf Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Als Referenzprobe wurde dabei 100 µl H₂O verwendet.

Die Umrechnung des gemessenen OD-Wertes auf die Konzentration der Probe erfolgte nach folgender Formel:

$$c = \text{Abs.-Wert} * 50df * 50 \text{ [} \mu\text{g/ml]}$$

50 df = verwendeter Verdünnungsfaktor
 50 µg/ml, dieser Wert gilt für Doppelstrang-DNA;
 für Einzelstrang-DNA muss 33 µg/ml eingesetzt werden

3.2 Southern Blot

Die Methode beruht auf dem von Edwin Southern entwickelten Verfahren. Durch sie ist es möglich Einzelstrang-DNA auf eine Nylonmembran zu transferieren und durch eine hergestellte Sonde spezifische DNA-Fragmente zu detektieren. Im konkreten Fall ist es möglich durch eine Sonde aus dem *Synapsin*-Lokus die Deletionsgröße der verschiedenen Deletionsmutanten abzuschätzen.

Das Verfahren des Southern Blots ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

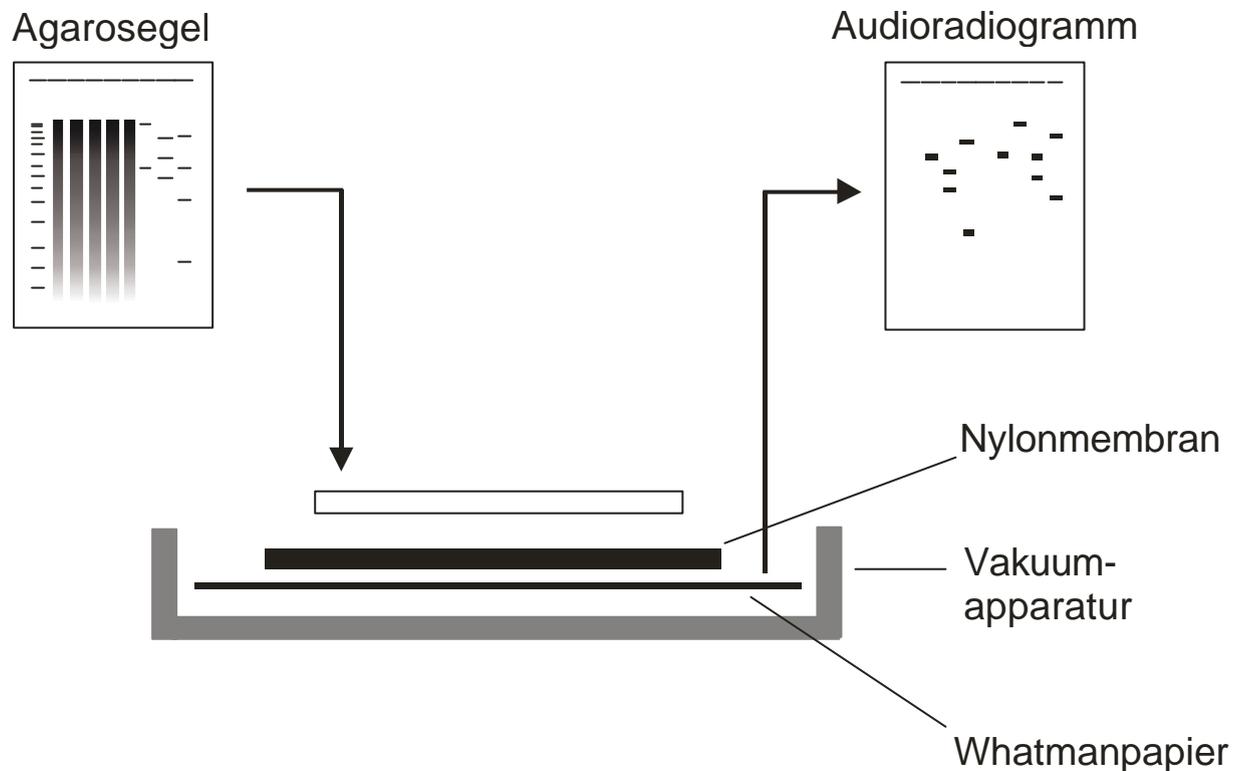


Abbildung 3.1: Verfahren des Southern Blots.

Eine Agarosegel mit einem genomischen DNA-Verdau und einem Verdau von Plasmid-DNA wird einem Vakuum-Blotting unterzogen. Die DNA wird auf eine Nylonmembran transferiert und kann mit spezifischen radioaktiven Sonden sichtbar gemacht werden.

3.2.1 Southern Blotting

Die DNA wurde durch Vakuumblotting bei ca. 55 mbar auf eine Nylon-Membran transferiert. Dabei erfolgten die ersten drei Schritte für jeweils 12 Minuten mit den folgenden Lösungen:

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1. Schritt: Depurinierung | 0,25 N HCl |
| 2. Schritt: Denaturierung | 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl |
| 3. Schritt: Neutralisierung | 0,5 M Tris, 1,5 M NaCl (pH8) |

Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Gel mit Wasser abgespült um verbliebene Lösungsreste zu entfernen. Die DNA wurde anschließend für mindestens 2 Stunden mit 20x SSC auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die DNA durch UV-crosslinking kovalent mit der Membran verbunden (Autocrosslink im UV-Stratalinker, Stratagene).

3.2.2 Labeln der DNA-Sonden

Die DNA-Sonden für Southern-Blots wurden mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP nach einem modifizierten Protokoll des Multiprime Labeling System (Amersham) markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983).

Dabei wurden 20 bis 100 ng der zu markierenden DNA in 14 μl dH₂O für 10 Minuten bei einer Temperatur von 100° C denaturiert. Danach wurde die Probe direkt für 1– 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde folgende Reaktion gestartet:

Labeling-Reaktion

- 14,0 μl denat. Probe
- + 5,0 μl Labeling-Puffer
- + 2,5 μl Primer/BSA- Lösung
- + 2,5 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (25 μCi)
- + 0,7 μl Klenow-Polymerase

Diese Reaktion wurde anschließend für 30 bis 40 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Reaktion abgestoppt mit 5 μl 200 mM EDTA und mit 70 μl H₂O aufgefüllt.

Zur Kontrolle des Einbaus erfolgte ein einfacher Nachweis, bei dem 1 μl des Reaktionsansatzes zu 990 μl 3,5% PCA/ 100 mM NaPP_i-Lösung und 10 μl Carrier-DNA gegeben wurde. Die Trennung der nichtinkorporierten Nukleotide von der Sonde erfolgte durch Vakuumfiltration. Dadurch kann die Radioaktivität der Sonde anhand einer Geigerzählermessung des eingesetzten Rundfilters (Glasfaserrundfilter GF52, Schleicher & Schuell) direkt abgeschätzt werden. Eine erfolgreich markierte Sonde wurde vor der Hybridisierung erneut für 10 Minuten bei 100° C denaturiert.

3.2.3 Hybridisierung/ Waschen

Die erhaltenen Blots wurden 2 Stunden bei 42° C in Southern-Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Nach der Zugabe der zuvor denaturierten Sonde wurde der Blot über Nacht bei 42° C hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran viermal für je 20 Minuten bei 68° C mit 0,2x SSC/ 0,1% SDS gewaschen.

3.2.4 Exposition/ Strippen

Die gewaschenen Blots wurden auf einen alten Röntgenfilm gelegt und mit Frischhaltefolie umwickelt. Die Exposition erfolgt auf einem Röntgenfilm bei -80° C für mehrere Tage, je nach Stärke des Signals.

Nach der Detektion kann ein angefertigter Blot weiteren Sonden durch Strippen der Membran zugänglich gemacht werden. Dabei wird der Blot in die Stripp-Lösung gelegt und in der Mikrowelle erhitzt. Danach kann der Blot einer weiteren Hybridisierung zugeführt werden.

3.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die durchgeführten PCR-Reaktionen wurden nach dem folgenden Schema durchgeführt, dabei gab es je nach benutzten Primerpaaren leichte Abänderungen vom Grundplan.

2,5 µl down Primer (20 µM, Ausgangskonzentration)
2,5 µl up Primer (20 µM, Ausgangskonzentration)
5,0 µl 10x PCR Puffer mit MgCl₂
5,0 µl dNTPs (2 µM)
5,0 µl Enhancer Solution
2 bis 5 µl DNA template
0,5µl Taq DNA Polymerase
x µl bidest.H₂O (Gesamtvolumen 50µl)

Die Reaktion wurde danach mit 50 µl Mineralöl überschichtet, falls die Reaktion im Hybaid Thermocycler durchgeführt wurde. Für den Eppendorf-Gradienten-Thermocycler mit Deckelheizung ist diese Überschichtung nicht nötig.

Die Inkubation erfolgte unter folgendem Programm:

- a) 94° C für 2 Minuten
- b) 30 Zyklen: 94° C für 30 Sekunden
50° C bis 56° C für 30 Sekunden
72° C für 1- 4 Minuten (1Minute = 1 kb)
- c) 72° C für 3 Minuten

3.4 Single-fly PCR

Die Methode beruht auf dem Protokoll aus dem Davis Labor und wurde wie folgt durchgeführt:

1. Fliege in ein 0,5 ml EG überführen
2. In eine Pipette 50 µl des Squishing Buffers aufnehmen und damit die Fliege homogenisieren ohne Flüssigkeit abzugeben
3. Zugabe der 50 µl SB-Lösung aus der Pipette
4. Inkubation bei 37° C für mindestens 30 Minuten
5. Inaktivierung der Proteinase K bei 95° C für 1-2 Minuten
6. Zentrifugation für 5 Minuten
7. Lagerung der Probe bei 4° C über mehrere Monate möglich

Aus dem so gewonnenen Ansatz wurden jeweils ca. 8 µl der DNA als template verwendet nach dem im Punkt 3.3 dargestelltem Muster.

3.5 Sequenzierungen

Die jeweiligen Proben wurden mit dem ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit sequenziert. Dieser Kit benutzt markierte Dideoxy-Nukleotide als Terminatoren, dadurch kommt es zu kontrollierten Abbrüchen in der DNA-

Synthese. Ein spezielles Sequenzierungssystem ist dann in der Lage die Sequenz der Probe auszuwerten.

Die Sequenzreaktion erfolgt in einem Thermocycler und beinhaltet folgende Komponenten:

2,0 μ l *Big Dye*
4,5 μ l Primer 2 μ M
370 ng DNA template
mit H₂O auffüllen auf 10 μ l Gesamtvolumen

Die Reaktion läuft nach folgenden Zyklen ab:

25 Zyklen von je: 96° C für 15 Sekunden
 50° C für 1 Sekunde
 60° C für 4 Minuten

Die Reaktion wurde dann dem Protokoll der ABI PRISMTM Ethanolfällung folgend aufbereitet und danach durch den ABI 310 analysiert.

3.6 Western Blot

3.6.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Mit dieser Methode ist man in der Lage Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dabei werden die Proteine durch die Substanzen des Probepuffers denaturiert, so dass im Gel eine umgekehrte Proportionalität der Laufweite mit dem Logarithmus des Molekulargewichtes besteht.

Die PAGE besteht aus zwei getrennt voneinander gegossenen Gelen (Sammel- und Trenngel), die zwischen den Raum zweier Glasplatten pipettiert wurden. Nach dem Auspolymerisieren der Lösungen wurden die Glasplatten vertikal in eine Elektrophoresekammer gespannt. Die Kammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Die vorbehandelten Proben konnten nun in die Spuren aufgetragen werden und das Gel unter Wasserkühlung bei einer Stromstärke von 35 mA laufen gelassen werden (2 kleine Gele = 70 mA).

Nachdem die Bromphenolblaufront des Probepuffers das Gel verlässt wird der Lauf gestoppt und die Methode des Western Blottings zugeführt.

3.6.2 Western Blotting

Bei dieser Methode werden die Proteine aus einem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wodurch sie einem Nachweis durch spezifische Antikörper zugänglich werden (Kyhse-Anderson, 1984). Der Transfer folgt dem Semi-Dry-Elektroblotting-Verfahren in einer Fastblotkammer von Biometra.

Die Methode des Western Blot ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

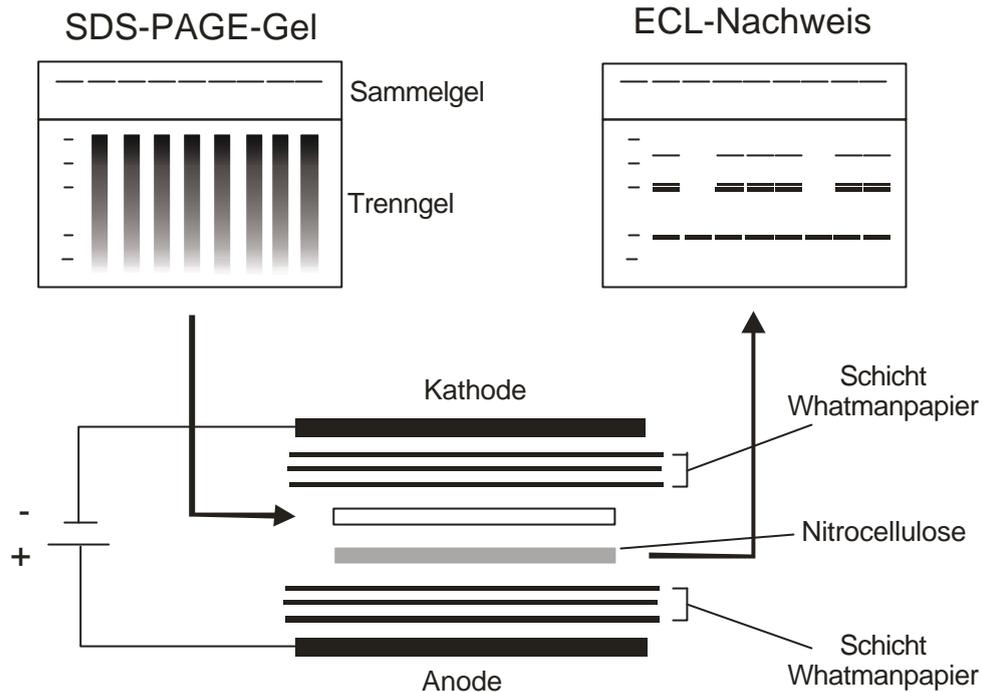


Abbildung 3.2: Verfahren des Western Blots.

Ein Polyacrylamidgel mit aufgetrennten Proteinproben wird oberhalb einer Nitrocellulosemembran positioniert. Eine Schicht von Whatmanpapier deckt beides ab. Der Stapel wird einem homogenen elektrischen Feld ausgesetzt. Die Nylonmembran kann dann nach Bindung der spezifischen Antikörper dem ECL-Nachweis unterzogen werden.

3.6.3 Antikörper-Inkubation/ ECL-Reaktion

Der Western Blot wird in einer 5%igen Milchlösung über Nacht bei 4° C geblockt, wodurch die unspezifischen Bindungen gesättigt werden.

Die Membran wird anschließend dreimal für je 10 Minuten in 1x TBST gewaschen und danach mit dem 1. Antikörper bei RT ca. eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Waschen des Blots in TBST erfolgt die Inkubation mit dem 2. Antikörper (z.B. Anti-Mouse IgG) für ebenfalls eine Stunde bei RT. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wird nach nochmaligem Waschen des Blots ECL-Reaktion gestartet.

Die im ECL-Kit enthaltenen Reagenzien werden im Verhältnis 1:1 gemischt und können durch die am sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase in einer Oxidationsreaktion zur Abgabe von Licht angeregt werden. Diese Lichtemission kann auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

3.7 In-vitro-Mutagenese

Die In-vitro-Mutagenese folgt den Angaben des Herstellers im Protokoll des QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene.

Die Primer wurden nach den Angaben des Herstellers selbst ausgewählt und besaßen mindestens eine Länge von 25 bis 30 Basen, ihre Schmelztemperatur lag oberhalb von 78° C.

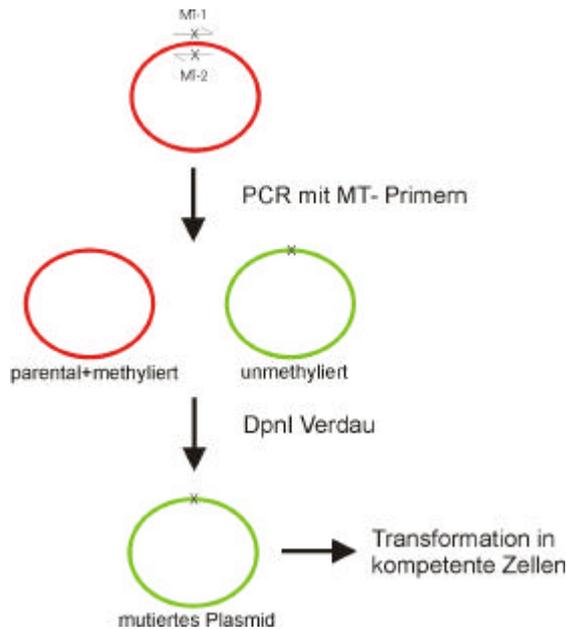


Abbildung 3.3:
Schema der In-Vitro-Mutagenese.
Ausgehend von dem zu mutierenden Plasmid wird eine PCR durchgeführt mit Primern, welche in ihrer Basenabfolge die Mutation beinhalten. Das erhaltene PCR-Produkt wird anschließend mit DpnI verdaut, wobei nur der parentale methylierte Doppelstrang abgebaut wird. Das neu synthetisierte Plasmid kann nach dem Verdau durch Transformation, z.B. in XL1-Blue Zellen vermehrt werden.

3.8 Inverse PCR

Die Methode folgt den im „Material und Methoden“-Teil des Papers „An Inverse PCR Screen for the Detection of P-Element Insertions in Cloned Genomic Intervals in *Drosophila melanogaster*“ von Dalby et al. (1995).

Dabei wurden die verwendeten Primer dem pUAST-Vektor angepasst (Lage: siehe Anhang) und die einzelnen Schritte vereinzelt modifiziert.

1. genomische DNA der jeweiligen Fliegenlinie wurde nach der Methode im Punkt 3.1.1 bzw. mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit von QIAGEN isoliert
2. Verdau von insgesamt 30 μl der DNA mit den Enzymen HaeIII und HpaII in einem 50 μl Ansatz
3. Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65° C für 20 Minuten
4. Ligation unter Bedingungen, welche die Selbstligation der DNA fördert

50 μl Verdau
40 μl Ligasebuffer (10x)
6 μl T4-Ligase
304 μl dH₂O
400 μl Volumen

Die Ligation wurde für 16 Stunden bei 18° C durchgeführt.

5. Aufbereitung der DNA mittels Phenolisierung und Ethanol-fällung, resuspendieren der DNA in 100 μl dH₂O
6. Durchführung der Inversen PCR mit 20 μl DNA als Template, wie in Paragraph 3.3 ausgeführt
7. Gelauftrag der Proben und anschließende Gelaufreinigung des Amplifikats laut Protokoll des QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN (3.1.6)

- Bestimmung des DNA-Gehalts und anschließende Sequenzierung des Produkts mit dem jeweiligen Primer

Die erhaltene Sequenz beinhaltet DNA aus dem direkt angrenzenden Bereich der Insertion. Durch Vergleich mit den Datenbanken kann so die genaue Lage der Insertion lokalisiert werden.

In der folgenden Abbildung ist die Methode schematisch dargestellt.

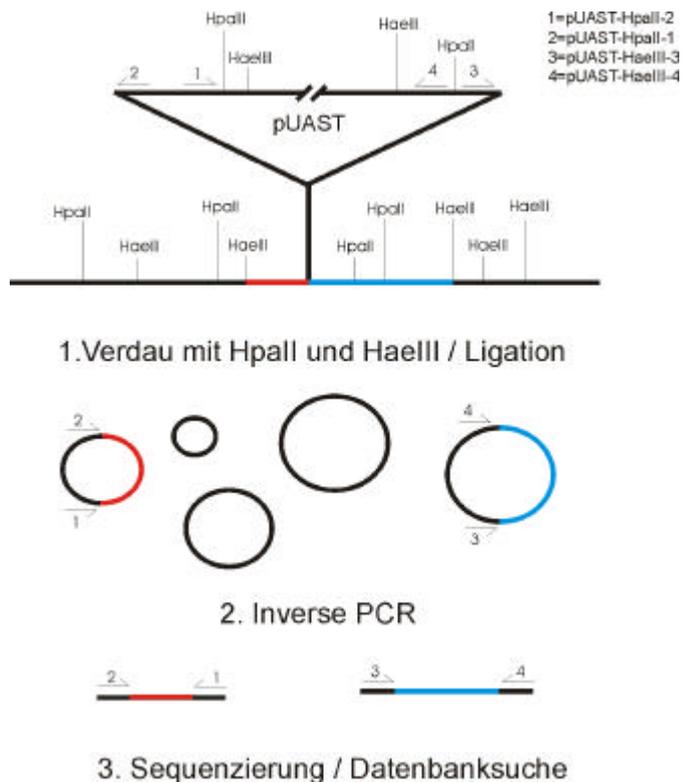


Abbildung 3.4:
Schema der Inversen-PCR am pUAST-Vektor .

Die genomische DNA der zu untersuchenden Fliege wird mit den Enzymen HpaII und HaeIII in getrennten Ansätzen verdaut. Anschließend erfolgt eine Selbstligation der Fragmente. Die Produkte dieser Ligation stehen dann als Ausgangstemplate für eine PCR mit den jeweiligen Primern zur Verfügung. Erhaltene PCR-Produkte können dann mit den Primern ansequenziert und einer Datenbankanalyse zugeführt werden.

3.9 Methoden auf RNA-Ebene

3.9.1 Totale RNA Isolation

Die Methode diente als erster Schritt zur Gewinnung der poly A⁺ mRNA aus Fliegen. Dabei wurden die folgenden Schritte bei 4° C durchgeführt:

- Homogenisation von 100 Fliegen mit 1 ml TRIzol Reagenz
- Inkubation für 5 Minuten bei RT
- Zugabe von 200 µl Chloroform
- Zentrifugation (12,000g) und Abnahme der oberen Phase
- Isopropanolfällung
- Zentrifugation (12,000g) mit anschließendem Waschen des Pellets
- Resuspendieren in 100 µl DEPC-Wasser

3.9.2 mRNA Isolation

Aus der gewonnenen totalen RNA wurde mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kit von QIAGEN die mRNA isoliert. Die Vorgehensweise folgt den Angaben des Herstellerprotokolls. Es wurden ca. 250 µg totale RNA eingesetzt und die isolierte mRNA in 10 µl H₂O resuspendiert.

3.9.3 Reverse Transkription

Die Methode dient dem Umschreiben der mRNA in eine einzelsträngige cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase von QIAGEN.

Ansatz:

x µl template mRNA (300 ng)
2 µl 10x Rev.Transk. Buffer
2 µl dNTPs (20 µM)
2 µl Oligo T- Primer (10 µM)
0,4 µl RNase Inhibitor (10U)
1 µl Omniscript Reverse Transcriptase
add. H₂O (RNase frei) zu 20 µl

Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei 37° C, danach wurde das Enzym inaktiviert durch eine Inkubation bei 93° C für 5 Minuten.

Die so erhaltene cDNA kann nun als Ausgangstemplate für eine PCR mit *Synapsin*-spezifischen Primern dienen.

3.10 Keimbahntransformation

Um ein transposables Element in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* zu inserieren wurde eine Keimbahntransformation durchgeführt. Dazu wurden Fliegen des Stammes *w¹¹¹⁸* verbreitert und ca. 3 Tage alte Fliegen zur Eiablage verwendet. Die Eiablageplatten wurden mit einem Pinselstrich Hefe versehen und die Fliegen für 30 bis 60 Minuten auf diese Platten gesetzt. Die Vorablage wurde verworfen und danach die Fliegen auf neue Ablageplatten transferiert. Mit den Eiern wurde sofort weitergearbeitet, da die Eier für die Injektion nicht älter als 90 Minuten sein sollten.

Eventuelle Hefeanhaftungen wurden von den Eiern durch Wasser entfernt. Das Chorion wurde durch eine 90 sekundige Überschichtung der Eier mit 7% Na-Hypochlorid Lösung entfernt. Danach wurden die Embryonen auf ein Gitternetz zur Aufreihung überführt, dabei achtet man auf eine einheitliche Ausrichtung der posterioren Pole. Die aufgereihten Eier können auf einen beschichteten Objektträger überführt werden (n-Heptan) und stehen nach der Trocknung des Klebers (20 bis 30 Minuten in einer Trockenkammer) nun für die Injektion zur Verfügung.

Dazu wurden die Embryonen mit Öl überschichtet und auf dem Mikroskopisch so ausgerichtet, dass die posterioren Pole in Richtung der Injektionsnadel (ausgezogene Bor-silikat-Glaskapillare) zeigen. Die Injektion erfolgt nur in Embryonen, welche noch keine Polzellen ausgebildet haben, dabei wurde darauf geachtet, dass nur eine geringe Menge Flüssigkeit in die Eier transferiert wurde. Injizierte Embryonen wurden danach in einer 18° C

Feuchtekammer gehalten bis die Larven schlüpften. Diese wurden auf Breigläser transferiert und bei 25° C gehalten.

Entwickelte Fliegen wurden mit drei Fliegen des Ausgangsstammes gekreuzt und die Nachkommenschaft auf das Auftreten des veränderten Augenphänotyps untersucht. Pigmentierte Fliegen wurden zur Verbreiterung mit dem Ausgangsstamm gekreuzt.

4 Ergebnisse

4.1 Molekulare Charakterisierung des *Synapsin* Lokus

4.1.1 Untersuchung der Deletionsbruchpunkte in regulatorischen Mutanten von *Synapsin*

Bei der in der Einleitung erwähnten Jump-out Mutagenese waren von T.A. Godenschwege neben Nullmutanten auch mehrere regulatorische Mutanten isoliert und untersucht worden (Dissertation T.A. Godenschwege, 1999). Als Ausgangsstamm der Mutagenese diente die Linie *Syn*^{P1+P2} in der ein P-Element im regulatorischen Bereich des Gens und ein weiteres im 9. Intron inseriert ist (siehe Abb. 1.6). Identifiziert wurden die Mutanten durch ihre veränderte Augenfarbe und ihre Auffälligkeit in der Färbung auf immunhistochemischen Gehirnschnitten. Im Einzelnen waren dies unter anderem die Mutanten *Syn*⁹⁷, *Syn*¹⁴³, *Syn*¹⁶⁸, *Syn*¹⁷⁸, *Syn*³²⁵ (*Syn*⁷⁹). Die ungefähre Größe der Deletionen in den einzelnen Linie wurde mit Southern Blot über den betreffenden Bereich bestimmt, wobei als Hybridisierungsprobe ein 3,8 kb großes SstI-SstI Fragment diente, welches den Bereich unmittelbar um das erste P-Element abdeckt (siehe Abb.1.6). Um einen ersten Einblick in regulatorische Mechanismen des *Synapsin* Gens zu bekommen, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Deletionen durch Sequenzierungen exakt kartiert. Hierzu wurde als erstes die genaue Lage des pLacW-Elementes durch einen Plasmid Rescue verifiziert.

Der Vektor pLacW im regulatorischen Bereich von *Synapsin* besitzt einen origin of replication und eine Antibiotika-Resistenz und kann damit für einen Plasmid Rescue verwendet werden. Hierbei ist es möglich mit einem EcoRI-Verdau die an das 3'-Ende des P-Elementes angrenzende genomische Sequenz zu erhalten und mit einem XbaI-Rescue den an das 5'-Ende anschließenden Bereich. Das EcoRI-Rescue Fragment besaß eine Größe von ca. 11 kb, das XbaI-Rescue Fragment, das sich über die gesamte Länge des Vektors erstreckt, war ca. 13 kb groß. Beide Banden entsprechen den erwarteten Fragmentgrößen. Bei der Sequenzierung zeigte sich die Duplikation von acht Basen, die am Insertionsort eines transposablen Elementes zu erwarten ist. Ein Sequenzvergleich mit der Datenbank von *Drosophila melanogaster* legte die Insertion im Klon AE003686 des B.D.G.P. auf die Position 28975 fest. Die Ergebnisse der Plasmid Rescues sind in der folgenden Graphik dargestellt.

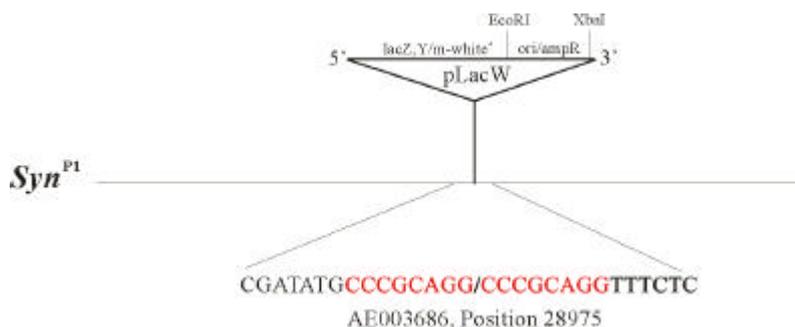


Abbildung 4.1:
Darstellung der Lage des pLacW-Elementes in der Linie *Syn*^{P1}. Abgebildet ist die angrenzende Sequenz um die Insertion des Vektors. (rot= 8bp Duplikation; die Positionsangabe bezieht sich auf den Klon AE003686).

Um die Deletionsgröße in den Fliegenlinien zu verifizieren wurden nochmals verschiedene Southern Blots durchgeführt. Für einen Southern Blot wurde genomische DNA der zu untersuchenden Fliegen mit den Restriktionsenzymen Sall und SstI verdaut und mit einem SstI/ SstI-Fragment (3,8 kb) aus der relevanten Region hybridisiert. Dabei fanden sich in den verschiedenen Mutanten Hybridisierungsbanden, die sich von denen des Wildtyp oder der Ausgangslinie *Syn^{P1}* unterschieden. Aufgrund dieser Banden konnten die Bruchpunkte der Deletionen eingegrenzt, sowie die Deletionsgröße ungefähr errechnet werden. Die Daten dieser Deletionskartierung sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst, sie dienen als Grundlage für die Auswahl der Primer für die PCR über die Deletion mit anschließender Sequenzierung des Amplifikats.

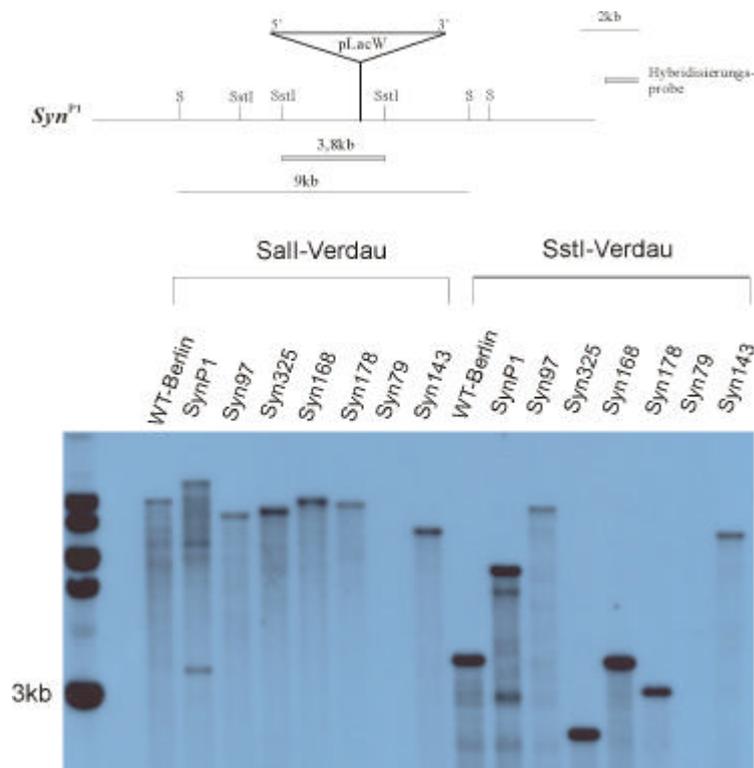


Abbildung 4.2:

Southern Blot zur Bestimmung der Deletionsgröße in verschiedenen regulatorischen *Synapsin* Mutanten. Dargestellt ist der betreffende genomische Bereich mit der Insertion des pLacW-Vektors aufwärts vom ersten *Synapsin* Exon. Als Hybridisierungsprobe diente ein 3,8 kb großes SstI/SstI-Fragment. Genomische DNA der untersuchten Linien wurde mit den Enzymen Sall bzw. SstI verdaut. [S= Sall]

Um die Deletionsbruchpunkte auf die Base genau zu bestimmen, wurden ausgehend von den Ergebnissen der Southern Blot Analyse Primer für eine PCR ausgewählt. Die Primer lagen dabei aufwärts und abwärts der aufgezeigten Deletion. Das PCR-Produkt wurde dann kontinuierlich mit ausgewählten Primern durchsequenziert. Dabei wurden die Deletionsgrößen weitgehend bestätigt, teilweise wurden noch Basen aus dem pLacW-Element in der Sequenz gefunden. Die einzelnen Größen der Deletionen sind in der Tabelle 4.3 zusammengefasst, die Deletionsbruchpunkte sind in der Wildtyp Sequenz im Anhang 9.1 angegeben.

Die nachgewiesenen Deletionen in den Linien *Syn¹⁶⁸*, *Syn¹⁷⁸* und *Syn³²⁵* betreffen nur aufwärts vom ersten Exon des *Synapsin* Gens gelegene Regionen. Eine besonders kleine Deletion liegt sich in der Linie *Syn¹⁶⁸* vor, in der nur 10 Basen unmittelbar abwärts der P-Element Insertion deletiert sind. Eine Überprüfung der Basenabfolge auf bekannte Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren ergab eine mögliche Bindung des Aktivator Protein 1 (AP-1) an die deletierte Sequenz (siehe Abb. 4.4). Interessanter Weise ist die *Synapsin* Expression in dieser Linie offenbar selektiv in der Lamina und distalen Medulla deutlich reduziert (vgl. Abb. 1.6).

In der Linie *Syn*¹⁷⁸ sind 435 Basen aus der 3'-Region um das P-Element durch die Deletion verloren gegangen. Auf immunhistochemischen Schnitten zeigt sich in dieser Linie eine leichte Reduktion der Synapsin Expression im gesamten Gehirn. Eine deutliche Reduzierung der Proteinmenge ergibt sich in der Linie *Syn*³²⁵. Hier kann nur noch ca. 1/3 der Wildtypexpression detektiert werden. Auf genomischer Ebene findet sich in dieser Linie eine Deletion von ca. 1,109 kb, welche zwar kein Exon berührt, jedoch vermutlich regulatorische Bereiche um das pLacW-Element betrifft.

In den beiden anderen Linien *Syn*⁹⁷ und *Syn*¹⁴³ konnte jeweils eine Deletion im upstream Bereich um das P-Element aufgezeigt werden. Dabei sind Bereiche des Promotors, wie auch Abschnitte des ersten Exons des *Synapsin* Gens betroffen. Auf Schnitten und Western Blots ist in diesen Linien keine Expression nachweisbar.

Deletionsmutanten	Deletionsgröße im Southern Blot	Deletionsgröße durch Sequenzierung
<i>Syn</i> ⁹⁷	1,5 kb	1,397 kb
<i>Syn</i> ¹⁴³	3,0 kb	2,944 kb
<i>Syn</i> ¹⁶⁸	0,1 kb	10 bp
<i>Syn</i> ¹⁷⁸	0,5 kb	0,435 kb
<i>Syn</i> ³²⁵	1,2 kb	1,109 kb

Tabelle 4.3:

Gegenüberstellung der Deletionsgrößen, die durch Southern Blot Analyse und durch Sequenzierung von PCR-Produkten ermittelt wurden.

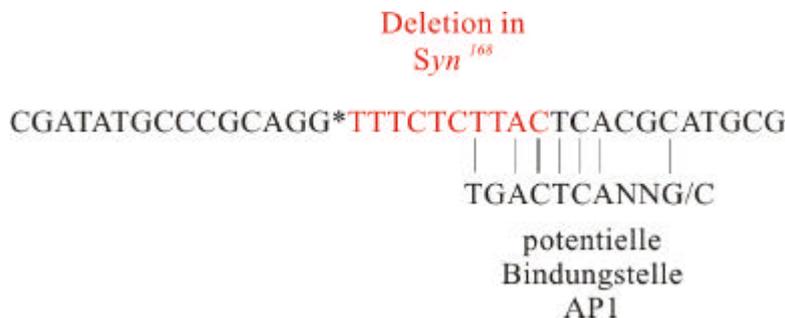


Abbildung 4.4:

Deletion in der regulatorischen Mutante *Syn*¹⁶⁸. Deletiert sind nur 10 Basen die unmittelbar an den P-Element Insertionsort (*) angrenzen. Diese sind Teil einer potentiellen Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP1.

In der Nullmutante *Syn*⁹⁷ zeigte sich innerhalb der Deletion von 1,397 kb eine Abfolge von 11 Basen, welche aus dem Inverted Repeat des P-Elementes stammen könnte. In den anderen Linien wurden unterschiedlich große Basenabfolgen beobachtet, welche wahrscheinlich aus dem Vektor stammen, in *Syn*³²⁵ fanden sich 4 Basen, in der Linie *Syn*¹⁷⁸ wurden zusätzliche 19 Basen im Bereich der Deletion gefunden. *Syn*¹⁴³ enthält 35 Basen aus dem Inverted Repeat, in der Linie *Syn*¹⁶⁸ konnten dagegen keine P-Element Artefakte gefunden werden. Die zusätzlichen Basenabfolgen sind im Anhang 9.1 dargestellt.

4.1.2 Untersuchung der Phosphorylierungsstelle(n) für Ca^{2+} / Calmodulin I/ IV Kinase (CaMK I/ IV) und Protein Kinase A in *Synapsin*

Vertebraten *Synapsin* ist als abundantes synaptisches Phosphoprotein Substrat für mehrere Kinasen, darunter auch die CaMK I/IV und die Protein Kinase A (PKA). Diese Kinasen haben als Zielaminosäure ein Serin in der A-Domäne des *Synapsin* Proteins. Diese Domäne zählt zu den in der Evolution am höchsten konserviertesten Domänen des Proteins. In *Drosophila* überspannt die Phosphorylierungsstelle mit ihrer Konsensussequenz (R-R-F-S) die Exons 4 und 5 des *Synapsin* Gens. Ein Vergleich der von B. Klagges vorgeschlagenen Exon-Intron-Struktur (Klagges et al., 1996) in diesem Bereich mit der postulierten Sequenzabfolge aus dem Berkeley Drosophila Genome Project (Berkeley D.G.P.) ergab in diesem Übergang eine Abweichung. Während in der Berkeley D.G.P. Sequenz die CaMK I/ IV/ PKA-Stelle auf genomischer Ebene nach dem Spleißen unter Wahrung der GT-AG Konsensussequenz aufzufinden ist, ist die Sequenz von B. Klagges nach dem dort vorgeschlagenen nicht-kanonischen Spleißen im zweiten Codon verändert, so dass ein Austausch der Aminosäure Arginin zu Glycin erfolgt (siehe Abb. 4.5).

4.1.2.1 Ebene der genomischen DNA

Zur Überprüfung der genomischen Sequenz in dieser Region wurden die etablierten Wildtypen im Labor untersucht. Dazu wurde eine PCR mit den Primern WT-syndown und WT-synup durchgeführt und das erhaltene Produkt sequenziert.

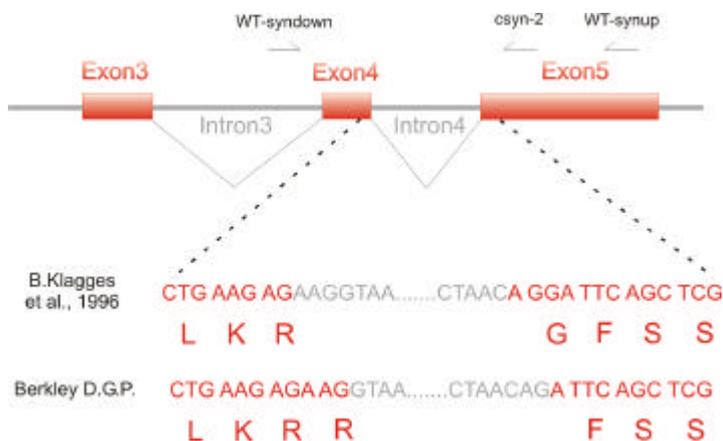


Abbildung 4.5:

Darstellung der CaMK I/ IV/ PKA-Stelle in der Region des Exon 4 und Exon 5 von *Synapsin*. Aufgezeigt sind die Exon/Intron Struktur, sowie die verwendeten Primer für die Amplifikation des betreffenden Bereiches. Im unteren Abschnitt befindet sich eine Gegenüberstellung der Sequenzen von B. Klagges und des Berkeley D.G.P.. Angegeben ist die resultierende Aminosäure-abfolge im Protein.

Die PCR mit den Wildtypen ergab eine Bande bei ca. 600 Basenpaaren, die mit den Primern WT-syndown und csyn-2 sequenziert wurde. Die Auswertung bestätigte in allen Linien die Sequenz des Berkeley D.G.P.. Dabei wurden nur im Intronabschnitt vereinzelte Basenaustausche gefunden. Es konnten ebenso die 5'- und 3'-Introngrenzen des vierten Introns mit der Exon-Intron-Grenzregel (GT-AG-Regel) in Einklang gebracht werden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt die folgende Abbildung.

Berkeley D.G.P.	CTG AAG AGA AGGTAA.....CTAACAGA TTC AGC TCG
Wildtyp Berlin	CTG AAG AGA AGGTAA.....CTAACAGA TTC AGC TCG
CantonS	CTG AAG AGA AGGTAA.....CTAACAGA TTC AGC TCG
WT Lindelbach	CTG AAG AGA AGGTAA.....CTAACAGA TTC AGC TCG
WT Oregon R	CTG AAG AGA AGGTAA.....CTAACAGA TTC AGC TCG
w^{1118}	CTG AAG AGA AGGTAA.....CTAACAGA TTC AGC TCG
	L K R R F S S

Abbildung 4.6:
Gegenüberstellung der genomischen DNA-Sequenz verschiedener Wildtypen im Bereich der N-terminalen PKA-Stelle im *Synapsin*-Lokus und der publizierten Basenabfolge des Berkeley D.G.P.

In allen Labor-Wildtypen fand sich auf der Ebene der genomischen DNA nach kanonischen Spleißen die Konsensussequenz (R-R-X-S) der CaMK I/ IV/ Protein Kinase A zwischen den Exons 4 und 5.

4.1.2.2 Ebene der Ribonukleinsäure

Die Sequenz der genomischen DNA im Bereich der CaMK I/ IV/ PKA-Erkennungsstelle steht somit im Widerspruch zur publizierten Sequenzabfolge der cDNA von *Synapsin* und der N-terminalen Ansequenzierung des Proteins. In der cDNA fanden sich die Codons der Aminosäurenreihenfolge R-G-F-S, im Protein hingegen die Abfolge R/G-G/D-F/L-S/A (siehe Abb. 1.4). Die Sequenz des Proteins ist daher mit der cDNA, nicht jedoch mit der genomischen Sequenz vereinbar. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte eine Modifikation der RNA durch RNA-Editing sein, durch die das Codon für die zweite Aminosäure (Arginin) zu einem Codon für Glycin verändert wird. Zur Klärung dieser Frage wurde eine Untersuchung des relevanten Abschnittes auf der Ebene der Ribonukleinsäure von *Synapsin* durchgeführt.

Dazu wurde aus den Homogenaten mehrerer Fliegenstämme jeweils die totale RNA-Fraktion gewonnen und daraus die mRNA isoliert. Diese diente als Matrix für die Herstellung der cDNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase. Aus der cDNA konnte der relevante Bereich des *Synapsins* durch Amplifikation mit spezifischen Primern gewonnen werden. Ein Schema der Vorgehensweise zeigt die Abbildung 4.7.

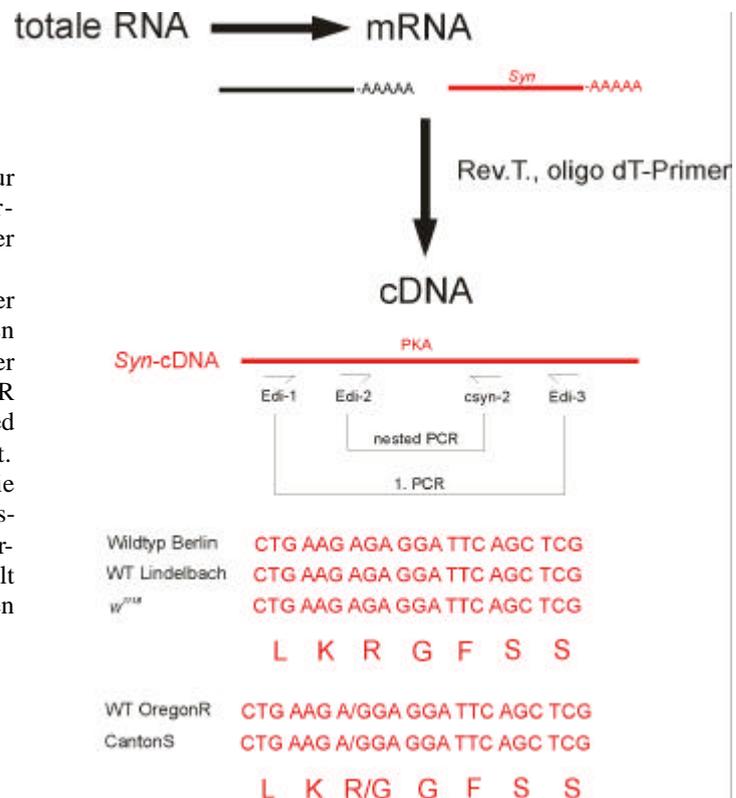
Die erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert. Dabei ergaben sich in den Wildtypen Lindelbach, Berlin und w^{1118} die Codons für die Aminosäurenabfolge R-G-F-S, in den Wildtypen CantonS und OregonR dagegen R/G-G-F-S, so dass hier das erste Arginin-Codon teilweise ebenfalls zu einem Glycin-Codon editiert worden ist. Eine genaue Angabe der aus dem ersten Codon resultierenden Aminosäure ist hier nicht möglich, da an einer Basenposition zwei Peaks in der Sequenzauswertung zu finden sind. So könnte dieses Codon AGA für Arginin oder auch GGA für Glycin lauten. Die zweite Aminosäure in der Konsensussequenz ist aber, wie bei den anderen Wildtypen, ein Glycin, so dass hier ebenfalls mindestens ein Editing vorliegt, eventuell sogar ein Zweites. Die Ergebnisse der RNA-Untersuchung in den verschiedenen Labor-Wildtypen sind in der Abbildung 4.7 dargestellt.

Abbildung 4.7:

Schematische Darstellung zur Überprüfung der PKA-Erkennungsstelle auf der Ebene der Ribonukleinsäure.

Dargestellt ist die Gewinnung der cDNA ausgehend von der totalen RNA. Der relevante Bereich der PKA-Stelle wurde durch eine 1.PCR mit einer anschließenden „nested PCR“ amplifiziert und sequenziert. Im unteren Abschnitt sind die Sequenzen im Bereich der Phosphorylierungsstelle für die unterschiedlichen Wildtypen dargestellt mit der daraus resultierenden Aminosäureabfolge.

[Rev.T.= Reverse Transkriptase]



4.1.2.3 Vergleich etablierter Wildtypen zu neu gefangenen *Drosophila* Fliegen

Zur Überprüfung, ob es sich bei der Modifikation der Protein Kinase A Stelle in der A-Domäne von *Synapsin* durch RNA-Editing um eine Art Anpassung an die Lebensumstände unter Laborbedingungen handelt, wurden die Ergebnisse der fünf Laborstämme mit denen von neu eingefangenen *Drosophila melanogaster* Fliegen verglichen. Dazu wurden an verschiedenen Orten Fliegen gefangen und ihre Nachkommen untersucht. Die Spezies Bestimmung erfolgte nach der Anleitung von B. Shorrock (1980; Ashburner, 1989). Im Rahmen dieser Experimente wurde sowohl der genomische Bereich, als auch der betreffende RNA Abschnitt sequenziert und analysiert. Insgesamt wurden vier unabhängige Linien von vier verschiedenen Orten untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.8 dargestellt.

In allen vier neu gefangenen Wildtypen fand sich auf der genomischen DNA Ebene die gleiche Sequenz wie in allen Labor-Wildtypen und bestätigt damit die Richtigkeit der Basenabfolge des Berkeley *Drosophila* Genom Project am Übergang des Exon4 und Exon5 von *Synapsin*. In der RNA ergab sich in den untersuchten Fliegen die gleiche Basenabfolge wie in den Wildtypen WT Berlin, Lindelbach und w¹¹¹⁸. Demnach wird auch hier die erste Base des zweiten Codons der Protein Kinase A Erkennungsstelle editiert durch den Austausch von Adenin zu Guanin. Im ersten Codon findet sich kein Austausch, so dass die Aminosäurereihenfolge in allen neuen Wildtypen Arginin-Glycin-Phenylalanin-Serin lautet.

Somit ließ sich kein Hinweis finden, dass es sich beim Editing der *Synapsin*-RNA um eine Anpassung an die Lebensbedingungen im Labor handelt. Auch neu eingefangene Fliegen zeigen den vollständigen Austausch des zweiten Arginins zu einem Glycin in der PKA-Phosphorylierungsstelle.

	genomische Ebene	RNA Ebene
Labor Wildtypen	CTG AAG AGA AGG TAA CTAACAGA TTC AGC TCG L K R R F S S	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG L K R G F S S oder CTG AAG A/GGA GGA TTC AGC TCG L K R/G G F S S
Schweinfurt	CTG AAG AGA AGG TAA CTAACAGA TTC AGC TCG	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG
BadSalzschlirf	CTG AAG AGA AGG TAA CTAACAGA TTC AGC TCG	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG
Westerwald	CTG AAG AGA AGG TAA CTAACAGA TTC AGC TCG	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG
Fulda	CTG AAG AGA AGG TAA CTAACAGA TTC AGC TCG L K R R F S S	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG L K R G F S S

Abbildung 4.8: Gegenüberstellung der Labor-Wildtyp Sequenz und der Ergebnisse der neu gefangenen Fliegen auf genomischer Ebene und RNA Ebene. Dargestellt ist in rot die Exonsequenz und in grau die dazwischen gelegene Intronsequenz, sowie die resultierende Aminosäurenabfolge im Protein.

4.1.2.4 Protein Kinase Erkennungsstelle in verschiedenen Entwicklungsstadien und Körpergeweben von *Drosophila melanogaster*

Zur Überprüfung, ob es beim RNA-Editing Gewebespezifische oder Entwicklungsstadienspezifische Effekte gibt, wurden Köpfe und Körper bzw. Stadien getrennt untersucht. Die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Fruchtfliege wurden getrennt abgesammelt, so dass Fraktionen mit Eiern plus Embryonen und 1. Larve, 2. Larve, 3. Larve und Puppe entstanden. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem im Methodenteil dargestellten Ansatz.

Gewebe	Kopf-Homogenat	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG
	Thorax+Abdomen Homogenat	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG L K R G F S S
Entwicklungsstadien	Ei, Embryo + 1. Larve	CTG AAG AGA G*GA TTC AGC TCG
	3. Larve	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG
	Puppe	CTG AAG AGA GGA TTC AGC TCG L K R G F S S

Abbildung 4.9: Ergebnisse der Untersuchung des RNA-Editing der PKA-Erkennungsstelle in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster*. Angegeben ist die Basenabfolge der cDNA in der betreffenden Region. * markiert die Stelle, an welcher in der Sequenzanalyse zwei Peaks (A unter G) übereinander lagen.

In der Analyse konnte kein Unterschied zwischen den cDNA-Sequenzen von Kopf und Körper entdeckt werden. Die resultierende Aminosäurereihenfolge weist stets das Editieren des Arginins zu Glycin im zweiten Codon auf.

Auch in den Proben der verschiedenen Entwicklungsstadien konnte fast ausschließlich die editierte Form des *Synapsins* nachgewiesen werden. Lediglich die Sequenzanalyse der

Fraktion der Eier, Embryonen und 1. Larven zeigte eine Besonderheit auf: In ihr waren an der Stelle der ersten Base des zweiten Codons der PKA-Stelle zwei Peaks zu erkennen, wobei der Peak für das Nukleotid Guanin deutlich größer war als der darunter liegende Peak für Adenin. Daher wurde in Abb. 4.9 das Triplet als GGA interpretiert, das für Glycin kodiert. Der zweite Peak, aus dem das Codon AGA für Arginin resultiert zeigt aber, dass in dieser Fraktion ein gewisser Prozentsatz an der nicht editierten Form der RNA vorliegt. Die Untersuchung der Fraktion zweiter Larve lieferte keine auswertbare Sequenz in dem relevanten Bereich des *Synapsins*.

4.1.2.5 Zweite Protein Kinase A Phosphorylierungsstelle in *Synapsin*

Abgesehen von der Protein Kinase A Erkennungsstelle (R-R-X-S) in der A-Domäne des *Synapsins* findet sich noch eine weitere potentielle Phosphorylierungsstelle im Exon12 des Gens. Eine vergleichbare hintere PKA-Stelle beobachtet man auch in der D-Domäne des *SynIIIa* der Ratte. Durch eine PCR wurde der betreffende Bereich aus den isolierten cDNAs bzw. der genomischen DNA von zwei verschiedenen Fliegenlinien amplifiziert und danach sequenziert. Die Untersuchung der genomischen Sequenz einerseits und der cDNA Sequenz andererseits zeigte, dass diese Stelle sowohl im Laborstamm Wildtyp „Berlin“, als auch in neugefangenen Wildtypstamm „Bad Salzschlirf“ nicht editiert wird. Die folgende Graphik fasst die Ergebnisse zusammen (Abb. 4.10).

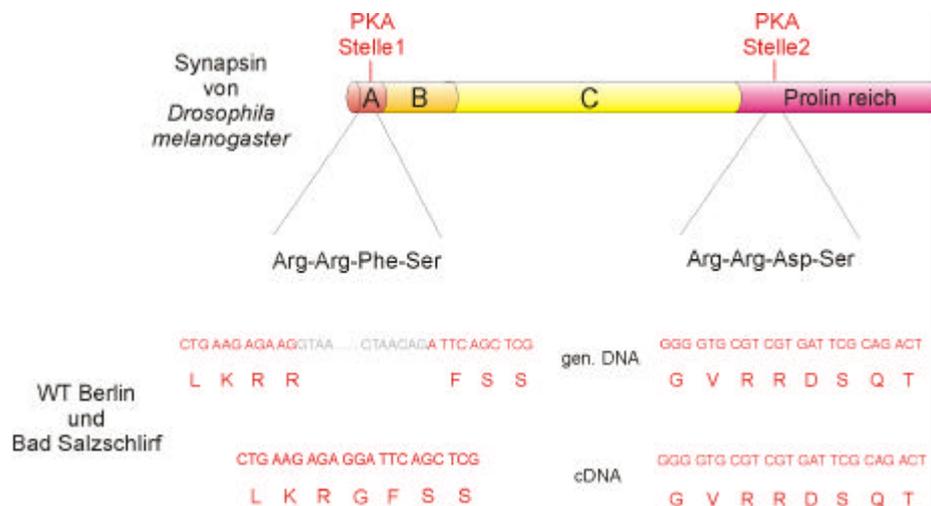


Abbildung 4.10:

Darstellung der Protein Kinase A Stellen im Synapsin Protein von *Drosophila melanogaster*.

Die beiden Stellen unterscheiden sich nur in der dritten Aminosäure, welche laut Konsensussequenz variabel ist (R-R-X-S). Darunter sind die Ergebnisse der PCR der genomischen DNA wie auch der cDNA gezeigt. Untersucht wurden Wildtyp Berlin (etablierter Laborstamm) und Bad Salzschlirf (neu etablierter Wildtyp-Fliegenstamm). Dabei bestätigt sich im Fall der PKA-Stelle 1 in der A-Domäne ein RNA-Editing während, die zweite Kinasestelle in der RNA unverändert vorliegt.

Die cDNA weist bei der zweiten PKA Stelle die gleiche Sequenz auf wie die genomische DNA, die für die Aminosäuresequenz Arginin-Arginin-Asparaginsäure-Serin kodiert.

4.1.3 Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen in der *Synapsin* cDNA

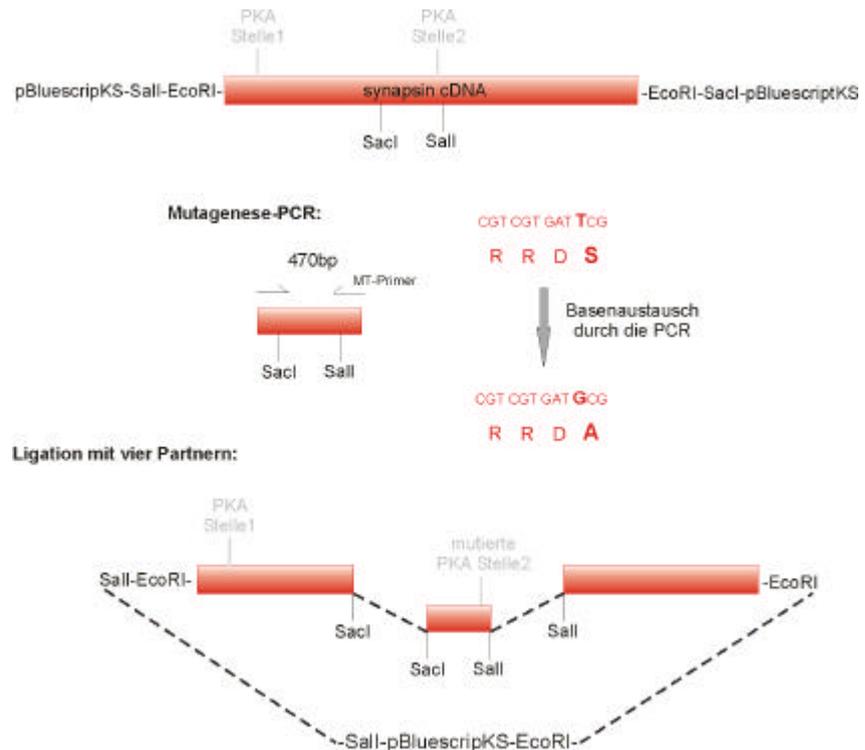
Um in späteren Experimenten die funktionelle Bedeutung der *Synapsin* Phosphorylierung und die Relevanz des Editings der Protein Kinase A Stelle in der A-Domäne des *Synapsins* testen zu können, wurde eine gezielte Mutagenese der cDNA des Proteins angesetzt. Dabei sollte zunächst die im pBluescriptKS-Vektor ligierte cDNA-Syn1 so verändert werden, dass in der C-terminalen PKA-Stelle das Codon für die Aminosäure Serin zu einem Codon für die neutrale Aminosäure Alanin umgewandelt wird. Dadurch wäre die Konsensussequenz für die Kinase zerstört, da die zu phosphorylierende Aminosäure fehlt. Abschließend sollte die erste konservierte Kinasestelle ebenfalls auf der Ebene der cDNA umgewandelt werden. Dazu wurden die Primer so gewählt, dass die Sequenz von R-G-F-S zur optimalen, genomisch kodierten Erkennungssequenz R-R-F-S mutiert wurde. In einem weiteren Schritt wurde die PKA-Stelle 1 zerstört durch die Substitution des Serins durch Alanin. Die konkrete Vorgehensweise wird nun einzeln besprochen.

Die einzelnen Mutationen wurden in einem ersten Versuch durch die Methode der in-vitro-Mutagenese von Stratagene durchgeführt. Obwohl die ausgesuchten Primer für die Mutagenese den Angaben des Herstellers entsprachen, konnte mit dieser Methode in keinem Ansatz ein erfolgreiches Ergebnis erzielt werden. Gewachsene Bakterienkolonien stellten sich entweder als nicht mutiertes Ausgangsplasmid heraus oder waren auf Verunreinigungen zurückzuführen. Daraufhin wurde die Basensubstitution durch eine gezielte PCR mit Primern, die den gewünschten Austausch trugen, durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente die cDNA-Syn1, die über EcoRI in den pBluescriptKS Vektor eingebracht war.

Im Fall der Protein Kinase A Stelle 2 wurden die Primer so gewählt, dass der 5'-Primer über der SacI-Schnittstelle in der cDNA von *Synapsin* lag. Der zweite Primer sollte über die Sall Stelle unmittelbar abwärts der PKA-Stelle 2 liegen. Der erste Primer entsprach der Sequenz auf der cDNA, während der zweite Primer die gewünschte Mutation im Codon des Serins trug. Dabei wurde die Sequenz CGT-CGT-GAT-TCG im Primer verändert zu CGT-CGT-GAT-GCG, so dass das letzte Codon für die Aminosäure Alanin steht. Das erhaltene PCR-Produkt wurde nach der Aufreinigung mit den Enzymen Sall und SacI verdaut und stand so einer Ligation zur Verfügung. In der Ligation wurden die vorab mit den relevanten Restriktionsenzymen geschnittenen Teilstücke und das neu mutierte Fragment eingesetzt. Eine genaue Darstellung der Ligationspartner, sowie die verwendeten Schnittstellen, zeigt die Abbildung 4.11.

In der Ligation wurden verschiedene Schnittstellen verwendet, so dass die Möglichkeit einer Religation des Vektors ausgeschlossen war. Dadurch war eine erfolgreiche Ligation auch nur in der gewünschten Orientierung möglich. Nach der Transformation wurden Klone gepickt und ihre Plasmid-DNA isoliert. Durch einen Verdau konnte die Richtigkeit des erhaltenen Produktes überprüft werden. Durch eine Sequenzierung wurde der relevante Bereich um die Protein Kinase A Phosphorylierungsstelle überprüft. Dabei fand sich die durch den Primer eingebrachte Basensubstitution im Codon für Serin, so dass nun hier die Aminosäure Alanin codiert wird. Die erfolgreich mutierte cDNA wurde nun als Ausgangsmaterial für eine weitere PCR verwendet mit dem Ziel der Veränderung der PKA-Stelle 1 in der cDNA des *Synapsins*.

Abbildung 4.11.: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Mutation der PKA-Stelle 2 in der *Synapsin* cDNA. Die cDNA lag über *EcoRI* Schnittstellen in den Vektor pKS eingebracht vor. Das Plasmid wurde als Ausgangsmaterial für eine PCR mit spezifischen Primern verwendet. Dazu wurde in den 3'-Primer die gewünschte Mutation eingebettet. Das PCR-Produkt stand nach einem Verdau für eine Ligation mit den anderen Fragmenten zur Verfügung. Dafür wurden die verschiedenen Plasmid-Fragmente durch separaten Verdau erhalten.



Um die Protein Kinase A Konsensussequenz in der A-Domäne des Synapsins zu mutieren wurde ebenfalls versucht, zuerst eine in-vitro Mutagenese nach dem Protokoll des Herstellers durchzuführen. Dieser Versuch scheiterte aber genauso wie im Falle der PKA-Stelle 2. Daraufhin wurde versucht die erfolgreiche Methode der PCR mit Primern, die den gewünschten Basenaustausch besaßen, durchzuführen.

In der PCR wurde ein downstream Primer verwendet, der oberhalb der *SacI*-Schnittstelle in der cDNA von *Synapsin* lag. Der upstream Primer lag über der PKA-Stelle und über die unmittelbar in 3'-Richtung anschließende *EcoRI* Erkennungssequenz. Dabei wurden zwei unterschiedliche Primer gewählt, ein Primer (PKA1-MT-4) trug dabei im relevanten Bereich die Sequenz AGA-AGA-TTC-GCC, welche für die Aminosäureabfolge Arg-Arg-Phe-Ala steht. Damit würde das Serin der genomisch kodierten Phosphorylierungsstelle zu einer Aminosäure mutiert, welche nicht phosphoryliert wird. Die Konsensussequenz der Protein Kinase wäre somit zerstört. Ein zweiter 3'-Primer (PKA1-MT-5) trug die Sequenz AGA-AGA-TTC-AGC, welche die editierte Form des Synapsin wieder zur uneditierten Form rückmutiert. Somit entsteht eine cDNA, in der beide Kinase-Erkennungsstellen zerstört sind und eine Form, in der die zweite Stelle zerstört, die erste aber wieder in die genomische Konsensussequenz rückmutiert wurde. Daneben existiert die bereits hergestellte Form der cDNA mit der editierten ersten Phosphorylierungsstelle und der zerstörten zweiten Stelle. Die genaue Vorgehensweise für die Mutation der ersten Protein Kinase Erkennungsstelle, sowie die Strategie der Ligation zeigt die Abbildung 4.12.

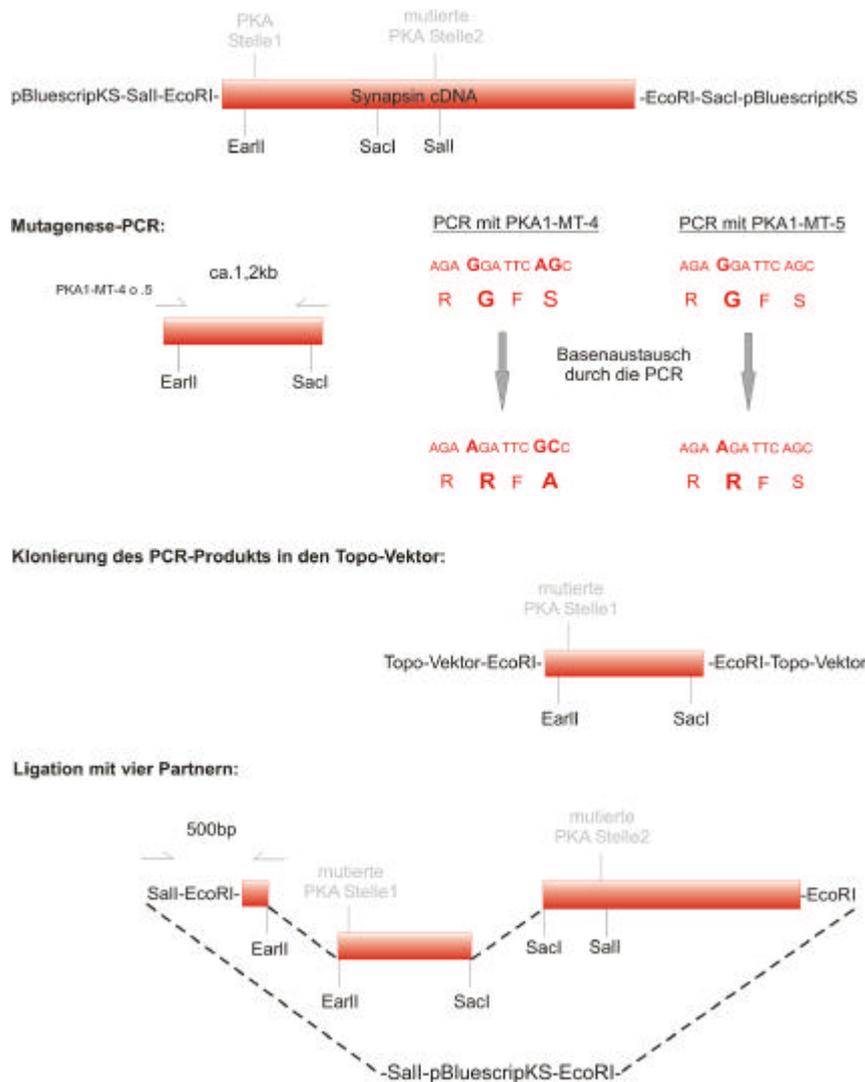


Abbildung 4.12.: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Mutation der PKA-Stelle 1 in der A-Domäne des Synapsins. Die cDNA befand sich über EcoRI in den pKS-Vektor ligiert. Das Plasmid diente als Ausgang für die PCR mit Primern, welche die gewünschten Basenaustausche einbringen. Das PCR-Produkt konnte in den Topo-Vektor kloniert werden und einer Sequenzanalyse zugeführt werden. Im unteren Abschnitt sind die benötigten einzelnen Fragmente für die Ligation des mutierten Abschnitts zurück in die cDNA von *Synapsin* dargestellt.

Um das positive PCR-Produkt in einer größeren Menge verwenden zu können, wurde das Amplifikat in beiden Fällen in den Klonierungsvektor pCR-4-Topo eingebracht. So war es möglich das Produkt mittels vektorspezifischer Primer anzusequenzieren. Dabei stellte sich heraus, dass beide Basensubstitutionen in die cDNA eingeführt wurden, wodurch die Aminosäuren im Protein ausgetauscht würden. Ein erster Versuch der Ligation zur Komplementierung der cDNA konnte aber nicht erfolgreich durchgeführt werden und aufgrund Zeitmangels nicht mehr wiederholt werden, so dass in diesem Teilprojekt die Fertigstellung der kompletten cDNA nicht gelang.

4.1.4 *Synapsin* Rescue-Konstrukt

Um die phänotypischen Defekte der *Synapsin*-Nullmutante eindeutig der Deletion im *Synapsin*-Gen zuordnen zu können, wurde versucht ein verbessertes Rescue-Konstrukt für *Synapsin* herzustellen. Eine von T.A. Godenschwege (1999) erzeugte Rescue-Transformante zeigte im Nullmutanten-Hintergrund eine bis zu fünfmal niedrigere Expression als der Wildtyp. In diesem Konstrukt scheinen daher relevante regulatorische Elemente zu fehlen, die in einem neuen Ansatz zusätzlich eingebracht werden sollten. Der prinzipielle Aufbau des neuen Rescue-Konstruktes zeigt die folgende Abbildung.

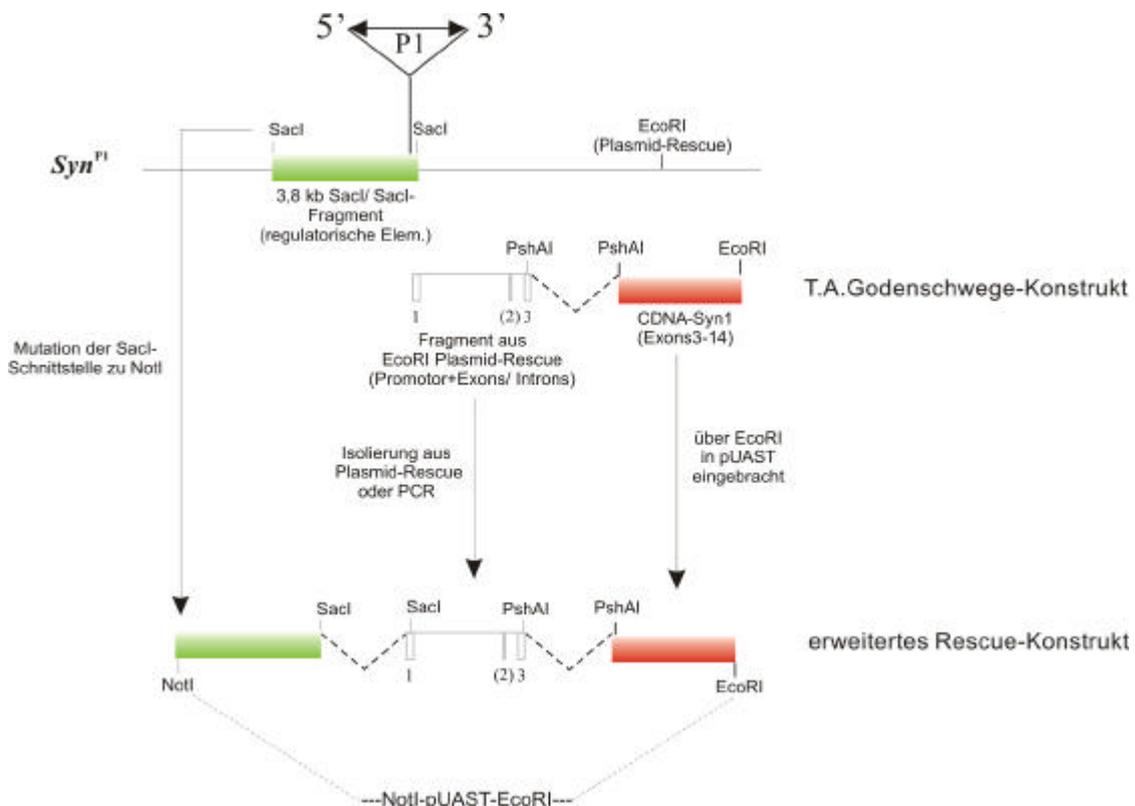


Abbildung 4.13: *Synapsin* Rescue-Konstrukt.

Dargestellt ist schematisch der relevante genomische Bereich mit der Insertion des P-Elementes in der Linie *Syn^{PI}*. Im unteren Bereich ist der Aufbau des Rescue-Konstruktes von T.A. Godenschwege gegenüber dem neuen Rescue-Konstrukt dargestellt. Dabei wird der Rescue um ein 3,8 kb Fragment mit regulatorischen Elementen erweitert. (Details: siehe Text)

Ziel war es den Rescue um ein ca. 3,8 kb Fragment aufwärts der Insertionsstelle des P-Elementes in *Syn^{PI}* zu verlängern. Dieses Fragment lag aus einer Phagenbibliothek isoliert bereits im pBluescript-Vektor vor. Für die erfolgreiche Klonierung war eine Mutation der aufwärts gelegenen SacI-Schnittstelle nötig. Diese Mutation wurde während der Diplomarbeit von U. Werner vollzogen und die Schnittstelle in eine NotI-Erkennungssequenz modifiziert. Der mittlere Teil des Rescue-Konstruktes konnte durch Restriktionsverdau aus dem EcoRI Plasmid-Rescue Fragment der Linie *Syn^{PI}* gewonnen werden. In einem zweiten Ansatz wurde dieses Fragment mit einer Länge von ca. 3,1 kb aus dem Genom der Fliege durch PCR amplifiziert und anschließend durch Enzyme verdaut. Die cDNA des *Synapsins* stand einkloniert in pKS zur Verfügung. Der vollständige Rescue sollte aus klonierungs-

technischen Gründen in einen modifizierten pUAST-Vektor eingebracht werden. Aus diesem wurde durch Restriktionsverdau die Wiederholungskassette der fünf UAS-Sequenzen entfernt, so dass davon keine genregulatorische Aktivität mehr ausging. Durch diesen Schritt wurde ein möglicher Effekt der UAS-Sequenz auf die Expressionsstärke im Konstrukt verhindert.

In einem ersten Schritt wurde versucht alle drei Komponenten mit dem geöffneten Vektor zu ligieren, was aber missglückte. In einem zweiten Ansatz wurde die cDNA allein über EcoRI in den pUAST-Vektor eingebracht und ihre Orientierung mit Restriktionsverdau überprüft. Dieses Konstrukt sollte als Ligationspartner für die regulatorischen Fragmente dienen. Dabei wurde versucht das 3,1 kb Fragment (Promotor, Exon 1, 2, 3 und Intron 1, 2) sowohl aus dem EcoRI Plasmid-Rescue des *Synapsins* zu verwenden, als auch durch eine PCR mit spezifischen Primer aus der Genom der Fliege herauszuamplifizieren.

Leider konnte in bakteriellen Transformanten der verschiedenen Ligationsansätze in keinem Fall ein erfolgreiches Produkt nachgewiesen werden. Aufgrund des Zeitmangels musste dieses Projekt nach mehrmaliger Wiederholung, auch mit veränderten Parametern, abgebrochen werden.

4.2 Phänotypische Charakterisierung der *Synapsin*-Nullmutante

Komplexe Verhaltensleistungen wie z.B. Lernen und Gedächtnis unterliegen sehr stark dem Einfluss des genetischen Hintergrunds der Fliege. Die Mutante *Syn*⁹⁷ wie auch die Linie *Syn*^{P1} sind beide im genetischen Hintergrund von *w*¹¹¹⁸. Für diese Fliegen wurde aber z.B. in der Hitzebox ein deutlicher Einfluss auf den Performance Index aufgezeigt (Schwaerzel et al., 2002; Putz et al., 2003). Daher können schwache Phänotypen der *Syn*⁹⁷ Linie im Vergleich zum Wildtyp Oregon R nicht nur auf den Defekt im *Synapsin* Gen, sondern auch auf den Einfluss des genetischen Hintergrund beruhen.

Um den Effekt des genetischen Hintergrundes zu minimieren wurde die Mutante *Syn*⁹⁷ in den Hintergrund des CantonS Wildstammes eingekreuzt. Für diesen Wildtyp wurde in verschiedenen Verhaltensexperimenten ein deutlicher Lernerfolg aufgezeigt.

4.2.1 Rückkreuzung der *Syn*⁹⁷ Mutante in den CantonS Hintergrund

Um den genetischen Hintergrund der *Synapsin*-Nullmutante *Syn*⁹⁷ von *w*¹¹¹⁸ in den Hintergrund des CantonS Stammes zu bringen wurden mehrere Zyklen einer Rückkreuzung durchgeführt. Dabei müssen für die *Syn*⁹⁷ Mutation heterozygote Fliegen in den verschiedenen Kreuzungsphasen identifiziert werden. Hierfür wurde die Methode der single-fly PCR angewandt. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass der erste Primer vor der Deletion lag, der zweite innerhalb der Deletion von ca. 1,4 kb und der dritte stromabwärts des linken Deletionsbruchpunktes. Die Kombination der Primer 1 und 2 lieferte nur von einem wildtypischen Allel des *Synapsin* Locus ein PCR-Produkt, mit der ungefähren Größe von 800 Basen. Die Primer 1 und 3 erzeugten dagegen nur bei Vorhandensein der Deletion eine Bande bei ca. 550 bp, da die im Wildtyp entstehende Bande bei ca. 2 kb durch die Wahl einer kurze Elongationsphase von 1 Minute unterbunden wurde. So konnten homozygote Wildtypiere oder Mutanten durch das Auftreten von jeweils nur einem PCR-Produkt, heterozygote Mutantenfliegen dagegen durch das entstehen beider PCR-Produkte eindeutig identifiziert werden. Diese Methode der Genotypisierung der einzelnen Fliegen wurde ebenfalls in einigen Verhaltensexperimenten eingesetzt. Hierbei wurden die Fliegen einzeln im jeweiligen Verhaltensexperiment getestet und erst danach der single-fly PCR zugeführt. Dadurch ist es möglich die Verhaltensanalysen als Blindversuch zu gestalten, die jeden Einfluss des Experimentators auf das Ergebnis ausschließen. Einen Überblick über die Durchführung der single-fly PCR gibt die Abbildung 4.14.

Mit Hilfe der single-fly PCR Genotypisierung konnte die Rückkreuzung der *Syn*⁹⁷ Fliegen in den genetischen Hintergrund des CantonS Stammes erfolgen. Durch die Kreuzung mit Wildtypfliegen wird sukzessiv das Genom der Nullmutantenfliege ausgetauscht bis auf den durch die Genotypisierung beobachteten Bereich (vgl. Abb. 4.15). Beginnend mit der F2- wurden in jeder Generation mehrere Einzelkreuzungen mit CantonS Fliegen angesetzt und nach Eiablage das fragliche Elterntier genotypisiert. Insgesamt wurde 12 Generationen lang eine solche Rückkreuzung mit CantonS Fliegen vollzogen und danach Einzelkreuzungen der heterozygoten Nachkommenschaft untereinander durchgeführt. Der neu etablierte Stamm *Syn*^{97CS} wurde letztlich durch die Zusammenführung der Nachkommenschaft aus drei Einzelpaaren von homozygoten *Syn*⁹⁷ Fliegen erhalten. Einen Überblick über die durchgeführte Rückkreuzung der Mutante zeigt die Abbildung 4.15.

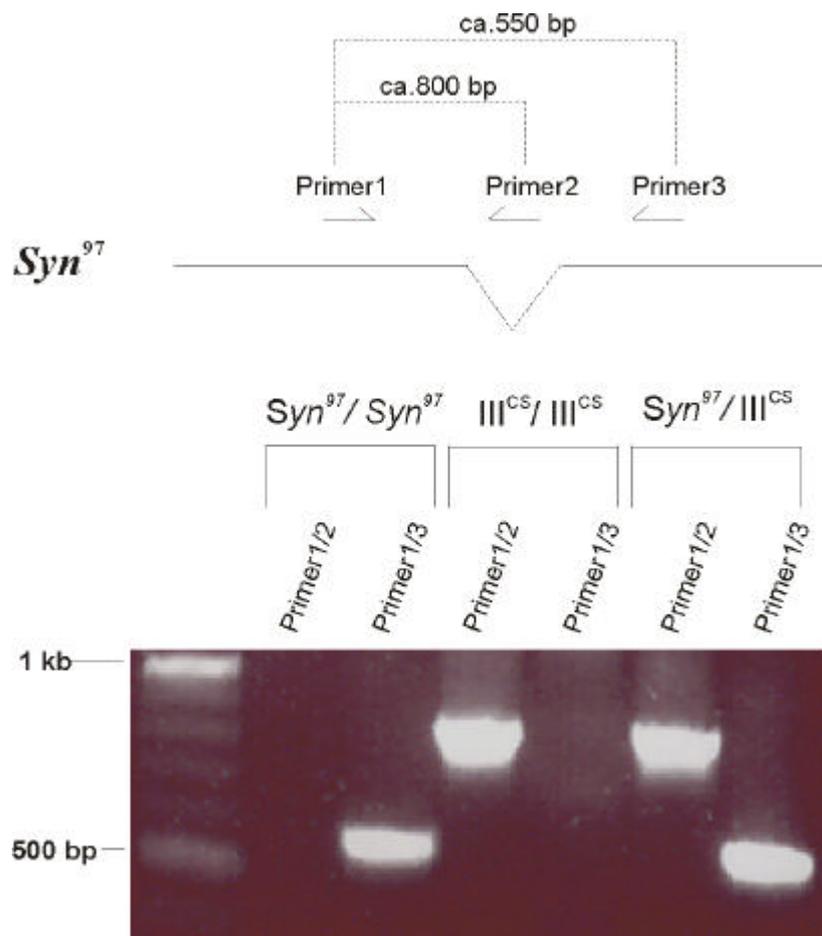


Abbildung 4.14:
Genotypisierung durch single-fly PCR.

Dargestellt ist die ca. 1,4 kb große Deletion innerhalb der Linie *Syn*⁹⁷. Zur Bestimmung des Genotypes wurden die Primer vor, innerhalb und hinter die Deletion gelegt. Dabei ergibt die Primer-Kombination 1+2 nur bei einem Wildtypallel ein PCR-Produkt, die Kombination 1+3 nur bei Vorliegen der Deletion. Ein PCR-Produkt bei beiden Ansätzen identifiziert eine Fliege, die die Mutation heterozygot trägt. Im unteren Abschnitt ist ein Gel mit einer Beispiel-PCR abgebildet.

Der neu etablierte Stamm *Syn*^{97CS} wurde ebenfalls molekular untersucht. Dabei wurden die exakten Deletionsbruchpunkte innerhalb des Klons AE003686 des B.D.G.P. mit Hilfe einer PCR mit anschließender Sequenzierung ermittelt. Ebenfalls wurde die Nullexpression auf einem Western Blot überprüft. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Abbildung 4.16 dargestellt.

In den molekularen Untersuchungen ergab sich kein Unterschied zum alten Stamm *Syn*⁹⁷. Durch die Selektion der heterozygoten Individuen durch die single-fly PCR ist es gelungen den genetischen Hintergrund des Stammes zu verändern, dabei aber die *Synapsin*-Nullmutation im Stamm weiter zu erhalten.

Der neu etablierte Stamm *Syn*^{97CS} diente im Folgenden als Ausgangsstamm zur Untersuchung der Phänotypen der *Synapsin*-Mutante in verschiedenen Verhaltensexperimenten. Dabei wurden vereinzelt auch erneute Kreuzungen der Linie mit CantonS Fliegen angesetzt und die für die Deletion heterozygoten Nachkommen untereinander gekreuzt. Aus der F2 Generation konnten dann heterozygote und homozygote Mutanten, als auch homozygote Wildtypfliegen im jeweiligen Paradigma getestet werden. Ihre Genotypisierung erfolgte nach dem Verhaltenstest in der gleichen Art wie bei der durchgeführten Rückkreuzung.

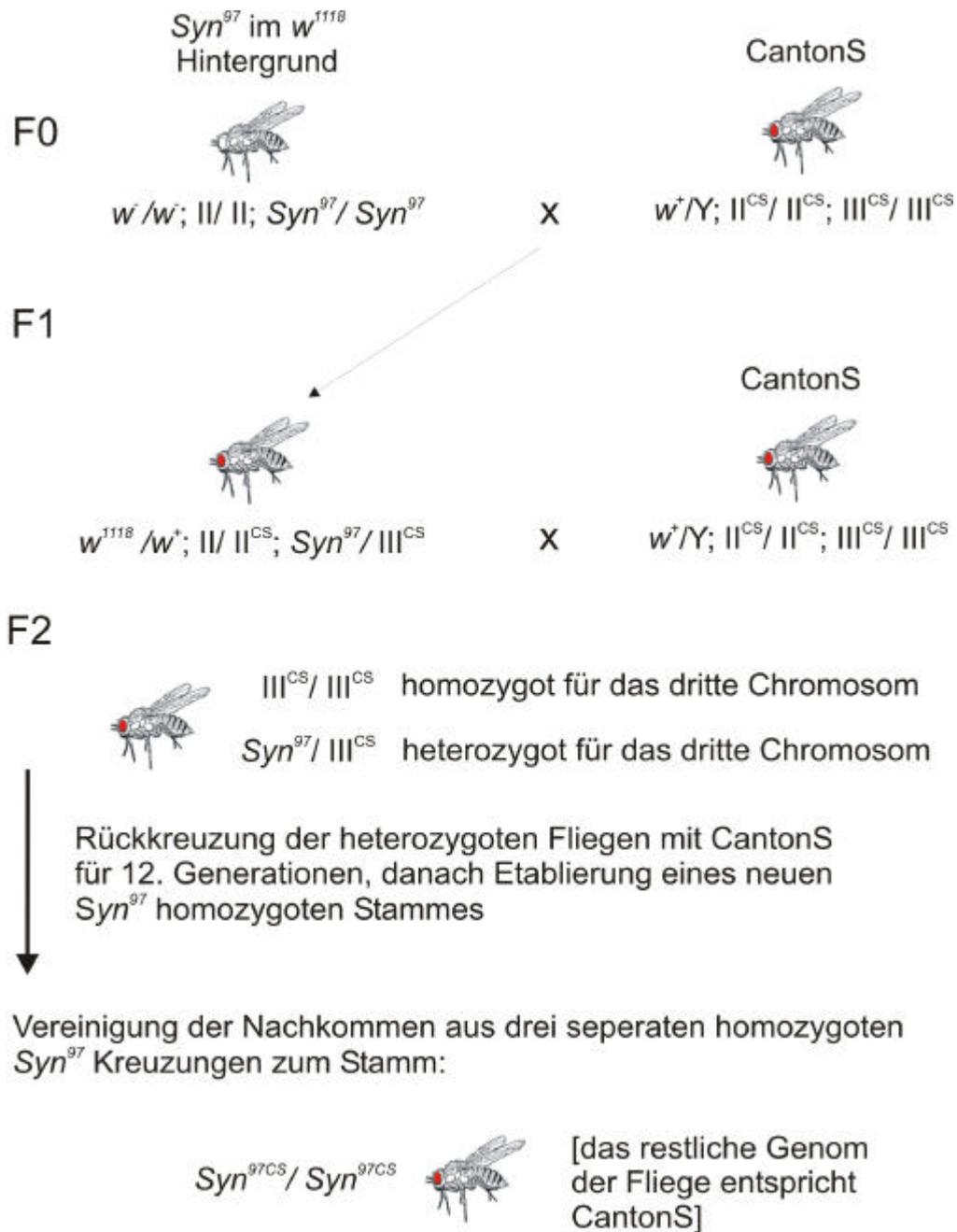
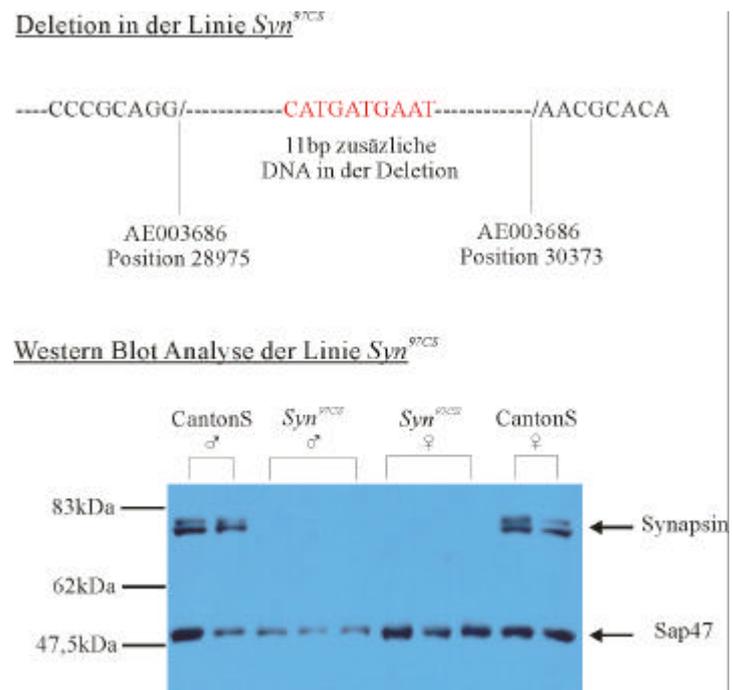


Abbildung 4.15: Rückkreuzung der *Syn⁹⁷* Fliegen in den genetischen Hintergrund von CantonS. Die im Hintergrund *w¹¹¹⁸* gehaltene Linie *Syn⁹⁷* wurde für 12. Generationen in den genetischen Hintergrund des Wildtypstammes CantonS eingekreuzt. Danach wurde ein neuer Stamm durch das Poolen der Nachkommenschaft von drei separat angeetzten homozygoten Kreuzungen gewonnen.

Abbildung 4.16:
 Untersuchung der neu etablierten *Syn^{97CS}* Linie.
 Die neu etablierte Linie zeigt die gleichen Deletionsbruchpunkte, wie der Ausgangsstamm. Ebenfalls finden sich innerhalb der Deletion 11 Basen (rot), die aus dem P-Element stammen können. Auf Western Blots zeigen die CantonS Kopfhomogenate die Synapsin Isoformen zwischen 70 und 80 kDa. Das Protein kann in Fliegenköpfen der Linie *Syn^{97CS}* nicht mehr detektiert werden, im Gegensatz dazu ist die Beladungskontrolle Sap47 nachweisbar. [Synapsin-Antikörper = IIC11; Sap47 = nc46]



4.2.2 *Syn^{97CS}* in verschiedenen Verhaltensassays

4.2.2.1 *Syn^{97CS}* Flügelschlagfrequenz, Jump Response, Ethanol-Toleranz

Unmittelbar auf diese Rückkreuzung der Nullmutante in den CantonS Hintergrund aufbauend wurde eine Diplomarbeit von Ursula Werner (2002) durchgeführt. In verschiedenen Verhaltensparadigmen wurde der Phänotyp der neu etablierten Linie *Syn^{97CS}* auf Unterschiede zum Wildtyp CantonS hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen hier nur kurz dargestellt werden, dabei wird auf genaue Details der Versuchsdurchführung verzichtet und auf die Originalarbeit von Ursula Werner verwiesen.

Flügelschlagfrequenz:

Durch ihre asynchrone Flugmuskulatur sind *Drosophilas* in der Lage relativ hohe Flügelschlagfrequenzen zu erreichen (um die 200 Hz). Erste Versuche von Dr. Lehmann zum Flugverhalten von Dipteren hatten den Hinweis ergeben, dass die *Synapsin*-Mutante *Syn⁹⁷* eine erhöhte Flügelschlagfrequenz aufweisen könnte. Um diesen Eindruck zu überprüfen wurde von U. Werner eine Messung der Flügelschlagfrequenz der Linien *Syn^{97CS}* und CantonS durchgeführt (siehe Abbildung 4.17). Bei der statistischen Auswertung der Daten zeigte sich, dass die Flügelschlagfrequenz in der Mutante von 210 Hz im Vergleich zum Wildtyp mit 193 Hz signifikant erhöht war ($p < 0,0001$). Der Anstieg der Frequenz kann nicht mit einer Verkleinerung der Flügeloberfläche und einem dadurch bedingten Kompensationsmechanismus erklärt werden, da in Messungen der Flügelfläche kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden konnte.

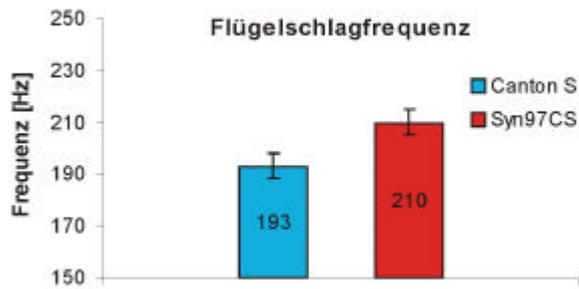


Abbildung 4.17:
Flügel Schlagfrequenz der Mutante Syn^{97CS} und des Wildtyps CantonS (Abbildung modifiziert nach Diplomarbeit U. Werner). Dargestellt ist der Mittelwert (+ Standardfehler) der beiden Linien (N=35)

Ethanoltoleranzverhalten:

Drosophila melanogaster entwickelt nach wiederholter Ethanol-Exposition reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Alkohol, die als Toleranz bezeichnet wird. Diese Toleranz zeigt sich in einem Anstieg der „Mean Elution Time“ (MET) in einem Inebriometer (Scholz et al., 2000). Die Entwicklung der Toleranz hängt vermutlich von octopaminergen Prozessen im Gehirn der Fliege ab (Scholz, pers. Mitteilung). Da Synapsin nach seinem Funktionsmodell einen direkten Einfluss auf die Verfügbarkeit der synaptischen Vesikel und so auf die Octopaminfreisetzung im Gehirn hat, könnte eine Nullmutante in der Toleranzentwicklung beeinflusst sein. Zur Untersuchung dieses Verhaltens wurden Fliegen des Stammes Syn^{97CS} und CantonS zweimal im Abstand von 40 Minuten Ethanoldampf ausgesetzt. Dabei ergaben sich die folgenden Befunde:

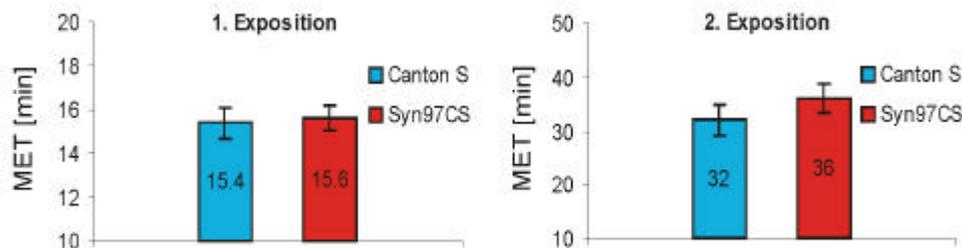


Abbildung 4.18: Ethanoltoleranzentwicklung.

Dargestellt sind die MET für CantonS (blau) und Syn^{97CS} (rot) für die erste und zweite Exposition. In der ersten Exposition findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. In der Toleranz in der zweiten Exposition sind die *Synapsin* Nullmutanten signifikant erhöht ($p < 0,05$, N zwischen 40-60 Fliegen). Abbildung modifiziert nach U. Werner (2002).

Während bei der ersten Exposition kein signifikanter Unterschied in der Zeit bis zum Verlust der Positurkontrolle (MET) zwischen der Mutante und dem Wildtyp aufgezeigt werden kann, ist diese Zeit in den Syn^{97CS} Fliegen bei der 2. Exposition signifikant erhöht im Vergleich zu CantonS ($p < 0,05$).

Jump-Response:

Der olfaktorische Jump Response ist eine Verhaltensantwort der Fliege auf einen plötzlich auftretenden Duftimpuls (McKenna et al., 1989). Dabei zeigt die Fliege eine Abnahme der Reaktion abhängig von der Wiederholung der Exposition, es kommt zu einer Habituation des olfaktorischen Verhaltens. In den durchgeführten Versuchen wurde das Verhalten von *Syn^{97CS}* gegen CantonS bei mehrmaliger Duftzugabe getestet. Es wurden verschiedene Duftklassen, sowie Konzentrationen verwendet. Dabei zeigte sich, dass es bei Fliegen des *Syn^{97CS}* Genotypes zu einer stärkeren Habituation bei wiederholter Reizung kommt als bei CantonS Fliegen (Werner, 2002).

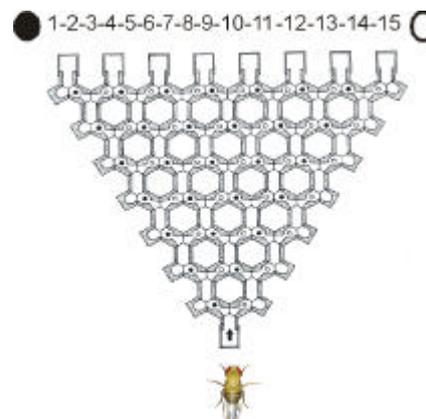
Zusammenfassend lassen sich in verschiedenen Paradigmen folgende phänotypischen Merkmale der *Syn^{97CS}* Mutante finden.

Parallel zu diesen Verhaltenstests wurden in dieser Doktorarbeit in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern des Lehrstuhls weitere Experimente durchgeführt um einen möglichen Phänotyp der Synapsin-Nullmutante aufzuzeigen. Dabei wurden Versuche zum visuellen Verhalten sowie zum Lernen und Gedächtnis der Fliegen durchgeführt. Insbesondere wurde ein umfangreiches Lernexperiment mit *Syn^{97CS}* Larven im Vergleich zu Wildtyp-Larven ausgewertet.

4.2.2.2 Objektfixierung

In einem Test zur Überprüfung der visuellen Fähigkeiten der *Synapsin* Mutanten wurden die Linie *Syn^{97CS}* und der für die Rückkreuzung verwendete Stamm CantonS getestet. In diesem von Bülthoff entwickelten Paradigma (Bülthoff et al., 1982a, b) muss *Drosophila melanogaster* ihren Weg durch mehrere Y-Elemente finden. Dabei wird den Fliegen an jedem Verzweigungspunkt ein schwarzer Punkt auf der einen und ein transparenter Punkt auf der anderen Seite präsentiert. Der schwarze Punkt deckt nur 0,1% des Sehfeldes der Fliege ab, so dass dadurch kein signifikanter phototaktischer Effekt bedingt werden kann. In den von Bülthoff durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass eine Wildtypfliege mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 75% das schwarze Objekt fixiert und zu ihm läuft. Insgesamt muss die Fliege in dem Paradigma vierzehn Choice-Elemente durchlaufen, bis sie am Ende an Futtergefäße gelangt. Dabei endet eine Fliege, welche immer in die Richtung der schwarzen Markierung läuft, im Gefäß mit der Nummer 1. Eine Fliege, die eine ständige Antifixation zeigt erreicht dementsprechend Gefäß 15. Einen schematischen Aufbau des Y-Labyrinths zeigt die folgende Abbildung.

Abbildung 4.19:
Bülthoff Paradigma zur Objektfixierung.
Dargestellt sind nur 7 von insgesamt 14 Entscheidungspunkten des multiplen Y-Labyrinths. Fliegen laufen durch die verschiedenen Ebenen des Paradigmas und müssen an jedem Choice-Punkt eine Entscheidung für oder gegen die schwarze Markierung treffen. Ein Zurücklaufen ist durch die trichterförmige Form der Wege unmöglich. Am Ende sind insgesamt 15 Futtergefäße angebracht, in denen die Fliegen nach max. 16h angelangt sind.



Aufgrund der Verteilung in den Endgefäßen können die Fliegen grob unterteilt werden. Tiere mit normalen Fixationsverhalten enden in den Endsektoren 1-5 (z.B. wildtypische Fliegen). Antifixierer enden in den Bereichen der Futtergefäße 11-15, darunter fallen z.B. die *omb^{H31}* Mutanten. Mögliche Kandidaten für *no object fixation* finden sich in den mittleren Sektoren (z.B. *white*, *sine oculis*) (Bülthoff et al., 1982a, b). In anatomische Untersuchungen der Tiere mit verändertem Fixierungsverhalten zeigte auf, dass die meisten Defekte in der Peripherie des visuellen Systems aufwiesen. Um einen möglichen Phänotyp der *Synapsin*-Mutanten in dem Fixierungsverhalten aufzuzeigen, wurden die ausgekreuzten *Syn^{97CS}* Fliegen gegen CantonS in einer Kooperation mit J. Rister (AG Heisenberg) getestet.

Dabei ergab sich die in der Abbildung 4.20 dargestellte Verteilung der Fliegen in den 15 Endgefäßen. Sie gibt Aufschluss über die durchschnittliche Präferenz der Fliegen für die schwarze Markierung. In der Abbildung ist deutlich erkennbar, dass die *Synapsin*-Nullmutanten, genauso wie der Wildtyp, die Objektfixierung in den mehrmaligen Entscheidungsebenen bewerkstelligen kann. Die Ermittlung des Medianes der Verteilungskurve zeigt, dass beide Fliegen mehrheitlich in die Sektoren 1 bis 5 laufen. Jedoch fällt bei der Mutante eine deutliche Verschiebung der Verteilung nach rechts auf. Dies zeigt an, dass die Mutante mit einer geringeren Effektivität zur schwarzen Markierung laufen als der Wildtyp. Dieser Unterschied in der *Syn^{97CS}*- im Vergleich zur CantonS-Verteilung ist mit $p < 0,001$ (Kolmogorov-Smirnov-Test) hochsignifikant.

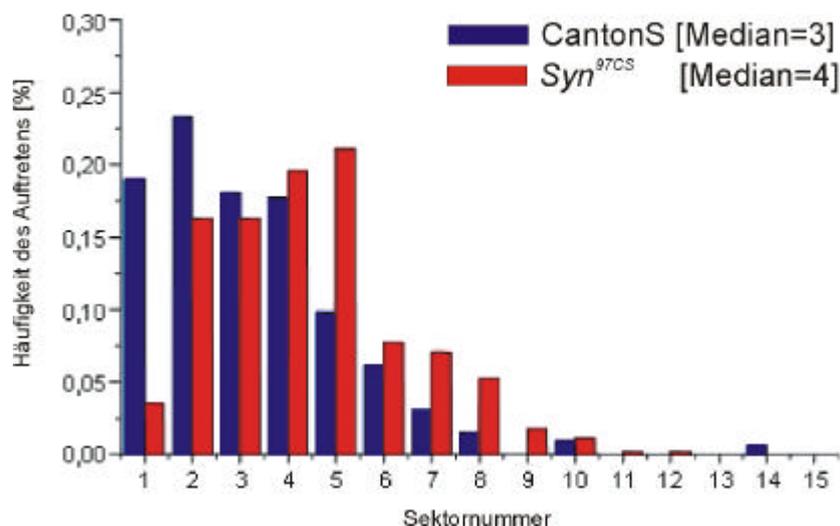


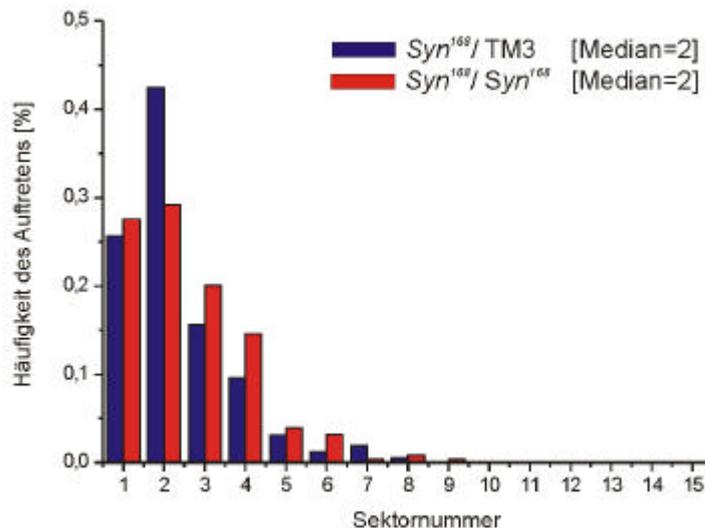
Abbildung 4.20: Objektfixierung im Y-Labyrinth. Dargestellt ist die Verteilung der Fliegen *Syn^{97CS}* (rot) und CantonS (blau) im Bülthoff Fixierungstest. Die Mediane der beiden Linien sind signifikant verschieden. [*Syn^{97CS}* N= 455 / CantonS N= 327]. (In Zusammenarbeit mit J. Rister)

Die Aufdeckung des signifikant veränderten Fixierungsverhaltens in der Nullmutante führte zu einem weiteren Experiment mit der Linie *Syn¹⁶⁸*. In dieser Linie zeigt sich eine Reduktion der Synapsin Expression in der Lamina und in Schichten der Medulla (siehe Abbildung 1.6). Da die Experimente von Bülthoff ergeben hatten, dass vor allem Mutanten in der Peripherie des visuellen Systems in diesem Paradigma auffällig waren, sollte nun geklärt werden, ob ein Fehlen des Synapsins in diesem Bereich der optischen Loben ausreicht, um den Phänotyp der Nullmutante zu erzeugen, bzw. ob das Vorhandensein von Synapsin in zentralen Bereichen des Gehirns für den wildtypischen Phänotyp ausreichend ist.

Da die Mutante *Syn¹⁶⁸* aber im Hintergrund der *white*-Mutation gehalten wurde und diese alleine schon einen Einfluss auf das Objektfixierungsverhalten der Fliege hat (Götz et al., 1964; Bülthoff et al., 1982), musste zuerst eine Kopie des *white⁺* Gens in die Fliege eingebracht werden. Dies erfolgte durch eine Kreuzung männlicher *Syn¹⁶⁸* Fliegen mit Jungfrauen eines rotäugigen TM3/TM6 Stammes. Die Nachkommen dieser Kreuzung (rotäugig + TM3 markiert) wurden untereinander gekreuzt und die F2 selektioniert nach

Fliegen mit roten Augen ohne TM3 Marker (homozygoten Syn^{168} Tiere) und Individuen mit roten Augen und TM3 Phänotyp als Kontrolle. In dem anschließenden Test der Fliegen zeigten sich die folgenden Verteilungen.

Abbildung 4.21:
Bülthoff Objektfixierung.
Dargestellt sind die Verteilungen der Fliegen Syn^{168}/Syn^{168} (rot) und $Syn^{168}/TM3$ (blau) im Bülthoff Fixierungstest. Die Verteilungen der beiden Linien sind mit $p < 0.05$ signifikant verschieden. [Syn^{168}/Syn^{168} N= 254 ; $Syn^{168}/TM3$ N= 417] (In Zusammenarbeit mit J. Rister)



In der Auswertung der Verteilung fand sich zwischen den Linien Syn^{168}/Syn^{168} und $Syn^{168}/TM3$ ein schwacher aber signifikanter Unterschied von $p < 0,05$ (Kolmogorov-Smirnov-Test).

4.2.2.3 Optomotorik

Um einen weiteren möglichen Effekt des Fehlens von Synapsin im Bereich der visuellen Verarbeitung aufzuzeigen wurde das optomotorische Verhalten der Fliege beobachtet. Dazu wurde eine an einem Haken fixierte Fliege auf einen Styroporball gesetzt, den sie durch ihre Beinbewegungen frei in alle Richtungen rotieren lassen kann. Die Rotationen des Balles können durch eine Lichtschranke detektiert und von einem Computer erfasst werden. Die Umgebung der Fliege besteht aus einem sich drehenden Streifenmuster (Abbildung 4.22). Die Drehbewegung des Musters kann von der Fliege wahrgenommen werden und sie antwortet mit einer entgegengesetzten Rotation des Balles, d.h. sie versucht die Musterrotation so zu kompensieren (Wolf und Heisenberg, 1991).

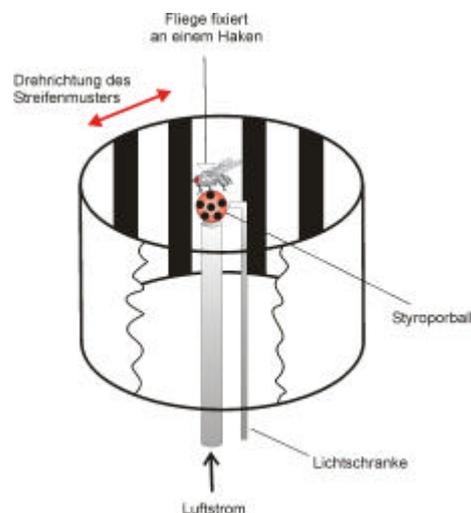


Abbildung 4.22:
Versuchsaufbau zu Messung des optomotorischen Verhaltens von *Drosophila melanogaster*.

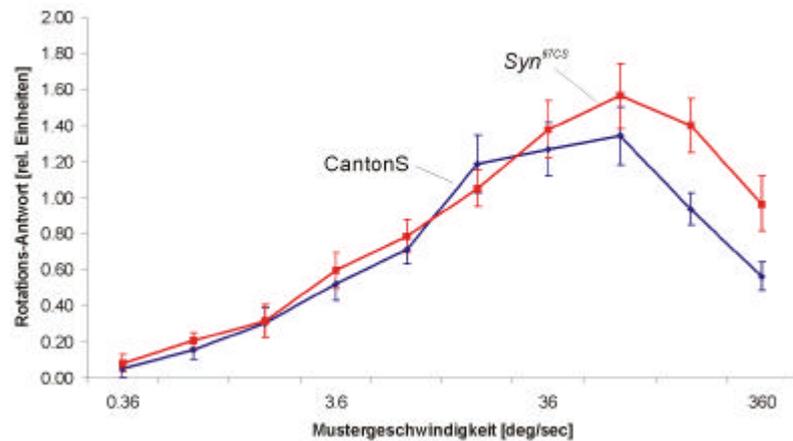
Die Fliege ist an ihrem Thorax an einem Haken befestigt und kann einen auf einem Luftstrom getragenen Styroporball durch ihre Beine frei bewegen. Die Bewegung des Balles wird von einer Lichtschranke erfasst und an einen Computer weitergeleitet. Das Streifenmuster um die Fliege kann in beide Richtungen in unterschiedlicher Geschwindigkeit (deg/sec) gedreht werden.

In diesem Versuch wurden Fliegen aus der Nachkommenschaft der etablierten Linie *Syn*^{97CS} (N= 11) und CantonS (N= 8) getestet. Aus den sich aus den Einzelfliegentests ergebenden Verhaltenskurven wurde eine Mittelwertskurve gebildet (Abbildung 4.23).

Abbildung 4.23:

Optomotorisches Verhalten von Wildtyp und *Syn*-Mutanten.

Dargestellt sind die Rotationsantworten der Fliegen auf das sich mit steigender Geschwindigkeit drehende Streifenmuster. Die Unterschiede bei den schnellen Rotationen sind signifikant ($p < 0,05$). (In Zusammenarbeit mit S. Jatzke)



Im Experiment zeigte sich dass beide Fliegenlinien auf die Rotation des Streifenmusters reagieren können und es zu einer Kompensationsbewegung der Tiere kommt. Dabei zeigen sich keine Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit bei niedrigen Geschwindigkeiten des Musters, jedoch können die CantonS Fliegen ab einer bestimmten Schnelligkeit der Streifenrotation keine adäquate Antwort mehr folgen lassen. Die *Synapsin*-Nullmutanten können anscheinend auch bei höheren Drehgeschwindigkeiten noch mit einer kompensatorischen Reaktion antworten. Der Unterschied der Genotypen ist in diesem Bereich signifikant ($p > 0,05$).

4.2.3 Lernen in *Syn*^{97CS} Mutanten

4.2.3.1 Olfaktorisches Lernen in *Syn*^{97CS} Larven

In einer Zusammenarbeit mit Dr. Bertram Gerber (AG Heisenberg) wurden der etablierte Stamm *Syn*^{97CS} in einem neu entwickelten Lernexperiment für Larven getestet (Gerber et al., 2003). Die Larven von *Drosophila melanogaster* eignen sich aufgrund der Kombination einer komplexen zentralen olfaktorischen Verarbeitung und der im Vergleich zu Adulten drastisch reduzierten Rezeptorzellenanzahl in besonderem Maße für die Untersuchung des assoziativen Lernens. So steht den über 1000 olfaktorischen Rezeptoren in der adulten Fliege eine überschaubare Anzahl von ca. 21 Rezeptorzellen gegenüber (Stocker 1994, 2001). Um die gute elektrophysiologische Zugänglichkeit von identifizierten motorischen Synapsen an der 3. Larve von *Drosophila* mit der Möglichkeit von individuellen Verhaltenstests kombinieren zu können, wurde am Lehrstuhl ein assoziatives Lernparadigma an der Larve entwickelt.

Einen schematischen Überblick über das Lernexperiment gibt die Abbildung 4.24.

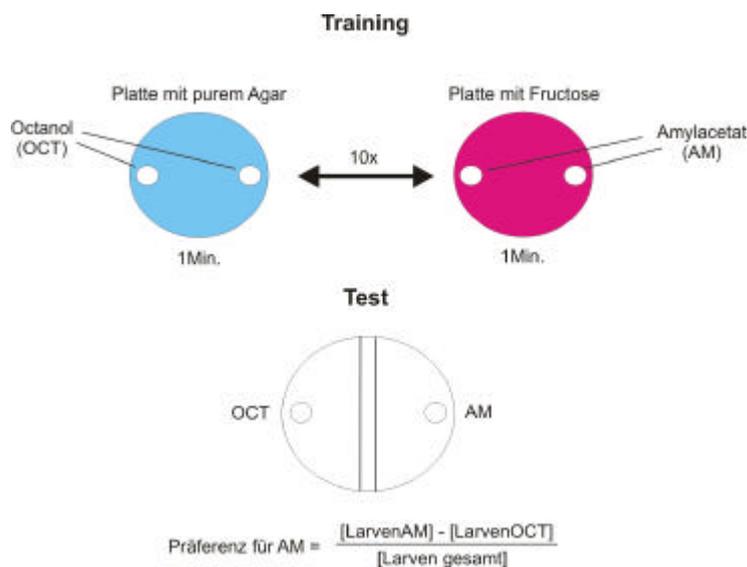


Abbildung 4.24:

Assoziatives olfaktorisches Lernexperiment für Larven von *Drosophila melanogaster*.

Individuelle Tiere werden auf die Assoziation von Amylacetat und Fructose trainiert (AM+/OCT). Gleichzeitig wird eine andere Gruppe von Tieren reziprok (AM/OCT+) vorbereitet. In einem Erinnerungstest wird die Präferenz der Larve für einen der beiden Düfte ermittelt und über eine Zeitspanne die Verteilung der Larven auf beiden Seiten der Testplatte ermittelt. Daraus kann die Präferenz der Larven für Amylacetat über die Zeitspanne ermittelt werden.

In diesem Paradigma wird ein gustatorischer Stimulus (Fructose) als Verstärker verwendet. Die individuelle Larve soll eine Assoziation der Fructose mit dem jeweiligen parallel angebotenen Duftreiz aufbauen. Dafür wird die Larve mehrmals zwischen den Trainingsplatten transferiert. In einem anschließenden Test wird die Larve auf einer Agarplatte beiden Düften ausgesetzt und kann sich frei zu den Düften bewegen. Über eine gewisse Zeitspanne wird die Verteilung der Larven in den beiden Hälften der Platte ermittelt. Daraus kann die Präferenz der Larve zum Amylacetat über die gesamte Zeitspanne ermittelt werden. Die verwendeten Düfte werden dabei in einer durch Vorexperimente ermittelten Konzentration verabreicht, in der die Stimuli ein neutrales Verhalten in naiven Larven hervorrufen.

In diesem Paradigma wurden die 3. Larven von *Syn^{97CS}* und CantonS gegeneinander getestet. Dabei wurden zu Beginn des Experimentes Larven aus den beiden etablierten Stöcken verwendet.

Hier zeigte sich das wildtypische Larven, die im Training der Situation AM+/OCT vorgefunden hatten, im anschließenden Test eine deutliche Präferenz während der Zeitspanne von 5 Minuten zum Amylacetat erkennen ließen. Reziprok trainierte Tiere (AM/OCT+) zeigten eine Präferenz zum vormals mit Fructose assoziierten Octanol. Die Performance-Kurven der Larven zeigen einen signifikanten Lernerfolg mit $p < 0,05$ (U-Test) der Tiere innerhalb der beobachteten Zeit an.

Um sicher zu stellen, dass der fehlende Lernphänotyp in den Mutanten nicht durch eine veränderte Wahrnehmung der Düfte oder der Fructose zustande kommt, wurden die Larven auf ihre Reizaufnahme hin überprüft.

Die Überprüfung auf Unterschiede in der Duftwahrnehmung erfolgte, indem der Larve auf der Entscheidungsplatte zum einen der entsprechende Duft (Amylacetat bzw. Octanol) und im anderen Gefäß kein Duft angeboten wurde. Die Verteilung der Larven in dieser Situation zeigt die Abbildung 4.26.

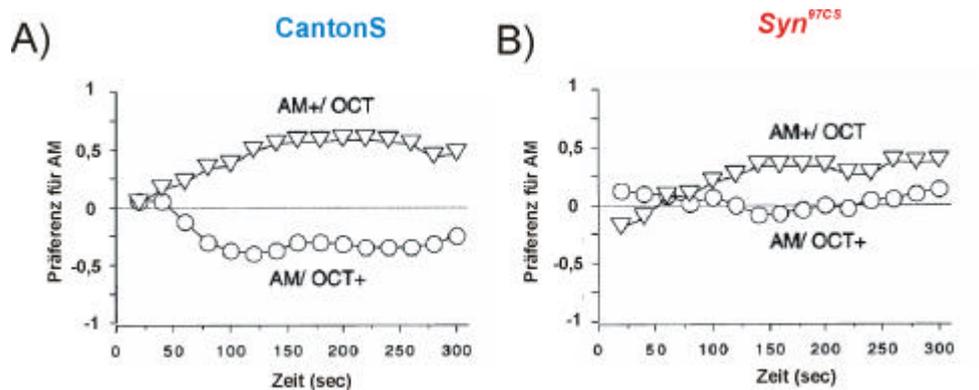


Abbildung 4.25: Test-Performance der Larven von CantonS und *Syn^{97CS}*. Dargestellt ist die Präferenz zum Amylacetat von Larven, die im Assoziations-Training die Kombination Fructose mit Amylacetat [(AM+/ OCT)= Dreiecke] oder die reziproke Trainingssituation [(AM/ OCT+)= Kreise] erfahren haben. Dabei zeigt sich bei CantonS A) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Lernkurven ($p < 0,05$; U-Test), so dass in diesem Fall von einem Lernerfolg der Larven gesprochen werden kann. In der Präferenz der *Synapsin*-Nullmutante (B) zeigte sich kein signifikanter Lerneffekt ($p > 0,05$, U-Test). [N bei CantonS jeweils ca. 40 Larven; N für *Syn^{97CS}* ca. 45] (In Zusammenarbeit mit B. Michels)

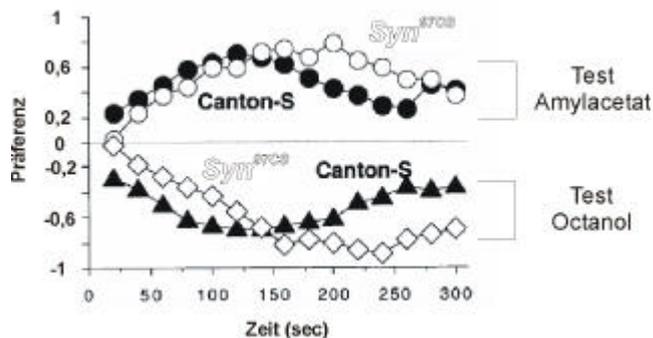


Abbildung 4.26: Überprüfung der olfaktorischen Rezeption im CantonS und *Syn^{97CS}*. Dargestellt ist die Präferenzkurve der Larven, wenn ihnen AM bzw. OCT gegen kein Duft angeboten wird. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. [N in allen Fällen ca. 70] (In Zusammenarbeit mit B. Michels und B. Gerber)

In der Duftwahrnehmung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Beide nehmen den Stimulus wahr und zeigen eine Präferenz für die Seite auf der Entscheidungsplatte, auf der der Duft präsentiert wurde.

Die Überprüfung der gustatorischen Rezeption der Tiere erfolgte auf einer Platte mit zwei unterschiedlichen Hälften. Auf der einen Hälfte wurde der Larve pures Agar angeboten, während sich auf der anderen Seite ein Gemisch von Agar mit Fructose befand. Die Präferenz, d.h. die Anzahl der Larven auf der Seite mit Fructose wurde in einer Zeitspanne von 5 Minuten ermittelt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Graphik gezeigt. Innerhalb der Verteilung der Genotypen bestand kein signifikanter Unterschied, beide wandern auf der Testplatte auf die Seite mit der Agar + Fructose Mischung.

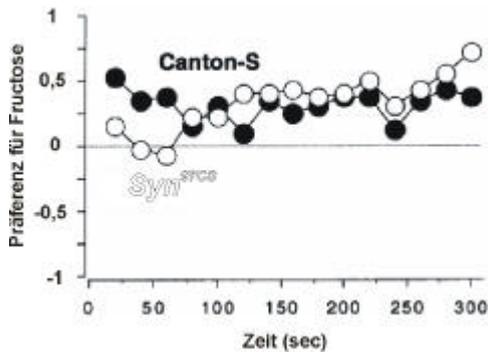


Abbildung 4.27: Überprüfung der gustatorischen Rezeption zwischen CantonS und *Syn^{97CS}*. Dargestellt ist die Präferenzkurve der Larven zur Fructose. Dabei besteht zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied in der Verteilung. [N in allen Fällen ca. 40] (In Zusammenarbeit mit B. Michels und B. Gerber)

Um die Ergebnisse des olfaktorischen Lernens gegen einen möglichen genetischen Hintergrund abzusichern wurde eine erneute Testreihe durchgeführt. Dabei wurden zuerst Fliegen der Linie *Syn^{97CS}* mit dem CantonS Stock gekreuzt. Die heterozygote Nachkommenschaft wurde untereinander gekreuzt, so dass in der Folgegeneration homozygoten CantonS Tiere, homozygote *Syn^{97CS}* Larven und *Syn^{97CS}/ III^{CS}* Tiere auftreten. Larven dieser F2-Generation wurden in einem erneuten assoziativen Lernversuch getestet und danach durch einen single-fly PCR-Ansatz einzeln ihr jeweiliger Genotyp bestimmt. Dadurch waren sowohl der genetische Hintergrundeffekt durch die Geschwistertests minimalisiert und durch die blinde Versuchsdurchführung ein möglicher Einfluss des Experimentators ausgeschlossen. Insgesamt konnten in den Verhaltenstest über 300 Larven getestet werden, die danach der Genotypisierung zur Verfügung standen. In der auf die Larve übertragenen single-fly PCR konnten jedoch nur 173 Larven einwandfrei den verschiedenen Genotypen zugeordnet werden. Die Verteilung der drei Genotypen entsprach dabei der aufgrund der Kreuzung von heterozygoten Tieren erwarteten Genotypverteilung von (1-2-1) (Details siehe Abbildung 4.28). Die Ergebnisse wurden anschließend auf die Verhaltensergebnisse der einzelnen Larve übertragen und die jeweiligen gleichen Tiere für eine Performance-Kurve gemittelt.

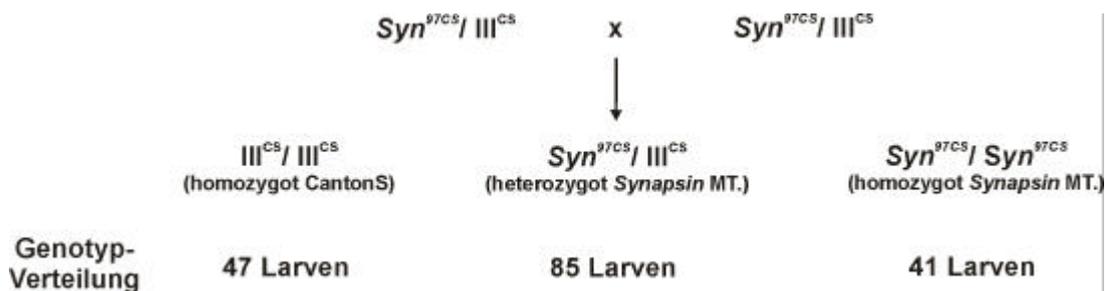


Abbildung 4.28: Zugrunde liegende Kreuzung für die olfaktorischen Verhaltenstest an 3. Larven und Genotypverteilung. Dargestellt ist die zweite Kreuzung zur Erzeugung von Nachkommen mit allen drei möglichen Genotypen. Die Geschwisterlarven wurden durch eine single-fly PCR genotypisch bestimmt. Die ermittelte Verteilung entspricht der erwarteten von 1-2-1.

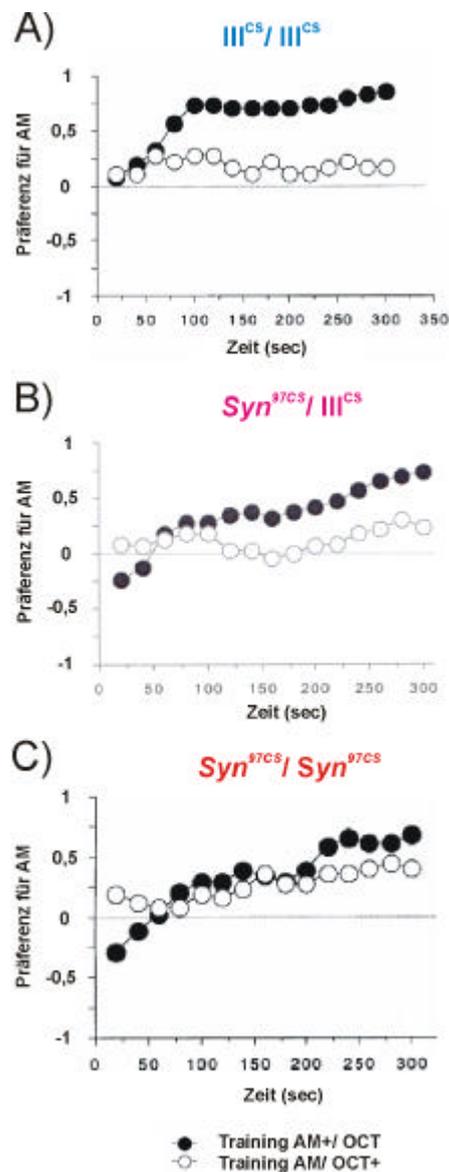


Abbildung 4.29:

Test-Performance der Larven nach olfaktorischer Training. Dargestellt ist die Präferenz zum Amylacetat von Larven, die im Training die Assoziation Fructose mit Amylacetat [(AM+/OCT) = schwarze Kreise] oder die reziproke Trainingssituation [(AM/OCT+) = helle Kreise] erlebt haben. Dabei zeigt sich bei CantonS (A) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Lernkurven ($p < 0,05$; U-Test), so dass in diesem Fall von einem Lernerfolg der Larven gesprochen werden kann. In der Präferenz der *Synapsin*-Nullmutante (C) und der heterozygoten Nullmutante (B) ließ sich kein Lerneffekt nachweisen. Hier war der Unterschied zwischen den Performance-Kurven mit $p > 0,05$ nicht signifikant (U-Test). [N-Werte können der Abbildung 4.28 entnommen werden] (In Zusammenarbeit mit B. Michels und B. Gerber)

4.2.3.2 Visuelles larvales Lernen

Ebenfalls in Zusammenarbeit mit Dr. Bertram Gerber wurden die Mutante *Syn*^{97CS} in einem neu entwickelten visuellen Lernexperiment für Larven getestet (Gerber et al., in prep.). In diesem Paradigma werden ähnliche Versuche durchgeführt wie im olfaktorischen Lernexperiment. Die Larven sollen hier eine Assoziation des visuellen Stimulus, Licht bzw. Dunkelheit mit einer positiven gustatorischen Erfahrung erlernen. Dafür werden die Tiere in wiederholten Trainingssitzungen auf eine der beiden Reizkombinationen trainiert (Licht+/Dunkel oder reziprok Dunkel+/Licht). Im anschließenden Test werden die Larven vor die Wahl zwischen Dunkel und Licht gestellt und können sich auf einer Viersektoren-Platte frei bewegen. Dabei wird die Anzahl der Larven in den verschiedenen Segmenten in bestimmten Intervallen ermittelt und daraus die Präferenz der Tiere zur Dunkelheit errechnet. Einen schematischen Überblick über dieses Lernparadigma zeigt die folgende Abbildung.

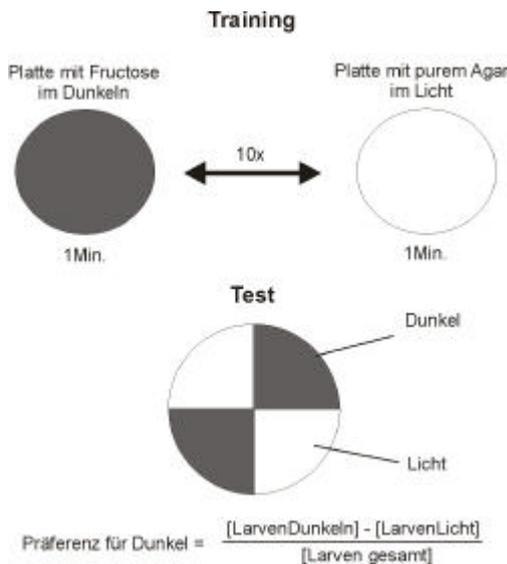


Abbildung 4.30: Assoziatives visuelles Lernexperiment für 3. Larven von *Drosophila*. Die Larven werden in einer 10x wiederholten Trainingsphase der Kombination Licht mit Fructose und Dunkelheit ohne Verstärker (Licht+/Dunkel) ausgesetzt. Parallel wird eine Gruppe von Tieren auf die reziproke Kombination trainiert (Licht/ Dunkel+). In der Testphase wird die Anzahl der Larven in den vier Segmenten ermittelt und die Präferenz der Larve für die Dunkelheit berechnet.

Im Test wurden die Performance-Kurven der Linien *Syn^{97CS}* und CantonS verglichen. Dabei zeigten sich folgende Lernerfolge der Larven (Abbildung 4.31).

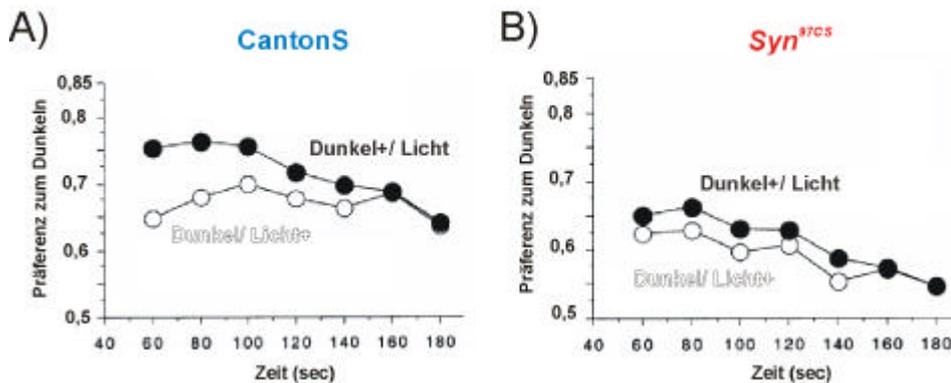


Abbildung 4.31: Test-Performance des visuellen Lernens der Genotypen CantonS und *Syn^{97CS}*. Gezeigt ist die Präferenz der Larven, welche im Training der Situation Dunkelheit + Fructose [(Dunkel+/ Licht)= schwarzer Kreis] bzw. die reziproke Situation [Dunkel/ Licht+]= helle Kreise] ausgesetzt waren. Für CantonS konnte ein signifikanter Lernerfolg ermittelt werden ($p < 0,05$, U-Test), während bei *Syn^{97CS}* kein Unterschied zwischen den Trainingsgruppen besteht ($p = 0,56$; U-Test). [N bei CantonS jeweils ca. 110 Larven; N für *Syn^{97CS}* ca. 103 bzw. 98 Larven] (In Zusammenarbeit mit T. Hendel und B. Gerber)

Die Auswertung der Performance-Kurven der Linie CantonS zeigte zwischen den beiden Trainingssituationen einen signifikanten Unterschied von $p = 0,04$ (U-Test). Demnach können Larven dieses Genotypes eine Assoziation des Stimulus Fructose mit den visuellen Reizen, Licht oder Dunkelheit, aufbauen. Der Vergleich der Testkurven der *Synapsin*-Nullmutante zeigte in diesem visuellen Lernparadigma keinen Lernerfolg, der Vergleich der Kurven fiel in diesem Genotyp mit $p = 0,56$ (U-Test) nicht signifikant aus.

Wie im olfaktorischen Lernen der Larven muss auch hier eine Überprüfung der Wahrnehmungsfähigkeit der einzelnen Reize in den verschiedenen Larven ausgetestet werden. Die gustatorische Rezeption wurde dabei schon im vorangehenden Abschnitt überprüft und zeigte keine Auffälligkeit (siehe Abbildung 4.27). Die Wahrnehmung der visuellen Stimuli wurde mit einer zweigeteilten Platte getestet. Die Larven konnten sich frei zu der hellen oder dunklen Hälfte bewegen, während die Verteilung der Tiere über 3 Minuten ermittelt wurde. Dabei ergab sich die in der folgenden Graphik dargestellte Verteilung.

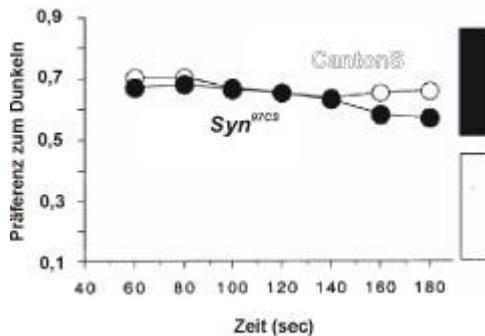


Abbildung 4.32: Überprüfung der visuellen Rezeption zwischen CantonS und *Syn*^{97CS}. Dargestellt ist die Präferenzkurve der Larven zur dunklen Seite einer Petrischale. Dabei besteht zwischen den beiden Genotypen kein signifikanter Unterschied in der Verteilung. (In Zusammenarbeit mit T. Hendel und B. Gerber)

In der Auswertung zeigte sich für beide Genotypen eine deutliche Präferenz für die abgedunkelte Seite der Petrischale. Zwischen den verschiedenen Larven zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; U-Test). Somit beruht das Fehlen des Lernphänotyps in der Mutante nicht auf einem Defekt in der Reizaufnahme der Tiere.

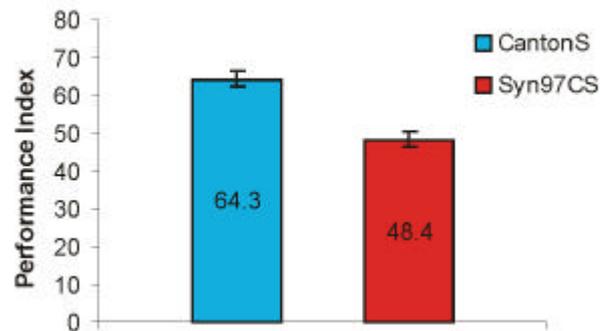
4.2.3.3 Olfaktorisches Lernen in adulten Fliegen

Die Experimente zum olfaktorischen assoziativen Lernen wurden mit einem leicht modifizierten Paradigma nach Tully und Quinn (1985) von Martin Schwaerzel (AG Heisenberg; Schwaerzel et al., 2002) durchgeführt. Aufgrund der für den Versuch notwendigen Anzahl von Versuchstieren konnten in diesem Paradigma keine Experimente mit anschließender Genotypisierung der Geschwistertiere durchgeführt werden. Es wurde der ausgekreuzte Stamm *Syn*^{97CS} und die für die Rückkreuzung verwendete CantonS Linie getestet.

Dabei wurden die Fliegen so trainiert, dass sie einen Duft mit einer Bestrafung in Form eines elektrischen Stromschlags assoziieren, während der zweite Duft unbestraft bleibt. Der Lern- oder Performance Index (PI) wurde dann dadurch ermittelt, dass man die Fliegen zwischen den beiden Düften wählen lässt. Eine Fliege welche die Assoziation Duft und negative Erfahrung (Schock) vollzogen hat, läuft in diesem Paradigma zu dem vormals unbestraften Duft, so dass der Performance Index positiv ist. Der Test des Lernerfolgs erfolgte drei Minuten nach dem Training. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.33 dargestellt.

In der Auswertung des Versuches zeigte sich in der Linie *Syn*^{97CS} eine ca. 25% Reduktion im Lernindex im Vergleich mit dem Wildtyp. Dieser Unterschied ist mit $p < 0,0001$ (ANOVA) signifikant.

Abbildung 4.33:
Assoziatives olfaktorisches Lernen.
Performance Index (PI) der Linien CantonS (blau) und *Syn^{97CS}* (rot) im olfaktorischen Lernparadigma von Tully und Quinn. Die Reduktion im PI zwischen den Linien ist signifikant ($p < 0,0001$; t-Test, N= 80 bis 100) (In Zusammenarbeit mit M. Schwaerzel)



Um auszuschließen, dass die Reduktion des Performance Index auf einer schlechteren Wahrnehmung der Düfte bzw. der elektrischen Bestrafung beruht, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Dabei nutzt man bei der Duftwahrnehmung das natürliche spontane Vermeidungsverhalten der Wildtypfliegen auf einen Duft aus. In den Kontrollversuchen (Abb. 4.34) zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen der Mutante und CantonS in der Vermeidung der Düfte (A, t-Test= 0,32) und der Reaktion auf den elektrischen Schock (B, t-Test= 0,63).

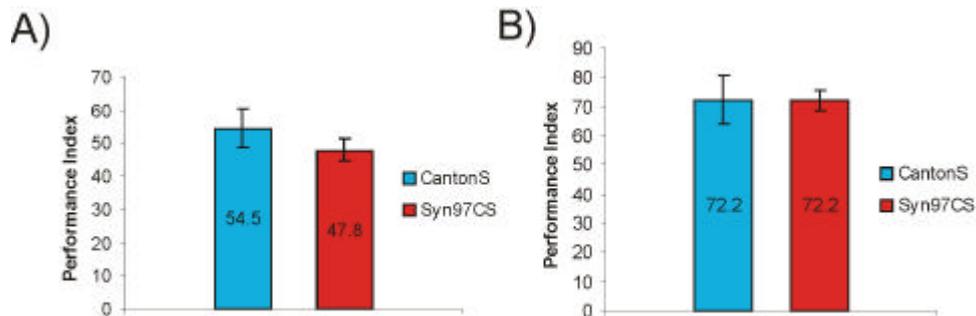


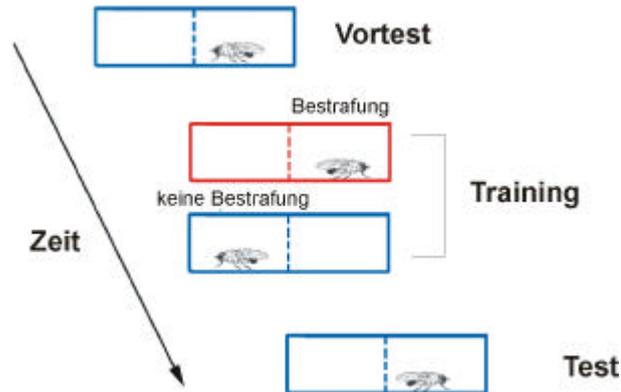
Abbildung 4.34: Kontrollversuche zum olfaktorischen Lernen.
A) Dargestellt sind die Performance Indices der Linien in der spontanen Duftvermeidung. Die beiden Werte sind nicht signifikant unterschiedlich. B) Dargestellt sind die PIs in der Vermeidung der elektrischen Bestrafung. [N zwischen 80 und 100] (In Zusammenarbeit mit M. Schwaerzel)

4.2.3.4 *Syn^{97CS}* Lernverhalten in der Hitzebox

In diesem Paradigma werden Fliegen konditioniert, eine Hälfte einer Hitzebox zu vermeiden (Wustmann et al., 1996). Die Hitzebox besteht aus einer engen Kammer, an deren Boden und Decke sich jeweils ein Peltier-Element zum schnellen Aufheizen bzw. Abkühlen der Kammer befindet. Das Experiment teilt sich in drei Stufen auf (siehe Abbildung 4.35). In einem Vortest kann die Fliege sich frei in der Kammer bewegen ohne „Bestrafung“. In der anschließenden Trainingsphase wird der Eintritt der Fliege in eine Hälfte der Hitzebox mit einem Aufheizen der gesamten Kammer auf ca. 40° C bestraft. Die Kammer wird wieder auf Raumtemperatur gekühlt wenn die Fliege die andere Seite betritt. Danach erfolgt die Testphase in der keine Bestrafung der Fliege erfolgt, wenn sie in die zuvor mit Bestrafung assoziierte Seite tritt. Während der gesamten Zeit wird die Position der Fliege gemessen und der Performance Index (PI) der jeweiligen Fliege ermittelt. Der PI ist 0, wenn die Fliege sich

gleich lange in beiden Kammerhälften aufhält, -1 bzw. +1 sie ausschließlich auf der Hitze-assoziierten Seite bzw. auf der nicht Hitze-assoziierten Seite bleibt (weitere Details zum Versuch, bzw. zur Berechnung: siehe Dissertation G. Putz, 2002).

Abbildung 4.35:
Schematische Darstellung des
Versuchsablaufs der Hitze-
box.
Das Experiment gliedert sich
in drei Phasen auf. Nur in der
Trainingsphase wird eine
Seite der Kammer mit Hitze
bestraft. In der anschlie-
ßenden Testphase wird der
Lernerfolg der Fliegen
ermittelt (nähere Details siehe
Text).



In Zusammenarbeit mit G. Putz (AG Heisenberg) wurden die *Synapsin*-Nullmutante auf ihr Verhalten in der Hitzebox getestet. Dabei wurde noch während der Rückkreuzung der *Syn⁹⁷* Fliegen in den CantonS Hintergrund (siehe Abschnitt 4.2.1) eine Paarung von heterozygoten Tieren angesetzt (siehe Abb. 4.28). In der Folgegeneration konnten Fliegen mit drei verschiedenen Genotypen erwartet werden, nämlich homozygote CantonS Fliegen, heterozygote *Syn⁹⁷/+* Fliegen und homozygote *Syn⁹⁷* Mutanten im Verhältnis von 1:2:1. Diese Fliegengeschwister, die sich äußerlich nicht unterscheiden, wurden zuerst im Lernparadigma in der Hitzebox getestet und danach durch eine single-fly PCR genotypisch charakterisiert (siehe 3.3.3). Durch diese Vorgehensweise wurden unbeabsichtigte Einflussnahmen des Experimentators auf die Ergebnisse ausgeschlossen (Blindversuch).

Von den insgesamt 303 Fliegen, welche in der Hitzebox getestet wurden, konnten 268 für eine spätere Auswertung des Versuches verwendet werden. Die restlichen hatten sich z.B. in der Kammer nicht bewegt und wurden daher ausgeschlossen. In der single-fly PCR konnten von den 268 Fliegen nur 199 durch eindeutige Signale in der PCR genotypisch bestimmt werden. Die Genotypverteilung zeigt nicht ganz das erwartete Zahlenergebnis. So waren von den 199 Fliegen insgesamt 61 CantonS homozygot, 75 heterozygot (*Syn⁹⁷/+*) und weitere 63 Fliegen konnten dem homozygoten *Syn⁹⁷* Genotyp zugeordnet werden. Die Daten der Genotypverteilung wurden anschließend mit den Verhaltensdaten gepaart und die jeweiligen Gruppen von Tieren zusammengefasst. Dabei ergaben sich die in der Abbildung 4.36 dargestellten Performance Indices für die einzelnen Genotypen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen aufgezeigt werden. Die Hitzevermeidung der heterozygoten *Synapsin* Fliegen scheint geringfügig verschlechtert im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen, jedoch ist auch dieser Unterschied nicht signifikant. In der Testphase zeigten alle drei Gruppen einen Lernerfolg, der in den Mutanten möglicherweise etwas schneller wieder absinkt (nicht signifikant).

Eine Auswertung der Laufaktivität der Fliegen in der Hitzebox während der drei Phasen ergab ebenfalls keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen (Abb. 4.36). Alle drei Gruppen zeigen einen Abfall der Aktivität während der Dauer des Experimentes.

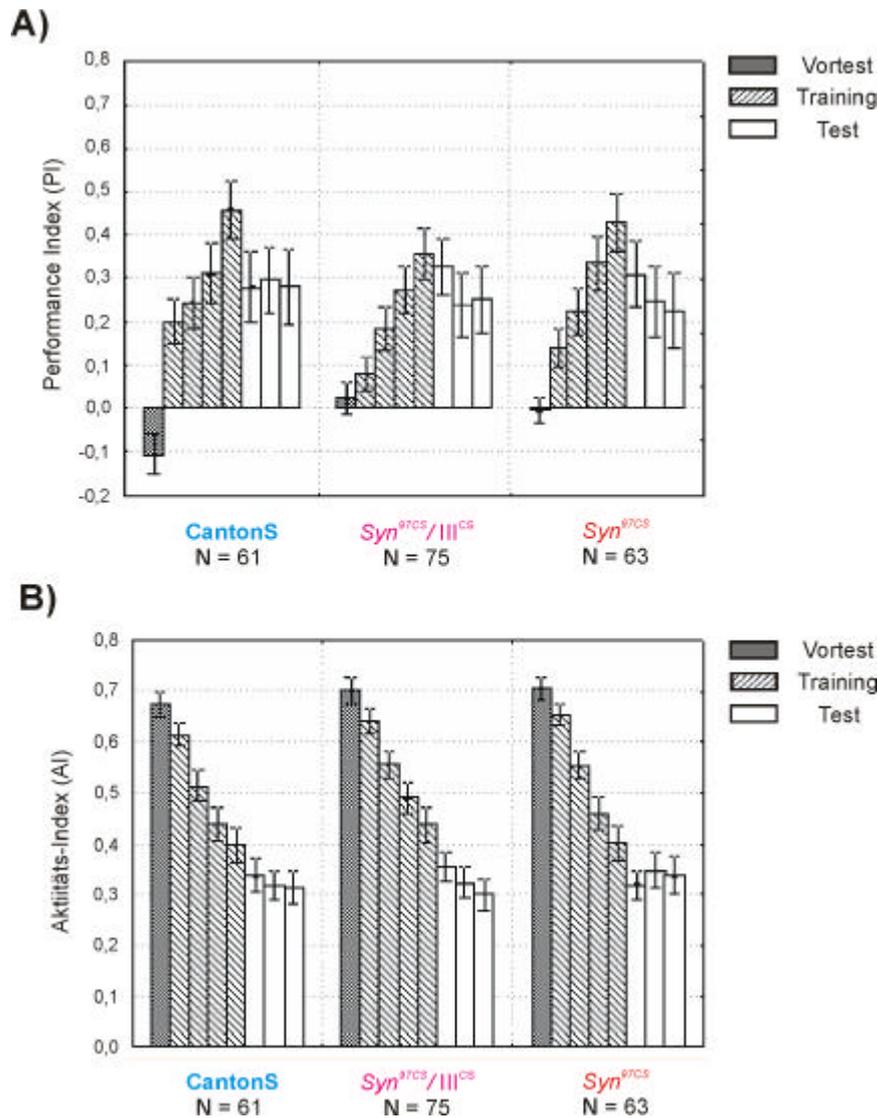


Abbildung 4.36: Hitzebox Performance der verschiedenen Genotypen.

Die Graphik zeigt den Vortest (30 Sekunden), Training und Test (in jeweils 1 Minuten Blöcke vereinigt).

A) zeigt den Lernerfolg der Fliegen an. Alle drei Genotypen zeigen während des Trainings eine Zunahme in der Vermeidung der mit Hitze bestrafte Seite. In heterozygoten Tieren ist die Hitzevermeidung etwas niedriger, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Im anschließenden Test zeigen alle Gruppen einen Lernerfolg der untereinander nicht signifikant ist.

B) Aktivitätsmessung der Fliegen während des Hitzeboxexperimentes.

In allen drei Genotypen kommt es im Laufe des Experiments zu einer Abnahme der Aktivität. Die Unterschiede der Genotypen untereinander sind dabei nicht signifikant. (In Zusammenarbeit mit G. Putz)

In einem erneuten Ansatz des Experimentes wurden Tiere aus dem neu etablierten *Syn^{97CS}* Stamm mit dem für die Rückkreuzung verwendeten CantonS Stamm verglichen. Dabei ergab sich für die Linien folgendes Ergebnis (Abb.4.37).

In der Trainingsphase zeigen *Synapsin*-Mutanten eine verringerte Hitzevermeidung, diese ist signifikant unterschiedlich zum Wildtyp ($p < 0,05$). Auch in dem anschließenden Gedächtnistest zeigen die Mutanten eine verringerten PI, der allerdings nicht signifikant verschieden zum Wildtyp ist. Betrachtet man die Gruppen nach Geschlecht aufgetrennt ergibt sich das folgende Bild (Abb. 4.38). Hier zeigt sich, dass *Synapsin* Männchen signifikant verringerte PIs in den beiden letzten Phasen des Trainings aufweisen. Auch in der letzten Phase des Gedächtnistest 3 Minuten nach Training kommt es bei *Syn^{97CS}* Männchen zu einem signifikant geringeren PI als bei der CantonS Vergleichsgruppe. In den Aktivitätsdaten wichen die beiden Genotypen in keiner Phase von einander signifikant ab, daher wird auf eine Darstellung verzichtet.

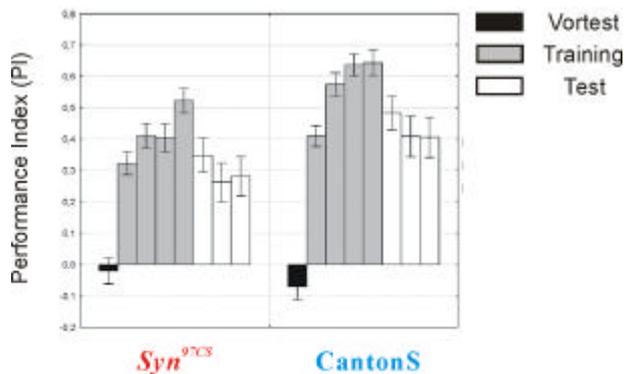


Abbildung 4.37:

Performance Index der Linien *Syn^{97CS}* und *CantonS*. Dargestellt ist der Performance Index in den verschiedenen Phasen. Synapsin Mutanten zeigen eine geringere Hitzevermeidung ($p > 0,05$) und einen verringerten Performance Index ($p = 0,1$) im Gedächtnistest. [N in beiden Gruppen ca. 130] (In Zusammenarbeit mit G. Putz)

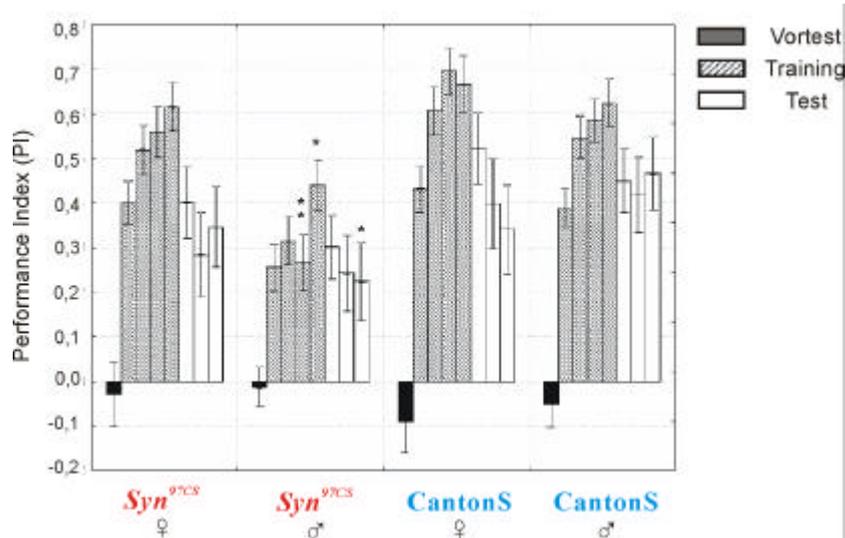


Abbildung 4.38:

Performance Index der Linien *Syn^{97CS}* und *CantonS* nach Geschlecht aufgetrennt. Dargestellt ist der Performance Index in den verschiedenen Phasen des Experimentes. Synapsin Männchen zeigen dabei am Ende des Trainings einen signifikant kleineren PI als die anderen Gruppen. Auch ist der Gedächtnisverlust nach 3 Minuten signifikant größer. [N in allen Gruppen zwischen 66-75] (In Zusammenarbeit mit G. Putz)

4.2.3.5 Courtship Suppression in *Syn^{97CS}* Männchen

In diesem Lernparadigma werden Fliegenmännchen auf eine Unterdrückung ihres Balzverhaltens konditioniert (Siegel und Hall, 1979; Kamyshev et al., 1999). Dabei wird in einer kleinen Kammer ein Männchen mit einem schon befruchteten Weibchen für ein 30minütiges „Training“ zusammengebracht. Das Männchen lernt in dieser Phase, die Abwehrreaktionen (kicking) des Weibchens gegenüber seinen Kopulationsversuchen mit dem spezifischen Duft des befruchteten Tiers zu assoziieren. Im Laufe des „Trainings“ unterdrückt das Männchen Verhaltensmerkmale der Balz, wie z.B. Orientierung zum Weibchen, Verfolgung oder Vibration, stattdessen zeigt es z.B. Umherlaufen oder Ruhepausen. Durch die Beobachtung des Verhaltens kann der Courtship Index (CI) ermittelt werden. Der CI ist die Zeit, die das Männchen mit Balzverhalten verbringt in Prozent der Gesamtzeit in der Kammer. 0 min, 30 min oder 180 min nach dem Training wird dem Männchen in einem 5minütigen Test ein neues befruchtetes Weibchen in der Kammer angeboten. Durch die negative Erfahrung im Training zeigt das Männchen auch bei diesem Partner zunächst kein

Balzverhalten. Diese Unterdrückung des Balzverhaltens klingt im Wildtyp im Verlauf mehrerer Stunden wieder ab, was durch einen Wiederanstieg des CI nachgewiesen werden.

In diesem Lernparadigma wurden die Männchen von *Syn^{97CS}* mit Männchen von CantonS verglichen. Dabei wurde der CI sowohl in der Trainingsphase, als auch zu verschiedenen Zeitabständen in der anschließenden Testphase ermittelt. Die Daten sind in der Abbildung 4.39 zusammengefasst.

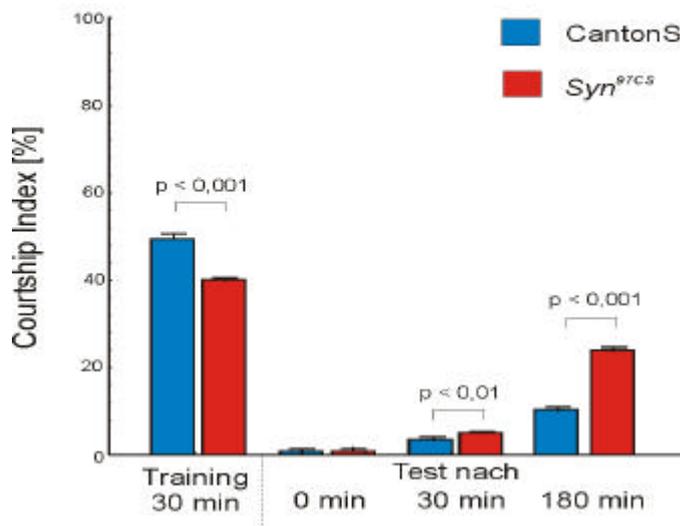


Abbildung 4.39: Courtship Index (CI).

Dargestellt ist der ermittelte CI für CantonS und *Syn^{97CS}* Männchen im Courtship Suppression Lernparadigma. Während des 30minütigen Trainings mit einem bereits verpaarten Weibchen zeigen *Syn*-Mutanten zu einem signifikant geringeren Prozentsatz Balzverhalten. In Test nach 30 bzw. 180 Minuten zeigt die CantonS Gruppe einen signifikant langsameren Wiederanstieg des CI als die *Synapsin* Fliegen. [N = 20, in beiden Fällen] (In Zusammenarbeit mit E. Nikitina)

Im Experiment zeigten Männchen des Mutantenstammes *Syn^{97CS}* einen reduzierten CI innerhalb der 30 Minuten Trainingsphase. Der ermittelte CI war mit $p < 0,001$ signifikant kleiner als in der CantonS Gruppe. Direkt an das Training anschließend zeigen beide Genotypen eine nahezu vollständige Unterdrückung des Balzverhaltens. Der CI steigt danach kontinuierlich wieder an, jedoch ist der Anstieg bei *Syn^{97CS}* sowohl nach 30 Minuten als auch nach 180 Minuten signifikant stärker als im Wildtyp, d.h. die Mutanten „vergessen“ schneller.

4.3 In-vivo Calcium Imaging

4.3.1 Lokalisation der Transgen-Insertion in Cameleon 2.0 Fliegen

Fliegen, die das Cameleon 2.0 Konstrukt unter UAS-Kontrolle in ihrem Genom integriert hatten wurden von Dr. Ch. Schuster (Tübingen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach seinen Angaben war die cDNA des Cameleon-Fusionsproteins über die NotI Restriktionsschnittstelle in den pUAST-Vektor eingebracht und mit diesem transposablen Element eine Keimbahntransformation durchgeführt worden. Seine Untersuchungen der etablierten Fliegenlinie wiesen auf eine oder mehrere Insertionen des Transposons auf dem zweiten und/ oder auf dem dritten Chromosom hin. Daher wurden die Fliegen auch über einem Doppelbalancer-Chromosom für das zweite und dritte Chromosom (STM) gehalten. Der übersendete Fliegenstamm ließ sich nur sehr schwer halten, und da für spätere Kreuzungen mit Gal4-Linien die Lokalisation des pUAST-Vektors wichtig war, wurde in zwei Ansätzen versucht die Lage sowie die Anzahl der Insertionen zu ermitteln.

Dabei folgte ein Weg dem klassischen Kreuzen mit Balancer-Chromosomen (TM3/TM6 bzw. Sco/CyO), der andere Ansatz verwendete eine Inverse PCR am pUAST-Vektor. Dabei sollten die Methoden auf ein gleiches Ergebnis der Lokalisation der Insertion kommen, wobei der große Vorteil der Inversen PCR ist, dass hier eine auf die Base genaue Festlegung der Insertionsstelle auf dem Chromosom möglich ist. Zwei Insertionen auf demselben Chromosom können nur in der Inversen PCR einwandfrei lokalisiert werden.

4.3.1.1 Kreuzungen

Diese Methode liefert darüber Aufschluss, ob die Insertionen ausschließlich auf einem der beiden Chromosomen liegen oder ob beide Chromosomen ein P-Element tragen. Aufgrund der Ergebnisse lässt sich aber zunächst keine Aussage treffen, ob auf einem Chromosom mehrere Insertionen stattgefunden haben. In der Abbildung 4.40 ist das zugrunde liegende Kreuzungsschema dargestellt. Es wurde in zwei Ansätze versucht die Insertion in der betroffenen Linie aufzudecken. Zum einen wurde eine Kreuzung mit TM3/TM6 Fliegen angesetzt und nach dem gleichen Prinzip eine Kreuzung mit dem Stamm Sco/CyO.

Beide Ansätze führten zu der Interpretation, dass die Insertion nur auf dem 3. Chromosom stattgefunden hat. So fanden sich in der Kreuzung mit der Fliegenlinie Sco/CyO in der F2 Generation Nachkommen mit normaler Flügelausprägung und weißen Augen. Diese Fliegen sind nur unter der Annahme zu erklären, dass sich keine Insertion auf dem zweiten Chromosom befindet. Auch die Nachkommenschaft aus der Kreuzung mit TM3/TM6 Fliegen konnte nur mit dieser Einschränkung erklärt werden. Durch die Lokalisation durch das klassische Kreuzen mit Balancer-Linien kann aber keine genauere Angabe gemacht werden, ob es in der betreffenden Linie zu mehrmaligen Insertionen des pUAST-Vektors gekommen ist. Um dies zu klären wurde eine genauere Lokalisation mit Hilfe der Inversen PCR durchgeführt.

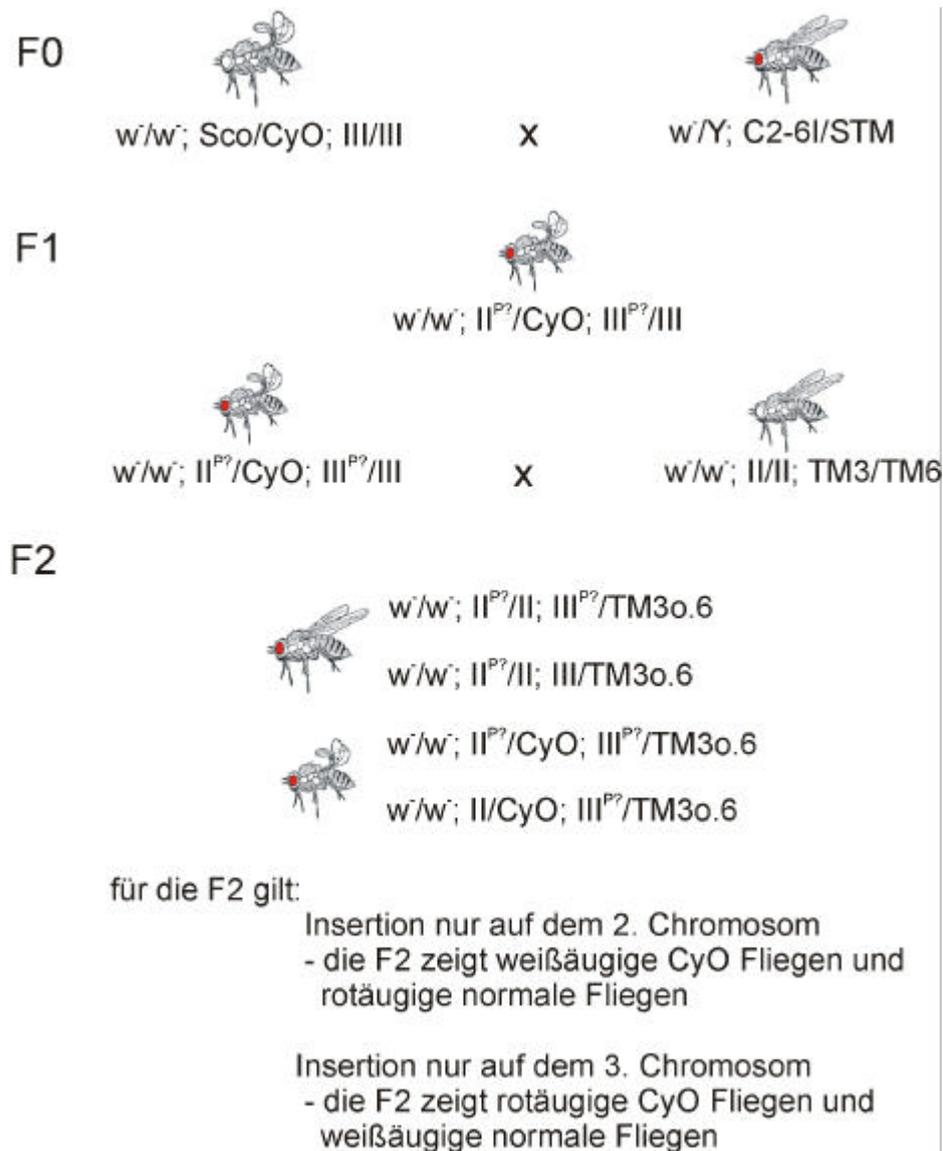


Abbildung 4.40:

Kreuzungsschema für die Lokalisation der Insertion in der von Ch. Schuster hergestellte Linie C2-6I.

Dargestellt ist die Kreuzung mit *Sco/CyO* Fliegen, parallel wurde eine Kreuzung mit *TM3/TM6* Fliegen in der F0 durchgeführt. Dementsprechend ändern sich die Bedingungen für die F2 Generation.

4.3.1.2 Inverse PCR

Diese Methode beruht auf einer speziell auf den pUAST-Vektor angepassten Modifikation der Inversen PCR von B. Dalby (Dalby et al., 1995) und wurde in einer Zusammenarbeit mit Thomas Spall (eigene Arbeitsgruppe) durchgeführt. Mit Hilfe einer PCR und einem anschließenden Vergleich der Sequenz des PCR-Produktes mit dem vollständig sequenzierten Genom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist es so möglich, die Insertion auf die Base genau zu detektieren. Dabei wird die an das P-Element angrenzende Sequenz sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung ansequenziert. Im Falle von pUAST grenzt die genomische Sequenz aus dem HpaII-Ansatz direkt an das 5'-Inverted Repeat des transposablen Elementes, die gewonnene Basenabfolge aus einem HaeIII-Ansatz schließt sich an das 3'-Ende von pUAST an (Details siehe Methoden-Teil Abschnitt 3.8).

Eine Inverse PCR mit genomischer DNA aus der Linie C2-6I ergab verschiedene Banden, die im Folgenden getrennt ausgewertet werden.

HpaII-Ansatz: 450 bp Bande

Die durch die Primer pUAST-HpaII-1/2 erhaltene Sequenz enthielt keinen Vektoranteil, welcher aber aufgrund der Lage der Primer hätte auftreten müssen. Ein Vergleich mit der Datenbank zeigte eine Übereinstimmung mit dem Klon AE003579, welcher auf dem linken Arm des 2. Chromosoms im Bereich 23F1-24B1 lokalisiert ist. Eine genaue Überprüfung des betroffenen Genomabschnittes ergab dann, dass der Primer pUAST-HpaII-1 mit 14 Basen im Klon übereinstimmt und auch 10 Basen des zweiten Primers pUAST-HpaII-2 im Klon vorkommen. Ein mögliches PCR-Produkt, welches zwischen diesen beiden Stellen amplifiziert werden würde, hätte eine Größe von ca. 370 bp. Aufgrund dieses Hinweises auf ein mögliches PCR-Artefakt kann dieser Bereich nicht als Insertionsort gelten. Auf eine Darstellung der Sequenz wird im Anhang verzichtet.

HpaII-Ansatz: 750 bp Bande

Beide Primer lieferten eine insgesamt 426 bp lange genomische Sequenz, welche an beiden Enden mit dem Vektoranteil versehen ist. Eine Datenbanküberprüfung zeigte eine Zuordnung auf dem 3. Chromosom, rechter Arm im Bereich 84F4 (AC008094). Die Insertion erfolgte in diesem Fall in die 5'-Region des vorhergesagten Gens CG9636 über dessen Funktion noch keine Aussage gemacht werden kann. Die Sequenz ist im Anhang genauer dargestellt.

HaeIII-Ansatz 400 bp Bande

Hier zeigte sich aufgrund der kurzen Leseweite in der Sequenzierung mit pUAST-HaeIII-4 Primer nur Vektoranteil. Der zweite PCR-Primer (pUAST-HaeIII-3) konnte aber eine ebenfalls auswertbare Basenabfolge liefern, in der 26 Basen umgeben sind von Sequenzen aus dem Vektor. Diese 26 Nukleotide zeigen eine Übereinstimmung mit AE003537, ab der Base 252145 des Klons, welcher auf dem 3. Chromosom im Bereich 70B2 lokalisiert ist. Das P-Element wäre ca. 1 kb entfernt von einem vorhergesagten Gen CG32130 mit unbekannter Funktion inseriert, auf der anderen Seite ist die Entfernung zum Gen CG10089, das für eine vermutete Protein-Phosphatase kodiert ca. 7,2 kb groß.

Aus den oben aufgeführten Ergebnissen zur Lokalisation der P-Element Insertion(en) in der Fliegenlinie C2-6I lässt sich eine einheitliche Aussage treffen. Die klassische Methode der Kreuzungen, belegt eine pUAST-Insertion auf dem dritten Chromosom. Durch die Sequenzierung der PCR-Produkte konnte nachgewiesen werden, dass es sich um eine doppelte Insertion des Vektors in der Region 70B2, als auch in der Region 84F handelt. Die genaue Lokalisierung im Genom von *Drosophila melanogaster* ist in Abb. 4.41 angegeben.

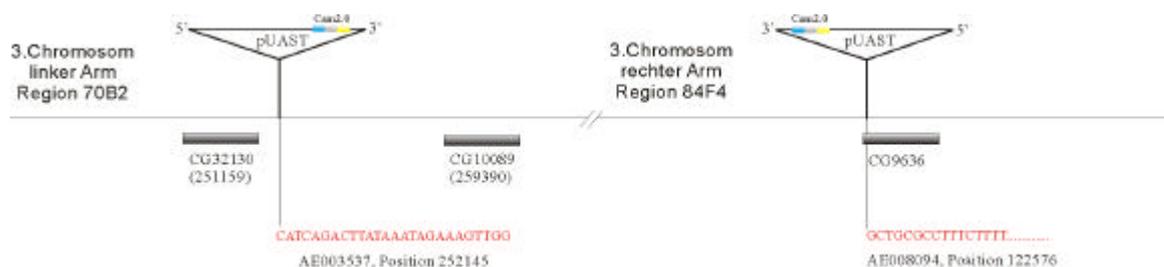


Abbildung 4.41:

Darstellung der beiden Insertionen der Cameleon 2.0 Konstrukte in der Linie C2-6I/STM.

Dargestellt sind die aus der Inversen PCR abgeleiteten Insertionen des pUAST-Vektors auf dem 3. Chromosom von *Drosophila melanogaster*. Angegeben ist in rot die Sequenz aus dem PCR-Produkt, wie auch ihre Lokalisation im Genom laut Berkeley D.G.P.. Ebenfalls sind postulierte Gene in der Nähe der Insertion angegeben. Die Zahlen der Abbildung beziehen sich auf den Insertionsort im jeweiligen Klon.

4.3.2 Cameleon 2.0 Konstrukt

Die cDNA des Fusionsproteins Cameleon 2.0 wurde uns ebenfalls von Dr. Ch. Schuster zur Verfügung gestellt. Laut seiner Beschreibung war die Ausgangs-DNA in den Vektor pUAST über eine NotI Ligation eingebracht. Dies konnte durch einen Verdau des Vektors überprüft werden, in dem sich eine 9 kb Bande (Vektor) und eine 2 kb Bande (Cameleon2.0) ergaben. Das Konstrukt wurde sequenziert und mit der Cameleon 2.0 Originalsequenz von R. Tsien verglichen. In der erhaltenen Sequenz fanden sich einige Basenaustausche die im Folgenden kurz dargestellt werden. Dabei werden nur die Abweichungen angegeben, die auch zu einem Austausch der betreffenden Aminosäure führen.

I. Position: 99. Base/ 26. Aminosäure im ECFP

Sequenz von R. Tsien:	AAG	Lysin/ K
eigene Sequenz:	AGG	Arginin/ R

Diese Mutation wurde als eine neu eingebrachte ECFP-Mutation beschrieben (Miyawaki et al., 1999).

II. Position: 628. Base/ 203. Aminosäure im ECFP

Sequenz von R. Tsien:	ACC	Threonin/ T
eigene Sequenz:	TCC	Serin/ S

Diese Mutation wurde in keiner Veröffentlichung beschrieben.

III. Position: 657. Base/ 212. Aminosäure

Sequenz von R. Tsien:	AAG	Lysin/ K
eigene Sequenz:	AAC	Aspargin/ N

Diese Mutation wurde als eine neu eingebrachte ECFP-Mutation beschrieben (Miyawaki et al., 1999).

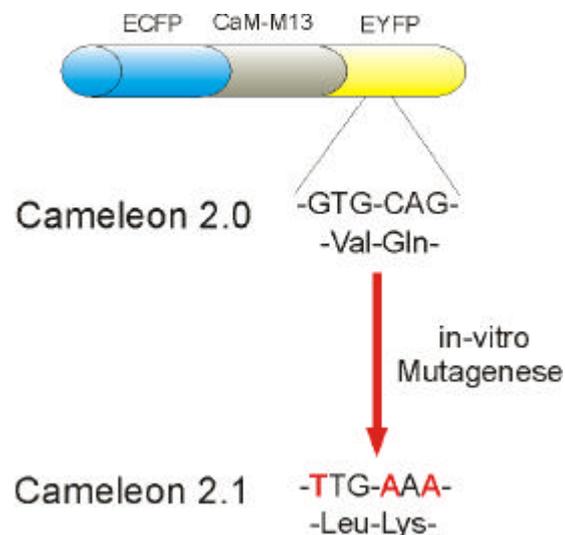
Insgesamt fanden sich in dem Konstrukt von Ch. Schuster vier Abweichungen von der Sequenz von R. Tsien. Davon führte eine zu keinem Austausch der Aminosäure und hat somit keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Indikators. Zwei weitere Mutationen konnten in späteren Publikationen als Verbesserungen im ECFP gefunden werden, so dass der Wechsel wahrscheinlich im Cameleon 2.0 Protein gewollt war. Eine Mutation im ECFP auf Position 203 führt jedoch zu einem Austausch der Aminosäure von Threonin, einer neutralen und polaren Aminosäure, zu Serin, mit einer ebenfalls neutralen und polaren Seitengruppe. Da es durch den Austausch der Aminosäure jedoch zu keiner Veränderung in den chemischen Eigenschaften der Seitenkette in der betreffenden Position kam und auch Dr. Ch. Schuster mit injizierten Fliegen die Funktionsfähigkeit des Calcium-Sensor gezeigt hatte wurde auf eine Rückmutation der codierenden Basen verzichtet.

Ein genauer Vergleich der Sequenzen findet sich im Anhang 9.2.

4.3.3 Mutation Cameleon 2.0 zu Cameleon 2.1

Um ausgehend von dem Calcium-Sensors Cameleon 2.0, die in der pH-Wert Abhängigkeit verbesserte Version Cameleon 2.1 (Miyawaki et al., 1999) zu erhalten, wurde eine in-vitro Mutagenese durchgeführt. Ziel der Mutagenese war der Austausch der Aminosäuren 68 (Valin) und 69 (Glutamin) im Enhanced Yellow Fluorescent Protein zu der neutral, hydrophoben Säure Leucin und der basischen Aminosäure Lysin. Um dies zu erreichen wurden die betreffenden Codons so mutiert, dass die cDNA nun für die ausgewechselten Aminosäuren codiert.

Abbildung 4.42:
Schematische Darstellung des Calcium-Sensors Cameleon. Gezeigt sind die betreffenden Codons im EYFP, die für die Mutagenese von Cameleon 2.0 zu 2.1 verändert wurden. Die in der Mutagenese ausgetauschten Basen sind rot markiert.



Um die Mutagenese erfolgreich durchzuführen wurde die cDNA aus dem pUAST-Vektor (insgesamt ca. 11 kb) in den kleineren pBluescriptKS-Vektor (insgesamt ca. 5 kb) eingebracht. Dieses Konstrukt diente als Ausgangsmaterial für die in-vitro Mutagenese. Nach der PCR wurde das Fusionsprotein wieder über die NotI Schnittstelle in den für die Keimbahntransformation benötigten Vektor pUAST transferiert. Eine anschließende Sequenzierung zeigte dann den geglückten Austausch der Basen im EYFP und die richtige Orientierung der cDNA Insertion an. Der Vektor stand nun für eine Keimbahntransformation in *Drosophila melanogaster* zur Verfügung.

4.3.4 Cameleon 2.1 Fliegen

Der verbesserte Calcium-Indikator Cameleon 2.1 wurde durch eine Transformation in die Keimbahn der Fliege eingebracht. Insgesamt wurden 150 Embryonen injiziert, aus denen sich 120 bis zur Larve entwickelten. Mit dem Ausgangsstamm w^{1118} wurden die geschlüpften Fliegen verbreitert und die Nachkommenschaft auf das Auftreten von roten Augen untersucht. Die rotäugigen Individuen wurden nach Verbreiterung untereinander gekreuzt und so versucht homozygote Linien zu etablieren. Insgesamt wurden folgende Linien erhalten:

Linie	Augenfärbung	etablierte homozygote Linie
Cam2.1 / 4	leicht orange	nein
Cam2.1 / 48	orange	nein
Cam2.1 / 53	orange	ja
Cam2.1 / 65	rötlich	ja
Cam2.1 / 72	rötlich bis rot	ja
Cam2.1 / 76	rötlich	ja
Cam2.1 / 82	rot	ja

Tabelle 4.43:
Die Tabelle gibt einen Überblick über die aus der Keimbahntransformation hervorgegangenen Linien. Cam2.1 / 4 und 48 konnten leider nicht als homozygoter Stamm etabliert werden.

Bis auf die Linien Cam2.1/ 4 und Cam2.1/ 48 konnten die Linien als homozygoter Stock etabliert werden. Sie standen nun weiteren Experimenten zum in-vivo Calcium Imaging zur Verfügung.

4.3.5 Lokalisation der Insertion in den neu etablierten Cameleon 2.1 Linien

Um für spätere Experimente, z.B. Rekombinationen mit Gal4 Treiberlinien, die genaue Lage des pUAST-Cam2.1 Konstrukt im Fliegen-genom zu bestimmen wurde, wie im Falle der C2-6I Linie, die Lokalisation durch Kreuzungen und Inverse PCR vorgenommen.

4.3.5.1 Kreuzungen

Das Kreuzungsschema folgt dem in Abbildung 4.40 dargestellten Muster. Aufgrund des geschlechtsunspezifischen Auftretens der roten Augenpigmentierung in den ersten Verbreiterungskreuzungen kann eine Insertion des Vektors auf dem X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* in allen Linien ausgeschlossen werden. Durch das Kreuzungsschema lässt die Verteilung der weißen Augen in der F2 Generation einen Rückschluss auf die Lokalisation der Insertion zu. Im konkreten Fall ergaben sich folgende Hinweise:

Linie	Cam2.1/4	Cam2.1/48	Cam2.1/53	Cam2.1/65	Cam2.1/72	Cam2.1/76	Cam2.1/82
Insertion	2. Chrom.	3.Chrom.	2.Chrom.	3.Chrom.	3.Chrom.	3.Chrom.	2.Chrom.

Tabelle 4.44: Lokalisation der Insertion des pUAST-Vektors in den neu etablierten Cameleon 2.1 Fliegenlinien abgeleitet aus Kreuzungen mit TM3/TM6 bzw. Sco/CyO Linien.

4.3.5.2 Inverse PCR

Wie bereits in der Linie C2-6I/STM wurde auch in den neu etablierten Stämmen mit den Cameleon 2.1 Konstrukten versucht, die genaue Lage der Insertion des P-Elementes mit Hilfe einer Inversen PCR zu ermitteln. Im Folgenden werden die einzelnen Linien getrennt besprochen.

4.3.5.2.1 Cameleon 2.1/ 53

In dieser Linie fanden sich im HpaII- und im HaeIII-Ansatz der Inversen PCR Banden, die getrennt ausgewertet wurden. Dabei zeigte sich wie bei der Lokalisation der Cameleon 2.0 Insertion eine Bande bei ca. 450 bp im HpaII Ansatz, welche durch Sequenzierung als eine Artefaktbande identifiziert werden konnte (siehe 4.3.1.1). Auf die erneute Darstellung wird daher verzichtet. Die anderen Banden werden nun getrennt interpretiert, ihre Sequenz ist im Anhang dargestellt.

HpaII-Ansatz: 400 bp Bande

Das erhaltene PCR-Produkt konnte mit beiden Primern ansequenziert werden, wobei in beiden Fällen eine Vektorsequenz in der Gesamtsequenz gefunden werden konnte. Ein Datenbankvergleich ergab eine Übereinstimmung mit dem Klon AC007476. Dieser liegt auf dem 2. Chromosom im Bereich von 49A-B. Aufgrund der Sequenz konnten die acht Basen ermittelt werden, die unmittelbar auf das 5'-Ende des pUAST-Vektors folgen. Sie lauten: CCC TGA TT. Eine Untersuchung des Klons zeigte eine HpaII Schnittstelle auf, die in einem Abstand von 139 Basen lag. Da im PCR-Produkt durch die Lage der Primer im Vektor schon ca. 300 bp aus Vektoranteil bestehen, bestätigt die postulierte Produktgröße von ca. 440 bp das tatsächlich gefundene Amplifikat.

HaeIII-Ansatz: 250 bp Bande

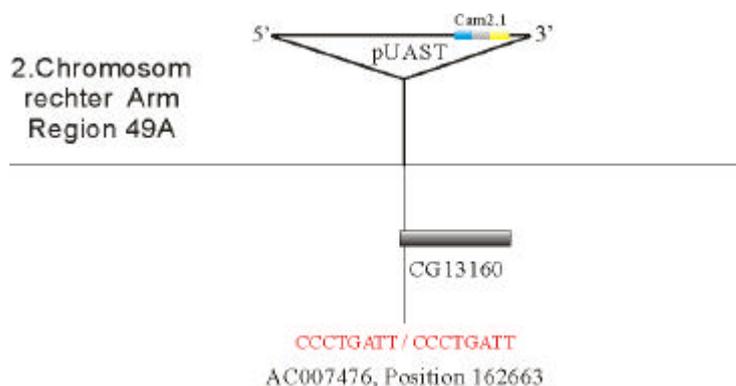
Auch im HaeIII-Ansatz konnte ein Produkt aufgereinigt und sequenziert werden. Aufgrund der geringen Größe enthielt die Sequenz am Beginn und am Ende einen Vektoranteil. Der so eingeschlossene genomische Anteil lag bei 67 Basen und konnte auf den rechten Arm des 2. Chromosom (AC007476, Region 49A-B) lokalisiert werden. Es konnten so ebenfalls die unmittelbar an das 3'-Ende des Vektors angrenzende Basenabfolge ermittelt werden: CCC TGA TT. Ein aufgrund der Insertion berechnetes PCR-Produkt sollte bei ungefähr 280 bp erscheinen (220 bp Vektroanteil + 61 bp genomischer Abschnitt), dies deckt sich mit dem auf dem Gel gefundenen 250 bp Fragment.

Daten aus beiden PCR-Ansätzen zeigen übereinstimmend, dass die Insertion auf dem 2. Chromosom innerhalb der 5'-Region des vorhergesagten Gens CG13160 erfolgte, über dessen mögliche Funktion noch keine Aussage getroffen wurde. Dieser Befund steht auch im Einklang mit dem Resultat der Kreuzungen, aufgrund der Ergebnisse lässt sich die Lage des Vektors in der Linie Cam 2.1/ 53 wie folgt angeben.

Abbildung 4.45.:

Dargestellt ist die Lokalisation des pUAST-Cameleon 2.1 Vektors in der Linie Cam 2.1/ 53.

Angegeben ist der Klon laut Berkeley D.G.P. und die genaue Position der Insertion in dem betreffenden Klon. Die aufgrund der Sequenzen aufgezeigte 8 Basen Duplikation um den Insertionsort ist in rot dargestellt. Die Insertion liegt innerhalb des vorausgesagten Gens CG13160.



4.3.5.2.2 Cameleon 2.1/ 65

In dieser Linie konnte die Inverse PCR mit beiden Ansätzen erfolgreich durchgeführt werden. Die isolierten Banden konnten mit den Primern sequenziert werden und die erhaltene Sequenz wurde mit der Datenbank verglichen. Im Folgenden werden die Ansätze getrennt besprochen. Die jeweiligen Sequenzen befinden sich im Anhang 9.3.

HpaII-Ansatz: 500 bp Bande

Im HpaII-Ansatz konnte zusätzlich zu der Artefaktbande bei ca. 450 bp noch eine größere Bande bei ca. 500 bp isoliert und sequenziert werden. Die Datenbanküberprüfung zeigte eine Übereinstimmung innerhalb des Klons AC004333 an, welcher auf dem rechten Arm des 3. Chromosoms liegt. Durch die Sequenz konnte die ans 5'-Ende des Vektors angrenzende Basenabfolge ermittelt werden, sie lautet: GTT CAA CG. Eine Überprüfung des Klons und der postulierten Insertionsstelle ergab, dass die Größe des PCR-Produkts mit den Primern pUAST-HpaII-1 und 2 ca. bei 510 bp liegen sollte.

HaeIII-Ansatz: <250 bp

Das in der Inversen PCR produzierte Amplifikat besaß eine sehr geringe Größe, was auf einen sehr geringen genomischen Anteil schließen lässt. Die Sequenzierung ergab dann auch nur einen 9 Basen umfassenden Bereich, der zu beiden Seiten umgeben war von Vektoranteilen. Eine Datenbankuntersuchung mit einer so kurzen Sequenz ist nicht sinnvoll, aber ein Vergleich mit der Sequenz aus dem HpaII-Ansatz zeigte, dass es sich bei den Basen um die im oberen Ansatz gefundene Duplikation um den Insertionsort des P-Elementes handelt. Der Klon besitzt unmittelbar stromabwärts der postulierten Insertionsstelle eine genomische HaeIII Schnittstelle, so dass auch hier eine Übereinstimmung von postulierter und gefundener Amplifikatgröße festgestellt werden konnte.

Übereinstimmend mit den Resultaten der Kreuzungen liegt demnach die Insertion des pUAST-Vektors in der Linie Cam 2.1/ 65 auf dem 3. Chromosom im Bereich des Klon AC004333. In der Nähe der Insertionsstelle liegt kein bekanntes oder vorhergesagtes Gen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Graphik dargestellt.

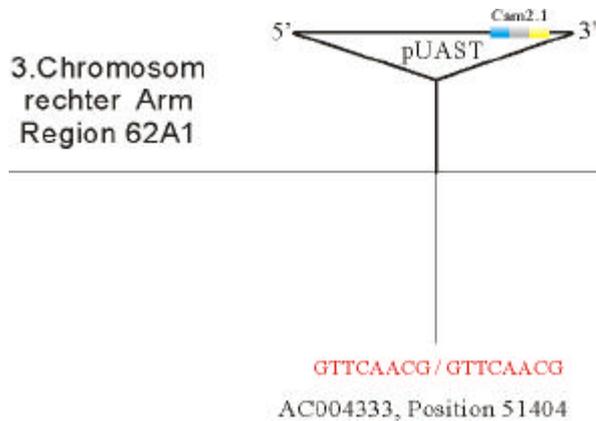


Abbildung 4.46.:

Lokalisation des pUAST-Cameleon 2.1 Vektors in der Linie Cam 2.1/ 65.

Angaben ist der Klon laut Berkeley D.G.P. und die genaue Position der Insertion in dem betreffenden Klon. Die aufgrund der Sequenzen aufgezeigte 8 Basen Duplikation um den Insertionsort ist in rot dargestellt.

4.3.5.2.3 Cameleon 2.1/ 72

In dieser Fliegenlinie konnte nur mit dem HaeIII-Ansatz ein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Im HpaII-Ansatz konnte auch nach mehrmaliger Wiederholung kein Amplifikat erzeugt werden. Bei einer erneuten PCR mit dem HaeIII-Ansatz, aber den Primer pUAST-HpaII-1 und 2 entstand jedoch ein Produkt, welches genomischen Anteil unmittelbar am 5'-Ende des P-Elementes beinhaltete. Die einzelnen Ergebnisse werden nun getrennt besprochen, dabei werden die genauen Sequenzabfolgen im Anhang dargestellt.

HaeIII-Ansatz: ca. 350 bp Bande

Das PCR-Produkt wies bei Sequenzierungen mit beiden Primern nur 84 Basen genomischen Anteil auf, welcher an beiden Seiten von Vektoranteilen umgeben war. Die Überprüfung der Sequenz zeigte eine Übereinstimmung mit dem Klon AC007647 auf. Dieser Klon liegt auf dem 3. Chromosom in der Region 89B. Der genomische Abschnitt beginnt mit den Basen: ATC CGT TA und entspricht der Basenabfolge innerhalb des 1. Introns des Gens *taranis* (*tara*). Eine genaue Betrachtung des relevanten Bereiches mit den Schnittstellen lässt bei der angenommenen Insertionsstelle ein PCR-Produkt von 305 bp erwarten.

HaeIII-Ansatz mit den Primern pUAST-HpaII-1 und 2: 950 bp Bande

In diesem Ansatz wurde wie durch die Lage der Primer erwartet ein sehr großer Vektoranteil gefunden. Mit einem weiteren Primer pUAST-HaeIII-5 konnte jedoch in die an das 5'-Ende des Vektors angrenzende genomische Sequenz sequenziert werden. Diese Sequenzierungsreaktion lieferte zwar nur relativ schwache Signale, aber im unmittelbar angrenzenden Bereich können die ersten acht Basen eindeutig identifiziert werden (ATC CGT TA). Im weiteren Bereich können ebenfalls Übereinstimmungen mit dem Klon AC007647 entdeckt werden. Auf eine Darstellung der Sequenz im Anhang wird aufgrund der Identifizierungslücken verzichtet.

In dieser Linie liegt die Insertion im 1. Introns des Gens *tara*. Dabei konnte der HaeIII-Ansatz ebenfalls durch die Verwendung der HpaII Primer ausgewertet werden. Die in dieser PCR entstandene Bande entsprach mit ca. 950 bp der aufgrund der vermuteten Insertion berechneten Bande von 965 bp und zeigte in der Ansequenzierung die gleichen acht Anfangsbasen, wie der normale HaeIII-Ansatz. Die vorangegangenen Kreuzungen hatten ebenfalls eine Lokalisation des Vektors im Bereich des 3. Chromosoms vorhergesagt. Die Lage des Cameleon 2.1 Konstruktes in der Linie Cam 2.1/ 72 ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

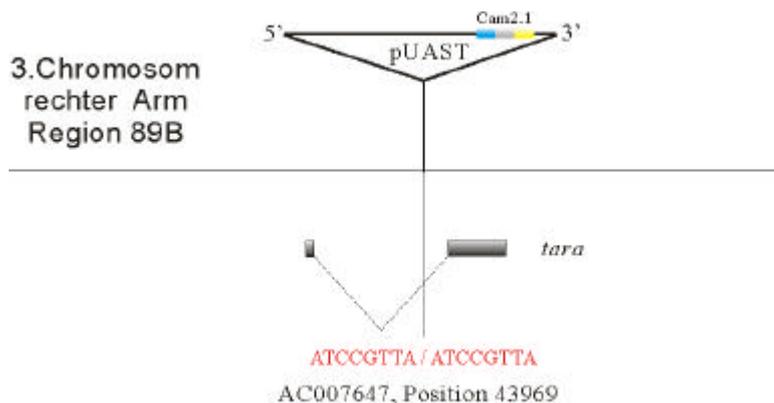


Abbildung 4.47:

Lokalisation des pUAST-Cameleon 2.1 Vektors in der Linie Cam 2.1/ 72.

Angaben ist der Klon laut Berkeley D.G.P. und die genaue Position der Insertion in dem betreffenden Klon. Die aufgrund der Sequenzen aufgezeigte 8 Basen Duplikation um den Insertionsort ist in rot dargestellt. Die Lage des P-Elementes konnte auf den Bereich des 1. Introns des Gens *tara* festgelegt werden. Aufgrund der Größe des Introns ist die Genstruktur hier nur schematisch dargestellt.

4.3.5.2.4 Cameleon 2.1/ 76

In dieser Linie konnte mit beiden Ansätzen ein PCR-Produkt ermittelt werden, welches durch Sequenzierung weiter analysiert wurde. Dabei fand sich im HpaII-Ansatz eine Bande von ca. 800 bp und im HaeIII-Ansatz ein Produkt bei 950 bp. Beide Produkte werden nun erläutert, die Sequenzen sind im Anhang angegeben.

HpaII-Ansatz: 800 bp

Das PCR-Produkt konnte mit dem Primer pUAST-HpaII-1 sequenziert werden. In der Sequenz fanden sich Anteile des Vektors und ein 250 Basen umfassender Bereich, der in einer Datenbanksuche eine Übereinstimmung mit Klon AC009537 zeigte. Dieser Klon liegt auf dem dritten Chromosom in der Region 82E. Um auch die unmittelbar an das P-Element angrenzende Sequenz zu erhalten wurde das PCR-Produkt mit einem Primer aus dem 250 bp Bereich weiter sequenziert. Dadurch war es möglich die acht Basen am 5'-Ende des P-Elementes zu ermitteln. Sie lauten GCC AAA GG. Eine Überprüfung der HpaII Schnittstellen im betreffenden Klon bestätigte die gefundene Größe des Inversen PCR Produkts.

HaeIII-Ansatz: 950 bp

Das erhaltene Produkt konnte mit beiden dazugehörigen Primern sequenziert werden. Dabei lieferte der Primer pUAST-HaeIII-3 die unmittelbare Sequenz am 3'-Ende des Vektors. Sie zeigte die acht Basenduplikation um den Insertionsort auf (GCC AAA GG). Die restliche Sequenz konnte ebenfalls im Klon AC009537 gefunden werden und bestätigte das Ergebnis

aus dem HpaII-Ansatz. Auch die Sequenz des zweiten Primers enthielt neben Sequenzen aus dem Vektor einen Bereich genomischer DNA, welcher mit der Insertionsstelle übereinstimmt.

In dieser Linie konnte durch beide Inversen PCR Ansätze eine Lokalisation des P-Elementes auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms nachgewiesen werden. Dabei befindet sich die Insertion innerhalb eines Exons des postulierten Gens CG31536 im Klon AC009537. Das Gen wurde aufgrund von Homologien als mögliches Zytoskelett Bindungsprotein eingestuft, weitere molekulare Untersuchungen wurden am Genlokus noch nicht durchgeführt. Die aufgrund der Position des P-Elementes erwarteten PCR-Amplifikate stimmen in beiden Ansätzen mit den tatsächlich gefundenen Signalen überein. Die Lage des pUAST-Cam 2.1 Vektors ist in der folgenden Graphik dargestellt.

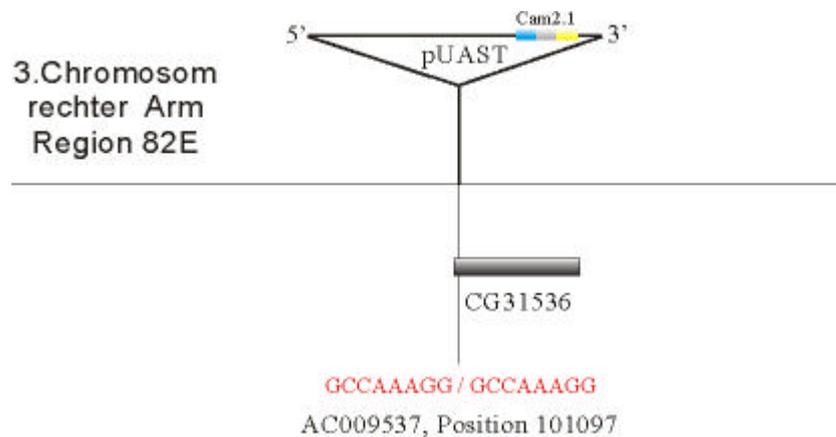


Abbildung 4.48: Darstellung der Lokalisation des pUAST-Cameleon 2.1 Vektors in der Linie Cam 2.1/ 76.

Angaben ist der Klon laut Berkeley D.G.P. und die genaue Position der Insertion in dem betreffenden Klon. Die aufgrund der Sequenzen aufgezeigte 8 Basen Duplikation um den Insertionsort ist in rot angegeben. Daneben ist die Lage innerhalb des Gens CG31536 schematisch dargestellt.

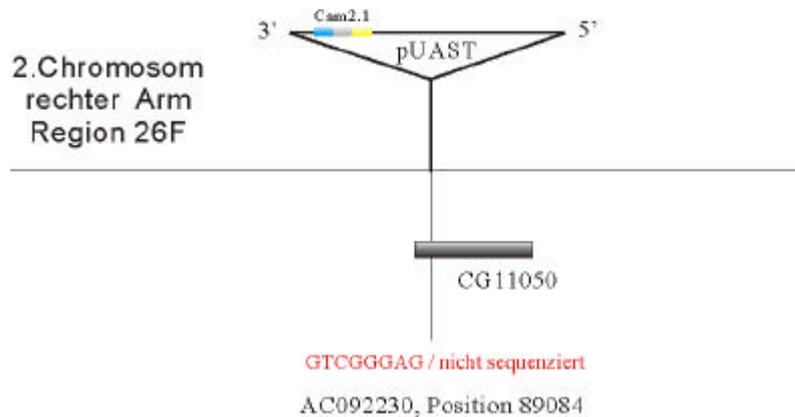
4.3.5.2.5 Cameleon 2.1/ 82

In dieser Linie konnte trotz mehrmaliger Wiederholung kein PCR-Produkt im HpaII-Ansatz entdeckt werden. Nur eine Bande im HaeIII-Ansatz konnte isoliert und sequenziert werden. Die Bande erschien bei ca. 350 bp und zeigte nach der Sequenzierung einen genomischen Anteil von 94 Basen auf. Der Datenbankvergleich ergab die Lokalisation innerhalb des kodierenden Bereiches des postulierten Gens CG11050, über dessen Funktion noch keine Aussage getroffen wurde. Die Insertion fand somit im Klon AC092230 statt, welcher auf dem 2. Chromosom im Bereich 26F liegt. Nimmt man den postulierten Insertionsort als Grundlage, müsste sich rechnerisch ein Fragment mit einer Größe von 315 bp ergeben. Somit ist das tatsächlich gefundene Produkt nur geringfügig größer als erwartet. Die errechnete Bande für den HpaII-Ansatz wäre bei ca.830 bp zu erwarten. Aufgrund des in der Sequenz enthaltenen Vektoranteils kann aber ein Artefakt ausgeschlossen werden. Die Position der P-Element Insertion ist in der folgenden Graphik dargestellt.

Abbildung 4.49.:

Lokalisation des pUAST-Cameleon 2.1 Vektors in der Linie Cam 2.1/ 82.

Angegeben ist der Klon laut Berkeley D.G.P. und die genaue Position der Insertion in dem betreffenden Klon. Die aufgrund der Sequenzen aufgezeigte 8 Basen Duplikation um den Insertionsort ist in rot angegeben. Daneben ist die Lage innerhalb des Gens CG11050 schematisch dargestellt.



4.3.6 Elektrophysiologische Untersuchung der Cam 2.1/ 82 Linie

Um zu überprüfen, ob die Expression des Calciumsensors aufgrund seiner Bindung von freiem Calcium einen Effekt auf die synaptische Übertragung hat, wurde eine Kreuzung der Cameleon 2.1/ 82 Linie mit einer panneuronale exprimierende Gal4-Linie Nrv2-Gal4-3 angesetzt. Am Nerv-Muskel Präparat der Larven aus dieser Kreuzung wurden von Ch. Leibold aus der Arbeitsgruppe elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden die exzitatorischen Potentiale (EJP = excitatory junctional potentials) aus Muskeln der Körperwand abgeleitet mit denen von w^{1118} Larven verglichen.

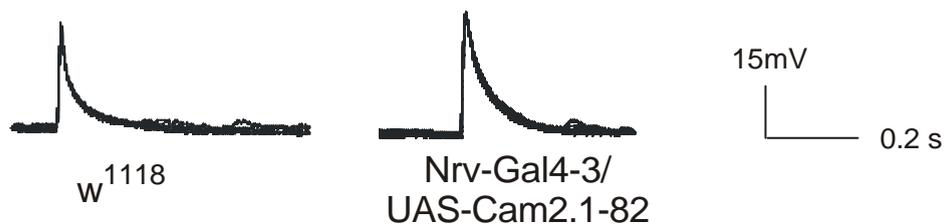


Abbildung 4.50:

Vergleich der EJPs aus larvalen neuro-muskulären Präparaten zwischen w^{1118} und der Cameleon 2.1 exprimierenden Linie Cam2.1/ 82/ Nrv2-Gal4-3. In den Graphen wurden fünf EJPs übereinander gelegt. (Zusammenarbeit mit Ch. Leibold)

Der Unterschied zwischen den beiden Signalen liegt innerhalb der Streubreite wildtypischer EJPs. Die elektrophysiologischen Untersuchungen ergaben danach keinen Hinweis auf einen offensichtlichen Einfluss des Cameleon 2.1 Fusionsprotein auf die synaptischen Transmission.

4.3.7 Untersuchung zur Expressionsstärke der etablierten Cameleon 2.1 Linien

Kopfhomogenate von Fliegen der fünf etablierten pUAST-Cameleon 2.1 Linien wurden auf einem Western Blot auf ihre unterschiedlich starke Expression hin untersucht. Dazu wurden die Linien mit der Linie Nrv2-Gal4-3 gekreuzt und die Köpfe der Nachkommen einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen.

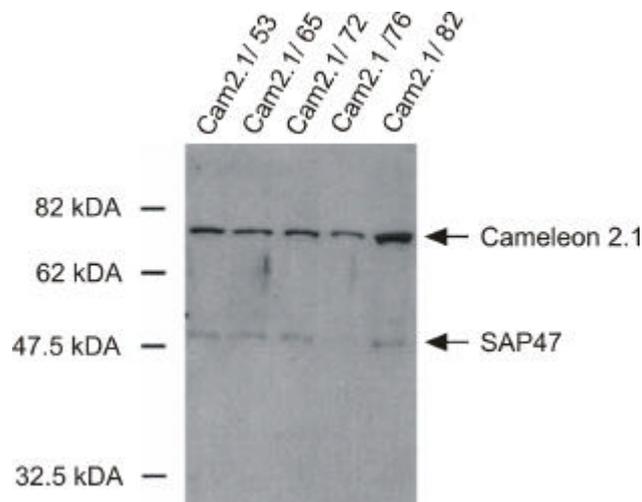


Abbildung 4.51:

Western Blot der Kopfhomogenate der verschiedenen Cameleon 2.1 Linien. Die Expression wurde durch die Gal4-Linie Nrv2-Gal4-3 getrieben. Cameleon 2.1 zeigt eine Bande bei ca. 74 kDa, als Beladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen Sap47 verwendet.

Auf den Western Blot zeigte sich, dass die Linie Cam2.1/ 82 die stärkste Expression aufwies. Dieser Eindruck konnte durch die Kreuzung der Cameleon 2.1 Linien mit der Gal4-Linie 201Y im Fluoreszenzmikroskop bestätigt werden. Die Linie 201Y treibt die Expression des Fusionsproteins im Pilzkörper von *Drosophila melanogaster* und diente für die ersten Experimente zum in-vivo Calcium Imaging. In diesen Experimenten zeigte die Linie Cam2.1/ 82 ebenfalls eine deutlich stärkere Fluoreszenz als die anderen Transformanten.

4.3.8 Expression von Cameleon 2.1 in *Drosophila melanogaster*

Um die Funktionsfähigkeit des Calcium-Sensors in-vivo nachzuweisen wurde von Dr. A. Fiala aus der Arbeitsgruppe eine primäre Zellkultur von Neuronen angelegt. Das Cameleon-Konstrukt wurde durch die Gal4-Linie 201Y selektiv nur in den Kenyonzellen des Pilzkörpers exprimiert (Diegelmann et al, 2001). Mit diesen Zellkulturen konnte die Funktionsfähigkeit des Proteins bei einer Kalium-Chlorid Depolarisation der Neuronen nachgewiesen werden. Dabei ließen sich ein Anstieg der Fluoreszenz des EYFP bei 535 nm und ein Absinken der Emission des ECFP bei 485 nm messen. Das Verhältnis der Fluoreszenz bei 535 nm zu der bei 485 nm stieg also nach der Depolarisation an.

In weiteren Experimenten wurde das Cameleon 2.1 Konstrukt mit Hilfe von mehreren Gal4-Linien in verschiedenen Bereichen des adulten Fliegengehirns exprimiert. Dabei wurde vor allem Linien mit Gal4-Expression auf verschiedenen Verarbeitungsebenen der olfaktorischen Wahrnehmung ausgewählt. So kann der Calcium-Sensor in den Antennalloben, Pilzkörpern oder in Projektionsneuronen selektiv exprimiert werden. Durch eine Öffnung in der Kopfkapsel von *Drosophila* im Bereich anterior zu den Ocellen können mit einem Fluoreszenzmikroskop die Calciumsignale in den durch einen Duftreiz aktivierten Geweben untersucht werden. Diese Experimente wurden von Thomas Spall und Dr. André Fiala vorangetrieben und in weiterführenden Arbeiten genauer besprochen (Fiala et al. 2002, Fiala und Spall, 2003)

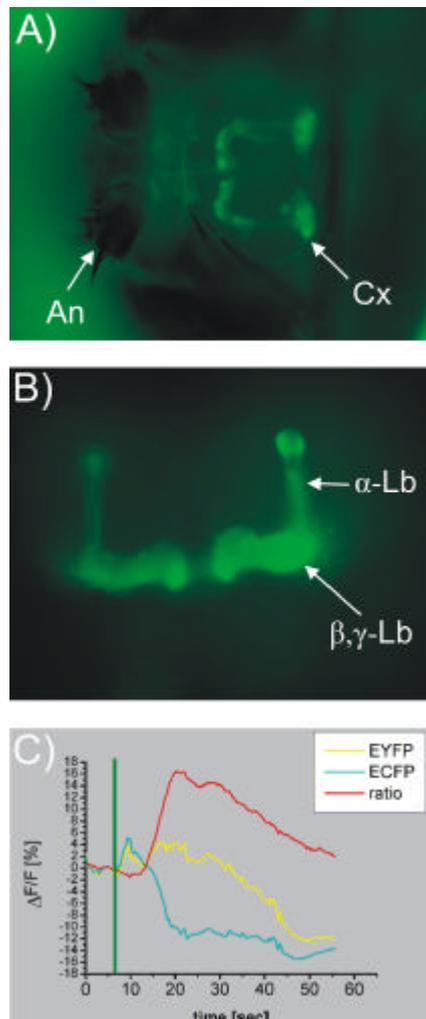


Abbildung 4.52:

Erste Versuche des Calcium Imaging am Pilzkörper von *Drosophila melanogaster*.

A) Blick durch die geöffnete Kopfkapselfläche einer Fliege, welche das Cameleon Konstrukt unter dem Gal4 Treiber 201Y in den Kenyonzellen des Pilzkörpers exprimiert. Im vorderen Bereich der Fliege sind die durch die Präparation unbeschädigten Antennen (An) der Fliege zu erkennen. Die Expression zeigt sich im Calyx (Cx), Pedunkel und in den α -Loben (α -Lb) des Pilzkörpers.

B) Fluoreszenzaufnahme des Pilzkörpers einer Kreuzung Cam 2.1/ 82 mit einer Pilzkörper Gal4 Linie. Der α -Lobus und die β, γ Loben (β, γ -Lb) des Pilzkörpers der Fliege sind deutlich zu erkennen.

C) Gemessene Fluoreszenzänderung im Bereich der Pilzkörper-Loben aufgrund der Depolarisation mit Kalium-Chlorid Lösung. Der Zeitpunkt der Zugabe der Lösung ist mit einem grünen Balken versehen. Zeitversetzt erfolgen die Abnahme der Fluoreszenz des ECFP (blau) und ein Anstieg der EYFP Fluoreszenzabgabe (gelb). Das gemessene Verhältnis (ratio) von EYFP/ ECFP ist in rot dargestellt und gilt als Maß für die Calcium Aktivität nach der Depolarisation. Zu erkennen ist auch der Effekt des Ausbleichens während der Zeitdauer von 1 Minute.

[alle Werte sind normiert]

In einem typischen Versuch wird die Ringerlösung über die geöffnete Kopfkapselfläche unter dem Mikroskop mit 1 M KCl-Lösung versetzt und so die Funktionalität des Calcium-Sensors *in vivo* überprüft. Dabei breitete sich eine durch die Kalium-Chlorid Lösung ausgelöste Depolarisationswelle im gesamten Gehirn aus. Die Depolarisation führt zu einem Calcium Einstrom in die Nervenzellen, der wiederum eine Konformationsänderung des Indikators auslöst und so zu einem Energietransfer (FRET) vom ECFP zum EYFP führt. Die Fluoreszenzabgabe der beiden GFP-Konstrukte wird dabei aufgezeichnet und man beobachtet nach der Depolarisation ein Abfall in der Fluoreszenz bei 485 nm und ein gleichzeitiger Anstieg der Fluoreszenz bei 535 nm. Die Berechnung der Ratio zwischen den EYFP- und ECFP-Signalen zeigt dabei einen deutlichen Calcium-abhängigen Anstieg an (siehe Abb. 4.52).

5 Diskussion

5.1 Molekulare Analysen

In den molekularen Experimenten wurde vor allem der 5'-Bereich des Gens genauer untersucht. Dabei wurden die Deletionsbruchpunkte einzelner Mutanten näher bestimmt. Durch die grobe Lokalisation der Deletion auf bestimmte Abschnitte des *Synapsin*-Lokus durch Southern Blot Analyse, konnten spezifische Primer zur Amplifikation des genomischen Bereiches ausgewählt werden. Durch Sequenzierung der PCR-Produkte konnte die exakte Position der Bruchpunkte bestimmt werden (siehe Anhang 9.1). In den Mutanten *Syn*⁹⁷ und *Syn*¹⁴³ waren die Deletionen mit ca. 1,4 und 2,9 kb am größten. Hier kommt es zu einer Deletion im Promotorbereiches und Teilen, bzw. des ganzen ersten Exon des *Synapsin* Gens. Eine Herstellung von funktionalem Synapsin kann in diesen Linien ausgeschlossen werden, da keine Proteinexpression mit dem monoklonalen Synapsin-Antikörper, welcher seine Erkennungssequenz innerhalb der hochkonservierten C-Domäne des Proteins besitzt, nachgewiesen werden konnte. Beide Linien werden als funktionelle Nullmutanten für Synapsin eingestuft. In der Linie *Syn*¹⁴³ kommt es zusätzlich zu einer verminderten Fertilität (Godenschwege, 1999). Daher wurde in weiteren Experimenten zur Klärung der phänotypischen Defekte der Synapsin Deletion die Linie *Syn*⁹⁷ verwendet. *Syn*¹⁷⁸ und *Syn*³²⁵ weisen auf Gehirnschnitten und Western Blots eine Restexpression des Proteins auf. Die Bruchpunkte konnten in beiden Linien im 5'-Bereich um die P-Element Insertion nachgewiesen werden. In diesem Bereich müssen demnach regulatorische Elemente für die wildtypische Expression liegen. In Computeranalysen konnten potentielle Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren gefunden werden, so z.B. 30 mögliche Stellen für den Faktor Deformed und insgesamt 24 Motive für das Genprodukt von *hunchback* innerhalb der deletierten Sequenz in der Mutante *Syn*³²⁵. Ein weiterer Hinweis auf regulatorische Elemente, wie Enhancer, kommt aus den Experimenten mit Rescue-Fliegen von T.A. Godenschwege (1999). In der Rescue-Linie *Syn*^{RTA}, in der ein genomischer Abschnitt, beginnend vom P-Insertionsort bis zum dritten Exon von *Synapsin* (ca. 3,1 kb), und der anschließende Teil der cDNA *Syn*-1 fusioniert und in einen Transformationsvektor ligiert wurden, konnte auf Western Blots nur ca. 1/5 der wildtypischen Proteinmenge nachgewiesen werden. Zur normalen Proteinproduktion scheinen weitere, mehr aufwärts der P-Element Insertion gelegene, regulatorische Elemente zu fehlen. Einen konkreten Hinweis auf eine wichtige regulatorische Region konnte die Kartierung der Linie *Syn*¹⁶⁸ liefern. Die Deletion umfasst hier 10 Basen unmittelbar 3' vom Insertionsort. Auf immunhistochemischen Gehirnschnitten kommt es bei diesem Genotyp zu einer deutlichen Reduktion der Expression in der Lamina und in den mittleren Schichten der Medulla. Eine Computeranalyse der Deletion auf mögliche Bindungsmotive von Transkriptionsfaktoren ergab, dass innerhalb der Sequenzlücke eine Konsensussequenz für den Faktor AP-1 (Aktivator-Protein 1) liegt. AP-1 ist ein dimerer Proteinkomplex aus Proteinen der Jun und Fos Proteinfamilie, die über Leucin-Zipper Motiv dimerisieren und an die DNA aufgrund basischer Domänen binden können. Die Aktivierung von AP-1 kann durch mehrere Signale, wie z.B. zellulären und oxidativen Stress, UV-Strahlung, DNA-Schädigung aber auch durch neuronale Depolarisation induziert werden (Review: Wisdom, 1999). Aufgrund der Immunfärbung wird auf einen Defekt eines gewebe-spezifischen Enhancers durch die Deletion in der Linie geschlossen.

Die Deletionsbruchpunkte der einzelnen Linien liegen wie erwartet in unmittelbarer Nachbarschaft um den Insertionsort des P(LacW)-Elementes. In den Linien *Syn*⁹⁷, *Syn*¹⁴³ und *Syn*¹⁶⁸ ist der 5'-Buchpunkt der Deletion direkt am Insertionsort derselbe.

In weiteren molekularen Untersuchungen konnte die Diskrepanz zwischen der postulierten Sequenz von B. Klagges (1996) im Bereich von Exon 4 und 5 des *Synapsin* Gens, und der Sequenz des Berkeley Drosophila Genom Project aufgeklärt werden. Durch Sequenzierung über den genomischen Bereich in verschiedenen Wildtypen konnte die Sequenz aus dem Berkeley D.G.P. bestätigt werden. Dadurch kommt es im Übergang der Exons/ Introns zum Spleißen unter Wahrung der GT-AG Konsensussequenz. Die linke Spleißstelle entspricht mit ihrer Abfolge von GTAAAG in vier Positionen der Literatur-Konsensussequenz (B. Lewin, Gene): G₁₀₀ T₁₀₀ A₆₂ A₆₈ G₈₄ T₆₃, dabei geben die tiefgestellten Zahlen die prozentuale Häufigkeit der Nukleotide in der Sequenz an. Für die Acceptorstelle ist die Konsensussequenz 6mal Py₇₄₋₈₇ N C₆₅ A₁₀₀ G₁₀₀, im konkreten Fall in sieben von zehn Nukleotiden erfüllt. Die abweichende Sequenz von B. Klagges kann eventuell durch Sequenzierungsfehler erklärt werden. Abschließend lässt sich der betreffende genomische Bereich wie in folgender Abbildung dargestellt beschreiben:



Abbildung 5.1 Übergang Exon 4 zu Exon 5 mit intrinsischer Sequenz des *Synapsin* Gens. Dargestellt ist die genomische Sequenzabfolge der Exon-Intron Übergänge im Bereich von Exon 4 und 5. Die Reihenfolge entspricht dem Berkeley D.G.P.. Auch die GT-AG Spleiß-Konsensussequenz ist eingehalten.

Die Untersuchung des genomischen Abschnittes führte aber zu weiteren Fragen in Bezug auf die nun auftretende Diskrepanz zwischen den Sequenzbefunden auf der DNA Ebene und den cDNA Sequenzen, sowie den Ergebnissen der Proteinansequenzierung. Die Klärung dieser Fragestellung führte zu einer neuen Annahme über die Feinregulierung des Synapsin-Proteins, so dass die Befunde und die darauf beruhende Arbeitshypothese in folgenden Abschnitt getrennt diskutiert werden.

5.2 RNA-Editing in *Synapsin*

In der Analyse des genomischen Bereiches der Exons 4 und 5 des *Synapsin* Gens konnte die Konsensussequenz für die Zielregion der CamK I/ IV und der Protein Kinase A (R-R-X-S) nachgewiesen werden. Hier ergab sich ein Widerspruch zur publizierten cDNA Sequenz und zur N-terminalen Ansequenzierung des Proteins (Schaupp, 1998, siehe Abb. 1.4). Als zweite Aminosäure im entsprechenden Bereich war anstelle von Arginin nur ein Glycin mit den Daten vereinbar. Zur Klärung dieser Diskrepanz wurde aus verschiedenen Wildtypen von *Drosophila melanogaster* mRNA isoliert und durch eine Reverse Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben, welche anschließend amplifiziert und sequenziert wurde. Die erhaltenen

Sequenzen in allen fünf Wildtypen wiesen auf eine Adenin zu Guanin Basensubstitution innerhalb des Codons für die zweite Aminosäure der Konsensussequenz hin. In zwei Wildtypen (CantonS und WT OregonR) wurden Hinweise auf einen zweiten Austausch eines Nukleotids beobachtet. Hierbei handelt es sich um das erste Arginin-Codon in der Erkennungssequenz, in dem ebenfalls die erste Base Adenin in ein Guanin auf der Ebene der cDNA umgewandelt war. Da in der Sequenzanalyse des Amplifikats an dieser Position etwa gleich hohe Peaks für A und G erhalten wurden, muß angenommen werden, dass der Basenaustausch an dieser Stelle unvollständig ist.

Das Auftreten der Veränderung der Basenabfolge zwischen der genomischen DNA und einer cDNA deutet auf RNA-Editing hin. Aufgrund des spezifischen Austauschs eines Adenins auf der genomischen Ebene zu einem Guanin auf der Ebene der cDNA kann auf eine Deaminierung eines Adenosins zu Inosin geschlossen werden. Diese Form des Editings manifestiert sich aufgrund der Basenpaarung des Inosins mit Cytidin in einem Austausch von Adenin in Guanin zwischen genomischer DNA und cDNA. Einen Überblick über das beobachtete RNA-Editing gibt die folgende Graphik.



Abbildung 5.2: RNA-Editing in *Synapsin*.

Dargestellt ist der relevante Sequenzabschnitt des Exon 4 und Exon 5 (rot) des *Synapsins* bei Analyse auf den verschiedenen Ebenen. Die editierten Adenosine sind hervorgehoben.

Diese Form des Editings wird durch das Enzym ADAR (Adenosine deaminases acting on RNA) durchgeführt. Es handelt sich um eine hydrolytische Deaminierung des C6-Kohlenstoffes der Purinbase. In *Drosophila melanogaster* konnte eine Form dieses Enzyms (dADAR) identifiziert werden (O'Farrell et al., 2001; Reenan et al., 2001). Die Expression des Enzyms ist in der Fruchtfliege, wie die Expression des *Synapsin* Gens, auf das Nervensystem beschränkt. Transkripte, für die ein RNA-Editing dieses Typus gezeigt werden konnte, kodieren alle für Proteine, die an der elektrischen oder chemischen Neurotransmission beteiligt sind, so z.B. *para* oder *cac* (Palladino et al., 2000; Hoopengardner et al., 2003). Auch *Synapsin* ist nach seinem Funktionsmodell in diese Kategorie einzuordnen. Das Enzym ADAR benötigt für den gezielten Austausch der Base eine bestimmte Form der RNA. Für die A-zu-I Umwandlung ist die Ausbildung einer Doppelstrang RNA im Bereich um die zu editierende Stelle nötig. Dieser Doppelstrang kann sich z.B. bilden, wenn ein kurzer Intronabschnitt zu diesem Bereich komplementär ist. Die komplementäre Sequenz wird auch ECS (Editng site Complementary Sequences) genannt. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um eine 9-15 Basen umfassende Sequenz, welche bis zu 1000 Nukleotide von der redigierten Stelle entfernt in einem angrenzenden Intron zu finden ist. Um im *Synapsin*-Lokus um den Bereich des Exon 4 eine potentielle ECS Stelle aufzudecken, wurde die Sequenz von

ca. 1 kb (stromauf- und stromabwärts der Editing Stelle) mit einem Computerprogramm analysiert (MFold, Zuker et al., 1999). Dieses Programm kann eine Sekundärstruktur aus einer RNA-Sequenz bilden. Dabei offenbarte sich, dass im 3'-angrenzenden Intron 4 eine komplementäre Sequenz zu finden ist. Sie ist 15 Basen lang und liegt nur 90 Basen entfernt vom editierten Adenosin, womit sie den Literaturwerten entspricht. Die Lage der ECS im Intron 4 und die vorhergesagte Sekundärstruktur ist in Abbildung 5.3 dargestellt. Für die Spezifität von dADAR scheint eher die dsRNA Struktur eine Rolle zu spielen als die Primärsequenz. Im Falle des ADAR1 Proteins von Säugern wird eine Präferenz für A, U, oder C in der 5'-angrenzenden Nachbarschaft des Adenosins vermutet (Polson und Bass, 1994). Für *Drosophila* wurden jedoch keine speziellen Sequenzmotive aufgedeckt.

In den Sequenzanalysen konnte in der ersten Position im Codon für die zweite Aminosäure der Kinase Erkennungssequenz eindeutig ausschließlich ein Guanin nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte kein PCR-Produkt isoliert werden, welches an der betreffenden Stelle nicht editiert war. Es scheint im konkreten Fall daher ein effektives RNA-Editing stattzufinden. Eventuell ist der Prozentsatz der nicht editierten Form der *Synapsin* mRNA zu gering, als dass er durch die angewandte Methode detektiert werden kann. Ein vergleichbar effektives RNA-Editing (ca. 100%) findet sich zum Beispiel in Substraten des ADAR2 von Säugern (Higuchi et al., 2000). Im Codon für die erste Aminosäure in der Konsensussequenz fanden sich aber in zwei Wildtypen bei der betreffenden Base zwei Peaks (Guanin und Adenin), so dass hier möglicherweise zwei Formen der mRNA detektiert werden konnten. Beide Peaks sind etwa gleich hoch, so dass hier von einem ca. 50%igen Editing gesprochen werden kann.

Im Falle des Editings der *Synapsin* mRNA handelt es sich offenbar nicht um eine Anpassung an die Lebensumstände der Fliege unter Laborbedingungen, da auch in neu etablierten Wildtypen das Editing nachweisbar ist. Die Untersuchung der verschiedenen Gewebe (Kopf/Thorax und Abdomen) von *Drosophila melanogaster* wies dabei ebenfalls keinen Unterschied auf, d.h. in beiden Homogenaten scheint die *Synapsin* mRNA zu einem hohen Prozentsatz editiert zu werden. Bei der Untersuchung des Editings in verschiedenen Entwicklungsstadien der Fliege, konnte nur in der Fraktion: der Eier, Embryonen und 1. Larven ein zweiter Peak nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um ein Adenosin, was bedeuten würde, dass ein gewisser Prozentsatz der mRNAs nicht editiert wäre. In den anderen Entwicklungsstadien kann an dieser Stelle, aber eindeutig nur ein Guanin in der cDNA gefunden werden. Dieser Befund steht im Einklang mit der Expression des für das Editing benötigten Enzyms dADAR, welches in der frühen Entwicklung nur schwach exprimiert wird (Ma et al., 2002).

Die zweite im Protein vorkommende Konsensussequenz für die Zielregion der Protein Kinase A wird nicht durch RNA-Editing verändert. Hier kommt es in den Wildtypen, sowohl in Laborstämmen, als auch in neu etablierten Stämmen, zu keinem Redigieren der Basenfolge. Die im Exon 12 kodierte Konsensussequenz (R-R-X-S) mit den Aminosäuren Arg-Arg-Asp-Ser wird auf cDNA-Ebene beibehalten.

Die funktionelle Bedeutung des RNA-Editing der konservierten N-terminalen Konsensussequenz in der prä-mRNA dürfte in einer Modulation des Phosphorylierungsgrades des Proteins liegen. Der Austausch von Arginin, einer basischen Aminosäure mit einer langen Seitenkette, durch Glycin, eine neutrale Aminosäure mit lediglich einem Wasserstoffatom als Rest, könnte die Effektivität der Phosphorylierung beeinflussen. Phosphorylierungsexperimente zum *Synapsin* konnten in der vorliegenden Arbeit aus Zeitmangel nicht mehr durchgeführt werden. Allerdings wurden einige molekulare Werkzeuge für derartige Versuche hergestellt. Für die Klärung der Frage ob das RNA-Editing einen negativen, positiven oder keinen Effekt auf den Phosphorylierungszustand des *Synapsins* hat, sind transgene Tiere, deren Phosphorylierungsstellen mutiert sind, von großen Nutzen. Daher wurde eine Mutagenese der betreffenden Stellen in der cDNA durchgeführt. Dieser Aspekt wird im folgenden Abschnitt 5.3 diskutiert.

A)

```

.....tgtatgtgtttttttttatgtatttttctggtgctgctgggatcaaaaggagccaaaaagcagcaccctgaatttct
cgfcgttcaaatcgagcttcacttccaatgttaatttctctgaagagaAggtaaagaccttaaaaaaggaagtgcccccttgg
cagaagggggcccagttgaacgaaactaatttgaatttcataatgttctctatttctctatctttttctctcgggctgatt
tgtctaccacccatttg.....

```

B)

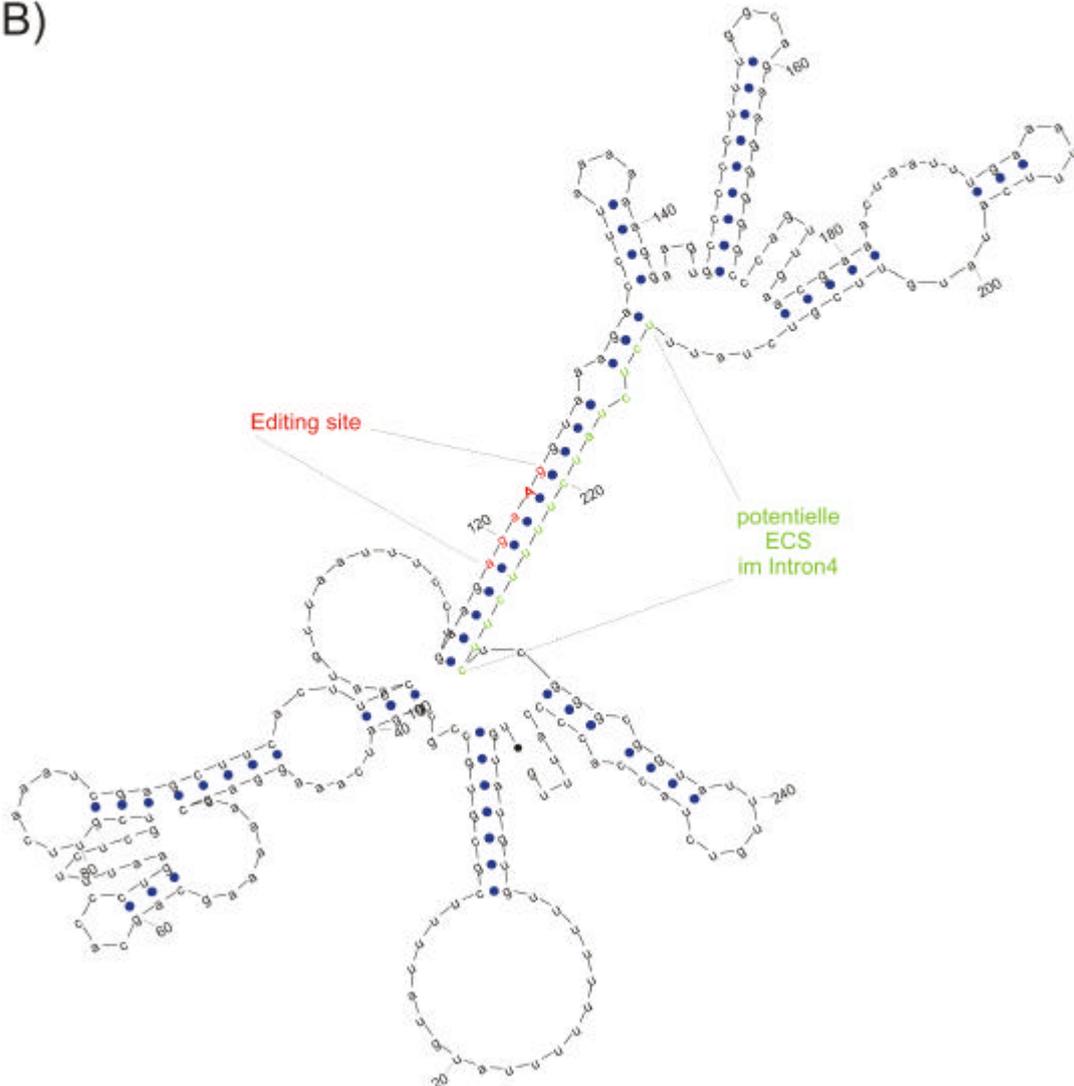


Abbildung 5.3: ECS-Stelle in der *Synapsin* prä-mRNA

A) Dargestellt ist die genomische Region des Exon 4 (unterstrichen) und teilweise des Introns 4 von *Synapsin*. Die potentielle ECS befindet sich 90 Basen entfernt von dem zu editierenden Adenosin. (rot= PKA-Stelle; grün= ECS).

B) Vorhergesagte Sekundärstruktur (durch MFold) der prä-mRNA. Zu erkennen ist, dass die PKA-Stelle eine doppelsträngige RNA Struktur mit Bereichen des Introns bilden kann.

5.3 Mutation der Protein Kinase A Stelle(n) im Synapsin

Zur Klärung der Bedeutung des möglichen RNA-Editings in der Erkennungssequenz der Protein Kinasen in der A-Domäne wurde eine Mutagenese der potentiellen Phosphorylierungsstellen durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente die cDNA-Syn1, welche bereits die editierte Form der Kinase-Stelle besitzt. Ziel war es, verschiedene cDNAs herzustellen welche für unterschiedliche Proteinisoformen kodieren. Die möglichen Varianten sind in der Abbildung 5.4 dargestellt.

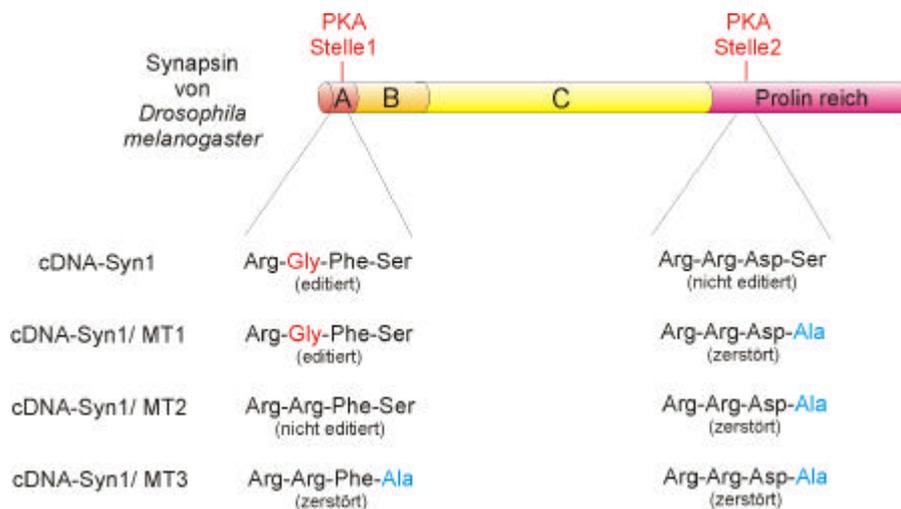


Abbildung 5.4: Mutation der PKA-Stellen in Synapsin.

Dargestellt ist der Aufbau des Synapsin Proteins, sowie die Lage der PKA-Erkennungsstellen. Darunter sind die durch die eingebrachten Nukleotidaustausche bedingten Aminosäureabfolgen dargestellt. Dabei entspricht die cDNA-syn1 der in der Fliege vorliegende Variante. Die Form cDNA-Syn1/ MT1 beinhaltet die editierte erste Stelle und die zerstörte PKA2-Stelle. Die Form cDNA-Syn1/ MT2 stellt die genomische Sequenz in der PKA1-Stelle wieder her, während in der Form cDNA-Syn1/ MT3 beide Konsensussequenzen durch den Austausch Serin gegen Alanin zerstört worden sind.

Die Mutagenese wurde mit verschiedenen Ansätzen durchgeführt, wobei das Ausgangsprodukt mindestens 5 Minuten denaturiert werden musste, damit die Primer an die einzelsträngig vorliegende Zielsequenz binden können. Die Mutagenese wurde in mehreren Schritten durchgeführt und konnte aufgrund des Zeitmangels nicht vollständig abgeschlossen werden. So konnten die Mutationen in die cDNA eingebracht werden, jedoch müssen noch einzelne Ligationen erfolgen um die kodierende Sequenz zu komplettieren.

Die verschiedenen Proteine, die durch die cDNAs kodiert werden, beinhalten Varianten der PKA-Stellen des Synapsins. Dabei gibt es eine „normale“ Isoform, welche die PKA1-Stelle in editierter und die PKA2-Stelle in unveränderter Form beinhaltet (cDNA-Syn1). Daneben wurde eine Form fertig gestellt, in welcher die PKA1 editiert und die PKA2-Stelle durch den Austausch der Aminosäure Serin gegen Alanin zerstört ist (cDNA-Syn1/ MT1). Die Mutationen der ersten Konsensussequenz konnten eingebracht werden, jedoch nicht mehr mit dem restlichen Anhang ligiert werden.

Auf die mögliche Vorgehensweise der Phosphorylierungsassays wird im Abschnitt 5.7 eingegangen.

5.4 Rescue-Konstrukt von *Synapsin*

Synapsin Nullmutanten, die mit dem von T.A. Godenschwege konstruierten *Synapsin*-Rescue Vektor transformiert waren, wiesen in Western Blot Analysen eine fünfmal schwächere Expression als der Wildtyp auf. Aufgrund dieses Befundes und aus den Daten der Deletionskartierung konnte auf die Existenz von weiteren regulatorischen Elementen außerhalb des transformierten Konstruktes geschlossen werden, die für eine wildtypische Expression notwendig sind.

Daher wurde in dieser Arbeit versucht das Rescue-Konstrukt um ein direkt stromaufwärts der Insertionsstelle des P-Elementes gelegenes genomisches Fragment zu erweitern. Dieses Teilstück bestand aus einem 3,8 kb großen *SacI*/*SacI*-Fragment, welches aus einer genomischen Phagenbibliothek stammte. Der mittlere Teil des Rescue Konstrukts bestand aus einem genomischen Fragment, das den Promotor, die Exons 1, 2 und teilweise das Exon 3, sowie die dazwischen liegenden Introns beinhaltete. Dieses Fragment konnte aus dem *EcoRI* Plasmid-Rescue Vektor der *Syn^{P1}* Linie herausgeschnitten werden oder mittels einer PCR aus dem Genom amplifiziert werden. Der Rescue wurde komplementiert durch ein ca. 3 kb großes Teilstück aus der cDNA-*Syn1* des *Synapsins*.

Ein kompletter genomischer Rescue ist aufgrund der Größe des *Synapsin*-Lokus und der Verschachtelung mit dem *dTimp* Gen nicht durchführbar. Eine Ligation mit allen vorher isolierten und verdauten Fragmenten in den Transformationsvektor konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Daraufhin wurde versucht die Anzahl der an der Ligation beteiligten Partner zu verringern. Dazu wurde in einem ersten Schritt die cDNA des Gens über *EcoRI* in den pUAST-Vektor eingebracht. Die Orientierung wurde durch einen Restriktionsverdau überprüft. Anschließend sollte versucht werden, die zwei restlichen Fragmente in einer zweiten Ligation ebenfalls einzubringen. Dieser Versuch konnte aber nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Die entstandenen Kolonien konnten entweder nicht identifiziert werden oder stellten sich als religierter Vektor mit cDNA heraus.

Die Gründe für den Misserfolg in der Ligation der einzelnen Komponenten können in den verschiedenen Teilaspekten der Methode gesucht werden. So deutet die Religierung an, dass scheinbar der Vektor nicht vollständig mit beiden Enzymen geschnitten wurde. Auch die Anwendung der Shrimp Alkaline Phosphatase am geschnittenen Vektor konnte dies nicht hundertprozentig verhindern. Eine Kontaminierung der für die Transformation verwendeten kompetenten Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, welches die „fremdartigen“ Plasmide erklären könnte. Eine mögliche Rekombination des Konstruktes wurde durch die Verwendung von kompetenten Sure-Zellen verringert. Ebenfalls wurde versucht die Rekombination durch Wachstum bei 30° C zu vermindern. Möglicherweise kann es in diesem Konstrukt dennoch zu Rekombinationen kommen, so dass im Restriktionsverdau keine erwarteten Banden auftreten.

Um diese Probleme der Ligation des Rescue-Konstruktes zu klären, sollten die einzelnen Komponenten durch Sequenzanalyse eindeutig überprüft werden. Durch die Ansequenzierung der gewonnenen „fremdartigen“ Plasmide könnte die Vermutung, dass es hier zu einer Rekombination im Konstrukt gekommen ist, näher überprüft werden. Die Ligationszeit, sowie der vorhergehende Verdau sollten in einem nochmaligen Ansatz deutlich verlängert werden um einen möglichen unvollständigen Verdau ausschließen zu können. Weiterhin könnte versucht werden die regulatorischen Fragmente zuerst in einen anderen Vektor einzuligieren. Ein Weg wäre dabei, das 3,1 kb Fragment (Promotor + erste Exons und Introns) aus der PCR zuerst in den Topo-Vektor zu transferieren. Dabei wäre ein Vorteil, dass kein weiterer Verdau schritt des PCR-Produktes nötig wäre, da der Vektor für die direkte Ligation von PCR-Produkten ausgelegt ist. In einen Topo-Vektor mit dem 3,1 kb genomischen Teilstück könnte

dann über die SacI-Schnittstelle das stromaufwärts gelegene Fragment einligiert werden. Nach erfolgreicher Durchführung könnten diese beiden Bereiche zusammen mit NotI und PshAI ausgeschnitten und mit dem bereits existierenden pUAST + cDNA-Syn Vektors ligiert werden. Der Vorteil der Vorgehensweise liegt darin, dass jede einzelne Ligation nur mit zwei Partnern durchgeführt wird. Die Durchführung dieses Ansatzes konnte aber aufgrund des Zeitmangels nicht mehr angesetzt werden.

5.5 Phänotypen der *Synapsin*-Nullmutanten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit, sowie im Rahmen der Diplomarbeit von U. Werner (2002), wurden *Syn*⁹⁷ Fliegen in verschiedenen Experimenten auf phänotypische Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

In dieser Linie ist aufgrund der Deletion des Promotors und der ersten Exons keine Expression des Proteins mehr nachweisbar. Da der *Synapsin*-Antikörper sein Epitop in der hochkonservierten C-Domäne des Proteins besitzt, ist davon auszugehen, dass es sich bei der Linie um eine funktionelle *Synapsin*-Nullmutante handelt.

Um einen möglichen Einfluss des genetischen Hintergrundes der Fliege zu minimieren, wurde die Linie *Syn*⁹⁷ für 12 Generationen in den genetischen Hintergrund der Linie CantonS eingekreuzt. Diese Linie wurde in anderen Arbeiten als Standard-Wildtyp für Lernexperimente am Lehrstuhl etabliert (Schwaerzel et al., 2002; Putz et al., 2003). Die Weitervererbung der 1,4 kb großen Deletion wurde durch die Genotypisierung der einzelnen Fliegen nach der Kreuzung mittels PCR überprüft. Der neu etablierte Stamm *Syn*^{97CS} wurde anschließend nochmals durch Deletionskartierung und Western Blots auf das Vorliegen der Deletion überprüft und dabei bestätigt.

Diese neue „cantonisierte“ Linie wurde verschiedenen Verhaltenstests und Lernexperimenten unterzogen. Dabei wurde teilweise eine Kreuzung heterozygoter *Synapsin* Fliegen angesetzt und die Nachkommenschaft in einem Blindversuch einzeln im jeweiligen Paradigma untersucht. Anschließend wurde der Genotyp der Fliege bzw. Larve durch die Methode der Einzel-Tier-PCR ermittelt.

Die Phänotypsuche in der Mutante umfasste zweierlei Stadien der Fliegenentwicklung, sowie verschiedenartige assoziative Lernversuche. Daneben wurden auch andere Verhaltensparameter der Fliegen wie z.B. der Courtship Index der Mutante im Vergleich zum CantonS Wildtyp überprüft. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Tabelle 5.5 zusammengefasst.

Es konnten verschiedenartige Verhaltensphänotypen in der Nullmutante aufgezeigt werden. Die Breite der Phänotypen steht durchaus mit der prominenten Expression des *Synapsins* im gesamten Nervensystem in Einklang. Scheinbar kommt es durch das Fehlen des Phosphoproteins in der Fliege zu kleinen, jedoch signifikanten Veränderungen im jeweiligen Verhaltensrepertoire. Dabei beruhen die modifizierten Verhaltensreaktionen auf komplexen neuronalen Verschaltungen, sodass eine Interpretation erschwert ist. Ultrastrukturanalysen in der Mutante deuteten an, dass es zu keiner Veränderung der Verteilung der synaptischen Vesikel in der larvalen neuromuskulären Synapse kommt. Sowohl die Anzahl der Vesikel in der direkten Umgebung, als auch in einem weiteren Radius um die aktive Zone, bleibt unverändert (Reisch, 2000). Die elektrophysiologischen Untersuchungen am gleichen System offenbarten, dass die Transmitterausschüttung durch das Fehlen des Proteins nicht beeinträchtigt ist (Reisch, 2000). Dies steht im Widerspruch zu den Befunden aus der Mausgenetik. In *Synapsin I* Knock-out Mäusen kommt es zu einer Verringerung der Vesikel

im distalen Pool der Synapse (Li et al., 1995). Des Weiteren konnten elektrophysiologische Phänotypen sowohl in der posttetanischen Potenzierung (PTP), als auch in der Paired Pulse Facilitation (PPF) in Synapsin Knock-out Mäusen entdeckt werden (Rosahl et al., 1993; 1995). Bisher konnte jedoch keiner dieser Effekte in der Fruchtfliege identifiziert werden. Trotz des Fehlens von detektierbaren Veränderungen auf der Ebene der Ultrastruktur oder Elektrophysiologie kann ein schwacher Einfluss des Proteinverlustes auf die Transmitterfreisetzung nicht ausgeschlossen werden. Dieser Effekt könnte sich eventuell erst auf der Ebene der Komplexität des Verhaltens äußern. Die in dieser Arbeit gefundenen Verhaltensanomalien deuten in diese Richtung (Zusammenfassung siehe Tab. 5.5).

Verhaltensphänotypen	Signifikanzniveau	Ref.
erhöhte Flügelschlagfrequenz	***	4.2.2.1
erhöhte EtOH-Toleranz	*	4.2.2.1
verringerte Objektfixierung	***	4.2.2.2
bessere Optomotorik bei schnell rotierenden Mustern	*	4.2.2.3
verringerte Hitzevermeidung	** (♂)	4.2.3.4
verringerte Courtship Index	*** (♂)	4.2.3.5

Lernphänotypen	Signifikanzniveau	Ref.
schnellere Habituation im olfakt. Jump Response	**	4.2.2.1
kein signifikanter Lernerfolg im larvalen olfaktorischen Lernen	/	4.2.3.1
kein signifikanter Lernerfolg im larvalen visuellen Lernen	/	4.2.3.2
verringertes Lernindex im adulten olfakt. Lernen	***	4.2.3.3
verringertes Lernindex im Heatbox-Lernen	* (♂)	4.2.3.4
verringerte Courtship Supression in ♂	** (30 min) *** (180 min)	4.2.3.5

Tabelle 5.5: Zusammenfassung der Phänotypen der *Synapsin*-Nullmutanten im Vergleich zum Wildtypen CantonS. Dargestellt sind die einzelnen Veränderungen im Verhalten bzw. Lernen, die im Genotyp *Syn^{97CS}* aufgezeigt werden konnten. Das Signifikanzniveau richtet sich nach folgendem Schema: p<0,05= *; p<0,01= **; p<0,001= ***. Die Referenznummer bezieht sich auf den betreffenden Abschnitt dieser Arbeit, an der der Phänotyp näher ausgeführt wird.

So finden sich in den zwei visuellen Test zur Objektfixierung und Optomotorik in der *Synapsin*-Nullmutante signifikante Unterschiede zum Wildtyp. In der Objektfixierung konnte nachgewiesen werden, dass vor allem Mutanten mit Defekten in der Peripherie der optischen Loben auffällig sind (Bülthoff et al., 1982a; b). In *Syn^{97CS}* kommt es zur Deletion des Proteins im gesamten neuronalen Gewebe, wodurch nicht die Fähigkeit der Fixierung von Objekten verloren geht, sondern nur die Präferenz für die schwarze Markierung leicht reduziert wird. In Versuchen mit der Linie *Syn¹⁶⁸* konnte ein genauerer Blick auf die Notwendigkeit von Synapsin in der Peripherie des visuellen Systems geworfen werden. In dieser Linie kommt es durch eine nur 10 Basen umfassende Deletion im regulatorischen Bereich des *Synapsin*-Lokus zu einem Verlust des Proteins in der Lamina und im mittleren Bereich der Medulla. Homozygote Tiere des *Syn¹⁶⁸* Genotyps weisen im Vergleich zum Kontrollstamm keine signifikante Verschiebung der Präferenz für das Objekt auf. Die Eliminierung des Proteins in den primären Verschaltungsebenen des visuellen Systems erzeugt keinen messbaren

Phänotyp, so dass der signifikante Phänotyp der Nullmutante vermutlich auf das Fehlen von Synapsin in zentralen Gehirnabschnitten zurückzuführen ist.

Die optomotorische Antwort auf ein rotierendes Streifenmuster hängt ebenfalls von einem komplexen Zusammenspiel zahlreicher Neurone ab. Auch hier könnte ein kleiner Effekt des Fehlens des Proteins in der synaptischen Weiterleitung seinen Einfluss auf der Ebene des Verhaltens manifestieren. Diese kleinen Effekte könnten durch die damalige elektrophysiologische Untersuchung nicht detektiert worden sein. Diese feinen Unterschiede in der synaptischen Übertragung könnten auch für die gesteigerte Toleranzentwicklung verantwortlich gemacht werden. Über die Interpretation des Flügelschlagfrequenzanstiegs im *Syn^{97CS}* Genotyp wurde ausführlich in der Diplomarbeit von U. Werner (2002) diskutiert. Der Effekt kann auf vielerlei Faktoren beruhen. Auch hier könnte eine Veränderung der Transmitterausschüttung in den zuständigen Motorneuronen aufgrund der Eliminierung des Synapsins den Phänotyp erklären. Zur Überprüfung wäre auch hier eine neue elektrophysiologische Untersuchung ratsam.

In verschiedenen assoziativen Lernparadigmen konnte in der *Synapsin*-Mutante ein Phänotyp nachgewiesen werden. Dabei wurden die Fliegen nicht nur im adulten Stadium untersucht, sondern auch in einem operanten Lernexperiment für 3. Larven. So beinhalteten die larvalen Experimente eine Kombination aus olfaktorischen oder visuellen Reizen und gustatorischem Stimulus. Im adulten Paradigma wurde die Assoziation zwischen Duft und elektrischem Schock trainiert. Im operanten Lernen in der Heatbox deutete sich zwar eine geringere Hitzevermeidung der Mutanten an. Der Lernerfolg in der Mutante wies ebenfalls eine Reduktion im Vergleich zum Wildtyp auf, jedoch war diese nicht signifikant. Die signifikanten Unterschiede in den Performance Indices von *Syn^{97CS}* und CantonS Männchen können nicht eindeutig interpretiert werden, da kein geschlechtsspezifischer Effekt in der Expression des *Synapsin* Gens bekannt ist. In den anderen Lernparadigmen konnte allgemein eine Reduktion in der Lernfähigkeit der Nullmutante entdeckt werden. So konnte in den larvalen olfaktorischen Lernexperimenten kein signifikanter Lernerfolg in den *Synapsin* Mutanten detektiert werden. Die Wahrnehmung der beiden Reize (Duft und Fructose) ist aber in den Tieren nicht verändert, so dass hier von einem tatsächlichen Lernphänotyp gesprochen werden kann. Auch im visuellen Paradigma wies die Larve einen Lerndefekt im Vergleich zum Wildtyp CantonS auf. Die Reduktion im olfaktorischen Lernen konnte auch in adulten Mutante nachgewiesen werden. Hier ist der Lernindex um ca. 25% reduziert im Vergleich zum Kontrollstamm. Die zugrunde liegenden Faktoren können hier auch wieder in einer leichten Modifikation der Transmitterfreisetzung durch das Fehlen des Phosphoproteins liegen, aber auch ein Einfluss des Synapsins in der Synaptogenese kann nicht ausgeschlossen werden. In Vertebraten konnte der Einfluss des Synapsin in der Bildung von Synapsen aufgezeigt werden (Ferreira et al., 1994; 1995; Chi et al., 1995). Der Befund, dass Synapsin in verschiedenen Lernprozessen involviert ist, wird ebenfalls durch Versuche in Knock-out Mäusen für SynI und SynII untermauert, da auch hier Lerndefekte auftraten (Silva et al., 1996).

In der Reduktion des Courtship Index, sowie in den alten Befunden zur Kopulationslatenz (Godenschwege, 1999) manifestiert sich ein direkter Eingriff der Mutation in die Fitness der Tiere. Scheinbar haben die *Syn^{97CS}* Tiere einen signifikanten Nachteil in diesem für die Kopulation wichtigen Verhaltensschema. Diese Verminderung im Courtship Index, sowie die Gemeinsamkeit der Defekte im Verhalten und Lernen der Fliege könnte den hohen Grad an Konserviertheit zwischen Vertebraten und Invertebraten im Synapsin Protein erklären.

Die teilweise geringen Phänotypen in den einzelnen Versuchen können eventuell durch Redundanz in der Synapsinfunktion erklärt werden. Dabei ist aufgrund des komplett sequenzierten Genoms der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* kein kompensatorischer Effekt durch ein zweites *Synapsin* Gen denkbar (Adams et al., 2000). Eventuell kommt es

aber zu stärkeren Expressionen von anderen synaptischen Proteinen, die zwar keine Sequenzhomologie besitzen, aber einen gewissen Grad von funktionaler Homologie aufweisen könnten.

5.6 Calcium Imaging

Im Rahmen einer Kooperation bei der Etablierung des in-vivo Calcium Imaging an *Drosophila melanogaster* sollte der Calcium Indikator Cameleon 2.1 für das Gal4/ UAS System der Fliege zugänglich gemacht werden.

Ausgehend von der Vorgängerform des Fusionsproteins, dem Cameleon 2.0, wurden durch eine gezielte in-vitro Mutagenese die Basensubstitutionen innerhalb des EYFP eingefügt. Der eingebrachte Austausch der Aminosäuren Valin und Glutamin zu Leucin und Lysin im Protein konnte durch eine Sequenzierung der cDNA bestätigt werden. Die cDNA des Calcium Indikators konnte anschließend in den Transformationsvektor pUAST über EcoRI eingebracht werden. In einer Überprüfung der Orientierung wurde darauf geachtet, dass das Startcodon des Fusionsproteins unmittelbar auf die fünfmalige UAS-Sequenzabfolge und den Hitzeschockpromotor des Vektors folgte. Das pUAST-Cameleon 2.1 Konstrukt konnte danach in einer Keimbahntransformation in das Genom integriert werden. Insgesamt wurden 150 Embryonen injiziert, aus deren Nachkommenschaft insgesamt fünf unabhängige Linien etabliert werden konnten. Die homozygoten transgenen Fliegen können somit im Gal4/ UAS-System verwendet werden. Die verschiedenen Insertionen in den Linien konnten durch Kreuzungsmethoden und durch Inverse PCR genauer lokalisiert werden. Dabei wiesen beide Lokalisationsmethoden, übereinstimmende Ergebnisse auf, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind.

Fliegenlinie	Chromosom	8bp repeat 5'	8bp repeat 3'	Klon (Position)	Region
Cam2.1/ 53	2 nd R	CCCTGATT	CCCTGATT	AC007476 (1 62663bp)	49A
Cam2.1/ 65	3 rd R	GTTCAACG	GTTCAACG	AC004333 (51404bp)	62A1
Cam2.1/ 72	3 rd R	ATCCGTTA	ATCCGTTA	AC007647 (43969bp)	89B
Cam2.1/ 76	3 rd R	GCCAAAGG	GCCAAAGG	AC009537 (101097bp)	82E
Cam2.1/ 82	2 nd L	keine Sequenz	GAGGGCTG	AC092230 (89084 bp)	26F

Tabelle 5.6: Lokalisation der Insertion in verschiedenen transgenen Fliegenlinien. Dargestellt ist die ermittelte Insertion des pUAST-Vektors in Cam 2.1 Linien, durch die Sequenzierung der Inversen PCR-Produkte. Die Nummern der Klone beziehen sich auf die Angaben des Berkeley D.G.P..

In den Linien waren die P-Elemente in vier Fällen in den 5'-Bereich von Genen gesprungen. Dies entspricht der generellen Beobachtung, dass transposable Elemente bevorzugt im Bereiche des Chromatins inserieren, die aufgrund der notwendigen Zugänglichkeit für die Transkriptions-Maschinerie stärker aufgelockert sind (O'Hare und Rubin, 1983; Liao et al.,

2000). Die von O'Hare und Rubin (1983) postulierte Vorliebe für die Zielsequenz GGC CAG AC konnte bei den hier bestimmten Insertionsorten nicht bestätigt werden. Allerdings beobachtet man eine Präferenz der Insertion innerhalb GC-reicher Sequenzen auch in den Cameleon 2.1 Keimbahntransformanten. Der unterschiedliche Augenphänotyp der Linien deutet auf Einflussnahmen von regulatorischen Elementen, z.B. Enhancer, hin, bzw. könnte auf Insertionen in Bereichen, die für die Expressionsmaschinerie unterschiedlich leicht zugänglich sind beruhen. Dabei weisen die Linien Cam2.1/ 72 und Cam 2.1/ 82 die deutlichste Pigmentierung der Augen auf und zeigen auch die stärkste Expression des Calcium-Indikators. Die betreffenden Linien erzeugen sowohl im Western Blot, als auch bei der Messung der Fluoreszenz unter dem Mikroskop, die deutlichsten Signale. Aufgrund dieser Befunde wurden die ersten Experimente zum in-vivo Calcium-Imaging auch mit diesen Linien durchgeführt. Damit stand der neuen Methode jeweils eine stabile UAS-Cameleon 2.1 Linie für das zweite und für das dritte Chromosom zur Verfügung.

Die Funktionsfähigkeit der Linien konnte in verschiedenen Tests nachgewiesen werden. Darunter waren Experimente an primären Neuronenzellkulturen von *Drosophila melanogaster* (Diegelmann, 2001), aber auch an Kopfpräparaten der lebenden Fliege. Dazu wurde die UAS-Linie mit den jeweiligen Gal4-Linien gekreuzt und die Nachkommenschaft auf Calciumsignale untersucht. Durch die Präparation (Fiala et al., 2003) der Kopfkapsel ist eine direkte Betrachtung von einzelnen Gehirnarealen möglich. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Menzel (FU Berlin) konnte in Vorversuchen die Funktionsweise des Sensors auf Depolarisation nachgewiesen werden. Eine induzierte Depolarisation durch Kaliumchlorid-Lösung löst in den Cameleon exprimierenden Zellen eine zeitlich verzögerte Antwort hervor. Es kommt zu einem Abfall der Fluoreszenz des ECFP und einem gleichzeitigen Anstieg der EYFP-Fluoreszenz. Dies ist mit dem durch die Konformationsänderung ermöglichten Energietransfer vom ECFP zum EYFP innerhalb des Fusionsproteins zu erklären.

5.7 Perspektiven

Aus der dargelegten Arbeit lassen sich einige Perspektiven für weiterführende Experimente ableiten.

Auf molekularer Ebene ist die Fertigstellung des erweiterten Rescue-Konstruktes von besonderer Dringlichkeit. Dabei sollten die regulatorischen Elemente stromaufwärts der Insertionsstelle des P-Elementes in *Syn^{PI}*, wie in dieser Doktorarbeit versucht, integriert werden. Die einzelnen Fragmente des *Synapsin*-Rescues sollten zuerst durch Sequenzanalysen überprüft werden um sicher zu stellen, dass die verwendeten Enzyme tatsächlich in den vorhergesagten Bereichen schneiden können. Auch sollten leichte, bereits im Abschnitt 5.4 besprochene Modifikationen in der Methodik der Ligation ausprobiert werden. Ein erfolgreich ligiertes Konstrukt muss dann durch Keimbahntransformation in das Genom der Fliege transferiert werden. Transgene Tiere sollten weiter charakterisiert werden und auf eine „Rettung“ der in dieser Doktorarbeit in der Nullmutante gefundenen Phänotypen hin untersucht werden.

In der Frage des RNA-Editings können verschiedene Wege zur Überprüfung der angenommenen Mechanismen zur Modifikation der *Synapsin* mRNA beschrritten werden. So wurde das für das Editing postulierte Enzym ADAR in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen und eine funktionelle Nullmutante für das entsprechende Gen beschrieben (Palladino et al, 2000). In einer Zusammenarbeit mit Prof. R. A. Reenan von der Universität

in Connecticut (USA) soll nun überprüft werden, ob in der *dADAR* Mutante die prä-mRNA von *Synapsin* in diesem Bereich keinen Austausch des Adenosins aufweist. Dies wäre ein direkter Beweis für das Editing der Kinase Konsensussequenz in der A-Domäne des Proteins durch das ADAR Enzym. Ein weiterer jedoch indirekter Beweis könnte im Vergleich des genomischen Abschnittes zwischen Exon 4 und 5 des *Synapsins* in verschiedenen *Drosophila* Arten liegen. Im Falle des RNA-Editings im *para*-Lokus konnte in einem intrinsischen ECS Abschnitt zwischen den *Drosophila* Arten *D. melanogaster* und *D. virilis* eine Sequenz-übereinstimmung von bis zu 94% beobachtet werden, während in anderen Intronabschnitten lediglich eine bis zu 50% identische Nukleotidabfolge identifiziert werden konnte. Die potentielle 15 Basen umfassende ECS im Intron 4 des *Synapsins* sollte daher ebenfalls auf den Grad der Konserviertheit hin überprüft werden.

Um eine mögliche funktionelle Relevanz der Modifikation der beiden Protein Kinase A Erkennungsstellen im *Synapsin* aufzudecken, wurden Mutationen in die entsprechenden Bereiche der cDNA eingebracht. Die so hergestellten verschiedenen Formen des Proteins könnten in in-vitro Experimenten auf ihren Phosphorylierungsgrad überprüft werden, so dass ein Rückschluss auf die Funktion des Editings gezogen werden kann. Dabei könnte sich eine Beeinträchtigung in der Kinaseeffektivität in der editierten Form gegenüber der nicht editierten Form herausstellen. Auch das Einbringen der mutierten cDNA in einen Transformationsvektor und die Integrierung in das Genom der Fliege könnte Effekte der *Synapsin*-Modifikation für die synaptische Transmission in der Fliege aufdecken.

Im Rahmen eines Großpraktikums wurden erste Versuche zu einer Herstellung eines *Synapsin*-RNAi Konstruktes durchgeführt. Die Herstellung eines solchen Konstruktes hätte den Vorteil, die *Synapsin* Expression durch gezielte Verwendung der Gal4/ UAS Technik in bestimmten Regionen des Gehirns ausschalten zu können und so weitere Informationen über die Notwendigkeit des Gens zu erhalten.

Im Calcium Imaging Projekt konnte durch die etablierten UAS-Linien der erste Schritt zur Anwendung der Methode in *Drosophila melanogaster* vollzogen werden. In weiteren Arbeiten, teilweise in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von G. Galizia (FU Berlin), konnte die Methode erfolgreich eingesetzt werden (Diegelmann et al., 2001; Fiala et al, 2002; 2003). Weitere Anwendungen des Calcium Imagings auf verschiedene Fragestellungen, z.B. bei der olfaktorischen Informationsverarbeitung in der Riechbahn der Fliege oder der Laufsteuerung durch den Zentralkomplex, werden derzeit am Lehrstuhl vorbereitet.

6 Zusammenfassung

Synapsine bilden eine Familie konservierter, abundanter Phosphoproteine der präsynaptischen Endigung. Sie verankern synaptische Vesikel am Zytoskelett und sind an der Feinregulation der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt. In vorangegangenen Arbeiten wurde das *Synapsin* Gen von *Drosophila melanogaster* kloniert und charakterisiert. Außerdem konnten ausgehend von diesen Erkenntnissen mehrere Deletionsmutanten durch Jump-out Mutagenese kreiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Details der molekularen Charakterisierung des *Synapsin*-Lokus, sowie Daten über die phänotypische Relevanz des Proteins ermittelt.

Durch genaue Kartierung der Defizienzen in den Mutanten konnten bislang unbekannte regulatorische Elemente des *Synapsin* Gens identifiziert werden. Mit dieser Information sollte es möglich sein, einen *Synapsin*-„Rescue“ Vektor zu konstruieren, der nach Transformation in die Nullmutante den wildtypischen Phänotyp wiederherstellt.

Beim Vergleich der im Rahmen des Berkeley *Drosophila* Genom Projekt veröffentlichten Sequenz des *Synapsin* Gens mit vor sieben Jahren publizierten Sequenzdaten fielen Diskrepanzen sowohl in der genomischen Sequenz als auch in der cDNA auf. Um zu klären, ob es sich hier um Artefakte, Polymorphismen oder systematische Modifikationen handelt, wurde der entsprechende Bereich von neun an verschiedenen Orten gefangenen Wildtypen genomisch und auf der cDNA Ebene amplifiziert und sequenziert. In allen Fällen wurde die genomische Sequenz des Genomprojekts verifiziert, so dass von einem Sequenzierfehler in der früheren Sequenz auszugehen ist. Als Folge ergibt sich eine Exon-Intron Struktur, bei der die Spleiß-Konsensussequenz (GT-AG Regel) im Intron 4 des *Synapsins* gewahrt bleibt. Dagegen bestätigten die RT-PCR Sequenzen die früheren cDNA-Daten, so dass ein A zu G Austausch zwischen der genomischen Sequenz und der cDNA des Proteins aufgedeckt wird. Dieser Austausch führt zu einer Veränderung der in allen bisher bekannten Synapsinen konservierten Zielsequenz der Proteinkinase CaMK I/IV und PKA, was interessante Fragen zu seiner funktionellen Bedeutung aufwirft. Die Basensubstitution spricht für ein A-zu-I RNA-Editing auf der Ebene der Ribonukleinsäure. Dieser Vorgang wird durch das Enzym *dADAR* katalysiert und wurde bereits für verschiedene neuronale Proteine nachgewiesen. Die für die Reaktion benötigte doppelsträngige Sekundärstruktur der RNA kann durch die Sequenz der prä-mRNA des *Synapsins* gebildet werden. Die potentielle „Editing site Complementary Sequence“ (ECS) konnte im Intron 4 in einem Abstand von ca. 90 Basen stromabwärts der Editing-Stelle durch ein Computerprogramm ermittelt werden. Der A zu G Austausch wird in allen Laborwildtypen und allen neu etablierten Stämmen, sowie in verschiedenen Entwicklungsstadien beobachtet. Lediglich in einem cDNA-Gemisch aus Eiern, Embryonen und 1. Larven findet man neben der editierten auch die nicht-editierte Sequenz. Um in späteren Experimenten die Funktion der Phosphorylierung und die Auswirkung der mRNA Editierung ermitteln zu können wurden in einem weiteren Versuch die beiden Erkennungsstellen der PKA in der cDNA durch Mutationen modifiziert, so dass Phosphorylierungstests an den Konstrukten durchgeführt werden können.

Zur phänotypischen Charakterisierung der Nullmutante wurde die Defizienz-Linie *Syn*⁹⁷ durch extensive Rückkreuzung in den genetischen Hintergrund des Wildtyps CantonS eingebracht, der als Standard-Kontrollstamm für Verhaltensexperimente und insbesondere Lernversuche dient. Die Linie *Syn*^{97CS} wurde im Rahmen einer Kooperation von Mitarbeitern des Lehrstuhls in verschiedenen Verhaltenstests und Lernparadigmen auf phänotypische Veränderungen überprüft. Dabei fanden sich mehrere Verhaltensunterschiede zum Wildtyp, die vermutlich auf geringfügigen Modifikationen in komplexen neuronalen Netzwerken beruhen. In

operanten Lernparadigmen konnte ein Einfluss der Synapsin-Elimination auf den Lernerfolg detektiert werden. Dabei trat die Reduktion des Lernindex bereits im dritten Larvenstadium auf und setzte sich in der adulten Fliege fort. Der Einfluss des Fehlens des Synapsins auf Lernprozesse in *Drosophila* steht im Einklang mit Befunden aus Knock-out Mäusen für SynI + II. Im reduzierten Courtship Index der *Syn*^{97CS} Männchen offenbart sich ein konkreter Hinweis auf eine verringerte Darwin'sche Fitness der Synapsin-Nullmutante. Die Gesamtheit der in der *Synapsin*-Nullmutante entdeckten Phänotypen könnte den hohen Konservierungsgrad des Proteins zwischen Vertebraten und Invertebraten erklären.

In einem weiteren Teil-Projekt konnten Mutationen in die cDNA des Calciumsensor Cameleon 2.0 Proteins eingebracht werden, um so die verbesserte Version Cam 2.1 zu erhalten. Daraufhin wurden mehrere transgene UAS-Cam 2.1 Linien hergestellt, die bei der Kreuzung mit verfügbaren Gal4 Linien den Calciumsensor für eine Expression in definierten Neuronenpopulationen von *Drosophila* zugänglich machen. In weiterführenden Arbeiten konnte die Funktionalität des Fusionsproteins überprüft werden und somit die ersten Schritte hin zur Anwendung der in-vivo Calcium Imaging Methode am Lehrstuhl durchgeführt werden.

7 Summary

Synapsins are abundant synaptic vesicle-associated phosphoproteins which are highly conserved between species. They are involved in anchoring the synaptic vesicle to the cytoskeleton and in the neurotransmitter release. Previously the *synapsin* gene (*syn*) in *Drosophila melanogaster* was cloned and characterized. Several deletions in the locus were generated by jump-out mutagenesis. In this thesis I present further details on the molecular characterization of the *synapsin* gene as well as data on the phenotypical relevance of the protein.

Previously unknown regulatory elements for the *synapsin* gene were identified by mapping the breakpoints of several mutants. By using this information it should be possible to generate a rescue construct for *syn* mutants apsin to create a transgenic line with a wild-type-like expression.

By comparing the synapsin sequence published seven years ago with the sequence from the Berkeley Drosophila Genome Project a discrepancy was detected regarding both the genomic and the cDNA sequence. In order to clarify if this discrepancy is based on an artefact, a polymorphism or a systematic modification, the region was amplified and sequenced at the genomic and cDNA level in nine different wild-type lines. In all cases the genomic sequence was identical to the data of the genome project, giving rise to the suspicion that the previously published sequence contained a sequencing artefact. This result eliminates the need to postulate an unconventional exon-intron structure that would violate the GT-AG splice consensus for in intron 4 of the *synapsin* gene. However the data from RT-PCR confirmed the cDNA sequence, proving an A to G exchange between genomic DNA and cDNA. This exchange leads to a modification of the aminoacid sequence at the highly conserved target site of the protein kinases CaMK I/ IV and PKA, raising interesting questions about the functional significance of the modification. The substitution is typical for an A-to-I editing event at the RNA level. The modification is catalysed by the dADAR enzyme and was already identified in several neuronal proteins. The necessary double-stranded secondary structure of the RNA can be formed by the *synapsin* pre-mRNA. The possible editing site complementary sequence (ECS) was detected 90 base downstream of the editing site within intron 4 by computer analysis. The A-to-G exchange was observed in all laboratory and new established wild-type strains as well as during most development stages. Only in a mixed cDNA fraction from eggs, embryos and first larvae a non-edited version coexists with the edited form. For further experiments on the function of phosphorylation at this site and on the relevance of the RNA-editing mutations were introduced into the cDNA in order to generate informative constructs for phosphorylation assays.

For the phenotypical characterization of the flies lacking synapsin the null-mutant *Syn*⁹⁷ was intensively crossed into the genetic background of the wild-type control strain CantonS, which normally serves as a control in behavioral and especially learning paradigms. The newly established *Syn*^{97CS} line was tested in collaboration with colleagues at the department for significant differences in behavior or learning compared to the wild-type. Several behavioral abnormalities were found which probably are due to minor modifications in complex neuronal networks. In operant learning tasks we found influences of the protein deficiency. A reduction in the learning index already exists at the 3rd larval stage and persists in the adult fly. The influence of the elimination of synapsin on learning processes in *Drosophila* is in agreement with results from *synI+II* knock-out mice. A link to a reduction of the Darwinian fitness of *Syn*^{97CS} mutants came from experiments using the courtship

suppression paradigm, where mutant males showed a reduced courtship index. In combination these phenotypes may well explain the high conservation of the protein between vertebrates and invertebrates.

In another project a mutation was introduced in the cDNA of the calcium sensor cameleon 2.0 in order to create the improved version cameleon 2.1. Several UAS-Cam 2.1 transgenic lines could be established. By crossing these lines with Gal4 flies the calcium sensor could be expressed in a subset of defined neurons. In subsequent experiments the function of the modified protein could be demonstrated establishing the first steps towards in-vivo calcium imaging at the department.

8 Literaturverzeichnis

- Adams, M. D. et al. (2000): "The genome of *Drosophila melanogaster*." *Science* 287, 2185-2195.
- Ashburner, M. (1989a): "*Drosophila*. A Laboratory Manual.", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Ashburner, M. (1989b): "*Drosophila*. A Laboratory Handbook.", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Auluck, P.K.; Chan, H.Y.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.; Bonini, J.H. (2002): "Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease.", *Science* 295, 865-868.
- Bass, B.L. (2002): "RNA Editing by Adenosine Deaminases that act on RNA.", *Annu. Rev. Biochem.* 71, 817-846.
- Bähler, M.; Greengard, P. (1987): "Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner.", *Nature* 326, 704-707.
- Ballinger, D.G.; Benzer, S. (1989): "Targeted gene mutations in *Drosophila*.", *PNAS USA* 86, 9402-9406.
- Bausenwein, B.; Wolf, R.; Heisenberg, M. (1986): "Genetic dissection of optomotor behaviour in *Drosophila melanogaster*. Studies on wild-type and the mutant optomotor-blind^{H31}." *J. of Neurogenetics* 3, 87-109.
- Bellen, H.J.; O'Kane, C.J.; Wilson, C.; Grossniklaus, U.; Paerson, R.K.; Gehring, W.J. (1989): "P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*." *Genes & Dev.* 3, 1288-1300
- Benfenati, F.; Bähler, M.; Jahn, R.; Greengard, P. (1989): "Interactions of Synapsin I with Small Synaptic Vesicles: Distinct Sites in Synapsin I Bind to Vesicle Phospholipids and Vesicle Proteins", *J. of Cell Biol.* 108, 1863-1872.
- Benfenati, F.; Valtorta, F.; Greengard, P. (1991): "Computer modeling of synapsin I binding to synaptic vesicles and F-actin: implications for regulation of neurotransmitter release.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 575-579.
- Benfenati, F.; Valtorta, F.; Chiergatti, E.; Greengard, P. (1992): "Interaction of free and synaptic-bound synapsin I with F-actin.", *Neuron* 8, 377-386.
- Benfenati, F.; Valtorta, F.; Rossi, M. C.; Onofri, F.; Sihra, T.; Greengard, P. (1993): "Interactions of Synapsin I with Phospholipids: Possible Role in Synaptic Vesicle Clustering and in Maintenance of Bilayer Structures", *J. of Cell Biol.* 123, Nr.6, 1845-1855.
- Benne, R.; Burg, J.V.D.; Brakenhoff, J.P.J.; Sloof, P.; Boom, J.H.V. (1986): "Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA." *Cell* 46, 819-826.
- Benne, R. (1993): "RNA Editing: The Alteration of Protein Coding Sequences of RNA." Chichester, UK.
- Benne, R. (1994): "RNA editing in trypanosomes." *Eur. J. Biochem.* 221, 9-23.
- Benzer, S. (1967): "Behavioral mutants of *Drosophila* isolated by counter-current distribution", *PNAS USA* 58, 1112-1119.
- Benzer, S.; Quinn, W.G.; Harris, W.A. (1974): "Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 708-712.

- Bier, H. J.; O'Kane, C. J.; Wilson, C.; Grossniklaus, U.; Pearson, R. K.; Gehring, W. J. (1989): "P-element mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*", *Genes and Development* 3, Nr.9, 1288-1300.
- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979): "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.", *Nucl. Acid Res.* 7, 1513-1522.
- Brini, M.; Marsault, R.; Bastianutto, C.; Pozzan, T.; Rizzuto, R. (1994): "Nuclear targeting of aequorin. A new approach for measuring nuclear Ca²⁺ concentration in intact cells." *Cell Calcium* 16, 259-268.
- Blondeau, J.; Heisenberg, M. (1982): "The three-dimensional optomotor torque system of *Drosophila melanogaster*." *J. Comp. Phys.* 145, 321-329.
- Brand, A.H.; Perrimon, N. (1993): "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118 (2), 401-415.
- Bülthoff, H.; Götz, K.G.; Herre, M. (1982a): "Recurrent Inversion of Visual orientation in the Walking Fly, *Drosophila melanogaster*." *J. Comp. Phys.* 148, 471-481.
- Bülthoff, H. (1982b): "*Drosophila* Mutants Disturbed in Visual Orientation.", *Biol. Cybernetics.* 45, 63-70.
- Castle, W.E., Carpenter, F.W., Clark, A.H., Mast, S.O., Barrows, W.N. (1906): "The effects of inbreeding, cross-breeding and selection upon the fertility and variability of *Drosophila*." *Proceedings of the American Academy of Arts and Science* 41, 729-786.
- Chang, B.J.; Lau, P.; Chan, L. (1998): "Apolipoprotein B mRNA editing." Washington, DC: ASM Press, 325-342.
- Chi, P.; Greengard, P.; Ryan, T.A. (2001): "Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity." *Nat. Neurosci.* 4, 1187-1193.
- Chi, P.; Greengard, P.; Ryan, T.A. (2003): "Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies." *Neuron* 38, 69-78.
- Chin, L.-S.; Li, L.; Ferreira, A.; Kosik, K. S.; Greengard, P. (1995): "Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice", *PNAS* 92, 9230-9234.
- Chin, L.-S.; Li, L.; Greengard, P. (1994): "Neuron-specific Expression of the Synapsin II Gene Is Directed by a Specific Core Promotor and Upstream Regulatory Elements", *JBC* 269, Nr.25, 18507-18513.
- Czernik, A.J.; Pang, D.T.; Greengard, P. (1987): "Amino acid sequences surrounding the cAMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent phosphorylation sites in rat and bovine synapsin I", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7518-7522.
- Dalby, B., Pereira, A.J., Goldstein, L.S.B. (1995): "An Inverse PCR Screen for the Detection of P- Element Insertions in Cloned Genomic Intervals in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* 139, 757-766.
- De Camilli, P.; Cameron, R.; Greengard, P. (1983b): "Synapsin I (Protein I), a Nerve Terminal-Specific Phosphoprotein. I. Its general Distribution in Synapses of The Central and Peripheral Nervous System Demonstrated by Immunofluorescence in Frozen and Plastic Sections", *J. of Cell Biol.* 96, 1337-1354.
- De Camilli, P.; Harris, S. M.; Huttner, W. B.; Greengard, P. (1983a): "Synapsin I (Protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein: II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes", *J. Cell Biol.* 96, 1355-1373.
- Diegelmann, S.; Fiala, A.; Leibold, C.; Spall, T.; Buchner, E. (2002): "Transgenic flies expressing the fluorescence calcium sensor Cameleon 2.1 under UAS control.", *Genesis* 34, 95-98.

- Dill, M.; Wolf, R.; Heisenberg M. (1995): "Behavioral analysis of *Drosophila* landmark learning in the flight simulator.", *Learn. Memory* 2, 152-160.
- Eberle, K. K., Zinsmaier, K. E., Buchner, S., Gruhn, M., Jenni, M., Arnold, C., Liebold, C., Reisch, D., Walter, N., Hafen, E., Hofbauer, A., Pflugfelder, G.O., Buchner, E. (1998): "Wide distribution of the cysteine string proteins in *Drosophila* tissues revealed by targeted mutagenesis." *Cell Tissue Res.* 294, 203-217.
- Ernst, R.; Heisenberg, M. (1999): "The memory template in *Drosophila* pattern vision at the flight simulator.", *Vision Research* 39, 3920-3933.
- Esser, L.; Wang, C.R.; Hosaka, M.; Smagula, C.S.; Südhof, T.C.; Deisenhofer, J. (1998): "Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes.", *EMBO Journal* 17(4), 977-984.
- Feinberg, A.P.; Vogelstein, B. (1983): "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.", *Anal. Biochem.* 132(1), 6-13.
- Feng, J.; Chi, P.; Blanpied, T.A.; Xu, Y.; Magarinos, A.M.; Ferreira, A.; Takahashi, R.H.; Kao, H.T.; McEwen, B.S.; Ryan, T.A.; Augustine, G.J.; Greengard, P. (2002): "Regulation of neurotransmitter release by synapsin III.", *J. Neurosci.* 22(11), 4372-4380.
- Ferreira, A.; Han, H.-Q.; Greengard, P.; Kosik, K. S. (1995): "Suppression of synapsin II inhibits the formation and maintenance of synapses in hippocampal culture", *PNAS* 92, 9225-9229.
- Ferreira, A.; Kosik, K. S.; Greengard, P.; Han, H.-Q (1994): "Aberrant Neurites and Synaptic Vesicle Protein Deficiency in Synapsin II-Depleted Neuron", *Science* 264, 977-979.
- Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Eisermann, B.; Sachse, S.; Devaud, J.M.; Buchner, E. (2002): "Genetically expressedameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons.", *Curr. Biol.* 12, 1877-1884.
- Fiala, A.; Spall, T. (2003): "In vivo calcium imaging of brain in *Drosophila* by transgenic cameleon expression.", *Sci STKE* 174, PL6.
- Garza, D.; Medhora, M. M.; Hartl, D. L. (1990): "*Drosophila* nonsense suppressors: functional analysis in *saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila* tissue cultures and *Drosophila melanogaster*", *Genetics* 126, 625-637.
- Gerber, B.; Scherer, S.; Stocker, R.F. (2003): "Olfactory Learning in Individually Assayed *Drosophila* Larvae.", *Learn. & Mem.* 10, 217-225.
- Godenschwege, T.A. (1995): "Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen ein Synapsin-ähnliches Protein aus *Drosophila melanogaster*.", Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Godenschwege, T.A. (1999): "Untersuchungen zum Synapsin-Lokus in *Drosophila melanogaster*: Herstellung und Charakterisierung von Mutanten.", PhD-thesis, Universität Würzburg.
- Gott, J.M. und Emeson, R.B. (2000): "Functions and Mechanisms of RNA Editing." *Annu. Rev. Genet.* 34, 499-531.
- Götz, K.G. (1964): "Optomotorische Untersuchung des visuellen Systems einiger Augenmutanten der Fruchtfliege *Drosophila*." *Kybernetik.* 2, 77-92.
- Greengard, P.; Valtorta, F.; Czernik, A.J.; Benfenati F. (1993): "Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function." *Science* 259, 780-785.
- Grosjean, H. und Benne, R (1998): "Modification and Editing of RNA." Washington, DC: ASM Press.

- Hackett, J.T.; Cochran, S.L.; Greenfield, I.J.; Brosius, D.C.; Ueda, T. (1990): "Synapsin I injected presynaptically into goldfish Mauthner axons reduces quantal synaptic transmission.", *J.Neurophysiol.* 63, 701-706.
- Hall, F.L.; Mitchell, J.P.; Vulliet, P.R. (1990): "Phosphorylation of synapsin I at a novel site by proline-directed protein kinase.", *J.Biol.Chem.* 265, 6944-6948.
- Han, H.-Q.; Nichols, R. A.; Rubin, M. R.; Bähler, M.; Greengard, P. (1991): "Induction of formation of presynaptic terminals in neuroblastula cells by synapsin IIb", *Nature* 349, 697-700.
- Han, H.-Q; Greengard, P. (1994): "Remodelling of cytoskeletal architecture of nonneuronal cells induced by synapsin", *PNAS* 91, 8557-8561.
- Hattfield, D. L. (1990): "Structure and Function of suppresser tRNAs in high Eukaryotes", *Biochemistry and Molecular Biology* 25, Nr.2, 71ff.
- Heimbeck, G. (1990): "Westernblot-Analyse und Expressionsklonierung von gehirnspezifischen exprimierten Genen bei *Drosophila melanogaster*.", PhD-thesis, Universität Würzburg.
- Heisenberg, M.; Wolf, R. (1979): "On the Fine Structure of Yaw Torque in Visual Flight Orientation of *Drosophila melanogaster*", *Journal of Comparative Physiology A* 130, 113-130.
- Herb, A.; Higuchi, M.; Sprengel, R.; Seeburg, P.H. (1996): "Q/R site editing in kainate receptor GluR5 and GluR6 pre-mRNAs requires distant intronic sequences." *PNAS* 93, 1875-1880.
- Hosaka, M.; Südhof, T. C. (1998): "Synapsin III, a Novel Synapsin with an unusual Regulation by Ca^{2+} .", *Journal of Biological Chemistry* 273, Nr.22, 13371-13374.
- Higuchi, M.; Single, F.N.; Kohler, M.; Sommer, B.; Sprengel, R.; et al. (1993): "Rna editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a basepaired intron-exon structure determines position and efficiency." *Cell* 75, 1361-1370.
- Hilfiker, S., Pieribone V.A., Czernik, A.J., Kao, H.-T., Augustine, G.J., Greengard, P. (1999): "Synapsins as regulators of neurotransmitter release." *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 269-279.
- Hofbauer, A. (1991): "Eine Bibliothek monoklonaler Antikörper gegen das Gehirn von *Drosophila melanogaster*.", PhD-thesis, Universität Würzburg.
- Hoopengardner, B.; Bhalla, T.; Staber, C.; Reenan, R. (2003): "Nervous System Targets of RNA Editing Identified by Comparative Genomics." *Science* Vol. 301, 832-835.
- Hosaka, M.; Südhof, T.C. (1998): "Synapsin III, a novel synapsin with an unusual regulation by Ca^{2+} .", *J. Biol. Chem.* 273, 13371-13374.
- Howard, L.O. (1900): A contribution to the study of the insect fauna of human excrement (with special references to the spread of typhoid fever by flies). *Proceedings of the Washington Academy of Science* 2, 541-604.
- Kaiser, K.; Goodwin, S.F. (1990): "Site-selected transposon mutagenesis of *Drosophila*.", *PNAS* 87, 1686-1690.
- Kamyshev, N.G.; Iliadi, K.G.; Bragina, J.V. (1999): "*Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory.", *Learn. Mem.* 6, 1-20.
- Kao, H.-T.; Porton, B.; Czernik, A. J.; Feng, J.; Yiu, G.; Häring, M.; Benfenati, F.; Greengard, P. (1998): "A third member of the synapsin gene family", *PNAS* 95, 4667-4672.
- Kendall, J. M.; Dormer, R. L.; Campbell, A. K. (1992): "Targeting aequorin to the endoplasmic reticulum of living cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1008-1016.

- Kendall, J. M.; Badminton, M. N.; Sala-Newby, G. B.; Campbell, A. K.; Rembold, C. M. (1996): "Recombinant apoaequorin acting as a pseudo-luciferase reports micromolar changes in the endoplasmic reticulum free Ca²⁺ of intact cells." *Biochem. J.* 318, 383-387.
- Keller, A.; Sweeney, S.T.; Zars, T.; O'Kane, C.J.; Heisenberg, M. (2002): "Targeted expression of tetanus neurotoxin interferes with behavioral responses to sensory input in *Drosophila*." *J. Neurobiol.* 50(3), 221-233.
- Kim, T.T.; Krupa, D.J.; Thompson, R.F. (1998): "Inhibitory cerebello-olivary projections and blocking effect in classical conditioning." *Science* 279, 570-573.
- Klagges, B. R. E. (1995): "DSH: Ein Synapsin-Homolog aus *Drosophila melanogaster*", PhD-Thesis, Universität Würzburg.
- Klagges, B. R. E.; Heimbeck, G.; Godenschwege, T. A.; Hofbauer A.; Pflugfelder, G. O.; Reifegerste, R.; Reisch, D.; Schaupp, M.; Buchner S.; Buchner, E. (1996): "Invertebrate Synapsins: A Single Gene Codes for Several Isoforms in *Drosophila*", *Journal of Neuroscience* 16, Nr.10, 3154-3165.
- Klemenz, R.; Weber, U.; Gehring, W. (1987): "The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*", *Nucleic Acids Res.* 15, 3947-3959.
- Kretschmar, D.; Brunner, A.; Wiersdorff, V.; Pflugfelder, G.O.; Heisenberg, M.; Schneuwly, S. (1992): "Giant lens, a gene involved in cell determination and axon guidance in the visual system of *Drosophila melanogaster*." *EMBO* 11, 2531-2539.
- Kuromi, H.; Kidokoro, Y. (2002): "Selective replenishment of two vesicle pools depends on the source of Ca²⁺ at the *Drosophila* synapse." *Neuron* 35, 333-343.
- Kyhse-Anderson, J. (1984): "Electroblotting of multiple gels", *J. Biochem. Biophysics Methods* 10, 203.
- Lewin, B. (2000): "Genes VII", Oxford University Press.
- Li, L.; Chin, L.-S.; Shupliakov, O.; Brodin, L.; Sihra, T. S.; Hvalby, O.; Jensen, V.; Zheng, D.; McNamara, J. O.; Greengard, P.; Andersen, P. (1995): "Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission and increased seizure propensity, in synapsin I-deficiency mice", *PNAS* 92, 9235-9239.
- Liao, G.C.; Rehm, E.J.; Rubin, G.M. (2000): "Insertion site preferences of the P transposable element in *Drosophila melanogaster*." *PNAS*, Vol.97, Nr. 7, 3347-3351.
- Llinas, R.; McGuinness, T. L. (1985): "Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse", *PNAS* 82, 3035-3039.
- Llinas, R.; Gruner, J.A.; Sugimori, M.; McGuinness, T.L.; Greengard, P. (1991): "Regulation by synapsin I and Ca²⁺ / calmodulin dependent protein kinase II of neurotransmitter release in squid giant synapse." *J. Physiol. London* 436, 257-282.
- Lukowiak, L.; Ringseis, E.; Spencer, G.; Wildering, W.; Naweid, S. (1996): "Operant conditioning of the aerial respiratory behavior in *Lymnaea stagnalis*." *J. Exp. Bio.* 199, 683-691.
- Ma, E.; Tucker, M.C.; Chen, Q.; Haddad, G.G. (2002): "Developmental expression and enzymatic activity of pre-mRNA deaminase in *Drosophila melanogaster*." *Molecular Brain Research* 102, 100-104.
- Mandell, J.W.; Townes-Anderson, E.; Czernik, A.J.; Cameron, R.; Greengard, P.; De Camilli, P. (1990): "Synapsins in the vertebrate retina. Absence from ribbon synapses and heterogeneous distribution among conventional synapses." *Neuron* 5, 19-33.
- Mandell, J.W.; Czernik, A.J.; De Camilli, P.; Greengard, P.; Townes-Anderson, E. (1992): "Differential expression of synapsins I and II among rat retinal synapses." *J. Neurosci.* 12, 1736-1749.

- Maniatis, T.; Fritsch, F. E.; Sambrook, J. (1982): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Martin J.-R.; Ernst, R.; Heisenberg, M. (1998): "Mushroom Bodies Suppress Locomotor Activity in *Drosophila melanogaster*.", *Nature* 375, 493-496.
- Martin, L.A.; Goldowitz, D.; Mittleman, G. (2002): "The cerebellum and spatial ability: dissection of motor and cognitive components with mouse model system." *Eur. J. Neurosci.*, 18, 2002-2010.
- Matsubara, M.; Kusubata, M.; Ishiguro, K.; Uchida, T.; Titani, K.; Taniguchi, H. (1996): "Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions.", *J. Biol. Chem.* 271, 21108-21113.
- McKenna, M.; Monte, P.; Helfand, S.L.; Woodard, C.; Carlson, J. (1989): "Characterization of the larval olfactory response in *Drosophila* and its genetic basis." *Behav. Genet.* 19, 267-283.
- Melcher, T.; Maas, S.; Higuchi, M.; Keller, W.; Seeburg, P.H.; et al. (1995): "Editing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR-B pre-mRNA in vitro reveals site-selective adenosine to inosine conversion.", *J. Biol. Chem.* 270, 8566-8670.
- Menzel, R.; Müller, U. (1996): "Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates.", *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 379-404.
- Miller, D.; Mahendran, R.; Spottswood, M.; Costandy, Wang, S. (1993): "Insertional editing in mitochondria of Physarum.", *Semin. Cell. Biol.* 4, 261-266.
- Miyawaki, A.; Llopis, J.; Heim, R.; McCaffery, J.M.; Adams, J.A.; Ikura, M.; Tsien, R.Y. (1997): "Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin.", *Nature* 388, 882-887.
- Miyawaki, A.; Griesbeck, O.; Heim, R.; Tsien, R.Y. (1999): "Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2135-2140.
- Nagalla, S.R.; Barry, B.J.; Spindel, E.R. (1994): "Cloning of complementary DNAs encoding the amphibian bombesin-like peptides Phe8 and Leu8 phyllolitorin from *Phyllomedusa sauvagei*: potential role of U to C RNA editing in generating neuropeptide diversity." *Mol. Endocrinol.* 8, 943-951.
- Nichols, R.A.; Sihra, T.S.; Czernik, A.J.; Nairn, A.C.; Greengard, P. (1990): "Calcium-calmodulin-dependent protein kinase I increases glutamate and noradrenalin release from synaptosomes.", *Nature London* 343, 647-651.
- Nichols, R.A.; Chilcote, T.J.; Czernik, A.J.; Greengard, P. (1992): "Synapsin I regulates glutamate release from rat brain synaptosomes.", *J. Neurosci.* 58, 783-785.
- O'Hare, K.; Rubin, G.M. (1983): "Structures of P Transposable Elements and Their Sites of Insertions and Excision in the *Drosophila melanogaster* Genome." *Cell* 34, 25-35.
- O'Kane, C.; Gehring, W.J. (1987): "Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*.", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84, 9123-9127.
- Palladino, M.J.; Keegan, L.P.; O'Connell, M.A.; Reenan, R.A. (2000): "A-to-I Pre-mRNA Editing in *Drosophila* Is Primarily Involved in Adult Nervous System Function and Integrity." *Cell* 102, 437-449.
- Pavlov, I.P. (1927): "Conditioned reflexes." *Oxford University Press*.
- Perrimon, N.; Stern, C. (1999): "Pattern formation and developmental mechanisms unresolved issues of pattern formation." *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 387-389.

- Pieribone, V. A.; Shupliakov, O.; Brodin, L.; Hilfiker-Rothenfluh, S.; Czernik, A. J.; Greengard, P. (1995): "Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release", *Nature* 375, 493-496.
- Pilgrim, D. B.; Belle, J.; (1993): "Expression of a *Drosophila melanogaster* amber suppresser tRNA^{Ser} in *Caenorhabditis elegans*", *Mol. Gen Genet* 241, 26-41.
- Polson, A.G.; Crain, P.F.; Pomerantz, S.C.; McCloskey, J.A.; Bass, B.L. (1991): "The mechanism of adenosine to inosine conversion by the double-stranded RNA unwinding/modifying activity: a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis." *Biochemistry* 30, 11507-11514.
- Polson, A.G.; Bass B.L. (1994): "Preferential selection of adenosine for modification by double-stranded RNA adenosine deaminase." *EMBO* 13(23), 5701-11.
- Pohar, N.; Godenschwege, T. A.; Buchner, E. (1999): "Invertebrate Tissue Inhibitor of Metalloproteinase: Structure and Nested Gene Organisation within *Synapsin* Locus is Conserved from *Drosophila* to Man", *Genomics* 57, 293-296.
- Price, D.H. und Gray, M.W. (1998): "Editing of tRNA." Washington, DC.: ASM Press, 289-305.
- Price, D.H. und Gray, M.W. (1999): "Confirmation of predicted edits and demonstration of unpredicted edits in *Acanthamoeba castellanii* mitochondrial tRNAs." *Curr. Genet.* 35, 23-29.
- Price, D.H. und Gray, M.W. (1999): "A novel nucleotide incorporation activity implicated in the editing of mitochondrial transfer RNAs in *Acanthamoeba castellanii*." *RNA*. 5, 302-317.
- Putz, G. (2002): "Characterization of memories and *ignorant* (S6KII) mutants in operant conditioning in the heat-box." Dissertationsschrift Universität Würzburg.
- Putz, G.; Heisenberg, M. (2003): "Memories in *Drosophila* heat-box learning.", *Learn. & Mem.* 9, 349-359.
- Reenan, R.A. (2001): "The RNA world meets behavior: A > I pre-mRNA editing in animals." *Trends Genet.* 17, 53-56.
- Reif, M. (1998): "The evolution of learning. A study in *Drosophila melanogaster*." Dissertationsschrift Universität Würzburg.
- Reisch, D. (2000): "Strukturelle und physiologische Untersuchung der Nerv-Muskel Synapse von *Drosophila melanogaster*." Dissertationsschrift, Universität Würzburg.
- Rescorla, R.A. (1988): "Behavioral studies of Pavlovian conditioning.", *Annu. Rev. Neurosci.* 11, 329-352.
- Rosahl, T. W.; Geppert, M.; Spillane, D.; Herz, J.; Hammer, R. E.; Malenka, R. C.; Südhof, T. C. (1993): "Short-Term synaptic Plasticity Is Altered in Mice Lacking Synapsin I", *Cell* 75, 661-670.
- Rosahl, T. W.; Spillane, D.; Missler, M.; Herz, J.; Selig, D. K.; Wolff, J. R.; Hammer, R. E.; Malenka, R. C.; Südhof, T. C. (1995): "Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation", *Nature* 375, Nr.8, 488-492.
- Rueter, S.M.; Burns, C.M.; Coode, S.A.; Mookherjee, P.; Emeson, R.B. (1995): "Glutamate receptor RNA editing in vitro by enzymatic conversion of adenosine to inosine." *Science* 267, 1491-1494.
- Rueter, S.M.; Emenson, R.B. (1998): "Adenosine-to-Inosine conversion in mRNA." Washington, DC.: ASM Press, 343-361.
- Rueter, S.M.; Dawson, T.R.; Emeson, R.B. (1999): "Regulation of alternative splicing by RNA editing." *Nature* 399, 75-80.

- Ryan, T. A.; Li, L.; Chin, L.-S.; Greengard, P.; Smith, S. J. (1996): "Synaptic Vesicle Recycling in Synapsin I Knock-out Mice", *Journal of Cell Biology* 134, Nr.5, 1219-1227.
- Sambrook, J.; Fritsch, F. E.; Maniatis, T. (1989): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; Cold Spring, New York.
- Samson, M.-L.; Lisbin, M. J.; White, K. (1995): "Two Distinct Temperature-Sensitive Alleles at the *elav* Locus of *Drosophila* Are Suppressed nonsense Mutations on the Same Tryptophan Codon", *Genetics* 141, 1101-1111.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): "DNA sequencing with chain-termination inhibitors", *PNAS* 74, 5463-5467.
- Schaeffer, E.; Alder, J.; Greengard, P.; Poo, M.-M. (1994): "Synapsin IIa accelerates functional development of neuromuscular synapses", *PNAS* 91, 3882-3886.
- Schaupp, M. (1998): "Reinigung und Charakterisierung zweier synaptischer Proteine, Synapsin und SAP47, aus *Drosophila melanogaster*.", PhD-thesis, Universität Würzburg.
- Scholz, H.; Ramond, J.; Singh, C.M.; Heberlein, U. (2000): "Functional ethanol tolerance in *Drosophila melanogaster*." *Neuron* 28, 261-271.
- Schuster, W.; Ternes, R.; Knoop, V.; Hiesel, R.; Wissinger, B., et al. (1991): "Distribution of RNA editing sites in *Oenothera* mitochondria mRNAs and rRNAs." *Curr. Genet.* 20, 397-404.
- Schwaerzel, M.; Heisenberg, M.; Zars, T. (2002): "Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level.", *Neuron* 35, 951-960.
- Semenov, E.P.; Pak, W.L. (1999): "Diversification of *Drosophila* chloride channel gene by multiple posttranscriptional mRNA modifications.", *J. Neurochem.* 72, 66-72.
- Sharma, P.M.; Bowman, M.; Madden, S.L.; Rauscher, F.J.; Sukumar, S. (1994): "RNA editing in the Wilm's tumor susceptibility gene, WT1." *Genes Dev.* 8, 720-731.
- Shorrock, B. (1980): "*Drosophila*" Ginn & Company Limited, London.
- Siegel, R.W.; Hall, J.H. (1979): "Conditioned response in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila*." *PNAS* 76, 565-578.
- Silva, A. J.; Rosahl, T. W.; Chapman P. F.; Marowitz, Z.; Friedman, E.; Frankland, P. W.; Cestari, V.; Cioffi, D.; Südhof, T. C.; Bourtchuladze, R. (1996): "Impaired learning in mice with abnormal short-lived plasticity.", *Current Biology* 6, Nr.11, 1509-1518.
- Skinner, B.F. (1938): "The behavior of organisms.", New York, Appleton.
- Skuse, G.R.; Cappione, A.J.; Sowden, M.; Metheny, L.J.; Smith, H.C. (1996): "The neurofibromatosis type I messenger RNA undergoes base-modification RNA editing." *Nucleic Acids Res.* 24, 478-485.
- Smith, H.C.; Gott, J.M.; Hanson, M.R. (1997): "A guide to RNA editing." *RNA* 3, 1105-1123.
- Spillane, D.M.; Rosahl, T.W.; Südhof, T.C.; Malenka, R.C. (1995): "Long-term Potentiation in Mice Lacking Synapsins." *Neuropharmacology*, Vol. 34, Nr. 11, 1573-1579.
- Spradling, A. C.; Rubin, G. M. (1982): "Transposition of cloned P-element into *Drosophila* germ line chromosomes", *Science* 218, 341-347.

- Stocker, R.F. (1994): "The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*.", *Cell Tissue Res.* 275, 3-26.
- Stocker, R.F.; Heimbeck, G.; Gendre, N.; de Belle, J.S. (1997): "Neuroblast ablation in *Drosophila* P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons.", *J. Neurobiol.* 32, 443-456.
- Stocker, R.F. (2001): "*Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity.", *Microsc. Res. Tech.* 55, 284-296.
- Stöber, G.; Meyer, J.; Nanda, I.; Wienker, T.F.; Saar, K.; Knapp, M.; Jatzke, S.; Schmid, M.; Lesch, K.P.; Beckmann, H. (2000): "Linkage and Family-Based Association Study of Schizophrenia and the Synapsin III Locus That Maps to Chromosome 22q13.", *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, 96, 392-397.
- Südhof, T. C.; Baumert, M.; Perin, M. S.; Jahn, R. (1989a): "A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*", *Neuron* 2, 1475-1481.
- Südhof, T. C.; Czernik, A. J.; Kao, H.-T.; Takei, K.; Johnston, P. A.; Horiuchi, A.; Kanazir, S. D.; Wagner, M. A.; Perin, M. S.; DeCamilli, P.; Greengard, P. (1989b): "Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic phosphoproteins", *Science* 245, 1474-1480.
- Südhof, T.C. (1990): "The Structure of the Human Synapsin I Gene and Protein", *J. of Biol. Chemistry* 265, Nr.14, 7849-7852.
- Südhof, T.C. (1995): "The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions.", *Nature* 375, 645-653.
- Takei, Y.; Harada, A.; Takeda, S.; Kobayashi, K.; Terada, S.; Noda, T.; Takahashi, T.; Hirokawa, N. (1995): "Synapsin I Deficiency Results in the Structural Change in the Presynaptic Terminals in the Murine Nervous system", *Journal of Cell Biology* 131, Nr.6, 1789-1800.
- Terada, S.; Tsujimoto, T.; Takei, Y.; Takahashi, T.; Hirokawa, N. (1999): "Impairment of Inhibitory Synaptic Transmission in Mice Lacking Synapsin I.", *The Journal of Cell Biology*, Vol. 145, Nr. 5, 1039-1048.
- Tully, T.; Quinn, W.G. (1985): "Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*.", *J. Comp. Physiol.* 157, 263-277.
- Tully, T.; Preat, T.; Boynton, S.C.; Del-Vecchio, M. (1994): "Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*.", *Cell* 79, 35-47.
- Unwin, E.E. (1907): "The vinegar fly (*Drosophila funebris*).", *Transactions of the Entomological Society of London* part 1, 285-302.
- Vawter, M.P.; Thatcher, L.; Usen, N.; Hyde, T.M.; Kleinman, J.E.; Freed, W.J. (2002): "Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia.", *Molecular Psychiatry* 7, 571-578.
- Valtorta, F.; Benfenati, F.; Greengard, P. (1992a): "Structure and function of the Synapsins", *J. of Biol. Chem.* 267, Nr.11, 7195-7198.
- Valtorta, F.; Greengard, P.; Fesce, R.; Chierigatti, E.; Benfenati, F. (1992b): "Effects of the neuronal phosphoprotein synapsin I on actin polymerisation. 1. Evidence for a phosphorylation-dependent nucleating effect", *J. Biol. Chem.* 267, 11281-11288.
- Valtorta, F.; Lezzi, N.; Benfenati, F.; Lu, B.; Poo, M.-M.; Greengard, P. (1995): "Accelerated structural maturation induced by synapsin I at developing neuromuscular synapses of *Xenopus laevis*", *European Journal of Neuroscience* 7, 261-270.

- Walter, N. (1991): "Site-selected P element mutagenesis.", Methods-Booklet.
- Werner, U. (2002): "Untersuchung zur Regulation und Funktion des *Synapsin* Gens in *Drosophila melanogaster*.", Diplomarbeit Universität Würzburg.
- Wisdom, R. (1999): "AP-1: One Switch for Many Signals.", *Experimental Cell Research*, 253, 180-185.
- Wolf, R.; Heisenberg, M. (1991): "Basic organization of operant behavior as revealed in *Drosophila* flight orientation", *Journal of Comparative Physiology A* 169, 699-705.
- Wolf, R.; Heisenberg, M. (1997): "Visual Space from Visual Motion: Turn Integration in Tethered Flying *Drosophila*.", *Learn. & Mem.* 4, 318-327.
- Wolf, R.; Wittig, T.; Liu, L.; Wustmann, G.; Eyding, D.; Heisenberg, M. (1998): "*Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile and motor learning.", *Learn. & Mem.* 5, 166-178.
- Wustmann, G.; Rein, K.; Wolf, R.; Heisenberg, M. (1996): "A new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*", *Journal of Comparative Physiology A* 179, 429-436.
- Wustmann, G.; Heisenberg, M. (1997): "Behavioral Manipulation of Retrieval in a Spatial Memory Task for *Drosophila melanogaster*", *Learning & Memory* 4, 328-336.
- Xia, S.Z.; Lui, L.; Feng, C.H.; Guo, A.K. (1997a): "Memory consolidation in *Drosophila* operant visual learning.", *Learn. & Mem.* 4, 205-218.
- Xia, S.Z.; Lui, L.; Feng, C.H.; Guo, A.K. (1997b): "Nutritional effects on operant visual learning in *Drosophila melanogaster*.", *Physiol. Behav.* 62, 263-271.
- Xia, S.Z.; Feng, C.H. Guo A.K. (1999): "Temporary amnesia induced by cold anesthesia and hypoxia in *Drosophila*.", *Physiol. Behav.* 65, 617-623.
- Yang, M.Y.; Armstrong, J.D.; Vilinsky I.; Strausfeld, N.J.; Kaiser, K. (1995): "Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns.", *Neuron* 15, 45-54.
- Yamauchi, M.; Yamauchi, N.; Meuth, M.; (1990): "Molecular cloning of the human CTP synthetase gene by functional complementation with purified human metaphase chromosomes." *EMBO J.* 9, 2095-2099.
- Yoshinaga, K.; Iinuma, H.; Masuzawa, T.; Uedal, K. (1996): "Extensive RNA editing of U to C in addition to C to U substitution in the *rbcL* transcripts of hornwort chloroplasts and the origin of RNA editing in green plants.", *Nucleic Acids Res.* 24, 1008-1014.
- Zars, T.; Wolf, R.; Davis, R.; Heisenberg, M. (2000): "Tissue-specific expression of a type I adenylyl cyclase rescues the rutabaga mutant memory defect: in search of the engram.", *Learn. Mem.* 7, 18-31.
- Zuker, M.; Mathews, D.H.; Turner, D.H. (1999): "Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology." J. Barciszewski and B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.

9 Anhang

9.1 Deletionskartierung von regulatorischen Mutanten von *Synapsin*

Aufgezeigt sind die Deletionsbruchpunkte der Jump-out Mutanten *Syn*⁹⁷, *Syn*¹⁴³, *Syn*¹⁶⁸, *Syn*¹⁷⁸ und *Syn*³²⁵ im Vergleich zur Wildtypsequenz. Die Nummern der Basen geben die Referenznummer des Klones AC003686 an.

```
WT      28021  cacgtgaaaa caagttttat gcaacagctc attgtttact tattgttggt ggggtcgttt
Syn97   28021  cacgtgaaaa caagttttat gcaacagctc attgtttact tattgttggt ggggtcgttt
Syn143  28021  cacgtgaaaa caagttttat gcaacagctc attgtttact tattgttggt ggggtcgttt
Syn168  28021  cacgtgaaaa caagttttat gcaacagctc attgtttact tattgttggt ggggtcgttt
Syn178  28021  cacgtgaaaa caagttttat gcaacagctc attgtttact tattgttggt ggggtcgttt
Syn325  28021  cacgtgaaaa caagtttt.. .....
```

//

```
WT      28501  cgtcctggcc cagttgctct ctatntttat caattcgcca tgcttgctga taaaaatatt
Syn97   28501  cgtcctggcc cagttgctct ctatntttat caattcgcca tgcttgctga taaaaatatt
Syn143  28501  cgtcctggcc cagttgctct ctatntttat caattcgcca tgcttgctga taaaaatatt
Syn168  28501  cgtcctggcc cagttgctct ctatntttat caattcgcca tgcttgctga taaaaatatt
Syn178  28501  cgtcctggcc cagttgctct ctatntttat .....
```

//

```
WT      28861  ccaaatttta agaaaatttg gcttgcatgg ttggttttga atagtgtatt atatagtgg
Syn143  28861  ccaaatttta agaaaatttg gcttgcatgg ttggttttga atagtgtatt atatagtgg
Syn168  28861  ccaaatttta agaaaatttg gcttgcatgg ttggttttga atagtgtatt atatagtgg
Syn178  28861  .....
```

Lage des P-Elementes in *Syn*^{PI}

```
WT      28921  ggttgatgga actcgtagcg taacgcagac ttcaatgaat cgatatgccc gcaggtttct
Syn97   28921  ggttgatgga actcgtagcg taacgcagac ttcaatgaat cgatatgccc gcagg.....
Syn143  28921  ggttgatgga actcgtagcg taacgcagac ttcaatgaat cgatatgccc gcagg.....
Syn168  28921  ggttgatgga actcgtagcg taacgcagac ttcaatgaat cgatatgccc gcagg.....
Syn178  28921  .....
```

//

```
WT      28981  cttactcacg catgcgcaact aacttccaat ggggtggtct tcgtaaaaga gagtaaccag
Syn97   28981  .....
```

//

```
WT      29101  aaagcctgga aaatattgaa tcatatntta attactcatc ctgcctgtct ataaaacaac
Syn97   29101  .....
```

//

```

WT      30361 ttatgacaag ccaacgcaca tatcaacaca aagcattctc gtaagggaaa agccactgga
Syn97   30361 ..... ..aacgcaca tatcaacaca aagcattctc gtaagggaaa agccactgga
Syn143  30361 ..... ..aacgcaca tatcaacaca aagcattctc gtaagggaaa agccactgga
Syn168  30361 ttatgacaag ccaacgcaca tatcaacaca aagcattctc gtaagggaaa agccactgga
Syn178  30361 ttatgacaag ccaacgcaca tatcaacaca aagcattctc gtaagggaaa agccactgga
Syn325  30361 ttatgacaag ccaacgcaca tatcaacaca aagcattctc gtaagggaaa agccactgga

```

//

```

WT      31881 acaatgtttt gcttggcagt cgacggcaaa aaaaaaaaga gagcaacaaa agcgacagtc
Syn97   31881 acaatgtttt gcttggcagt cgacggcaaa aaaaaaaaga gagcaacaaa agcgacagtc
Syn143  31881 ..... ..aacgcaca tatcaacaca aagcattctc gtaagggaaa agccactgga
Syn168  31881 acaatgtttt gcttggcagt cgacggcaaa aaaaaaaaga gagcaacaaa agcgacagtc
Syn178  31881 acaatgtttt gcttggcagt cgacggcaaa aaaaaaaaga gagcaacaaa agcgacagtc
Syn325  31881 acaatgtttt gcttggcagt cgacggcaaa aaaaaaaaga gagcaacaaa agcgacagtc

```

zusätzliche Basen in den Deletionen der Mutanten

<i>Syn</i> ⁹⁷	CATGATGAAA T
<i>Syn</i> ¹⁴³	CATGATGAAT AACATGTTA TGTTAACATA TATAT
<i>Syn</i> ¹⁶⁸	keine zusätzlichen Basen
<i>Syn</i> ¹⁷⁸	TGAATGATGT TATTCATC
<i>Syn</i> ³²⁵	CATC

9.2 Sequenz des Cameleon 2.0 Konstruktes

Folgend ist die Sequenz des verwendeten Cameleon 2.0 Konstruktes von Dr Ch. Schuster angegeben. Die Abfolge wurde durch eigene Sequenzierung mit den angegebenen Primern ermittelt. Abweichungen von der Sequenz von R. Tsien sind durch fette Buchstaben aufgezeigt. Die in der Mutation Cam 2.0 zu Cam 2.1 ausgetauschten Basen sind oberhalb des betreffenden Codons im EYFP markiert. Die angezeigten Restriktionsenzyme wurden für Klonierungsschritte verwendet.

```

HindIII   NotI     KpnI
|         |         |
AAGCTTGC GCGCCGCC ACCATGGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT CACCGGGGTGGTGCC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TTCGAACGCGCGGGTGGTACCACTCGTTCCCGCTCCTCGACAAGTGGCCCCACCACGGG

AS      K  L  A  A  A  T  M  V  S  K  G  E  E  L  F  T  G  V  V  P  -
                               Cham3
ATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGGACGTAACGGCCACAGGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TAGGACCAGCTCGACCTGCCGCTGCATTTGCCGGTGTCCAAGTCGCACAGGCCGCTCCC

AS      I  L  V  E  L  D  G  D  V  N  G  H  R  F  S  V  S  G  E  G  -
GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTCCCCTACGGTGGATGCCGTTTCCGACTGGGACTTCAAGTAGACGTGGTGGCCGTTTCGAC

AS      E  G  D  A  T  Y  G  K  L  T  L  K  F  I  C  T  T  G  K  L  -

```

```

      CCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      GGGCACGGGACCGGGTGGGAGCACTGGTGGGACTGGACCCCCGCACGTACCGAAGTCGGCC
AS      P V P W P T L V T T L T W G V Q C F S R -
           Cham4
      TACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      ATGGGGCTGGTGTACTTCGTCTGCTGAAGAAGTTCAGGCGGTACGGGCTTCCGATGCAG
AS      Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V -
           CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      GTCCTCGCGTGGTAGAAGAAGTTCCTGCTGCCGTTGATGTTCTGGGCGCGGCTCCACTTC
AS      Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K -
           TTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      AAGCTCCCGCTGTGGGACCACTTGGCGTAGCTCGACTTCCCCTAGCTGAAGTTCCTCCTG
AS      F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D -
           GGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
      CCGTTGTAGGACCCCGTGTTCGACCTCATGTTGATGTAGTCGGTGTTCAGATATAGTGG
AS      G N I L G H K L E Y N Y I S H N V Y I T -
           Cham5
      CGCCACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGAC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
      CGGCTGTTCTGCTCTTCTTGCCGTAGTTCCGGTTGAAGTTCTAGGCGGTGTTGTAGCTCCTG
AS      A D K Q K N G I K A N F K I R H N I E D -
           Cham12
      GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTG
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
      CCGTCGCACGTGAGCGGCTGGTGTATGGTCTTGTGGGGGTAGCCGCTGCCGGGGCAC
AS      G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V -
           CTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCTTCCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
      GACGACGGGCTGTTGGTGTATGGACTCGAGGGTCAGGCGGGACTCGTTTCTGGGGTTGCTC
AS      L L P D N H Y L S S Q S A L S K D P N E -
           Cham6
      AAGCGGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCCCGCATGCATGACCAACTG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
      TTCGCGCTAGTGTACCAGGACGACCTCAAGCACTGGCGGGCGGGCGTACGTACTGGTTGAC
AS      K R D H M V L L E F V T A A R M H D Q L -
           ACAGAAGAGCAGATTGCAGAGTTCAAAGAAGCCTTCTCATTATTTCGACAAGGATGGGGAC
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
      TGTCTTCTCGTCTAACGTCTCAAGTTTCTTCGGAAGAGTAATAAGCTGTTCTACCCCTG
AS      T E E Q I A E F K E A F S L F D K D G D -

```

```

GGCACCATCACCACAAAGGAACTTGGCACCGTTATGAGGTCGCTTGGACAAAACCCAACG
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
CCGTGGTAGTGGTGTTCCTTGAACCGTGGCAATACTCCAGCGAACCTGTTTTGGGTTGC

AS   G T I T T K E L G T V M R S L G Q N P T -

GAAGCAGAATTGCAGGATATGATCAATGAAGTCGATGCTGATGGCAATGGAACGATTTAC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
CTTCGTCTTAACGTCCTATACTAGTTACTTCAGCTACGACTACCGTTACCTTGCTAAATG

AS   E A E L Q D M I N E V D A D G N G T I Y -

TTTCCTGAATTTCTTACTATGATGGCTAGAAAAATGAAGGACACAGACAGCGAAGAGGAA
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
AAAGGACTTAAAGAATGATACTACCGATCTTTTTTACTTCCTGTGTCTGTGCGCTTCTCCTT

AS   F P E F L T M M A R K M K D T D S E E E -
      Cham7
ATCCGAGAAGCATTCCGTGTTTTTGACAAGGATGGGAACGGCTACATCAGCGCTGCTGAA
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
TAGGCTCTTCGTAAGGCACAAAACTGTTCTACCCCTTGCCGATGTAGTCGCGACGACTT
      Cham13

AS   I R E A F R V F D K D G N G Y I S A A E -

TTACGTCACGTCATGACAAACCTCGGGGAGAAGTTAACAGATGAAGAAGTTGATGAAATG
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
AATGCAGTGCAGTACTGTTTGGAGCCCCCTCTCAATTGTCTACTTCTCAACTACTTTAC

AS   L R H V M T N L G E K L T D E E V D E M -

ATAAGGGAAGCAGATATCGATGGTGATGGCCAAGTAAACTATGAAGAGTTTGTACAAATG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
TATTCCCTTCGTCTATAGCTACCACTACCGGTTCAATTTGATACTTCTCAAACATGTTTAC

AS   I R E A D I D G D G Q V N Y E E F V Q M -

ATGACAGCAAAGGGGGGAAGAGGCGCTGGAAGAAAACTTCATTGCCGTCAGCGCTGCC
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
TACTGTGCTTTTCCCCCCTTCTCCGCGACCTTCTTTTTTGAAGTAACGGCAGTCGCGACGG

AS   M T A K G G K R R W K K N F I A V S A A -

      SstI
      |
AACCGGTTCAAGAAGATCTCCAGCTCCGGGGCACTGGAGCTCATGGTGAGCAAGGGCGAG
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
TTGGCCAAGTTCTTCTAGAGGTGCGAGGCCCGTGACCTCGAGTACCACTCGTTCCCGCTC

AS   N R F K K I S S S G A L E L M V S K G E -

      Cham8
GAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCAC
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
CTCGACAAGTGGCCCCACCACGGGTAGGACCAGCTCGACCTGCCGCTGCATTTGCCGGTG

AS   E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H -

```

AAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 TTCAAGTCGCACAGGCCGCTCCCGCTCCCGCTACGGTGGATGCCGTTTCGACTGGGACTTC
 AS K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K -
 TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGC
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 AAGTAGACGTGGTGGCCGTTTCGACGGGCACGGGACCGGGTGGGAGCACTGGTGGAAAGCCG
 AS F I C T T G K L P V P W P T L V T T F G -
 T A A Cham-MT1
 TACGGCGTGCAGTGCTTCGCCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAG
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 ATGCCGCACGTACGAAGCGGGCGATGGGGCTGGTGTACTTCGTCTGTGTAAGAAGTTC
 AS Y G V Q C F A R Y P D H M K Q H D F F K -
 in Cam 2.1 L K Cham-MT2
 TCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAAC
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
 AGGCGGTACGGGCTTCCGATGCAGGTCTCGCGTGGTAGAAGAAGTTCCTGCTGCCGTTG
 AS S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N -
 TACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
 ATGTTCTGGGCGCGGCTCCACTTCAAGCTCCCGCTGTGGGACCACTTGGCGTAGCTCGAC
 AS Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L -
 Cham11
 AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTAC
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
 TTCCCCTAGCTGAAGTTCCTCCTGCCGTTGTAGGACCCCGTTCGACCTCATGTTGATG
 AS K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y -
 AACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTC
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
 TTGTCGGTGTTCAGATATAGTACCGGCTGTTTCGTCTTCTTCCGTTAGTTCCACTTGAAG
 AS N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F -
 Cham10
 AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACAGCAGAAC
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
 TTCTAGGCGGTGTTGTAGCTCCTGCCGTCGCACGTCGAGCGGCTGGTGTGATGGTTCGCTTTG
 AS K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N -
 ACCCCCATCGGGCAGGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCC
 1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
 TGGGGGTAGCCGCTGCCGGGGCACGACGACGGGCTGTTGGTGTGATGGACTCGATGGTCAGG
 AS T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y Q S -

```

      GCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACC
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
      CGGGACTCGTTTTCTGGGGTTGCTCTTCGCGCTAGTGTACCAGGACGACCTCAAGCACTGG
AS      A L S K D P N E K R D H M V L L E F V T -

                                     EcoRI
                                     |
      GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGAATTC
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1968
      CGGCGGCCCTAGTGAGAGCCGTACCTGCTCGACATGTTTCATTCTTAAG
AS      A A G I T L G M D E L Y K * E F -

```

9.3 Inverse PCR der Cameleon Fliegen

Im folgenden Abschnitt werden die erhaltenen Sequenzen aus den verschiedenen Ansätzen zur Lokalisation der P-Element Insertion in den Cameleon 2.0 und 2.1 Fliegenlinien dargestellt. Dabei gibt die Sequenz in rot den gefundenen Vektoranteil in der erhaltenen Sequenz an.

9.3.1 Cameleon 2.0 Linie C2-6I/STM

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HpaII-1 und 2

```

TATCGACGGGACCACCTTATCGTTATTTTCATCATGGCTGCGCCTTTCTTTTGCTTCTTCTGCTGCAATCAATAA
TACTCCGATACACAGGCTGCTCCTATCGATTGGGATATAAGGAACAGAAGTGTATCGATAAGTGGCTTCGAATTT
AATGAGTTATATTGACGATCGGTAATTTGCTAATTTTTATACTATAATATATTTCAAGTAATTATACTGGGCGGT
TATAAACGTAAAAGTTAAAAATTTAGAAATTAACCTCTTGCTAACCGATATCAATCACGGTGCGCATCTCTAATG
AAAATAGGAAAAGCGAAAGTCACGCAAAGCAGTAAACAAATTTAAGGTATATCGATAGACGTACACCCACAACCC
CAATTCACACCGGGATATATTTTTTATATACATAC

```

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HaeIII-3 und 4

```
CATCAGACTTATAAATAGAAAGTTGG
```

9.3.2 Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 53

Inverse PCR mit den Primer pUAST-Hpa-1

```

GTCGCTCCAAGGTCGTGCAACAAAAGGTCGAATGTGTTAGCTGGAGAGCGGGTGGGAGACAGCGAAAGAGCAACT
ACGAAACGTGGTGGTGGTGGAGGTGAATTATGAAGAGGGCGCGCCGATTTGAAAAGTATGTATATAAAAAATATA
TCCCGGTCTCACCAGGAGCTTTTAGCTCTCTGTCTCTGCCTCTCCCACTCTCTCTCGCCGCTCTCTTTGCTCGAG
CTTTTCAACTTGTGGCGGTAGTTTTCGGTTCAACTGGTGTGTATCCTGTAAGTGTATGTGTGTGTGGAA

```

Inverse PCR mit den Primer pUAST-HpaII-2

```

GTAAGCTTCGGCTATCGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATGAATCAGGGCCTTCCACACACACATACACT
TAGGGGATACAACACCAGTTGAACCGCAAACCTACCGCAACAAGT

```

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HaeIII-3

TTATGTTATTTTCATCATGCCCTGATTGCTGTATGGGTGTGCTTTTCCTCAAAGCTCGTTATTTATCTTCCGCCC
CGTGTGGCCAGCAGATCTCGTTAACGAATTNCCAATTCCTATTTCAGAGNTCTCTTCTTGTATTCAATAATTACT
TCTTGCCAGATTTCAAGTAG

9.3.3 Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 65

Inverse PCR mit den Primern pUAST-Hpa-1 und 2

CTGATTTAAGTGTTACTTCGGTAAGCTTCGGCTATCGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATGCGTTGAACC
AAGTAAGTAAATAGAGAGAAAGAGAGCGCGAGAGAAATGTTTCCAGGGGAAAGCGCAACAACAACATAACGCCTA
ATAACAATGAGTATCTGGCATTAGAATTTGGCCATTAGTTATCAGTTGTTAACAGCGACGTGTGCATTTATACCA
CAAGCGCGCTCTGCCACTGATAAAGGAGATAAAAACGATTTTCGTTCCGGGATATATTTTTTATATACATACTTT
TCAAATCGCGCGCCCTTTCATAATTCACCT

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HaeIII-4

AGTGAATCAATTAAGTAACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAACTACTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTTATT
GAATACAAGAAGAGAAGTCTGAATAGGGAATTGGGAATTCGTTAACAGATCTGCGGCCACGTTGAACCATGATGA
AATAACAT

9.3.4 Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 72

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HaeIII-3 und 4

ATGTTATTTTCATCATGATCCGTTAGCTTTGTGGCGCTGCGCTGGCGAGTCCAAATCCGAATCCGATTCAAACACTAC
GTGAATTTGCGCGCGCTACGCTGCGGGCCGAGATCTGTTAACGAATTCCTAATTCCTATTTCAGAGTTCTCTTC
TTGTATTCAATAATTACTTCTTGGCAGATTTTCAGTAGTTGCAGTTGATTTACT

9.3.5 Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 76

Inverse PCR mit den Primern pUAST-Hpa-1

AACAAAAGGTGAATGTGTTGCGGAGAGCGGGTGGGAGACAGCGAAAGAGCAACTACGAAANNGTGGTAGTGGTGG
AGGTGAATTTAAGAGGGCGCGGATTTGAAAAGTATGTATATAAAAAATATATCCCGGCACTGGCCGACACTG
TTTATACTGCTGAAAATATATATTTACCAATAAAATATGTGCTTGAATTCGAAAACATTTTATTATAACACTGAG
TGGCGTAGGTGTAAACTAAAAAGGGAAAAATTGGTAATAAAATAATTGTCTGTATGAATAACTACGAAAAGAAAT
TGAGATGATGATTTTTTAATTGATCAATTGTTTGCCTTAAGTGTATAAGGATCAAGAGCGCGAATATGTCAAGCT
CAAATTTATTT

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HaeIII-3

GTATCTGAGTTTTTTCCCGATGTCAACGCGAACGGATCGCACGTAAGGGCAGCGGAAAATGCAGTGAAAATTG
CCAGAAAAGTCAGGGGACAGCATGTGCGGGCAAATTCAGCGAAGCATTTCGATTAAGTGCAGAGTGCCGCGCGAT
CCTTGTATTTTCCGGGAATACCTGCCACGTTTCGAC

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HaeIII-4

GAATCAATTAAGTAACCAGCAACCAAGTAAATCAACTGCAACTACTGAAATCTGCCAAGAAGTAATTTATTGAA
TACAAGAAGAGAAGTCTTGAATAGGGAATTGGGAATTCGTTAACAGATCTGCGGCCCAACAACAACAGCAATGGG
GTGGGTGCTTGGGCAGGGGTGTGGGAGGGAATCGGAGTCTGCACCTGCCTGCTCTAT

9.3.6 Cameleon 2.1 Linie Cam 2.1/ 82

Inverse PCR mit den Primern pUAST-HaeIII-3 und 4

```
TTTCATCATGCTCCCGACGTCACGCCGCTTGCTGTGCGCTCGGAGCAACTGCTGTAGTTGTAGTGAGAACATCGCG
ACCACAGATGAGATCAAATTCAGATCGTGGCCCGCAGATCTGTTAACGAATTCCTAATTCCTATTCAGAGTTCT
CTTCTTGTATTCAATAATTACTTCTTGGCAGATTTTCAGTAGTTGCAGNTGATTTACTTGGTTGCTGGTTACTTTT
AATTGATTCACITTAACCTTGCACTTTACTGCAGATTGTTTAGCTTGTTCAGCTGCGCTTG
```

9.4 Lage der Primer

Die Lage der Primer im *Synapsin* Lokus für die Deletionskartierung, zum RNA-Editing als auch für die Genotypisierung der *Syn*⁹⁷ Mutanten sind im Anhang der Diplomarbeit von Ursula Werner (2002) dargestellt.

Die Primer für die Inverse PCR am pUAST-Vektor liegen im folgenden Bereich des Vektors:

pUAST-HpaII-1 :	912-929 bp im Vektor
pUAST-HpaII-2 :	87-104 bp im Vektor
pUAST-HaeIII-3:	6244-6261 bp im Vektor
pUAST-HaeIII-4:	5796-5813 bp im Vektor
72-HaeIII-5:	1247-1263 bp im Vektor

9.5 Verwendete Vektoren

Die folgenden Abbildungen zeigen die wichtigsten Plasmide/ Vektoren, die während der Doktorarbeit verwendet wurden.

pBlueskript KS+/-

Stratagene

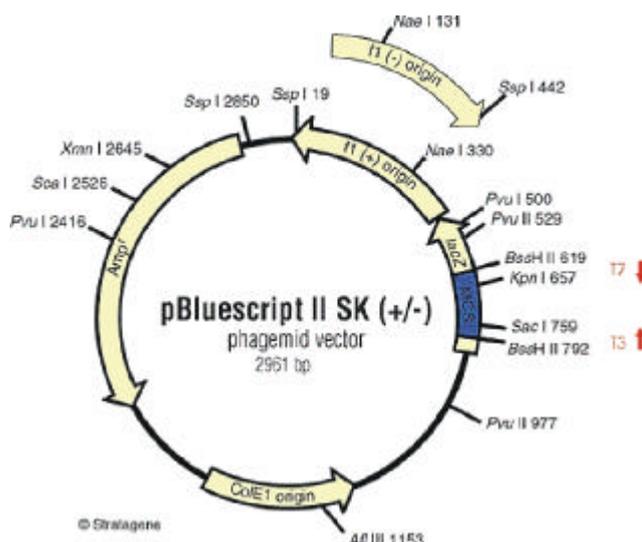


Abbildung 9.1:

pBluescript II SK Vektor von Stratagene.

Dieses Plasmid wurde vor allem für Klonierungsschritte verwendet. Der Vektor enthält eine Multiple Cloning Site (MCS) innerhalb des *lac* Gens, so dass Kolonien mit erfolgreich ligiertem Insert einer Blau-Weiß Selektion auf XGal Platten zur Verfügung stehen.

pP{W8}

Klemenz et al., 1987

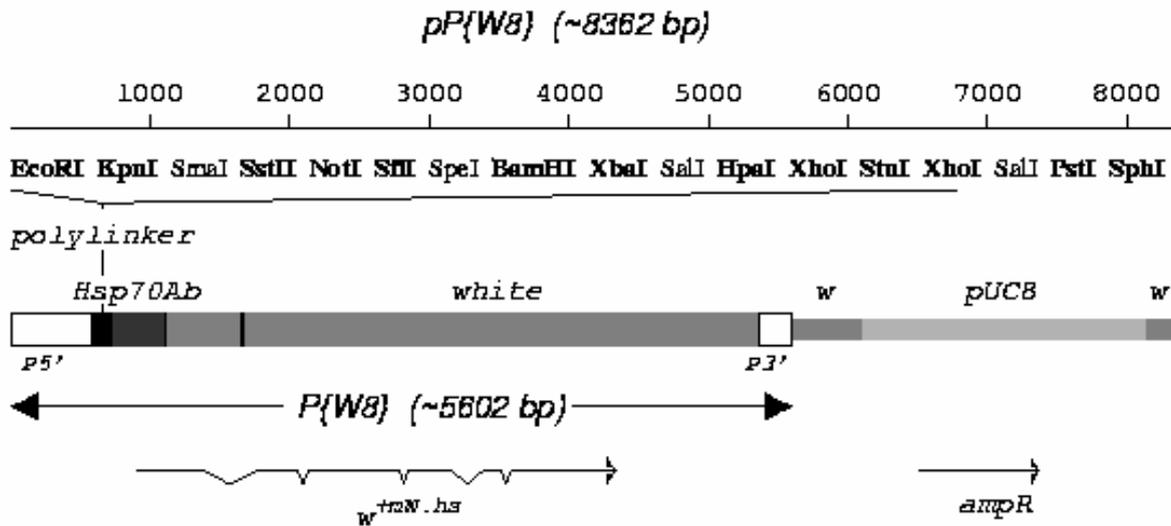


Abb. 9.3: Karte des Klonierungsvektors pP{W8} zur P-Element Keimbahntransformation.

Er enthält einen Hsp70Ab Promotor (heat shock promotor), einen Polylinker, ein modifiziertes *white*-Gen als Marker sowie eine Ampicillin-Resistenz (*ampR*) (nach Klemenz et al., 1987).

pP{UAST}

Brand und Perrimon, 1990

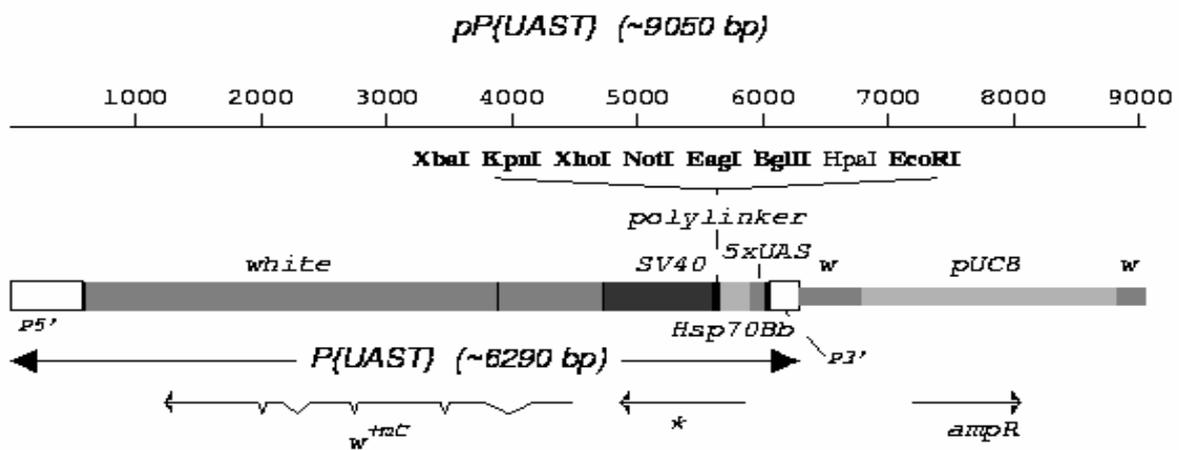


Abb. 9.2: Klonierungsvektor pP{UAST} zur P-Element Keimbahntransformation.

Er enthält 5 in Tandem angeordnete Gal4 Bindungsstellen (5xUAS, upstream activating sequence), einen Hsp70Bb Promotor (heat shock promotor), einen Polylinker und ein SV40 Polyadenylierungssignal sowie eine Ampicillin-Resistenz (*ampR*) und ein modifiziertes *white*-Gen als Marker (nach Brand und Perrimon, 1990).

10 Abkürzungen

μ	mikro	DAB	3, 3'-Diaminobenzidin
°C	Grad Celsius	dH ₂ O	vollentsalztes Wasser
32p	Phosphor 32	DNA	Desoxyribonukleinsäure
A	Adenosin	ECFP	Enhanced Cyano Fluoreszenz Protein
Abb.	Abbildung	ECL	Enhanced Chemilumineszenz
ABC	Avidin-Biotin-Komplex	E. coli	Escherichia coli
ADAR	Adenosine Deaminase that acts on RNA	ECS	Editing site Complementary Sequence
Amp.	Ampicillin	EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure
ampR	Ampicillin-Resistenz-Gen	EG	Eppendorf-Gefäß
AS	Aminosäure	et al.	et alii
B.D.G.P.	Berkeley Drosophila Genom Project	EtOH	Ethanol
bp	Basenpaare	EYFP	Enhanced Yellow Fluoreszenz Protein
bzw.	beziehungsweise	FP	Fusionsprotein
C	Cytidin	FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
ca.	circa	g	gramm
Ca ²⁺	Calcium-Ion	G	Guanosin
Cam	Cameleon	gDNA	genomische DNA
CaMK I/ IV	Calcium/ Calmodulin- abhängige Kinase	griech.	griechisch
cAMP	cyclisches Adenosin- mono- phosphat	h	Stunde
cDNA	complementary DNA	H ₂ O	Wasser
Ci	Curie	HRP	Horse radish peroxidase
cm	Zentimeter	k	kilo
CS	CantonS	kb	Kilobasen
<i>CyO</i>	<i>Curly O</i>	kDa	Kilodalton
d()	drosophila	kg	Kilogramm
d. h.	das heißt		
Da	Dalton		

l	Liter	RNAase	Ribonuklease
La	Lamina	RT	Raumtemperatur
<i>lac</i>	<i>lacquered</i>	<i>Sco</i>	Scutoid
lacZ / β - Gal	beta- Galactosidase	SDS	Sodiumdodecylsulfat
LB	Luria- Broth	SDS-Page	Sodium-dodecyl-sulfat- Polyacryl-Gel-
Lsg.	Lösung		Elektrophorese
m	milli	sek	Sekunde
M	molar	SSC	Saline sodium citrat
MAK	monoklonaler Antikörper	Syn	Synapsin
max.	maximal	T	Thymidin
MG	Molekulargewicht	Tab.	Tabelle
min	Minute	TBE	Tris- HCl, Borat, EDTA
mind.	mindestens	TBST	Tris Buffered Saline + Tween-20
ml	Milliliter	TE	Tris- HCl, EDTA
mm	Millimeter	TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylaminomethan
mM	Millimolar	TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
mRNA	messenger RNA	TM	Third Multiple
MT	Mutation	Tris	Trishydroxymethyl- aminomethan
n	nano	tRNA	transfer Ribonukleinsäure
N	Normal	UAS	upstream activating sequence
nm	nanometer	UV	Ultraviolett
nt	Nukelotid	V	Volt
OD	optische Dichte	vergl.	vergleiche
ORF	Open-Reading-Frame	<i>w</i>	<i>white</i>
<i>ori</i>	origin of replication	WT	Wildtyp
OT	Objektträger	X- Gal	5- Brom- 4- chlor- 3- indolyl- β - D- galactopyranosid
P	P-Element	z.B.	zum Beispiel
PBS	Phosphate Buffered Saline		
PBST	Phosphat Buffer Saline + Triton X-100		
PCR	Polymerase Chain Reaction		
PKA	Protein Kinase A		
PPF	paired pulse faciliation		
PTP	post tetanic potentiation		
RNA	Ribonukleinsäure		

11 Danksagung

Last but not least noch ein paar Worte des Dankes an die Personen, ohne deren Hilfe auf die eine oder andere Art diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.....

..... meinem Doktorvater Prof. Dr. Buchner, oder einfach „Erich“, dafür dass er einen alten „GOP“ in seiner Gruppe aufnahm und ihm zu einem der „Buchners“ werden ließ und dass er zu jeder Zeit ein offenes Ohr hatte für aufkommende Fragen während der letzten Jahre.

..... Thomas Spall, einem der Gründerväter der Inversen PCR am pUAST-Vektor, für die lustigen und unterhaltsamen Mittagspausen mit der Erforschung des niederen Talkshow-Niveaus, die helfende Hand in manchen Lebenslagen und denk immer dran, wenn du deine Doktorarbeit schreibst: „There is always a ringer solution!“

.... Uschi Werner, dafür, dass ich nicht alleine in der weiten Welt des molekularen Synapsins arbeiten musste, für die engagierte Diplomarbeit mit den schönen Phänotypen und für die witzigen Momente.

..... Susanne Jatzke, für die unbezahlbare Hilfe am Mammutprojekt der Rückkreuzung und Suche nach den *Syn*⁹⁷ Eltern und für die Hilfe bei der Optomotorik und Rescue-Durchführung (irgendwann klappt er bestimmt!).

..... Natalja Funk, für das offene Ohr bei molekularen Absonderheiten und Western Blots und auch für das leckere Essen (Mmmmh!).

..... André Fiala, für die Hilfe bei der Cameleon-Entschlüsselung und bei der Arbeit am Genesis Projekt, sowie für die vielen Denkanstöße bei mancher Fragestellung.

..... Saskia Huber, meiner alten DK40 Zimmerkollegin für die schöne Laborzeit und die langen Gespräche.

..... Christian Leibold, einem Fuldaer-Buben wie mir, für die unendliche Hilfe wenn der Computer mal wieder nicht das tat, was ich wollte und für die Klärung der elektrophysiologischen Fragestellungen.

..... Dieter Dudaczek, für die schönen Gehirnschnitte und für die Hilfe in so manchen F1-Praktikums-Tagen.

..... Gabi Putz, für die zeitaufwendigen Hitzebox-Experimente und Auswertungen, sowie für so manches Tänzchen.

..... Bertram Gerber, für die Unerschrockenheit auch die Synapsin-Fliegen im larvalen Lernen zu testen und für die Geduld beim Eintreffen der Genotypdaten.

..... Katharina Gerber, dem Robbie-Fan, für die gute Zusammenarbeit in den unendlichen Weiten der single-fly PCR.

..... Birgit (oder war es Brigitte?) Michels und Thomas Hendel, für die Durchführung der Experimente im olfaktorischen und visuellen larvalen Lernen und die äußerst unsterilen Pipetten.

..... Jens Rister, the Godfather of Heavy Metal (oder wie man diese Musikrichtung nennt), für die legendären Bülthoff Versuche, hoffe ich konnte mich mit den Einblicken in die Welt der PCR und Sequenzierung revanchieren.

..... Henrike Scholz, für die Hilfe bei den Ethanoltoleranz Versuchen und die Anregungen insbesondere bei der Postervorbereitung.

..... Martin Schwärzel, für die Durchführung der adulten olfaktorischen Verhaltensassays, eventuell sieht man sich ja wieder.

..... Willi Spatz, meinem finalen Laborgenossen, möge er nun die Bretter die die Welt bedeuten erobern {Halt die Gosch ;-)}.

..... Martin Roth, meinem alten Verbindungsglied in den oberen Stock, für manche klärende Antwort und für so manches Badmintonmatch

..... Susanne Clemens-Richter, Barbara Mühlbauer, Gertrud Graulich, Eva Schmidt, für die Aushilfe, wenn es mal wieder einen Enzymnotstand gab oder ein Fliegenstamm benötigt wurde.

..... Andreas, Dhananjay, Franco, Heidi, Isabell, Matze, Natascha, Pavel, Tanja, Tom, Troy, Stephan und die, die ich hier vergessen habe, für die schöne Zeit im Genetikerblock.

..... meinen F2-Studenten: Stefan Schild, Adriana Lung, Michael Grauer, Andreas Fischer, Susanne Reuther, Andrea Herb, Vanessa Nieratschker und Birgit Michels für die konstruktiven Praktika in so vielen Gebieten der Synapsin-Welt, hoffe ich hab euch nicht von der molekularen Arbeit verkraut.

..... Jörg Ludwig, der alten Sportskanone, für die Expeditionen in das Maindreieck, Badminton, die vielen schönen Grillabende und wie du siehst, werden meine Prognosen doch wahr.

..... Andrea Holzschuh für die erste Ochsenfurt-Tour und die Relax-Abende im Nautiland und in der Piano-Bar.

..... meiner Freundin Nadine, für die private Unterstützung während dieser Doktorarbeit, die schönen Momente und ich hoffe doch: bis zum Mond und noch viel weiter.

..... meiner Familie, für die finanzielle und private Unterstützung neben der Uni, sowie den Halt und Lissy für die Momente zum Abschalten außerhalb der Zivilisation.

In Memoriam: Albin Smieskol
 Weißer, Meerschwein und Feli

Lebenslauf

Sören Diegelmann

Persönliche Daten:	24.10.1973	geboren in Fulda, Deutschland, ledig
Schulausbildung:	1980-1984	Don-Bosco-Schule, Grundschule, Künzell
	1984-1990	Heinrich-von-Bibra-Schule, Realschule, Fulda
	1990-1993	Marianum Fulda, Gymnasium
	18.06.1993	Allgemeine Hochschulreife
Zivildienst:	01.09.1993- 30.11.1994	im Städtischen Klinikum Fulda
Studium:	1994-1999	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	16.10.1996	Diplom-Vorprüfung in den Fächern Botanik (mit Betonung der Allgemeinen Biologie), Zoologie (mit der Betonung der Allgemeinen Biologie), Chemie und Physik
	19.11.1998	Diplomprüfung in den Fächern Genetik, Zoologie (mit dem Schwerpunkt Tierphysiologie), Mikrobiologie
	1998-1999	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Thema: Untersuchung der Genregulation im <i>omb</i> -Lokus von <i>Drosophila melanogaster</i>
Promotion:	ab Dezember 1999	Promotion am Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit dem Thema: Molekulare und phänotypische Charakterisierung der <i>Synapsin</i> Nullmutante in <i>Drosophila melanogaster</i> und In-Vivo Calcium Imaging

Würzburg, den 18.12.2003

Sören Diegelmann

Publikationen

Diegelmann, S.; Fiala, A.; Leibold, C.; Spall, T.; Buchner, E. (2002): „Transgenic flies expressing the fluorescence calcium sensor cameleon 2.1 under UAS control“, *Genesis*, Special Issue, Volume 34, S.95-98

Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Eisermann, B.; Sachse, S.; Devaud, J.-M.; Buchner, E.; Galizia, C.G. (2002): „Genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster* is used to visualize olfactory information in projection neurons.“, *Current Biology*, Volume 12, Nr. 21, S.1877-1885

In Vorbereitung/ Eingereicht:

Godenschwege, T.A.; Reisch, D.; Diegelmann, S.; Eberle, K.; Heisenberg, M.; Hoppe, V.; Klagges, B. R.E.; Martin, J.R.; Nikitina, E.A.; Putz, G.; Reifegerste, R.; Reisch, N.; Riester, J.; Schaupp, M.; Scholz, H.; Schwärzel, M.; Werner, U.; Buchner, S.; Buchner, E. (2003): „Synapsin knock-out flies are impaired in complex behaviour.“

Diegelmann, S.; Reenan, R.; Werner, U.; Buchner, E. (2003): „Adenosine-to-Inosine RNA Editing at a Conserved Protein Kinase Target in Synapsin pre-mRNA of *Drosophila*.“

Veröffentlichte Meeting Abstracts

Diegelmann, S.; Werner, U.; Godenschwege, T.A.; Reisch, D.; Putz, G.; Schwaerzel, M.; Buchner, E. (2003): „Molecular and phenotypical characterisation of the *Drosophila synapsin* mutant“, *The neurosciences from basic research to therapy*, Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference 2003, edited by N. Elsner and H. Zimmermann, S.793

Gerber, B.; Scherer, S.; Diegelmann, S.; Michels, B.; Hendel, T.; Neuser, K.; Godenschwege, T.A.; Schwaerzel, M.; Zars, T.D., Stocker, R.F.; Buchner, E.; Heisenberg, M. (2003): „Associative learning in individually assayed *Drosophila* larvae“, *The neurosciences from basic research to therapy*, Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference 2003, edited by N. Elsner and H. Zimmermann, S.723

Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Riemensperger, T.; Sachse, S.; Eisermann, B.; Devaud, J.M.; Galizia, C.G.; Buchner, E. (2003): „Optical imaging of odorant representations in the *Drosophila* brain using the calcium sensor protein cameleon“, *The neurosciences from basic research to therapy*, Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference 2003, edited by N. Elsner and H. Zimmermann, S.522

De Bruyne, M.; Schwarz, S.; Wendt, M.; Regnery, B.; Galizia, C.G.; Fiala, A.; Diegelmann, S.; Buchner, E.; Carlson, J.R. (2003): „A gustatory receptor in carbon dioxide sensitive olfactory neurons of *Drosophila*“, *The neurosciences from basic research to therapy*, Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference 2003, edited by N. Elsner and H. Zimmermann, S.486

Vorträge

Diegelmann, S.; Dürrbeck, H.; Fiala, A.; Funk, N.; Huber, S.; Leibold, C.; Pohar, N.; Prüfert, K.; Spall, T.; Valas, A.; Buchner, S. (2001): „Functional analysis of synaptic proteins in *Drosophila*“, 8th Regional Drosophila Meeting 2001, Würzburg, Germany

Konferenzbeiträge

Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Rodriguez, V.; Buchner, E. (2001): „Towards a neuronal calcium imaging in the nervous system of *Drosophila*“ Cold Spring Harbor Symposium 2001, Cold Spring Harbor, USA

Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Riemensperger, T.; Galizia, C.G.; Buchner, E. (2001): „Neuronal calcium imaging in the *Drosophila* brain“, 5th Schloessmann Seminar on Optical Methods in Biology, Schloss Elmau, Germany

Galizia, C.G.; Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Sachse, S.; Devaud, J.M.; Eisermann, B.; Buchner, E. (2002): „Olfactory information restructuring by projection neurons visualized with genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster*“, Berlin Neuroscience Forum 2002, Liebenwalde, Germany

Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Sachse, S.; Devaud, J.M.; Galizia, C.G.; Buchner, E. (2002): „Watching a fly brain smelling: Visualization of olfactory neuronal activity in projection neurons of *Drosophila*“, Symposium of the SFF 554, Retzbach, Germany

Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Sachse, S.; Devaud, J.M.; Galizia, C.G.; Buchner, E. (2002): „Odour evoked calcium signals in olfactory projection neurons visualized using cameleon 2.1“, 9th Regional Drosophila Meeting 2002, Bochum, Germany

Galizia, C.G.; Fiala, A.; Spall, T.; Diegelmann, S.; Sachse, S.; Devaud, J.M.; Eisermann, B.; Buchner, E. (2002): „Olfactory information restructuring by projection neurons visualized with genetically expressed cameleon in *Drosophila melanogaster*“, 95. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Halle (Saale), Germany

De Bruyne, M.; Schwarz, S.; Wendt, M.; Regnery, B.; Galizia, C.G.; Fiala, A.; Diegelmann, S.; Buchner, E.; Carlson, J.R. (2003): „Carbon dioxide perception in *Drosophila*: receptor expression, physiology, and behavior“, 8th European Symposium on Insect Taste and Olfaction, Harstad, Norway

Erklärung

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

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

Würzburg, den 18.12.2003

Sören Diegelmann