

**Identifizierung GFP-markierter und
neuromuskulär lokalisierter Proteine
und
Charakterisierung von Charybde, einem neu
entdeckten synaptischen Translationsregulator
in *Drosophila melanogaster***

der Fakultät für Biologie
der
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT
TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Matthias Knirr
aus Potsdam
vorgelegte
Dissertation

2007

Tag der mündlichen Prüfung: 26.09.2007

Dekan: Prof. Dr. Friedrich Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph M. Schuster, Universität Heidelberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Reuter, Universität Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS		4
ZUSAMMENFASSUNG		7
1 EINLEITUNG		9
1.1 Synaptische Plastizität – aktivitätsabhängige strukturelle und funktionelle Veränderungen.....		9
1.2 Die neuromuskuläre Endplatte <i>Drosophila melanogasters</i>		10
1.2.1 Anatomie und Zellbiologie der neuromuskulären Endplatte		10
1.2.2 Entwicklungs- und aktivitätsabhängige Plastizität an neuromuskulären Endplatten		13
1.3 TOR-abhängige lokale Proteinsynthese an Synapsen		15
1.4 Scylla und Charybde – Negativregulatoren des Zellwachstums.....		17
1.5 Zielsetzung		19
2 ERGEBNISSE		21
2.1 Neue Proteine mit synaptischer Lokalisation		21
2.1.1 Suche nach GFP-markierten Proteinen an der neuromuskulären Endplatte.....		21
2.1.2 Identifizierung der neuromuskulär lokalisierten GFP-Fusionsproteine.....		24
2.1.3 GFP-Fusionsproteine zur Untersuchung dynamischer Prozesse an neuromuskulären Endplatten		29
2.2 Funktionelle und biochemische Charakterisierung Charybdes.....		33
2.2.1 Generierung einer <i>charybde</i> - Nullmutante und eines polyklonalen anti-Charybde-Antikörpers.....		33
2.2.2 Charybde ist in Motoneuronen exprimiert und lokalisiert an neuromuskulären Endplatten		36
2.2.3 Charybde beeinflusst das larvale Laufverhalten		43
2.2.4 Charybde reguliert die Größe neuromuskulärer Endplatten und Boutons.....		45
2.2.5 Charybde ist ein zytosolisch lokalisiertes Protein		48
2.2.6 Charybde hat keinen Einfluß auf die Expression synaptischer Marker.....		51
2.2.7 Das Charybde-Expressionsniveau wird nicht erfahrungsabhängig reguliert.....		53
2.2.8 Charybde moduliert die subsynaptische Proteinsynthese.....		54

3	DISKUSSION	59
3.1	Neue Proteine mit neuromuskulärer Lokalisation	59
3.1.1	„Protein Trap“-Linien zur Analyse synaptischer Funktion und Entwicklung.....	59
3.1.2	Funktionelle Implikationen der identifizierten Proteine mit neuromuskulärer Lokalisation.....	63
3.2	Biochemische und funktionelle Charakterisierung Charybdes im Kontext der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte.....	67
3.2.1	Charybde ist ein zytoplasmatisch lokalisiertes, neuronales Protein.....	67
3.2.2	Neuronales Charybde beeinflusst die Morphologie neuromuskulärer Endplatten und moduliert das subsynaptische Translationsniveau.....	68
3.2.3	Charybdeabhängige morphologische Veränderungen korrelieren mit larvalem Laufverhalten	72
3.2.4	Charybde:GFP ist ein potentieller Hypomorph	73
4	MATERIAL UND METHODEN	75
4.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Organismen.....	75
4.1.1	Bakterienmedien	75
4.1.2	Fliegenmedien.....	75
4.1.3	Molekularbiologie.....	75
4.1.4	Protein-Biochemie	76
4.1.4.1	Affinitätsreinigung des GST:Chrb-Fusionsproteins und des anti-Charybde-Antikörpers.....	77
4.1.4.2	Puffer für Proteinextraktionen.....	77
4.1.4.3	Puffer für Deacylierung, Deglykosylierung und Gradientenzentrifugation	78
4.1.5	Immunhistologie in L3-Larven	78
4.1.6	Antikörper	79
4.1.7	Oligonukleotide.....	80
4.1.8	Bakterienstämme und Vektoren.....	80
4.1.9	Fliegen-Linien.....	81
4.2	Methoden und Protokolle	81
4.2.1	Molekularbiologie.....	81
4.2.1.1	Inverse PCR zur Identifizierung von <i>PTT</i> -Integrationsstellen	82
4.2.1.2	Genotypisierung der <i>charybde</i> -Nullmutante	83
4.2.1.3	Klonierung des <i>GST:chrb</i> -Konstrukts	84
4.2.1.4	PCR-Bedingungen	85
4.2.2	Protein-Biochemie	85

4.2.2.1	Rekombinante Expression und Affinitätsreinigung des GST:Chrb-Fusionsproteins.....	86
4.2.2.2	Affinitätsreinigung der anti-Charybde-Antikörper.....	87
4.2.2.3	Herstellung von Proteinextrakten.....	87
4.2.2.4	Proteinfällungen.....	87
4.2.2.5	Protein-Deacylierung.....	88
4.2.2.6	Protein-Deglykosylierung.....	88
4.2.2.7	Gradientenzentrifugation zur Isolierung synaptischer Vesikel.....	89
4.2.3	Fliegen-genetik und -haltung.....	89
4.2.3.1	Kreuzungen und optimale larvale Kulturen.....	89
4.2.3.2	Unpräzise Exzision des <i>PTT-P</i> -Elementes der Linie <i>chrb^{G375}</i>	90
4.2.3.3	Das GAL4/UAS-System – Gerichtete Genexpression.....	91
4.2.4	Immunhistologie.....	91
4.2.5	Fluorometrische Analyse des Protein-Expressionsniveaus.....	92
4.2.6	Verhaltensanalyse von L3-Larven.....	92
4.2.7	Analyse der subsynaptischen Translationsaktivität.....	92
4.2.8	Quantifizierung der Größe neuromuskulärer Endplatten und Boutons.....	93
5	LITERATUR.....	95
	ANHANG.....	111

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die neuromuskuläre Endplatte der <i>Drosophila</i> -Larve.	11
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ib-Boutons.....	12
Abbildung 3: Formierung des Initiationskomplexes durch TOR-abhängige Phosphorylierung des 4E-bindenden Proteins.....	15
Abbildung 4: Das TOR-Signalnetzwerk.	16
Abbildung 5: Abgleich der Charybde-Protein-Sequenz mit den Sequenzen der identifizierten Homologe aus Insekten und Wirbeltieren.	18
Abbildung 6: Insertion eines zusätzlichen GFP-Exons in genomische Sequenzen mittels einer transposonbasierten Strategie.	22
Abbildung 7: Lokalisationsmuster der identifizierten GFP-Fusionsproteine an NMEs.....	23
Abbildung 8: Unterschiedliche Lokalisation des SNAP-25:GFP-Fusionsproteins und abweichende Boutonmorphologie.	28
Abbildung 9: Überprüfung der Integrität der GFP-Fusionsproteine mittels anti-GFP-Immunoblot.	29
Abbildung 10: Exzisionen des <i>PTT-P</i> -Elementes.	33
Abbildung 11: Gen- und Proteinstruktur von <i>charybde</i> /Charybde.	34
Abbildung 12: Aufreinigung von rekombinantem Charybde aus <i>E. coli</i>	35
Abbildung 13: Charybde:GFP und Scylla:GFP zeigen im ZNS ein exklusives Lokalisationsmuster.	37
Abbildung 14: Charybde lokalisiert im präsynaptischen Bereich neuromuskulärer Endplatten.	38
Abbildung 15: Differenzen im <i>charybde</i> -Expressionsniveau zwischen <i>Wildtyp</i> - und <i>chr^b^{G375}</i> -Tieren.	39
Abbildung 16: Das <i>Chrb</i> :GFP-Expressionsniveau wird in muskelabhängiger Weise reguliert.....	40
Abbildung 17: Vergleich des <i>charybde</i> -Expressionsniveaus in verschiedenen genetischen Situationen/Geweben mittels anti-Charybde-Antikörpern.	42
Abbildung 18: Charybde beeinflusst die Laufaktivität von L3-Larven.	44
Abbildung 19: Charybde reguliert die Größe neuromuskulärer Endplatten.....	45
Abbildung 20: <i>Charybde</i> -Verlust führt zu einer Vergrößerung der Boutondurchmesser.	47

Abbildung 21: Chrb:GFP zeigt eine vesikelähnliche Verteilung an der larvalen neuromuskulären Endplatten, co-lokalisiert aber nur teilweise mit Vesikelmarkern.	48
Abbildung 22: Das Migrationsverhalten Charybdes ist nicht auf höhermolekulare posttranslationelle Modifikationen zurückzuführen.	50
Abbildung 23: Gradientenzentrifugation zur Trennung synaptischer Vesikel von zytosolischen Proteinen. Charybde ist ein zytosolisches Protein, das nicht zusammen mit synaptischen Vesikeln sedimentiert.	51
Abbildung 24: Verlust <i>charybdes</i> bzw. dessen Überexpression hat keinen Einfluß auf das Expressionsmuster und -niveau prä- und postsynaptischer Marker.	52
Abbildung 25: Quantitative und qualitative Analyse der Charybde-Expression in Abhängigkeit vom motorischen Aktivitätsniveau.	54
Abbildung 26: Temperaturinduzierte, erfahrungsabhängige Zunahme der subsynaptischen Translationsaktivität an neuromuskulären Endplatten.	55
Abbildung 27: Charybde moduliert die basale postsynaptische Translationsaktivität.	56
Abbildung 28: Kreuzungsschema zur (unpräzisen) Exzision des <i>PTT-P</i> -Elementes der Linie <i>chrb</i> ^{G375}	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>PTT-P</i> -Element Insertionen auf Chromosom III mit neuromuskulärem Lokalisationsmuster.	25
Tabelle 2: Funktionelle und molekulare Integrität der GFP-Fusionsproteine.	31
Tabelle 3: Verwendete Erstantikörper.	79
Tabelle 4: Verwendete Zweitantikörper.	79
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.	80
Tabelle 6: Verwendete Fliegen-Linien.	81
Tabelle 7: PCR-Protokolle.	85
Tabelle 8: Übersicht über alle von GFP-Insertionen betroffenen Gene. Molekulare Integrität und erfahrungsabhängige Expressionsdynamik der GFP-Fusionsproteine sowie neuromuskuläre Morphologie der „protein trap“-Linien.	111

ZUSAMMENFASSUNG

Die glutamaterge neuromuskuläre Endplatte *Drosophilas* wird durch entwicklungs- und erfahrungsabhängige Prozesse funktionell und strukturell modifiziert. Die vorliegende Studie befaßt sich im ersten Teil mit der Suche nach und der Identifizierung von GFP-Fusionsproteinen mit neuromuskulärer Lokalisation, die eventuell in Mechanismen synaptischer Plastizität involviert sind und die sich potentiell zur *in vivo*-Untersuchung erfahrungsabhängiger dynamischer Veränderungen an neuromuskulären Endplatten eignen. Insgesamt wurden 249 „protein trap“-Linien mit *P*-Element-Insertionen auf Chromosom III auf GFP-Fluoreszenz an der neuromuskulären Endplatte hin untersucht. Die GFP-Fusionsproteine der 30 positiven Linien, konnten auf Insertionen in sechs verschiedenen Genen zurückgeführt werden. Unter ihnen sind sowohl bekannte synaptische Proteine als auch solche, deren neuromuskuläre Lokalisation und Funktion bislang unbekannt war. Fünf der GFP-Fusionsproteine beeinflussen die Entwicklung der neuromuskulären Endplatte. Eines der GFP-Fusionsproteine (INDY) zeigt erfahrungsabhängige Veränderungen des Expressionsniveaus und eignet sich somit potentiell zur *in vivo*-Detektion von Veränderungen an der neuromuskulären Endplatte. Die Markierung von Proteinen mit Hilfe von „protein traps“ eignet sich somit sowohl zur Identifizierung von synaptischen Proteinen, als auch zur Generierung von Werkzeugen, die für *in vivo*-Studien zur synaptischen Entwicklung verwendet werden können.

Unter den identifizierten „neuen“ Genen ist auch *charybde*, ein Negativregulator des TOR-Signalweges, dessen Funktion im Kontext der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte im zweiten Teil dieser Studie charakterisiert wird. Charybde ist ein ausschließlich von neuronalen Geweben exprimiertes, zytosolisches Protein. Die Motorneurone von *charybde*-Mutanten zeigen ein unverändertes Projektionsmuster auf die Muskeln 6 und 7. Konsistent mit einer regulatorischen Funktion im TOR-Signalweg, hat Charybde einen Einfluß auf die Größe neuromuskulärer Endplatten und auf die Boutonmorphologie, der auf eine TORC1-abhängige Veränderung des Translationsniveaus im präsynaptischen Neuron bzw. auf eine TORC2-abhängige Regulation der Zellmorphologie zurückgehen könnte. Die Veränderung der Größe der neuromuskulären Endplatte korreliert mit einer Veränderung des larvalen Laufverhaltens. Charybde moduliert nicht-zellautonom die basale subsynaptische Proteinsynthese, hat aber keinen Einfluß auf die erfahrungsabhängige akute Induktion der synaptischen Translation, die die Voraussetzung für langanhaltende synaptische Veränderungen darstellt. Der modulatorische Charakter der Charybde-Funktion steht im Einklang mit einem Modell, bei dem die basale Translationskompetenz durch globale humorale Mechanismen vermittelt wird und durch lokale Mechanismen zellspezifisch moduliert wird.

1 EINLEITUNG

1.1 Synaptische Plastizität – aktivitätsabhängige strukturelle und funktionelle Veränderungen

Das menschliche Gehirn ist aus ca. 100 Milliarden Neuronen aufgebaut, und jedes dieser Neurone hat bis zu tausend Verbindungen zu anderen Neuronen. Die Grundmuster dieser Verbindungen werden während der Entwicklung angelegt und bilden die Basis für alle fundamentalen neuronalen Funktionen, wie sensorische Wahrnehmung, motorische Koordination und kognitive Funktionen, wie Lernen und Gedächtnis. Im Laufe des Lebens werden diese Verbindungen fortlaufend modifiziert. Es wird angenommen, daß die Fähigkeit des Gehirns, Erfahrungen in Form von Erinnerungen abzuspeichern, auf die langanhaltende, aktivitätsabhängige Veränderung spezifischer synaptischer Verbindungen zurückzuführen ist.

Bei der Konsolidierung von Gedächtnisspuren führen wiederkehrende Signalmuster zu nachhaltigen Veränderungen der synaptischen Effizienz, die als „long term potentiation“ (LTP; erhöhte Aktivität) oder „long term depression“ (LTD; verminderte Aktivität) bezeichnet werden (Review: Malenka and Bear, 2004). Diese Prozesse werden unter dem Begriff „long term plasticity“ zusammengefaßt und von vorübergehenden (reversiblen) Veränderungen unterschieden („short term plasticity“). Langfristige funktionelle Veränderungen gehen auch mit strukturellen und morphologischen Modifikationen (Neuformierung bzw. Eliminierung von Synapsen) einher (Bailey and Kandel, 1993). Prozesse, die letztlich zu einer anhaltenden Veränderung der synaptischen Effizienz und somit zur langfristigen Konsolidierung von Gedächtnisspuren führen, erfordern die Expression von Genen und die Synthese von Proteinen (Review: Davis and Squire, 1984; Kandel, 2000).

Für detaillierte mechanistische Studien aktivitätsabhängiger Veränderungen an einzelnen Synapsen haben sich reduktionistische Ansätze als besonders hilfreich erwiesen, da die Größe und Komplexität neuronaler Netzwerke des Zentralnervensystems (ZNS) hochauflösende Untersuchungen erschweren. So sind der neuronale Schaltkreis für den Kiemenrückziehreflex in *Aplysia californica* und die neuromuskulären Endplatten des Krallenfroschs, der Maus und der Taufliege *Drosophila melanogaster* vor allem auch wegen der geringen Anzahl sowie der leichten Identifizierbarkeit und Zugänglichkeit der beteiligten Zellen wichtige synaptische Modellsysteme zur Analyse der Signalwege, die an aktivitätsabhängigen Veränderungen beteiligt sind.

1.2 Die neuromuskuläre Endplatte *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster hat sich in den zurückliegenden zwei Dekaden auch als Modellorganismus für die Untersuchung aktivitätsabhängiger Veränderungen an Synapsen bewährt. Der kurze Lebenszyklus, das vollständig sequenzierte Genom und eine Vielfalt an Möglichkeiten zur Mutation sowie zur zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Genexpression (Brand and Perrimon, 1993; Duffy, 2002; The FlyBase Consortium, 2003; Ryder *et al.*, 2004; Reichhart *et al.*, 2002; Lee and Carthew, 2003) prädestinieren *Drosophila* zum Modellorganismus. Aufgrund ihrer Größe und einfachen Zugänglichkeit haben die neuromuskulären Endplatten (NMEs) der Fliegen-Larve (Abbildung 1) dabei besondere Bedeutung für die Untersuchung der Synaptogenese und aktivitätsabhängiger synaptischer Veränderungen erlangt. Wie auch in anderen Arthropoden werden die Muskeln der Taufliege *Drosophila melanogaster* durch glutamaterge Synapsen innerviert. Viele Mechanismen, die die Synaptogenese, die synaptische Funktionalität und Plastizität in *Drosophila* regulieren, sind auch in anderen Spezies konserviert. In Hinblick auf Prozesse synaptischer Plastizität und die Regulation der Glutamaterezeptoren zeigt die NME zahlreiche Parallelen zu den glutamatergen Synapsen des Zentralnervensystems der Säugetiere. Deshalb ist die NME dazu geeignet, Einsicht in die prinzipiellen Regulationsmechanismen zentraler Säugetier-Synapsen zu gewinnen (Review: Featherstone and Broadie, 2000).

1.2.1 Anatomie und Zellbiologie der neuromuskulären Endplatte

Der Hautmuskelschlauch der *Drosophila*-Larve besteht in den abdominalen Segmenten 2–7 (A2–7) aus einem sich in jedem Hemisegment wiederholenden Muster aus 30 Muskeln (Abbildung 1B), die von 45 Motorneuronen innerviert werden. Das stereotype Innervierungsmuster ermöglicht die einfache Identifizierung der verschiedenen NMEs aufgrund ihres Verzweigungsmusters sowie der Art, Position und Anzahl der präsynaptischen Spezialisierungen (Boutons) (Abbildung 1; Review: Featherstone and Broadie, 2000).

Die Muskeln werden durch drei verschiedene Arten von Motorneuronen innerviert, die alle Glutamat als Neurotransmitter nutzen (Johansen *et al.*, 1989), teilweise aber auch andere Transmitter exprimieren (Review: Keshishian *et al.*, 1996). Aufgrund der Größe und Morphologie werden Typ I-, Typ II- und Typ III-Boutons an NMEs unterschieden (Abbildung 1C; Gorczyca *et al.*, 1993).

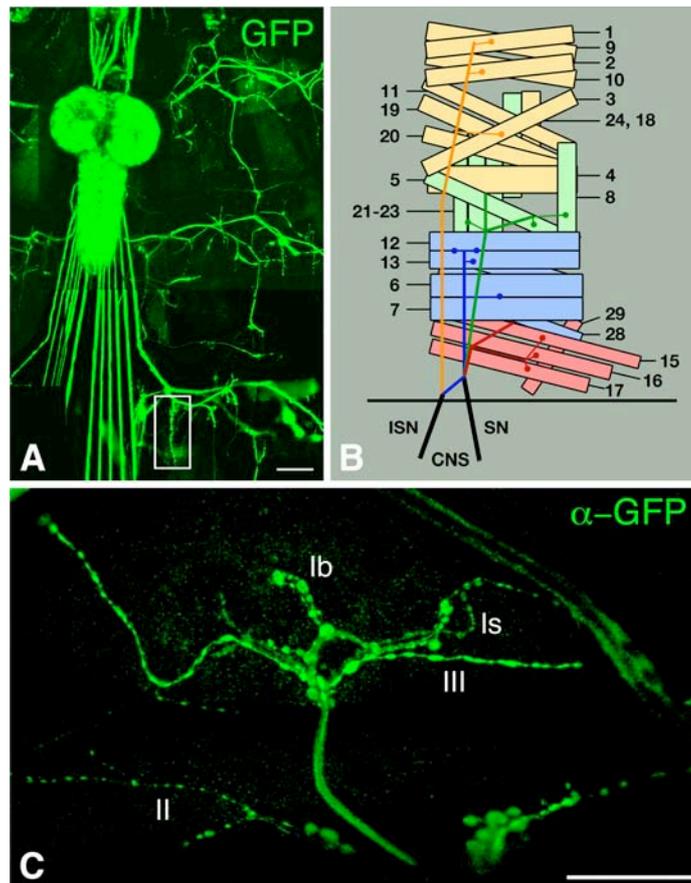


Abbildung 1: Die neuromuskuläre Endplatte der *Drosophila*-Larve.

(A) Neuronale GFP (green fluorescent protein)-Expression (Chalfie *et al.*, 1994). Deutlich erkennbar sind das ZNS mit seinen beiden Hemisphären, das Bauchmark mit den abgehenden Motorneuronen und die sich segmentweise wiederholenden NMEs. Der Rahmen markiert die NME der Muskeln 6 und 7. Der Maßstab beträgt 100 µm; Abbildung aus Reiff *et al.* (2002). (B) Schematische Darstellung der Muskel- und Motorneuronenordnung eines Hemisegmentes der Segmente A2-7 (von innen gesehen). (C) NME der Muskeln 12 und 13 einer Fliegenlinie, die neuronal ein GFP-Fusionsprotein exprimiert. Die NME wurde mit anti-GFP-Antikörpern markiert. Bezeichnet sind jeweils die verschiedenen Boutontypen. Der Maßstab beträgt 40 µm.

Typ I-Boutons werden weiter in kleinere Typ Is- und größere Typ Ib-Boutons (Atwood *et al.*, 1993; Kurdyak *et al.*, 1994) unterteilt, die jeweils zu verschiedenen Motorneuronen gehören (Lnenicka and Keshishian, 2000; Hoang and Chiba, 2001). Typ I-Boutons sind der vorherrschende Boutontyp und haben bei der Untersuchung der synaptischen Entwicklung und funktionellen Regulation eine herausgehobene Stellung. Die kleineren Typ II-Boutons enthalten neben Glutamat auch den Neurotransmitter Octopamin (Monastirioti *et al.*, 1995). Nicht alle Muskeln werden von Typ II-Boutons innerviert, die entsprechenden Axone durchmessen aber oftmals die gesamte Muskeloberfläche. Typ III-Boutons haben eine linsenförmige Gestalt und kommen ausschließlich auf Muskel 12 vor. Typ III-Boutons zeigen Insulin-Immunreaktivität (Gorczyca *et al.*, 1993). Die genaue Funktion der Typ III-Boutons ist bislang unklar. Vermutlich modulieren sie durch Insulinsekretion das Wachstum oder die Funktionalität der anderen Boutontypen (Gorczyca *et al.*, 1993).

Zahlreiche Studien haben dazu beigetragen, eine genauere Vorstellung vom Aufbau der Synapsen innerhalb der NME zu entwickeln. Der präsynaptische Teil der NME (Bouton) ist durch zwei strukturell und funktionell unterscheidbare Membranabschnitte gekennzeichnet. Sogenannte aktive Zonen wechseln sich mit periaktiven Zonen ab (Abbildung 2). In den aktiven Zonen befinden sich u. a. Proteinkomplexe, die die Exozytose neurotransmittergefüllter Vesikel regulieren (Review: Schoch and Gundelfinger, 2006). Ein Bouton enthält immer mehrere Synapsen/aktive Zonen, ähnlich den Heldschen Calyx-Neuronen der Säuger (Schneggenburger and Forsythe, 2006). Einige aktive Zonen sind mit einer elektronendichten Struktur assoziiert, die als „t-bar“ bezeichnet wird und die senkrecht zum synaptischen Spalt angeordnet ist. „T-bars“ binden synaptische Vesikel und gewährleisten eine effiziente Vesikelexozytose (Atwood *et al.*, 1993; Aberle *et al.*, 2002; Wagh *et al.*, 2006; Kittel *et al.*, 2006; Review: Zhai and Bellen, 2004).

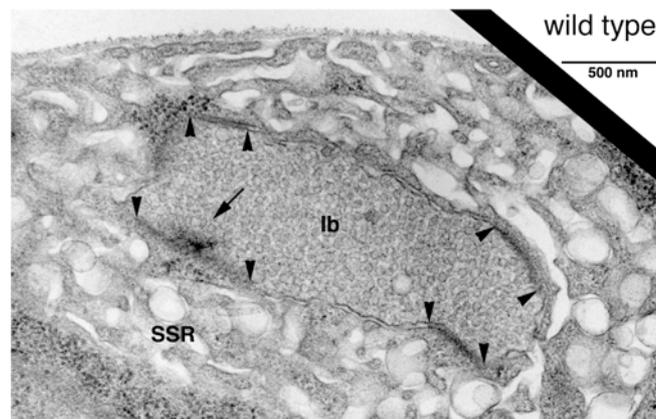


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ib-Boutons.

Pfeilspitzen markieren die Grenzen der aktiven Zonen. Der Pfeil zeigt einen t-bar. Der präsynaptische Teil ist mit Vesikeln gefüllt, die die Neurotransmitter enthalten. Das zum Muskel gehörende, stark segmentierte subsynaptische Retikulum (SSR) ist ebenfalls sichtbar. Abbildung: Sigrist *et al.* (2002).

In der periaktiven Zone sind Komplexe konzentriert, die der Vesikelendozytose dienen (Estes *et al.*, 1996; Roos and Kelly, 1999; Review: Broadie, 2004). Daneben sind in den periaktiven Zonen auch Zelladhäsionsmoleküle wie Fasciclin-2 (Fas2) zu finden, dessen Expressionsniveau Einfluß auf die Dichte aktiver Zonen hat (Schuster *et al.*, 1996a; Stewart *et al.*, 1996).

Die der aktiven Zone gegenüberliegende Membran besteht aus einem Rezeptorfeld, das ionotrope Glutamatrezeptoren (Schuster *et al.*, 1991; Petersen *et al.*, 1997; Marrus *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2005) und spannungsgesteuerte Kanäle enthält. Die Moleküle dieses Membranabschnitts werden von einem Netzwerk strukturgebender Proteine (z. B. Disks large, Dlg) organisiert, die auch die räumliche Interaktion mit Komponenten von Signalwegen sicherstellen, die den Rezeptoren nachgeschaltet sind. Im Bereich des synaptischen Spaltes liegen die prä- und postsynaptischen Membranen besonders eng beieinander. Die hohe

Elektronendichte dieser Membranabschnitte ist auf deren hohen Proteingehalt zurückzuführen (Review: Zhai and Bellen, 2004).

Auf der muskulären Seite sind die Boutons der Endplatte vom Membrannetzwerk des subsynaptischen Retikulums (SSR) umgeben (Abbildung 2; Atwood *et al.*, 1993), in dem auch Ribosomen und mRNAs synaptischer Proteine nachgewiesen werden können (Sigrist *et al.*, 2000). Die lokale subsynaptische Proteinsynthese dieser Ribosomen bildet vermutlich die Grundlage für langfristige strukturelle und morphologische Veränderungen (Sigrist *et al.*, 2000; 2003), wie sie bei der Konsolidierung von Gedächtnisspuren auftreten.

1.2.2 Entwicklungs- und aktivitätsabhängige Plastizität an neuromuskulären Endplatten

Drosophila-Larven durchlaufen über einen Zeitraum von vier Tagen drei Larvenstadien, bevor sie sich verpuppen. Im dritten Larvenstadium (L3) erreichen sie schließlich eine Länge von ca. 5 mm. Während des larvalen Wachstums vergrößert sich die Muskeloberfläche um das 100fache. Die NME muß sich ständig an die Größe der wachsenden Muskeln anpassen, um eine ausreichende Innervierung zu gewährleisten (Schuster *et al.*, 1996a). Die koordinierte Entwicklung von Muskel und Motorneuron muß eine ausgewogene Balance zwischen Boutonzahl, Synapsenzahl und Transmitterexozytose sowie der Depolarisation der Muskelzelle sicherstellen. Diese homeostatische Adaption wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Es konnten sowohl anterograde als auch retrograde Mechanismen identifiziert werden, die die morphologische und funktionelle Entwicklung der NME kontrollieren (Reviews: Marques, 2005; Marques and Zhang, 2006; Griffith and Budnik, 2006).

Neben dieser entwicklungsabhängigen Plastizität (funktionelle Homeostase) kann die NME zusätzlich auch durch gesteigerte neuronale Aktivität verändert werden (aktivitätsabhängige Plastizität; Budnik *et al.*, 1990; Zhong *et al.*, 1992). Wodurch sich diese zumeist parallel ablaufenden Prozesse voneinander unterscheiden, wann sie auftreten und wie sie reguliert werden, kann durch herkömmliche genetische Manipulationen nur schwer festgestellt werden, da diese zumeist die Summe aus chronischen Aktivitätsveränderungen und Entwicklungseinflüssen zeigen. Genetische Modelle für aktivitätsabhängige Veränderungen an NMEs, wie die Kaliumkanal-Doppelmutante *eag¹, Sh¹⁰²* (Ganetzky and Wu, 1983) oder Mutationen in *dunce* (cAMP-spezifische Phosphodiesterase; Byers *et al.*, 1981) und *rutabaga* (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase; Levin *et al.*, 1992) sind daher nicht für die Analyse ausschließlich aktivitätsinduzierter Prozesse geeignet, da sie stets die Summe aus chronischer Hyperaktivität und Entwicklungseinflüssen zeigen (Budnik *et al.*, 1990; Zhong *et*

al., 1992; Jia *et al.*, 1993; Schuster *et al.*, 1996b; Renger *et al.*, 2000; Kuromi and Kidokoro, 2000).

Für die Aufklärung der Regulation aktivitätsabhängiger Mechanismen wurden daher Methoden entwickelt, die das natürliche Verhalten der Tiere ausnutzen, um Prozesse synaptischer Plastizität zu induzieren. Den Ausgangspunkt bildete die Beobachtung, daß Larven nach Erhöhung der Umgebungstemperatur bzw. nach Transfer auf eine futterfreie Oberfläche mit einer Verhaltensänderung reagieren. In beiden Fällen nimmt die motorische Aktivität der Tiere zu, wobei in letzterem Fall wohl die Suche nach Futter für die erhöhte Agitiertheit verantwortlich ist. Sigrist *et al.* (2003) nutzten diese Phänomene zur akuten bzw. chronischen Steigerung der motorischen Aktivität und zur Charakterisierung der damit assoziierten kurz- und langfristigen Veränderungen. Weil durch diese Behandlung nicht nur die neuronale Aktivität zunimmt, sondern z. B. auch die metabolische Aktivität der Muskeln, werden die beobachteten Effekte als „erfahrungsabhängige“ Veränderungen bezeichnet. Zunächst führt erhöhte motorische Aktivität nur zu transienten physiologischen Anpassungen (Steinert *et al.*, 2006). Längere Phasen gesteigerter motorischer Aktivität (4–7 h) resultieren u. a. in einer erhöhten subsynaptischen Translationsaktivität [Anstieg der Anzahl der Aggregate des Initiationsfaktors 4E (eIF4E) und des Poly-A-bindenden Proteins (PABP)]. Weiterhin erscheinen im postsynaptischen Bereich neue Glutamatrezeptor IIA-Untereinheiten, und die perisynaptische Fas2-Expression ist reduziert (Sigrist *et al.*, 2000; 2003; Menon *et al.*, 2004). In diesem Stadium sind noch keine morphologischen Veränderungen an der NME feststellbar (Sigrist *et al.*, 2003). Die erfahrungsabhängige Proteinsynthese führt in einem ersten Schritt nur zum Einbau zusätzlicher Glutamatrezeptoren in bestehende Synapsen (Anstieg der synaptischen Transmission). Längerfristig führt die gesteigerte motorische Aktivität aber auch zu morphologischen Veränderungen (Entstehung neuer Synapsen bzw. Boutons). So haben Tiere mit konstant gesteigerter motorischer Aktivität (genetisch induziert oder verhaltensinduziert) deutlich vergrößerte Endplatten und mehr Synapsen (Budnik *et al.*, 1990; Zhong *et al.*, 1992; Schuster *et al.*, 1996b; Sigrist *et al.*, 2003). Auch bei diesen Tieren ist ein deutlicher Anstieg der subsynaptischen Translationsaktivität zu verzeichnen (Sigrist *et al.*, 2000).

1.3 TOR-abhängige lokale Proteinsynthese an Synapsen

In vielen Modellorganismen konnte inzwischen belegt werden, daß langanhaltende funktionelle und strukturelle Modifikationen synaptischer Verbindungen lokale Proteinsynthese an Synapsen erfordern (Nguyen *et al.*, 1994; Frey and Morris, 1998; Kang and Schuman, 1996; Montarolo *et al.*, 1986; Sigrist *et al.*, 2000; 2003). Die Signaltransduktionsprozesse, die synaptische Aktivität mit der Proteintranslationsmaschinerie koppeln, sind bislang nur zum Teil verstanden.

Sowohl in Vertebraten als auch in *Drosophila* konnten an der Basis dendritischer Fortsätze der ZNS-Neurone bzw. im subsynaptischen Bereich der NME Polysomen und andere Komponenten der Translationsmaschinerie (4E-bindendes Protein, eIF4E, PABP) nachgewiesen werden (Steward and Levy, 1982; Atwood *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2002; Sigrist *et al.*, 2000). Auch mRNAs synaptischer Proteine sind dort lokalisiert (Eberwine *et al.*, 2001; Review: Steward and Schuman, 2001; Zhong *et al.*, 2006; Sigrist *et al.*, 2000). Gesteigerte synaptische Aktivität kann durch verschiedene Mechanismen die lokale Translation dendritischer mRNAs auslösen.

Einer dieser Prozesse funktioniert über die TOR(target of rapamycin)-abhängige Aktivierung des Initiationsfaktors eIF4E, der durch eIF4E-bindende Proteine (4E-BPs) inhibiert wird. 4E-BPs dissoziieren nach Phosphorylierung durch die TOR-Kinase von eIF4E ab. Durch Interaktion des freigesetzten eIF4E mit eIF4G und PABP wird schließlich die Translation von 5'-Cap-mRNAs initiiert (Abbildung 3; Review: Proud, 2006).

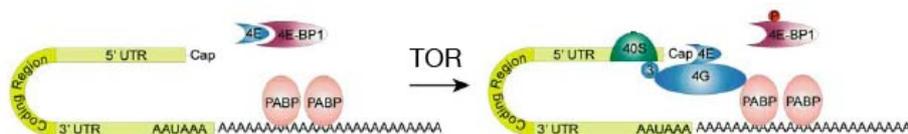


Abbildung 3: Formierung des Initiationskomplexes durch TOR-abhängige Phosphorylierung des 4E-bindenden Proteins.

Die Erkennung des 5'-Caps der mRNA durch den eIF4E und die nachfolgende Rekrutierung der ribosomalen 40S-Untereinheit durch eIF4G sind Schlüsselschritte bei der Translationsinitiation. Über die Phosphorylierung des 4E-BP durch die TOR-Kinase wird die Verfügbarkeit des eIF4E und somit auch die Translationsrate reguliert. Abbildung nach Kelleher *et al.* (2004); modifiziert.

Die Initiation lokaler Translation in Säugern und in *Aplysia* ist z.T. auf TOR-Aktivität zurückzuführen (Casadio *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002; Tischmeyer *et al.*, 2003; Cammalleri *et al.*, 2003; Horwood *et al.*, 2006). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, daß auch andere Komponenten des TOR-Signalnetzwerkes (Abbildung 4) wie z.B. PI3-Kinase, PTEN, Akt (PKB), TSC2 und S6-Kinase in Formen neuronaler Plastizität und Gedächtnisformierung (LTP/LTD; Kelly and Lynch, 2000; Raymond *et al.*, 2002; Cammalleri *et al.*, 2003; Hou and

Klann, 2004; van der Heide *et al.*, 2005; Guo and Zhong, 2006; Karpova *et al.*, 2006; Horwood *et al.*, 2006; von der Brellie *et al.*, 2006) sowie bei der Regulation der neuronalen Zellgröße eine Rolle spielen (Acebes and Ferrús, 2001; Backman *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2006).

Während die Komponenten der Translationsmaschinerie (Ribosomen, eIF4E, 4E-BP, PABP) bislang ausschließlich im postsynaptischen Bereich festgestellt werden konnten (Sigrist *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2002), lokalisieren andere Komponenten des TOR-Signalweges dagegen auch im präsynaptischen Bereich (Akt; Guo and Zhong, 2006). Bislang ist nicht bekannt, ob auch TOR selbst im präsynaptischen Bereich vorkommt und ob der TOR-Signalweg im präsynaptischen Bereich eine Rolle spielt. Im Rahmen der nachfolgenden Studie wird zum ersten Mal gezeigt, daß Charybde, ein vor kurzem neu entdeckter Negativregulator des TOR-Signalwegs, ausschließlich im präsynaptischen Bereich neuromuskulärer Endplatten lokalisiert ist und die lokale subsynaptische Proteinsynthese moduliert.

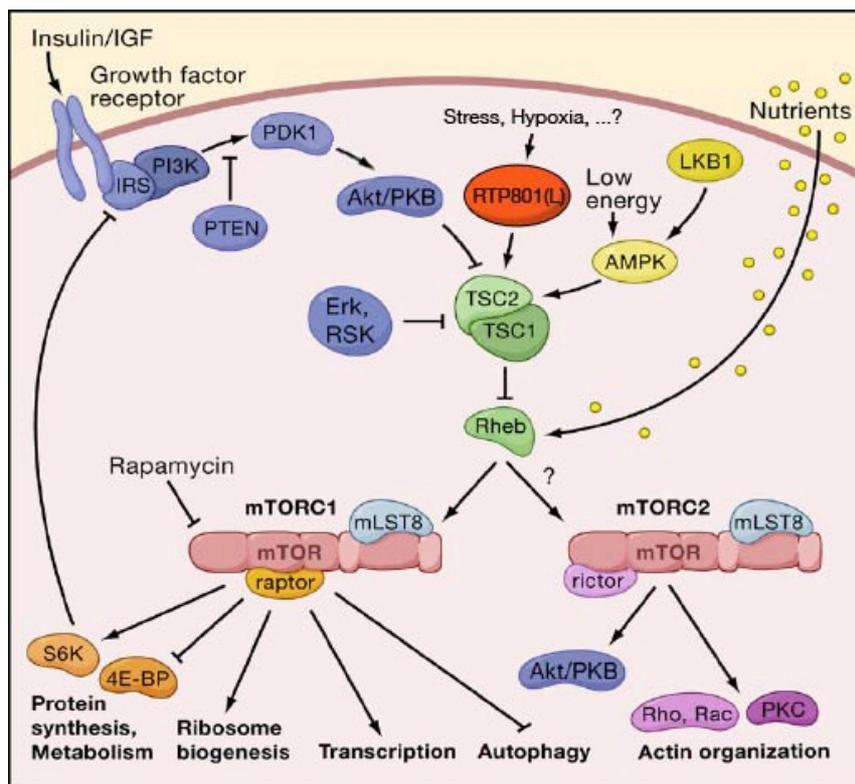


Abbildung 4: Das TOR-Signalnetzwerk.

TOR ist eine konservierte Ser/Thr-Kinase, die in Abhängigkeit von diversen extrinsischen und intrinsischen Stimuli (Wachstumsfaktoren, Nährstoffe, Energie und Streß) Prozesse wie Wachstum, Stoffwechsel, Proliferation und Alterung reguliert. Bei Nährstoffmangel und anderen Streßfaktoren drosselt TOR die Synthese von Makromolekülen, initiiert Autophagie und aktiviert streßabhängige Transkriptionsfaktoren. Katabole Prozesse werden begünstigt, anabole Prozesse werden unterdrückt (Review: Wullschleger *et al.*, 2006). Die Regulation von Wachstumsprozessen vermittelt die TOR-Kinase als Bestandteil zweier Proteinkomplexe, die als TORC1 und TORC2 bezeichnet werden. TORC1 reguliert die Synthese von Makromolekülen, und TORC2 kontrolliert die Zellmorphologie durch Steuerung der Actin-Polymerisation (Review: Wullschleger *et al.*, 2006). Abbildung nach Wullschleger *et al.* (2006); modifiziert.

1.4 Scylla und Charybde – Negativregulatoren des Zellwachstums

Die Paraloge Scylla und Charybde, die nach zwei mythologischen Ungeheuern benannt wurden, gehören zu einer Gruppe phylogenetisch konservierter Wachstums- und Proliferationsregulatoren, die als Negativregulatoren im TOR-Signalweg wirken und einen negativen Effekt auf die Proteinsynthese haben (Reiling and Hafen, 2004; Brugarolas *et al.*, 2004; Corradetti *et al.*, 2005; Sofer *et al.*, 2005). *Scylla* und *charybde* sind vermutlich als Resultat einer Genduplikation entstanden (Scuderi *et al.*, 2006). Homologe dieser Gene konnten u. a. in Insekten, Säugern und Fischen identifiziert werden. Alle Vertreter dieser Proteinfamilie zeichnen sich durch eine konservierte C-terminale Proteinsequenz (RTP801_C) aus. Der N-Terminus ist dagegen weniger gut konserviert und in *Drosophila*-Arten deutlich größer als in allen anderen bisher untersuchten Arten (Abbildung 5B). Die Aminosäuresequenz der Proteine ist im konservierten C-Terminus (143 Aminosäuren) zu 60% identisch bzw. besteht zu 75% aus konservativ getauschten Aminosäuren (Abbildung 5A). Strukturelle Daten und der genaue Funktionsmechanismus der Proteine sind bislang nicht bekannt.

Scylla bzw. seine Orthologe (*DDIT4*; Synonyme: *RTP801*, *REDD1*, *dig2*) werden durch verschiedene Streßsituationen auf transkriptioneller Ebene induziert. Unter anderem führen Sauerstoffmangel (Hypoxie), oxidativer Streß, DNA-schädigende Faktoren, Glukokortikoide und ATP-Depletion zur Induktion des *scylla*-Orthologs *RTP801* (Ellisen *et al.*, 2002; Shoshani *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Reiling and Hafen, 2004; Lin *et al.*, 2005; Sofer *et al.*, 2005). In Abhängigkeit vom Zelltyp und Differenzierungsstatus hat *RTP801* pro- oder antiapoptotische Wirkung (Ellisen *et al.*, 2002; Shoshani *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Bislang ist nicht bekannt, wie diese unterschiedlichen, kontextabhängigen „Antworten“ durch *RTP801* vermittelt werden, sie gehen aber mit einer veränderten Sensitivität gegenüber Sauerstoffradikalen einher. Die proapoptotische Wirkung *RTP801* spielt bei verschiedenen durch Ischämie ausgelösten pathologischen Prozessen (Schlaganfall, Retinopathien) sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen (Parkinson, Alzheimer) eine Rolle (Shoshani *et al.*, 2002; Brafman *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2006; Malagelada *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die antiapoptotische Wirkung *RTP801* für die Hypoxietoleranz und Invasivität des Prostatakarzinoms essentiell ist (Schwarzer *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu *scylla* ist für *charybde* und seine mutmaßlichen Orthologe (*DDIT4L*; Synonyme: *RTP801L*, *REDD2*, *SMHS1*) noch weitgehend unklar, durch welche Faktoren sie induziert werden. *REDD2* wird in Macrophagen durch oxidiertes LDL induziert (Cuaz-Pérolin *et al.*, 2004). *SMHS1* wird in atrophierenden Muskeln induziert und ist mit einer

Expression beider Gene in den abdominalen Segmenten des sich entwickelnden ZNS. Bei der Kopfinvolution wirken Charybde und Scylla proapoptotisch.

Scylla und Charybde fungieren unabhängig voneinander als Negativregulatoren im TOR-Signalweg und integrieren Signale durch Interaktion mit TSC2, einem GTPase-aktivierenden Protein, das zusammen mit TSC1 den „tuberous sclerosis complex“ bildet (Reiling and Hafen, 2004; Brugarolas *et al.*, 2004; Corradetti *et al.*, 2005; Sofer *et al.*, 2005). TSC1/TSC2-Aktivierung führt zur Inaktivierung des kleinen G-Proteins Rheb, das direkt an die Kinase-Domäne von TOR bindet und TOR in GTP-abhängiger Weise aktiviert (Abbildung 4; Reviews: Wullschleger *et al.*, 2006; Inoki and Guan, 2006). Auf welche Art und Weise Scylla bzw. Charybde TSC2 aktivieren, ist unbekannt. Eine direkte physische Interaktion konnte bislang nicht belegt werden. Für das Scylla-Ortholog REDD1 konnte gezeigt werden, daß ein Verlust der konservierten C-terminalen Domäne einen Funktionsverlust in Hinblick auf die Inhibition der TOR-Kinase nach sich zieht (Brugarolas *et al.*, 2004; Sofer *et al.*, 2005). Die durch die Induktion von Scylla/Charybde bzw. deren Orthologen reduzierte TOR-Aktivität wurde in mehreren Studien anhand der Aktivität der S6-Kinase bzw. am Phosphorylierungsstatus des 4E-BPs belegt (Reiling and Hafen, 2004; Brugarolas *et al.*, 2004; Corradetti *et al.*, 2005; Sofer *et al.*, 2005) und führt über eine reduzierte Proteinsynthese zu einer Verringerung der Zellgröße (Reiling and Hafen, 2004; Sofer *et al.*, 2005).

Bisherige Studien konnten zeigen, daß Scylla und Charybde bzw. ihre Orthologe auch in neuronalen Geweben die beschriebenen Effekte auf das Schicksal von Zellen haben (Shoshani *et al.*, 2002; Brafman *et al.*, 2004; Malagelada *et al.*, 2006; Scuderi *et al.*, 2006). Eine spezifische Funktion an der NME konnte dagegen bislang weder für Scylla noch für Charybde belegt werden. Die nachfolgende Studie befaßt sich zunächst mit der Identifizierung Charybdes als neuem, präsynaptisch lokalisiertem Protein der NME der *Drosophila*-Larve und der anschließenden funktionellen Charakterisierung des Proteins im Kontext der Entwicklung der NME.

1.5 Zielsetzung

Die nachfolgende Studie hat zunächst die Identifizierung neuer synaptischer Proteine an der NME *Drosophilas* zum Ziel. Mit Hilfe von „protein trap“-Linien, die ein GFP-codierendes *P*-Element tragen (Morin *et al.*, 2001) und GFP-Fusionsproteine unter Kontrolle des endogenen Promoters exprimieren, sollen unbekannte synaptische Proteine *in vivo* identifiziert werden. Neben der Charakterisierung der molekularen Identität der GFP-Fusionsproteine wird auch die molekulare Integrität der GFP-Fusionsproteine überprüft. Weiterhin wird untersucht, ob

die GFP-Fusionsproteine die Entwicklung der NME beeinflussen und erfahrungsabhängige Expressionsunterschiede zeigen. GFP-Fusionsproteine, die erfahrungsabhängige Expressionsunterschiede zeigen, könnten als *in vivo*-Marker eine hochauflösende Analyse von verhaltensabhängigen molekularen Veränderungen an der NME ermöglichen.

Der zweite Teil der Studie befaßt sich mit der Charakterisierung Charybdes, einem der Proteine, die mit Hilfe der „protein trap“-Linien identifiziert wurden. Neben der Untersuchung des Expressionsmusters, der genauen subzellulären Lokalisation und der Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften soll die Rolle Charybdes bei der Entwicklung der NME untersucht werden. Dazu sollen der Einfluß Charybdes auf die Morphologie und Struktur der Endplatte sowie sein Einfluß auf Prozesse akuter erfahrungsabhängiger synaptischer Veränderungen (lokale Proteinsynthese) analysiert werden. Der Einfluß Charybdes auf die lokomotorische Effizienz der Larven wird mit Hilfe eines Verhaltenstests untersucht.

2 ERGEBNISSE

2.1 Neue Proteine mit synaptischer Lokalisation

2.1.1 Suche nach GFP-markierten Proteinen an der neuromuskulären Endplatte

Zur genaueren Charakterisierung von Proteinen ist es oftmals hilfreich, deren subzelluläre Lokalisation und Expressionsdynamik zu kennen, da diese Aufschluß über den funktionellen Kontext der Proteine liefern können. Neben der Detektion mittels Antikörpern (Immunfluoreszenz) hat sich dafür die intrinsische Fluoreszenz von GFP-Fusionsproteinen bewährt, da diese auch Untersuchungen an lebenden Organismen ermöglicht. Sowohl die Immunfluoreszenz als auch herkömmliche Verfahren zur Generierung von GFP-Fusionsproteinen setzen jedoch meist die Kenntnis der Sequenz des Proteins voraus. An unbekannt Proteinen sind derartige Untersuchungen somit nur unter Umständen möglich. Um diesen Nachteil zu umgehen und um Proteinen gezielt Funktionen zuzuordnen zu können, wurde von Morin *et al.* (2001) eine *P*-Element-basierte Strategie angewandt. Ein sogenanntes „*Protein Trap Transposon*“ (*PTT*), das ein künstliches GFP-Exon ohne Start- und Stop-Codon enthält und dessen Sequenz von Spleißakzeptor- und Spleißdonor-Sequenzen flankiert wird, kann bei Insertion in intronische Sequenzen zur Generierung einer modifizierten mRNA und zur Expression eines GFP-Fusionsproteins führen (Abbildung 6).

Diese Strategie vereint mehrere Vorteile:

- (1) die Identität des Proteins ist für die Generierung von GFP-Fusionsproteinen nicht relevant, und
- (2) kann schnell durch Analyse der Sequenzen, die das *P*-Element flankieren, abgeklärt werden;
- (3) die Expression des GFP-Fusionsproteins steht unter Kontrolle des endogenen Promoters und repräsentiert somit das Expressionsmuster des endogenen Proteins;
- (4) die subzelluläre Lokalisation des GFP-Fusionsproteins entspricht der des endogenen Proteins, falls entsprechende Signalsequenzen nicht durch die Insertion beeinträchtigt werden;
- (5) räumliche und zeitliche Änderungen des Expressions- und Lokalisationsmusters können im lebenden Gewebe auf subzellulärer Ebene studiert werden, und

- (6) die zusätzliche GFP-Sequenz kann zu funktionellen Einschränkungen und damit verbundenen Phänotypen führen, die Hinweise auf funktionelle Aspekte des Proteins liefern.

Diese Vorteile machen die von Morin *et al.* (2001) generierten „protein trap“-Linien auch für die Untersuchung der NME in verschiedener Hinsicht zu wertvollen Werkzeugen. Sie gestatten die schnelle und einfache, genomweite Suche und Identifizierung bislang unbekannter Proteine mit neuromuskulärer Lokalisation. Die GFP-Fusionsproteine stellen gleichzeitig Allele dar, deren potentieller Einfluß auf die Entwicklung, Morphologie und Physiologie der Endplatte funktionelle Aspekte der endogenen Proteine offenbaren könnte. Daneben könnten sich die Fusionsproteine auch als Marker zur *in vivo*-Verfolgung erfahrungsabhängiger Veränderungen an der NME eignen. Mit negativen Effekten, wie sie durch die GAL4-abhängige Überexpression von GFP-Fusionsproteinen entstehen (Proteinkonzentration), ist in diesen Linien nicht zu rechnen.

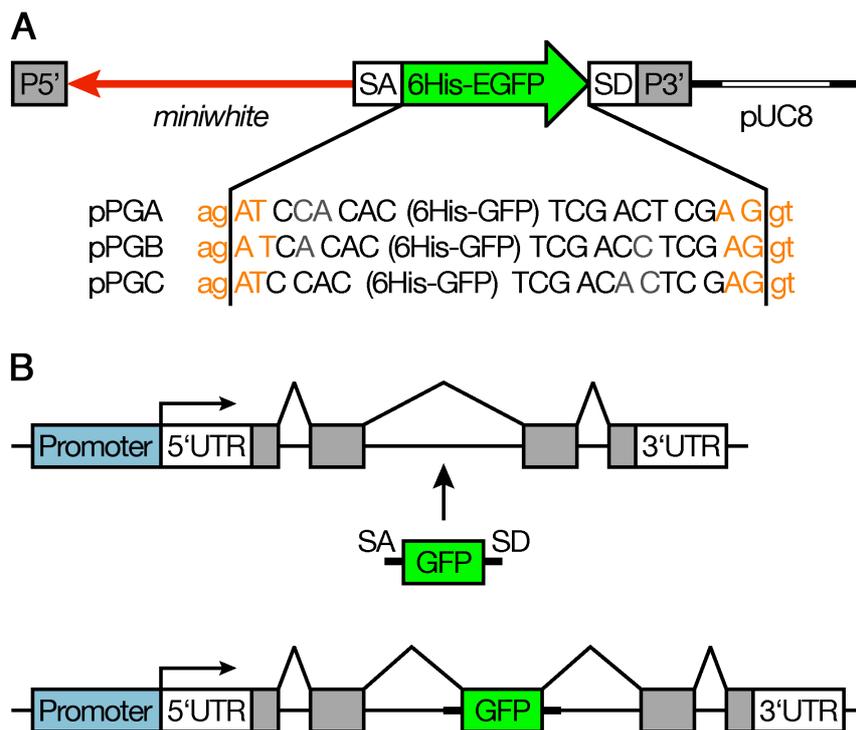


Abbildung 6: Insertion eines zusätzlichen GFP-Exons in genomische Sequenzen mittels einer transposonbasierten Strategie.

(A) Aufbau des *PTT-P*-Elementes: Innerhalb der Erkennungssequenz sind eine Kopie des *white*-Gens sowie ein künstliches GFP-Exon ohne Start- und Stop-Codon untergebracht. Das GFP-Exon wird von Spleißakzeptor- und Spleißdonor-Sequenzen (SA/SD) flankiert. Es kommen drei verschiedene Konstrukte zum Einsatz, in denen die Spleißakzeptor- und Spleißdonor-Positionen um jeweils eine Base relativ zur GFP-Sequenz verschoben sind, um alle drei Leseraster abzudecken. Der N-Terminus des GFPs ist zusätzlich mit einem 6xHis-Tag versehen (Morin *et al.*, 2001). (B) Das *PTT-P*-Element mit dem künstlichen GFP-Exon wurde mobilisiert und an anderen Stellen im Genom reintegriert. Insertionen des *P*-Elementes in intronischen Sequenzen führen zur Generierung modifizierter mRNAs, die GFP-Fusionsproteine kodieren. Abbildung adaptiert nach Morin *et al.*, 2001.

Im Rahmen einer Studie wurden in unserem Labor 549 der von Morin *et al.* (2001) generierten *PTT*-Linien auf GFP-Fusionsproteine an der larvalen NME hin untersucht (vgl. Marella, 2003), um neue Proteine zu identifizieren, die potentiell an der Regulation erfahrungsabhängiger synaptischer Veränderungen beteiligt sind. Im Folgenden wird die Suche, Identifizierung und Charakterisierung von neuromuskulär lokalisierten GFP-Fusionsproteinen unter den zuvor genetisch auf Chromosom III eingegrenzten Insertionen (249 Linien) beschrieben.

Unter Ausnutzung der intrinsischen GFP-Fluoreszenz und mittels Immunfluoreszenz konnten 30 Linien isoliert werden, die z.T. ähnliche und z.T. verschiedene GFP-Lokalisationsmuster an der NME bzw. in deren Umgebung aufweisen. Abbildung 7 verdeutlicht die unterschiedlichen neuromuskulären Lokalisationsmuster der GFP-Fusionsproteine durch Co-Immunmarkierung von GFP und einem panneuronal exprimierten Epitop, das von anti-HRP-Antikörpern erkannt wird (Jan and Jan, 1982; Sun and Salvaterra, 1995b).

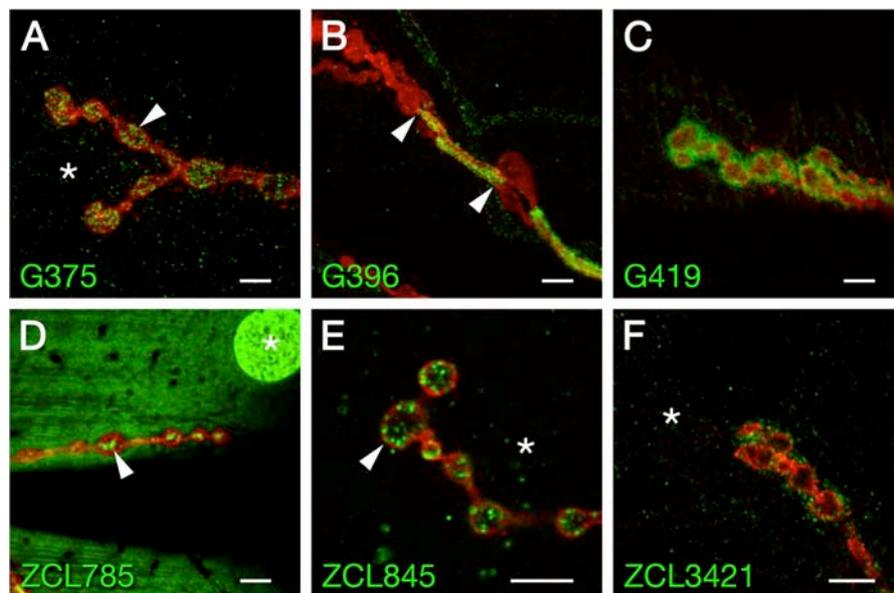


Abbildung 7: Lokalisationsmuster der identifizierten GFP-Fusionsproteine an NMEs.

Darstellung des Lokalisationsmusters aller auf Chromosom III identifizierten GFP-Fusionsproteine mit neuromuskulärer Lokalisation. Die Co-Immunmarkierung von GFP (grün) und HRP (rot) verdeutlicht die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine. Die Morphologie neuronaler Strukturen (Axone und Boutons) ist durch anti-HRP-Antikörper (rot) markiert. Die Linien G375 (A) und ZCL845 (E) exprimieren beide präsynaptisch lokalisierte Proteine (Pfeile). Das Fusionsprotein der Linie G396 (B) ist ausschließlich in axonalen Bereichen lokalisiert (Pfeile) und kann nicht in Boutons beobachtet werden. In der Linie ZCL785 (D) markiert das GFP-Fusionsprotein in den Boutons Strukturen, die in ihrer Größe und Verteilung an Mitochondrien erinnern (Pfeil). Daneben ist das Protein auch im Muskel und dessen Kernen zu beobachten (Sternchen). Die Linien G419 (C) und ZCL3421 (F) exprimieren jeweils post-synaptisch lokalisierte Fusionsproteine. Durch Vergleich mit der intrinsischen GFP-Fluoreszenz konnte bestätigt werden, daß es sich bei den in A, E und F mit Sternchen markierten Bereichen um unspezifische Markierungen des anti-GFP-Antikörpers handelt. Der Maßstab entspricht jeweils 4 µm.

Die 30 Linien mit synaptischer GFP-Fluoreszenz konnten vier verschiedenen präsynaptischen und zwei postsynaptischen Lokalisationsmustern zugeordnet werden. Neben einem Protein

mit homogen granulärer Verteilung im gesamten präsynaptischen Bereich (Boutonlumen, Motoraxone; Pfeil in Abbildung 7A; Linie G375), konnte besonders häufig (13 Linien) ein GFP-Fusionsprotein beobachtet werden, das ausschließlich axonale Strukturen markiert (Pfeile in Abbildung 7B; Linie G396). Die Verteilung dieses GFP-Fusionsproteins erinnert an die Position der Gliazellen, die bis zur Kontaktstelle zwischen Nerv und Muskel die Motorneurone umhüllen und nur teilweise in die neuromuskuläre Endplatte hineinreichen (Sepp *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2006a). Ebenfalls sehr häufig (7 Linien) trat ein für Mitochondrien charakteristisches Muster auf, das innerhalb der Boutons zwei bis vier Partikel markierte (Pfeil in Abbildung 7D; Linie ZCL785). In diesen Tieren konnte außerdem auch eine relativ homogene GFP-Fluoreszenz in Muskeln und Muskelzellkernen (Sternchen) beobachtet werden. Das GFP-Fusionsprotein der Linie ZCL845 ist in Form unregelmäßiger Aggregate (Pfeil in Abbildung 7E) innerhalb der Boutons verteilt. Die postsynaptisch lokalisierten GFP-Fusionsproteine sind ausschließlich außerhalb der durch anti-HRP-Antikörper markierten neuronalen Strukturen zu beobachten. Eines der Proteine zeigt eine homogene Verteilung im subsynaptischen Bereich (Abbildung 7C; Linie G419), das andere eine granuläre (Abbildung 7F; Linie ZCL3421).

Die hier beschriebenen Lokalisationsmuster verdeutlichen die prinzipielle Möglichkeit, mit Hilfe der „protein trap“-Strategie neuromuskulär lokalisierte Proteine zu finden.

2.1.2 Identifizierung der neuromuskulär lokalisierten GFP-Fusionsproteine

Zur Identifizierung der neuromuskulär lokalisierten GFP-Fusionsproteine wurden die *PTT*-Insertionsstellen mittels inverser Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermittelt (siehe Kapitel 4.2.1.1; Huang *et al.*, 2000). Bei dieser Methode wird genomische DNA mit Restriktionsenzymen verdaut und die entstehenden Abschnitte durch Ligation zirkularisiert. Anschließend werden mittels PCR und Oligonukleotiden, die innerhalb des *P*-Elementes entgegen der üblichen Orientierung binden, selektiv die Abschnitte amplifiziert, die Teile des *PTT-P*-Elementes enthalten. Die amplifizierten Fragmente werden danach sequenziert. Die Methode ermöglicht, ausgehend von der bekannten Sequenz des *PTT-P*-Elementes, die Ermittlung der flankierenden genomischen DNA-Sequenz. Die *PTT*-Insertionsstellen und die betroffenen Gene wurden anschließend durch Abgleich mit der aktuellen Genomsequenz identifiziert (BLAST: Altschul *et al.*, 1990).

Übereinstimmend mit früheren Beobachtungen (Morin *et al.*, 2001) konnte eine hohe Redundanz unter den Insertionsereignissen festgestellt werden, die auf die präferentielle

ERGEBNISSE

Insertion von *P*-Elementen in bestimmten Bereichen des Genoms („hot spots“) zurückzuführen ist (Spradling *et al.*, 1995; Spradling *et al.*, 1999). Insgesamt konnten die Insertionen der 30 untersuchten Linien sechs Genen zugeordnet werden (Tabelle 1).

Gen	Chromosomen-Arm, zytogenetische Position	Insertionspunkt	Insertionspunkt innerhalb des Gens bzw. Introns, betroffene Transkripte ¹	Linien
<i>Arginine kinase (Argk)</i>	3L, 66F2 – F3 [-]	9 032 006 bp	Intron 3/2, 4 408/11 547 bp CG32031-RA/B	(7) ²
<i>charybde (chrb)</i>	3L, 68C10 [+]	11 466 481 bp	Intron 1, 3 933/5 488 bp CG7533-RC	G375 G378
<i>I'm not dead yet (Indy)</i>	3L, 75E1 – E2 [-]	18 805 796 bp	Intron 1, 5 499/14 051 bp Intron 1, 615/9 167 bp CG3979-RB/C	G419
		18 806 673 bp	Intron1, 4 622/14 051 bp CG3979-RB	ZCL3039
<i>gilgamesh (gish)</i>	3R, 89B16 – B17 [+]	12 105 970 bp	Intron 3, 5 079/14 461 bp CG6963-RB/D/E/F/H	G339
		12 106 239 bp	Intron 3, 5 348/14 461 bp CG6963-RB/D/E/F/H	ZCL3421 ZCL3422 ZCL3423
<i>Atpα</i>	3R, 93A4 – B2 [+]	16 782 523 bp	Intron 1, 7 972/13 385 bp CG5670-RA/C/F/G	ZCL1026
		16 782 866 bp	Intron 1, 8 315/13 385 bp CG5670-RA/C/F/G	ZCL1529
		16 783 353 bp	Intron 1, 8 802/13 385 bp CG5670-RA/C/F/G	G341 ZCL306 ZCL326
		16 783 357 bp	Intron 1, 8 806/13 385 bp CG5670-RA/C/F/G	(4) ³
		16 783 414 bp	Intron 1, 8 863/13 385 bp CG5670-RA/C/F/G	G109 G396 ZCL203
		16 783 418 bp	Intron 1, 8 867/13 385 bp CG5670-RA/C/F/G	G374
<i>Snap25</i>	3h, 80 – h47 [+] (64E11 – 65B5)	947 772 bp	Intron 3, 7 255/31 034 bp CG40452-RA/B	ZCL3186
		1 014 449 bp	Intron 5, 271/43 083 bp CG40452-RA/B	ZCL845

Tabelle 1: *PTT-P*-Element Insertionen auf Chromosom III mit neuromuskulärem Lokalisationsmuster.

Angegeben ist jeweils das betroffene Gen, dessen zytogenetische Position und Orientierung (sense/antisense) sowie die absolute und relative Position der *P*-Element-Insertion (relativ zur ersten Base des betroffenen Introns) und die theoretisch von der Insertion betroffenen Transkripte (¹ laut Genomprojekt vorhergesagte Transkripte). Weiterhin sind die Namen der Linien angegeben, die die entsprechenden Insertionen tragen (² G341, ZCL532, ZCL785, ZCL789, ZCL829, ZCL894, ZCL928 / ³ ZCL1792, ZCL2207, ZCL2479, ZCL3266). Alle Angaben beziehen sich auf die Version 4.3 des annotierten *Drosophila melanogaster*-Genoms (März 2006) bzw. auf Version 3.2b des *Drosophila melanogaster*-Heterochromatins (Januar 2005; <http://www.flybase.org/>).

Im Folgenden werden die identifizierten Gene vorgestellt, und es wird, soweit bekannt, ihre Rolle im neuronalen Kontext beschrieben.

Die **Argininkinase** ist eine ATP/Guanidin-Phosphotransferase, die in Geweben mit hohem und fluktuierendem Energiebedarf (Nervensystem, Muskeln) den reversiblen Transfer von ATP- γ -Phosphatgruppen auf Arginin katalysiert (Blethen and Kaplan, 1968; Morrison, 1973). Die analogen Kreatinkinasen der Vertebraten konnten in hohen Konzentrationen im Gehirn nachgewiesen werden, wo sie vermutlich unter anderem auch Energie für synaptische Transmissionsprozesse bereitstellen (Hemmer and Wallimann, 1993; Friedman and Roberts, 1994; Kaldis *et al.*, 1996). Argininkinase konnte während der Axogenese in Wachstumskegeln von Motorneuronen von Heuschrecken nachgewiesen werden und spielt dort bei der Energieversorgung dynamischer Prozesse (Lamellipodien) eine Rolle (Wang *et al.*, 1998). Aufgrund des Lokalisationsmusters an der *Drosophila*-NME handelt es sich bei dem hier identifizierten Argk:GFP-Fusionsprotein vermutlich um die mitochondriale Isoform des Proteins.

Charybde fungiert als Negativregulator im TOR-Signalweg und kontrolliert Zellwachstum und -proliferation (Shoshani *et al.*, 2002; Reiling and Hafen, 2004; Sofer *et al.*, 2005; Scuderi *et al.*, 2006). Charybde spielt bei der Entwicklung des ZNS eine Rolle (Scuderi *et al.*, 2006). Funktionelle Aspekte Charybdes, das im präsynaptischen Bereich der NME lokalisiert ist, werden im Kapitel 2.2 dieser Studie untersucht.

Indy kodiert für einen Carboxylat-Transporter, der den Na⁺/Carboxylat-Cotransportern der Säugetiere ähnelt und Intermediärstoffwechselprodukte des Citratzyklus (Citrat, Succinat) in Zellen importiert. *Indy*-Mutanten, die das Expressionsniveau des Transporters verringern, führen in *Drosophila* zu einer erhöhten Lebensspanne. Bisher konnte INDY-Expression im Darm sowie in Fettkörpern und Önozyten nachgewiesen werden (Rogina *et al.*, 2000; Knauf *et al.*, 2002; Marden *et al.*, 2003). Die aus Säugetieren bekannten Homologe NaC2 und NaC3 konnten auch in neuronalen Geweben nachgewiesen werden (Review: Pajor, 2006). Sie versorgen Neurone mit Zwischenprodukten des Citratzyklus, die diese nicht *de novo* synthetisieren können, da ihnen die Pyruvatcarboxylase fehlt (Yu *et al.*, 1983; Shank *et al.*, 1985; Cesar and Hamprecht, 1995). Diese Zwischenprodukte sind u. a. wichtige Vorstufen für die Biosynthese von Neurotransmittern wie Glutamat und GABA. Die hier identifizierten INDY:GFP-Fusionsproteine sind im subsynaptischen Bereich der NME lokalisiert.

Gilgamesh kodiert für das *Drosophila*-Homolog der Caseinkinase 1 γ . In Eukaryonten wurden bislang acht verschiedene Isoformen der Caseinkinase 1 beschrieben, die in vielen Zelltypen exprimiert werden und in verschiedenen subzellulären Kompartimenten vorkommen (Review: Gross and Anderson, 1998). Caseinkinase 1 spielt bei vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle, darunter DNA-Reparatur, Regulation der Zellmorphologie,

Modulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges während der Entwicklung und Regulation zirkadianer Rhythmen (Peters *et al.*, 1999; Whitmore *et al.*, 2000). Speziell für die Caseinkinase 1γ (Gilgamesh) konnte gezeigt werden, daß sie über palmitoylierte Cystein-Reste in der Plasmamembran verankert ist. Dort ist sie mit dem Wingless-Rezeptor Arrow (LRP5/6) assoziiert. Nach Bindung des Liganden Wingless (Wg) phosphoryliert Gilgamesh Arrow, was schließlich zur Degradierung von Axin und zur Expression von Wg-Zielgenen führt (Davidson *et al.*, 2005). Das Gish:GFP-Fusionsprotein ist im subsynaptischen Bereich der NME lokalisiert.

Die Na^+/K^+ -ATPase ist eine ubiquitär exprimierte Ionenpumpe, die durch ATP-Hydrolyse für die asymmetrische Verteilung von Na^+ - und K^+ -Ionen zwischen dem Zytoplasma und der Zellumgebung sorgt. Diese Na^+/K^+ -Gradienten sind u.a. von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials und bilden die Grundlage für die Generierung von Aktionspotentialen in Neuronen. Die Na^+/K^+ -ATPase ist ein Heterodimer, das aus einer katalytischen α -Untereinheit (*Atp α*) und einer β -Untereinheit (*nervana 1 bzw. 2*) besteht (Sun and Salvaterra, 1995a; Sun *et al.*, 1998). Mutationen in *Atp α* führen neben Verhaltensstörungen (Schlag-Paralyse; Schubiger *et al.*, 1994), reduzierter Lebensspanne und neuronaler Übererregbarkeit vor allem zu beschleunigter altersbedingter Neurodegeneration (Palladino *et al.*, 2003). Das *ATP α :GFP*-Fusionsprotein ist entlang der Axone bis zur Nerv-Muskel-Kontaktstelle, nicht jedoch an Boutons lokalisiert und wird vermutlich von Gliazellen exprimiert, die die Motoraxone umhüllen (Sepp *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2006a).

Synaptische Transmission infolge eines Aktionspotentials erfordert die Fusion neurotransmittergefüllter Vesikel mit der präsynaptischen Membran. **SNAP-25** (synaptosomal-associated membrane protein of 25 kDa; Oyler *et al.*, 1989; Risinger *et al.*, 1993) ist neben Syntaxin 1A (Bennett *et al.*, 1992; Schulze *et al.*, 1995) und n-Synaptobrevin (Trimble *et al.*, 1988; DiAntonio *et al.*, 1993) eine der Hauptkomponenten des heterotrimeren SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)-Kernkomplexes, der die Ca^{2+} -abhängige Fusion zwischen synaptischen Vesikeln und der präsynaptischen Membran an aktiven Zonen katalysiert (Söllner *et al.*, 1993; Reviews: Chen and Scheller, 2001; Rizo and Südhof, 2002; Jahn *et al.*, 2003). Zwei *Snap25*-Mutationen wurden bisher eingehender in *Drosophila* untersucht. Die *Snap25^{ts}*-Mutante zeigt in Abhängigkeit von der Temperatur entweder erhöhte oder stark verringerte Transmitterfreisetzung (Destabilisierung des SNARE-Komplexes) und ist bei erhöhter Temperatur homozygot letal (Rao *et al.*, 2001). *Snap25*-Nullmutanten überleben überraschenderweise bis zur Puppe und zeigen als Larve keine physiologischen Beeinträchtigungen. Im Gegensatz zur *Snap25^{ts}*-Mutante kompensiert das an der NME ebenfalls vorhandene SNAP-24 (Lloyd *et al.*, 2000; Niemeyer and Schwarz, 2000) vermutlich die fehlende SNAP-25-Funktion (Vilinsky *et al.*, 2002).

In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung interessant, daß in einigen Larven SNAP-25:GFP nicht in allen Verzweigungen der NME lokalisiert (Abbildung 8A). Dies könnte auf eine boutonspezifische Regulation der Zusammensetzung des SNARE-Komplexes in Hinblick auf SNAP-24/SNAP-25 hinweisen. Weiterhin fällt auf, daß in Typ Ib-Verzweigungen die SNAP-25 exprimierenden Ansammlungen dicht beieinander liegender Boutons zu beobachten sind (Satellitenboutons; Abbildung 8B). Verzweigungen ohne SNAP-25 zeigen dagegen reguläre Boutonmorphologie. Das präsynaptische Lokalisationsmuster des SNAP-25:GFP-Fusionsproteins entspricht ansonsten dem Muster des endogenen Proteins (Rao *et al.*, 2001).

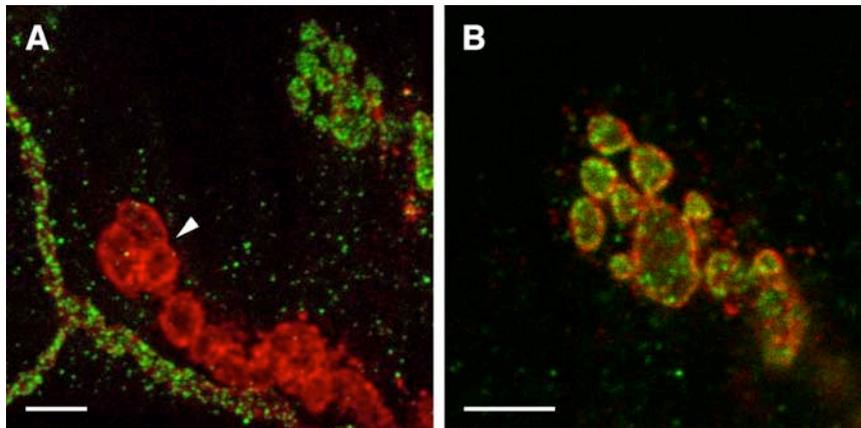


Abbildung 8: Unterschiedliche Lokalisation des SNAP-25:GFP-Fusionsproteins und abweichende Boutonmorphologie.

Co-Immunmarkierung von SNAP-25:GFP (grün) und HRP (rot) zur Markierung der Morphologie neuronaler Strukturen (Axone und Boutons). (A) Einzelne Verzweigungen der NME ohne SNAP-25:GFP-Immunreaktivität (Pfeilspitze) zeigen reguläre Boutonmorphologie. (B) Dagegen sind Ib-Verzweigungen mit SNAP-25:GFP-Immunreaktivität durch eine abweichende Boutonmorphologie gekennzeichnet – große Boutons sind von vielen kleinen Satellitenboutons umgeben. Der Maßstab beträgt jeweils 4 μm .

Die mit Hilfe der GFP-Fusionsproteine festgestellte neuromuskuläre Lokalisation von Proteinen wie ATP α oder SNAP-25 ist nicht überraschend, da sie für die Aufrechterhaltung neuronaler Funktionen essentiell sind. Für andere Proteine, wie die Argininkinase oder INDY liegen bereits Erkenntnisse vor, die eine Funktion im neuronalen Kontext beschreiben. Im Fall von Gilgamesh liegt eine neuronale Funktion nahe, wenn man berücksichtigt, welche Rolle der Wingless-Signalweg bei der koordinierten Entwicklung der NME spielt. Charybde scheint nach bisherigen Erkenntnissen auch an der Entwicklung des ZNS beteiligt zu sein, dessen Lokalisation und Rolle an der NME sind aber bisher neu bzw. unbekannt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die „protein trap“-Strategie prinzipiell zur Identifizierung von Proteinen geeignet ist, deren Lokalisation an der *Drosophila*-NME bislang nicht bekannt war und die somit interessante Einblicke in die Funktionsweise der NME erbringen könnten.

2.1.3 GFP-Fusionsproteine zur Untersuchung dynamischer Prozesse an neuromuskulären Endplatten

Die über die *P*-Element-Insertionen identifizierten Proteine sind potentiell nützlich für die Untersuchung erfahrungsabhängiger Veränderungen an der NME. Durch die GFP-Insertion könnten die Proteine jedoch falsch gespleißt oder destabilisiert werden oder funktionell beeinträchtigt sein. Letzteres würde sich im Extremfall in homozygoter Letalität äußern.

Um die an der NME lokalisierten GFP-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer molekularen Integrität genauer zu charakterisieren, wurden mittels eines tritonhaltigen Homogenisierungspuffers Gesamtproteinextrakte aus jeweils 5–10 larvalen Hautmuskelschläuchen hergestellt. Die Proteine wurden elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Molekülmasse anschließend per Immunoblot mit anti-GFP-Antikörpern abgeschätzt. Alle Proteine haben anscheinende Molekülmassen, die ungefähr um das Gewicht des GFPs (ca. 27 kDa) über den für die jeweiligen endogenen Proteine vorhergesagten Werten liegen (Abbildung 9; Tabelle 2).

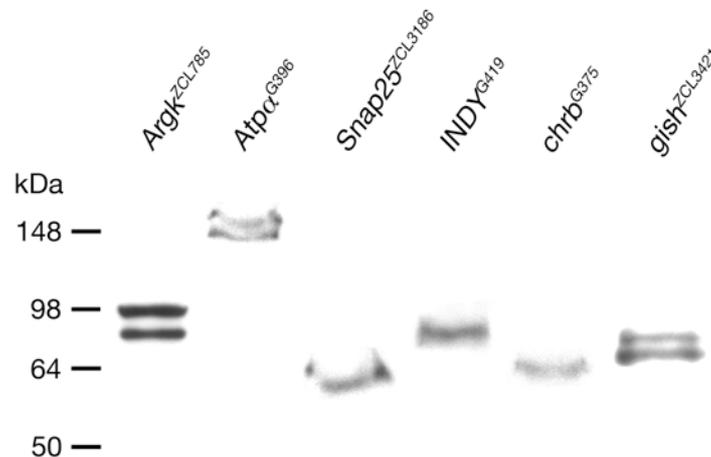


Abbildung 9: Überprüfung der Integrität der GFP-Fusionsproteine mittels anti-GFP-Immunoblot. Der Western-Blot zeigt, daß die von der *P*-Element-Insertion betroffenen Gene in Proteine translatiert werden, deren Größe jeweils ungefähr um die des GFPs (ca. 27 kDa) zunimmt. Zur Orientierung ist die Molekülmasse in kDa angegeben.

Fünf der sechs untersuchten Gene mit *PTT*-Insertionen könnten laut Vorhersage (<http://www.flybase.org>) theoretisch mehr als ein Transkript generieren, das die zusätzliche GFP-Sequenz enthält (Tabelle 1). Drei der analysierten Linien (*Argk*^{ZCL785}; *Atpα*^{G396}; *gish*^{ZCL3421}) exprimieren im Hautmuskelschlauch bzw. an der NME jeweils zwei verschiedene Isoformen der GFP-Fusionsproteine (Abbildung 9). Die Stabilität der Proteine wird in keiner der untersuchten Linien durch die zusätzliche GFP-Sequenz beeinträchtigt. Das Auftreten

verschiedener Isoformen belegt zudem, daß das künstliche GFP-Exon wie vorhergesagt in verschiedene Transkripte eingespleißt wird.

Um potentielle funktionelle Beeinträchtigungen der GFP-Fusionsproteine zu charakterisieren wurde ihr Einfluß auf die Entwicklung der NME untersucht. Dazu wurde in homozygoten L3-Larven die Anzahl der Boutons der Endplatte auf den Muskeln 6 und 7 im Segment A2 bestimmt und mit der in *Wildtyp*-Tieren bestimmten Anzahl verglichen. Die Muskeln 6 und 7 sind für die Fortbewegung der Tiere besonders wichtig und werden durch zwei Motoneurone innerviert, die jeweils Typ Is- oder Ib-Boutons ausbilden. Die NME der Muskeln 6 und 7 im Segment A2 ist besonders groß und ein etabliertes Modellsystem zur Untersuchung entwicklungs- und erfahrungsabhängiger Veränderungen. Es wurden generell Tiere ähnlicher Größe für die Quantifizierung herangezogen. Um dennoch auftretende individuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Tieren auszugleichen (die Boutonanzahl ist proportional zur Muskelgröße), wurde die absolute Anzahl der Boutons auf die Muskelfläche bezogen normalisiert (siehe Kapitel 4.2.8; Schuster *et al.*, 1996a). Bei dieser Untersuchung wurden nur die Linien berücksichtigt, die bis zum dritten Larvenstadium als homozygote Tiere überleben.

Alle Linien, bis auf die mit der Insertion in *charybde*, entwickeln signifikant größere Endplatten mit mehr Boutons [*Wildtyp*: $2,31 \pm 0,07$ AU¹ (100 %) / *Argk*^{ZCL785}: $2,91 \pm 0,12$ AU (126 %; $p < 0,001^2$) / *chrh*^{G375}: $2,64 \pm 0,23$ AU (114 %; $p < 0,07$) / *INDY*^{G419}: $3,40 \pm 0,17$ AU (147 %; $p < 0,001$) / *gish*^{ZCL3421}: $3,37 \pm 0,35$ AU (146 %; $p < 0,001$) / *Atpα*^{G396}: $3,41 \pm 0,39$ AU (148 %; $p < 0,001$); Tabelle 2]. Diese Insertionen haben also einen direkten oder indirekten Einfluß auf das Wachstum der NME. Die beobachteten Effekte könnten auf einer veränderten Aktivität der Proteine beruhen oder durch eine Veränderung der Transkriptionsaktivität infolge der *P*-Element-Insertion hervorgerufen werden.

Um unter den GFP-Fusionsproteinen jene zu identifizieren, die an der Regulation erfahrungsabhängiger Veränderungen beteiligt sind und sich zur Verfolgung von Prozessen synaptischer Plastizität eignen, wurden Larven entweder bei 18°C oder bei 29°C aufgezogen. Prozesse synaptischer Plastizität an der larvalen NME können durch Kontrolle der Umgebungstemperatur gezielt beeinflußt werden. Tiere, die bei 18°C aufgewachsen sind, haben eine deutlich kleinere Endplatte als die bei 29°C aufgewachsenen Tiere. Diese Unterschiede sind auf die gesteigerte motorische Aktivität der Larven bei höheren Temperaturen zurückzuführen (Sigrist *et al.*, 2003).

¹ AU – „arbitrary unit“; 1 AU = 718,54 Boutons/mm² Muskeloberfläche.

² *t*-Test

Gen	Linie	Letalität (Stadium)	Integrität m_M in kDa	NME
<i>Argininkinase</i>	ZCL785	Puppe	85/97 (48/61)	+
<i>charybde</i>	G375	–	64 (32)	<i>wt</i>
<i>INDY</i>	G419	–	85 (64/66)	+
<i>gilgamesh</i>	ZCL3421	Puppe	76/81 (41/52/53)	+
<i>Atpα</i>	G396	Puppe	145/160 (111/116)	+
<i>Snap25</i>	ZCL3186	Embryo	60 (17/24)	nb

Tabelle 2: Funktionelle und molekulare Integrität der GFP-Fusionsproteine.

Angegeben ist, ob und wann die *P*-Element-Insertion letal ist (Spalte 3). In Spalte 4 ist die per Immunoblot bestimmte anscheinende Molekülmasse der GFP-Fusionsproteine aufgeführt. In Klammern ist jeweils die theoretische Molekülmasse der endogenen Proteine angegeben. Aus Spalte 5 geht hervor, wie sich die Morphologie der NME gegenüber *Wildtyp*-Larven verändert (*wt*: Boutonzahl gegenüber *Wildtyp* unverändert / +: Boutonzahl gegenüber *Wildtyp* erhöht / nb: nicht bestimmt).

In dorsal aufgeschnittenen, PFA-fixierten larvalen Hautmuskelschläuchen (Filets) wurden die GFP-Fusionsproteine mittels fluoreszierender anti-GFP-Antikörper markiert. Für Referenzzwecke wurden neuronale Strukturen mittels anti-HRP-Antikörpern ebenfalls fluoreszenzmarkiert. In Epifluoreszenz-Aufnahmen wurde die Fluoreszenzintensität an jeweils 10–20 Boutons der NME der Muskeln 6 und 7 des Segmentes A2 mittels eines Bildanalyseprogramms bestimmt. Um individuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Tieren zu eliminieren, wurde zur Normalisierung der Quotient aus der Fluoreszenzintensität der GFP- und der HRP-Immunkmarkierung gebildet (siehe Kapitel 4.2.5). Die ermittelten Daten zum Expressionsniveau bei 18°C und 29°C wurden jeweils miteinander verglichen. Diese Untersuchung wurde nur an Linien durchgeführt, die homozygote L3-Larven hervorbringen und deren GFP-Fusionsproteine direkt an Boutons oder in deren unmittelbarer Umgebung lokalisiert sind und ein ausreichend starkes Expressionsniveau aufweisen.

Die Argininkinase und Charybde zeigten keine erfahrungsabhängige Regulation des Expressionsniveaus [Argk:GFP 18°C: $0,25 \pm 0,03$; 29°C: $0,27 \pm 0,05$; $p < 0,72$ (*t*-Test) / Chrb:GFP 18°C: $0,24 \pm 0,06$; 29°C: $0,23 \pm 0,04$; $p < 0,94$ (*t*-Test)]. Die INDY:GFP-Expression nahm bei 29°C signifikant zu [INDY:GFP 18°C: $0,72 \pm 0,04$; 29°C: $0,92 \pm 0,06$; $p < 0,016$ (*t*-Test)]. INDY:GFP eignet sich daher potentiell auch als *in vivo*-Marker zur Verfolgung von erfahrungsabhängigen synaptischen Veränderungen.

Alle molekularen und funktionellen Daten inklusive derer, die die GFP-Fusionsproteine des ersten und zweiten Chromosom betreffen und noch nicht veröffentlicht wurden (molekulare Integrität, Morphologie und Dynamik; vgl. Marella, 2003), sind noch einmal im Anhang in Tabelle 8 als Übersicht dargestellt.

Die Suche nach neuen Proteinen an der NME mittels der Linien, die ein *PTT*-Element stabil integriert haben (Morin *et al.*, 2001), führte zur Identifizierung von sechs Genen auf Chromosom III, deren Relevanz im neuronalen Kontext bereits teilweise zuvor beschrieben wurde. Es konnten aber auch Proteine identifiziert werden, deren genaue Funktion und Lokalisation an der NME bislang noch nicht beschrieben wurden (Argk, Chrb, INDY, Gish). Die molekulare Integrität der untersuchten Proteine wird durch die zusätzliche GFP-Sequenz nicht beeinträchtigt. In vier Proteinen (Argk, INDY, Gish, Atp α) führt die GFP-Insertion direkt oder indirekt zu funktionellen Beeinträchtigungen (verstärktes Wachstum der NME). Eine Linie (*INDY*^{G419}) eignet sich potentiell zur *in vivo*-Verfolgung erfahrungsabhängiger synaptischer Veränderungen. Die Linie *chrb*^{G375} bildet den Ausgangspunkt für die nachfolgende funktionelle und biochemische Untersuchung des Proteins Charybde im Kontext der NME.

2.2 Funktionelle und biochemische Charakterisierung Charybdes

2.2.1 Generierung einer *charybde*-Nullmutante und eines polyklonalen anti-Charybde-Antikörpers

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* stellt durch ihre leichte genetische Manipulierbarkeit einen nahezu idealen Modellorganismus dar, um Effekte zu studieren, die durch den Verlust bzw. die Überexpression von Genen entstehen. Bislang wurde für Studien zum *charybde*-Funktionsverlust in *Drosophila* entweder ein Hypomorph eingesetzt (*chr^b180*; Reiling and Hafen, 2004) bzw. auf RNA-Interferenz und Defizienzen zurückgegriffen, die neben *charybde* z.T. auch andere Gene verloren haben [*Df(3L)vin2*, *Df(3L)vin4*; Scuderi *et al.*, 2006]. Für funktionelle Untersuchungen ist es generell vorteilhaft, echte Nullmutanten einzusetzen, die idealerweise keine weiteren Gene direkt beeinträchtigen. Deshalb wurde eine *charybde*-Nullmutante mittels unpräziser Exzision des *PTT-P*-Elementes der Linie *chr^bG375* (Morin *et al.*, 2001) generiert. Dazu wurde das *P*-Element durch Einkreuzen des Konstrukts *P{Δ2-3}* mobilisiert, das ubiquitär die aktive Form der Transposase exprimiert. Der Exzision des *P*-Elementes konnte über die Augenfarbe festgestellt werden, da der Verlust des *miniwhite*-Gens zu weißen Augen in *w⁻*-Fliegen führt (vgl. Kapitel 4.2.3.2, Abbildung 28). Insgesamt wurden 130 Linien generiert, die das *P*-Element verloren hatten. Unter diesen konnten mittels genomischer PCR (Oligonukleotide binden in der 5'-UTR bzw. 3'-UTR) und anschließender Analyse der Amplifikate auf einem Agarose-Gel sieben Linien mit unpräzisen Exzisionen identifiziert werden (Abbildung 10, vgl. Kapitel 4.2.1.2).

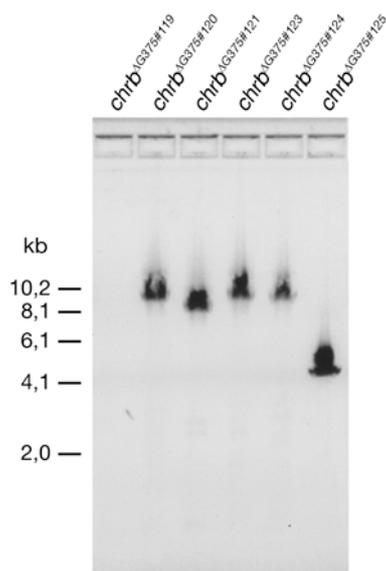


Abbildung 10: Exzisionen des *PTT-P*-Elementes.

Repräsentatives Ergebnis einer genomischen PCR zur Überprüfung von Exzisionsereignissen. Die in den Linien #120, #123 und #124 beobachtete Größe des Amplifikates entspricht in etwa der erwarteten Größe (9,1 kb) für eine präzise Exzision des *PTT-P*-Elementes aus *charybde*. Durch anschließende Sequenzierung konnte dies bestätigt werden. In der Linie #121 fehlt ein Teil des ersten Introns, und in der Linie #126 fehlt neben dem Start-Codon der überwiegende Teil der 5'-UTR. Die Größen der Amplifikate sind entsprechend kleiner. In der Linie #119 läßt sich mit den verwendeten Oligonukleotiden kein Amplifikat generieren.

Alle unpräzisen Exzisionen wurden anschließend durch Sequenzierung auf die Base genau charakterisiert. In einer Linie war nur ein kleinerer Bereich mit intronischer Sequenz verloren gegangen (*chr^bAG375#121*). In einer weiteren Linie lagen die Grenzen der Exzision außerhalb des genomischen Bereichs, der mit den verwendeten Oligonukleotiden amplifiziert werden kann (*chr^bAG375#119*). Diese Linie scheint neben *charybde* auch noch weitere (essentielle) Gene verloren zu haben. Selten auftretende homozygote Individuen sind unfruchtbar und sterben früh. Die restlichen fünf Linien (#2, #58, #109, #125, #126) sind alle auf dasselbe Exzisionsereignis zurückzuführen, welches durch den Verlust eines Großteils des ersten Exons gekennzeichnet ist. Neben dem codierenden Bereich inklusive des Start-Codons, fehlen ca. 86 % der 5'-UTR (rot bzw. blau in Abbildung 11A).

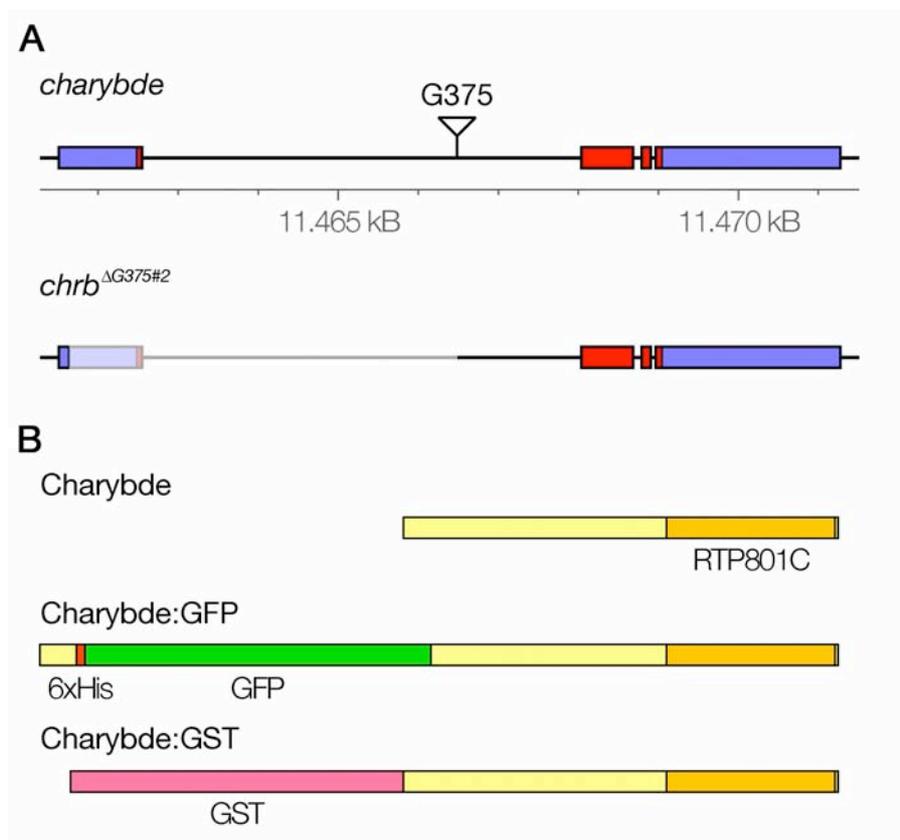


Abbildung 11: Gen- und Proteinstruktur von *charybde*/Charybde.

(A) *Charybde* erstreckt sich über einen genomischen Bereich von 9770 Basen auf Chromosom III. Das einzige sequenzierte Transkript deckt den gesamten codierenden Bereich aller vier Exons ab. Die Linie G375 (*chr^bG375*) trägt im ersten Intron das *P*-Element mit dem GFP-codierenden Exon (Morin *et al.*, 2001). Ausgehend von dieser Linie wurde die Nullmutante *chr^bAG375#2* mittels unpräziser Exzision des *PTT-P*-Elementes generiert. In dieser Mutante fehlt der größte Teil des ersten Exons inklusive des codierenden Bereiches mit dem Start-Codon. Codierende Bereiche sind rot dargestellt, 5'UTR bzw. 3'UTR sind blau dargestellt. (B) *Charybde* codiert für ein Protein mit einer theoretischen Molekülmasse von ca. 32 kDa (299 Aminosäuren). *Charybde* und seine Homologe besitzen im C-terminalen Bereich eine konservierte Domäne, die nach dem humanen Scylla-Homolog RTP801 als RTP801_C bezeichnet wird (orange). Die beiden unteren Darstellungen zeigen die Struktur des Chrb:GFP-Fusionsproteins (*chr^bG375*) und des GST:Chrb-Fusionsproteins zur rekombinanten Expression in Bakterien.

Diese Exzision sollte daher theoretisch zum Verlust der *charybde*-Expression führen, wie später auch experimentell bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 2.2.2; Abbildung 17). Die Tiere dieser Linien werden in Übereinstimmung mit Beobachtungen in anderen *charybde*-Mutanten (Reiling and Hafen, 2004; Scuderi *et al.*, 2006) leicht homozygot und entwickeln sich unter Standard-Kulturbedingungen unauffällig. Für alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde die Linie *chr^bAG375#2* als Nullmutante verwendet.

Zur Detektion des Charybde-Proteins wurden in Kaninchen polyklonale Antikörper generiert. Eine *charybde*-cDNA wurde in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-4T-3 (Amersham) kloniert (siehe Kapitel 4.2.1.3) und in *E. coli* ein N-terminales Glutathion-S-Transferase:Charybde-Fusionsprotein (GST:Chrb; vgl. Abbildung 11B) rekombinant exprimiert. Das GST-Fusionsprotein wurde per Affinitätschromatografie über eine Glutathion-Sepharose-Säule aufgereinigt (Abbildung 12; siehe Kapitel 4.2.2.1). Anschließend wurde das gebundene GST:Chrb-Fusionsprotein proteolytisch mit Thrombin gespalten und das freie Charybde eluiert. Die Aufreinigung des Proteins im nativen Zustand hat den Vorteil, daß für die Antigenizität wichtige Epitope weitgehend erhalten bleiben. Das gereinigte Protein wurde zwei Kaninchen subkutan injiziert. Charybdespezifische Antikörper wurden aus den Gesamtseren mittels Affinitätschromatographie gegen aufgereinigtes, rekombinantes Charybde isoliert (siehe Kapitel 4.2.2.2).

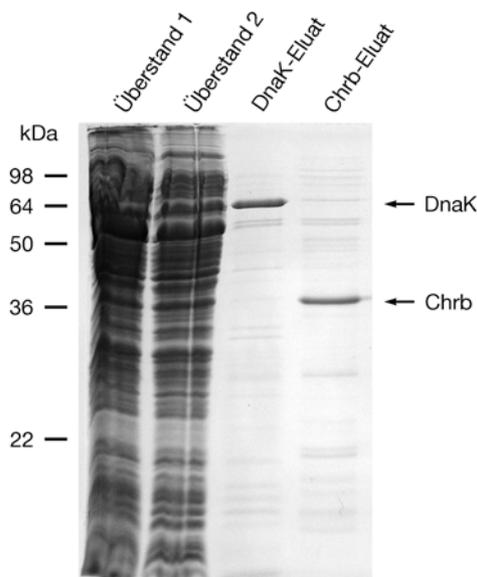


Abbildung 12: Aufreinigung von rekombinantem Charybde aus *E. coli*.

Coomassie-Färbung einer Charybde-Aufreinigung. Überstand 1 enthält das lösliche GST:Chrb-Fusionsprotein nach Aufschluß der Bakterien und anschließender Zentrifugation. Überstand 2 zeigt das Eluat nach Bindung des Fusionsproteins an die Glutathion-Sepharose-Matrix. Spur 3 zeigt die Elution des bakteriellen Chaperons DnaK, das häufig als Kontamination bei der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen auftritt (siehe Kapitel 4.2.2.1). Spur 4 zeigt das Eluat, das Charybde enthält nach proteolytischer Spaltung des GST:Chrb-Fusionsproteins auf der Säule mittels Thrombin.

Die Spezifität der gereinigten Antikörper wurde per Western-Blot und Immunfluoreszenz getestet. Dazu wurden mittels eines tritonhaltigen Homogenisierungspuffers Gesamtproteinextrakte des larvalen Bauchmarks bzw. der Hautmuskelschläuche (Charybde ist vor allem in neuronalen Geweben exprimiert; vgl. Kapitel 2.2.2) hergestellt. Beide Antikörper eignen sich sehr gut für die Anwendung im Immunoblot (vgl. Kapitel 2.2.2; Abbildung 17). Sie zeigen sehr wenig unspezifische Reaktionen und kreuzreagieren nicht mit dem Paralog Scylla. Die Spezifität der Antikörper wird auch durch die Detektion der unterschiedlichen Charybde-Konzentrationen in verschiedenen genetischen Situationen belegt. In der Linie *chr^bAG375#2*, die mittels unpräziser Exzision einen Teil des ersten Exons verloren hat, ist per Immunoblot kein Charybde mehr nachweisbar. Diese Linie ist also eine echte Nullmutante. Überexpression *charybdes* in Motorneuronen führt dagegen zu einem deutlichen Anstieg der Immunreaktivität (Abbildung 17).

Für die Immunhistochemie sind die Antikörper ebenfalls geeignet. Beide Antikörper lassen sich in methanolfixierten Präparaten einsetzen und detektieren unterschiedliche *charybde*-Expressionsniveaus. Während *Wildtyp*-Larven eine schwache Immunreaktivität zeigen, die das Lumen der Boutons der NME markiert, fehlt diese in *chr^bAG375#2*-Tieren (Abbildung 14A) bzw. ist bei Überexpression *charybdes* in Motorneuronen deutlich gesteigert (Abbildung 14D). Darüber hinaus binden die Antikörper aber auch unspezifisch an filamentöse Strukturen in Axonen und Muskeln (Pfeil in Abbildung 14A).

2.2.2 Charybde ist in Motorneuronen exprimiert und lokalisiert an neuromuskulären Endplatten

Neben der Linie *chr^bG375* generierten Morin *et al.* (2001) auch eine Linie mit einer GFP-Insertion in *scylla* (*scyl^{ZCL611}*). Diese Linien sind für Lokalisationsstudien der beiden Paraloge (vgl. Abbildung 5) sehr nützlich, da bislang keine *scylla*-spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen. Charybde und Scylla zeigen trotz ihrer funktionellen Ähnlichkeit und Sequenzidentität (Reiling and Hafen, 2004; Brugarolas *et al.*, 2004; Corradetti *et al.*, 2005; Scuderi *et al.*, 2006) sehr unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. Sowohl Charybde als auch Scylla werden im dritten Larvenstadium vor allem in neuronalen Zellen des ZNS und des PNS exprimiert. Dabei fällt vor allem ihre exklusive Verteilung auf. Während Charybde ausschließlich im neuronalen Zytoplasma, in Axonen und an Synapsen vorkommt, ist Scylla auf Zellkerne beschränkt (Abbildung 13; vgl. Reiling and Hafen, 2004). Charybde markiert deutlich das neuronale Zytosol, das Neuropil und die abgehenden Motoraxone des Bauchmarks (Pfeilspitzen bzw. Sternchen in Abbildung 13A, B). Scylla markiert dagegen

durch seine nukleäre Lokalisation deutlich die Position neuronaler Zellkörper in der Peripherie des Bauchmarks und entlang der Mittellinie (Pfeil in Abbildung 13C).

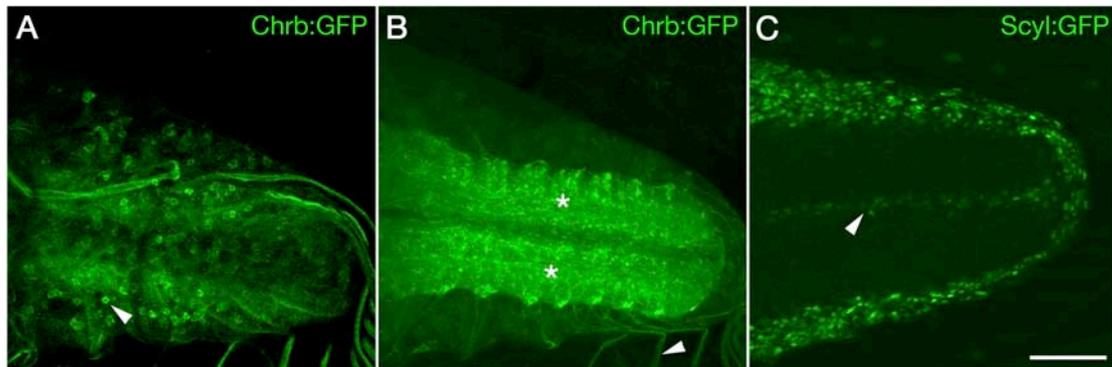


Abbildung 13: Charybde:GFP und Scylla:GFP zeigen im ZNS ein exklusives Lokalisationsmuster. Vergleich der Lokalisation der beiden Paraloge *charybde* und *scylla* anhand der intrinsischen GFP-Fluoreszenz der jeweiligen Fusionsproteine Chrb:GFP (*chrh^{G375}*) und Scyl:GFP (*scyl^{ZCL611}*; Morin *et al.*, 2001) im larvalen Bauchmark. Chrb:GFP kommt ausschließlich im Zytosol neuronaler Zellen vor. (A) Chrb:GFP-Expression im Soma der Neurone (Pfeilspitze). Deutlich erkennbar sind die nicht fluoreszierenden Zellkerne. (B) Das Bild zeigt eine andere konfokale Ebene des bereits in A gezeigten Bauchmarks. Chrb:GFP markiert das Neuropil (Sternchen) sowie die Motoraxone. (C) Scyl:GFP ist auf Zellkerne beschränkt und markiert die Position der neuronalen Zellkörper. Die Pfeilspitze markiert die Mittellinie. Der Maßstab beträgt 50 µm.

Die in Boutons der larvalen NME zu beobachtende Verteilung des Charybde:GFP-Fusionsproteins stimmt mit der anhand der anti-Charybde-Immunreaktivität bestimmten Lokalisation des endogenen Proteins überein (Abbildung 14B, E). Neben dem Boutonlumen werden durch den anti-Charybde-Antikörper auch unspezifisch filamentöse Strukturen in Axonen und Muskeln markiert, die auch in der Nullmutante zu beobachten sind (Pfeil in Abbildung 14A). In den Boutons der Nullmutante *chrh^{AG375#2}* ist Charybde jedoch nicht nachweisbar (Pfeilspitzen in Abbildung 14A), wodurch die Spezifität der Immunmarkierung belegt wird. Die *GAL4*-abhängige ektopische Überexpression (Brand and Perrimon, 1993) eines *charybde*-Transgens (Reiling and Hafen, 2004) im Muskel mittels *Mhc-GAL4* führt zu einer schwachen, diffusen Immunreaktivität im Muskelgewebe (Sternchen in Abbildung 14C) ohne lokale Anreicherung im subsynaptischen Bereich der NME. Dies weist darauf hin, daß Charybde ein präsynaptisches Protein ist. Überexpression *charybdes* in Motorneuronen mittels *OK6-GAL4* (Aberle *et al.*, 2002) führt denn auch zu einem deutlichen Anstieg der Immunfluoreszenz im Boutonlumen und entlang der Axone. Die beobachtete Verteilung Charybdes in *Wildtyp*-Tieren, bei Überexpression im Muskel sowie im Motorneuron spricht für eine endogene Funktion des Proteins in Neuronen bzw. präsynaptischen Spezialisierungen.

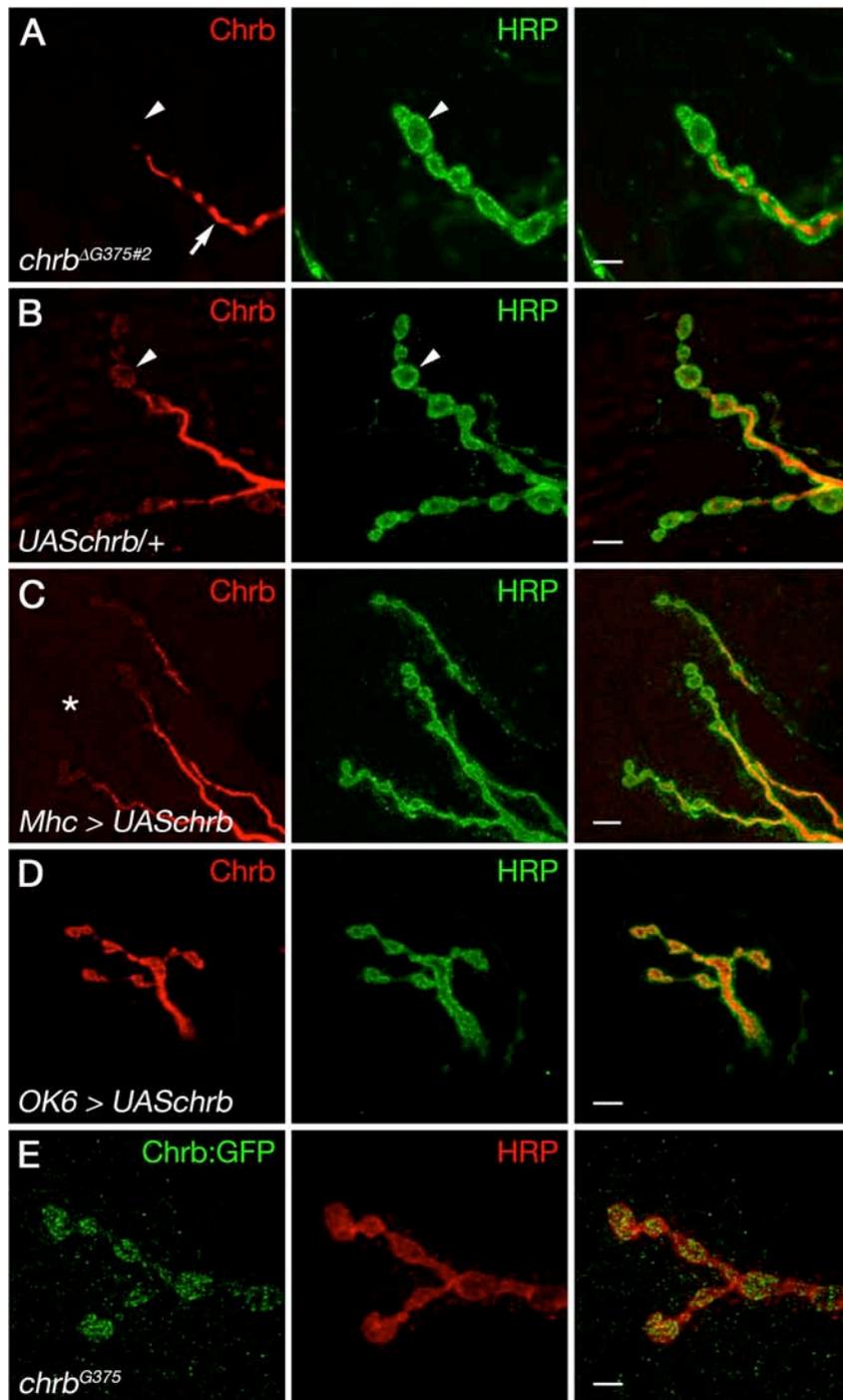


Abbildung 14: Charybde lokalisiert im präsynaptischen Bereich neuromuskulärer Endplatten.

Die Co-Immunmarkierung von Charybde und HRP zeigt, daß Charybde ein präsynaptisch lokalisiertes Protein ist. Daneben markiert der anti-Charybde-Antikörper jeweils unspezifisch filamentöse Strukturen innerhalb der Motoraxone (Pfeil in A). (A) Die Nullmutante *chrb*^{ΔG375#2} zeigt keine Charybde-Immunreaktivität in Boutons (Pfeilspitze). (B) Kontroll-Tiere zeigen dagegen eine leichte Immunreaktivität innerhalb der Boutons (Pfeilspitze). (C) Überexpression *charybdes* im Muskel mittels *Mhc-GAL4* führt nur zu einem leichten Anstieg der Reaktivität im Muskel (Sternchen). Die Expression im präsynaptischen Neuron bleibt gegenüber der *Wildtyp*-Situation unverändert. (D) *Charybde*-Überexpression in Motorneuronen mittels *OK6-GAL4* führt zu einem deutlichen Anstieg der Immunreaktivität an der Endplatte. (E) *Charybde:GFP* (anti-GFP-Antikörper) zeigt das gleiche Verteilungsmuster wie das endogene Protein bei einer gegenüber *Wildtyp*-Tieren erhöhten Immunreaktivität. Dargestellt ist jeweils eine Typ Ib-Verzweigung der NME der Muskeln 6 und 7 im Segment A2. Der Maßstab entspricht jeweils 4 µm.

Eine eingehendere Analyse der NME der Muskeln 12 und 13 im dritten Larvenstadium ergab, daß Charybde in allen Motorneuronen exprimiert wird und in den jeweiligen Boutontypen lokalisiert. Charybde wird neben den ausschließlich glutamatergen MNSNb/d-Is- und MN6/7-Ib-Motorneuronen (Typ Is- und Ib-Boutons; Johansen *et al.*, 1989) auch von octopaminergen MNSNb/d-II-Neuronen (Typ II-Boutons; Monastirioti *et al.*, 1995; Nishikawa and Kidokoro, 1999) und insulinergen MN12-III-Neuronen (Typ III-Boutons; Gorczyca *et al.*, 1993) exprimiert (Bezeichnung der Motorneurone: Hoang and Chiba, 2001). Das endogene Charybde-Expressionsniveau variiert je nach Neurontyp, wie an den NMEs der Muskeln 6/7 und 12/13 in *Wildtyp*-Tieren beobachtet werden kann. In Typ Is-, Ib- und III-Boutons ist Charybde jeweils ungefähr gleich stark exprimiert, in Typ II-Boutons ist es dagegen fast nicht nachweisbar (Abbildung 14 und Pfeile in Abbildung 15A). Ein Vergleich des Charybde- und Charybde:GFP-Expressionsniveaus an NMEs der Muskeln 6/7 und 12/13 deutet auf eine gegenüber der *Wildtyp*-Situation generell gesteigerte Expression in *chrB^{G375}*-Tieren hin. Typ II-Boutons zeigen in Gegensatz zu *Wildtyp*-Tieren eine deutlich gesteigerte Expression. Am stärksten wird Charybde:GFP aber in insulinergen Typ III-Boutons exprimiert (Abbildung 14 und Abbildung 15B).

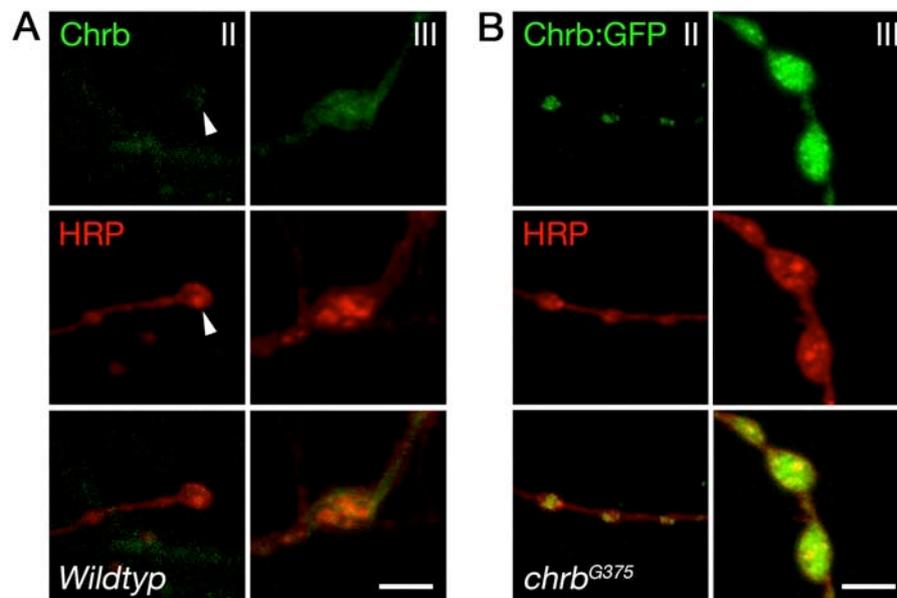


Abbildung 15: Differenzen im *charybde*-Expressionsniveau zwischen *Wildtyp*- und *chrB^{G375}*-Tieren.

(A) In *Wildtyp*-Tieren kann in octopaminergen Typ II-Boutons fast kein Charybde nachgewiesen werden (Pfeilspitze). In insulinergen Typ III-Boutons zeigt Charybde ein schwaches Expressionsniveau, das dem in Is- und Ib-Boutons ähnelt. (B) Chrb:GFP ist dagegen in Typ II-Boutons deutlich nachweisbar. Typ III-Boutons zeigen in *chrB^{G375}*-Tieren eine gegenüber Typ Ib-Boutons stark gesteigerte Expression. Dargestellt sind jeweils Boutons der NME des Muskels 12. Zur Verdeutlichung der Boutonmorphologie wurden neben anti-Charybde- bzw. anti-GFP-Antikörpern auch anti-HRP-Antikörper zur Markierung eingesetzt. Der Maßstab beträgt jeweils 3 µm.

Weiterhin fällt bei einem Vergleich des Charybde- und Charybde:GFP-Expressionsmusters an NMEs der Muskeln 6 und 7 auf, daß Charybde:GFP in glutamatergen Typ Ib-Boutons in muskelabhängiger Weise reguliert wird. Die auf Muskel 7 liegenden Ib-Boutons weisen ein deutlich erhöhtes Charybde:GFP-Expressionsniveau gegenüber den auf Muskel 6 liegenden Ib-Boutons auf (Abbildung 16B; vgl. Kapitel 2.2.7, Abbildung 25A). In Typ Is-Boutons sind diese Unterschiede nicht zu beobachten. Alle Typ Ib-Innervierungen auf Muskel 6 und 7 gehen auf dasselbe Motorneuron zurück (MN6/7-Ib; Lnenicka and Keshishian, 2000; Hoang and Chiba, 2001). Die Charybde:GFP-Expression in Typ Ib-Boutons könnte somit lokal durch retrograde Signale reguliert werden. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, daß Entwicklungs- und Wachstumsprozesse zwischen Muskel und Motorneuron in Abhängigkeit von der jeweiligen Verbindung individuell koordiniert werden, um zu gewährleisten, daß die postsynaptische Zelle ausreichend innerviert wird (Davis and Goodman, 1998; Nakayama *et al.*, 2006). Leider sind die in *chr^bG³⁷⁵*-Tieren beobachteten Expressionsunterschiede mit dem anti-Charybde-Antikörper in *Wildtyp*-Tieren nicht nachvollziehbar (Abbildung 16A). Eine abschließende Bewertung dieses Phänomens wird im Rahmen dieser Arbeit daher nicht durchgeführt.

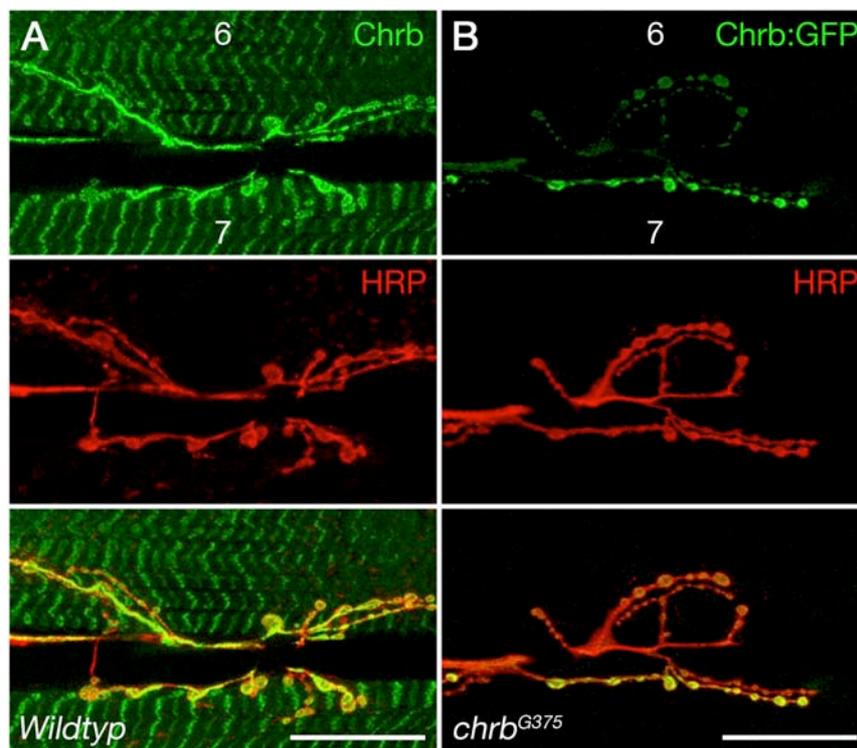


Abbildung 16: Das Chrb:GFP-Expressionsniveau wird in muskelabhängiger Weise reguliert.
 (A) In *Wildtyp*-Tieren ist in glutamatergen Typ Is- und Ib-Boutons sowohl auf Muskel 6 als auch auf Muskel 7 ein ähnliches *charybde*-Expressionsniveau zu beobachten. (B) In *chr^bG³⁷⁵*-Tieren wird Chrb:GFP in Typ Ib-Verzweigungen in muskelabhängiger Weise reguliert. Dargestellt ist die NME der Muskeln 6/7 des Segmentes A2. Der Maßstab beträgt jeweils 30 µm.

Die in verschiedenen genetischen Situationen (*chr^b^{ΔG375#2}*, *UASchr^b/+*, *OK6 > UASchr^b*, *chr^b^{G375}*) beobachteten Unterschiede im Charybde(:GFP)-Expressionsniveau (Abbildung 14) konnten auch per Western-Blot verifiziert werden (Abbildung 17). Zunächst fällt auf, daß die Charybde-Hauptbande im Immunoblot abweichend von der theoretischen Molekülmasse bei ca. 38 kDa statt bei 32 kDa migriert. Das Charybde:GFP-Fusionsprotein migriert im Western-Blot bei ca. 64 kDa (theoretisch 60 kDa). Diese Abweichung könnte in einer posttranslationalen Modifikation begründet liegen und wird im Kapitel 2.2.5 näher untersucht werden. Gewebeabhängig sind bis zu drei schwächere Nebenbanden zu beobachten, deren anscheinende Molekülmasse geringfügig größer ist. Im Bauchmark ist daneben auch eine schwache Bande zu beobachten, die etwas unterhalb der Hauptbande migriert. Die Unterschiede der Molekülmassen der verschiedenen Isoformen liegen in einer Größenordnung, wie sie für niedermolekulare Modifikationen zu erwarten ist. Diese Isoformen sind nur mit hochauflösenden Acrylamidgelen darstellbar (Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid 19:1).

In *chr^b^{ΔG375#2}*-Tieren ist keine Charybde-Expression per Immunoblot feststellbar. Dies belegt, daß es sich bei dieser Linie tatsächlich um eine Nullmutante handelt. Bei Überexpression in Motorneuronen mittels *OK6-GAL4* steigt die Charybde-Konzentration dagegen deutlich gegenüber der *Wildtyp*-Kontrolle an. In *chr^b^{G375}*-Tieren wird das Charybde:GFP-Fusionsprotein wesentlich stärker exprimiert als Charybde unter *Wildtyp*-Bedingungen bzw. unter Kontrolle des Treibers *OK6-GAL4* (Abbildung 17A, B). Auffällig ist vor allem auch die Veränderung der relativen Intensität der einzelnen Banden gegenüber der Kontrolle. In *chr^b^{G375}* ist die Intensität der Haupt- und Nebenbanden im Bauchmark nahezu identisch (Abbildung 17A). Nicht alle Isoformen Charybdes, die sich im Bauchmark nachweisen lassen, sind auch an NMEs exprimiert. In *Wildtyp*-Tieren, bei Überexpression mit *OK6-GAL4* und in Tieren der Linie *chr^b^{G375}* ist neben der Isoform, die im ZNS den Hauptanteil bildet, auch noch jeweils mindestens eine Nebenbande zu beobachten (Abbildung 17B). Neben Charybde:GFP konnte in *chr^b^{G375}*-Tieren per Immunoblot kein endogenes Charybde festgestellt werden. Das Expressionsmuster des Fusionsproteins repräsentiert somit wahrscheinlich das Expressionsmuster des endogenen Proteins.

Das stark gesteigerte Expressionsniveau und die anteilige Veränderung der einzelnen Isoformen des Charybde:GFP-Fusionsproteins in *chr^b^{G375}*-Tieren könnten darauf hindeuten, daß das Protein durch die Insertion der GFP-Sequenz in seiner Funktion beeinträchtigt ist und zur Kompensation stärker translatiert und modifiziert wird. Die Insertion könnte aber auch in einer erhöhten Stabilität des Proteins resultieren und seine Abbaurate verlangsamen. Charybde hat in Neuronen anscheinend ohnehin eine relativ große Halbwertszeit. Nur in den Larvenstadien L1 und L2, nicht jedoch in L3, konnte ein 6,8 kb großes Transkript nachgewiesen werden (Scuderi *et al.*, 2006). Alternativ könnte das *PTT-P*-Element aber auch

regulatorische Elemente im betroffenen Intron zerstören und somit zu verstärkter Transkription von *chrB*^{G375} führen.

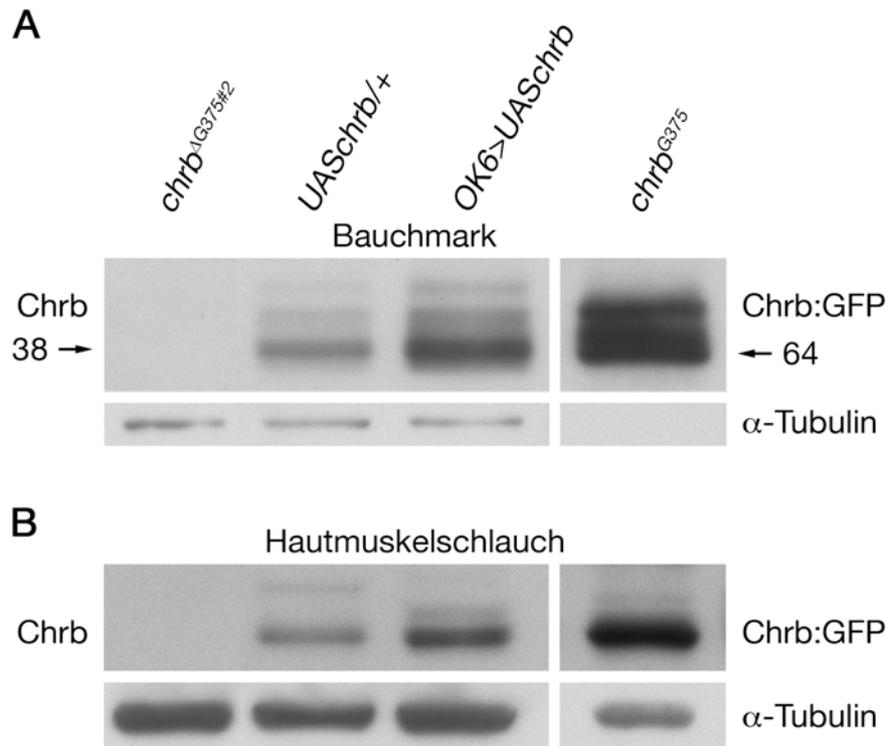


Abbildung 17: Vergleich des *charybde*-Expressionsniveaus in verschiedenen genetischen Situationen/Geweben mittels anti-Charybde-Antikörpern.

(A) Charybde-Expression im larvalen Bauchmark. Die fehlende Charybde-Immunreaktivität in *chrB*^{ΔG375#2}-Tieren bestätigt, daß diese Linie eine Nullmutante darstellt. Ein deutlicher Anstieg des Signals ist bei Überexpression *charybdes* in Motorneuronen mittels *OK6-GAL4* zu beobachten. In *chrB*^{G375}-Tieren wird das Charybde:GFP-Fusionsprotein im Vergleich zur Kontrolle stark überexprimiert. Angegeben ist die Molekülmasse in kDa. (B) Charybde-Expression im larvalen Hautmuskelschlauch/ an NMEs. Nur einige der im Bauchmark exprimierten Charybde-Isoformen sind auch in der Peripherie nachweisbar. Überexpression mittels *OK6-GAL4* führt zu einer Verschiebung in der anteiligen Zusammensetzung der Isoformen. Als Ladekontrolle ist jeweils α -Tubulin dargestellt. Für die Linie *chrB*^{G375} wurde aufgrund der starken Überexpression des Chrb:GFP-Fusionsproteins im Vergleich zu den anderen Spuren jeweils nur ca. 1/3 der Gesamtproteinmenge aufgetragen.

Die vorliegenden Daten belegen, daß Charybde ein von allen Motorneuronen exprimiertes Protein ist, das u. a. auch im präsynaptischen Bereich der NME lokalisiert. Das Lokalisationsmuster des Chrb:GFP-Fusionsproteins der Linie *chrB*^{G375} unterscheidet sich nicht von dem des endogenen Proteins, sein Expressionsniveau ist jedoch stark gesteigert.

2.2.3 Charybde beeinflusst das larvale Laufverhalten

Um festzustellen, ob *charybde* einen Einfluß auf die lokomotorische Effizienz hat, wurden L3-Larven verschiedener *charybde*-Genotypen einem Verhaltenstest unterzogen. Dazu wurden Larven ähnlicher Größe auf eine temperierte, feuchte Oberfläche gesetzt, auf der die Larven sofort anfangen, futtersuchend heranzukriechen. Die meisten Larven zeigen dabei eine im Mittel relativ konstante Laufaktivität, die nur von kurzen Pausen zur Reorientierung unterbrochen wird. Unterschiede zeigen sich aber bei den akkumulierten Laufstrecken. Die individuelle Laufaktivität der Tiere wurde jeweils über einen Zeitraum von zwei Stunden mit Hilfe eines computergesteuerten Kamerasystems kontinuierlich erfaßt und quantifiziert (Steinert *et al.*, 2006). Für die graphische Darstellung wurden jeweils die innerhalb von fünf Minuten zurückgelegten Wegstrecken zusammengefaßt, da die Varianz der Laufaktivität im Minutenbereich sehr hoch ist.

Die *charybde*-Nullmutante zeigt gegenüber den *Wildtyp*-Tieren eine leicht erhöhte Laufaktivität (Abbildung 18A). Die innerhalb von zwei Stunden zurückgelegte Gesamtlaufstrecke steigt gegenüber der *Wildtyp*-Kontrolle um 11% (Abbildung 18E). Chronische, panneuronale Überexpression *charybdes* mittels *elav^{C155}-GAL4* (Stimson and Ramaswami, 1999) führt zu einer deutlich verminderten Laufaktivität (Abbildung 18B); die Gesamtlaufstrecke reduziert sich um 21% (Abbildung 18E). Um entwicklungsbedingte Einflüsse der chronischen *charybde*-Überexpression ausschließen zu können, wurde *charybde* zur Kontrolle auch akut mittels der induzierbaren, panneuronalen Treiberlinie *elavGS-GAL4* und RU486 (Mifepriston) überexprimiert (Osterwalder *et al.*, 2001). Dazu wurden die Tiere für 20 h in Standardfutter gehalten, das RU486 bzw. nur das Lösungsmittel DMSO enthielt. Die akute Überexpression *charybdes* führte im Gegensatz zur chronischen nicht zu einer Verringerung der Laufaktivität (Abbildung 18C, E). Tiere der Linie *chrh^{G375}* unterscheiden sich in ihrer Laufleistung ebenfalls nicht signifikant vom *Wildtyp* (Abbildung 18D, E).

Es zeigt sich somit, daß Charybde keinen akuten Einfluß auf das Laufverhalten hat. Chronischer Verlust bzw. Überexpression *charybdes* in Neuronen ist dagegen mit einer Veränderung des Laufverhaltens assoziiert. Die Expression des Chrb:GFP-Fusionsproteins hat trotz des gegenüber der *Wildtyp*-Situation gesteigerten Expressionsniveaus keine Konsequenzen in Hinblick auf das Verhalten.

In früheren Arbeiten korrelierte eine verringerte Laufleistung, wie sie bei chronischer Charybde-Überexpression zu beobachten ist, mit einer Verkleinerung der NME. So haben Nullmutanten des Glutamaterezeptors IIA eine kleinere NME und eine eingeschränkte Laufaktivität (Sigrist *et al.*, 2003). Der Einfluß Charybdes auf die Größe der NME wird im folgenden Kapitel untersucht werden.

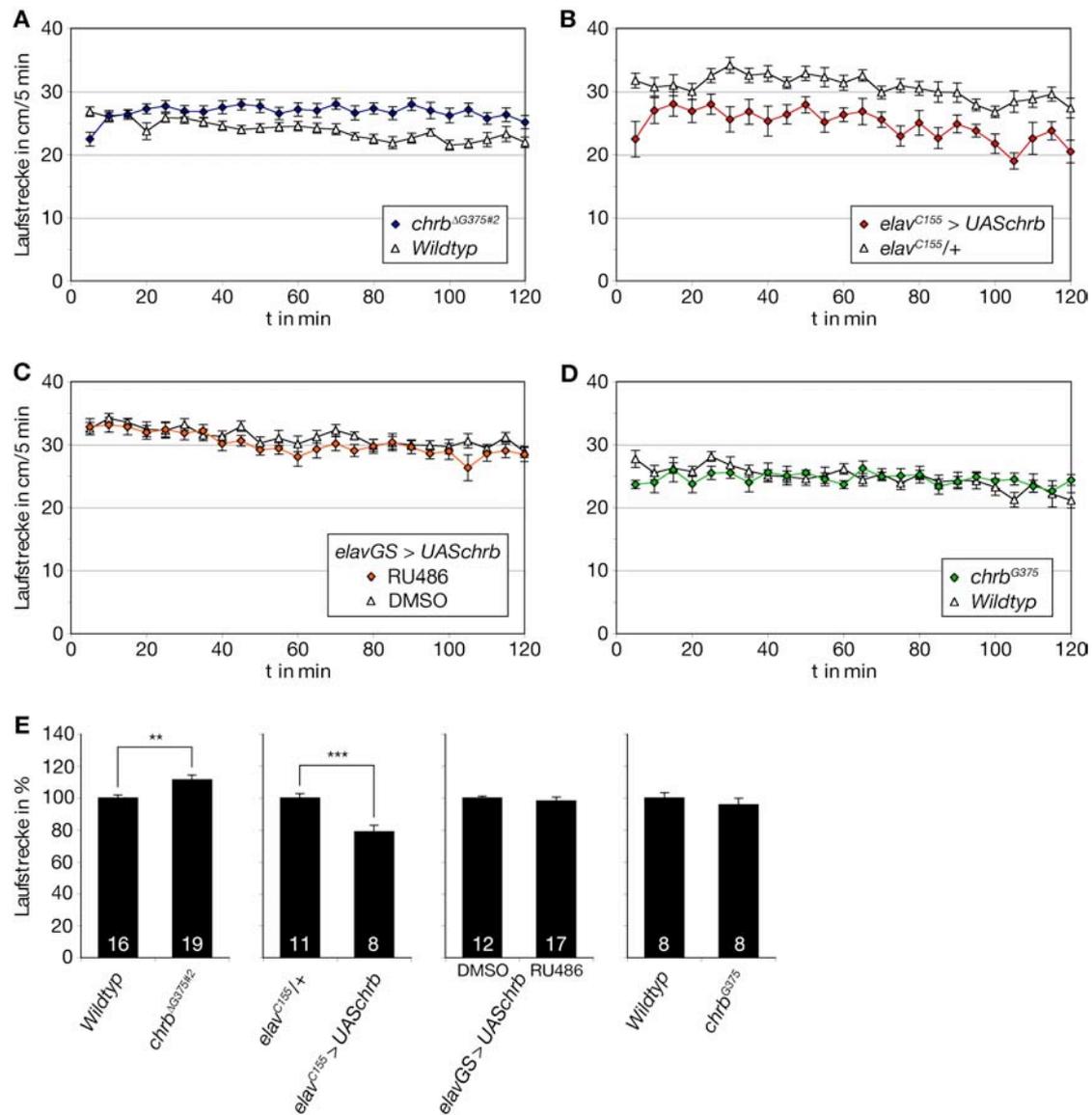


Abbildung 18: Charybde beeinflusst die Laufaktivität von L3-Larven.

(A) Die *charybde*-Nullmutante ($chr b^{AG375\#2}$) legt durchschnittlich größere Strecken als *Wildtyp*-Tiere zurück. (B) Chronische, neuronale *charybde*-Überexpression mittels $elav^{C155}$ -*GAL4* führt zu einer Reduzierung der zurückgelegten Laufstrecke. (C) Die Laufaktivität von Tieren, in denen *charybde* mittels $elavGS$ -*GAL4* und RU486 in Neuronen akut überexprimiert wird, ist hingegen nicht beeinträchtigt. (D) Tiere der Linie $chr b^{G375}$ zeigen keine Veränderung der Laufaktivität gegenüber *Wildtyp*-Tieren. Die Datenpunkte zeigen jeweils die innerhalb der vorangegangenen 5 min zurückgelegten Wegstrecken. Angegeben sind Durchschnittswerte und Standardfehler von 8–19 Tieren. (E) Darstellung der innerhalb von zwei Stunden zurückgelegten Gesamtlafstrecke: Verlust *charybdes* führt zu einem signifikanten Anstieg (+ 11%). Chronische, neuronale Überexpression hat den gegenteiligen Effekt und führt zu einer signifikanten Reduktion der Laufstrecke (– 21%) gegenüber der Kontrolle. Die akute Überexpression *charybdes* und die Expression des *Chrb*:GFP-Fusionsproteins ($chr b^{G375}$) haben keinen Einfluß auf die Laufleistung der Tiere. Angegeben sind jeweils die durchschnittlich zurückgelegten Laufstrecken von 8–19 Tieren. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *t*-Test)

2.2.4 Charybde reguliert die Größe neuromuskulärer Endplatten und Boutons

Wie erwähnt, kann eine Verringerung der larvalen Laufleistung ein Hinweis auf eine verkleinerte NME sein. Aus dieser Überlegung heraus wurde die Größe der NME in verschiedenen genetischen Situationen quantifiziert. Als zuverlässiges Kriterium zur Beschreibung der Größe der NME hat sich die Boutonzahl erwiesen. Die Anzahl der Boutons und die Muskeloberfläche korrelieren positiv miteinander. Zur Normalisierung wird daher der Quotient aus Boutonzahl und Muskeloberfläche der Muskeln 6 und 7 gebildet (Schuster *et al.*, 1996a).

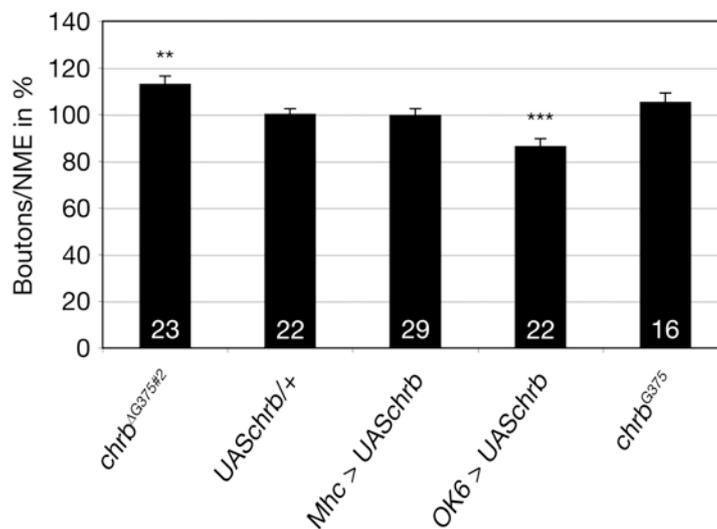


Abbildung 19: Charybde reguliert die Größe neuromuskulärer Endplatten.

Gegenüber der *Wildtyp*-Kontrolle nimmt die Anzahl der Boutons in der *charybde*-Nullmutante um ca. 13 % zu. Bei chronischer *charybde*-Überexpression in Motorneuronen mittels *OK6-GAL4* sinkt die Anzahl der Boutons dagegen auf ca. 86 %. Postsynaptische Überexpression im Muskel mit *Mhc-GAL4* hat keinen Einfluß auf die Anzahl der Boutons (99,5 %). Auch in *chr6^{G375}*-Tieren ist keine signifikante Änderung der Boutonzahl gegenüber der *Wildtyp*-Kontrolle feststellbar ($p < 0,27$; *t*-Test). Angegeben ist jeweils die durchschnittliche Boutonzahl pro neuromuskulärer Endplatte der Muskeln 6/7 des Segmentes A2. Die Boutonzahlen wurden bezogen auf die Muskelgröße normalisiert. Pro Genotyp wurden zwischen 16 und 29 Hemisegmente ausgewertet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *t*-Test).

Zur Charakterisierung der NMEs wurde die Anzahl der Boutons auf den Muskeln 6 und 7 des Segmentes A2 bestimmt. Wie aus Abbildung 19 zu entnehmen ist, führt der Verlust *charybdes* in *chr6^{AG375#2}* zu einem 13%igen Anstieg der Boutonzahl im Vergleich zur *Wildtyp*-Kontrolle. Chronische *charybde*-Überexpression in Motorneuronen mittels *OK6-GAL4* verursacht dagegen eine Reduktion der Größe der NME um ca. 14%. Ektopische Überexpression *charybdes* im Muskel mittels *Mhc-GAL4* hat keinen Einfluß auf die Größe der NME. In der Linie *chr6^{G375}* konnte trotz des stark gesteigerten Expressionsniveaus des Charybde:GFP-Fusionsproteins keine signifikante Veränderung der Boutonzahl festgestellt

werden. Das gesteigerte Expressionsniveau des Fusionsproteins spielt also auch in Hinblick auf diesen Parameter keine Rolle. Dies könnte ein Hinweis auf einen endogenen Kompensationsmechanismus sein, der funktionelle Beeinträchtigungen des Proteins ausgleicht. Abgesehen davon projizieren die Motorneurone MNSNb/d-Is und MN6/7-Ib in den verschiedenen untersuchten genetischen Situationen normal auf die Muskeln 6 und 7 und zeigen keine Abweichungen in ihrem Verzweigungsverhalten.

Neben der Boutonzahl hat Charybde auch einen Einfluß auf den Durchmesser der Boutons. Um dieses Phänomen zu quantifizieren, wurden Projektionen konfokaler Bilderserien von fluoreszenzmarkierten NMEs (anti-HRP-Antikörper) angefertigt. In jeweils zehn Tieren wurden von jeweils einer NME der Muskeln 6 und 7 des Segmentes A2 die Durchmesser aller Boutons mit Hilfe des Programms Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) bestimmt. Da die Boutondurchmesser nicht normalverteilt sind, wurde der Median als Vergleichsparameter gewählt (vgl. Abbildung 20A). Verlust *charybdes* führt zu einer homogen über die gesamte Boutonpopulation verteilten Vergrößerung der Boutondurchmesser (Abbildung 20A, B). Der Median der Boutondurchmesser erhöht sich von 1,45 μm (Wildtyp) auf 1,73 μm (*chr^bG375#2*). Die beiden Verteilungen unterscheiden sich signifikant voneinander, wie anhand der kumulativen Wahrscheinlichkeiten leicht zu erkennen ist ($p < 0,001$; Kolmogorv-Smirnov-Test). Überexpression *charybdes* in Motorneuronen mittels *OK6-GAL4* führt dagegen nicht zu einer Veränderung der Boutondurchmesser. Die jeweiligen Kurven der kumulativen Verteilungen der Boutondurchmesser überlagern sich nahezu (Abbildung 20A, B). Die Expression des Charybde:GFP-Fusionsproteins in der Linie *chr^bG375* führt, ähnlich wie in der Nullmutante, zu einer Zunahme der Boutondurchmesser. Der Median der Boutondurchmesser steigt von 1,45 μm (Wildtyp) auf 1,6 μm (*chr^bG375*; Abbildung 20A, B). Auch hier unterscheiden sich die Verteilungen signifikant voneinander ($p < 0,001$; Kolmogorv-Smirnov-Test).

Charybde hat somit einen Einfluß auf das Wachstum der NME und die Boutongröße. Während die chronische Überexpression *charybdes* zu einem verringerten Wachstum der NME bei gleichbleibender Boutongröße führt, hat der Verlust *charybdes* verstärktes Wachstum der NME bei gleichzeitiger Zunahme der Boutondurchmesser zur Folge.

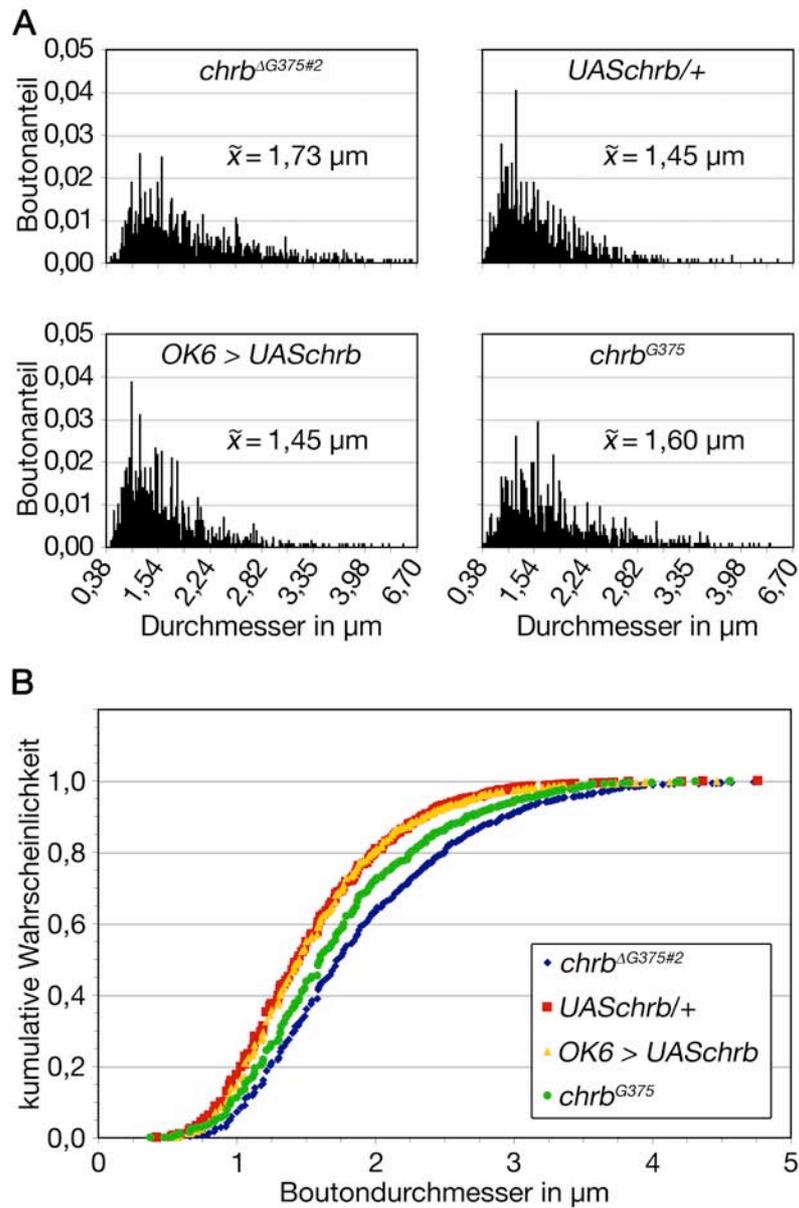


Abbildung 20: Charybde-Verlust führt zu einer Vergrößerung der Boutondurchmesser.

(A) Histogramme der Boutondurchmesser von Larven verschiedener Genotypen. Angegeben ist jeweils der Median der gemessenen Boutondurchmesser. (B) Die kumulative Verteilung zeigt, daß die Zunahme der Boutondurchmesser in *chr^{ΔG375#2}*- und *chr^{G375}*-Tieren homogen über die gesamte Population verteilt erfolgt. Die Verteilungen unterscheiden sich jeweils signifikant im Vergleich zur Verteilung der *Wildtyp*-Population ($p < 0,001$; *Kolmogorov-Smirnov*-Test). Überexpression *charybdes* in Motorneuronen mittels *OK6-GAL4* hat keinen Einfluß auf die Verteilung der Boutondurchmesser. Ausgewertet wurden jeweils mehr als 1100 Boutons der NME der Muskeln 6/7 des Segmentes A2.

2.2.5 Charybde ist ein zytosolisch lokalisiertes Protein

Wachstumsprozesse an der NME bedürfen einer engen Abstimmung zwischen prä- und postsynaptischen Ereignissen. Die Koordination dieser Ereignisse kann unter anderem durch direkte physische Interaktion zwischen sekretierten oder membranständigen Liganden und ihren entsprechenden Rezeptoren erfolgen. Für eine funktionelle Charakterisierung Charybdes ist es hilfreich, die genaue subzelluläre Lokalisation des Proteins zu kennen und zu wissen, ob es sich um ein membranassoziiertes oder sekretiertes Protein handelt.

Wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben, ist Charybde-Immunreaktivität im gesamten Boutonlumen neuromuskulärer Endplatten zu beobachten (Abbildung 14). Sie erinnert in ihrer Verteilung an synaptische Vesikelmarker wie CSP (cystein string protein; Buchner and Gundersen, 1997; Chamberlain and Burgoyne, 2000; Zinsmaier and Bronk, 2001) oder Synapsin (Greengard *et al.*, 1993). Mit Hilfe hochauflösender konfokaler Einzelbilder wurde überprüft, ob Charybde:GFP mit synaptischen Vesikelmarkern co-lokalisiert. Die Aufnahmen in Abbildung 21 zeigen eine nur teilweise überlappende Immunfluoreszenz zwischen den vesikulären Markerproteinen CSP bzw. Synapsin und Charybde:GFP.

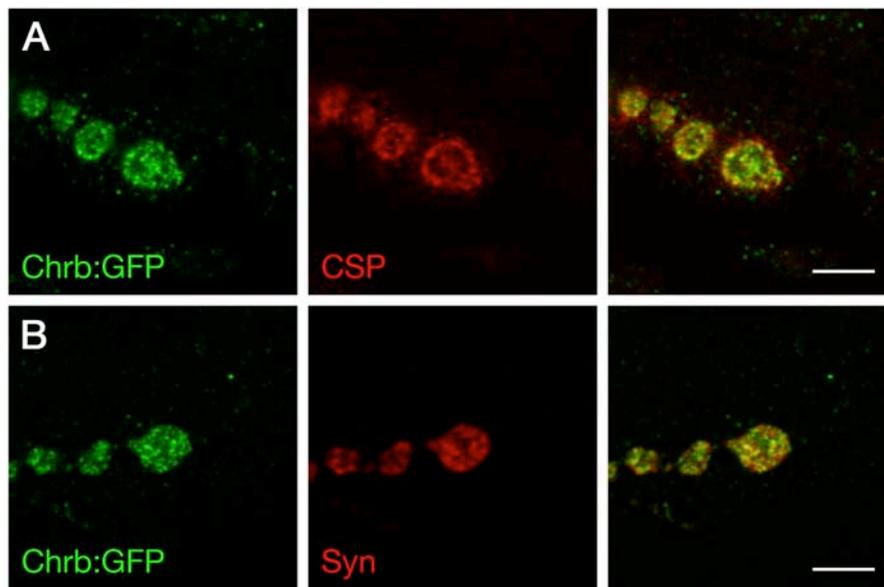


Abbildung 21: Chrb:GFP zeigt eine vesikelähnliche Verteilung an der larvalen neuromuskulären Endplatten, co-lokalisiert aber nur teilweise mit Vesikelmarkern.

Konfokale Einzelbilder neuromuskulärer Endplatten von *chrB^{G375}*-Tieren, die mit Antikörpern gegen die Vesikelmarker CSP (A) bzw. Synapsin (B) und GFP co-markiert sind. Während Chrb:GFP nur selten mit CSP co-lokalisiert, zeigt sein Verteilungsmuster deutliche Überschneidungen mit Synapsin. Der Maßstab entspricht jeweils 4 μ m.

Charybde besitzt laut Vorhersage (PSORT; <http://www.psort.org>) keine Aminosäuresequenzen, die darauf hindeuten würden, daß es sich um ein sekretiertes Molekül oder ein Transmembranprotein handelt, das im endoplasmatischen Retikulum (ER) posttranslational

modifiziert wird. Myristoylierungs- oder Prenylierungsmotive sind ebenfalls nicht vorhanden. Trotzdem fällt auf, daß Charybde im Western-Blot etwas langsamer migriert als erwartet und eine von der Vorhersage abweichende anscheinende Molekülmasse zeigt (38 kDa statt 32 kDa; vgl. Kapitel 2.2.2). Als Ursache könnte auch eine Palmitoylierung in Frage kommen, eine posttranslationelle Modifizierung, die bei der Regulation diverser neuronaler Prozesse eine wichtige Rolle spielt (Review: Huang and El-Husseini, 2005). Palmitoylierungen und andere Protein-Acylierungen unterstützen durch Erhöhung der Hydrophobizität die Interaktion mit Membranen und könnten die vesikelähnliche Verteilung des Chrb:GFP-Fusionsproteins erklären.

Um zu untersuchen, ob dem Phänomen des abweichenden Migrationsverhaltens eine posttranslationelle Modifizierung zugrunde liegt, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Neben einem Vergleich der Molekülmassen von endogenem und rekombinant in *E. coli* exprimiertem Charybde wurden für Kontrollzwecke auch eine Deglykosylierung und eine Deacylierung durchgeführt, um einen Eindruck zu gewinnen, wie entsprechende Modifizierungen das Migrationsverhalten beeinflussen.

Für den Vergleich der Molekülmassen wurden Gesamtproteinextrakte aus Gehirnen und Hautmuskelschläuchen von *Wildtyp*-Larven (L3) hergestellt. Zum Vergleich diente das bereits zur Antikörpergenerierung eingesetzte Charybde, das durch proteolytische Spaltung des GST:Chrb-Fusionsprotein gewonnen wurde (vgl. Kapitel 4.2.2.1). Sollte das abweichende Migrationsverhalten des endogenen Proteins durch höhermolekulare, posttranslationelle Modifizierungen verursacht werden, wie sie nur in eukaryontischen Zellen auftreten, würde man eine deutlich erhöhte Mobilität des rekombinanten Proteins erwarten. Das Migrationsverhalten beider Proteine unterscheidet sich jedoch nur unwesentlich und kann durch die leicht voneinander abweichenden Molekülmassen erklärt werden (Abbildung 22A).

Für die Deacylierung wurde eine Suspension aus ZNS-Neuronen erwachsener *Wildtyp*-Fliegen für zwei Stunden mit 0,1 M methanolischer Natriumhydroxidlösung inkubiert. Durch diese Behandlung werden eventuell vorhandene Thioesterbindungen an Cystein-Resten hydrolysiert. Die resultierende Deacylierung sollte zu einer Erhöhung der relativen elektrophoretischen Mobilität des Proteins führen (Kaufman *et al.*, 1984; van de Goor and Kelly, 1996). Die Charybde-Hauptbande zeigt keine Änderung in ihrem Laufverhalten – das Protein ist nicht palmitoyliert (Abbildung 22B). Zur Kontrolle wurde die Deacylierung von CSP überprüft (van de Goor and Kelly, 1996), dessen Molekülmasse deutlich reduziert wurde.

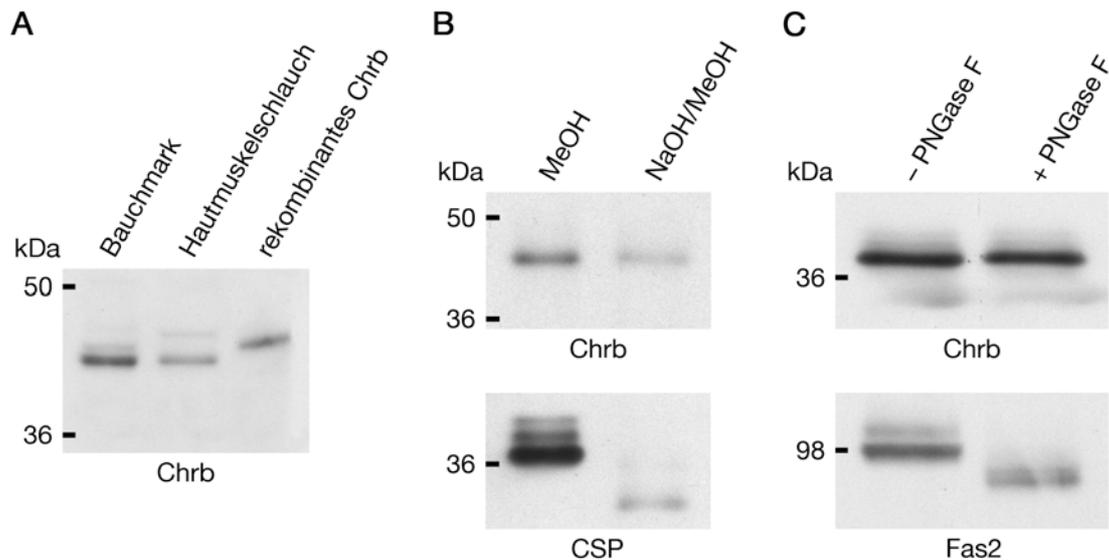


Abbildung 22: Das Migrationsverhalten Charybdes ist nicht auf höhermolekulare posttranslationelle Modifikationen zurückzuführen.

(A) Die anscheinenden Molekülmassen von endogenem und rekombinatem Charybde unterscheiden sich nur geringfügig und beruhen wahrscheinlich auf der zusätzlichen N-terminalen Aminosäuresequenz GSPNS des rekombinanten Proteins, die die Verbindung zur Thrombinschnittstelle des GST:Chrb-Fusionsproteins darstellt. Die theoretischen Molekülmassen betragen 32 179 Da bzw. 32 621 Da. (B) Das unveränderte Migrationsverhalten Charybdes zeigt, daß keine Acylierung/ Palmitoylierung vorliegt (oben). Als Kontrolle ist die Deacylierung des membranassoziierten Vesikelproteins CSP gezeigt (unten). (C) Das unveränderte Migrationsverhalten nach Verdau mit PNGase F belegt, daß Charybde nicht an Asparagin-Resten glykosyliert wird und somit kein sekretiertes Protein bzw. Transmembranprotein ist (oben). Zur Kontrolle ist die Deglykosylierung des neuronalen Adhäsionsmoleküls Fas2 gezeigt (unten). Zur Orientierung ist jeweils die Molekülmasse in kDa angegeben.

Für die Deglykosylierung wurde ein Proteinextrakt aus Köpfen erwachsener *Wildtyp*-Fliegen mit N-Glykosidase F (PNGase F) verdaut. PNGase F spaltet fast alle an Asparagin-Reste gebundenen Glykane (Tarentino *et al.*, 1985). Erwartungsgemäß zeigt Charybde nach Behandlung mit PNGase F keine Veränderung im Migrationsverhalten. Als Kontrolle wurde die Deglykosylierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls Fas2 (Lin and Goodman, 1994) überprüft (Abbildung 22C).

Eine posttranslationelle Prozessierung Charybdes im ER/Golgi und andere höhermolekulare Modifikationen wie z.B. Acylierungen können somit ausgeschlossen werden. Die beobachtete anscheinende Molekülmasse des Proteins ist somit auf inhärente Eigenschaften der Charybde-Aminosäuresequenz zurückzuführen.

Die beschriebene teilweise Co-Lokalisation mit synaptischen Vesikelmarkern (Abbildung 21) wirft trotzdem die Frage auf, inwiefern Charybde mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist. Synaptische Vesikel lassen sich von anderen Zellbestandteilen mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation abtrennen. Dabei wird ausgenutzt, daß synaptischen Vesikel aufgrund ihrer spezifischen Dichte innerhalb eines Glycerin-Gradienten langsamer sedimentieren als Zellmembranen und andere Zellorganellen (van de Goor *et al.*, 1995; Arnold *et al.*, 2004).



Abbildung 23: Gradientenzentrifugation zur Trennung synaptischer Vesikel von zytosolischen Proteinen. Charybde ist ein zytosolisches Protein, das nicht zusammen mit synaptischen Vesikeln sedimentiert.

Zur Klärung der Frage, ob Charybde ein vesikelassoziiertes Protein ist, wurde ein postnukleäres Homogenat aus Fliegenköpfen mittels einer Glycerin-Gradientenzentrifugation separiert. Der 5–25%ige Glycerin-Gradient wurde mit einem 50%igen Sucrose-Kissen unterschichtet. Die erste Spur enthält das Rohhomogenat (H), das auf den Gradienten aufgetragen wurde. Die Zone, innerhalb der synaptische Vesikel sedimentieren, wird durch die synaptotagminpositiven Fraktionen markiert. Charybde ist nicht mit synaptischen Vesikeln assoziiert, sondern ein zytosolisches Protein, das nur langsam in den Gradienten eindringt.

Ein postnukleäres Homogenat aus Köpfen erwachsener *Wildtyp*-Fliegen wurde über einen 5–25%igen Glycerin-Gradienten aufgetrennt (Abbildung 23). Die Zone, innerhalb der synaptische Vesikel sedimentieren, ist auf dem Immunoblot durch die synaptotagminpositiven Fraktionen markiert. Charybde ist nicht mit synaptischen Vesikeln assoziiert, sondern ein zytosolisches Protein, das nur langsam in den Gradienten eindringt. Die relativ starke Charybde-Reaktivität an der Oberfläche des Sucrose-Kissens ist wahrscheinlich auf eine Verunreinigung mit unvollständig homogenisierten bzw. intakten Zellen zurückzuführen und konnte bei Wiederholungen des Experimentes nicht beobachtet werden. Man beachte, daß die entsprechende Fraktion auch Synaptotagmin enthält.

Die Daten zur biochemischen Charakterisierung belegen, daß Charybde ein zytosolisches Protein ist. Die Diskrepanz zwischen der vorhergesagten Molekülmasse und der im Immunoblot beobachteten anscheinenden Molekülmasse ist nicht auf posttranslationelle Modifikationen zurückzuführen, wie sie typischerweise bei membranassoziierten oder sekretierten Proteinen auftreten. Die beobachtete teilweise Co-Lokalisation mit Vesikelmarkern ist daher wahrscheinlich auf unerwünschte Proteinaggregation während der Fixierung oder eine unzureichende optische Auflösung zurückzuführen.

2.2.6 Charybde hat keinen Einfluß auf die Expression synaptischer Marker

Der Verlust *charybdes* bzw. seine Überexpression im Motorneuron oder im Muskel führen nicht zu gravierenden Veränderungen der Morphologie der NME. Um den Einfluß Charybdes auf die strukturelle Integrität der NME zu bewerten, wurde das Expressionsmuster und -niveau synaptischer Marker in verschiedenen genetischen Situationen immunhistologisch überprüft. Abbildung 24 zeigt jeweils Typ Ib-Boutons auf Muskel 6. Auf präsynaptischer

Seite wurde die Expression von Synaptotagmin (Littleton *et al.*, 1993; Review: Tucker and Chapman, 2002) und Bruchpilot (Wagh *et al.*, 2006; Kittel *et al.*, 2006) überprüft. Synaptotagmin ist ein integrales Protein der Vesikelmembran, das am Exo- und Endozytoseprozess beteiligt ist. Bruchpilot ist ein Protein, das aktive Zonen markiert und für die evozierte Neurotransmitterausschüttung an glutamatergen Synapsen essentiell ist. Auf postsynaptischer Seite wurde die Expression von Disks large (Dlg) und der Glutamatrezeptor-Untereinheit IIA untersucht. Dlg ist eine membranassoziierte Guanylatkinase, die PDZ-Domänen enthält und bei der strukturellen Organisation der subsynaptischen Zone eine wichtige Rolle spielt (u.a. Aggregation von Fasciclin-2 und Shaker an Synapsen; Woods and Bryant, 1991; Tejedor *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1997; Zito *et al.*, 1997; Koh *et al.*, 1999). Ionotrope Glutamatrezeptoren sind Heterotetramere, die immer die essentiellen Untereinheiten IIC, IID und IIE enthalten. Daneben enthalten sie entweder die Glutamatrezeptor-Untereinheit IIA oder IIB (Marrus *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2005).

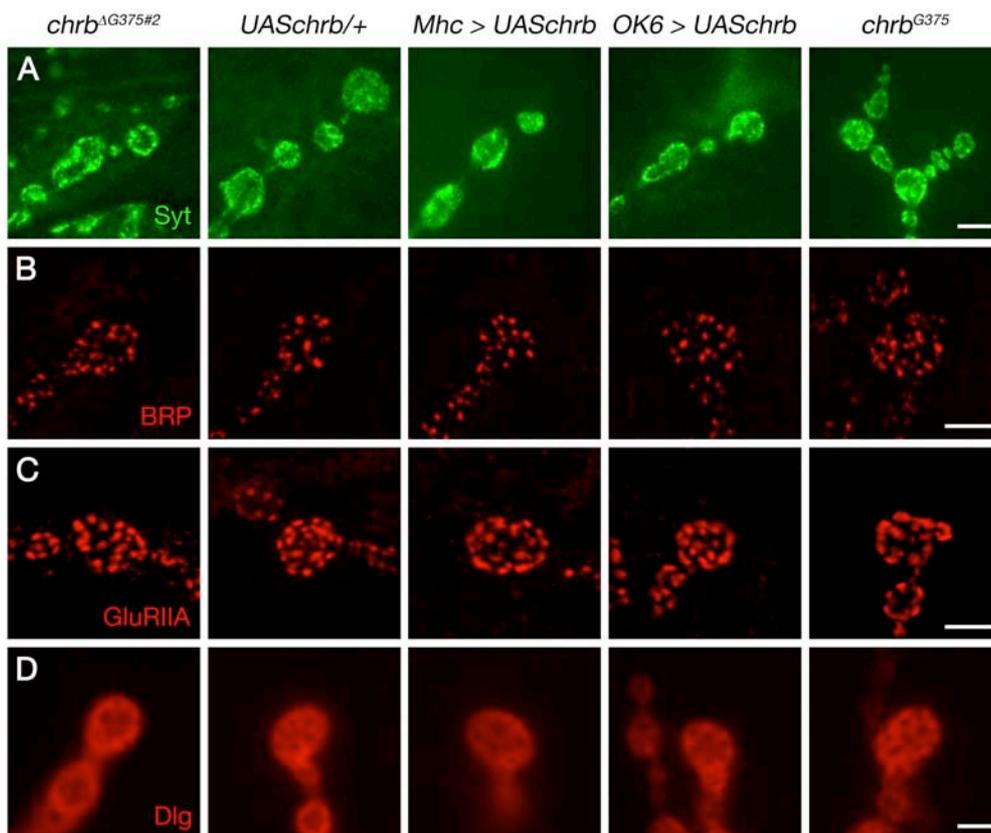


Abbildung 24: Verlust *charybdes* bzw. dessen Überexpression hat keinen Einfluß auf das Expressionsmuster und -niveau prä- und postsynaptischer Marker.

Dargestellt sind jeweils der Vesikelmarker Synaptotagmin (A), der präsynaptische Marker Bruchpilot (aktive Zone) (B) sowie als postsynaptische Marker die Glutamatrezeptor-Untereinheit IIA (C) und Disks Large (D). Spaltenweise ist jeweils die Situation für die *charybde*-Nullmutante, die *Wildtyp*-Kontrolle, die post- und präsynaptische Überexpression mittels *Mhc*- bzw. *OK6-GAL4* sowie für das *Chrb*:GFP-Fusionsprotein dargestellt. Deutlich erkennbar ist, daß keine der untersuchten Bedingungen zu einer veränderten Expression der synaptischen Markerproteine führt. Der Maßstab beträgt jeweils 3 µm.

Sowohl der Verlust *charybdes* (*chr^{bAG375#2}*) als auch seine Überexpression in Muskeln (*Mhc-GAL4*) oder Motoneuronen (*OK6-GAL4*) führt nicht zu einer Veränderung des Expressionsniveaus oder des Lokalisationsmusters der untersuchten synaptischen Marker. Gleiches gilt auch für die Tiere der Linie *chr^{bG375}*. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das prä- und postsynaptisch exprimierte Zelladhäsionsmolekül Fas2 (Schuster *et al.*, 1996a, 1996b) gemacht (nicht gezeigt). Die strukturelle Integrität der NME wird durch Veränderung des *charybde*-Expressionsniveaus somit nicht verändert.

2.2.7 Das Charybde-Expressionsniveau wird nicht erfahrungsabhängig reguliert

Die im Kapitel 2.1.3 beschriebenen Experimente zur genaueren Charakterisierung der identifizierten GFP-Fusionsproteine hatten bereits ergeben, daß das Expressionsniveau des Charybde:GFP-Fusionsproteins nicht erfahrungsabhängig reguliert wird. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde auch das endogene Expressionsniveau Charybdes an NMEs von *Wildtyp*-Tieren untersucht. Dazu wurden *Wildtyp*-Larven bei 18°C aufgezogen. Eine Teilpopulation wurde für fünf Stunden bei 29°C gehalten, um durch die gesteigerte motorische Aktivität der Tiere akute, erfahrungsabhängige Veränderungen zu induzieren (Sigrist *et al.*, 2003). Anschließend wurden larvale Filets präpariert und Charybde mittels fluoreszierender Antikörper markiert. Die Fluoreszenzintensität wurde an den fünf terminalen Boutons jeder Typ Ib-Verzweigung der NME der Muskeln 6 und 7 des Segmentes A2 bestimmt. Um individuelle Unterschiede zwischen verschiedenen Tieren zu eliminieren, wurde die Fluoreszenzintensität Charybdes jeweils mittels der ebenfalls gemessenen Immunfluoreszenz des HRP normalisiert. Insgesamt wurde zur Quantifizierung von fünf Tieren jeweils eine Endplatte herangezogen. Für Vergleichszwecke wurde das gleiche Experiment mit Tieren der Linie *chr^{bG375}* durchgeführt.

Sowohl in *Wildtyp*-Tieren als auch in Tieren der Linie *chr^{bG375}* ist keine erfahrungsabhängige Veränderung des Charybde-Expressionsniveaus an NMEs zu beobachten (Abbildung 25A; vgl. Kapitel 2.1.3). Auch hier zeigen sich die bereits in Kapitel 2.2.2 und Abbildung 16B beschriebenen muskelabhängigen Expressionsunterschiede der Linie *chr^{bG375}*, die in *Wildtyp*-Tieren nicht zu beobachten sind. In Tieren der Linie *chr^{bG375}* ist die Charybde:GFP-Konzentration in Typ Ib-Boutons auf Muskel 7 um mehr als 30% gegenüber Ib-Boutons auf Muskel 6 erhöht. In diesem Zusammenhang ist die Tatsache interessant, daß alle auf den Muskeln 6 und 7 vorhandenen Typ Ib-Verzweigungen auf ein und dasselbe Neuron zurückgehen (Lnenicka and Keshishian, 2000; Hoang and Chiba, 2001). Dies könnte

auf eine lokale Regulation der Charybde-Konzentration durch retrograde Signale hinweisen (vgl. Kapitel 2.2.2).

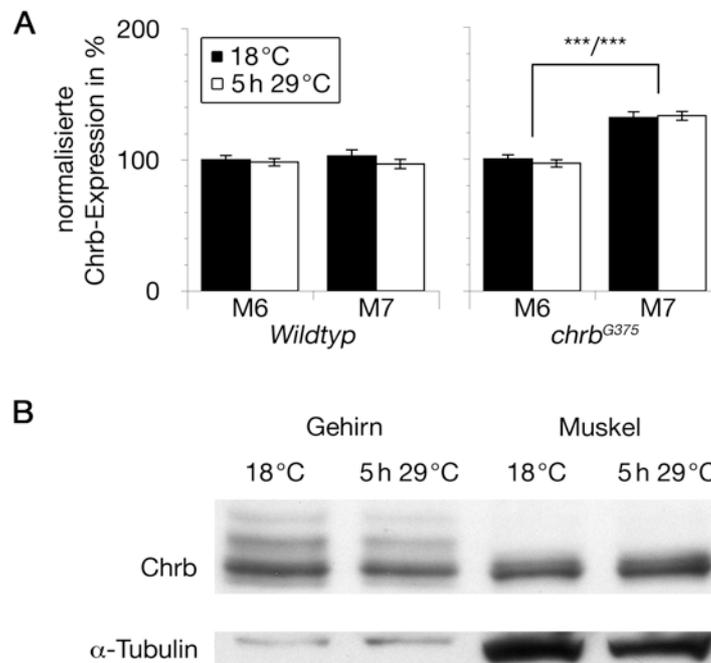


Abbildung 25: Quantitative und qualitative Analyse der Charybde-Expression in Abhängigkeit vom motorischen Aktivitätsniveau.

Bei 18°C aufgewachsene L3-Larven wurden für fünf Stunden bei 29°C gehalten. (A) Immunfluorometrische Quantifizierung des Charybde-Expressionsniveaus in terminalen Typ Ib-Boutons auf Muskel 6 und 7 des Segments A2. Die Meßwerte wurden mittels der parallel bestimmten Immunfluoreszenz des HRP's normalisiert. Alle Meßwerte wurden zu der auf Muskel 6 bei 18°C bestimmten Expression (100%) ins Verhältnis gesetzt. Die signifikanten, muskelabhängigen Expressionsunterschiede der *chrb^{G375}*-Tiere sind in *Wildtyp*-Tieren nicht zu beobachten (vgl. Abbildung 15). Das Charybde-Expressionsniveau wird weder in *chrb^{G375}* noch in *Wildtyp*-Tieren erfahrungsabhängig reguliert. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an (***) $p < 0,001$; *t*-Test). (B) Erhöhte Aktivität führt in *Wildtyp*-Tieren weder im Gehirn noch an den NMEs zu einer per Immunoblot nachweisbaren Veränderung des Charybde-Expressionsniveaus oder der anteiligen Zusammensetzung der verschiedenen Charybde-Isoformen.

Auch per Immunoblot läßt sich in *Wildtyp*-Tieren nach temperaturinduzierter Aktivitätszunahme weder im larvalen Gehirn noch an den NME eine Änderung des generellen Charybde-Expressionsniveaus oder der anteiligen Zusammensetzung der verschiedenen Charybde-Isoformen feststellen (Abbildung 25B).

2.2.8 Charybde moduliert die subsynaptische Proteinsynthese

Prozesse synaptischer Plastizität an der larvalen NME können durch Kontrolle der Umgebungstemperatur gezielt beeinflußt werden. In einem experimentellen Modell zur Induktion langfristiger verhaltensabhängiger Veränderungen entwickeln Tiere, die bei 18°C

aufgewachsen sind, deutlich kleinere Endplatten als bei 29°C aufgewachsene Tiere. Diese Unterschiede sind auf die gesteigerte motorische Aktivität der Larven bei höheren Temperaturen zurückzuführen. Das zugrundeliegende Paradigma kann auch zur akuten Steigerung der motorischen Aktivität genutzt werden. In der Folge läßt sich in L3-Larven ein Anstieg der Proteinsyntheserate, charakterisiert durch die Anzahl eIF4E-positiver Translationsaggregate im subsynaptischen Retikulum, beobachten (Abbildung 26; Sigrist *et al.*, 2000; 2003).

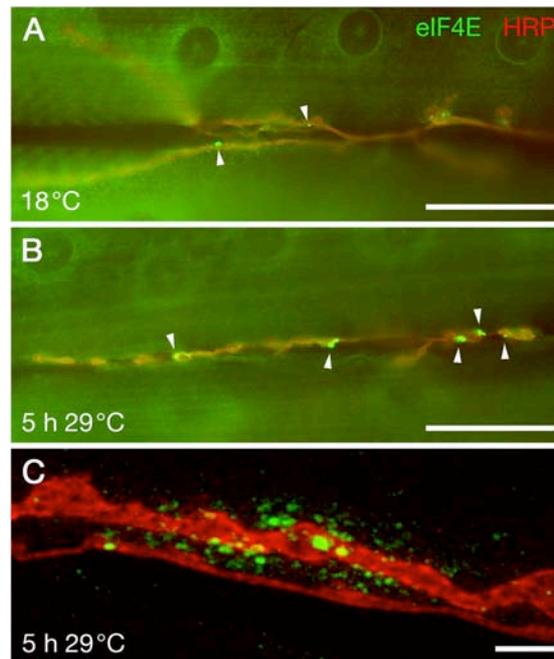


Abbildung 26: Temperaturinduzierte, erfahrungsabhängige Zunahme der subsynaptischen Translationsaktivität an neuromuskulären Endplatten.

(A, B) Durch Temperaturerhöhung (5 h 29°C) induzierte, erfahrungsabhängige Zunahme eIF4E-positiver Translationsaggregate im subsynaptischen Bereich der NMEs zweier *Wildtyp*-Larven. Die Aggregate sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet. Zur Verdeutlichung der Ausmaße der Endplatte wurden neben anti-eIF4E-Antikörpern auch anti-HRP-Antikörper eingesetzt. (C) Konfokale Projektion einer Ansammlung von eIF4E-Aggregaten im Detail. Der Maßstab entspricht 40 µm (A, B) bzw. 4 µm (C).

Diese lokale Proteinsynthese bildet vermutlich die Grundlage für langfristige physische Veränderungen (Wachstum) an der NME. Durch Experimente mit der temperatursensitiven Mutante *para^{ts1}* (Suzuki *et al.*, 1971; Loughney *et al.*, 1989) konnte gezeigt werden, daß nicht die Temperaturerhöhung sondern die motorische Aktivität der Tiere die Ursache dieses Phänomens ist (Sigrist *et al.*, 2000; 2003).

Auch wenn Charybde selbst nicht in erfahrungsabhängiger Weise reguliert wird, bleibt die Frage offen, ob Charybde als Negativregulator des TOR-Signalweges einen Einfluß auf die subsynaptische Translationsaktivität und somit letzten Endes auch auf die Größe der NME hat (vgl. Kapitel 2.2.4). Zur Überprüfung dieser Überlegung wurde in verschiedenen genetischen Situationen die Anzahl eIF4E-positiver Aggregate im subsynaptischen Bereich der NME der

Muskeln 6 und 7 in den Segmenten A2–5 bestimmt. Bei 18°C aufgewachsene Tiere wurden mit Tieren verglichen, die unmittelbar vor der Präparation für fünf Stunden bei 29°C gehalten wurden. Bereits bei 18°C sind deutliche Unterschiede in der Anzahl der subsynaptischen eIF4E-positiven Translationsaggregate zu beobachten (Abbildung 27A). Während in der *Wildtyp*-Kontrolle durchschnittlich vier Translationsaggregate pro neuromuskulärer Endplatte zu beobachten waren, hatte die Nullmutante *chrb*^{AG375#2} mehr als fünf.

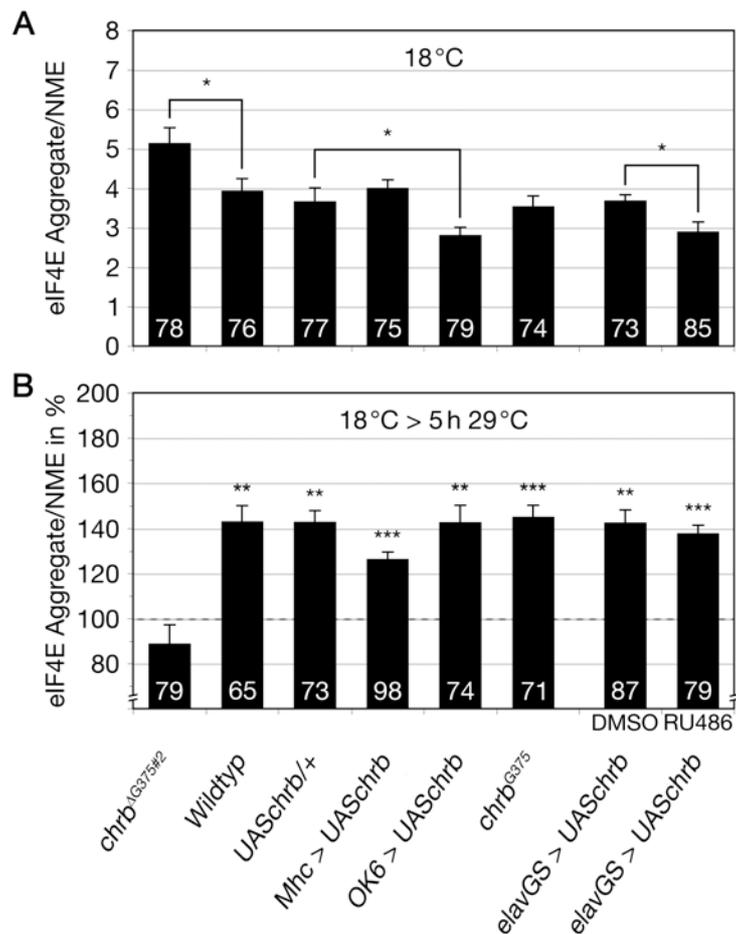


Abbildung 27: Charybde moduliert die basale postsynaptische Translationsaktivität.

(A) Verlust von *charybde* führt zu einem ca. 25%igen Anstieg der Anzahl der subsynaptischen eIF4E-Aggregate bei 18°C gegenüber der *Wildtyp*-Kontrolle. Chronische Überexpression *charybdes* in Motoneuronen mittels *OK6-GAL4* hat den gegenteiligen Effekt – die Anzahl eIF4E-positiver Aggregate sinkt auf ca. 75%. Chronische *charybde*-Überexpression im Muskel mittels *Mhc-GAL4* hat keine Auswirkungen auf die Anzahl der eIF4E-Aggregate. *chrb*^{G375}-Tiere zeigen gegenüber der *Wildtyp*-Kontrolle ebenfalls keine signifikante Veränderung. Um auszuschließen, daß die beobachteten Veränderungen auf entwicklungsbedingte Unterschiede zurückzuführen sind, wurde *charybde* auch akut mittels *elavGS-GAL4* und RU486 in Neuronen überexprimiert. Angegeben ist jeweils die durchschnittliche Anzahl eIF4E-positiver Aggregate pro neuromuskulärer Endplatte der Muskeln 6/7 der Segmente A2–5. (B) Dargestellt ist jeweils die durch Temperaturerhöhung induzierte erfahrungsabhängige Zunahme der Anzahl der eIF4E-Aggregate und deren Signifikanz gegenüber den 18°C-Werten. Die dynamische Regulation der Translationsaktivität geht nur in der Nullmutante *chrb*^{AG375#2} verloren. Das bereits bei 18°C erhöhte Translationsniveau kann durch Aktivitätssteigerung nicht weiter angehoben werden. Die Zahl ausgewerteter Hemisegmente ist jeweils angegeben. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *t*-Test).

Chronische *charybde*-Überexpression im Motorneuron mittels *OK6-GAL4* führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Translationsaggregate auf weniger als drei pro Endplatte. Die Linie *chrB^{G375}* zeigte gegenüber der *Wildtyp*-Kontrolle keine signifikante Veränderung. Gleiches gilt für die Überexpression *charybdes* mittels *Mhc-GAL4* im Muskel. *Wildtyp*-Tiere, die für fünf Stunden bei 29°C gehalten wurden, zeigen im subsynaptischen Bereich eine ca. 40%ige Zunahme der Translationsaggregate (Abbildung 27B). Diese erfahrungsabhängige Dynamik bleibt auch bei Überexpression *charybdes* im Motorneuron unverändert erhalten. Gleiches gilt für das Charybde:GFP-Fusionsprotein der Linie *chrB^{G375}*. Auch bei Überexpression im Muskel bleibt die aktivitätsbedingte Zunahme der Translationsaggregate erhalten, fällt aber etwas geringer aus (ca. 26%). Der stärkste Effekt ist in der Nullmutante *chrB^{AG375#2}* zu beobachten – die Zahl der Translationsaggregate verändert sich gegenüber den bei 18°C gehaltenen Tieren nicht signifikant (Abbildung 27B). Um potentiell akute Funktionen der *charybde*-Überexpression ermitteln zu können, wurde *charybde* mittels der induzierbaren, neuronalen Treiberlinie *elavGS-GAL4* und RU486 überexprimiert (Osterwalder *et al.*, 2001). Dabei zeigte sich sowohl bei den 18°C-Tieren, als auch bei den für fünf Stunden bei 29°C gehaltenen Tieren kein signifikanter Unterschied zu den Tieren, die *charybde* chronisch im Motorneuron überexprimieren. Als Kontrolle wurden Tiere nur mit dem Lösungsmittel DMSO gefüttert (Abbildung 27).

Präsynaptisch lokalisiertes Charybde moduliert also die basale subsynaptische Translationsaktivität unabhängig von der motorischen Aktivität der Tiere. Diese Beobachtung ist konsistent mit den in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Effekten Charybdes auf die Größe der NME. Die permanent gesteigerte Translationsaktivität der Nullmutante könnte die Vergrößerung der NME erklären, wohingegen *charybde*-Überexpression zu verringerter Translationsaktivität und in der Folge zu reduziertem NME-Wachstum führen würde.

3 DISKUSSION

3.1 Neue Proteine mit neuromuskulärer Lokalisation

3.1.1 „Protein Trap“-Linien zur Analyse synaptischer Funktion und Entwicklung

Die subzelluläre Lokalisation und Expressionsdynamik von Proteinen können wichtige Hinweise auf deren Funktion liefern. In dieser Hinsicht stellt der von Morin *et al.* (2001) entwickelte Ansatz des „protein trappings“ eine elegante Methode zur Markierung von Proteinen dar. Dabei wird ein *P*-Element (*protein trap transposon*, *PTT*) zur Insertion eines künstlichen GFP-Exons in intronische Sequenzen genutzt. In der Folge werden anstelle der endogenen Proteine GFP-Fusionsproteine exprimiert. Die von Morin *et al.* (2001) generierten „protein trap“-Linien wurden für die Suche nach neuen Proteinen mit neuromuskulärer Lokalisation genutzt. Unter den 249 Linien mit Insertionen auf Chromosom III konnten 30 Linien mit GFP-Fluoreszenz an der NME identifiziert werden. Diesen Linien konnten intronische Insertionen des künstlichen GFP-Exons in sechs Genen zugeordnet werden. Neben Proteinen mit bekannter synaptischer bzw. neuronaler Funktion konnten auch Proteine identifiziert werden, deren neuromuskuläre Lokalisation und Funktion bislang unbekannt war. Eine weitergehende Analyse der Rolle einiger dieser „neuen“ Proteine an der NME erscheint sehr vielversprechend, da deren subzelluläre Lokalisation gut zu bereits vorliegenden funktionellen Daten paßt. Darüber hinaus eignen sich einige der Fusionsproteine potentiell zur *in vivo*-Analyse entwicklungsabhängiger Prozesse in verschiedenen Substrukturen der NME. INDY:GFP könnte als Marker zur Untersuchung erfahrungsabhängiger, dynamischer Veränderungen eingesetzt werden, da sein Expressionsniveau erfahrungsabhängig reguliert wird (Kapitel 2.1.3).

Die Zuverlässigkeit der „protein trap“-Methode zur Identifizierung synaptischer Proteine zeigt sich insbesondere darin, daß die SNAP-25:GFP- und Chrb:GFP-Lokalisationsmuster mit der immunhistologisch festgestellten Verteilung der endogenen Proteine übereinstimmen (Rao *et al.*, 2001; diese Studie, Abbildung 14). Durch die zusätzliche GFP-Sequenz wird die korrekte Lokalisation dieser Fusionsproteine an der Synapse also nicht beeinträchtigt. Diese Beobachtung deckt sich mit Berichten zu anderen GFP-Fusionsproteinen, die ebenfalls mit Hilfe von „protein trap“-Strategien generiert wurden (Morin *et al.*, 2001; Marella, 2003; Clyne *et al.*, 2003; Bonin and Mann, 2004; Rasse *et al.*, 2005). Die neuromuskuläre Lokalisation von Argininkinase, Gilgamesh und ATP α ist zuvor noch nicht in *Drosophila* beschrieben worden, erscheint vor dem Hintergrund der zu diesen Proteinen bzw. deren

Homologen vorliegenden funktionellen Daten aber plausibel (vgl. Kapitel 3.1.2). Durch Immunoblots konnte zudem gezeigt werden, daß es keine Anzeichen für ein abweichendes Spleißverhalten oder eine verringerte Stabilität der Translationsprodukte gibt (Tabelle 2, Abbildung 9). Auch dieses Ergebnis deckt sich mit bisherigen Beobachtungen (Morin *et al.*, 2001; Marella, 2003; Clyne *et al.*, 2003).

Die NME stellt aufgrund der Kopplung von funktioneller und morphologischer Entwicklung ein sehr sensibles System dar, um funktionelle Veränderungen der GFP-Fusionsproteine zu detektieren. Die Effekte akkumulieren sich über den gesamten Entwicklungszeitraum der Larve, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, entsprechende Veränderungen zu detektieren. Die mit den GFP-Fusionsproteinen assoziierten neuromuskulären Phänotypen verdeutlichen deshalb ebenfalls die Zuverlässigkeit der „protein trap“-Strategie zur Identifizierung von Proteinen mit synaptischer Funktion. Die zusätzliche GFP-Sequenz führt in Argk:GFP, INDY:GFP, Gish:GFP und ATP α :GFP zu funktionellen Beeinträchtigungen, die direkt oder indirekt in verstärktem NME-Wachstum resultieren (Kapitel 2.1.3) oder wie im Fall von SNAP-25:GFP zu einer veränderten Boutonmorphologie führen (Abbildung 8B). Dies ist nicht überraschend, da durch die GFP-Insertionen funktionell wichtige Domänen in ihrer Integrität gestört werden können. Der im Vergleich zur durchschnittlichen homozygoten Letalität (17%; Morin *et al.*, 2001) hohe Anteil unter den synaptisch lokalisierten GFP-Fusionsproteinen auf Chromosom III (67%) läßt sich vielleicht mit der fundamentalen Bedeutung von Proteinen wie Argk, ATP α und SNAP-25 für zelluläre Funktionen erklären (vgl. Kapitel 3.1.2).

Die Nutzung der „protein trap“-Linien zur Identifizierung von Genen/Proteinen und zur Untersuchung von deren Funktion bietet gegenüber herkömmlichen Strategien einige Vorteile. Im Vergleich zu klassischen Mutagenesestrategien (EMS, ionisierende Strahlung) oder auch RNA-Interferenz (RNAi) besteht der Vorteil darin, daß man nicht zwingend auf das Vorhandensein detektierbarer Phänotypen angewiesen ist, da zusätzlich Informationen über die zeitliche und räumliche Verteilung des Translationsproduktes auf subzellulärer Ebene vorliegen. Dies ist auch gegenüber der „enhancer trap“-Strategie der Hauptvorteil, bei der man mit Hilfe eines Reporterkonstrukts zwar Daten zur zeitlichen und räumlichen Expression von Genen gewinnen kann, nicht jedoch zur Verteilung der endogenen Proteinprodukte (O’Kane and Gehring, 1987; Bellen *et al.*, 1989; Bier *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1989). Beim „gene trapping“ bleibt unter Umständen die Lokalisation der Proteine intakt, häufig wird aber deren Funktion zerstört, da das künstliche Exon ein Stop-Codon enthält (Lukacsovich *et al.*, 2001).

Die Nutzung der *PTT*-Insertionen hat aber auch einige Nachteile. Insgesamt wurden in unserem Labor 549 Linien mit *PTT*-Insertionen auf dem X-, dem 2. und dem 3. Chromosom auf neuromuskulär lokalisierte GFP-Fusionsproteine hin untersucht (vgl. Marella, 2003). Es konnten Insertionen in 17 verschiedenen Genen identifiziert werden, die zur Expression neuromuskulär lokalisierter Fusionsproteine führen (vgl. Tabelle 8). Dies sind relativ wenige Gene, wenn man bedenkt, wie viele verschiedene Proteine am Aufbau der NME beteiligt sind. Die Ursachen für die geringe Ausbeute liegen in verschiedenen prinzipiellen Nachteilen begründet, die generell bei der Verwendung von *P*-Elementen auftreten, aber auch in der speziell hier angewandten Strategie zur Generierung und Selektierung von GFP-Insertionslinien.

P-Elemente haben die Tendenz, sich an bestimmten, präferierten Stellen im Genom, sogenannten „hot spots“, zu integrieren, die wiederum in Abhängigkeit von der Startposition mehr oder weniger häufig betroffen sind (Spradling *et al.*, 1999; Bellen *et al.*, 2004). Darüber hinaus springen sie häufig in Regionen oberhalb des Promoters oder in die 5'-UTR von Genen (Spradling *et al.*, 1995). Diese Phänomene führen grundsätzlich zu einer hohen Redundanz unter bestimmten Insertionsereignissen. Aufgrund statistischer Effekte und der Größe des *P*-Elementes steigt die Integrationswahrscheinlichkeit mit zunehmender Intronlänge. Die durchschnittliche Länge der von Insertionen betroffenen Introns liegt bei den von Morin *et al.* (2001) generierten *PTT*-Linien bei 8 kb. Die durchschnittliche Intronlänge des *Drosophila*-Genoms liegt dagegen bei weniger als 100 Basen. Auch die hier identifizierten Integrationsstellen auf Chromosom III liegen alle in Introns, die mehrere tausend Basen lang sind.

Abgesehen von den Limitierungen, die in der Verwendung von *P*-Elementen begründet liegen, können ca. 20% aller *Drosophila*-Gene prinzipiell nicht mit Hilfe von „protein trap“-Transposons untersucht werden, da sie aus nur einem Exon bestehen (Morin, 2003), die Integration jedoch innerhalb eines Introns erfolgen muß. *PTT*-Integrationen in intronischen Sequenzen führen darüber hinaus nur dann zur Expression von GFP-Fusionsproteinen, wenn die Integration in der korrekten Orientierung und im richtigen Leseraster erfolgt und die Spleißmaschinerie das GFP-codierende Exon nicht aus dem Transkript entfernt. Der Nutzen des entstehenden GFP-Fusionsproteins hängt noch von dessen richtiger Lokalisation innerhalb der Zelle ab, da entsprechende Signalsequenzen theoretisch durch die Insertion zerstört werden könnten.

Ein weiterer Grund für die geringe Anzahl synaptisch lokalisierter GFP-Fusionsproteine ist die verhältnismäßig kleine Zahl von untersuchten *PTT*-Linien, die das Genom nur unzureichend abdecken dürfte. Durch die von Morin *et al.* (2001) angewandte Selektionsstrategie, nach GFP-Expression im Larvenstadium L1 zu suchen, können erst in späteren

Entwicklungsstadien exprimierte Proteine grundsätzlich nicht entdeckt werden. Die geringe Größe der NME in L1-Larven dürfte die Entdeckung neuromuskulär lokalisierter Proteine zusätzlich erschwert haben.

Die grundsätzlichen Vorteile des „protein trappings“ zur Identifizierung und Charakterisierung bislang unbekannter Gene und Proteine haben zu weiteren Projekten geführt, um die Anzahl der *PTT*-Insertionen zu erhöhen. Die Überwindung der prinzipiellen, mit der Verwendung von *P*-Elementen verbundenen Nachteile standen und stehen dabei im Fokus. Clyne *et al.* (2003) gelang es, durch die Konstruktion eines besonders kleinen *P*-Elementes (*WeeP*; 1,9 kb), die durchschnittliche Länge der von Insertionen betroffenen Introns auf 2,9 kb zu reduzieren. Eine weitere Strategie besteht in der Verwendung anderer transposabler Elemente wie z.B. *piggyBac* (Cary *et al.*, 1989; Handler and Harrell, 1999). Dieses Transposon nutzt eine andere, sehr einfache Zielsequenz zur Integration (TTAA) und zeigt ein weniger stark ausgeprägtes „hot spot“-Verhalten. Die präferierten Insertionsstellen überlappen zudem nicht mit denen der *P*-Elemente und liegen häufig in Introns (Horn *et al.*, 2003; Häcker *et al.*, 2003; Thibault *et al.*, 2004). Bonin *et al.* (2004) konnten bereits in einer kleinen Studie zeigen, daß sich auch *piggyBac* grundsätzlich zur Generierung von GFP-Fusionsproteinen eignet.

Das Spektrum der Werkzeuge läßt sich, ausgehend von den *PTT*-Insertionen, auch noch erweitern, indem man sie z.B. für die Generierung von Nullmutanten durch unpräzise Exzision der *P*-Elemente nutzt oder durch zielgerichtete Transposition („targeted transposition“) andere Marker, Domänen oder Exons mit Stop-Codon und folgendem Terminator einführt (Sepp and Auld, 1999). Durch Ergänzung des *PTTs* um einen Promoter zur GAL4-abhängigen Induktion von RNA-Interferenz durch Transkription des Antisense-Stranges könnte die Palette der Einsatzmöglichkeiten ebenfalls erweitert werden. Der Erfolg ließe sich leicht über die Verringerung des Expressionsniveaus des GFP-Fusionsproteins verfolgen. Mit Hilfe des FLP/FRT-Systems könnten auch Tiere generiert werden, die hinsichtlich des GFP-Fusionsproteins genetische Mosaike darstellen (Theodosiou and Xu, 1998).

3.1.2 Funktionelle Implikationen der identifizierten Proteine mit neuromuskulärer Lokalisation

Im Folgenden werden unter Berücksichtigung der subzellulären Lokalisation potentielle funktionelle Aspekte der an der NME identifizierten Proteine diskutiert.

Phosphoarginin dient, ähnlich wie Phosphokreatin in anderen Organismen, der ATP-Homeostase und dem effizienten Transport von energiereichen Phosphaten vom Ort der Entstehung zum Ort des Verbrauchs. Die im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisierte Isoform der **Argininkinase** generiert Phosphoarginin, während die zytosolische Isoform die Rückreaktion zur Bereitstellung von ATP katalysiert (Reviews: Bessman and Geiger, 1981; Bessman and Carpenter, 1985; Wallimann *et al.*, 1992). In bisherigen Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* und *Schistocerca americana* konnte per Immunoblot nicht zwischen verschiedenen Isoformen der Argininkinase unterschieden werden (Wyss *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998). Die subzelluläre Verteilung des Argk:GFP-Fusionsproteins scheint auf die Existenz verschiedener Isoformen hinzudeuten. In den Boutons der Motorneurone ist Argk:GFP ausschließlich mit Mitochondrien assoziiert. Im Muskel ist neben einer starken Anreicherung im Zellkern eine eher homogene Verteilung des GFP-Fusionsproteins zu beobachten (Abbildung 7D). Eine Immunoblot-Analyse des Argk:GFP-Fusionsproteins bestätigt die Existenz von mindestens zwei Isoformen in dritten Larven (Abbildung 9). Das Auftreten eines zweiten Argk:GFP-Fusionsproteins könnte auf ein abweichendes Spleißverhalten infolge der GFP-Insertion hindeuten. Auf jeden Fall eröffnen die verschiedenen GFP-Fusionsproteine einen Weg zur Untersuchung isoformspezifischer Expressions- und Lokalisationsmuster. Die Lokalisation der Argininkinase in Boutons der NME ist insofern nicht überraschend, da die analogen Kreatinkinasen der Vertebraten vermutlich an der Energieversorgung synaptischer Transmissionsprozesse beteiligt sind (Hemmer and Wallimann, 1993; Friedman and Roberts, 1994; Kaldis *et al.*, 1996). Die an der NME beobachtete mitochondriale Lokalisation des Argk:GFP-Fusionsproteins und das Fehlen einer zytosolischen Isoform in Motorneuronen entspricht der in Mäusen beobachteten Verteilung der Kreatinkinase (Tachikawa *et al.*, 2004), könnte aber auch bedeuten, daß das GFP-Exon in *Drosophila* in den entsprechenden Transkripten herausgespleißt wird.

Das **Chrb:GFP-Fusionsprotein** ist ausschließlich im präsynaptischen Zytosol zu beobachten. Es markiert das Lumen der Boutons sowie die Axone der Motorneurone (Abbildung 7A). Durch anti-Charybde-Antikörper konnte bestätigt werden, daß diese Verteilung der des endogenen Proteins entspricht (Abbildung 14). Charybde moduliert als Negativregulator im TOR-Signalweg die lokale subsynaptische Proteinsynthese und hat einen

Einfluß auf die Morphologie der larvalen NME. Funktionelle Aspekte Charybdes an der NME werden im Kapitel 3.2 dieser Studie erörtert.

Das **INDY**:GFP-Fusionsprotein konnte in der Umgebung der NME im subsynaptischen Bereich beobachtet werden (Abbildung 7C). Diese bislang noch nicht beschriebene Lokalisation wirft einige funktionelle Fragen auf. In Säugetieren konnte gezeigt werden, daß von Astrozyten ausgeschüttetes Citrat durch Komplexierung von Zn^{2+} die Funktion von NMDA-Rezeptoren modulieren kann (Westergaard *et al.*, 1995). Die erfahrungsabhängige Potenzierung an der NME beinhaltet u.a. auch die transiente Aktivierung präsynaptischer NMDA-Rezeptoren (Steinert *et al.*, 2007, Manuskript eingereicht). Dies würde die Möglichkeit einer retrograden Regulation synaptischer Potenzierung durch lokale Kontrolle der Citratkonzentration in der Umgebung des synaptischen Spaltes eröffnen. Darüber hinaus berichteten Rival *et al.* (2006) kürzlich, daß der in erwachsenen Fliegen für die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt verantwortliche hochaffine Glutamattransporter EAAT1 an der larvalen NME nicht exprimiert ist. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob INDY an der NME eventuell auch als Glutamatttransporter fungiert.

Die Verteilung des GFP-Fusionsproteins der Caseinkinase 1γ (**Gilgamesh**) an der NME deutet auf eine ausschließlich postsynaptische Lokalisation des Proteins hin (Abbildung 7F). Das Expressionsmuster des Gish:GFP-Fusionsproteins läßt einige Spekulationen über dessen Funktion zu. Der Wingless-Signalweg spielt bei der koordinierten Entwicklung der neuromuskulären Synapse eine entscheidende Rolle. Der Wingless-Rezeptor Frizzled2 und Wingless selbst konnten in der Umgebung von Boutons nachgewiesen werden (Packard *et al.*, 2002). Neben Frizzled2 ist für eine erfolgreiche Signaltransduktion auch der Co-Rezeptor Arrow (LRP5/6) notwendig (Schweizer and Varmus, 2003; Cong *et al.*, 2004). In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, daß Gilgamesh nach Bindung des Liganden Wingless an Arrow dessen Phosphorylierung katalysiert, was schließlich zur Sequestrierung von Axin und zur Expression von Wingless-Zielgenen führt (Davidson *et al.*, 2005). Die Verteilung von Arrow wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Lokalisation des Gish:GFP-Fusionsproteins im subsynaptischen Bereich entspricht aber in etwa der, die auch für Frizzled2 und Wingless festgestellt werden konnte (Packard *et al.*, 2002). Daher liegt die Vermutung nahe, daß Gilgamesh auch im Kontext der NME die Phosphorylierung von Arrow katalysiert und somit eine weitere Komponente eines bereits beschriebenen Signalwegs identifiziert werden konnte.

ATP α ist die katalytische Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase, die für die asymmetrische Verteilung von Na^+ - und K^+ -Ionen zwischen Zytoplasma und Zellumgebung sorgt. Das ATP α :GFP-Fusionsprotein ist entlang der Motoraxone lokalisiert, nicht jedoch an Boutons und wird vermutlich von Gliazellen (Abbildung 7B) exprimiert, die bis zur Kontaktstelle

zwischen Nerv und Muskel die Motorneurone umhüllen und nur teilweise in die NME hineinreichen (Sepp *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2006a). Diese Gliazellen sorgen mit Hilfe der Septate-Junctions, dem funktionellen Äquivalent der Tight-Junction in Vertebraten für eine effiziente Isolierung der Axone (Blut-Nerv-Schranke; Bellen *et al.*, 1998; Carlson *et al.*, 2000; Tepass *et al.*, 2001). Die Na⁺/K⁺-ATPase ist eines der essentiellen Proteine, die die strukturelle und funktionelle Integrität der Septate-Junctions aufrecht erhalten (Genova and Fehon, 2003). Alternatives Spleißen und „RNA-Editing“ sind für eine große Vielfalt von ATP α -Isoformen verantwortlich (Palladino *et al.*, 2003). Die Transkripte für das ATP α :GFP-Fusionsprotein werden nur von wenigen Geweben exprimiert. Angesichts der fundamentalen Bedeutung des Proteins kann auch von der Existenz von Transkripten ausgegangen werden, in denen das GFP-Exon herausgespleißt wird. Auch hier verdeutlicht das Vorhandensein zweier verschiedener GFP-Fusionsproteine den potentiellen Nutzen von GFP-Insertionen zur Untersuchung isoformspezifischer Expressions- und Lokalisationsmuster.

SNAP-25 ist eine der Hauptkomponenten des SNARE-Komplexes, der die Ca²⁺-abhängige Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran katalysiert (Söllner *et al.*, 1993; Reviews: Chen and Scheller, 2001; Rizo and Südhof, 2002; Jahn *et al.*, 2003). Die identifizierten Insertionen in Intron 3 bzw. 5 von *Snap25* führen beide zur Expression eines SNAP-25:GFP-Fusionsproteins, das in den Boutons der NME lokalisiert ist (Abbildung 7E). Die homozygote Letalität des SNAP-25:GFP-Fusionsproteins könnte auf den auch bei der *Snap25^{ts}*-Mutation beobachteten „poison effect“ zurückgehen, der durch die funktionelle Dominanz eines mutierten Proteins hervorgerufen wird (Rao *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang sind zwei Beobachtungen von Interesse. Die GFP-Insertionen in *Snap25* führen zu einer Veränderung der Boutonmorphologie (Satellitenboutons, Abbildung 8B). Ähnliche Phänotypen sind u. a. bei mutierten Komponenten der Endozytosemaschinerie (Estes *et al.*, 2003; Coyle *et al.*, 2004; Koh *et al.*, 2004; Marie *et al.*, 2004) und bei Überexpression des *Drosophila*-APP-Homologs APPL (Torroja *et al.*, 1999) beobachtet worden und könnten auf verstärktes Wachstum zur Kompensation synaptischer Fehlfunktion hindeuten. In einigen Larven können neben Verzweigungen mit Satellitenboutons, die SNAP-25:GFP enthalten, auch solche mit normaler Boutonmorphologie beobachtet werden, die kein SNAP-25:GFP enthalten (Abbildung 8A). Dies könnte auf eine boutonspezifische Regulation der Zusammensetzung des SNARE-Komplexes in Hinblick auf SNAP-24/SNAP-25 hinweisen, da SNAP-25 durch SNAP-24 funktionell ersetzt werden kann (Vilinsky *et al.*, 2002). Es wäre interessant zu untersuchen, ob dieses Phänomen auf die funktionelle Beeinträchtigung des SNAP-25:GFP-Fusionsproteins zurückzuführen ist oder ob es auch unter natürlichen Bedingungen eine Rolle spielt. Ein entsprechender Mechanismus könnte Möglichkeiten zur lokalen Regulation der Exozytose eröffnen.

3.2 Biochemische und funktionelle Charakterisierung Charybdes im Kontext der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte

3.2.1 Charybde ist ein zytoplasmatisch lokalisiertes, neuronales Protein

Um Vorstellungen zur Charybde-Funktion im Kontext der NME zu entwickeln, wurde zunächst dessen subzelluläre Lokalisation mit Hilfe von Antikörpern genauer untersucht. Charybde wird in *Drosophila*-Larven unter Standard-Kulturbedingungen nur in neuronalen Geweben exprimiert, u. a. auch von allen Motorneuronsubtypen (Abbildung 13, 14 und 15). Es kommt im neuronalen Soma, in Axonen und an Synapsen bzw. in Boutons der NME vor. In Übereinstimmung mit der beobachteten Lokalisation des Proteins führen nur Veränderungen des *charybde*-Expressionsniveaus im neuronalen Teil der Endplatte zu morphologischen und funktionellen Veränderungen, nicht jedoch ektopische Expression im Muskel (Abbildung 19, 20 und 27). Dieser Umstand zeigt, daß Charybde in erster Linie für neuronale Zellen funktionell relevant ist (vgl. Kapitel 3.2.2).

Die subzelluläre Verteilung des Charybde:GFP-Fusionsproteins der Linie *chrB*^{G375} entspricht der Verteilung des endogenen Proteins in *Wildtyp*-Tieren (Abbildung 14 und 15). Die zusätzliche GFP-Sequenz hat somit keine Auswirkungen auf die Lokalisation des Fusionsproteins. Per Immunoblot konnte zudem belegt werden, daß neben dem Chrb:GFP-Fusionsprotein kein endogenes Charybde durch alternatives Spleißen in *chrB*^{G375}-Tieren gebildet wird (Abbildung 17). Das beobachtete Chrb:GFP-Lokalisationsmuster repräsentiert somit das des endogenen Proteins.

Die Auswertung der Immunoblots ergab weiterhin, daß sich gewebeabhängig mindestens vier verschiedene Charybde-Isoformen detektieren lassen, deren geringfügige Massenunterschiede (wenige hundert Dalton) nur mit Hilfe hochauflösender Polyacrylamidgele dargestellt werden können (Abbildung 17). Da in *Drosophila*-Larven zudem bislang nur ein *charybde*-Transkript nachgewiesen wurde (Scuderi *et al.*, 2006), sind diese Isoformen vermutlich nicht auf alternativ gespleißte Transkripte, sondern auf niedermolekulare posttranslationelle Modifizierungen wie z. B. Phosphorylierungen zurückzuführen.

Das Chrb:GFP-Fusionsprotein zeigt gegenüber dem endogenen Protein ein deutlich erhöhtes Expressionsniveau (vgl. Kapitel 3.2.4), wird aber ähnlich modifiziert und zeigt auch die gleichen Unterschiede bei der Verteilung der Isoformen zwischen Bauchmark und NME (Abbildung 17). Dies legt den Schluß nahe, daß das Fusionsprotein weitgehend normal prozessiert wird und macht es zu einem wertvollen Werkzeug für funktionelle *in vivo*-Studien. Insbesondere die Suche nach Faktoren die zur Induktion *charybdes* führen, ließe sich mittels des Chrb:GFP-Fusionsproteins deutlich vereinfachen.

Die vesikelähnliche Verteilung in Boutons und die teilweise Co-Lokalisation des Chrb:GFP-Fusionsproteins mit synaptischen Vesikelmarkern sowie die von der Vorhersage abweichende anscheinende Molekülmasse führten zu der Vermutung, daß Charybde ein membranassoziertes Molekül sein könnte (Abbildung 21 und 17) und sein Migrationsverhalten eventuell durch Palmitoylierungen beeinflußt wird. Glykosylierungen schieden als Ursache von vornherein aus, da die Sequenz weder ein ER-Signalpeptid noch eine Transmembran-Domäne enthält.

Durch subzelluläre Fraktionierung konnte eindeutig belegt werden, daß Charybde ein zytoplasmatisches Protein ist (Abbildung 23). Verschiedene Versuche zeigten außerdem, daß Charybde keinen höhermolekularen posttranslationalen Modifikationen unterliegt, die für eine Membranassoziation notwendig wären. Das abweichende Migrationsverhalten des Proteins im Immunoblot ist auf inhärente Eigenschaften der Aminosäuresequenz zurückzuführen, da unmodifiziertes, rekombinant exprimiertes Charybde sich ganz ähnlich verhält (Abbildung 22A). Dieser Befund stimmt mit Erkenntnissen von Shoshani *et al.* (2002) überein, die für das Charybde-Homolog RTP801 auch eine von der Vorhersage abweichende, anscheinende Molekülmasse feststellen konnten, die ebenfalls auf inhärente Eigenschaften der Aminosäuresequenz zurückzuführen ist. Allein aufgrund der konservierten Aminosäuresequenz sollte sich Charybde in Polyacrylamidgelen ähnlich wie RTP801 verhalten.

3.2.2 Neuronales Charybde beeinflußt die Morphologie neuromuskulärer Endplatten und moduliert das subsynaptische Translationsniveau

Charybde und Scylla bzw. deren Orthologe wurden ursprünglich als Negativregulatoren im TOR-Signalweg charakterisiert, die durch Aktivierung des TSC1/TSC2-Komplexes die TOR-Kinase und somit Translation und Zellwachstum inhibieren. In mehreren Studien konnte demonstriert werden, daß beide Proteine prinzipiell einen gleichgerichteten Einfluß auf Proteinsynthese und Zellwachstum haben und unabhängig voneinander zu reduzierter TOR-Aktivität führen (Reiling and Hafen, 2004; Brugarolas *et al.*, 2004; Corradetti *et al.*, 2005; Sofer *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang ist die exklusive Verteilung der beiden Paraloge in Neuronen von Interesse, die hier erstmals mit Hilfe der jeweiligen GFP-Fusionsproteine gezeigt werden konnte (Linien *chr^b^{G375}* und *scy^l^{ZCL611}*; Morin *et al.*, 2001). Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit der beiden Proteine kommt Charybde:GFP nur im neuronalen Soma, in Axonen und an Synapsen bzw. Boutons vor, Scylla:GFP hingegen ist

ausschließlich in Zellkernen lokalisiert (Abbildung 13). Die exklusive Verteilung der beiden Paraloge spricht dafür, daß sie das Zellwachstum auf verschiedenen Ebenen kontrollieren. Viele Komponenten des TOR-Signalweges (PI3K, Akt, TSC1/2, TOR, S6K) können sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden (Martin *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Furuya *et al.*, 2006; Bachmann *et al.*, 2006; Clements *et al.*, 2007). Im Zellkern ist TOR als Teil des TORC1-Komplexes an der Regulation der Transkription ribosomaler RNAs und Proteine beteiligt. Im Zytoplasma reguliert TORC1 dagegen durch Phosphorylierung von 4E-BP und S6K die Proteinsynthese (Reviews: Arsham and Neufeld, 2006; Wullschleger *et al.*, 2006). Scylla und Charybde könnten also in Abhängigkeit von Streß-Faktoren das Zellwachstum durch Regulation der Ribosomenbiogenese bzw. der allgemeinen Translationsaktivität inhibieren.

Resultierend aus der regulatorischen Funktion im TOR-Signalweg konnten Reiling und Hafen (2004) eine charybdeabhängige Beeinflussung des Ommatidien-Zellvolumens beobachten. Konsistent mit diesen Erkenntnissen und der Lokalisation des endogenen Proteins läßt sich auch bei Verlust oder chronischer Überexpression von *charybde* in Motorneuronen eine leichte, aber dennoch signifikante Vergrößerung bzw. Verkleinerung der larvalen NME beobachten, die sich in einer veränderten Boutonzahl ausdrückt (Abbildung 19). In diesem Kontext ist auch interessant, daß Mutationen in *gigas* (*Drosophila*-Homolog von *TSC2/Tuberin*) zu Phänotypen führen, die den hier beschriebenen ähneln. Gigas, das u. a. auch Charybde-Signale in den den TOR-Signalweg integriert (Reiling and Hafen, 2004; Brugarolas *et al.*, 2004; Corradetti *et al.*, 2005), reguliert das Zellvolumen und die Synapsenzahl olfaktorischer Neurone (Acebes and Ferrús, 2001). Bei Funktionsverlust nimmt das Zellvolumen der Neurone zu, und es kommt zu einer Verdopplung bis Verdreifachung der Synapsenzahl im ventralen Glomerulus.

Die hier beobachteten Effekte auf die Entwicklung der NME könnten also auf eine generelle Veränderung des Translationsniveaus im präsynaptischen Motorneuron zurückzuführen sein. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung wird die molekulare Integrität der NME anscheinend nicht beeinträchtigt. Das Expressionsniveau und Lokalisationsmuster präsynaptischer Markermoleküle bleibt unverändert (Kapitel 2.2.6, Abbildung 24).

Dennoch bleibt die Frage, welche Funktion synaptisch lokalisiertes Charybde hat, da in Boutons der NME keine Proteinsynthese stattfindet. Interessanterweise steigt bei Verlust von *charybde* der Durchmesser der Boutons signifikant an (Abbildung 20). Die größeren Boutons der *charybde*-Nullmutante könnten auf eine charybdeabhängige Beeinflussung der Aktivität

des TORC2-Komplexes zurückzuführen sein. Dieser reguliert über Rho-GTPasen und PKC α die Zellmorphologie durch Steuerung der Actin-Polymerisation (Sarbassov *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2004). Aufgrund der für Boutonzahlen gemachten Beobachtungen hätte man bei *charybde*-Überexpression in Motoneuronen eine Verringerung der Boutongröße erwarten können. Daß diese keinen Einfluß auf die Größe der Boutons hat, könnte als Hinweis interpretiert werden, daß Boutons funktionelle Einheiten darstellen, deren Mindestgröße sich innerhalb einer gewissen Bandbreite bewegt, die nicht unterschritten wird. Bei eingeschränktem Wachstum wird nicht die Größe, sondern die Anzahl der funktionellen Einheiten verringert.

Die in der *charybde*-Nullmutante beobachtete Vergrößerung der Boutondurchmesser bei gleichzeitiger Vergrößerung der NME ist an sich noch bemerkenswert. Viele der bisher untersuchten Proteine, die bei der Regulation der strukturellen oder funktionellen Entwicklung der NME eine Rolle spielen, zeigen einen Phänotyp, bei dem die Boutonzahl negativ mit dem Boutondurchmesser korreliert. Dies geht häufig mit funktioneller Homeostase einher, die eine gleichbleibende, effiziente Muskeldepolarisation gewährleistet. Im Fall von *Charybde* könnten die beobachteten Unterschiede zu gering sein, um entsprechende kompensatorische Mechanismen zu initiieren.

Neben der potentiellen Veränderung des präsynaptischen Translationsniveaus dürfte auch die *charybde*-abhängige Modulation der subsynaptischen Proteinsynthese bei der Entwicklung der NME eine Rolle spielen. Sowohl chronische als auch akute präsynaptische *charybde*-Überexpression führen zu einer signifikanten Reduktion der subsynaptischen Translationsaktivität (Abbildung 27A). Unabhängig davon bleibt die dynamische, erfahrungsabhängige Regulation des Translationsniveaus erhalten, verringert sich aber proportional (Abbildung 27B). *Charybde* ist somit nicht an der Regulation von Prozessen erfahrungsabhängiger synaptischer Plastizität beteiligt, sondern moduliert nur das basale Translationsniveau (vgl. auch Abbildung 25). Konsistent damit lassen sich auch keine Veränderungen des Expressionsniveaus oder Lokalisationsmusters postsynaptischer Markermoleküle feststellen (Kapitel 2.2.6, Abbildung 24). Der in der *charybde*-Nullmutante beobachtete Verlust der erfahrungsabhängigen Dynamik bei gleichzeitig signifikant gesteigerter basaler Translationsaktivität (Abbildung 27) deutet darauf hin, daß durch weiteres Wachstum der ohnehin größeren NME die Depolarisationseffizienz nicht weiter zunehmen würde (vgl. Kapitel 3.2.3).

Die modulatorische Funktion *Charybdes* in Hinblick auf das subsynaptische Translationsniveau würde gut mit einem Modell korrespondieren, bei dem die basale Translationskompetenz durch einen global wirkenden humoralen Faktor vermittelt wird (z. B. Insulin) und

durch lokal wirkende Mechanismen angepaßt wird. Ein solcher Mechanismus würde in Streßsituationen eine zellspezifische Anpassung des Translationsniveaus an die Umgebungsbedingungen ermöglichen und die für synaptische Plastizität notwendige akute Induktion der lokalen Translation erhalten.

Die hier beobachtete nicht-zellautonome Beeinflussung der synaptischen Proteinsynthese demonstriert zudem die enge Koordination zwischen prä- und postsynaptischem Wachstum. Da Charybde ein zytoplasmatisches Protein des präsynaptischen Motorneurons ist, müssen die beobachteten Effekte auf die subsynaptische Translationsaktivität indirekt vermittelt werden. Prinzipiell sind zwei transsynaptisch wirkende Szenarien denkbar: (1) Charybde könnte die physiologischen Eigenschaften der Synapsen verändern und über die Transmitterausschüttung die subsynaptische Proteinsynthese modulieren (vgl. Sigrist *et al.*, 2000), oder (2) Charybde könnte die Ausschüttung eines sekretierten Wachstumsfaktors regulieren. Vorläufige elektrophysiologische Untersuchungen lieferten bisher keine soliden Anhaltspunkte für die erstgenannte Variante (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswerter Weise läßt sich auch im Elektroantennogramm von *gigas*-Mutanten keine Veränderung der synaptischen Transmission feststellen (Acebes and Ferrús, 2001).

Anzumerken ist noch, daß Charybdes Einfluß auf die Morphologie der NME und die subsynaptische Proteinsynthese relativ moderat ist und eher modulatorischen Charakter hat. In *Wildtyp*-Tieren lassen sich allein durch Variation der Umgebungstemperatur (Haltung bei 29°C) deutlich größere Endplatten generieren (Sigrist *et al.*, 2003), deren Entwicklung vermutlich auf die chronisch erhöhte motorische Aktivität der Tiere zurückzuführen ist (Sigrist *et al.*, 2003). Auch die Zunahme der basalen Translationsaktivität in der *charybde*-Nullmutante stellt bei weitem nicht die Kapazitätsgrenze des Systems dar. Durch Manipulationen an eIF4E; PABP und dem eIF4E-Translationsrepressor Pumilio konnte gezeigt werden, daß sich die Zahl der subsynaptischen Translationsaggregate auf mehr als das Dreifache steigern läßt und mit einem Anstieg der GluRIIA- und einem Abfall der Fas2-Immunreaktivität einhergeht (Sigrist *et al.*, 2000; Menon *et al.*, 2004). Die vergleichsweise geringe Veränderung des Translationsniveaus durch Charybde reicht wahrscheinlich nicht aus, um entsprechend gravierende Veränderungen zu initiieren (vgl. Abbildung 27 und 24).

Der modulatorische Einfluß Charybdes auf die Morphologie und die subsynaptische Proteinsynthese ist zudem ein spezifisch neuronaler Effekt. Ektopische Überexpression *charybdes* im Muskel hat im Gegensatz zu neuronaler Überexpression weder einen Einfluß auf die Größe der Muskelzellen oder der NME noch auf das basale subsynaptische Translationsniveau (Abbildung 19 und 27A). Allein der Umfang der erfahrungsabhängigen Zunahme der subsynaptischen Translation fällt etwas geringer aus (Abbildung 27B). Dies

könnte darauf hindeuten, daß der inhibitorische Effekt Charybdes auf die Translationsaktivität kompensiert wird, und das System bei dynamischen Anpassungen etwas träger reagiert. Die Beobachtungen lassen vermuten, daß Charybde im Muskel keine endogene Funktion hat. Im Gegensatz zur neuronalen Überexpression wird Charybde bei ektopischer Überexpression im Muskel anscheinend auch relativ schnell abgebaut, da es immunhistologisch kaum nachweisbar ist (Abbildung 14). Auch Ellisen *et al.* (2002) haben in Zellkultorexperimenten mit Osteosarcom-Zellen (U2OS) beobachtet, daß das Scylla-Ortholog REDD1/RTP801 unter Standard-Kulturbedingungen nur eine geringe Halbwertszeit hat und anscheinend rasch durch das Proteasom abgebaut wird. Charybde unterliegt offenbar einer starken zelltypabhängigen Regulation des Expressionsniveaus, und seine spezifische endogene Funktion als Wachstumsregulator scheint auf neuronale Gewebe beschränkt zu sein.

3.2.3 Charybdeabhängige morphologische Veränderungen korrelieren mit larvalem Laufverhalten

Die charybdeabhängigen morphologischen Veränderungen der NME korrelieren mit einer Verhaltensänderung der Tiere. Bei Verlust *charybdes* steigt die motorischen Aktivität, wohingegen chronische, panneuronale *charybde*-Überexpression zu einer Reduktion der Laufleistung führt (Abbildung 18). Auch in diesem Fall zeigt der Phänotyp der *charybde*-Nullmutante wieder Parallelen zu den bereits erwähnten *gigas*-Mutanten. Gigas-Funktionsverlust in olfaktorischen Neuronen führt nicht nur zu einer Erhöhung der Synapsenzahl im ventralen Glomerulus sondern auch zu einer verbesserten sensorischen Wahrnehmung (Acebes and Ferrús, 2001).

Diese Beobachtung unterstützt einen Erklärungsansatz, wonach die Laufleistungsunterschiede auf die entwicklungsabhängigen morphologischen Veränderungen der NME bei Verlust oder Überexpression von *charybde* zurückzuführen sein könnten (vgl. Abbildung 19). Bei gleichbleibender Synapsendichte und Transmission würde dies theoretisch zu einer Veränderung der Effizienz der Muskeldepolarisation führen. Auch der Umstand, daß akute neuronale Überexpression nicht zu einer Verringerung der motorischen Aktivität der Tiere führt, deutet darauf hin, daß die Laufleistung mit der entwicklungsabhängig veränderten Morphologie in Zusammenhang stehen könnte. Akute neuronale Überexpression *charybdes* führt zwar zu einer Verringerung der Proteinsynthese, hätte aber keine unmittelbare Auswirkung auf die Anzahl der Synapsen oder die Morphologie der NME.

Variierende Laufleistungen können aber auch durch Veränderungen in den erregungsmustergenerierenden neuronalen Schaltkreisen des Bauchmarks hervorgerufen

werden (Fox *et al.*, 2006; Marder and Calabrese, 1996). Eine genauere Bewegungsmusteranalyse könnte Hinweise darauf liefern, ob dieses System durch Charybde beeinflusst wird oder ob die beobachteten Laufleistungsunterschiede allein auf Effekte an der NME bzw. in den Motorneuronen zurückzuführen sind.

3.2.4 Charybde:GFP ist ein potentieller Hypomorph

Das Expressionsniveau des Charybde:GFP-Fusionsproteins der Linie *chrB^{G375}* ist gegenüber dem des endogenen Proteins in *Wildtyp*-Tieren deutlich gesteigert (Abbildung 14, 15 und 17). Drei Ursachen kommen für die gesteigerte Expression des Charybde:GFP-Fusionsproteins in Frage: (1) die zusätzliche GFP-Sequenz könnte die Stabilität des Proteins erhöhen, (2) die Insertion des *PTT-P*-Elementes könnte zum Verlust von regulatorischen Elementen im betroffenen Intron und somit zu verstärkter *charybde*-Transkription führen, und (3) eine potentielle, funktionelle Beeinträchtigung des Fusionsproteins könnte zu einer kompensatorischen Expressionssteigerung führen.

Die beiden erstgenannten Erklärungsansätze sollten theoretisch zu Phänotypen führen, wie sie bei neuronaler Überexpression des endogenen Proteins auftreten. Eben diese Auswirkungen auf die Morphologie der NME und die subsynaptische Translationsaktivität können in Tieren der Linie *chrB^{G375}* jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 19 und 27), obwohl das Expressionsniveau des Chrb:GFP-Fusionsproteins das der GAL4-abhängigen neuronalen Überexpression deutlich übertrifft (Abbildung 17). Auch hinsichtlich der Laufaktivität unterscheiden sich die *chrB^{G375}*-Tiere nicht von denen der *Wildtyp*-Kontrolle (Abbildung 18). Einzig die Boutondurchmesser dieser Tiere sind leicht erhöht, allerdings weniger stark als die der *charybde*-Nullmutante (Abbildung 20). Das Fehlen der Überexpressions-Phänotypen legt den Schluß nahe, daß die gesteigerte Expression des Chrb:GFP-Fusionsproteins kompensatorischen Charakter haben und das Protein einen Hypomorph darstellen könnte. Hinsichtlich des Boutondurchmessers wäre diese funktionelle Kompensation jedoch nur teilweise wirksam. Die Existenz eines solchen Rückkopplungsmechanismus' zur Regulation des Expressionsniveaus würde auf die Wichtigkeit Charybdes für die neuronale Entwicklung hindeuten.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Organismen

Falls nicht gesondert angegeben, wurden alle verwendeten Laborchemikalien über die Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

4.1.1 Bakterienmedien

- LB Medium (0,5 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt in ddH₂O, pH7,0)
- LB Agar (0,5 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1,5 % Agar in ddH₂O, pH7,0)

Bezugsquelle Agar: Life Technologies GIBCO, Eggenstein

Das Medium bzw. der Agar wurde den Resistenzen der bakteriellen Plasmide entsprechend auf 50–100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Tetracyclin oder 25 µg/ml Kanamycin eingestellt. Die Protein-Expression wurde durch Zugabe von IPTG (peqlab, Erlangen) induziert.

4.1.2 Fliegenmedien

Für alle Experimente wurde Standard-Fliegenfutter verwendet, das sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzt:

80 g Fadenagar, 180 g Trockenhefe, 100 g Sojamehl, 800 g Maismehl, 220 g Rübensirup, 800 g Malzextrakt, 62,5 ml Propionsäure, 10–12 l Wasser

4.1.3 Molekularbiologie

- DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

- Proteinase K (Qiagen, Hilden)
- Restriktionsendonukleasen (Roche und New England Biolabs)
- T4 DNA-Ligase (ABgene, GB)
- *Taq* DNA-Polymerase (ABgene, GB)
- Vent DNA-Polymerase (New England Biolabs)
- *Pwo* DNA-Polymerase (peqlab, Erlagen)
- Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim)
- 1 kb-DNA-Leiter (GIBCO, Eggenstein)
- 1x TBE (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA)
- 1x TAE (40 mM Tris/HCl pH 8,5, 0,1 % CH₃-COOH, 2 mM EDTA)

DNA-Extraktionspuffer:

25 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8,2, 1 mM EDTA, 200 µg/ml Proteinase K

4.1.4 Protein-Biochemie

Alle für SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot verwendeten Chemikalien und Puffer entsprechen den gängigen Standard-Protokollen (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979; Coligan *et al.*, 1995–2003). Es wurden Gele in variierenden Konzentrationen eingesetzt (zwischen 8% und 12%). Für alle Western-Blots wurden Nitrocellulose-Membranen (Amersham) verwendet. Antikörper-Inkubationen wurden generell in 5% Milch in PBS durchgeführt. Zur Antigendetektion wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper und das „Enhanced Chemiluminiscence“ (ECL)-System von Amersham verwendet.

Probenpuffer für SDS-PAGE (4x Lämmli-Puffer):

40% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) 2-Mercaptoethanol, 8% (w/v) SDS, 240 mM Tris pH 6,8

PBS („phosphate buffered saline“):

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,9 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, pH 7,4

- BCA-Protein-Assay (Pierce; Rockford, IL, USA)
- SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard Marker (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)
- Proteaseinhibitoren: Aprotinin, Benzamidin und PMSF (Sigma, Steinheim)

- Complete Inhibitorcocktail (Roche, Mannheim)

4.1.4.1 Affinitätsreinigung des GST:Chrb-Fusionsproteins und des anti-Charybde-Antikörpers

- Glutathion Sepharose 4B (Amersham, Schweden)
- Thrombin (Amersham, Schweden)
- AminoLink-Kit (Pierce; Rockford, IL, USA)
- Slide-a-Lyser Dialyse-Kassetten (Pierce; Rockford, IL, USA)

Lysepuffer: 1x PBS, 25 mM Tris pH7,4, 1 % Triton X-100,
1x Aprotinin, 1x Benzamidin, 1x Complete/EDTA, 1x PMSF

Waschpuffer 1: 1x PBS, 1 M NaCl, 1 % Triton X-100

Waschpuffer 2: 1x PBS, 0,05 % Triton X-100

DnaK-Elutionspuffer:

150 mM NaCl, 25 mM Tris pH7,4, 5 mM ATP, 5 mM MgSO₄,
0,25 % Triton X-100, 100 µg/ml denaturierte, lösliche *E. coli*-Proteine

Dialyse-Puffer für GST:Chrb-Fusionsprotein: 1x PBS, 10 % Glycerin

Kolloidal-Coomassie Färbe-Lösung ("Blue Silver", Candiano *et al.*, 2004):

10 % (v/v) H₃PO₄, 10 % (w/v) (NH₄)₂SO₄, 20 % (v/v) Methanol,
0,12 % (w/v) Coomassie G-250

Dialyse-Puffer für anti-Charybde-Antikörper: 1x PBS, 20 % Glycerin

4.1.4.2 Puffer für Proteinextraktionen

Homogenisierungspuffer für GFP-Fusionsproteine:

150 mM NaCl, 25 mM Tris pH7,4, 1 % Triton X-100,
1x Aprotinin, 1x Benzamidin, 1x Complete/EDTA, 1x PMSF

Homogenisierungspuffer zur Analyse Charybdes:

100 mM NaCl, 25 mM Tris pH7,4, 50 mM NaF,

1x Aprotinin, 1x Benzamidin, 1x Complete/EDTA, 1x PMSF

4.1.4.3 Puffer für Deacylierung, Deglykosylierung und Gradientenzentrifugation

Suspensionspuffer Deacylierung:

140 mM NaCl, 10 mM Tris pH7,4,

1x Aprotinin, 1x Benzamidin, 1x Complete, 1x PMSF

Denaturierungspuffer Deglykosylierung:

1x PBS, 0,5 % SDS, 1 % 2-Mercaptoethanol, 25 mM EDTA,

1x Aprotinin, 1x Benzamidin, 1x Complete, 1x PMSF

Homogenisierungspuffer Gradientenzentrifugation:

150 mM NaCl, 10 mM Hepes pH7,3, 1 mM EGTA, 0,1 mM MgCl₂,

1x Aprotinin, 1x Benzamidin, 1x Complete/EDTA, 1x PMSF

- PNGase F (New England Biolabs)

4.1.5 Immunhistologie in L3-Larven

calciumfreier HL3-Präparations-Puffer (Stewart *et al.*, 1994):

70 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 5 mM Trehalose,

115 mM Sucrose, 5 mM HEPES pH7,2

Fixativ: • 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS oder

- Methanol (−20°C)

Antikörper-Inkubationspuffer (PBT):

0,05–0,3 % Triton X-100 und 5 % NGS (normal goat serum) in PBS

4.1.6 Antikörper

Spezifität	Spezies (Klon)	Anwendung ¹	Quelle
BRP	Maus mAB NC82	1:200 IHC	Dr. E. Buchner / Würzburg
Charybde	Kaninchen #7 394/#7 395	1:1 000/2 000 IHC/WB	Biogenes / Berlin
CSP	Maus mAB 49	1:10/100 IHC/WB	Dr. E. Buchner / Würzburg
DGluRIIA	Maus mAB 8B4D2	1:250 IHC	DSHB / Iowa
Dlg	Maus mAB 4F3	1:100 IHC	DSHB / Iowa
eIF4E	Kaninchen	1:200 IHC	Dr. P. Lasko / Montreal
Fasciclin-2	Maus mAB 34B3	1:50 WB	DSHB / Iowa
	Maus mAB 1D4	1:10 IHC	DSHB / Iowa
GFP	Kaninchen TP401	1:5 000 WB	Torrey Pines
	Kaninchen A-11 122	1:2 000 IHC	Molecular Probes
GST	Kaninchen	1:1 000 WB	Amersham
HRP-Cy3/FITC	Ziege	1:1 000 IHC	Jackson / Dianova
Synaptotagmin	Kaninchen	1:250/2 000 IHC/WB	
Synapsin	Maus mAB 3C11	1:10 IHC	Dr. E. Buchner / Würzburg
α -Tubulin	Maus mAB DM1A	1:1 000 WB	Amersham

Tabelle 3: Verwendete Erstantikörper.

¹ IHC – Immunhistochemie; WB – Western-Blot.

Spezifität	Konjugation	Anwendung ¹	Hersteller
Kaninchen	Cy3/FITC	1:200 IHC	Jackson / Dianova
Maus	Cy3/FITC	1:100 IHC	Jackson / Dianova
Kaninchen	HRP	1:5 000 WB	Amersham
Maus	HRP	1:2 500 WB	Amersham

Tabelle 4: Verwendete Zweitantikörper.

¹ IHC – Immunhistochemie; WB – Western-Blot.

4.1.7 Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide wurden als PCR-Primer, zur Sequenzierung oder für Klonierungszwecke verwendet. Alle Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Primer	Sequenz (5'–3')	Verwendung
Plac2	AGG CTG CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC	
Pwht2	GCG CGG AAC TAA CGA CAG TCG CTC CAA	
Plac3	TCG TCC GCA CAC AAC CTT TCC TCT CAA C	inverse PCR zur Analyse der <i>PTT</i> -Insertionsstellen
Pwht3	TGT GTT GCG GAG AGC GGG TGG GAG AC	
Pry1	CCT TAG CAT GTC CGT GGG GTT TGA AT	
Pry4	CAA TCA TAT CGC TGT CTC ACT CA	
Sp1	ACA CAA CCT TTC CTC TCA ACA A	Sequenzierung der inversen PCR-Produkte
Spep1	GAC ACT CAG AAT ACT ATT C	
char F1	CAG TTC CAG TTT TTC ATC GTC CTC C	Analyse der Exzision des <i>PTT-P</i> -Elementes der Linie <i>chrB</i> ^{G375} und Sequenzierung der PCR-Produkte
char B5	GCT CCT GCC TCT TCA CAA TAG TTA CC	
char-seq_F	GCC TTG TAA TAA AGT GTG TGG TCG	
char-seq_B	GTT TTC CAT CTC GCT CTG GC	
PM001-13	ATT GGT ACG TCG ACG TTA GAA CGC GGC TAC A	Umklonierung der <i>chrB</i> -cDNA aus pOT2 in pGEX-4T-3
EcoRI ¹	ACC <u>CGA ATT CCA</u> TGA AGA TGG AAG TGC TCT CA (ACG GCG GCT CTA TGA AGA TGG AAG TGC TCT CA)	

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.

¹ Die *EcoRI*-Schnittstelle ist unterstrichen; die abweichende Original-Sequenz ist in Klammern angegeben.

4.1.8 Bakterienstämme und Vektoren

Bakterienstämme:

Escherichia coli XL1-Blue MRF⁺ (Stratagene; für Klonierungszwecke)

Escherichia coli BL21 pREP4 (Dr. O. Grub, Heidelberg; Expression des GST:Chrb-Fusionsproteins)

Vektoren:

pGEX-4T-3 (Amersham; zur Generierung des GST:Chrb-Konstrukts)

4.1.9 Fliegen-Linien

Genotyp	Quelle
<i>Canton S (Wildtyp)</i>	Dr. T. Tully / Cold Spring Harbor
<i>Sco/CyO, Act-GFP</i>	
<i>Dr/TM3, Sb, Ser</i>	
<i>Dr/TM3, Ser, Kr-GFP</i>	
<i>Sco/CyO; Δ2-3, Sb/TM2</i>	Dr. Bernard Moussian / Tübingen
<i>chr^b^{G375}</i>	Dr. W. Chia / London
<i>chr^b^{ΔG375#2}</i>	M. Knirr
<i>UAS-chrb(56) (Chromosom II)</i>	Dr. E. Hafen / Zürich
<i>OK6-GAL4 (Chromosom II)</i>	Dr. C. J. O’Kane / Cambridge
<i>elav^{C155}-GAL4 (Chromosom X)</i>	Dr. C. S. Goodman / Berkeley
<i>Sp/CyO; elavGS³¹¹-GAL4 (Chromosom III)</i>	Dr. H. Keshishian / New Haven
<i>MHC-82-GAL4 (Chromosom III)</i>	Dr. C. S. Goodman / Berkeley

Tabelle 6: Verwendete Fliegen-Linien.

Die für die Suche nach neuromuskulär lokalisierten Proteinen verwendeten Fliegenlinien mit *PTT*-Insertionen (Kapitel 2.1) sind bis auf die Linie *chr^b^{G375}* nicht in Tabelle 6 aufgeführt. Alle Linien mit *PTT*-Insertionen stammen von Dr. William Chia (London) und sind z.T. öffentlich verfügbar (<http://flytrap.med.yale.edu>). Alle Fliegenlinien die neuromuskulär lokalisierte GFP-Fusionsproteine exprimieren sind in Kapitel 2.1.2, Tabelle 1 aufgeführt.

4.2 Methoden und Protokolle

4.2.1 Molekularbiologie

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle molekularbiologischen Arbeiten, wie die Bakterienkultivierung, die Reinigung von Plasmid-DNA aus bakteriellen Kulturen, die Analyse und Separation von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,8–1,2%), die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen oder PCR-Reaktionen, die Klonierung von DNA-Fragmenten (Restriktion, Ligation) sowie die Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmiden nach Standard-Methoden (Sambrook and Russell, 2001) oder entsprechend den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Protokollen durchgeführt.

4.2.1.1 Inverse PCR zur Identifizierung von *PTT*-Integrationsstellen

Zur Identifizierung der Insertionsstellen der *PTT-P*-Elemente wurde die im Rahmen des *Drosophila*-Genom-Projektes entwickelte inverse PCR-Methode (Huang *et al.*, 2000; siehe auch: <http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>) adaptiert. Durch diese Methode wurden die flankierenden genomischen Sequenzen des *PTT-P*-Elementes amplifiziert und anschließend sequenziert.

Gewinnung genomischer DNA aus erwachsenen Fliegen

Von jeder der Linien mit *PTT-P*-Element-Insertionen wurden ca. 80 erwachsene Fliegen gesammelt, in LN₂ schockgefroren und unter Trockeneis-Kühlung in einem Mörser zermahlen. Aus dem Homogenat wurde mittels des DNeasy-Tissue-Kits von Qiagen genomische DNA isoliert. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde dazu angewandt.

Restriktions-Verdaus

Ungefähr 5 μ l (ca. 2 μ g) genomische DNA wurden jeweils mit 10 U *Msp*I, *Sau*3AI oder *Hin*PI (Roche) im entsprechenden Puffer für drei Stunden bei 37°C verdaut. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug jeweils 25 μ l. Anschließend wurden die Enzyme durch eine 40minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. 10 μ l der verdauten DNA wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel analysiert, um die Effizienz des Verdaus zu testen.

Ligation

5 μ l der verdauten DNA wurden mittels 0,1 μ l T4-DNA-Ligase (ABgene) für 2–3 h bei Raumtemperatur ligiert. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 200 μ l. Der vom Hersteller empfohlene Ligase-Puffer wurde verwendet. Anschließend wurde die ligierte, zirkularisierte DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH5,2 und 500 μ l Ethanol für 20 min bei –20°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde für 15 min bei 4°C mit 14000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, die DNA erneut abzentrifugiert und das Pellet anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Pellet in 50 μ l 10 mM Tris pH8,0 aufgenommen.

Inverse PCR

Die ligierte DNA wurde für eine inverse PCR-Reaktion verwendet, in der nur die Fragmente amplifiziert wurden, die Teile des *PTT-P*-Elementes enthielten (Primerbindungsstellen). Die Reaktionen (50 μ l Gesamtvolumen) setzten sich folgendermaßen zusammen: 10 μ g

genomische DNA, 1x ABgene-PCR-Puffer, 80 μM dNTPs, 1,5 μM MgCl_2 , jeweils 0,4 μM Primer 1 und 2 (siehe Kapitel 4.1.7), 1 U *Taq*-Polymerase (ABgene). Die PCR-Reaktion wurde nach dem in Kapitel 4.2.1.4 angegebenen Protokoll durchgeführt. Anschließend wurden 5 μl der PCR-Reaktion auf einem 1%igen Agarose-Gel analysiert. Falls nur eine Bande festgestellt werden konnte, wurde die PCR-Reaktion mittels des QIAquick PCR-Purification-Kits (Qiagen) gereinigt. Falls mehrere PCR-Produkte auf dem Gel identifiziert werden konnten (Mehrfach-Insertionen), wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAEX[®] II Gel-Extraction-Kit (Qiagen) gereinigt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in 10 mM Tris pH8,0 aufgenommen.

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der Primer Sp1 (5') und Spep1 (3'; vgl. Tabelle 5) sequenziert. Um die *PTT*-Insertionsstellen und die betroffenen Gene zu bestimmen, wurden die Sequenzen mittels BLAST (Altschul *et al.*, 1990) gegen das *Drosophila*-Genom analysiert.

4.2.1.2 Genotypisierung der *charybde*-Nullmutante

Die durch Mobilisierung des *PTT-P*-Elementes generierten Fliegen-Linien (vgl. Kapitel 4.2.3.2) wurden mittels genomischer PCR und anschließender Sequenzierung auf unpräzise Exzisionen hin untersucht. Aus jeweils einer homozygoten Fliege, die das *P*-Element verloren hatte, wurde genomische DNA isoliert. Dazu wurde die betäubte Fliege in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit einer Pipettenspitze, die 50 μl DNA-Extraktionspuffer (vgl. Kapitel 4.1.3) enthielt, für ca. 15 s zerkleinert. Das Homogenat wurde anschließend mit den 50 μl DNA-Extraktionspuffer vermischt und für 20–30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Proteinase K durch Erhitzen auf 95°C inaktiviert (1–2 min). Das Homogenat wurde kurz abzentrifugiert und 1–2 μl des Überstandes für die nachfolgende PCR verwendet.

Mit Hilfe des „Expand Long PCR Template Systems“ (Roche) und entsprechenden Oligonukleotid-Primern wurde der genomische Bereich des *charybde*-Gens amplifiziert. Das „Expand Long PCR Template System“ kann durch eine spezielle Polymerase-Mischung (*Taq*- und *Tgo*-Polymerase) genomische DNA-Fragmente von bis zu 20 kb Länge amplifizieren. Die verwendeten Oligonukleotide binden im 5'-UTR des ersten Exons (char F1) bzw. im 3'-UTR des vierten Exons (char B5; vgl. Tabelle 5). Die Amplifikate wurden auf einem 0,8%igem Agarose-Gel analysiert. Proben, die eine von der *Wildtyp*-Kontrolle abweichende Länge aufwiesen, wurden anschließend sequenziert (Oligonukleotide: char-seq_F und char-seq_B; vgl. Tabelle 5).

Unter den 130 analysierten Linien konnten sieben mit unpräzisen Exzisionen identifiziert werden. In der Linie *chr^b^{AG375#121}* war nur ein kleinerer Bereich der intronischen Sequenz verloren gegangen. In der Linie *chr^b^{AG375#129}* ließen sich die Grenzen der Exzision mit den verwendeten Oligonukleotiden nicht bestimmen. Diese Linie scheint neben *charybde* auch noch weitere Gene verloren zu haben. Die Individuen werden nur vereinzelt homozygot, sind unfruchtbar und sterben früh. Die restlichen fünf Linien (#2, #58, #109, #125, #126) sind alle auf ein und dasselbe Exzisionsereignis zurückzuführen, welches durch den Verlust eines Großteils des ersten Exons gekennzeichnet ist. Der codierende Bereich inklusive des Start-Codons fehlt (Abbildung 11A).

4.2.1.3 Klonierung des *GST:chr^b*-Konstrukts

Der bakterielle Expressionsvektor pGEX-4T-3 (Amersham) und der *charybde*-cDNA-Klon LD22381 (*Drosophila* Genomics Resource Center, Bloomington, IN, USA) wurden verwendet, um ein *GST:chr^b*-Konstrukt zu generieren. Zur Klonierung wurden die *Eco*RI- und *Xho*I-Schnittstellen der Vektor-Klonierungsregion genutzt. Die *charybde*-cDNA wurde mittels PCR amplifiziert, um im 5'-Bereich vor dem Start-Codon durch einen mutierten Oligonukleotid-Primer eine *Eco*RI-Schnittstelle einzuführen. Die *charybde*-cDNA enthielt im 3'-Bereich nach dem Stop-Codon ohnehin eine *Xho*I-Schnittstelle. Um die Wahrscheinlichkeit von Mutationen während der PCR zu reduzieren, wurde die Proofreading-Polymerase Vent verwendet. Die amplifizierte *charybde*-cDNA und der pGEX-4T-3-Vektor wurden mit *Eco*RI und *Xho*I geschnitten, gereinigt und anschließend miteinander ligiert. Im resultierenden Konstrukt ist die 5' liegende *GST*-Sequenz über eine Linker-Region (Thrombin-Schnittstelle) mit der 3'-liegenden *charybde*-Sequenz verbunden. Bei der zur Kontrolle durchgeführten Sequenzierung des Konstruktes konnten keine Abweichungen in der *charybde*-Sequenz festgestellt werden.

4.2.1.4 PCR-Bedingungen

Primer(-Paar)	Bedingungen	
Plac2/Pwht2; Plac3/Pwht3 (5')	1x	15 min 95 °C
(inverse PCR)	35x	30 s 95 °C / 1 min 60 °C / 2 min 72 °C
	1x	10 min 72 °C
		4 °C
Pry1/Pry4 (3')	1x	15 min 95 °C
(inverse PCR)	35x	30 s 95 °C / 1 min 53 °C / 2 min 72 °C
	1x	10 min 72 °C
		4 °C
charF1/charB5	1x	2 min 94 °C
(<i>chrB</i> -Null Genotypisierung)	10x	10 s 94 °C / 30 s 55,2 °C / 8 min 68 °C
	25x	10 s 94 °C / 30 s 55,2 °C / 8 min* (+ 5 s) 68 °C
	1x	7 min 68 °C
		4 °C
PM001-13/EcoRI	1x	15 min 95 °C
(Umklonierung <i>charybde</i> cDNA)	25x	30 s 95 °C / 30 s 66 °C / 2 min 72 °C
	1x	7 min 72 °C
		4 °C
Sp1 oder Spep1	1x	1 min 96 °C
(Sequenzierung inverse PCR)	30x	20 s 96 °C / 10 s 50 °C / 4 min 60 °C
		4 °C
char-seq_F oder char-seq_B	1x	5 min 95 °C
(Sequenzierung <i>chrB</i> -Null)	30x	30 s 95 °C / 20 s 61,9 °C oder 62,2 °C / 4 min 60 °C
		4 °C

Tabelle 7: PCR-Protokolle.

4.2.2 Protein-Biochemie

Falls nicht anders angegeben, wurden zur Analyse und Darstellung der Proteine gängige Standard-Protokolle und Methoden angewandt (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979; Coligan *et al.*, 1995–2003). Zur Analyse von Proteinproben wurden grundsätzlich diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Alle Proben wurden mit reduzierendem Lämmli-Puffer aufbereitet. Es wurden Gele in variierenden Konzentrationen (8–12%) verwendet, um die jeweils beste Auflösung zu erzielen. Zum Blotting wurden Nitrozellulose-Membranen [Hybond ECL (0,45 µm); Amersham] verwendet. Proteinkonzentrationen wurden grund-

sätzlich mittels des BCA-Tests (Pierce) bestimmt. Antikörper-Inkubationen wurden generell in 5% Milch in PBS durchgeführt. Zur Antigendetektion wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper und das „Enhanced Chemiluminiscence“ (ECL)-System von Amersham verwendet.

4.2.2.1 Rekombinante Expression und Affinitätsreinigung des GST:Chrb-Fusionsproteins

Der *E. coli*-Stamm BL21 pREP4 wurde zur Expression des Glutathion-S-Transferase:Charybde-Fusionsproteins (GST:Chrb) mit dem in Kapitel 4.2.1.3 beschriebenen Konstrukt transfiziert. Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 8 ml LB-Medium inokuliert und bei 37°C inkubiert. Bei einer OD von 0,7 wurden 400 ml LB-Medium (18°C) mit der Vorkultur angeimpft. Nachdem die Kultur eine OD von 0,76 erreicht hatte, wurde durch Zugabe von IPTG die Expression des GST:Chrb-Fusionsproteins induziert. Die Expression erfolgte über Nacht bei 18°C. Die Bakterien wurden anschließend bei 4°C abzentrifugiert, in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen (Branson 450D mit Microtip: 90 s; 0,4 s / 0,6 s an/aus; 70%). Danach wurde das Homogenat für 15 min mit 25000 g abzentrifugiert. Der Überstand mit dem gelösten GST:Chrb-Fusionsprotein wurde bei 4°C für 45 min mit Glutathion-Sepharose inkubiert. Die Glutathion-Sepharose mit dem gebundenen GST:Chrb-Fusionsprotein wurde mit drei Volumina Waschpuffer 1 und einem Volumen Waschpuffer 2 gewaschen. Danach wurde für 10 min mit zwei Volumina DnaK-Elutionspuffer inkubiert, um eine entsprechende Kontamination zu beseitigen (Rial and Ceccarelli, 2002), gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit zwei Volumina Waschpuffer 2. Das gebundene GST:Chrb-Fusionsprotein wurde im Anschluß proteolytisch mit Thrombin gespalten (3 h bei Raumtemperatur in Waschpuffer 2) und das freie Charybde anschließend eluiert. Um die Stabilität des eluierten Charybdes zu gewährleisten und seine Konzentration zu erhöhen, wurde über Nacht gegen 10% Glycerin in PBS dialysiert. Die Qualität der Affinitätsreinigung wurde mittels einer Kolloidal-Coomassie-Färbung nach einem modifizierten Neuhoff-Protokoll überprüft ("Blue Silver"; Candiano *et al.*, 2004). Das aufgereinigte Charybde wurde zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet. Die entsprechenden Arbeiten wurden durch die Firma Biogenes (Berlin) durchgeführt.

4.2.2.2 Affinitätsreinigung der anti-Charybde-Antikörper

Spezifische anti-Charybde-Antikörper wurden aus den Seren der beiden immunisierten Kaninchen mittels Affinitätschromatographie isoliert. Dazu wurde aufgereinigtes, rekombinantes Charybde auf einer AminoLink-Säule (Pierce) immobilisiert, und das Serum für drei Stunden bei 18°C mit dem Säulensubstrat inkubiert. Anschließend wurde mit 40 ml PBS (4°C) gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden danach mit 9 ml 100 mM Glycin pH2,87 (4°C) eluiert und als 1 ml-Fractionen in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen, in denen zur Neutralisierung jeweils 100 µl 1 M Tris pH7,5 vorgelegt waren. Anschließend wurden die Fractionen mit hohen Antikörperkonzentrationen (A_{280}) vereinigt und über Nacht gegen 20 % Glycerin in PBS dialysiert.

4.2.2.3 Herstellung von Proteinextrakten

Falls nicht anderweitig beschrieben, wurden zur Herstellung von Proteinextrakten die Köpfe erwachsener Fliegen, die Gehirne von L3-Larven oder deren Hautmuskelschläuche in einem Glas-Micro-Homogenisator (Radnoti/Roth) aufgeschlossen. Anschließend wurden bei 1000 g Zellkerne und nichthomogenisierte Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4x Lämmli-Puffer für die Gel-Elektrophorese aufbereitet.

4.2.2.4 Proteinfällungen

Zur Aufkonzentration von Proteinproben wurden je nach Proteingehalt Aceton- bzw. TCA-Fällungen durchgeführt.

Aceton-Fällung (> 200 µg Gesamt-Protein):

Das Probenvolumen wurde im Verhältnis 1 : 4,5 mit Aceton versetzt und für zwei Stunden bei -70°C gefällt. Das Präzipitat wurde danach für 10 min mit 20000 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach dem Trocknen in Lämmli-Puffer aufgenommen.

TCA-Fällung (< 200 µg Gesamt-Protein):

Die Probe wurde auf eine Konzentration von 10% Trichloressigsäure (TCA) eingestellt und für 10 min auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde für 10 min mit 20000 g bei 4°C abzentri-

fugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80% Aceton (-20°C) gewaschen. Das Präzipitat wurde erneut für 10 min mit 20000 g bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in Lämmli-Puffer aufgenommen.

4.2.2.5 Protein-Deacylierung

Zur Analyse von Protein-Acylierungen wurden 30 Köpfe erwachsener *Wildtyp*-Fliegen in einem Eppendorf-Gefäß mit einem Kunststoff-Pistill in 60 μl Suspensionspuffer homogenisiert. Durch die Verwendung des Kunststoff-Pistills bleiben die Zellen des ZNS weitgehend intakt. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 1000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 μl methanolischer NaOH-Lösung (100 mM NaOH in Methanol) resuspendiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das NaOH mit 5 μl 1 M HCl neutralisiert, die Probe mit TCA gefällt und in Lämmli-Puffer aufgenommen. Als Kontrolle wurde eine Probe mit Methanol inkubiert. Durch die Behandlung mit methanolischer NaOH-Lösung werden vorhandene Thioesterbindungen an Cystein-Resten hydrolysiert. Die resultierende Deacylierung führt zu einer Erhöhung der relativen elektrophoretischen Mobilität des Proteins (Kaufman *et al.*, 1984; van de Goor and Kelly, 1996).

4.2.2.6 Protein-Deglykosylierung

Zur Analyse von Protein-Glykosylierungen wurden 60 Köpfe erwachsener *Wildtyp*-Fliegen in 60 μl Denaturierungspuffer homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine weitgehende Denaturierung der Proteine zu erreichen. Anschließend wurde die Probe im Verhältnis 3:4,5 mit 1,7% Nonidet P-40 in PBS verdünnt. Die Zugabe von Nonidet P-40 zur Probe verhindert die Denaturierung der N-Glykosidase F (PNGase F) durch SDS (Haselbeck and Hösel, 1988). 30 μl dieses Homogenates wurden mit 500 U PNGase F versetzt und für 90 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Probe mit 4x Lämmli-Puffer für die Gel-Elektrophorese aufbereitet.

4.2.2.7 Gradientenzentrifugation zur Isolierung synaptischer Vesikel

Synaptische Vesikel lassen sich von anderen Zellbestandteilen mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation abtrennen. Dabei wird ausgenutzt, daß synaptische Vesikel aufgrund ihrer spezifischen Dichte innerhalb eines Glycerin-Gradienten langsamer sedimentieren als Zellmembranen und andere Zellorganellen (van de Goor *et al.*, 1995; Arnold *et al.*, 2004).

Die Köpfe von 1,58 g in LN₂ schockgefrorenen, erwachsenen *Wildtyp*-Fliegen wurden durch Schütteln auf einem Sieb abgetrennt (ca. 149 mg Köpfe). Die Köpfe wurden anschließend unter Trockeneis-Kühlung in einem Mörser zermahlen und in 1,5 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen. Das Homogenat wurde für 5 min mit 1000 g zentrifugiert, und ca. 1 ml des postnukleären Überstandes wurde auf einen 5–25%igen Glycerin-Gradienten aufgetragen. Der Gradient bestand aus Homogenisierungspuffer mit entsprechendem Glycerin-Anteil und wurde mit einem 50%igen Sucrose-Kissen unterschichtet. Zellmembranen sammeln sich an der Oberfläche des Sucrose-Kissens. Nur intakte Zellen und Zellkerne können in das Sucrose-Kissen eindringen. Synaptische Vesikel durchqueren den Dichtegradienten deutlich langsamer als andere Membranfragmente. Zur Auftrennung der Zellbestandteile wurde der Gradient für 100 min mit 182000 g (SW 40 Ti Rotor: 38000 Upm) zentrifugiert. Der Gradient wurde in 600 µl-Fractionen geerntet. Die einzelnen Fractionen wurden mittels Aceton- oder TCA-Fällung aufkonzentriert und in Lämmli-Puffer aufgenommen.

4.2.3 Fliegen-genetik und -haltung

Alle Fliegenlinien wurden, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur in Standard-Fliegenfutter gehalten und einmal pro Monat umgesetzt.

4.2.3.1 Kreuzungen und optimale larvale Kulturen

Für die Überexpression von Transgenen wurden je nach Fliegenlinie 20–40 Jungfrauen der GAL4-Treiberlinie mit 10–20 Männchen der UAS-Fliegenlinie oder mit *Wildtyp*-Männchen verpaart, um in den verschiedenen Kulturen eine konstante Larvendichte zu erzielen (optimale Kulturen). Die Eltern-Fliegen dieser Kreuzungen wurden bei 25°C gehalten und täglich in ein neues Futterröhrchen umgesetzt. Die aus den Gelegen schlüpfenden Larven

wurden entweder bei 18°C oder 25°C aufgezogen und im dritten Larvenstadium für die entsprechenden Experimente und Analysen verwendet.

4.2.3.2 Unpräzise Exzision des *PTT-P*-Elementes der Linie *chr^bG375*

Das *PTT-P*-Element mit dem GFP-codierenden Exon wurde mittels einer konservativen Transpositions-Strategie herausgeschnitten. Dazu wurde das *P*-Element in der männlichen Keimbahn mobilisiert (Abbildung 28). Männchen, die sowohl das *PTT-P*-Element als auch eine Kopie des Konstrukts *P{Δ2-3}* tragen, wurden mit Weibchen verpaart, die den Marker *Dr* und den Balancer *TM3, Ser, Sb* (Chromosom III) tragen (F_1 -Generation). Das Konstrukt *P{Δ2-3}* enthält die cDNA der aktiven Form der Transposase unter Kontrolle eines ubiquitären Promoters. Aus der F_2 -Generation wurden Männchen selektiert, die weder das Konstrukt *P{Δ2-3}* noch das *PTT-P*-Element tragen, dafür aber den Balancer *TM3, Ser, Sb*.

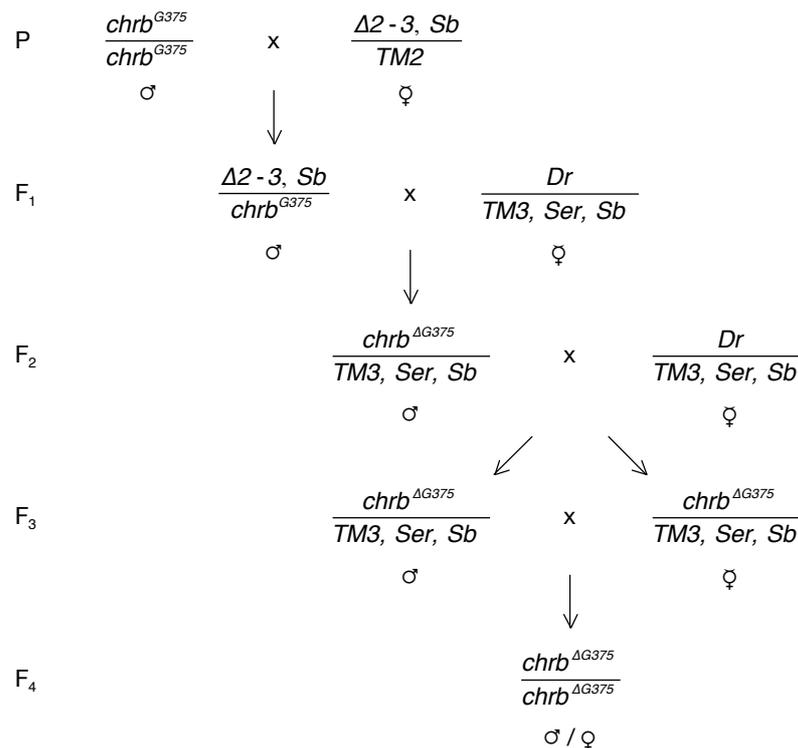


Abbildung 28: Kreuzungsschema zur (unpräzisen) Exzision des *PTT-P*-Elementes der Linie *chr^bG375*.

Der Verlust des *PTT-P*-Elementes konnte über die Augenfarbe festgestellt werden, da der Verlust des *miniwhite*-Gens, das als Reportergen in den *P*-Elementen enthalten ist, in $w^{-/-}$ -Fliegen zu weißen Augen führt. Diese Tiere wurden erneut mit Weibchen verpaart, die auf Chromosom III eine Kombination aus Marker und Balancer tragen (*Dr/TM3, Ser, Sb*). Unter

den Nachkommen dieser Tiere (F₃) wurden die Träger des Markers *Dr* aussortiert. Die anderen Individuen wurden untereinander gekreuzt, um schließlich in F₄ homozygote Individuen ohne *PTT-P*-Element zu erhalten.

Insgesamt wurden 130 Linien aufgesetzt, die das *P*-Element verloren hatten. Die Integrität des *charybde*-Gens dieser Linien wurde mittels PCR (vgl. Kapitel 4.2.1.2) und anschließender Sequenzierung bestimmt. Es konnten sieben Linien mit unpräzisen Exzisionen identifiziert werden.

4.2.3.3 Das GAL4/UAS-System – Gerichtete Genexpression

Für die gewebespezifische, ektopische Expression von Genen wurde das GAL4/UAS-System (Brand and Perrimon, 1993) genutzt. Bei diesem System exprimiert eine sogenannte Treiber-Linie unter Kontrolle eines endogenen Enhancers/Promoters den aus *Saccharomyces cerevisiae* stammenden Transkriptionsfaktor GAL4. GAL4 bindet an ein sogenanntes UAS(upstream activating sequence)-Element, das als Enhancer fungiert. In der Folge wird die Transkription eines unterhalb des UAS-Elementes gelegenen Gens stimuliert.

Durch Kreuzen einer Treiber-Linie mit einer Linie, die ein Transgen unter Kontrolle eines UAS-Elementes trägt, wird das jeweilige Transgen dem Muster des GAL4-Proteins entsprechend exprimiert. Das Expressionsmuster des Transgens hängt somit vom Enhancer/Promoter ab, der die GAL4-Expression reguliert.

Die konditionale, gewebespezifische Expression eines UAS-Transgens kann durch die Verwendung von „GeneSwitch“-Linien erreicht werden (Osterwalder *et al.*, 2001). In diesen Linien läßt sich die transkriptionelle Aktivität durch Fütterung des Progesteronrezeptor-Antagonisten RU486 (Mifepriston) steuern. Eine modifizierte Form des GAL4-Proteins („GeneSwitch“) kann erst durch Interaktion mit RU486 an das UAS-Element binden und die Transkription des Transgens stimulieren. Zur Induktion der „GeneSwitch“-Linie (*elavGS-GAL4*) wurden L3-Larven für 20 h in Standardfutter gehalten, das 15 µg/ml RU486 enthielt. Die Stocklösung enthielt 15 mg/ml RU486, gelöst in DMSO. Kontroll-Tiere wurden in Standardfutter gehalten, das eine äquivalente Menge des Lösungsmittels DMSO enthielt.

4.2.4 Immunhistologie

L3-Larven wurden in calciumfreiem HL3-Puffer präpariert (Stewart *et al.*, 1994). Dazu wurden die Tiere dorsal geöffnet und die inneren Organe entfernt, um die Muskeln freizulegen. Diese Larven-Filets wurden für 10 min mit eiskaltem 4%igem PFA in PBS bzw.

mit Methanol fixiert und danach in PBT permeabilisiert und weiterverarbeitet. Zur Verringerung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Larven für 30 min in 5% NGS in PBT inkubiert, bevor die entsprechenden Erstantikörper hinzugegeben wurden. Die Erstantikörper-Inkubation erfolgte für zwei Stunden bzw. über Nacht. Die Inkubationszeit für die fluoreszierenden Zweitantikörper betrug generell zwei Stunden. Die fluoreszenzmarkierten Tiere wurden anschließend in Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) equilibriert und auf Objektträgern eingebettet.

4.2.5 Fluorometrische Analyse des Protein-Expressionsniveaus

Zur Quantifizierung der Expressionsdynamik der GFP-Fusionsproteine wurden epifluoreszente Aufnahmen der NME der Muskeln 6 und 7 mit Hilfe der Programme IP-Lab 3.6.3 (Fairfax, VA, USA) bzw. Image J 1.34s (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ausgewertet. Für die jeweils miteinander verglichenen Bedingungen wurden dieselben Aufnahmeparameter verwendet. Die präparierten Larven wurden mit anti-GFP- und anti-HRP-Antikörpern markiert. Die zu analysierenden Bereiche wurden im GFP-Kanal ausgewählt. Neben der Fluoreszenzintensität der markierten GFP-Fusionsproteine wurde als interner Standard die Immunfluoreszenz des HRPs bestimmt. Zur Normalisierung wurde der Quotient der Fluoreszenzintensität des GFP-Kanals und des HRP-Kanals ermittelt.

4.2.6 Verhaltensanalyse von L3-Larven

Um das larvale Laufverhalten zu untersuchen, wurden Tiere ähnlicher Größe auf eine temperierte, futterfreie, feuchte Oberfläche gesetzt. Die individuelle Laufaktivität der Tiere wurde jeweils über einen Zeitraum von zwei Stunden mit Hilfe eines softwaregesteuerten Kamerasystems kontinuierlich erfaßt und quantifiziert (Steinert *et al.*, 2006).

4.2.7 Analyse der subsynaptischen Translationsaktivität

Als Ausdruck der subsynaptischen Translationsaktivität wurde die Anzahl eIF4E-positiver Aggregate im subsynaptischen Bereich der NME der Muskeln 6 und 7 bestimmt (Sigrist *et al.*, 2000; 2003). Zur Quantifizierung wurden die Segmente A2–5 herangezogen. Um die variierenden Größen der eIF4E-Aggregate zu berücksichtigen, wurde bei deren Zählung

zusätzlich eine subjektive Gewichtung der Größe vorgenommen. Große Aggregate wurden so behandelt, als setzten sie sich aus mehreren kleinen zusammen.

4.2.8 Quantifizierung der Größe neuromuskulärer Endplatten und Boutons

Zur Quantifizierung der Größe neuromuskulärer Endplatten wurde die Anzahl der Is- und Ib-Boutons auf den Muskeln 6 und 7 des Segmentes A2 bestimmt. Zum Ausgleich individueller Unterschiede wurde der Quotient aus Boutonzahl und Muskeloberfläche gebildet (Schuster *et al.*, 1996a). Die Größe der Muskeln 6 und 7 wurde bei 25facher Vergrößerung mit Hilfe eines Okulars mit eingeschliffenem Maßstab bestimmt.

Zur Quantifizierung der Boutongröße wurden Projektionen konfokaler Bilderserien der NME der Muskeln 6 und 7 des Segmentes A2 angefertigt. Die Boutondurchmesser aller Is- und Ib-Boutons wurden jeweils quer zum Axon bestimmt. Zur Messung der Distanz wurde das Programm Image J 1.34s (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) verwendet. Pro Genotyp wurde von 10 bzw. 11 Tieren jeweils eine Endplatte ausgewählt. Insgesamt wurden pro Genotyp mehr als 1100 Boutons vermessen. Die statistische Auswertung zur Bestimmung, ob die Durchmesser der Boutonpopulationen der verschiedenen Genotypen voneinander abweichen wurde mit Hilfe des *Kolmogorov-Smirnov*-Tests (Zwei-Stichprobentest) durchgeführt (siehe: <http://www.physics.csbsju.edu/stats/KS-test.html>).

5 LITERATUR

Aberle, H., Haghghi, A. P., Fetter, R. D., McCabe, B. D., Magalhaes, T. R. and Goodman, C. S. (2002). *wishful thinking* encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **33**(4): 545-558.

Acebes, A. and Ferrús, A. (2001). Increasing the number of synapses modifies olfactory perception in *Drosophila*. *J Neurosci* **21**(16): 6264-6273.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3): 403-410.

Arnold, C., Reisch, N., Leibold, C., Becker, S., Prüfert, K., Sautter, K., Palm, D., Jatzke, S., Buchner, S. and Buchner, E. (2004). Structure-function analysis of the cysteine string protein in *Drosophila*: cysteine string, linker and C terminus. *J Exp Biol* **207**(8): 1323-1334.

Arsham, A. M. and Neufeld, T. P. (2006). Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 589-597.

Atwood, H. L., Govind, C. K. and Wu, C. F. (1993). Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* **24**(8): 1008-1024.

Bachmann, R. A., Kim, J. H., Wu, A. L., Park, I. H. and Chen, J. (2006). A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. *J Biol Chem* **281**(11): 7357-7363.

Backman, S. A., Stambolic, V., Suzuki, A., Haight, J., Elia, A., Pretorius, J., Tsao, M. S., Shannon, P., Bolon, B., Ivy, G. O. and Mak, T. W. (2001). Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* **29**(4): 396-403.

Bailey, C. H. and Kandel, E. R. (1993). Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* **55**: 397-426.

Banerjee, S., Pillai, A. M., Paik, R., Li, J. and Bhat, M. A. (2006a). Axonal ensheathment and septate junction formation in the peripheral nervous system of *Drosophila*. *J Neurosci* **26**(12): 3319-3329.

Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K. and Gehring, W. J. (1989). *P*-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev* **3**(9): 1288-1300.

Bellen, H. J., Lu, Y., Beckstead, R. and Bhat, M. A. (1998). Neurexin IV, caspr and paranodin – novel members of the neurexin family: encounters of axons and glia. *Trends Neurosci* **21**(10): 444-449.

Bellen, H. J., Levis, R. W., Liao, G., He, Y., Carlson, J. W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P. R., Schulze, K. L., Rubin, G. M., Hoskins, R. A. and Spradling, A. C. (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**(2): 761-781.

- Bennett, M. K., Calakos, N. and Scheller, R. H.** (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* **257**(5067): 255-259.
- Bessman, S. P. and Geiger, P. J.** (1981). Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* **211**(4481): 448-452.
- Bessman, S. P. and Carpenter, C. L.** (1985). The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* **54**: 831-862.
- Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E. and et al.** (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a *P-lacZ* vector. *Genes Dev* **3**(9): 1273-1287.
- Blethen, S. L. and Kaplan, N. O.** (1968). Characteristics of arthropod arginine kinases. *Biochemistry* **7**(6): 2123-2135.
- Bonin, C. P. and Mann, R. S.** (2004). A *piggyBac* transposon gene trap for the analysis of gene expression and function in *Drosophila*. *Genetics* **167**(4): 1801-1811.
- Brafman, A., Mett, I., Shafir, M., Gottlieb, H., Damari, G., Gozlan-Kelner, S., Vishnevskia-Dai, V., Skaliter, R., Einat, P., Faerman, A., Feinstein, E. and Shoshani, T.** (2004). Inhibition of oxygen-induced retinopathy in RTP801-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(10): 3796-3805.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**(2): 401-415.
- Broadie, K.** (2004). Synapse scaffolding: intersection of endocytosis and growth. *Curr Biol* **14**(19): R853-855.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W. and Kaelin, W. G., Jr.** (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* **18**(23): 2893-2904.
- Buchner, E. and Gundersen, C. B.** (1997). The DnaJ-like cysteine string protein and exocytotic neurotransmitter release. *Trends Neurosci* **20**(5): 223-227.
- Budnik, V., Zhong, Y. and Wu, C. F.** (1990). Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J Neurosci* **10**(11): 3754-3768.
- Byers, D., Davis, R. L. and Kiger, J. A., Jr.** (1981). Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the *dunce* mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **289**(5793): 79-81.
- Cammalleri, M., Lütjens, R., Berton, F., King, A. R., Simpson, C., Francesconi, W. and Sanna, P. P.** (2003). Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70^{S6K} pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(24): 14368-14373.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P. G.** (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**(9): 1327-1333.

- Carlson, S. D., Juang, J. L., Hilgers, S. L. and Garment, M. B.** (2000). Blood barriers of the insect. *Annu Rev Entomol* **45**: 151-174.
- Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E. and Fraser, M. J.** (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* **172**(1): 156-169.
- Casadio, A., Martin, K. C., Giustetto, M., Zhu, H., Chen, M., Bartsch, D., Bailey, C. H. and Kandel, E. R.** (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* **99**(2): 221-237.
- Cesar, M. and Hamprecht, B.** (1995). Immunocytochemical examination of neural rat and mouse primary cultures using monoclonal antibodies raised against pyruvate carboxylase. *J Neurochem* **64**(5): 2312-2318.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**(5148): 802-805.
- Chamberlain, L. H. and Burgoyne, R. D.** (2000). Cysteine-string protein: the chaperone at the synapse. *J Neurochem* **74**(5): 1781-1789.
- Chen, Y. A. and Scheller, R. H.** (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 98-106.
- Clements, D., Mayer, R. J. and Johnson, S. R.** (2007). Subcellular distribution of the TSC2 gene product tuberin in human airway smooth muscle cells is driven by multiple localization sequences and is cell-cycle dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**(1): L258-266.
- Clyne, P. J., Brotman, J. S., Sweeney, S. T. and Davis, G.** (2003). Green fluorescent protein tagging *Drosophila* proteins at their native genomic loci with small *P* elements. *Genetics* **165**(3): 1433-1441.
- Coligan, J. E., Dunn, B. M., Speicher, D. W. and Wingfield, P. T.,** Eds. (1995–2003). Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
- Cong, F., Schweizer, L. and Varmus, H.** (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the β -catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* **131**(20): 5103-5115.
- Corradetti, M. N., Inoki, K. and Guan, K. L.** (2005). The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem* **280**(11): 9769-9772.
- Coyle, I. P., Koh, Y. H., Lee, W. C., Slind, J., Fergestad, T., Littleton, J. T. and Ganetzky, B.** (2004). Nervous wreck, an SH3 adaptor protein that interacts with Wsp, regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **41**(4): 521-534.
- Cuaz-Pérolin, C., Furman, C., Larigauderie, G., Legedz, L., Lasselín, C., Copin, C., Jaye, M., Searfoss, G., Yu, K. T., Duverger, N., Nègre-Salvayre, A., Fruchart, J. C. and Rouis, M.** (2004). REDD2 gene is upregulated by modified LDL or hypoxia and mediates human macrophage cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(10): 1830-1835.

- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stannek, P., Glinka, A. and Niehrs, C.** (2005). Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**(7069): 867-872.
- Davis, G. W. and Goodman, C. S.** (1998). Synapse-specific control of synaptic efficacy at the terminals of a single neuron. *Nature* **392**(6671): 82-86.
- Davis, H. P. and Squire, L. R.** (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* **96**(3): 518-559.
- DiAntonio, A., Burgess, R. W., Chin, A. C., Deitcher, D. L., Scheller, R. H. and Schwarz, T. L.** (1993). Identification and characterization of *Drosophila* genes for synaptic vesicle proteins. *J Neurosci* **13**(11): 4924-4935.
- Duffy, J. B.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**(1-2): 1-15.
- Eberwine, J., Miyashiro, K., Kacharina, J. E. and Job, C.** (2001). Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(13): 7080-7085.
- Ellisen, L. W., Ramsayer, K. D., Johannessen, C. M., Yang, A., Beppu, H., Minda, K., Oliner, J. D., McKeon, F. and Haber, D. A.** (2002). *REDD1*, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell* **10**(5): 995-1005.
- Estes, P. S., Roos, J., van der Blik, A., Kelly, R. B., Krishnan, K. S. and Ramaswami, M.** (1996). Traffic of dynamin within individual *Drosophila* synaptic boutons relative to compartment-specific markers. *J Neurosci* **16**(17): 5443-5456.
- Estes, P. S., Jackson, T. C., Stimson, D. T., Sanyal, S., Kelly, L. E. and Ramaswami, M.** (2003). Functional dissection of a eukaryotic dicistronic gene: transgenic *stonedB*, but not *stonedA*, restores normal synaptic properties to *Drosophila stoned* mutants. *Genetics* **165**(1): 185-196.
- Featherstone, D. E. and Broadie, K.** (2000). Surprises from *Drosophila*: genetic mechanisms of synaptic development and plasticity. *Brain Res Bull* **53**(5): 501-511.
- Fox, L. E., Soll, D. R. and Wu, C. F.** (2006). Coordination and modulation of locomotion pattern generators in *Drosophila* larvae: effects of altered biogenic amine levels by the tyramine β hydroxylase mutation. *J Neurosci* **26**(5): 1486-1498.
- Frey, U. and Morris, R. G.** (1998). Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* **21**(5): 181-188.
- Friedman, D. L. and Roberts, R.** (1994). Compartmentation of brain-type creatine kinase and ubiquitous mitochondrial creatine kinase in neurons: evidence for a creatine phosphate energy shuttle in adult rat brain. *J Comp Neurol* **343**(3): 500-511.
- Furuya, F., Hanover, J. A. and Cheng, S. Y.** (2006). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by a mutant thyroid hormone beta receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(6): 1780-1785.

- Ganetzky, B. and Wu, C. F.** (1983). Neurogenetic analysis of potassium currents in *Drosophila*: synergistic effects on neuromuscular transmission in double mutants. *J Neurogenet* **1**(1): 17-28.
- Genova, J. L. and Fehon, R. G.** (2003). Neuroglian, Glotactin, and the Na⁺/K⁺ ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *J Cell Biol* **161**(5): 979-989.
- Gorczyca, M., Augart, C. and Budnik, V.** (1993). Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. *J Neurosci* **13**(9): 3692-3704.
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A. J. and Benfenati, F.** (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **259**(5096): 780-785.
- Griffith, L. C. and Budnik, V.** (2006). Plasticity and second messengers during synapse development. *Int Rev Neurobiol* **75**: 237-265.
- Gross, S. D. and Anderson, R. A.** (1998). Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal* **10**(10): 699-711.
- Guo, H. F. and Zhong, Y.** (2006). Requirement of Akt to mediate long-term synaptic depression in *Drosophila*. *J Neurosci* **26**(15): 4004-4014.
- Häcker, U., Nystedt, S., Barmchi, M. P., Horn, C. and Wimmer, E. A.** (2003). *piggyBac*-based insertional mutagenesis in the presence of stably integrated *P* elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(13): 7720-7725.
- Handler, A. M. and Harrell, R. A., 2nd** (1999). Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol Biol* **8**(4): 449-457.
- Haselbeck, A. and Hösel, W.** (1988). Studies on the effect of the incubation conditions, various detergents and protein concentration on the enzymatic activity of N-glycosidase F (glycopeptidase F) and endoglycosidase F. *Topics in Biochemistry*(8): 1-4.
- Hemmer, W. and Wallimann, T.** (1993). Functional aspects of creatine kinase in brain. *Dev Neurosci* **15**(3-5): 249-260.
- Hoang, B. and Chiba, A.** (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev Biol* **229**(1): 55-70.
- Horn, C., Offen, N., Nystedt, S., Hacker, U. and Wimmer, E. A.** (2003). *piggyBac*-based insertional mutagenesis and enhancer detection as a tool for functional insect genomics. *Genetics* **163**(2): 647-661.
- Horwood, J. M., Dufour, F., Laroche, S. and Davis, S.** (2006). Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci* **23**(12): 3375-3384.
- Hou, L. and Klann, E.** (2004). Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J Neurosci* **24**(28): 6352-6361.

- Huang, A. M., Rehm, E. J. and Rubin, G. M.** (2000). Recovery of DNA sequences flanking *P*-element insertions: inverse PCR and plasmid rescue. In: *Drosophila* Protocols. W. Sullivan, M. Ashburner and R. S. Hawley, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) pp. 429 ff.
- Huang, K. and El-Husseini, A.** (2005). Modulation of neuronal protein trafficking and function by palmitoylation. *Curr Opin Neurobiol* **15**(5): 527-535.
- Inoki, K. and Guan, K. L.** (2006). Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol* **16**(4): 206-212.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M. A., Hall, A. and Hall, M. N.** (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* **6**(11): 1122-1128.
- Jahn, R., Lang, T. and Südhof, T. C.** (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**(4): 519-533.
- Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**(8): 2700-2704.
- Jia, X. X., Gorczyca, M. and Budnik, V.** (1993). Ultrastructure of neuromuscular junctions in *Drosophila*: comparison of wild type and mutants with increased excitability. *J Neurobiol* **24**(8): 1025-1044.
- Johansen, J., Halpern, M. E., Johansen, K. M. and Keshishian, H.** (1989). Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* **9**(2): 710-725.
- Kaldis, P., Hemmer, W., Zanolla, E., Holtzman, D. and Wallimann, T.** (1996). 'Hot spots' of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus. *Dev Neurosci* **18**(5-6): 542-554.
- Kandel, E.** (2000). Cellular Mechanisms of Learning. In: Principles of Neural Science. E. Kandel, J. Schwartz and T. Jessell, Eds. (McGraw-Hill, New York, NY) pp. 1247 ff.
- Kang, H. and Schuman, E. M.** (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* **273**(5280): 1402-1406.
- Karpova, A., Sanna, P. P. and Behnisch, T.** (2006). Involvement of multiple phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways in the persistence of late-phase long term potentiation expression. *Neuroscience* **137**(3): 833-841.
- Kaufman, J. F., Krangel, M. S. and Strominger, J. L.** (1984). Cysteines in the transmembrane region of major histocompatibility complex antigens are fatty acylated via thioester bonds. *J Biol Chem* **259**(11): 7230-7238.
- Kelleher, R. J., 3rd, Govindarajan, A., Jung, H. Y., Kang, H. and Tonegawa, S.** (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **116**(3): 467-479.
- Kelly, A. and Lynch, M. A.** (2000). Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology* **39**(4): 643-651.

- Keshishian, H., Broadie, K., Chiba, A. and Bate, M.** (1996). The *Drosophila* neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development and function. *Annu Rev Neurosci* **19**: 545-575.
- Kim, J. R., Lee, S. R., Chung, H. J., Kim, S., Baek, S. H., Kim, J. H. and Kim, Y. S.** (2003). Identification of amyloid beta-peptide responsive genes by cDNA microarray technology: involvement of *RTP801* in amyloid beta-peptide toxicity. *Exp Mol Med* **35**(5): 403-411.
- Kittel, R. J., Wichmann, C., Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D. A., Pawlu, C., Kellner, R. R., Willig, K. I., Hell, S. W., Buchner, E., Heckmann, M. and Sigrist, S. J.** (2006). Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* **312**(5776): 1051-1054.
- Knauf, F., Rogina, B., Jiang, Z., Aronson, P. S. and Helfand, S. L.** (2002). Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene *Indy*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(22): 14315-14319.
- Koh, T. W., Verstreken, P. and Bellen, H. J.** (2004). Dap160/intersectin acts as a stabilizing scaffold required for synaptic development and vesicle endocytosis. *Neuron* **43**(2): 193-205.
- Koh, Y. H., Popova, E., Thomas, U., Griffith, L. C. and Budnik, V.** (1999). Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell* **98**(3): 353-363.
- Kurdyak, P., Atwood, H. L., Stewart, B. A. and Wu, C. F.** (1994). Differential physiology and morphology of motor axons to ventral longitudinal muscles in larval *Drosophila*. *J Comp Neurol* **350**(3): 463-472.
- Kuromi, H. and Kidokoro, Y.** (2000). Tetanic stimulation recruits vesicles from reserve pool via a cAMP-mediated process in *Drosophila* synapses. *Neuron* **27**(1): 133-143.
- Kwon, C. H., Zhu, X., Zhang, J., Knoop, L. L., Tharp, R., Smeyne, R. J., Eberhart, C. G., Burger, P. C. and Baker, S. J.** (2001). Pten regulates neuronal soma size: a mouse model of Lhermitte-Duclos disease. *Nat Genet* **29**(4): 404-411.
- Kwon, C. H., Zhu, X., Zhang, J. and Baker, S. J.** (2003). mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(22): 12923-12928.
- Kwon, C. H., Luikart, B. W., Powell, C. M., Zhou, J., Matheny, S. A., Zhang, W., Li, Y., Baker, S. J. and Parada, L. F.** (2006). Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* **50**(3): 377-388.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lee, Y. S. and Carthew, R. W.** (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* **30**(4): 322-329.
- Levin, L. R., Han, P. L., Hwang, P. M., Feinstein, P. G., Davis, R. L. and Reed, R. R.** (1992). The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* **68**(3): 479-489.
- Lin, D. M. and Goodman, C. S.** (1994). Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* **13**(3): 507-523.

- Lin, L., Qian, Y., Shi, X. and Chen, Y.** (2005). Induction of a cell stress response gene RTP801 by DNA damaging agent methyl methanesulfonate through CCAAT/enhancer binding protein. *Biochemistry* **44**(10): 3909-3914.
- Littleton, J. T., Stern, M., Schulze, K., Perin, M. and Bellen, H. J.** (1993). Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca²⁺-activated neurotransmitter release. *Cell* **74**(6): 1125-1134.
- Lloyd, T. E., Verstreken, P., Ostrin, E. J., Phillippi, A., Lichtarge, O. and Bellen, H. J.** (2000). A genome-wide search for synaptic vesicle cycle proteins in *Drosophila*. *Neuron* **26**(1): 45-50.
- Lnenicka, G. A. and Keshishian, H.** (2000). Identified motor terminals in *Drosophila* larvae show distinct differences in morphology and physiology. *J Neurobiol* **43**(2): 186-197.
- Loughney, K., Kreber, R. and Ganetzky, B.** (1989). Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* **58**(6): 1143-1154.
- Lukacsovich, T., Asztalos, Z., Awano, W., Baba, K., Kondo, S., Niwa, S. and Yamamoto, D.** (2001). Dual-tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **157**(2): 727-742.
- Malagelada, C., Ryu, E. J., Biswas, S. C., Jackson-Lewis, V. and Greene, L. A.** (2006). RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. *J Neurosci* **26**(39): 9996-10005.
- Malenka, R. C. and Bear, M. F.** (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**(1): 5-21.
- Marden, J. H., Rogina, B., Montooth, K. L. and Helfand, S. L.** (2003). Conditional tradeoffs between aging and organismal performance of *Indy* long-lived mutant flies. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(6): 3369-3373.
- Marder, E. and Calabrese, R. L.** (1996). Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* **76**(3): 687-717.
- Marella, S.** (2003). Cell Biology of Synapses at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junctions: Role of Unconventional Myosin VIIa and Identification of Synaptic Molecules Involved in Dynamic Changes by GFP Exon-Trapping. Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Marie, B., Sweeney, S. T., Poskanzer, K. E., Roos, J., Kelly, R. B. and Davis, G. W.** (2004). Dap160/intersectin scaffolds the periactive zone to achieve high-fidelity endocytosis and normal synaptic growth. *Neuron* **43**(2): 207-219.
- Marques, G.** (2005). Morphogens and synaptogenesis in *Drosophila*. *J Neurobiol* **64**(4): 417-434.
- Marques, G. and Zhang, B.** (2006). Retrograde signaling that regulates synaptic development and function at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* **75**: 267-285.

- Marrus, S. B., Portman, S. L., Allen, M. J., Moffat, K. G. and DiAntonio, A.** (2004). Differential localization of glutamate receptor subunits at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* **24**(6): 1406-1415.
- Martin, K. A., Schalm, S. S., Romanelli, A., Keon, K. L. and Blenis, J.** (2001). Ribosomal S6 kinase 2 inhibition by a potent C-terminal repressor domain is relieved by mitogen-activated protein-extracellular signal-regulated kinase kinase-regulated phosphorylation. *J Biol Chem* **276**(11): 7892-7898.
- Menon, K. P., Sanyal, S., Habara, Y., Sanchez, R., Wharton, R. P., Ramaswami, M. and Zinn, K.** (2004). The translational repressor Pumilio regulates presynaptic morphology and controls postsynaptic accumulation of translation factor eIF-4E. *Neuron* **44**(4): 663-676.
- Monastirioti, M., Gorczyca, M., Rapus, J., Eckert, M., White, K. and Budnik, V.** (1995). Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **356**(2): 275-287.
- Montarolo, P. G., Goelet, P., Castellucci, V. F., Morgan, J., Kandel, E. R. and Schacher, S.** (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Science* **234**(4781): 1249-1254.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M. and Chia, W.** (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(26): 15050-15055.
- Morin, X.** (2003). In vivo protein trapping in *Drosophila*. *Brief Funct Genomic Proteomic* **2**(2): 137-141.
- Morrison, J. F.** (1973). Arginine and other invertebrate guanidino kinases. In: The Enzymes. P. D. Boyer, Ed. (Academic Press, New York, NY) **Vol. 8**: pp. 457 ff.
- Nakayama, H., Kazama, H., Nose, A. and Morimoto-Tanifuji, T.** (2006). Activity-dependent regulation of synaptic size in *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurobiol* **66**(9): 929-939.
- Nguyen, P. V., Abel, T. and Kandel, E. R.** (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* **265**(5175): 1104-1107.
- Niemeyer, B. A. and Schwarz, T. L.** (2000). SNAP-24, a *Drosophila* SNAP-25 homologue on granule membranes, is a putative mediator of secretion and granule-granule fusion in salivary glands. *J Cell Sci* **113**(22): 4055-4064.
- Nishikawa, K. and Kidokoro, Y.** (1999). Octopamine inhibits synaptic transmission at the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *Brain Res* **837**(1-2): 67-74.
- O'Kane, C. J. and Gehring, W. J.** (1987). Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(24): 9123-9127.
- Osterwalder, T., Yoon, K. S., White, B. H. and Keshishian, H.** (2001). A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(22): 12596-12601.

- Oyler, G. A., Higgins, G. A., Hart, R. A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F. E. and Wilson, M. C.** (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* **109**(6/1): 3039-3052.
- Packard, M., Koo, E. S., Gorczyca, M., Sharpe, J., Cumberledge, S. and Budnik, V.** (2002). The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell* **111**(3): 319-330.
- Pajor, A. M.** (2006). Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflugers Arch* **451**(5): 597-605.
- Palladino, M. J., Bower, J. E., Kreber, R. and Ganetzky, B.** (2003). Neural dysfunction and neurodegeneration in *Drosophila* Na⁺/K⁺ ATPase alpha subunit mutants. *J Neurosci* **23**(4): 1276-1286.
- Peters, J. M., McKay, R. M., McKay, J. P. and Graff, J. M.** (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* **401**(6751): 345-350.
- Petersen, S. A., Fetter, R. D., Noordermeer, J. N., Goodman, C. S. and DiAntonio, A.** (1997). Genetic analysis of glutamate receptors in *Drosophila* reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron* **19**(6): 1237-1248.
- Pisani, D. F., Leclerc, L., Jarretou, G., Marini, J. F. and Dechesne, C. A.** (2005). SMHS1 is involved in oxidative/glycolytic-energy metabolism balance of muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* **326**(4): 788-793.
- Proud, C. G.** (2006). Regulation of protein synthesis by insulin. *Biochem Soc Trans* **34**(2): 213-216.
- Qin, G., Schwarz, T., Kittel, R. J., Schmid, A., Rasse, T. M., Kappei, D., Ponimaskin, E., Heckmann, M. and Sigrist, S. J.** (2005). Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *J Neurosci* **25**(12): 3209-3218.
- Rao, S. S., Stewart, B. A., Rivlin, P. K., Vilinsky, I., Watson, B. O., Lang, C., Boulianne, G., Salpeter, M. M. and Deitcher, D. L.** (2001). Two distinct effects on neurotransmission in a temperature-sensitive SNAP-25 mutant. *Embo J* **20**(23): 6761-6771.
- Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmid, A., Kittel, R. J., Mertel, S., Sigrist, C. B., Schmidt, M., Guzman, A., Merino, C., Qin, G., Quentin, C., Madeo, F. F., Heckmann, M. and Sigrist, S. J.** (2005). Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation *in vivo*. *Nat Neurosci* **8**(7): 898-905.
- Raymond, C. R., Redman, S. J. and Crouch, M. F.** (2002). The phosphoinositide 3-kinase and p70 S6 kinase regulate long-term potentiation in hippocampal neurons. *Neuroscience* **109**(3): 531-536.
- Reichhart, J. M., Ligoxygakis, P., Naitza, S., Woerfel, G., Imler, J. L. and Gubb, D.** (2002). Splice-activated UAS hairpin vector gives complete RNAi knockout of single or double target transcripts in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* **34**(1-2): 160-164.

- Reiff, D. F., Thiel, P. R. and Schuster, C. M.** (2002). Differential regulation of active zone density during long-term strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci* **22**(21): 9399-9409.
- Reiling, J. H. and Hafen, E.** (2004). The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**(23): 2879-2892.
- Renger, J. J., Ueda, A., Atwood, H. L., Govind, C. K. and Wu, C. F.** (2000). Role of cAMP cascade in synaptic stability and plasticity: ultrastructural and physiological analyses of individual synaptic boutons in *Drosophila* memory mutants. *J Neurosci* **20**(11): 3980-3992.
- Rial, D. V. and Ceccarelli, E. A.** (2002). Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. *Protein Expr Purif* **25**(3): 503-507.
- Risinger, C., Blomqvist, A. G., Lundell, I., Lambertsson, A., Nassel, D., Pieribone, V. A., Brodin, L. and Larhammar, D.** (1993). Evolutionary conservation of synaptosome-associated protein 25 kDa (SNAP-25) shown by *Drosophila* and *Torpedo* cDNA clones. *J Biol Chem* **268**(32): 24408-24414.
- Rival, T., Soustelle, L., Cattaert, D., Strambi, C., Iche, M. and Birman, S.** (2006). Physiological requirement for the glutamate transporter dEAAT1 at the adult *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurobiol* **66**(10): 1061-1074.
- Rizo, J. and Südhof, T. C.** (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* **3**(8): 641-653.
- Rogina, B., Reenan, R. A., Nilsen, S. P. and Helfand, S. L.** (2000). Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science* **290**(5499): 2137-2140.
- Roos, J. and Kelly, R. B.** (1999). The endocytic machinery in nerve terminals surrounds sites of exocytosis. *Curr Biol* **9**(23): 1411-1414.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., et al.** (2004). The DrosDel collection: a set of *P*-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**(2): 797-813.
- Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M.** (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**(14): 1296-1302.
- Schneggenburger, R. and Forsythe, I. D.** (2006). The calyx of Held. *Cell Tissue Res* **326**(2): 311-337.
- Schoch, S. and Gundelfinger, E. D.** (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* **326**(2): 379-391.

- Schubiger, M., Feng, Y., Fambrough, D. M. and Palka, J.** (1994). A mutation of the *Drosophila* sodium pump α subunit gene results in bang-sensitive paralysis. *Neuron* **12**(2): 373-381.
- Schulze, K. L., Broadie, K., Perin, M. S. and Bellen, H. J.** (1995). Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell* **80**(2): 311-320.
- Schuster, C. M., Ultsch, A., Schloss, P., Cox, J. A., Schmitt, B. and Betz, H.** (1991). Molecular cloning of an invertebrate glutamate receptor subunit expressed in *Drosophila* muscle. *Science* **254**(5028): 112-114.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (1996a). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* **17**(4): 641-654.
- Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S.** (1996b). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron* **17**(4): 655-667.
- Schwarzer, R., Tondera, D., Arnold, W., Giese, K., Klippel, A. and Kaufmann, J.** (2005). REDD1 integrates hypoxia-mediated survival signaling downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* **24**(7): 1138-1149.
- Schweizer, L. and Varmus, H.** (2003). Wnt/Wingless signaling through β -catenin requires the function of both LRP/Arrow and frizzled classes of receptors. *BMC Cell Biol* **4**: 4.
- Scuderi, A., Simin, K., Kazuko, S. G., Metherall, J. E. and Letsou, A.** (2006). *scylla* and *charybde*, homologues of the human apoptotic gene *RTP801*, are required for head involution in *Drosophila*. *Dev Biol* **291**(1): 110-122.
- Sepp, K. J. and Auld, V. J.** (1999). Conversion of lacZ enhancer trap lines to GAL4 lines using targeted transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**(3): 1093-1101.
- Sepp, K. J., Schulte, J. and Auld, V. J.** (2000). Developmental dynamics of peripheral glia in *Drosophila melanogaster*. *Glia* **30**(2): 122-133.
- Shank, R. P., Bennett, G. S., Freytag, S. O. and Campbell, G. L.** (1985). Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools. *Brain Res* **329**(1-2): 364-367.
- Shoshani, T., Faerman, A., Mett, I., Zelin, E., Tenne, T., et al.** (2002). Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, *RTP801*, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**(7): 2283-2293.
- Sigrist, S. J., Thiel, P. R., Reiff, D. F., Lachance, P. E., Lasko, P. and Schuster, C. M.** (2000). Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature* **405**(6790): 1062-1065.
- Sigrist, S. J., Thiel, P. R., Reiff, D. F. and Schuster, C. M.** (2002). The postsynaptic glutamate receptor subunit DGluR-IIA mediates long-term plasticity in *Drosophila*. *J Neurosci* **22**(17): 7362-7372.

- Sigrist, S. J., Reiff, D. F., Thiel, P. R., Steinert, J. R. and Schuster, C. M.** (2003). Experience-dependent strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci* **23**(16): 6546-6556.
- Sofer, A., Lei, K., Johannessen, C. M. and Ellisen, L. W.** (2005). Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol* **25**(14): 5834-5845.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J. E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**(6418): 318-324.
- Spradling, A. C., Stern, D. M., Kiss, I., Roote, J., Lavery, T. and Rubin, G. M.** (1995). Gene disruptions using *P* transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(24): 10824-10830.
- Spradling, A. C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E. J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S. and Rubin, G. M.** (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single *P*-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* **153**(1): 135-177.
- Steinert, J. R., Kuromi, H., Hellwig, A., Knirr, M., Kidokoro, Y. and Schuster, C. M.** (2006). Experience-dependent formation and recruitment of large vesicles from reserve pool. *Neuron* **50**(5): 723-733.
- Steinert, J. R., Pfenning, P. N., Litzenburger, U. M., Wyatt, A. W., Wismar, J., Schmitt, B., Kuzin, B., Enikolopov, G. and Schuster, C. M.** (2007). Retrograde Nitric Oxide Signaling Activates Presynaptic NMDA Receptors. (manuscript in preparation)
- Steward, O. and Levy, W. B.** (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* **2**(3): 284-291.
- Steward, O. and Schuman, E. M.** (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* **24**: 299-325.
- Stewart, B. A., Atwood, H. L., Renger, J. J., Wang, J. and Wu, C. F.** (1994). Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol [A]* **175**(2): 179-191.
- Stewart, B. A., Schuster, C. M., Goodman, C. S. and Atwood, H. L.** (1996). Homeostasis of synaptic transmission in *Drosophila* with genetically altered nerve terminal morphology. *J Neurosci* **16**(12): 3877-3886.
- Stimson, D. T. and Ramaswami, M.** (1999). Vesicle recycling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol* **43**: 163-189.
- Sun, B. and Salvaterra, P. M.** (1995a). Two *Drosophila* nervous system antigens, Nervana 1 and 2, are homologous to the β subunit of Na^+, K^+ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(12): 5396-5400.
- Sun, B. and Salvaterra, P. M.** (1995b). Characterization of nervana, a *Drosophila melanogaster* neuron-specific glycoprotein antigen recognized by anti-horseradish peroxidase antibodies. *J Neurochem* **65**(1): 434-443.

- Sun, B., Wang, W. and Salvaterra, P. M.** (1998). Functional analysis and tissue-specific expression of *Drosophila* Na⁺,K⁺-ATPase subunits. *J Neurochem* **71**(1): 142-151.
- Suzuki, D. T., Grigliatti, T. and Williamson, R.** (1971). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. VII. A mutation (*para^{ts}*) causing reversible adult paralysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**(5): 890-893.
- Tachikawa, M., Fukaya, M., Terasaki, T., Ohtsuki, S. and Watanabe, M.** (2004). Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci* **20**(1): 144-160.
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A. C., Sonenberg, N. and Schuman, E. M.** (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(1): 467-472.
- Tang, Y., Pacary, E., Freret, T., Divoux, D., Petit, E., Schumann-Bard, P. and Bernaudin, M.** (2006). Effect of hypoxic preconditioning on brain genomic response before and following ischemia in the adult mouse: identification of potential neuroprotective candidates for stroke. *Neurobiol Dis* **21**(1): 18-28.
- Tarentino, A. L., Gomez, C. M. and Plummer, T. H., Jr.** (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* **24**(17): 4665-4671.
- Tejedor, F. J., Bokhari, A., Rogero, O., Gorczyca, M., Zhang, J., Kim, E., Sheng, M. and Budnik, V.** (1997). Essential role for dlG in synaptic clustering of Shaker K⁺ channels *in vivo*. *J Neurosci* **17**(1): 152-159.
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. and Fehon, R.** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**: 747-784.
- The Flybase Consortium** (2003). The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res* **31**(1): 172-175.
- Theodosiou, N. A. and Xu, T.** (1998). Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods* **14**(4): 355-365.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., et al.** (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using *P* and *piggyBac*. *Nat Genet* **36**(3): 283-287.
- Thomas, U., Kim, E., Kuhlendahl, S., Koh, Y. H., Gundelfinger, E. D., Sheng, M., Garner, C. C. and Budnik, V.** (1997). Synaptic clustering of the cell adhesion molecule fasciclin II by discs-large and its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron* **19**(4): 787-799.
- Tischmeyer, W., Schicknick, H., Kraus, M., Seidenbecher, C. I., Staak, S., Scheich, H. and Gundelfinger, E. D.** (2003). Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *Eur J Neurosci* **18**(4): 942-950.
- Torroja, L., Packard, M., Gorczyca, M., White, K. and Budnik, V.** (1999). The *Drosophila* beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* **19**(18): 7793-7803.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**(9): 4350-4354.

Trimble, W. S., Cowan, D. M. and Scheller, R. H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**(12): 4538-4542.

Tucker, W. C. and Chapman, E. R. (2002). Role of synaptotagmin in Ca^{2+} -triggered exocytosis. *Biochem J* **366**(1): 1-13.

van de Goor, J., Ramaswami, M. and Kelly, R. (1995). Redistribution of synaptic vesicles and their proteins in temperature-sensitive *shibire^{ts1}* mutant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(12): 5739-5743.

van de Goor, J. and Kelly, R. B. (1996). Association of *Drosophila* cysteine string proteins with membranes. *FEBS Lett* **380**(3): 251-256.

van der Heide, L. P., Kamal, A., Artola, A., Gispen, W. H. and Ramakers, G. M. (2005). Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-D-aspartate receptor and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent manner. *J Neurochem* **94**(4): 1158-1166.

Vilinsky, I., Stewart, B. A., Drummond, J., Robinson, I. and Deitcher, D. L. (2002). A *Drosophila* SNAP-25 null mutant reveals context-dependent redundancy with SNAP-24 in neurotransmission. *Genetics* **162**(1): 259-271.

von der Brellie, C., Waltereit, R., Zhang, L., Beck, H. and Kirschstein, T. (2006). Impaired synaptic plasticity in a rat model of tuberous sclerosis. *Eur J Neurosci* **23**(3): 686-692.

Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Dürrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M. C., Schmidt, M., Qin, G., Wichmann, C., Kittel, R., Sigrist, S. J. and Buchner, E. (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* **49**(6): 833-844.

Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K. and Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* **281**(1): 21-40.

Wang, Y. E., Esbensen, P. and Bentley, D. (1998). Arginine kinase expression and localization in growth cone migration. *J Neurosci* **18**(3): 987-998.

Wang, Z., Malone, M. H., Thomenius, M. J., Zhong, F., Xu, F. and Distelhorst, C. W. (2003). Dexamethasone-induced gene 2 (*dig2*) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals. *J Biol Chem* **278**(29): 27053-27058.

Westergaard, N., Banke, T., Wahl, P., Sonnewald, U. and Schousboe, A. (1995). Citrate modulates the regulation by Zn^{2+} of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated channel current and neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(8): 3367-3370.

Whitmore, D., Cermakian, N., Crosio, C., Foulkes, N. S., Pando, M. P., Travnickova, Z. and Sassone-Corsi, P. (2000). A clockwork organ. *Biol Chem* **381**(9-10): 793-800.

- Wilson, C., Pearson, R. K., Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Grossniklaus, U. and Gehring, W. J.** (1989). P-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev* **3**(9): 1301-1313.
- Woods, D. F. and Bryant, P. J.** (1991). The *discs-large* tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* **66**(3): 451-464.
- Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N.** (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**(3): 471-484.
- Wyss, M., Maughan, D. and Wallimann, T.** (1995). Re-evaluation of the structure and physiological function of guanidino kinases in fruitfly (*Drosophila*), sea urchin (*Psammechinus miliaris*) and man. *Biochem J* **309**(1): 255-261.
- Yu, A. C., Drejer, J., Hertz, L. and Schousboe, A.** (1983). Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem* **41**(5): 1484-1487.
- Zhai, R. G. and Bellen, H. J.** (2004). The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)* **19**: 262-270.
- Zhang, X., Shu, L., Hosoi, H., Murti, K. G. and Houghton, P. J.** (2002). Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. *J Biol Chem* **277**(31): 28127-28134.
- Zhong, J., Zhang, T. and Bloch, L. M.** (2006). Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons. *BMC Neurosci* **7**: 17.
- Zhong, Y., Budnik, V. and Wu, C. F.** (1992). Synaptic plasticity in *Drosophila* memory and hyperexcitable mutants: role of cAMP cascade. *J Neurosci* **12**(2): 644-651.
- Zinsmaier, K. E. and Bronk, P.** (2001). Molecular chaperones and the regulation of neurotransmitter exocytosis. *Biochem Pharmacol* **62**(1): 1-11.
- Zito, K., Fetter, R. D., Goodman, C. S. and Isacoff, E. Y.** (1997). Synaptic clustering of Fascilin II and Shaker: essential targeting sequences and role of Dlg. *Neuron* **19**(5): 1007-1016.

ANHANG

Übersicht über alle identifizierten Gene mit neuromuskulär lokalisierten GFP-Fusionsproteinen

Muster	Gen	Protein	Integrität m_M in kDa	NME	Dynamik 18°C/29°C
A	<i>shaggy</i>	GSK3	97 (54/59)	<i>wt</i>	nb
	<i>Neuroglian</i>	Fibronectin III	190/205 (138/144)	<i>wt</i>	+
	CG15926 ¹		70 (17)	+	0
	<i>Basigin</i> (RA-F, H, I)	Ig-like	60 (29)	<i>wt</i>	0
	<i>Basigin</i> (RG) ²	Ig-like	60 (32)	-	-
	<i>Calmodulin</i> (RA)	Calmodulin	50 (17)	nb	-
	<i>Calmodulin</i> (RA, B)	Calmodulin	50 (17)	nb	-
	<i>Rho1</i>	Rho1-GTPase	55 (22)	nb	-
B	<i>Rtn1</i>	Reticulon	120 (26/64)	<i>wt</i>	0
	<i>VhaSFD</i>	Vakuolen-Protonen-Pumpe	90/95 (51/54/62)	-	0
	<i>Arginine kinase</i>	Argininekinase	70/90 (48/61)	+	0
	<i>charybde</i>	RTP801-like	64 (32)	<i>wt</i>	0
	<i>Atpa</i>	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	140/150 (116) ³	+	nb
	<i>Snap25</i> (Intron 3)	SNAP-25	60 (17/24)	nb	nb
C	<i>dunce</i>	cAMP-PDE	110 (85)	+	0
	CG2991 ¹	Ubiquitin-Ligase	87 (63)	+	+
	<i>gilgamesh</i>	Caseinkinase 1 γ	76/81 (41/52)	+	nb
	<i>I'm not dead yet</i>	Carboxylat-Transporter	90 (63)	+	+
D	<i>Imp</i>	IGF-II mRNA-bindendes Protein	90 (62)	+	nb

Tabelle 8: Übersicht über alle von GFP-Insertionen betroffenen Gene. Molekulare Integrität und erfahrungsabhängige Expressionsdynamik der GFP-Fusionsproteine sowie neuromuskuläre Morphologie der „protein trap“-Linien.

Spalte 1 gibt das Lokalisationsmuster der Fusionsproteine an (A: prä- und postsynaptisch; B: präsynaptisch; C: postsynaptisch; D: andere Muster). Die Spalten 2 und 3 geben den Namen des von der Insertion betroffenen Gens/Transkripts und seine molekulare Funktion an (¹ Insertion in 5'-UTR; ² Insertion in Exon). Spalte 4 gibt die per Immunoblot bestimmte Molekülmasse der GFP-Fusionsproteine an. In Klammern ist jeweils die theoretische Molekülmasse des endogenen Proteins angegeben (³ Vorläufer-Protein). Aus Spalte 5 geht hervor, wie sich die Morphologie der NME gegenüber *Wildtyp*-Larven verändert (*wt*: Boutonzahl gegenüber *Wildtyp* unverändert; +: Boutonzahl gegenüber *Wildtyp* signifikant erhöht; -: Boutonzahl gegenüber *Wildtyp* signifikant verringert; nb: nicht bestimmt). Spalte 6 stellt die Veränderung des erfahrungsabhängigen Expressionsniveaus dar (0: keine Veränderung des Expressionsniveaus; +: signifikant erhöhte Expression; -: signifikant verringerte Expression; nb: nicht bestimmt).

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	eIF4E-bindendes Protein
Abd-A/B	Abdominal-A/B
APP	Amyloid Precursor Protein
Argk	Argininkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRP	Bruchpilot
cAMP-PDE	cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase
cDNA	complementary DNA
Chrb	Charybde
CSP	Cystein String Protein
Cy3	Carbocyanin 3
DDIT4(L)	DNA damage inducible transcript 4(-like)
Dlg	Discs large
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DnaK	bakterielles Hsp70-Protein
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Dpp	Decapentaplegic
EAAT1	Exitatory amino acid transporter 1
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
eIF4E/G	Eukaryontischer Initiationsfaktor 4 E/G
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fas2	Fasciclin 2
"FITC"	Fluorescein
FLP/FRT	Flp-Rekombinase / Flp-recombinase target
GABA	gamma-amino-butyric-acid
GFP	green fluorescent protein
Gish	Gilgamesh
GluRIIA	Glutamatrezeptor IIA
GSK-3	Glycogensynthasekinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HL(3)	hemolymph like (3)

HRP	horseradish peroxidase
IGF	Insulin-like growth factor
Ig-like	Immunoglobulin-like
INDY	I'm not dead yet
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LDL	Low density lipoprotein
LN ₂	liquid nitrogen; flüssiger Stickstoff
LRP5/6	LDL-receptor-related proteins 5/6
LTD	long term depression
LTP	long term potentiation
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaC2/3	Sodium/calcium exchanger 2/3
NGS	normal goat serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NME	neuromuskuläre Endplatte
OD	optical density
PABP	PolyA bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PBT	PBS-Triton
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	N-Glycosidase F
PNS	peripheres Nervensystem
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTT	protein trap transposon
REDD1/2	Regulated in development and DNA damage 1/2
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RNAi	RNA-Interferenz
RU486	Mifepriston
Sb	Stubbled
Scyl	Scylla
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	Serrate
SMHS1	Skeletal muscle hindlimb suspension 1
SNAP-24/25	Synaptosomal-associated membrane protein of 24/25 kDa
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

SSR	subsynaptisches Retikulum
Syn	Synapsin
Syt	Synaptotagmin
TAE	tris-acetate-EDTA
TBE	tris-borate-EDTA
TCA	trichloric acid
TM2/3	Balancer (Chromosom III)
TOR	Target of rapamycin
TORC1/2	TOR-complex 1/2
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	tubero sclerosis complex
UAS	upstream activating sequence
Ubx	Ultrabithorax
UTR	untranslated region; untranslatierte Region
Wg	Wingless
Zen	Zerknüllt
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christoph Schuster für die Förderung meiner Arbeit und das in mich gesetzte Vertrauen, das es mir erlaubte frei zu forschen. Seine motivierende und engagierte Betreuung haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rolf Reuter für die Bereitschaft zur Erstellung des Zweitgutachtens.

Ich danke Herrn Dr. Xavier Morin und Herrn Prof. Dr. William Chia für die Überlassung der GFP-Exon-Trap-Linien, die die Basis dieser Arbeit bildeten sowie für die umfangreiche Hilfe während des Sequenzierungs-Projektes. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch Dr. Sunanda Marella, die dieses Projekt initiiert hat und deren Freundschaft und Hilfsbereitschaft mir nicht nur den Laboralltag erleichtert haben. Bei Dr. Jan Reiling und Herrn Prof. Dr. Ernst Hafen bedanke ich mich für die intensive Kooperation bei der Erforschung Charybdes. Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern des Labors Oliver Gruß für die vielfältige Hilfe im Bereich der Proteinexpression und -biochemie bedanken.

Mein Dank gilt den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Labors Christoph Schuster in Heidelberg und Tübingen. Ganz besonders möchte ich mich bei Ulli, Philipp und Joni für die gemeinsam verbrachten Stunden bedanken.