



**Analyse der Funktion des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Futsch
während der Entwicklung des neuronalen Cytoskeletts bei
*Drosophila melanogaster***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Stefanie Gögel
aus Münster

-2004-

Dekan: Prof. Dr. A. Steinbüchel

Erster Gutachter: Prof. Dr. C. Klämbt

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. M. Bähler

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2004

Tag der Promotion: 30.07.2004

1.	Einleitung	1
1.1	Die Funktion des Mikrotubuli-Cytoskeletts während der neuronalen Entwicklung	1
1.2	Molekulare Eigenschaften des MAP1B Proteins	3
1.3	Die funktionelle Aktivität von MAP1B ist von seiner Phosphorylierung abhängig	3
1.4	Sequenzanalysen von <i>futsch</i> zeigen hohe Homologie zu MAP1B	4
1.5	Die <i>futsch</i> -Mutation	6
1.6	Synaptogenese an der <i>Drosophila</i> neuromuskulären „Junction“ (NMJ)	7
1.7	Das Fragile X Syndrom wird durch den Verlust eines RNA bindenden Proteins verursacht	8
1.8	Das <i>Drosophila</i> Fragile X Protein, dFMR 1, reguliert neuronale Morphologie und Funktion	9
1.9	Ziel der Arbeit	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Puffer, Medien, Lösungen	11
2.1.3	Vektoren	18
2.1.4	Oligonukleotide	19
2.1.5	Bakterienstämme	19
2.1.6	Antikörper	19
2.1.7	Verwendete Fliegenstämme	20
2.2	Methoden	22
2.2.1	Genetische Methoden	22
2.2.2	Histologische Methoden	24
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.4	Biochemische Methoden	33
2.2.5	Zellkultur Methoden	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	Das Expressionsmuster des 22C10-Epitops	40
3.2	Die <i>futsch</i> Mutation ist gekennzeichnet durch ein verändertes 22C10-Expressionsmuster	41
3.3	Untersuchungen an der <i>Drosophila</i> NMJ	41
3.3.1	<i>Drosophila</i> Futsch reguliert die synaptische Mikrotubuli-Organisation und ist für synaptisches Wachsen notwendig	41
3.3.2	Mutationen in den Komponenten der <i>wingless</i> -Signaltransduktionskaskade führen zu einem <i>futsch</i> -ähnlichen Synapsenphänotyp	43
3.3.3	Funktion des Fragile X Proteins während der Synaptogenese	46
3.4	Generierung einer Futsch cDNA mit Hilfe der Gene SOEing Methode	47
3.5	Klonierung der verschiedenen Futsch-Konstrukte, die in dieser Arbeit Verwendung fanden	49
3.5.1	Klonierung von <i>futsch</i> ^{N-Term} , <i>futsch</i> ^{C-Term} und <i>futsch</i> ^{N+C-Term} in den pUAST-Vektor	49
3.5.2	Klonierung der MAP1B-homologen Proteindomänen von Futsch in Expressionsvektoren zur Untersuchung der rekombinanten Proteine	49
3.5.3	Klonierung der Futsch-Domänen, die für potentielle Phosphorylierungsstellen kodieren, in den pMAL-Vektor	51
3.5.4	Klonierung der Futsch-Domänen, die für eine potentielle Phosphorylierungsstelle kodieren, in den pUAST-Vektor	52
3.6	Subzelluläre Lokalisation von Futsch	52
3.6.1	In Zellkultur colokalisieren der N- und der C-Terminus von Futsch mit dem Aktin-Cytoskelett	52
3.6.2	F-Aktin-Bindungstest	53
3.6.3	Mikrotubuli-Bindungstest	54

3.7	Etablierung von transgenen UAS- <i>futsch</i> -Fliegen	56
3.8	Ektopische Expression der der UAS- <i>futsch</i> -Konstrukte	56
3.9	Partielle Rettung des <i>futsch</i> Synapsenphänotyps durch spezifische Expression der UAS- <i>futsch</i> -Konstrukte	57
3.10	Generierung weiterer anti-Futsch Antikörper	59
3.10.1	Die Expressionsmuster der polyklonalen Antikörper im Embryo entsprechen dem 22C10-Expressionsmuster	60
3.10.2	Das Expressionsmuster des polyklonalen Antikörper anti-C-Term in der Augenimaginalscheibe entspricht dem 22C10-Expressionsmuster	60
3.11	Kartierung des 22C10 Epitops	61
3.12	Eine Phosphorylierungsstelle von MAP1B für die GSK3 β findet man auch im Futsch Protein	62
3.12.1	<i>In-vitro</i> Kinase-Test	63
3.12.2	Zellkultorexperimente zeigten keine Phosphorylierung von Futsch durch die Shaggy Kinase	64
3.13	Futsch wird nicht in eine leichte und schwere Kette gespalten wie MAP1B	65
4.	Diskussion	67
4.1	Die Methode des Gene SOEing zur Generierung einer „cDNA“	67
4.2	Futsch interagiert mit cytoskelettalen Komponenten	68
4.2.1	Futsch colokalisiert mit F-Aktin	68
4.2.2	Futsch interagiert mit dem Mikrotubuli-Cytoskelett	69
4.3	Wird die Funktion von Futsch durch Phosphorylierung reguliert?	70
4.4	Die Phosphorylierung erfolgt in spezifischen subzellulären Kompartimenten	72
4.5	Die Bedeutung der Wingless-Signaltransduktionskaskade während der Synaptogenese an der <i>Drosophila</i> NMJ	73
4.6	Der <i>futsch</i> -mutante Synapsenphänotyp kann durch die Expression funktionell wichtiger Domänen abgeschwächt werden	75
5.	Zusammenfassung	78
6.	Literatur	79
7.	Anhang	85

1. Einleitung

Die ausgeprägte und zum Teil hoch komplexe neuronale Differenzierung und die spezifische Verschaltung der Neurone des peripheren und des zentralen Nervensystems erfordern einen präzise regulierten Aufbau des Cytoskeletts. Dieses setzt sich in der Regel aus drei Komponenten zusammen: den Intermediärfilamenten, die in *Drosophila* allerdings nicht nachgewiesen wurden, den Aktin- und den Mikrotubulifilamenten. Letztere sind im Axon polar organisiert, man unterscheidet in Plus- und Minus-Ende. Das Plus-Ende zeigt im Axon immer zur Synapse; im Dendriten sind beide Orientierungen zu finden.

Die Regulation des Aktin-Cytoskeletts wird durch kleine GTPasen der Rho-Familie kontrolliert (Hall, 1998). Die Regulation der Mikrotubuli-Dynamik wird von einer großen Anzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) gesteuert, die in drei Klassen eingeteilt werden (Schoenfeld und Obart, 1994): die niedermolekulare Gruppe der MAPs setzt sich zusammen aus Kinesin-ähnlichen Proteinen, Dynamin, MAP2c und Tau. Die intermediäre Gruppe besteht aus MAP3 und MAP4 Proteinen, die hochmolekulare Gruppe setzt sich zusammen aus MAP1A, MAP1B, MAP2 und cytoplasmatischem Dynein.

Man unterscheidet MAPs in Proteine mit Motoreigenschaften, wie z.B. Dynein oder Kinesin, und solche ohne Motoreigenschaften, wie z.B. Tau, MAP1A/B oder MAP2 (Schoenfeld und Obart 1994). Durch „antisense“-Experimente konnte eine Funktion der nicht-Motor-MAPs für die Differenzierung neuronaler Zellen gezeigt werden (Caceres und Kosik 1990; Caceres et al., 1992). Die Bedeutung der nicht-Motor-MAPs in der Etablierung der Zellform wurde von ihrer unterschiedlichen Assoziation mit den neuronalen Kompartimenten abgeleitet. So ist MAP2 hauptsächlich im Dendriten und im neuronalen Soma, während Tau dagegen nur im Axon exprimiert ist. MAP1A/B Proteine finden sich im Dendriten, im Soma und im Axon.

1.1 Die Funktion des Mikrotubuli-Cytoskeletts während der neuronalen Entwicklung

Die *in-vivo* Funktion der verschiedenen MAPs während der Entwicklung eines Nervensystems ist noch unklar, jedoch lässt ihre Expression in sich entwickelnden und in regenerierenden Nerven auf eine Rolle im axonalen Auswachsen schließen. Erste Beweise hierfür stammen von „antisense“-Experimenten in Zellkultur: „antisense“-RNA von Tau blockiert das Auswachsen von Axonen in kultivierten Neuronen (Pizzi et al., 1993 und 1995;

Liu et al., 1999). Ebenso führt der Verlust von MAP1B oder MAP2 RNA durch „antisense“-RNA oder durch Freisetzung spezifischer Antikörper zu einer Reduktion oder Inhibition des axonalen Wachstums in kultivierten Zellen (Caceres und Kosik 1990; Caceres et al., 1992; Brugg et al., 1993; Shea und Beermann 1994).

„Knock out“-Experimente an Mäusen haben weiteren Aufschluss über die Funktion der MAPs im sich entwickelnden Nervensystem gegeben. Sie haben gezeigt, dass der Verlust von *tau* zu keinen dramatischen Änderungen führt, da möglicherweise das verwandte MAP2c Protein den Verlust der *tau* Funktion kompensieren kann (Harada et al., 1994). MAP1B „knock out“-Experimente ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Es sind vier „Knock out“-Mäuse beschrieben worden, die jedoch unterschiedliche Phänotypen aufweisen (Edelmann et al., 1996; Takei et al., 1997; Gonzalez-Billault et al., 2000; Meixner et al., 2000). Der komplette Verlust der *map1b* Funktion zeigte, daß MAP1B für embryonale Lebensfähigkeit nötig ist. Sogar heterozygote Tiere zeigen Phänotypen wie langsamere Wachstumsrate und Motorsystemabnormalitäten (Edelmann et al., 1996). Die durch den kompletten Verlust der *map1b* Funktion hervorgerufenen dramatischen neuronalen Phänotypen wurden jedoch noch nicht eingehend zellbiologisch charakterisiert. Diese Phänotypen sind sehr ähnlich zu denen, die man in *Drosophila futsch*^{P158}-mutanten Tieren beobachtet. Diese wurden in einem Screen auf Mutationen gefunden, in denen die Musterbildung im embryonalen Nervensystem gestört ist (Hummel et al., 1999).

In einer weiteren „Knock out“-Maus sind nicht alle MAP1B „splice-Varianten“ betroffen, so dass noch Restexpression detektiert werden kann (Takei et al., 1997; Kutschera, 1998). Es handelt sich also um eine hypomorphe Mutation. Homozygot mutante Mäuse sind zwar lebensfähig, zeigen aber eine verzögerte Entwicklung des Nervensystems ähnlich dem Phänotyp von *futsch*^{K68}- oder *futsch*^{N94}-mutanten Tieren.

Eine MAP1B „knock out“-Mutante von Edelmann et al. resultiert ebenfalls in einer Trunkierung des Gens, wobei die 571 Aminosäuren große N-terminale Domäne intakt bleibt (Edelmann et al. 1996), für die eine dominant negative Aktivität postuliert wurde (Takei, et al., 1997).

Die von Gonzalez-Billault et al. generierte „Knock out“-Maus trägt eine hypomorphe Mutation. Sie ist perinatal letal und zeigt starke Defekte im Nervensystem, z.B. in der Großhirnrinde, Hippocampus und Kleinhirn, was die Funktion von MAP1B für neuronale Migration und axonale Wegfindung bestätigt (Gonzalez-Billault et al., 2000; Meixner et al., 2000).

1.2 Molekulare Eigenschaften des MAP1B Proteins

MAP1B cDNA Klone und Sequenzen sind u.a. von der Maus (Noble et al., 1989), der Ratte (Garner et al., 1990), dem Menschen (Lien et al., 1994) und dem Huhn bekannt (Burg et al., 1997). Die genomische Organisation ist in Maus, Ratte und Mensch untersucht. Der ORF besteht aus 7 kodierenden und 2 nicht-kodierenden Exons, die sich über 101 kb erstrecken, wobei die *map1b* mRNA in Säugern nur 9 kb groß ist. Bei Maus, Ratte und Mensch kodieren die Transkripte für Proteine aus 2464, 2459 bzw. 2468 Aminosäuren. Es gibt zwei alternative Promotoren. Eine Homologie von >90% unter den Säugern zeigt, wie hochkonserviert dieses Protein ist. Das Protein wird als Polyprotein translatiert und besteht aus einer schweren und einer leichten Kette, LC1, die nach der Translation vom C-Terminus abgespalten wird (Hammarback et al., 1991). Ein separates Genprodukt kodiert für eine weitere leichte Kette, LC3, die ebenso wie LC1 an die schwere Kette binden kann (Vallee und Davis, 1982; Kuznetsov et al., 1986). LC1 bindet an die ersten 508 Aminosäuren der schweren Kette und kann auch direkt an die Mikrotubuli binden (Zauner et al., 1992; Tögel et al., 1998).

Das Protein enthält eine stark basische Region in der N-terminalen Hälfte der schweren Kette mit einem kurzen sich 21x wiederholenden Motiv Lys-Lys-Glu-X, wobei X nahezu immer ein saurer oder hydrophober Rest ist. Transfektionsexperimente haben gezeigt, dass sich hier die Mikrotubuli-Bindungsdomäne befindet (Noble et al., 1989; Zauner et al., 1992). Es wurde vermutet, dass diese positiv geladene Domäne mit dem sich 21x wiederholenden Motiv eine α -helikale Struktur bildet, die an die negativ geladene β -helikale Domäne am Carboxyterminus von β -Tubulin bindet (Avila et al., 1991).

Die Regulierung der Funktion des MAP1B Proteins erfolgt zum einen über seine zeitlich begrenzte Expression, zum anderen aber auch über posttranslationale Modifikationen.

1.3 Die funktionelle Aktivität von MAP1B ist von seiner Phosphorylierung abhängig

Die Bindungseigenschaften und die Aktivität der MAPs werden durch ihre Phosphorylierung reguliert (Diaz-Nido et al., 1988; Ulloa et al., 1993a,b; Goold et al., 1999; Goold und Gordon-Weeks, 1999). Für MAP1B lässt sich eine graduelle Verteilung der phosphorylierten Form nachweisen, wobei die höchste Konzentration im Wachstumskegel zu finden ist. Man unterscheidet zwei Klassen von Phosphorylierungen: Klasse I Phosphorylierung durch Serin/Threonin-Kinasen wie GSK3 β und CDK5, Klasse II Phosphorylierungen durch Casein

Kinase II (Ulloa et al., 1993a,b). Diese posttranslationale Modifikation ist für die *in-vivo* Funktion von MAP1B relevant (Mack et al., 2000). Die unilaterale Ablation von phosphoryliertem MAP1B im Wachstumskegel durch „microscale chromophore-assisted laser inactivation“ (micro-CALI) induziert Änderungen in der Wachstumsrichtung. Hieraus lässt sich für phosphoryliertes MAP1B eine Funktion in lokaler Stabilisierung und damit eine Steuerung des Wachstumskegels ableiten.

Die phosphorylierungsabhängige Regulierung von MAP1B und die anschließenden Effekte auf die Mikrotubuli Funktion sind allerdings komplex. Einige der Kinasen, die MAP1B phosphorylieren, sind bereits bekannt (Pedrotti et al., 1996; Pigino et al., 1997; Garcia-Perez et al., 1998; Goold et al., 2001 and 2003; Chang et al., 2003). Phosphorylierung durch die Casein Kinase II scheint die Affinität von MAP1B zu den Mikrotubuli zu erhöhen. Phosphorylierung durch GSK3 β scheint die Mikrotubuli in einem Stadium der dynamischen Instabilität zu halten, dass für die Wachstumskegelmotilität und Migration nötig ist (Goold et al., 1999).

Molekulare und genetische Analysen haben gezeigt, dass eine große Zahl extrazellulärer Signale an dem Prozeß der axonalen Wegfindung und der Synaptogenese beteiligt sind (Tessier-Lavigne und Goodman 1996; Dickson, 2002). Untersuchungen am neuronalen Cytoskelett zeigen, wie intrazelluläre Faktoren während der neuronalen Entwicklung Änderungen im Cytoskelett hervorrufen können (Tanaka und Sabry 1995). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass WNT7a axonales Auswachsen und Verzweigen induziert (Lucas und Salinas 1997; Lucas et al., 1998). Dieser Prozess wird über die GSK3 β vermittelt, eine Komponente des WNT-Signaltransduktionsweges (Lucas und Salinas 1997).

1.4 Sequenzanalysen von *futsch* zeigen hohe Homologie zu MAP1B

Sequenzanalysen haben gezeigt, dass der Futsch ORF starke Homologie zu MAP1B und MAP1A am N- und am C-Terminus zeigt. Der offene Leserahmen kodiert ein Protein mit 5327 Aminosäuren und einem Gewicht von ca. 570 kDa (vorhergesagt durch das European *Drosophila* Genome Project, EDGP). Die Homologie beschränkt sich jedoch auf die N-terminalen 500 Aminosäuren und die C-terminalen 200 Aminosäuren. Die große mittlere Domäne von Futsch zeigt eine hochrepetitive Struktur, 60 Wiederholungen einer 37 Aminosäuren großen Sequenz. Zwei Blöcke von 11 und 20 hochkonservierten Einheiten

werden flankiert von einer weniger konservierten Wiederholungseinheit (Homologie >40% Identität). Datenbank-Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Futsch Wiederholungseinheit einige Homologien zu den Neurofilamentproteinen zeigt (Wahrscheinlichkeit 10^{-14}). Interessanterweise wurde die Sequenz KSPXXXP, die häufig in den Futsch Wiederholungen und in den Neurofilamentproteinen gefunden wurde, als Zielsequenz der ERK2 Protein Kinasen beschrieben (Veeranna, 1998).

Die MAP1B Proteine und im Besonderen die N- und C-terminalen Proteindomänen sind während der Vertebratenevolution hochkonserviert. MAP1A und MAP1B Sequenzen sind weniger konserviert, aber die größte Übereinstimmung findet man in den Enden der Proteine (N-terminale Domäne = 70% Identität, C-terminale Domäne = 80% Identität). Dieselben Regionen zeigen starke Homologie zum Futsch Protein, weshalb Futsch wahrscheinlich ein Mitglied der Familie der MAPs repräsentiert. MAP1B unterscheidet sich von MAP1A durch zusätzliche 220 Aminosäuren im N-Terminus. Da die Homologie von Futsch innerhalb dieser Region beginnt, kann Futsch als MAP1B Homolog gesehen werden.

Eine MAP1B Mikrotubuli-Bindungsdomäne befindet sich im N-terminalen Bereich des Proteins zwischen den Aminosäuren 589 und 786 (Noble et al., 1989). MAP1B kann aber auch mit der leichten Kette direkt an die Mikrotubuli binden (Tögel et al., 1998). Die Mikrotubuli-Bindungsdomänen im N- und im C-Terminus von MAP1B sind im Futsch Protein nicht konserviert. Abbildung 1 verdeutlicht die Homologien zwischen menschlichem MAP1B, MAP1A und Futsch.

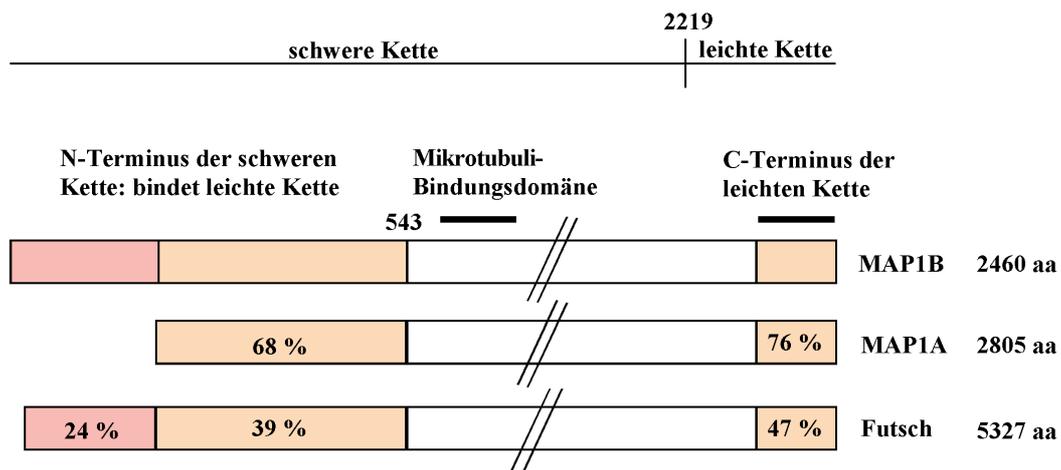


Abb. 1: MAP1B, MAP1A und Futsch sind hochkonservierte Proteine. Die Abbildung zeigt die Homologien zwischen menschlichen MAP1A, MAP1B und *Drosophila* Futsch. Die obere Linie kennzeichnet die Regionen der schweren und leichten Kette bei MAP1A und MAP1B. Gelb zeigt die homologen Regionen zwischen den 3 Proteinen, der Grad der Homologie zu MAP1B ist in Prozent angegeben. Rot kennzeichnet zusätzliche homologe Regionen zwischen MAP1B und Futsch. Der C-Terminus ist am stärksten konserviert. Für das MAP1B Protein wurde gezeigt, dass diese Region an Aktinfilamente und an die schwere Kette bindet. Die zweite hochkonservierte Region ist der N-Terminus, der auch zumindest in MAP1B die Bindungsstelle für die leichte Kette enthält.

Auffallend ist die Konservierung einer Phosphorylierungsstelle in MAP1B für die GSK3 β Kinase, die im Futsch Protein auch vorkommt. Sequenzhomologie und die subzelluläre Lokalisation legen nahe, dass Futsch ein Mikrotubuli assoziiertes Protein kodiert. Mikrotubuli setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen, α -Tubulin und β -Tubulin, die in Gegenwart von GTP polymerisieren können. Die so gebildeten röhrenförmigen Mikrotubulifilamente können durch Taxol stabilisiert werden und Mikrotubuli bindende Proteine können über ihre Bindung an Taxol-stabilisierte Mikrotubuli definiert werden. Das aus wildtypischen Fliegenköpfen gewonnene Futsch Protein kann mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli präzipitiert werden (Hummel et al., 2000). Futsch bindet also direkt oder indirekt an die Mikrotubuli, wobei die Mikrotubuli-bindenden Domänen des MAP1B Proteins aber nicht konserviert sind.

1.5 Die *futsch*-Mutation

In einer EMS Mutagenese, in der Mutationen gesucht wurden, die die Musterbildung im embryonalen Nervensystem stören, konnten fünf Allele isoliert werden, die zum Verlust bzw. zur starken Reduktion der 22C10 Expression führen (Hummel et al., 1999). Die Mutationen wurden daher „futsch“ genannt. Der monoklonale Antikörper 22C10, der im Labor von Seymour Benzer isoliert wurde, erkennt das Futsch Protein (Fujita 1982; Zipursky 1984).

Die Mutationen *futsch*^{K68} und *futsch*^{P158} führen zu einem vollständigen Verlust der 22C10 Expression, die Mutation *futsch*^{M454} zu einer stark reduzierten 22C10 Expression, die Mutationen *futsch*^{P28} und *futsch*^{N94} führen zu einer reduzierten 22C10 Expression und zeigen zusätzlich eine abnorme subzelluläre Verteilung des 22C10 Antigens.

Ein Western Blot mit Proteinextrakten aus Köpfen wildtypischer Fliegen zeigte, dass Futsch ein Protein von >570 kDa kodiert. In *futsch*^{K68}-mutanten Köpfen konnte kein Futsch Protein nachgewiesen werden, in *futsch*^{N94}-mutanten Köpfen wurden geringe Mengen eines verkürzten Proteins nachgewiesen.

Homozygot mutante *futsch*^{K68}-Tiere und homozygot mutante *futsch*^{N94}-Tiere sind lebensfähig, fertil, flugfähig und zeigen normales Verhalten. Eine Defizienz in der genomischen Region des *futsch* Genortes 1F-2A führt ebenfalls zu einem Verlust der 22C10 Expression und zu einem Nervensystem-Phänotyp, der *futsch*^{P158}-mutanten Tieren vergleichbar ist. Daher stellt *futsch*^{P158} wahrscheinlich eine amorphe Mutation dar, während es sich bei den Allelen *futsch*^{K68}, *futsch*^{N94}, *futsch*^{M454} und *futsch*^{P28} hypomorphe Mutationen handelt. In den

hypomorphen *futsch*-Mutanten ist das Nervensystem normal angelegt, allerdings ist die Ausbildung der Synapsen stark gestört (Hummel et al., 2000).

1.6 Synaptogenese an der *Drosophila* neuromuskulären „Junction“ (NMJ)

Die neuromuskuläre „Junction“ (NMJ) stellt die Verbindung zwischen Motoneuron und Muskel dar und ist als Modell für die Synaptogenese während der *Drosophila* Larvalentwicklung hervorragend geeignet.

Ein Mechanismus für die Bildung neuer Synapsen an einer Nervenendigung ist das „sprouting“ von neuen Boutons (Zito, 1999; Mathew et al., 2002). Die Teilung der synaptischen Boutons kann ebenfalls die Zahl der Synapsen erhöhen. Hier werden bereits bestehende aktive Zonen zwischen neu geformten Boutons aufgeteilt. Beide Prozesse erfordern ein präzise kontrolliertes Cytoskelett an der Nervenendigung, wobei die Signale, die diese Prozesse kontrollieren, noch nicht eingehend untersucht sind. Das präzise kontrollierte Cytoskelett könnte durch lokale Änderungen desselben erreicht werden und ist für die synapsenspezifische und aktivitätsabhängige Plastizität nötig (Roos et al., 2000).

Ein offensichtliches Rearrangement der Mikrotubuli „loop“-Architektur tritt während der Boutonteilung ein und eine genetische Analyse zeigte, dass *Futsch* für diesen Prozess nötig ist (Roos et al., 2000). *Futsch*-positive „loops“ sind in allen Typen synaptischer Boutons, das sind Typ 1b, 1s und II zu finden (siehe Keshishian et al., 1996 für die Definition der Bouton-Typen). Sie sind vermehrt an Verzweigungen der Nervenendigung, immer in den endständigen Boutons zu finden. Es gibt jedoch keine „loops“ an der Stelle der Muskelinnervation, an der das Axon die Muskeloberfläche kontaktiert.

futsch-Mutanten sind durch eine reduzierte Zahl von Boutons gekennzeichnet. Die *futsch*^{N94}-Mutation zeigt auch veränderte subzelluläre Lokalisation von *Futsch*. Hier füllt die *Futsch* Immunoreaktivität die ganze Synapse aus und ist diffus verteilt. Die Mikrotubuli Organisation in dieser Mutation ist ebenfalls gestört. Sowohl in *futsch*^{N94}- als auch in *futsch*^{K68}-mutanten Nervenendigungen bilden die Mikrotubuli keinen filamentösen cytoskelettalen Schaft. Zudem ist keine „loop“-Bildung zu erkennen. Die anti- β -Tubulin Färbung ist vielmehr diffus und punktiert, füllt die ganze Synapse aus und ist identisch mit der diffusen anti-*Futsch* (22C10) Färbung in *futsch*^{N94}-Mutanten. Doppelfärbungen mit *Futsch* und β -Tubulin haben gezeigt, dass die Colokalisierung auch dann zu sehen ist, wenn die Mikrotubuli-Organisation gestört ist, wie es in hypomorphen *futsch*-Mutanten zu sehen ist. Eine essentielle Rolle für *Futsch* als

Mikrotubuli-assoziiertes Protein könnte also in der Stabilisierung des offenen Endes eines „loops“ liegen (Roos 2000).

Ähnlich zu der Organisation der Mikrotubuli in der Synapse wurden dynamische „loop“-Strukturen auch im Wachstumskegel gefunden. Die Regulierung der Mikrotubuli Organisation in einem Wachstumskegel ist eine wichtige Determinante für Wachstumskegel-Motilität. Die makroskopische Organisation der Mikrotubuli im Wachstumskegel ist dynamisch, wie die Bildung und der Zusammenfall sogenannter „hairpin loops“-Strukturen zeigen, die einen großen Anteil der Mikrotubuli des Wachstumskegels beinhalten. (Tanaka, 1995; Dent, 1999). Interessant ist die Beobachtung, dass die Bildung dieser „hairpin loops“ mit dem Pausieren des Wachstumskegels korreliert ist, was für den Übergang von einem beweglichen Wachstumskegel zu einer stabilen synaptischen Verbindung nötig ist. Das Öffnen der „hairpin loops“ ermöglicht die Wiederaufnahme der Beweglichkeit des Wachstumskegels. Die molekularen Grundlagen der Mikrotubuli-Dynamik sind noch weitgehend unbekannt (Roos, 2000).

1.7 Das Fragile X Syndrom wird durch den Verlust eines RNA bindenden Proteins verursacht

Das Fragile X Syndrome wird durch eine „loss-of-function“ Mutation im Genlokus *fragile X mental retardation 1 (fmr1)* verursacht und ist die häufigste vererbte Erkrankung mit mentaler Retardierung. Sie kommt unter 1 von 4000 Männern bzw. 1 von 8000 Frauen vor (Gao, 2002; Ishizuka et al., 2002; Morales et al., 2002; Kogan et al., 2004). Die Erkrankung äußert sich in mentaler Retardierung unterschiedlicher Stärke, häufig autistisches Verhalten, Hyperaktivität, Aufmerksamkeitsdefizite und Schlafstörungen.

Die Krankheit wird zumeist durch die „loss-of-function“ Mutation aufgrund einer Expansion und Hypermethylierung von CGG Wiederholungen in der regulatorischen Region im Genlokus *fragile X mental retardation 1 (fmr1)* verursacht (Verkerk et al., 1991; Verheij et al., 1993). FMR1 ist ein RNA bindendes Protein, das in Neuronen des ZNS stark exprimiert wird. Da FMR1 sowohl Kernlokalisationsignal (NLS) und ein Kernexportsignal (NES) enthält (Eberhardt et al., 1996), wurde vermutet, dass es als „shuttle“ für den Transport seiner Ziel-RNAs zwischen Nucleus und Cytoplasma dient. Außerdem wird eine regulierende Rolle im Translationsprozess vermutet, da der dFMR1-mRNP-Komplex mit Polyribosomen im

Cytoplasma assoziiert (Jin und Warren 2000). In Übereinstimmung mit dieser Theorie haben Brown et al. (2001) in Zellen von Patienten mit Fragile X Syndrom gefunden, dass 251 mRNAs ein abnormes Polyribosomenprofil zeigen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Translation dieser mRNAs bei Fehlen von dFMR1 gestört ist. Untersuchungen an der Maus haben gezeigt, daß 432 mRNAs an den dFMR1-mRNA-Komplex binden (Brown et al., 2001). Eine der mRNAs, die an den dFMR1-mRNA-Komplex bindet, ist die *map1b* mRNA.

1.8 Das *Drosophila* Fragile X Protein, dFMR 1, reguliert neuronale Morphologie und Funktion

Untersuchungen an *Drosophila* haben gezeigt, dass dFMR1 eine wichtige Rolle in der Synaptogenese und dem axonalem Auswachsen spielt. Das *Drosophila* Protein zeigt starke Homologien in der Aminosäuresequenz mit dem Vertebraten Protein. Der hohe Grad an Homologie in Schlüsseldomänen wie KH Domäne, RGG box und „ribosomal association domain“ lassen auf eine artübergreifende funktionelle Konservierung schließen.

Zhang et al. konnten zeigen, dass die *futsch* mRNA mit dFMR1-spezifischen monoklonalen Antikörpern immunopräzipitiert, woraus zu schließen ist, dass sie mit dem dFMR1-mRNP-Komplex assoziiert ist (Zhang et al., 2001). Im *Drosophila* Nervensystem ist die Futsch Expression in *dfmr1*-Mutanten erhöht und eine Überexpression von dFMR1 führt zu einer reduzierten Expression von Futsch (Zhang et al., 2001). FMR1 fungiert also als translationaler Repressor der *futsch* mRNA.

Verhaltenstests haben aufgedeckt, dass *dfmr1*-mutante Fliegen ein unkoordiniertes Verhalten zeigen (Zhang et al., 2001). Untersuchungen an der *Drosophila* NMJ haben bewiesen, dass dFMR1 das Wachstum und die Funktion der Synapsen reguliert. *dfmr1*-mutante Larven zeigen an den synaptischen Endigungen stärkeres Wachstum, mehr Verzweigungen und eine Erhöhung der Zahl der synaptischen Boutons um ca. 50%. Die Überexpression von dFMR1 im prä- oder postsynaptischen Kompartiment verursacht eine Verringerung der Anzahl synaptischer Boutons. Die Größe der synaptischen Boutons konnte durch die Überexpression von dFMR1 im präsynaptischen Kompartiment verstärkt werden. Das Einkreuzen der *futsch*-Mutation rettete die durch *dfmr1* „loss-of-function“ verursachten strukturellen und funktionellen Defekte (Zhang et al. 2001). Dieses Ergebnis und die Tatsache, dass *futsch* mRNA mit dem dFMR1-mRNP-Komplex assoziiert und die Futsch Expression in *dfmr1*-

mutanten Tieren erhöht ist, lassen vermuten, dass dFMR1 die synaptische Struktur und Funktion reguliert, indem es die Translation der *futsch* mRNA inhibiert.

1.9 Ziel der Arbeit

Das Futsch Protein ist ein sehr großes Mikrotubuli-assoziiertes Protein (>570kDa), das für die korrekte Ausbildung des Mikrotubuli-Cytoskeletts von Bedeutung ist. Ziel der Arbeit war es, das Futsch Protein näher zu charakterisieren. Daher wurden zunächst einige Fusionsproteine hergestellt, die zur Klärung der Frage dienen sollten, mit welcher Domäne Futsch an die Mikrotubuli bindet und wie Futsch die Organisation der Mikrotubuli beeinflusst. Durch verschiedene *futsch*-Minigene sollten die *in-vitro* erhaltenen Daten auf ihre *in-vivo* Relevanz getestet werden. Die Aktivität des Vertebraten Homologs MAP1B wird durch Phosphorylierung durch u.a. der GSK3 β Kinase beeinflusst, die auch im *Drosophila* Genom gefunden wurde. Daher sollte auch untersucht werden, ob Futsch phosphoryliert wird und welche funktionelle Bedeutung eine eventuelle Phosphorylierung hat. Die Generierung spezifischer anti-Futsch Antikörper sollte zum weiteren Verständnis des Futsch Proteins beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den folgenden Firmen in der Qualität *pro-analysis* bezogen:

Aldrich (Steinheim)	Baker (Groß-Gerau)	Biomol (Hamburg)
Biozym (Hameln)	Fluka (Neu Ulm)	La Rouche (Mannheim)
GIBCO/BRL (Eggenstein)	Merck (Darmstadt)	Pharmacia/LKB (Freiburg)
Roth (Karlsruhe)	Serva (Heidelberg)	Sigma (Deisenhofen)

Alle Lösungen für molekularbiologische und Zellkultur Arbeiten wurden mit Reinstwasser angesetzt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

2.1.2 Puffer, Medien, Lösungen

Apfelsaftagarplatten	19 g Agar auf 500 ml H ₂ O geben, autoklavieren. 100 ml H ₂ O zugeben, aufkochen, 3 ml Eisessig zugeben.
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v) Coomassie R250 30% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	30% (v/v) Essigsäure 10% (v/v) Methanol
DAB	0,3 mg/ml DAB in PBS
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) DEPC in H ₂ O ü. N. lösen und autoklavieren.

<i>Drosophila</i> -Standardmedium	pro Liter Leitungswasser: 8,5 g Agar und 77 g Maismehl aufkochen, 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl, 82 g Malzextrakt und 41 g Rübensirup hinzugeben und auf eine Temperatur von 60°C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 1/5 Eßlöffel Nipagin hinzugeben.
1% FBS/EDTA	1% FBS in PBS 2 mM EDTA
Fixativ	für Speicheldrüsenchromosomen: Essigsäure / Wasser / Milchsäure 3:2:1
Heptan-Fix	400 ml 5% Formaldehyd in PBS 1:1 mit Heptan auffüllen, kräftig schütteln und nach Phasentrennung die gesättigte Heptanphase zur Fixierung verwenden.
Heptankleber	Zerkleinertes Klebeband (Tesapack; Beiersdorff, Hamburg) wird in einer Weithalsflasche (500 ml) mit 150 ml Heptan überschichtet. Durch Schütteln (ca. 5 h) den Kleber in Heptan lösen. Den Überstand für 20 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Den Überstand als Kleber verwenden.
Hoyer's Medium	50 ml H ₂ O und 30 g <i>Gummi arabicum</i> ü. N. rühren, 200 g Chloralhydrat und 16 ml Glycerin zugeben und verrühren.
Hybridisierlösung	100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA zum Hybridisierungspuffer geben.
Hybridisierungspuffer	50% Formamid 5 x SSC 0,1% Tween 20

Injektionsansatz	5 µg Vektor-DNA (pUAST-Konstrukt) 1,5 µg Helper-DNA (pUCHs □2-3; {Laski, 1986 #1029}) 1 µl sterile rote Lebensmittelfarbe 1,5 µl 10x Injektionspuffer ad 15 µl H ₂ O
Injektionspuffer (10x)	1 mM PO ₄ -Puffer, pH 7,4 50 mM KCl
IPTG	zur blau-weiß Selektion 100 mM IPTG in ddH ₂ O bei -20°C lagern
LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast Extract, 10 g NaCl ad 1 l H ₂ O, auf pH 7 einstellen und autoklavieren.
LB-Agarplatten	24 g Agar/1 l Medium
Loading Buffer (10x)	4 M Harnstoff 50% Saccharose 50 mM EDTA < 0,001% Xylencyanol < 0,001% Bromphenolblau
Lysis-Puffer (genom. DNA)	100 mM EDTA 100 mM Tris / HCl, pH 9,0 1% SDS
Lysis-Puffer (Proteinextrakte)	1% NP40 in ddH ₂ O 1 mM DTT 1 mM PMSF

10% Milchpulver	10 g Milchpulver in 100 ml 10%iger TBS/Tween Lösung mischen
Natriumhypochloritlösung	12% aktives Chlor (NaOCl) (Schindler & Co.) 1:1 mit H ₂ O verdünnen
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid
NBT-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl, pH 9,5
NZY-Medium	10 g NZ-Amine 5 g NaCl 5 g Bacto Yeast Extract 1 g Casamino Extract 2 g MgSO ₄ x 2 H ₂ O ad 1l H ₂ O, auf pH 7 einstellen und autoklavieren.
Orcein-Milch-Essigsäure	2 g natürliches Orcein 50 ml Milchsäure 50 ml Eisessig filtrieren, 24 h stehen lassen erneut filtrieren
PBS	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl, pH 7,6
PBT	0,1% Triton X-100 in PBS
Phosphat-Puffer, 1 M, pH 7,2	68,4 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 31,6 ml 1M NaH ₂ PO ₄

Phosphat-Puffer, 1 M, pH 7,4	77,4 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 22,6 ml 1M NaH ₂ PO ₄
Ponceau S-Färbelösung	3% Essigsäure 0,3% Ponceau S
QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol 0,15% Triton X-100
QC	1 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15% Isopropanol
QF	1,25 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 8,5 15% Isopropanol
RNase-Wasser	0,2 µg/ml RNase in sterilem ddH ₂ O
SDS-Page	
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgel 4% (10ml)	1,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Roth) 2,5 ml 4x Sammelgelpuffer 0,1 ml 10% SDS 6,0 ml ddH ₂ O 100 µl 10% APS 10 µl TEMED

Trenngel 10% (30 ml)	10 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Roth) 7,5 ml 4x Trenngelpuffer 0,3 ml 10% SDS 12,1 ml ddH ₂ O 300 µl 10% APS 20 µl TEMED
2x SDS-Probenpuffer	0,125 M Tris 4% SDS 20% Glycerol 0,02% Bromphenolblau 0,2 M Dithiothreitol, auf pH 6,8 einstellen.
Elektrodenpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS, auf pH 8,3 einstellen.
SB-Medium	35 g Trypton 20 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O, pH 7,5 einstellen und autoklavieren.
SDS (10%)	10% Natriumdodecylsulfat in ddH ₂ O
SM-Puffer	10 mM NaCl 10 mM MgSO ₄ 10 mM 1 M Tris/HCl, pH 7,5
SOC-Medium	2% Bacto Trypton (Pepton 140) 0,5% Bacto Yeast Extract 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂

	10 mM MgSO ₄ autoklavieren und auf 20 mM Glucose einstellen.
SquiB - Puffer	10 mM Tris, pH 8,2 1 mM EDTA 25 mM NaCl unmittelbar vor der Verwendung auf 200 µg / ml Proteinase K einstellen.
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat
STET-Puffer	8% Saccharose 5% Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl, pH 8,0
TBE	89 mM Tris/HCl, pH 8,2 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TBS/Tween 20	20 mM Tris/HCl, pH7,6 137 mM NaCl 0,1% Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl, pH 8,2 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 129 mM Glycin 10% Methanol pH 8,2 - 8,4

Tris/HCl	1 M Trisbase mit HCl auf gewünschten pH-Wert einstellen.
Mowiol	12 g Mowiol in 30 g Glycerin (fluoreszenzfrei) 2 h unter intensivem Rühren lösen. Dabei leicht erwärmen. 30 ml ddH ₂ O zugeben und 5 min rühren. 60 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 zugeben. 10 min bei 56°C leicht rühren. 15 min bei 5000 g zentrifugieren. Den klaren Überstand portionieren und bei -20°C aufbewahren.
2x YT	16 g Trypton 10 g Yeast Extract 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O pH 7,5 mit 10N NaOH einstellen und autoklavieren.
X-Gal (40%)	zur blau - weiß Selektion 400 mg X-Gal in 10 ml DMF lösen Bei - 20°C lagern
2.1.3 Vektoren	
pBlueskript SK ⁺	Standardklonierungen Stratagene GmbH, Heidelberg
pGEM T-Easy	T/A-Klonierung von PCR-Produkten Promega, Mannheim
pGex 4T-1	Fusionsprotein-Expressionsvektor Amersham
pMAL	Fusionsprotein-Expressionsvektor New England Biolabs

pP (Ac ^{Bam})	Klonierungsvektor für Zellkulturtransfektion mit dem Actin 5c Promotor (Krasnow et al., 1989)
pQE	Fusionsprotein-Expressionsvektor Qiagen
pUAST	P-Element Transformationsvektor (Brand, 1993)

2.1.4 Oligonukleotide

Die für die verschiedenen Anwendungen verwendeten Oligonucleotide sind im Anhang aufgelistet.

2.1.5 Bakterienstämme

DH5 α	(GIBCO/BRL, Eggenstein)
Xl-1blue	(GIBCO/BRL, Eggenstein)
BL21	(Amersham Pharmacia Biotech)

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Quelle
1D4 (anti-Fasciclin II)	Maus	1:5	Helt and Goodman unveröffentlicht
22C10 (anti-Futsch)	Maus	1:50	Fujita, 1982
BP102	Maus	1:50	Patel and Goodman unveröffentlicht
anti- β -Galactosidase	Kaninchen	1:5000	Cappel
anti- β -Tubulin	Maus	1:400	Developmental Studies Hybidoma Bank

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Herkunft / Spezifität	Konjugation, Verdünnung	Quelle
Ziege anti-Maus	HRP, 1:500	Dianova GmbH
Ziege anti-Maus	Alkalische Phosphatase, 1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	HRP, 1:500	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	Alkalische Phosphatase, 1:1000	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	Cy2, Cy3 oder Cy5, 1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Maus	Cy2, Cy3 oder Cy5, 1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Ratte	Cy2, Cy3 oder Cy5, 1:200	Dianova GmbH
Ziege anti-Kaninchen	Alexa 488, 568 oder 647, 1:500	Molecular Probes
Ziege anti-Maus	Alexa 488, 568 oder 647, 1:500	Molecular Probes
Ziege anti-Ratte	Alexa 488, 568 oder 647, 1:500	Molecular Probes
anti- Digoxigenin	Alkalische Phosphatase, 1:2000	Roche

2.1.7 Verwendete Fliegenstämme

2.1.7.1 Allgemeine Balancer- und Wildtypstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
<i>OregonR</i>	Wildtyp	Lindsley, 1992
<i>w</i> ¹¹¹⁸	<i>w</i> ⁻ , sonst wildtypisch	Lindsley, 1992
TM2, <i>Ubx</i>	Balancer 3. Chromosom	Lindsley, 1992
TM3 ^{bb} , <i>Sb</i> P[<i>ry+</i> , <i>ftz-lacZ</i>]	Balancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
TM6 ^{bb} , <i>Tb</i> P[<i>w+</i> , <i>Ubx-lacZ</i>]	Balancer 3. Chromosom	Vässin, unveröffentlicht
<i>w</i> ⁻ ; TM3, <i>Sb</i> /TM6B, <i>Hu Tb</i>	Doppelbalancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
<i>w</i> ⁻ ; CyO/Sp; TM2/MKRS	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
FM7 ^{bb}	Balancer X Chromosom	Hiromi, unveröffentlicht
<i>w</i> ⁻ ; CyO ^{bb} P[<i>ry+</i> , <i>elav-lacZ</i>]/Sp;	Doppelbalancer 2./3. Chromosom	
TM2/TM6B ^{bb} P[<i>w+</i> , <i>Ubx-lacZ</i>]	Klämbt, unveröffentlicht	

2.1.7.2 Deletionsmutanten

Die Deletionsmutanten wurden aus dem Bloomington-Stock-Center, Bloomington, Indiana, USA bezogen. Die angegebenen Bruchpunkte entsprechen den in der Flybase gemachten Angaben zur genetischen Konstitution der Fliegenstämme.

Bezeichnung	Bruchpunkte	Quelle
<i>Df(1)AC7, w[*]/ FM7c</i>	1E3-4;2A10	Adelheid Degelmann, 1993
<i>Df(1)AD11, w[*]/ FM7c</i>	1B;2A	Adelheid Degelmann, 1993

2.1.7.3 P-Element Insertion

P{w ⁺ , [+mC]=EP}EP 1419 w[1118]	Pernille Rorth, 1996
---	----------------------

2.1.7.4 Verwendete Mutationen

Allel	Gen	Quelle
<i>futsch</i> ^{K68}	<i>futsch</i>	EMS, (Hummel, 1999)
<i>futsch</i> ^{N94}	<i>futsch</i>	EMS, (Hummel, 1999)
<i>futsch</i> ^{M455}	<i>futsch</i>	EMS, (Hummel, 1999)
<i>futsch</i> ^{P28}	<i>futsch</i>	EMS, (Hummel, 1999)
<i>futsch</i> ^{P158}	<i>futsch</i>	EMS, (Hummel, 1999)
<i>fmr1</i> ^{□113M}	<i>fragile X</i>	□2-3, (Zhang et al., 2001)
<i>shaggy</i> ¹⁰	<i>shaggy</i>	EMS, (Bourouis et al., 1989)
<i>wingless</i> ¹	<i>wingless</i>	EMS, (Couso und Martinez, 1989)

2.1.7.5 GAL4-Treiberlinien

Bezeichnung	Muster/Promotor,	Chromosom	Quelle
<i>da</i> -GAL4	<i>daughterless</i>	III	Wodarz, 1995
<i>elav</i> -GAL4	<i>elav</i>	III	Lin, 1994
<i>P163</i>	<i>PNS-spezifisch</i>	III	Klämbt, unveröffentlicht
<i>rho</i> -GAL4	<i>rhuboid</i>	II bzw. III	Ip and Levine, unveröffentlicht
<i>sca</i> -GAL4	<i>scabrous</i>	II	Hinz, 1994
<i>sim</i> -GAL4	<i>single-minded</i>	II bzw. III	Scholz, 1997
<i>sli</i> -GAL4	<i>slit</i>	II	Klämbt, 1996

2.1.7.6 UAS-Effektorlinien

Bezeichnung	Gen	Chromosom	Quelle
UAS- <i>sgg</i>	<i>shaggy</i>	III	Bourouis et al., 1989
UAS- <i>sgg</i> ^{activated}	<i>shaggy</i>	III	Bourouis et al., 1989
UAS- <i>sgg</i> ^{DN}	<i>shaggy</i>	III	Bourouis et al., 1989
UAS- <i>fragile X</i>	<i>fragile X</i>	III	Zhang et al., 2001

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

2.2.1.1 Fliegenzucht

Alle Fliegenstämme wurden auf *Drosophila*-Futtermedium in Standard-Plastiktöpfen bei 25°C gehalten. Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte, virginelle Weibchen 10h nach Verlassen des Pupariums bei 18 °C) und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

2.2.1.2 Sammeln von Embryonen

Für Einzel-Eiablagen wurden die Fliegen in ein leeres, mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt, das mit einer Apfelsaft-Agarplatte mit etwas frisch angerührter

Bäckerhefe verschlossen wurde. Die Apfelsaft-Agarplatte wurde alle 12h gewechselt und für maximal 2 Tage bei 4°C bis zur Fixierung gelagert.

2.2.1.6 Keimbahntransformation

Zur Keimbahntransformation wurde ein Eppendorf Transjektor 5246 eingesetzt. Für die Injektionen wurden nachgeschliffene (30°) *femtotipsII*-Kanülen (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Vor dem Aufsetzen auf das Injektionssystem wurde die *femtotipII*Kanüle mit 5 µl Injektionsmix befüllt.

2.2.1.6.1 Präparation der Embryonen

Zur Injektion wurden *w¹¹¹⁸*-Embryonen verwendet. Die Fliegen werden für Apfelsaft-agarplatten zur Ablage gesetzt. Die Platten wurden 1 x pro Stunde gewechselt und die Embryonen zur Injektion verwendet. Die Embryonen wurden mit einem Pinsel auf einen mit doppelseitigem Klebeband präparierten Objektträger transferiert. Mit einer Präpariernadel wurden die Embryonen manuell dechorionisiert und in einer Reihe auf einem Agarblock angeordnet (ca. 100 Embryonen/Reihe). Die Embryonen wurden mit einem mit Heptankleber beschichteten Deckglas aufgenommen und für ca. 20 min getrocknet (bis sich Falten in der Vitellinmembran zeigen). Anschließend wurden die Embryonen mit 10S-Öl (Votalef) überschichtet und für die Injektion verwendet.

2.2.1.6.2 Injektion eines Konstruktes

Embryonen und Injektionskanüle wurden an einem Inversen-Mikroskop (Leica) in einer Ebene ausgerichtet. Injektionen erfolgten nur in Embryonen, die sich noch im syncytialen Blastoderm Stadium befanden. Die Kanüle wurde in den posterioren Pol des Embryos gestochen und durch Betätigen der Injektionstaste des Transjektors wurde eine kleine Menge des Injektionsmixes in den Embryo injiziert. Die erfolgreiche Injektion kann anhand der roten Farbe des Injektionsmixes nachvollzogen werden. Nach erfolgter Injektion aller Embryonen wurde das Deckglas in ein Wägeschälchen überführt und mit 3S-Öl (Votalef) überschichtet. Die Embryonen wurden bis zum Schlüpfen bei 18°C inkubiert. Die L1-Larven wurden mit einer Präparationsnadel in ein Fliegenröhrchen mit *Drosophila*-Standardmedium überführt.

2.2.1.6.3 Selektion transgener Fliegen

Die geschlüpften Fliegen wurden einzeln gegen Doppelbalancer-Fliegen (w^- ; *Sp/CyO*; *TM2/MKRS*) gekreuzt. In der F1-Generation können die transgenen Tiere anhand der Augenfarbe (w^+) identifiziert werden. Die Stärke der Expression des w^+ -Gens hängt vom Insertionsort ab, so dass die Augenfarbe zwischen schwach gelb bis rot variieren kann.

2.2.1.6.4 Bestimmung des Insertionsortes

Zur Bestimmung des Chromosoms auf dem die Insertion stattgefunden hat, wurden die transgenen Tiere erneut gegen Doppelbalancer-Fliegen gekreuzt. Anhand des Segregationsverhaltens der dominanten Marker und der w^+ -Markierung der transgenen Fliegen konnte so das Chromosom, das die Insertion des UAS-Konstruktes trägt, identifiziert werden. Die transgenen Stämme wurden durch Selbstung über den entsprechenden Balancer-Chromosomen etabliert.

2.2.1.7 Herstellung von Rekombinanten

Die Herstellung von Rekombinanten erfolgte nach genetischen Standard-Methoden (Ashburner 1989).

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von L3-Larven zur Untersuchung der NMJ

- Larven werden im Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt
- mit kochendem H₂O gewaschen
- H₂O abnehmen und durch PBS ersetzen
- Larven mit feiner Schere dorsal der Länge nach aufschneiden (in PBS auf Objektträger)
- Gewebe bis auf die Muskulatur abnehmen
- Larven werden im Eppendorf Reaktionsgefäß mit Fixierlösung gesammelt (4%Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Larven für 30 min
- anschließende Antikörperfärbung (siehe 2.2.2.3.2)

2.2.2.3 *whole-mount* Antikörperfärbung von *Drosophila*-Embryonen

2.2.2.3.1 Fixierung der Embryonen

- Embryonen werden mit PBT von der Agarplatte in Multiwell-Plexiglasplatten (MWP) überführt.
- Dechorionisierung mit NaOCl (6% aktives Chlor) für 4 min
- gründlich mit H₂O waschen
- auf Apura-Papier gut trocknen
- Überführung der MWP in Heptan
- Überführung der Embryonen mit dem Heptan aus der MWP in 5 ml Glasröhrchen
- Zugabe des gleichen Volumens an Fixierungslösung (4% Formaldehyd/PBS)
- Fixierung der Embryonen für 20 min bei RT auf einem Schüttler
- Abnahme der wäßrigen (unteren) Phase und Zugabe von 2 ml Methanol
- zur Devitellinisierung ca. 10 sec kräftig schütteln
- Abnahme der organischen (oberen) Phase, erneute Zugabe von Methanol und kurz schütteln
- Abnahme des Methanols und 2 x mit 96% Ethanol waschen
- Lagerung bei -20°C möglich

2.2.2.3.2 Hybridisierung der Antikörper

- 3 x kurz und anschließend 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- Inkubation in 10% Goatserum (GS)/PBT für 1 h bei RT
- Inkubation des primären AK in geeigneter Verdünnung in 10% GS/PBT bei 4°C ü.N.
- 3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- Inkubation des sekundären AK in geeigneter Verdünnung in 10% GS/PBT für 2-3 h bei RT
- 3 x kurz mit PBT waschen, 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen.

2.2.2.3.3 Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

- Embryonen 2 x 5 min in NBT-Puffer waschen
- Embryonen in 3,5 µl/ml BCIP und 4,5 µl/ml NBT in NBT-Puffer inkubieren
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist (5-10 min)
- 3 x kurz mit PBT waschen
- 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- in 70% Glycerin überführen

2.2.2.3.4 Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Färbung

- Embryonen 1 x in PBS waschen
- Inkubation der Embryonen in 0,3 mg/ml DAB-Lösung in PBS und 1,5 µl/ml H₂O₂
- Stoppen der Färbereaktion mit PBT, wenn gewünschte Intensität erreicht ist (5-10 min)
- 3 x kurz mit PBT waschen
- 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- in 70% Glycerin überführen

2.2.2.4 Präabsorption des anti-β-Galaktosidase Antikörpers

- Fixierung der Embryonen wie bei der *whole-mount* Antikörperfärbung
- 3 x kurz und anschließend 3 x 20 min mit PBT auf einem Schüttler bei RT waschen
- Inkubation in 10% GS/PBT für 1 h bei RT
- Inkubation des anti-β-Galaktosidase AK (Verdünnung 1:500) in 10% GS/PBT ü.N. bei 4°C
- Überstand sterilfiltrieren, bei 4°C lagern und bei Bedarf in einer Verdünnung von 1:5-1:10 einsetzen

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Herstellung von transformationskompetenten XL-1blue, DH5-alpha oder BL-21

Escherichia coli:

- 2 x 0,5 l LB-Medium mit 10 ml einer frischen ü. N.-Kultur animpfen
- Im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD 600 von 0,4 - 0,6 inkubieren (3-5 h)
- Kultur 15-20 min auf Eis stellen
- in einem vorgekühlten Rotor bei 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 1 l kaltem ddH₂O resuspendieren
- in einem vorgekühlten Rotor bei 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 0,5 l kaltem ddH₂O resuspendieren
- in einem vorgekühlten Rotor bei 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 20 ml kaltem 10 % Glycerin/ddH₂O resuspendieren
- in einem vorgekühlten Rotor bei 4.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in ca. 2 ml kaltem 10% Glycerin/ddH₂O resuspendieren (entspricht einer Zellkonzentration von ca. 1-3 x 10⁸ Zellen/ml)
- 50 µl Aliquots der Suspension auf Eis herstellen und bei -70°C lagern.

2.2.3.2 Bakterientransformation (Elektrotransformation)

Die Transformationen von DNA in elektrokompetente *Escherichia coli*-Stämme wurden mit dem Gene-Pulser der Firma BIORAD nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
- 50 µl Zellsuspension mit geeigneter DNA-Menge (1-2 µl) mischen
- in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette überführen
- Küvette in Gene Pulser (BIORAD) einsetzen
- Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm (Einstellung am Gene Pulser: Kapazität -25 µF, Spannung -1,8 KV, Widerstand -200 W)
- Küvette schnell entnehmen und 250 µl SOC-Medium zugeben (vorgewärmt)
- im Schüttler bei 37 °C für 30 min inkubieren

- auf einem geeigneten Selektions-Medium ausstreichen und ü. N. kultivieren.
- evtl. zur blau-weiß 40 µl X-Gal und 40 µl IPTG auf dem Selektionsmedium ausstreichen

2.2.3.3 DNA-Restriktionen

Die DNA-Restriktionen erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme (Roche).

2.2.3.4 Gelelektrophorese

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 100 - 150 V durch Horizontal-Gelelektrophorese in Agarosegelen (0,8 bis 1,2 % in TBE) mit Ethidiumbromid (10 mg/ml H₂O, 2 µl Ethidiumbromid/100ml Agarosegel). Als relatives Maß für die Größe der DNA-Fragmente diente eine 1 kb-Leiter (GIBCO/BRL).

2.2.3.5 Elution von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Gel

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde bei einer niedrigen Spannung durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einem Kit der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Düsseldorf). Die Arbeiten wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen wurde ein zweckmäßiges Volumen auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Als Standard diente 1 µg einer 1 kb-Leiter (Gibco/BRL). Die Konzentration der DNA-Lösung wird dann durch einen Vergleich der relativen Fluoreszenz-Intensitäten unter UV-Licht bestimmt. Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf).

2.2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden der Vektor und das zu klonierende DNA-Fragment (Insert) in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:4 eingesetzt.

Berechnung des molaren Verhältnisses:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{Kb Größe des Inserts}}{\text{Kb Größe des Vektors}} \times \text{molares Verhältnis von} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{ng des Inserts}$$

Bei einer Restriktion des Vektors mit nur einem Enzym, muß dieser vor der Ligation zur Verhinderung einer Religation mit SAP (1µg/µl Shrimps Alkaline Phosphatase, Roche) dephosphoryliert werden. Bei einer Doppelrestriktion kann auf die Phosphatase-Behandlung verzichtet werden.

Ligationsansatz:

- 100 ng Vektor-DNA
- 1-4 fache molare Menge des DNA-Fragments
- 2 µl 10 x Ligationspuffer (Promega)
- 1 µl T4-DNA-Ligase (Promega)
- ad 20 µl ddH₂O
- Inkubation 1 h bei 22 °C oder ü. N. bei 16 °C

2.2.3.8 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

- 2 ml LB-Medium (mit Antibiotika zur Selektion) mit Einzelkolonien animpfen
- ü. N. bei 37°C im Schüttler inkubieren
- ca. 1,5 ml Bakterienkultur in Eppendorf-Gefäß überführen, den Rest kühl lagern
- in einer Tischzentrifuge 40 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren und den Überstand abnehmen
- 400 µl STET zum Pellet geben und durch Vortexen das Pellet lösen
- 1 min kochen, anschließend in einer Tischzentrifuge 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand zu 400 µl Isopropanol in ein neues Eppendorf-Gefäß schütten und mischen
- zur Fällung in einer Tischzentrifuge für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 70% EtOH waschen
- Pellet trocknen und in 20-100 µl RNase-H₂O resuspendieren

2.2.3.9 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation größerer DNA-Mengen erfolgte aus einer 50 ml ü. N. Kultur. Hierfür wurde ein DNA-Präparations-Kit der Firma Qiagen (Qiagen GmbH Düsseldorf) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.3.10 Isolierung genomischer DNA: Quiagen - Kit

Die Isolierung der genomischen DNA wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Qiagen (Qiagen GmbH Düsseldorf) gemäß der Protokollangaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden ca. 50-100 Fliegen eingesetzt.

2.2.3.11 Isolierung genomischer DNA: Salzfällungsmethode

Ca. 40 betäubte Fliegen wurden bei -20°C für 20 min eingefroren. Dann erfolgte die Zugabe von 100 μ l Lysispuffer. Die Fliegen wurden in einem Homogenisator im 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß homogenisiert. Weitere 700 μ l wurden dazugegeben und das Homogenisat gut gemischt. Nach Inkubation für 30 min bei 70°C erfolgte die Zugabe von 154 μ l 8M Kaliumacetat-Lösung. Erneut wurde gut durchgemischt und der Ansatz auf Eis für 30 min inkubiert. Der Ansatz wurde im Weiteren für 30 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Erneuter Zentrifugation bei 10.000 g und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß folgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 75 μ l 2M NaCl und 700 μ l Isopropanol. Der gut gemischte Ansatz wurde anschließend für 15 min bei 13.000 g zentrifugiert, das Pellet mit 200 μ l 70% EtOH gewaschen und nach erneuter Zentrifugation getrocknet. Das Pellet wurde in 100 μ l RNase-Wasser aufgenommen.

2.2.3.12 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Alle Amplifikationen wurden mittels einer MJ Research PTC 200 DNA-Engine (Biozym) durchgeführt.

2.2.3.12.1 Standard PCR

Für Standard PCR-Amplifikationen wurde entweder genomische DNA nach konventioneller Aufreinigung (2.2.3.11) aus Einzelfliegen-Präparationen (2.2.3.12.2), oder aus Plasmiden aus

Midi-Präparationen (2.2.3.10) eingesetzt. Für die Amplifikation wurde folgender Reaktionsansatz (50 μ l) angesetzt:

- Template ca. 100 ng (genomische DNA, Plasmid DNA ca. 0,5 ng)
- 10 x Puffer 1x 5 μ l
- dNTP 0,2 mM 1 μ l
- Primer A (20 μ M) 50 pmol
- Primer B (20 μ M) 50 pmol
- Taq-DNA-Polymerase 1Unit 0,2 μ l
- ad 50 μ l ddH₂O

Das verwendete Temperaturprofil richtet sich nach der Länge des PCR-Produktes, den Annealing-Temperaturen der Primer und nach der Menge der eingesetzten Template DNA. Die Temperaturprofile wurden entsprechend variiert.

Standard-Temperaturprofil:

- Initiale Denaturierung 94 °C 2:00 min
- Denaturierung 94 °C 0:40 min
- Annealing (je nach Primerpaar) 60 °C (variabel) 0:40 min
- Extension 72 °C 2:30 min (variabel)
- Wiederholung der Schritte 2-4 32x
- finale Extension 72 °C 10:00 min
- Kühlen 4 °C nach Bedarf

2.2.3.12.2 Isolierung von RNA aus Einzelfliegen für die RT-PCR

Die Isolierung von RNA erfolgte nach dem Protokoll für das Rneasy Mini Kit der Firma Qiagen, Katalognummer 74103.

2.2.3.12.3 Gene SOEing

Eine Sonderform der PCR ist „Gene SOEing“ (Splicing by Overlap Extension, Higuchi, 1990; Horton et al., 1989). Dieses Verfahren ermöglicht es, über PCR-Reaktionen mehrere DNA-Abschnitte kovalent zusammenzufügen. Ermöglicht wird dies durch die Wahl spezieller Primer, die zu benachbarten Exons homologe Sequenzen aufweisen. In einem ersten Zyklus

werden beide Templates getrennt durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Die entstehenden Fragmente werden als Templates in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt, bei der die beiden äußeren Primer zugegeben werden. Die homologen Bereiche der zuvor amplifizierten Sequenzen lagern sich aneinander und dienen sich gegenseitig als Primer. Als Produkt dieses zweiten PCR-Zyklus resultiert ein Chimär aus den ursprünglichen DNA-Abschnitten. Einen Überblick über diese Methode gibt Abbildung 2.

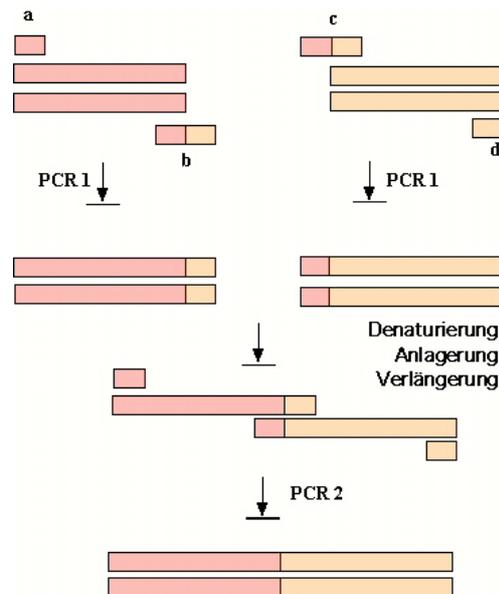


Abb. 2: Gene SOEing. In zwei PCR-Schritten können DNA-Abschnitte kovalent zusammengefügt werden. Auf diese Weise wurden das N-terminale und das C-terminale Konstrukt generiert.

2.2.3.13 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden mit dem Amersham Sequenzierungs-Kit (*Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Premix Kit*) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem ABIPRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt). Zur Analyse der Sequenzdaten wurde das Programm *Lasergene DNASTAR Software Package* (GATC, Konstanz) verwendet.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Proteinlösungen von *Drosophila melanogaster*

Zur Herstellung von Proteinlösungen wurden Embryonen, Puppen oder adulte Tiere von *Drosophila melanogaster* verwendet. Die jeweiligen Stadien wurden gesammelt und für 20 min bei -20°C eingefroren. Die Embryonen wurden mit NaOCl (3% aktives Chlor) dechorionisiert. Mit einem Homogenisator und unter Zugabe von 50 µl Lysispuffer, mindestens jedoch das 2fache Volumen der Probe, wurden die Ansätze homogenisiert. In einer auf 4°C abgekühlten Zentrifuge wurden die Proben anschließend 2x unter Verwendung neuer Eppendorf Reaktionsgefäße bei 14.000 g für 15 min zentrifugiert. Die fertige Proteinlösung wurde zwischen Pellet und Fettschicht abgesaugt und zur Lagerung bei -70°C eingefroren.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Zu der Proteinlösung (2-5 µl) wurde Bradford-Reagenz (1:4 mit ddH₂O verdünnt) hinzugegeben (ad1 ml). Nach Inkubation für 10 min wurde die Extinktion bei $\lambda = 595$ nm in Kunststoffküvetten in einem Photometer (Eppendorff) gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine entsprechende Eichgerade mit definierten Konzentrationen BSA als Standard erstellt.

2.2.4.3 Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE). Es wurden Gelelektrophorese-Apparaturen der Firma Hoefer (San Francisco) verwendet. Für die analytischen Gele wurden SE 260 Minikammern und für präparative Gele SE 600 Kammern verwendet. Nach dem Polymerisationsstart der Trenngellösung durch Zugabe von APS und TEMED wurde das Trenngel bis auf ca. 2/3 der Gesamthöhe der Gelkassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation (1 h) wurde das Isopropanol abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel (nach Polymerisationsstart) überschichtet. In das noch flüssige Gel wird der Probenkamm eingesetzt. Vor der Verwendung muß das Sammelgel vollständig polymerisiert sein. Die Elektrophorese erfolgt bei analytischen Gelen

für 1 h bei 20 mA und bei präparativen Gelen für 5 h bei 30 mA. Es wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Gele wurden mit kolloidalem Coomassie angefärbt oder für eine immunhistochemische Analyse nach einem Western Blot eingesetzt. Die Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine erfolgte durch einen Vergleich mit Standardmarkern.

2.2.4.4 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen

Der Proteintransfer nach SDS-PAGE auf PVDF-Membranen (Amersham) erfolgte in einer Tank-Blot Einheit der Firma Hoefer (San Francisco) nach Angaben des Herstellers. Die PVDF-Membran wurde für 10 sec in Methanol aktiviert, 5 min in ddH₂O gewaschen und für 5 min im Transferpuffer vorinkubiert. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei einer konstanten Stromstärke von 8 mA/cm². Kontrolle und Markierung der Standardmarkerbanden erfolgte durch Färbung mit Ponceau S und anschließendem Waschen der Membran mit TBS / Tween. Die Membran wurde für 1 h in 10% Milchpulver/TBS-Tween 20 geblockt. Der primäre Antikörper wurde in geeigneter Verdünnung hinzugegeben und ü.N. bei 4°C inkubiert. Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch 5 x 20 min waschen mit TBS von der Membran entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur und erneutes Waschen für 5 x 20 min mit TBS-Tween 20. Für den Nachweis des Antigens wurde das ECL-Western-Blotting Detektiersystem (Amersham) verwendet.

2.2.4.5 Induktion der pMAL-Fusionsproteine

Die pMAL-Fusionsproteine (pMAL + Insert) wurden durch Elektrottransformation in BL21-Zellen eingebracht. Die Expression und Aufreinigung der Proteine ist dem Begleitheft „pMAL Protein Fusion and Purification System“, New England Biolabs entnommen.

Für analytische Gele wurden 2ml-Kulturen angeimpft (2x YT-Medium)

- Inkubation für 3-4h bei 37°C im Schüttler
- Induktion der Fusionsproteine durch Zugabe von 0,1mMol IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4
- weitere Inkubation für 12h bei 18°C
- Zentrifugieren der Kulturen bei 13.000 rpm für 1 min in einem 2ml Reaktionsgefäß
- Aufnehmen des Pellets in 250 µl Columnbuffer

- 50 μ l 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versehen, für 5 min bei 100°C inkubieren
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren und per SDS-PAGE testen

Für präparative Gele und zum Test der Löslichkeit wurde eine 500 ml Kultur eingesetzt. Die Inkubation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und das Pellet in Columnbuffer aufgenommen (5 ml/g Feuchtgewicht)

- Zellaufschluss mit Sonifiziergerät (Amplitude 100 W, Frequenz 1Hz)
- Zentrifugieren 30 min bei 15.000 rpm (JA20 Rotor, Beckman)
- Pellet im gleichen Volumen aufnehmen
- Überstand und Pellet in einer SDS-PAGE testen (20 μ g auf analytischem Gel).

2.2.4.6 Mikrotubuli-Bindungstest mit Hilfe des „Tubulin/Microtubules Biochem Kit“ der Firma Cytoskeleton, Denver, CO, USA

Die Präparation der Mikrotubuli wurde nach Protokoll durchgeführt, und zwar so, dass sie eine Länge von ca. 6,5 μ m erreichten. Anschließend wurden die Mikrotubuli mit Taxol stabilisiert. Vor dem Cosedimentationsassay wurden die Fusionsproteine 30 min bei 100.000 g (TLA 45 K rpm) abzentrifugiert, um eventuell unlösliches Protein abzutrennen. In dem Cosedimentationsassay wurden je 3 μ Mol Fusionsprotein und 3 μ Mol taxol-stabilisierte Mikrotubuli eingesetzt. Das Volumen betrug 100 μ l. Nach 10 minütiger Inkubation wurde die Lösung 30 min bei 100.000 g (TLA 45 K rpm) abzentrifugiert und der Überstand und das Pellet getrennt. Das Pellet wurde in 100 μ l 1xPP aufgenommen, 80 μ l Überstand wurden mit 20 μ l 5x PP versehen. Die Proteinproben wurden schließlich in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie Blue gefärbt.

2.2.4.7 Mikrotubuli-Bindungstest nach R. Brandt, Osnabrück

Benötigte Lösung: BRB80: 80 mM PIPES/KOH pH 6.8

1 mM EGTA

1 mM MgCl₂

1 mM Taxol in DMSO

Präparation der Taxol-stabilisierten Mikrotubuli:

- Tubulin abzentrifugieren bei 100.000 g (TLA 45 K rpm)

- 1/100 Volumen 10 μ M Taxol dazugeben, mischen, Inkubation 5 min bei 37°C
- 1/100 Volumen 100 μ M Taxol dazugeben, mischen, Inkubation 5 min bei 37°C
- 1/100 Volumen 1 mM Taxol dazugeben, mischen, Inkubation 5 min bei 37°C

Mikrotubuli-Bindungsassay:

- Gefrorene Taxol-stabilisierte Mikrotubuli (50 μ M; bei -80°C aufbewahrt) in ein Wasserbad, 37°C geben
- In einem Volumen von 35 μ l vorbereiten:
 - zu testendes Protein (1-5 μ g)
 - 3,5 μ l 100 μ M Taxol (Endkonzentration: 10 μ M)
 - 0,7 μ l 50 mM GTP (Endkonzentration: 1mM)
 - mit BRB80 auf 35 μ l auffüllen.
- Inkubieren bei 37°C, bis die Temperatur erreicht ist
- 15 μ l taxol-stabilisierte Mikrotubuli dazugeben, mischen, inkubieren bei 37°C, 10 min
- Inzwischen 100 μ l von einer 30%igen Sucrose-Lösung in BRB80 in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettieren. 1 μ l einer 0,1 M GTP-Lösung und Taxol zugeben zu einer Endkonzentration von 10 μ M. Mischen und bei Raumtemperatur aufbewahren.
- Inkubationsmischung auf das Sucrose-Kissen pipettieren
- Zentrifugation bei 100.000 g (TLA45, 45 K rpm) für 1 h bei 20°C
- Überstand abnehmen = ungebundene Fraktion
- Pellet in 150 μ l BRB80 lösen = gebundene Fraktion
- 38 μ l 5x PP zur gebundenen und ungebundenen Fraktion geben
- Proben in SDS-PAGE auftrennen und das Gel mit Coomassie blue färben

2.2.4.8 F-Aktin-Bindungstest nach M. Bähler, Münster

Benötigte Lösung: Polymerisationspuffer

- 30 mM KCl
- 10 mM Hepes, pH 7,4 - 7,5
- 2 mM MgCl₂
- 2mM NaN₃
- 1 mM β -Mercaptoethanol

Aktin wurde nach Pardee und Spudich (1982) aus dem Kaninchenmuskel gereinigt. Das so gewonnene G-Aktin wurde freundlicherweise von M. Bähler, Münster zur Verfügung gestellt. Um die F-Aktin-Bindung von Proteinen zu untersuchen, wurden Cosedimentationsexperimente mit Aktinfilamenten durchgeführt. Aktin wurde über Nacht bei 4°C in Polymerisationspuffer polymerisiert. Die zu untersuchenden Proteine wurden vor dem Bindungstest vorzentrifugiert (100.000 g, 30 min, 4°C), um eventuell aggregiertes Material abzutrennen. Das Volumen der Versuchsansätze betrug 100 μ l. Folgende Komponenten wurden in den angegebenen Endkonzentrationen im Zentrifugenröhrchen gemischt:

- 3 μ M zu testendes Protein
- 6 μ M F-Aktin
- Polymerisationspuffer ad 100 μ l

Jede Versuchsreihe enthielt als Kontrolle einen Ansatz ohne F-Aktin, dafür mit dem entsprechenden Volumen Polymerisationspuffer, um zu überprüfen, ob das Protein bereits ohne Zugabe von Filamenten sedimentiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze zentrifugiert (100.000 g, 30 min, 4°C). Die Überstände wurden abgenommen, die Pellets im gleichen Volumen Puffer suspendiert. Anschließend wurden die Proben von Überstand und Pellet mittels SDS-PAGE und anschließender Commassie-Färbung untersucht.

2.2.4.8 *In-Vitro*-Kinase-Test

Benötigte Lösungen:

Kinasepuffer (KB-):

- 30 mM EGTA
- 40 mM Hepes, pH 7,4
- 2 mM MgCl₂

Kinasepuffer (KB+):

- KB-
- 50 mM NaF
- 2 mM ATP
- 2 mM DTT
- 1 mM Okadaic Acid

Die für den Versuch benötigte rekombinante GSK3 β und die Maushirnextrakte wurden freundlicherweise von P. Gordon-Weeks zur Verfügung gestellt. Die Präparation ist Johnstone et al., 1997 zu entnehmen. Die Phosphorylierungsreaktionen wurden im KB+

Puffer durchgeführt, der 0,1 mg/ml Fusionsprotein enthielt, die an Gluthation-Agarose Säulenmaterial gebunden waren. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Maushirnextakt bzw. rekombinanter GSK3 β (2 μ l S₁ bzw. 2 μ l rekombinanter Kinase) initiiert. Das Gemisch wurde ü.N. bei 37°C inkubiert, anschließend zentrifugiert (1 min, 500 g). Der Überstand wurde abgenommen. Das Säulenmaterial wurde mit 500 μ l KB- Puffer gewaschen und anschließend zentrifugiert (1 min, 500 g). Das rekombinante Protein wurde durch Resuspension des Säulenmaterials in 1xPP und 5 min Inkubation bei 100°C eluiert. Die Proben wurden im Western Blot. Eine positive Phosphorylierung der rekombinanten Proteine konnte durch den polyklonalen Antikörper BUGS gezeigt werden.

2.2.5 Zellkultur Methoden

2.2.5.1 Kultivierung der *Drosophila* Schneider-(S2) Zellen

Die Zellen wurden in Schneider's *Drosophila* Medium (GIBCO/BRL) (10 ml) mit 10% hitzeinaktiviertem FBS und 50 Einheiten Penicillin G und 50 Einheiten Streptomycin Sulfat pro ml bei 25°C kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 6×10^6 bis 20×10^6 in einem Verhältnis von 1:5 in eine neue Kulturflasche passagiert.

2.2.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Dazu wurden die Zellen der 4 Gruppenquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und die Zellzahl mit folgender Formel berechnet:

VF: Verdünnungsfaktor;

Fläche eines Gruppenquadrates: $0,04 \text{ mm}^2$;

Kammertiefe: 0,1 mm

Volumen: 0,004 ml:

Mittelwert der 4 Quadrate x VF x $10^4 = \text{Zellzahl/ml}$

Das der gewünschten Zellzahl entsprechende Volumen an Zellen wurde zentrifugiert und das Sediment in der zur Einstellung des Titers erforderlichen Menge an Medium resuspendiert.

2.2.5.3 Transfektion von *Drosophila* Schneider-(S2) zellen

Zur Transfektion wurden S2-Zellen in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Well in einer 24-well Platte auf Fibronectin (1:100 in PBS) beschichteten Deckgläschen ausgesät und ü.N. auf 25°C inkubiert. Pro well wird ein Transfektionsansatz vorbereitet:

100 μ l Schneider's Drosophila Medium (GIBCO/BRL) ohne Antibiotikazusatz

0,5-1 μ g der zu transfizierenden μ g

2 μ l FuGene 6s (Roche/Mannheim)/ μ g μ g

15 min auf RT inkubieren

Pro well werden die 100 μ l Transfektionsansatz zu 400 μ l Schneider's Drosophila Medium (GIBCO/BRL) mit Antibiotikazusatz gegeben und für ein bis drei Tage bei 25°C inkubiert.

2.2.5.4 Antikörperfärbung an *Drosophila* Schneider-(S2) Zellen

Zur Förderung der Adhärenz der S2-Zellen wurden Deckgläser vor der Verwendung mit Fibronectin (1:100 in PBS) beschichtet. In einer 24-well Platte wurden 1×10^6 S2 Zellen auf den beschichteten Deckgläschen ausgesät.

- Die Zellen werden ü.N. bei 25°C kultiviert
- am nächsten Tag das Medium vorsichtig abnehmen
- Zellen 1 x kurz mit PBS (pH 7,2) waschen
- für 15 min bei RT in 4% Paraformaldehyd/PBS fixieren (1 ml/well)
- 1 x 5 min mit PBS waschen
- Permeabilisierung der Zellen für 3 min mit 0,2% Tween 20/PBS (1 ml/well)
- 1 x 5 min mit PBS waschen
- Blocken in 3% BSA/PBS für 1 h
- 3 x 5 min mit PBS waschen
- Inkubation des primären Antikörpers für 2 h bei RT (300 - 500 μ l/well)
- 3 x 5 min mit PBS waschen
- Inkubation des sekundären Antikörpers für 1 h bei RT (300 μ l/well)
- 3 x 5 min mit PBS waschen

Deckgläschen 1 x mit H₂O waschen und umgekehrt in entsprechendes Medium auf einem Objektträger mit Mowiol einbetten.

3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, das Futsch Protein näher zu charakterisieren. Dabei galt den MAP1B homologen Bereichen besonderes Augenmerk, da für MAP1B die funktionelle Relevanz dieser Domänen schon eingehend untersucht wurde. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine Regulation von Futsch über Phosphorylierung möglich ist. Schließlich wurden die *futsch*-Mutanten auf ihren Synapsenphänotyp untersucht. Dabei wurden auch die Mutanten berücksichtigt, deren Vertebraten-Homologe mit MAP1B interagieren, das sind *shaggy*, *wingless* und *fragile X*. Die fünf *futsch*-Allele, die für diese Arbeit zur Verfügung standen, sind noch nicht eingehend molekular untersucht. Aufgedeckt wurde die *futsch*-Mutation durch eine abnorme 22C10-Expression (Hummel et al., 1999).

3.1 Das Expressionsmuster des 22C10-Epitops

Der monoklonale Antikörper 22C10 wurde im Labor von Seymour Benzer als neuralspezifischer Antikörper bezüglich seines Färbemusters im adulten Gehirn isoliert (Fujita, 1982; Zipursky, 1984). In wildtypischen Embryonen beginnt die erste 22C10 Expression im ZNS im Stadium 12 in den sich entwickelnden MP2-Neuronen vor der Axogenese, danach exprimiert eine kleine Gruppe benachbarter Inter- und Motoneurone (aCC-, MP1-, SP1- und VUM-Neurone) das 22C10-Epitop (Canal und Ferrus 1986). Im PNS ist die erste Expression des 22C10-Epitops im Stadium 13 in den sensorischen Zellen der dorsalen Gruppe zu sehen, gefolgt von lateralen und ventralen Neuronen. In allen Fällen spiegelt das 22C10-Expressionsmuster den sequentiellen Eintritt postmitotischer Zellen in die Phase der neuronalen Differenzierung wider (Canal und Ferrus, 1986). Am Ende der Embryogenese ist das 22C10-Epitop in allen sensorischen Neuronen im PNS und in einem Großteil der Neurone des ZNS exprimiert, und zwar in allen zellulären Kompartimenten, im Dendriten, im Soma und im Axon, wo es mit dem axonalen Cytoskelett assoziiert ist (Estes et al., 1996).

In der Larve beginnt die Expression des Epitops in der sich entwickelnden Augenimaginalscheibe direkt posterior zur morphogenetischen Furche in den Photorezeptorneuronen. Dies entspricht einem sehr frühen Zeitpunkt neuronaler Differenzierung, vor dem ersten Auswachsen von neuronalen Fortsätzen.

3.2 Die *futsch* Mutation ist gekennzeichnet durch ein verändertes 22C10-Expressionsmuster

Die fünf *futsch*-Allele, die in einer EMS Mutagenese isoliert wurden, führen zum Verlust bzw. zur starken Reduktion der 22C10 Expression (Hummel et al., 1999). Das Expressionsmuster anderer getesteter neuronaler oder glialer Marker ist normal. So ergibt der Nachweis der Elav-Expression ein wildtypisches Erscheinungsbild, d.h. alle Zellen des ZNS und PNS scheinen anwesend zu sein. Ebenso ist das ZNS-Axonmuster von *futsch*^{K68}-Embryonen nicht verändert, was durch eine Färbung mit den mABs BP102 und anti-fasII gezeigt wurde (Hummel et al., 2000). Im Gegensatz dazu kann man in *futsch*^{P158}-Embryonen neben dem vollständigen Verlust des 22C10-Epitops Veränderungen in der axonalen Projektion beobachten.

Die Expression des 22C10-Epitops wird auch im optischen System der Larve erkennbar. mAb 22C10 markiert die Photorezeptoren und ihre Projektion entlang des optischen Stiels in die Lamina. Der sogenannte Bolwig-Nerv verbindet also das larvale Lichtwahrnehmungsorgan mit den optischen Loben des Gehirns. In homozygoten *futsch*^{K68}-Larven des 3. Larvenstadiums zeigte sich in den Augenimaginalscheiben kein Signal mit dem mAb 22C10 (Hummel et al., 2000).

3.3 Untersuchungen an der *Drosophila* NMJ

3.3.1 *Drosophila* Futsch reguliert die synaptische Mikrotubuli-Organisation und ist für synaptisches Wachsen notwendig

Um zu untersuchen, ob Futsch im Prozess der Synaptogenese benötigt wird, wurde eine genauere Analyse der synaptischen Boutons mit dem synaptischen Marker nc46 (freundlicherweise von Herrn E. Buchner, Würzburg, zur Verfügung gestellt) durchgeführt. Die Untersuchung der synaptischen Morphologie wurde an Larven des frühen L3-Stadiums am Muskel 4 durchgeführt. Zwei Axone, die beide vom Segmentalnerv projizieren, bilden Typ 1b Endigungen am Muskel 4. Diese Axone erreichen Muskel 4 und migrieren an der Muskeloberfläche in entgegengesetzter Richtung. Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau der Muskulatur in einem Abdominalsegment A2-A7 (aus: M. Bate, The Development of *Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbour Press, 1993).

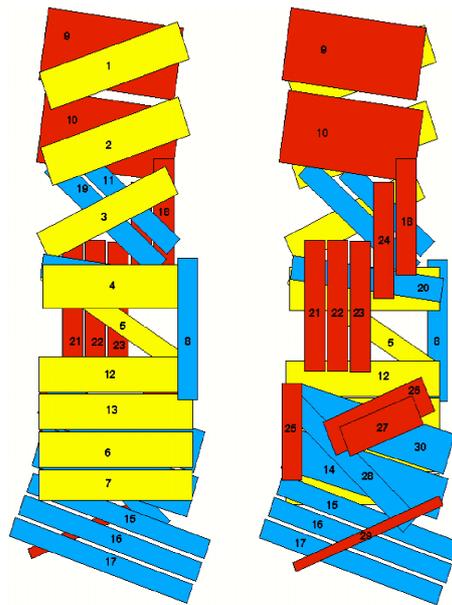


Abb. 3: Aufbau der Muskulatur in einem Abdominalsegment A2-A7 (entnommen aus M. Bate, *The Development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbour Press, 1993). Die Abbildung zeigt den charakteristischen Aufbau der Muskeln in einem Abdominalsegment A2-A7. Die Muskeln sind in den 3 Hauptgruppen eingeteilt: gelb (innen), blau (Mitte, außer Muskel 8) und rot (außen). Das rechte Bild zeigt die Ansicht von Außen, das linke Bild zeigt die Ansicht von Innen, wie es sich nach dem Aufschneiden der Larven ergibt.

Abbildungen 4 und 5 zeigen die Innervation des Muskels 4 in den *futsch*-Mutanten. In den fünf etablierten *futsch*-Mutanten zeigte sich eine Reduktion der Anzahl der Boutons an der *Drosophila* NMJ in Larven des 3. Larvenstadiums gegenüber dem Wildtyp. Diese sind zudem größer als in wildtypischen Larven. Die nachfolgende Tabelle 1 fasst die erhaltenen Daten zusammen. Die Tabelle im Anhang listet die Einzeldaten auf, die anhand der Untersuchungen einzelner Muskeln erhalten wurden.

Tabelle 1: Übersicht über die durchschnittliche Zahl der Boutons pro Muskel 4 im Wildtyp und in den *futsch*-Mutanten.

Genotyp	Gesamtzahl der gezählten Boutons	Anzahl der gezählten Muskeln	Durchschnittliche Zahl der Boutons pro Muskel
Wildtyp	1534	30	51,1 ± 14
K68	409	25	16,4 ± 6
M455	465	25	18,6 ± 11
N94	430	25	17,2 ± 10
P158	377	25	15,1 ± 13
P28	365	25	14,6 ± 8

Ein Verlust oder eine deutliche Reduktion des Futsch Proteins führt zu einer signifikant reduzierten Zahl an Boutons, was eine Funktion von Futsch im Prozess der Boutonteilung nahe legt.

Anhand der 22C10 Färbung in Abbildung 6 ist gut zu erkennen, dass die Axone, die Muskel 4 innervieren, in den *futsch*-Allelen deutlich kürzer sind. Die Muskelgröße in den *futsch*-Mutationen entspricht der des Wildtyps. Mutante Nervenendigungen an Muskel 4 haben zudem weniger Verzweigungen. Dieses könnte allerdings auch eine Folge der stark reduzierten Zahl an Boutons sein. Die Mutation *futsch*^{N94} führt zudem zu einer stark reduzierten Expression des 22C10 Antigens.

3.3.2 Mutationen in den Komponenten der *wingless*-Signaltransduktionskaskade führen zu einem *futsch*-ähnlichen Synapsenphänotyp

Untersuchungen am neuronalen Cytoskelett haben bewiesen, dass intrazelluläre Faktoren während der neuronalen Entwicklung Änderungen im Cytoskelett hervorrufen können (Tanaka und Sabry 1995). Insbesondere die GSK3 β Kinase ist in diesem Zusammenhang von Interesse, da gezeigt wurde, daß neuronale Plastizität durch WNT-Signale reguliert werden kann (Burden, 2000; Hall et al., 2000; Packard et al., 2002; Krylova et al., 2002; Salinas et al., 2003).

Im *Drosophila*-Genom sind diese Gene ebenfalls vorhanden, die Homologe heißen *wingless* (*wnt*) und *shaggy* (*gsk3 β*). Mutationen in diesen Genen sind embryonal letal, da beide Proteine in der frühen Musterbildung eine entscheidende Rolle spielen (Nüsslein-Volhard et al., 1985; Parr und McMahon, 1994; Wodarz und Nusse, 1998).

Eine Untersuchung des Synapsenphänotyps an der NMJ bei diesen Mutationen wurde daher an hypomorphen Allelen durchgeführt. Zur Selektion mutanter Larven wurden beide Stämme zunächst auf einen GFP-Balancer umbalanciert (Casso et al., 2000). Die Untersuchung der NMJ an L3-Larven ergab, dass diese Mutanten ebenfalls eine Reduktion in der Anzahl der Boutons aufweisen. Sowohl *shaggy* als auch *wingless* führen zu einem *futsch*-ähnlichen Phänotyp in der *Drosophila* NMJ. Die Boutonzahl ist drastisch reduziert (siehe Tabelle 2). Die Länge des Motoaxons, das Muskel 4 innerviert ist gegenüber dem Wildtyp verkürzt, die Muskelgröße entspricht jedoch dem Wildtyp.

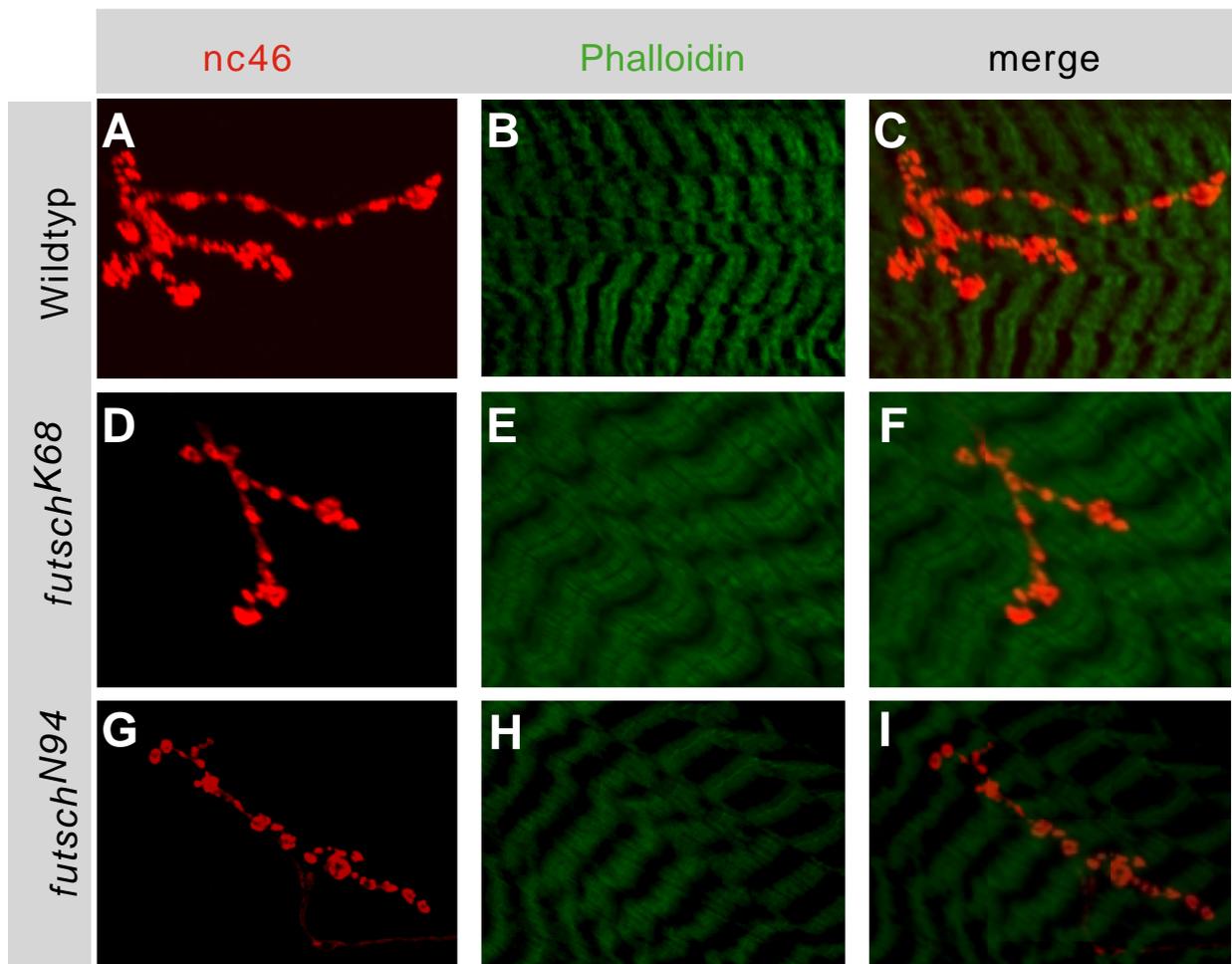


Abb. 4: Präparationen der larvalen NMJ am Muskel 4.

(A-C) Wildtyp, (D-F) *futsch^{K68}*, (G-I) *futsch^{N94}*. Der mAb nc46 färbt die Boutons, die Muskel 4 innervieren (A, D, G). Die Muskulatur wurde durch eine Phalloidin färbung sichtbar gemacht (B, E, H). In *futsch^{K68}*-mutanten Larven (D) und in *futsch^{N94}*-mutanten Larven (G) exprimieren weniger Boutons das synaptische Protein nc46 als in wildtypischen Larven (A).

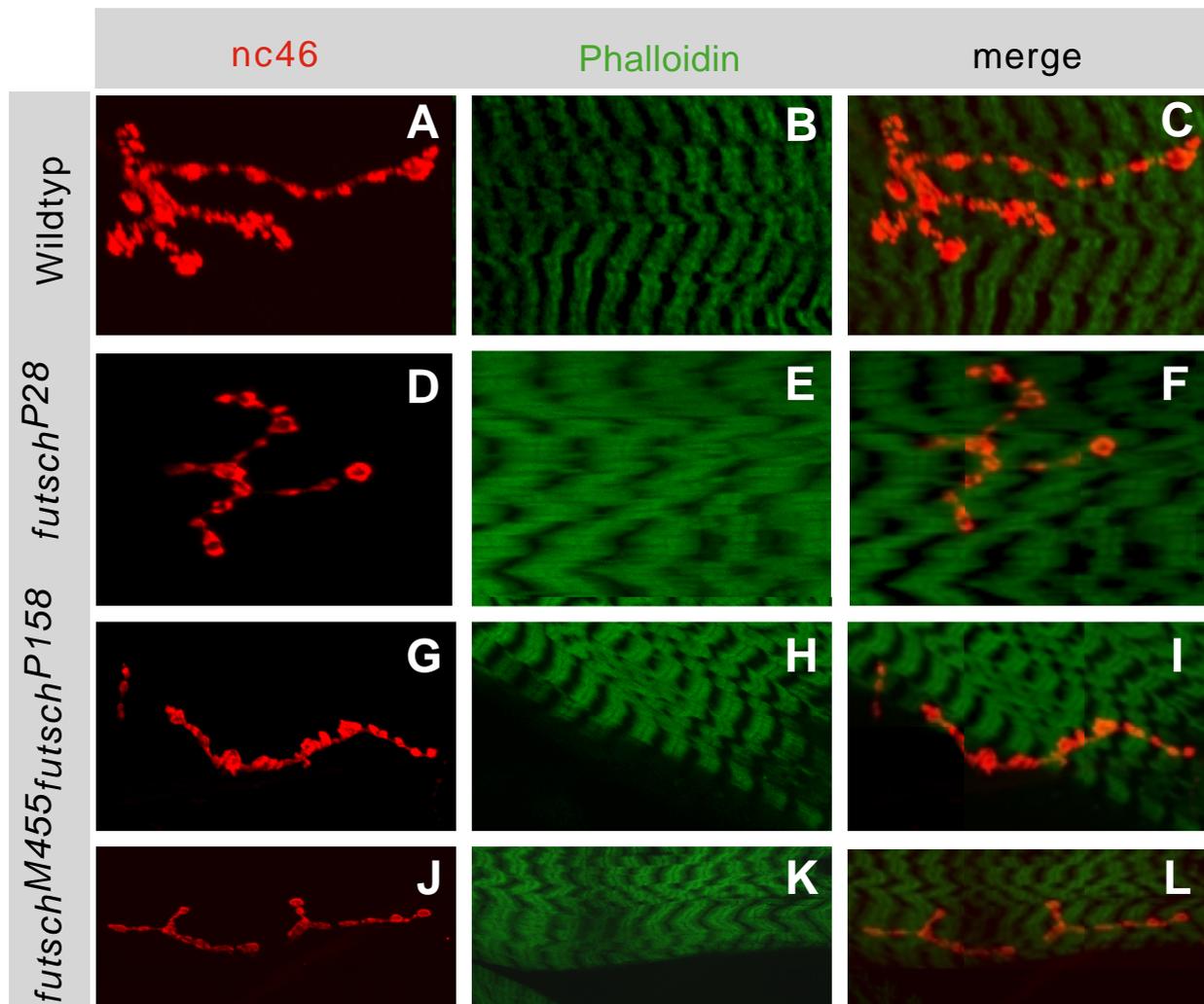


Abb. 5: Präparationen der larvalen NMJ am Muskel 4.

(A-C) Wildtyp, (D-F) *futsch*^{P28}, (G-I) *futsch*^{P158}, (J-L) *futsch*^{M454}. Der mAb nc46 färbt die Boutons, die Muskel 4 innervieren (A, D, G, J). Die Muskulatur wurde durch eine Phalloidininfärbung sichtbar gemacht (B, E, H, K). In *futsch*^{P28}-mutanten Larven (D), in *futsch*^{P158}-mutanten Larven (G) und in *futsch*^{M454}-mutanten Larven (J) ist die Anzahl an Boutons, die Muskel 4 innervieren, deutlich reduziert gegenüber der Anzahl an Boutons, die in wildtypischen Larven Muskel 4 innervieren (A).

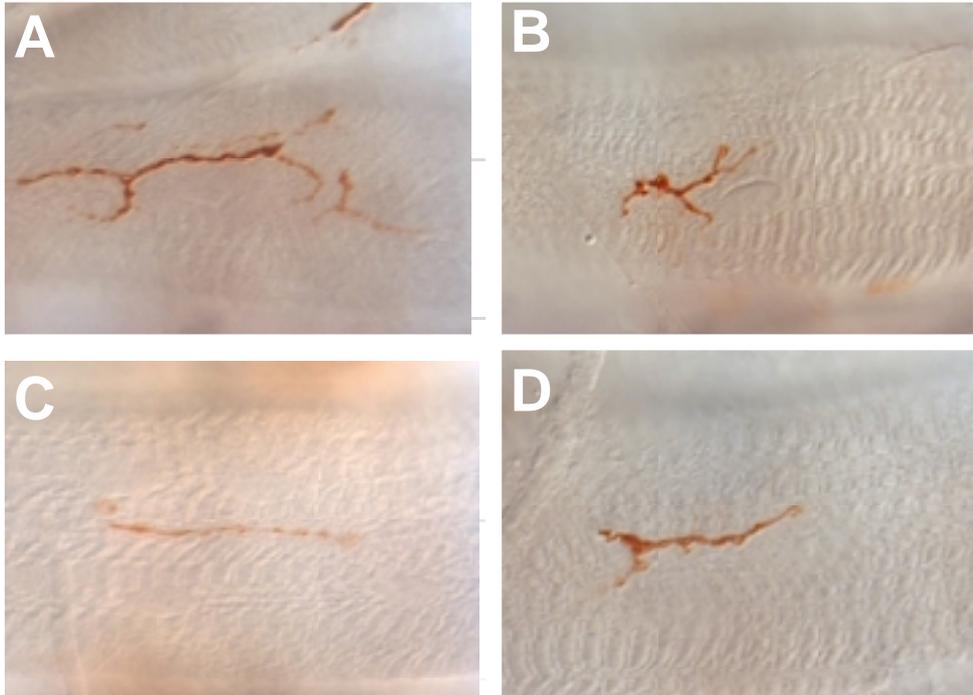


Abb. 6: Die *futsch*-Mutation betrifft die 22C10-Expression in der larvalen NMJ. Präparation der larvalen NMJ am Muskel 4 nach einer Antikörperfärbung mit dem mAb 22C10 und anschließender HRP-Immunohistochemie. (A) Wildtyp, (B) *futsch*^{P28}, (C) *futsch*^{N94}, (D) *futsch*^{M454}. Die Axone, die Muskel 4 innervieren, sind in den *futsch*-Mutanten deutlich verkürzt (B-D) gegenüber dem Wildtyp (A). *futsch*^{N94} (C) führt zu einer stark reduzierten Expression des 22C10 Antigens.

Tabelle 2: Übersicht über die durchschnittliche Zahl der Boutons pro Muskel 4 im Wildtyp, in der *wingless*-Mutante und in der *shaggy*-Mutante.

Genotyp	Gesamtzahl der gezählten Boutons	Anzahl der gezählten Muskeln	Durchschnittliche Zahl der Boutons pro Muskel
Wildtyp	1534	30	51,1 ± 14
<i>wingless</i>	592	30	19,7 ± 11
<i>shaggy</i>	581	25	23,2 ± 12

In einem weiteren Ansatz sollte die Bedeutung der Shaggy Kinase für die Synaptogenese untersucht werden. Für das von der GSK3 β Kinase phosphorylierte MAP1B wird postuliert, die Mikrotubuli in einem instabilen Zustand zu belassen (Goold et al., 1999). Es wird vermutet, dass dephosphoryliertes Futsch die „loop“ Bildung der Mikrotubuli und damit ihre Dynamik herabsetzt. Andersherum sollte phosphoryliertes Futsch die Mikrotubuli im „loop“ in dynamischer Instabilität belassen und so die Boutonteilung fördern (Roos et al., 2000). Daher sollte untersucht werden, ob eine mögliche Hyperphosphorylierung von Futsch durch die Überexpression der Shaggy Kinase zu einer verstärkten Instabilität der Mikrotubuli führt und damit die Boutonteilung verstärkt. Hierfür wurden verschiedene Formen der Kinase mittels des UAS/GAL4-Systems in Larven und Embryonen überexprimiert (Brand und Perrimon, 1993). Die transgenen UAS-*shaggy*-Fliegen, UAS-*shaggy*^{wt}, UAS-*shaggy*^{DN}, UAS-*shaggy*^{activated} wurden freundlicherweise von M. Bourouis (Bourouis et al., 2001) zur Verfügung gestellt. Durch das Kreuzen des *elav*-GAL4-Treibers mit den UAS-*shaggy*-Fliegen wurden die unterschiedlichen Formen der Kinase panneural exprimiert. Dies führte zu einem *futsch*-ähnlichen Phänotyp in der larvalen NMJ, die Anzahl der Boutons ist drastisch reduziert (Abbildung 7). Eine panneurale Expression von *shaggy*^{wt} oder *shaggy*^{DN} führt zu einer deutlicheren Reduktion der Anzahl der Boutons, als die Expression von *shaggy*^{activated}. Die nachfolgende Tabelle 3 fasst die erhaltenen Daten zusammen. Die Tabelle im Anhang listet die Einzeldaten auf, die anhand der Untersuchung einzelner Muskeln erhalten wurden.

Die ektopische Expression der verschiedenen Shaggy Kinasen durch Kreuzen des *da*-GAL4 bzw. *elav*-GAL4 Fliegenstammes mit den transgenen Fliegen UAS-*sgg*^{wt}, UAS-*sgg*^{activated} und UAS-*sgg*^{DN} wurde auch im Embryo hinsichtlich eines Phänotyps untersucht. Sie führte jedoch nur zu leichten Defekten im embryonalen Nervensystem, was anhand von Färbungen mit den Antikörpern BP102, 22C10 und anti-fasII aufgedeckt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Larven verpuppen sich sogar und entwickeln sich zur Fliege, allerdings schlüpfen diese nicht.

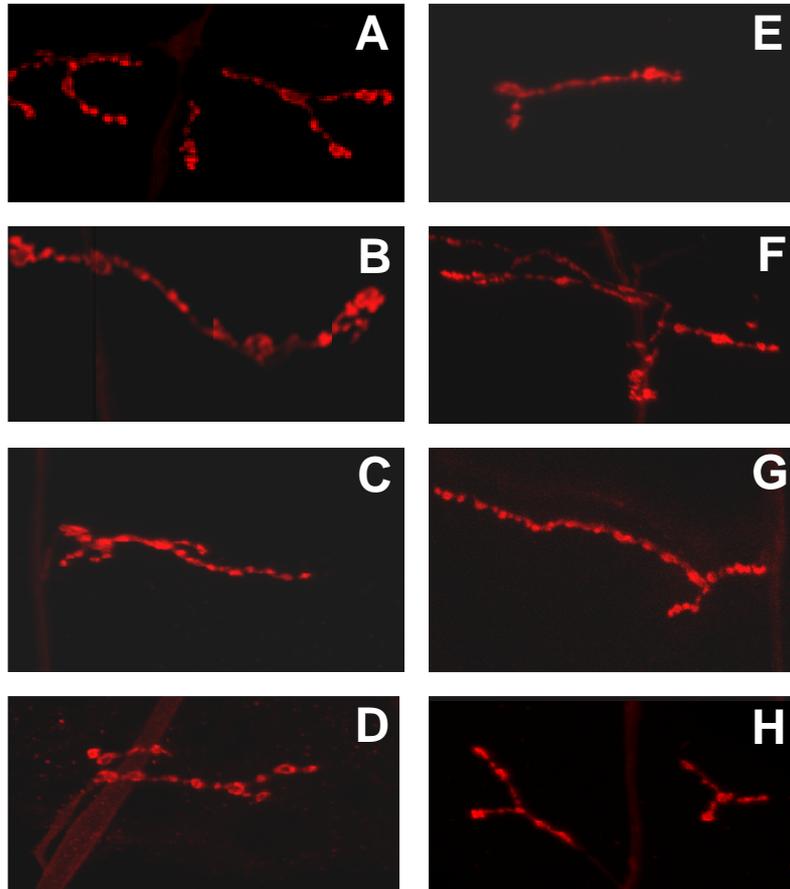


Abb. 7: Präparationen der larvalen NMJ am Muskel 4.

(A) Wildtyp, (B) *shaggy*-Mutante, (C) *shaggy/fragile X*-Doppelmutante (D) *wingless*-Mutante, (E) *elav-GAL4/UAS-sgg* Larve, (F) *elav-GAL4/UAS-sgg^{activated}* Larve, (G) *elav-GAL4/UAS-sgg^{DN}* Larve, (H) *elav-GAL4/UAS-fragile X* Larve. Der mAb nc46 färbt die Boutons, die Muskel 4 innervieren (A-H). In Tieren der gezeigten Genotypen ist die Anzahl an Boutons, die Muskel 4 innervieren, deutlich reduziert gegenüber wildtypischen Larven (A).

Tabelle 3: Übersicht über die durchschnittliche Zahl der Boutons pro Muskel 4 in den Fliegen, die ein UAS-*shaggy*-Konstrukt und eine GAL4-Insertion tragen.

Genotyp	Gesamtzahl der gezählten Boutons	Anzahl der gezählten Muskeln	Durchschnittliche Zahl der Boutons pro Muskel
Wildtyp	1534	30	51,1 ± 14
elav-GAL 4/UAS- <i>sgg</i> ^{WT}	371	20	18,8 ± 13
elav-GAL 4/UAS- <i>sgg</i> ^{activated}	465	20	27,3 ± 9
elav-GAL 4/UAS- <i>sgg</i> ^{DN}	430	20	24,1 ± 13

Abbildung 8 fasst die gewonnenen Daten nach der Quantifizierung der Anzahl der Boutons in den unterschiedlichen Genotypen anhand eines Balkendiagrammes zusammen.

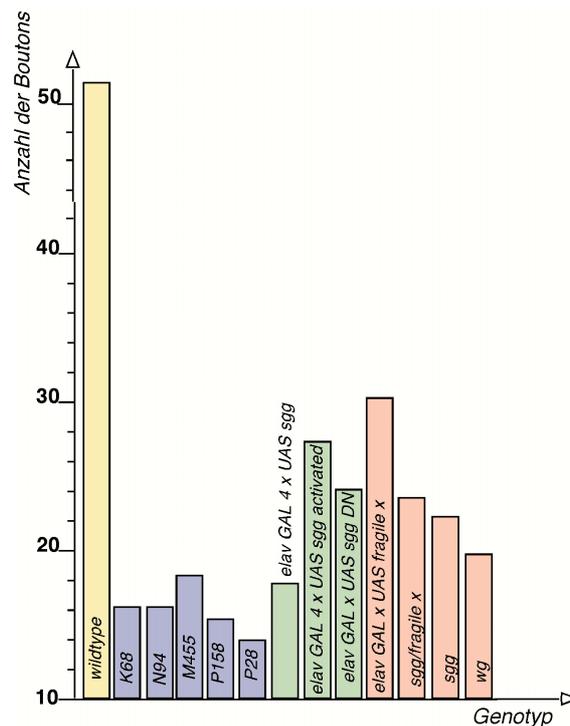


Abb. 8: Quantifizierung der Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren. Dargestellt sind die Quantifizierungen der Boutonzahl in den *futsch*-Mutanten, der *shaggy*-Mutante, der *wingless*-Mutante und der *shaggy/fragile X*-Doppelmutante, sowie die der Tiere, die eine *elav*-GAL4-Insertion und ein UAS-*shaggy*-Transgen tragen bzw. ein UAS-*fragile X*-Transgen.

Im adulten Tier zeigte sich nach ektopischer Expression der drei verschiedenen Shaggy Kinasen mittels des *scabrous*-GAL4 Treibers in den F1-Tieren eine gestörte

Borstenmorphologie auf dem Thorax und dem Scutellum. Die Borsten scheinen in ihrer Zahl zwar nicht reduziert, sind aber deutlich kürzer als wildtypische Borsten (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Funktion des Fragile X Proteins während der Synaptogenese

Untersuchungen an der *Drosophila* NMJ haben gezeigt, dass dFMR1 eine wichtige Rolle in der Synaptogenese und axonalem Auswachsen spielt. Im *Drosophila* Nervensystem ist die Futsch Expression in *dfxr1*-Mutanten erhöht und andersherum führt eine Überexpression von dFMR1 führt zu einer reduzierten Expression von Futsch und zu einer Verringerung der Anzahl synaptischer Boutons (Zhang et al., 2001). Zhang et al. konnten zeigen, dass die *futsch* mRNA immunopräzipitiert mit dFMR1-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Zhang et al., 2001). dFMR1 fungiert also als translationaler Repressor der *futsch*-mRNA.

Eine panneurale Überexpression von dFMR1 durch Kreuzen des *elav*-GAL4 Treibers mit dem UAS-*fraX* Fliegenstamm und eine anschließende Untersuchung der NMJ in den Larven der F1-Generation bestätigte das Ergebnis (Abbildung 7H). Anhand der Daten in Tabelle 4 ist ersichtlich, dass die Boutonzahl in Larven der F1-Generation reduziert ist. Die panneurale (*elav*-GAL4) oder ubiquitäre (*da*-Gal4) Expression von dFMR1 führte dazu, dass sich die Larven der F1-Generation zwar verpuppen, allerdings schlüpfen die Fliegen nicht aus ihrem Puparium.

futsch^{N94}/*dfxr1*-doppeltmutante Tiere zeigen normale synaptische Struktur und Funktion (Zhang et al., 2001).

Es wurde versucht, diese Ergebnisse zu reproduzieren, jedoch ließ sich ein Stamm, der für *futsch*^{K68}/*dfxr1*-doppeltmutant ist, nicht etablieren. Es wurde außerdem ein *sgg/dfxr1*-doppeltmutanter Fliegenstamm etabliert und die Innervierung an Muskel 4 in L3-Larven untersucht. *sgg/dfxr1*-doppeltmutante Larven haben eine deutlich reduzierte Anzahl an Boutons (23,1 Boutons gegenüber 51,1 im Wildtyp; siehe Tabelle 4). Der Phänotyp der *sgg*-Mutante ließ sich nicht abschwächen, so dass eine direkte Interaktion zwischen dFMR und der *shaggy* mRNA nicht nahe liegt.

Tabelle 4: Übersicht über die durchschnittliche Zahl der Boutons pro Muskel 4 im Wildtyp, in der *sgg/fraX*-Doppelmutante und in Tieren die eine GAL4-Insertion und ein UAS-*fraX*-Transgen tragen.

Genotyp	Gesamtzahl der gezählten Boutons	Anzahl der gezählten Muskeln	Durchschnittliche Zahl der Boutons pro Muskel
Wildtyp	1534	30	51,1 ± 14
<i>sgg/fra X</i>	462	20	23,1 ± 10
<i>elav-GAL 4/UAS-fraX</i>	602	20	31,1 ± 6

3.4 Generierung einer Futsch cDNA mit Hilfe der Gene SOEing Methode

Das Futsch Protein sollte zudem molekular untersucht werden. Die Sequenzinformationen über die *futsch*-Exons sind dem „European *Drosophila* Genome Project“ entnommen. Eine komplette cDNA ist nicht erhältlich, aber die genomische DNA von *futsch* ist im Cosmid 49E4 enthalten (accession number AL031128). Der erste Schritt zur molekularen Charakterisierung von Futsch bestand in der Generierung einer cDNA. Zunächst wurde über Gene SOEing (siehe Material und Methoden) der mit dem MAP1B Protein homologe N- und C-terminale Bereich von *futsch* amplifiziert. Abbildung 9 verdeutlicht den genomischen Aufbau des *futsch*-Lokus. Die vorhergesagte mRNA ist 15984 bp groß. Das davon abgeleitete Futsch Protein umfaßt 5327 Aminosäuren und ist >570 kDa groß.

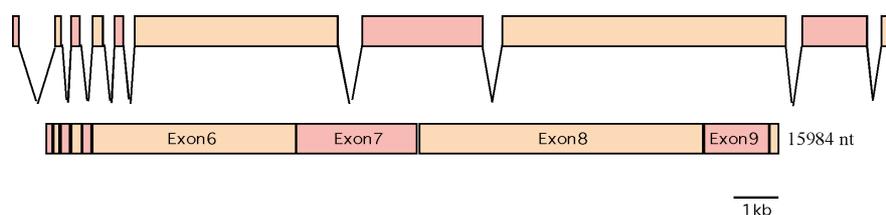


Abb. 9: Genomische Organisation des *futsch*-Lokus. Alle Sequenzinformationen sind dem EDGP (European *Drosophila* Genome Project) entnommen. *futsch* Exons sind im Cosmid 49E4 enthalten (accession number AL 031128). Das abgeleitete Protein besteht aus 5327 Aminosäuren und ist >570 kDa groß.

Das N-terminale Konstrukt umfasst die Nucleotide 1-1853, das C-terminale Konstrukt die Nucleotide 14395-15984. Die einzelnen Zwischenschritte wurden sämtlich in den pGEM-Vektor kloniert und auf ihre Sequenz geprüft.

Die evolutionär konservierten und damit wahrscheinlich funktionell wichtigen Proteindomänen von MAP1B befinden sich im N- und im C-Terminus des Proteins, das posttranslational in eine leichte und eine schwere Kette gespalten wird. Die leichte Kette bindet aber an die schwere Kette, was für die Funktion des MAP1B Proteins notwendig ist. Daher wurden auch der N- und der C-Terminus von Futsch nicht nur einzeln, sondern auch zusammen in den Expressionsvektor pMAL kloniert.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, über RT-PCR die komplette cDNA von *futsch* zu generieren. Hierfür wurde RNA aus wildtypischen Fliegenköpfen gewonnen (siehe Material und Methoden). Diese wurde in der folgenden PCR als „template“ verwendet. Es konnte allerdings kein hochmolekulares DNA-Fragment isoliert werden.

Abbildung 10 zeigt eine Übersicht über die klonierten Futsch-Konstrukte, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

Aus dieser Abbildung ist ersichtlich, dass große Bereiche der Exons 6 und 7 noch nicht in die Vektoren pMAL oder pUAST kloniert wurden. Mittels PCR wurden diese Bereiche bereits aus der Cosmid-DNA amplifiziert und in den pGEM-Vektor kloniert. Eine Sequenzanalyse bestätigte eine korrekt amplifizierte Basenabfolge.

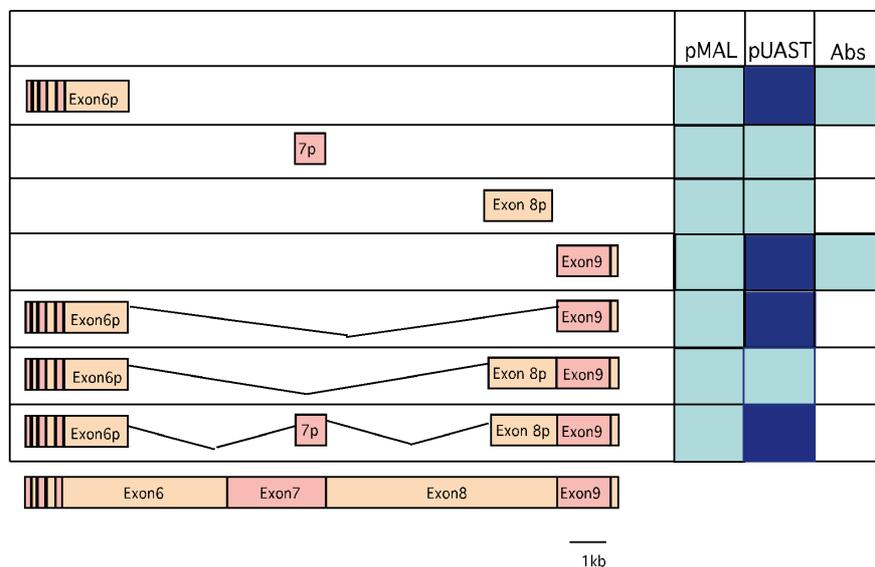


Abb. 10: Übersicht über die bereits klonierten Futsch-Konstrukte in die Vektoren pMAL und pUAST. Die dunkelblau markierten Felder zeigen Konstrukte, für die transgene Fliegen mit Hilfe des pUAST-Vektors generiert werden konnten. Außerdem wurden zwei polyklonale Antikörper hergestellt, zum einen gegen Futsch^{N-Term} (Exon 1-6p), zum anderen gegen Futsch^{C-Term} (Exon 9+10).

3.5 Klonierung der verschiedenen Futsch-Konstrukte, die in dieser Arbeit Verwendung fanden

3.5.1 Klonierung von *futsch*^{N-Term}, *futsch*^{C-Term} und *futsch*^{N+C-Term} in den pUAST-Vektor

Für Zellkulturexperimente und zur Generierung transgener Fliegenstämmen wurden die Konstrukte *futsch*^{N-Term}, *futsch*^{C-Term} und *futsch*^{N+C-Term} in den pUAST-Vektor kloniert. Das N-terminale Konstrukt von *futsch* wurde über eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoI aus dem Vektor pGEM in den Vektor pUAST kloniert. Das C-terminale Konstrukt von *futsch* wurde mittels PCR amplifiziert und so vor dem ersten kodierenden Nucleotid ein ATG als Startcodon eingebracht. Über eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoI wurde das Konstrukt aus dem Vektor pGEM in den Vektor pUAST kloniert. Das N+C-terminale Konstrukt wurde ebenfalls über eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoI aus dem Vektor pMAL in den Vektor pUAST kloniert. Die Klonierungen wurden sowohl durch Testrestriktionen als auch durch Sequenzierung der Konstrukte bestätigt.

3.5.2 Klonierung der MAP1B-homologen Proteindomänen von Futsch in Expressionsvektoren zur Untersuchung der rekombinanten Proteine

Zur Untersuchung rekombinanter Futsch Proteine wurden die zum MAP1B Protein homologen Domänen in Expressionsvektoren kloniert. Zunächst wurde sowohl das N-terminale Konstrukt als auch das C-terminale Konstrukt aus dem pGEM-Vektor in den pGEX-3X-Vektor (Amersham) kloniert, um GST-Fusionsproteine generieren zu können. Die Fusionsproteine wurden nach unterschiedlichen Induktionsbedingungen exprimiert und nach Standardprotokollen auf ihre Löslichkeit getestet (siehe Material und Methoden). Sie sind nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und anschließender Commassie-Färbung des Gels im Gesamtextrakt und im unlöslichen Pellet zu finden, nicht aber im Überstand (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde das N-terminale Konstrukt aus dem pGEM-Vektor über eine Restriktion mit dem Enzym NotI in den pBlueskript kloniert. Die im pBlueskript enthaltenen Restriktions-Schnittstellen für die Enzyme BamHI und SacI konnten anschließend für eine *in-frame* Klonierung in den HisTag-Vektor pQE-32 genutzt werden. Das C-terminale Konstrukt wurde

aus pGEM-Vektor mit SphI/SalI direktional in den HisTag-Vektor pQE-31 kloniert. Beide Fusionsproteine waren unlöslich.

Daher erfolgte eine Klonierung der Konstrukte in das pMAL-Expressionssystem, mit dem allgemein eine gute Löslichkeit der Fusionsproteine erreicht werden kann. Allerdings ist der Protein-, „Tag“ mit ca. 43 kDa sehr groß.

Die Klonierung des N-terminalen Bereichs von *futsch* ist in Abschnitt 3.10 (Generierung weiterer polyklonaler Antikörper) beschrieben. Für die Klonierung des C-Terminus von *futsch* wurde zunächst eine PCR an der pUAST/9+10+ATG+HisTag durchgeführt, die diesen Bereich amplifiziert und so weitere Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoI und HindIII einbringt. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-Vektor ligiert und die resultierenden Klone durch weitere Testrestriktionen und Sequenzierung überprüft. Der C-Terminus von *futsch* wurde anschließend direktional über eine Restriktion mit den Restriktionsenzymen EcoI und HindIII in den pMAL kloniert. Abbildung 11 zeigt eine Übersicht über die MBP-Fusionsproteine.

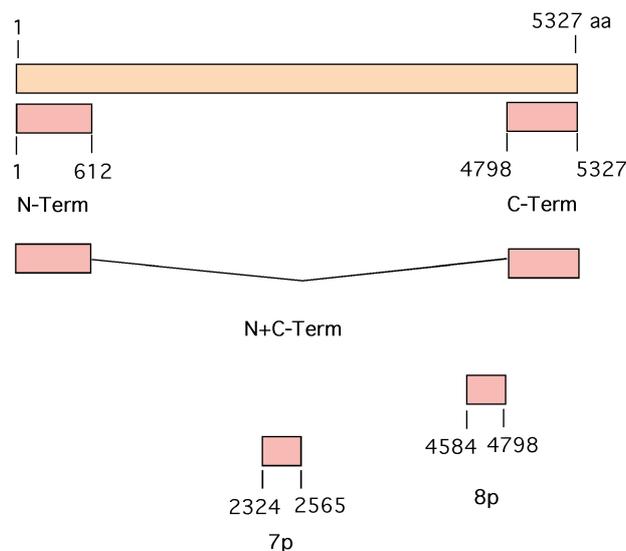


Abb. 11: Übersicht über die MBP-Fusionsproteine. In das pMAL-Vektorsystem wurden die zu MAP1B homologen Bereiche von Futsch kloniert. Angegeben sind die Fusionsproteine N-Term, C-Term, N+C-Term, 7p und 8p und die Aminosäuren von Futsch, die sie beinhalten.

Für die Konstrukte N-Term und C-Term konnten mehrere Klone isoliert werden, jedoch wurden für alle weiteren Versuche Klon 28 für das N-terminale Fusionsprotein und Klon 11 für das C-terminale Fusionsprotein verwendet (Abbildung 12). Die Fusionsproteine wurden in jeweils 5 Elutionsschritten über eine Amylosesäule gereinigt (Abbildung 13). Außerdem wurden die MAP1B homologen N- und C-Termini von Futsch zusammen in den pMAL-

Vektor kloniert. Hierfür wurde zunächst mittels PCR der C-Terminus (Exon 9+10) amplifiziert und weitere Restriktionsschnittstellen für die Enzyme SallI und HindIII eingebracht. Das PCR-Produkt wurde nach Klonierung in den pGEM und anschließender Sequenzierung mit den Enzymen SallI und HindIII verdaut und direktional in das Konstrukt pMAL/1-6p kloniert.

3.5.3 Klonierung der Futsch-Domänen, die für potentielle Phosphorylierungsstellen kodieren, in den pMAL-Vektor

Zur Untersuchung der potentiellen Phosphorylierungsstellen von Futsch für die Shaggy Kinase in einem *in-vitro* Kinase-Test wurden die entsprechenden Bereiche von *futsch* mittels PCR an der Cosmid 49E4 DNA amplifiziert und so Schnittstellen für die Enzyme BamHI und SallI (für Exon 7p) bzw. SallI und HindIII (für Exon 8p) eingebracht. Die PCR-Fragmente wurden zunächst in den pGEM-Vektor kloniert. Die Klonierungen wurden durch Testrestriktionen und Sequenzanalyse auf ihre Richtigkeit überprüft. Exon 7p wurde anschließend direktional über eine Restriktion mit den Restriktionsenzymen BamHI und SallI in den pMAL-Vektor kloniert. Das resultierende Fusionsprotein pMAL/Exon 7p umfasst die Aminosäuren 2324-2565. Es ist ohne den pMAL-Anteil 241 Aminosäuren groß und hat ein Molekulargewicht von 25,8 kDa. Exon 8p wurde direktional über eine Restriktion mit den Restriktionsenzymen SallI und HindIII in den pMAL-Vektor kloniert. Das resultierende Fusionsprotein pMAL/Exon 8p umfasst die Aminosäuren 4584-4798. Es ist ohne den pMAL-Anteil 214 Aminosäuren groß und hat ein Molekulargewicht von 22,6 kDa.

Außerdem wurden diese potentiellen Phosphorylierungsstellen in das Konstrukt pMAL/1-6p+9-10 kloniert. Hierfür wurde wiederum mittels PCR an der Cosmid DNA Exon 7p und Exon 8p amplifiziert und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SallI und XhoI eingebracht. Die PCR-Fragmente wurden zunächst in den pGEM kloniert, um eine Sequenzanalyse durchführen zu können. In einem ersten Schritt wurde Exon 8p über SallI und XhoI in das Konstrukt pMAL/1-6p+9-10 kloniert und die Orientierung über Testrestriktionen ermittelt. In einem zweiten Klonierungsschritt wurde Exon 7p über SallI und XhoI in das Konstrukt pMAL/1-6p+8p-10 kloniert und die Orientierung über Testrestriktionen ermittelt.

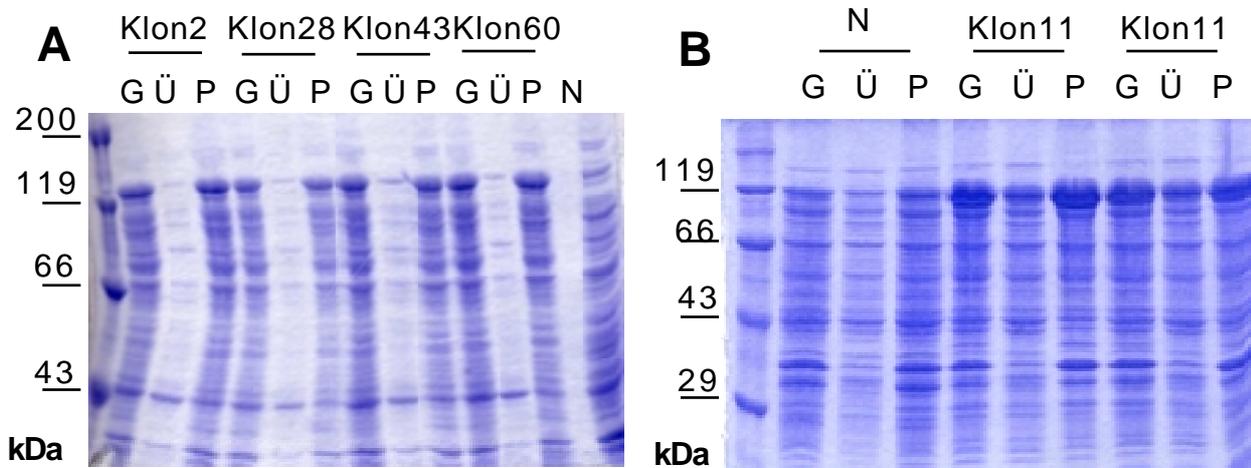


Abb. 12: Test auf Löslichkeit der pMAL-Fusionsproteine. Commassie-Färbungen von SDS-PAGE Analysen. Als Kontrolle wurde der Proteinextrakt eines nicht-induzierten MBP-Ausgangsvektors aufgetragen (N), um die Induktionseffizienz zu dokumentieren. Das Fusionsprotein pMAL/Exon 1-6p (A) und das Fusionsprotein pMAL/Exon 9+10 (B) sind im Gesamtextrakt (G), im löslichen Überstand nur bedingt (Ü) und im unlöslichen Pellet (P) nachweisbar.

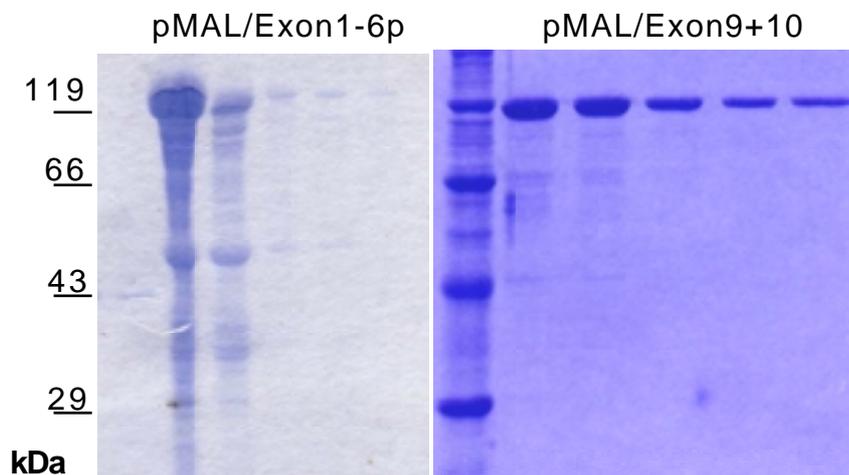


Abb. 13: pMAL-Fusionsproteine nach Aufreinigung über eine Amylose-Säule. Commassie-Färbungen von SDS-PAGE Analysen. Die Fusionsproteine pMAL/Exon 1-6p und pMAL/Exon 9+10 wurden in je 5 Elutionsschritten über eine Amylose-Säule gereinigt. Das N-terminale Fusionsprotein degradiert stark.

3.5.4 Klonierung der Futsch-Domänen, die für eine potentielle Phosphorylierungsstelle kodieren, in den pUAST-Vektor

Für Zellkulturexperimente und zur Generierung transgener Fliegenstämme wurden die Futsch-Domänen mit den potentiellen Phosphorylierungsstellen zunächst einzeln in den pUAST kloniert. Hierfür wurden die pGEM-Klone pGEM/Exon 7p und pGEM/Exon 8p mit dem Restriktionsenzym EcoI restringiert und die Fragmente anschließend in den pUAST kloniert. Weitere Testrestriktionen gaben über die Orientierung im pUAST-Vektor Aufschluss. Das Konstrukt pMAL/1-6p+8p-10 wurde ebenso mit dem Restriktionsenzym EcoI restringiert und das Fragment anschließend in den pUAST kloniert. Auch hier wurde die Orientierung im pUAST-Vektor über Testrestriktionen bestimmt.

Das Konstrukt pMAL/1-6p+7p-10 wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und SpeI restringiert und direktional in den mit den Restriktionsenzymen BglIII und XbaI restringierten pUAST kloniert.

3.6 Subzelluläre Lokalisation von Futsch

3.6.1 In Zellkultur colokalisieren der N- und der C-Terminus von Futsch mit dem Aktin-Cytoskelett

Für das Vertebraten Futsch Homolog MAP1B ist gezeigt worden, dass es sowohl an das Aktin-Cytoskelett als auch an die Mikrotubuli binden kann (Tögel et al., 1998). MAP1B wird posttranslational in eine N-terminale schwere Kette und in eine C-terminale leichte Kette gespalten. Für die leichte Kette ist eine direkte Bindung an die Mikrotubuli gezeigt worden (Tögel et al., 1998). Die leichte Kette bindet *in-vivo* auch die schwere Kette, die eine Mikrotubuli-Bindungsdomäne enthält (Vallee und Davis, 1983; Kuznetsov et al., 1986; Kuznetsov und Gelfand, 1987). Diese befindet sich in der N-terminalen Hälfte der schweren Kette. Diese Region von MAP1B enthält eine hochbasisches Sequenzmotiv, 21 Wiederholungen von KKEE oder KKEI/V (Noble et al., 1989; Zauner et al., 1992). Sie ist allerdings im *Drosophila* Futsch Protein nicht konserviert. Transfektionsexperimente haben gezeigt, dass sich die Aktin-Bindungsdomäne von MAP1B in der C-terminalen leichten Kette befindet (Tögel et al., 1998).

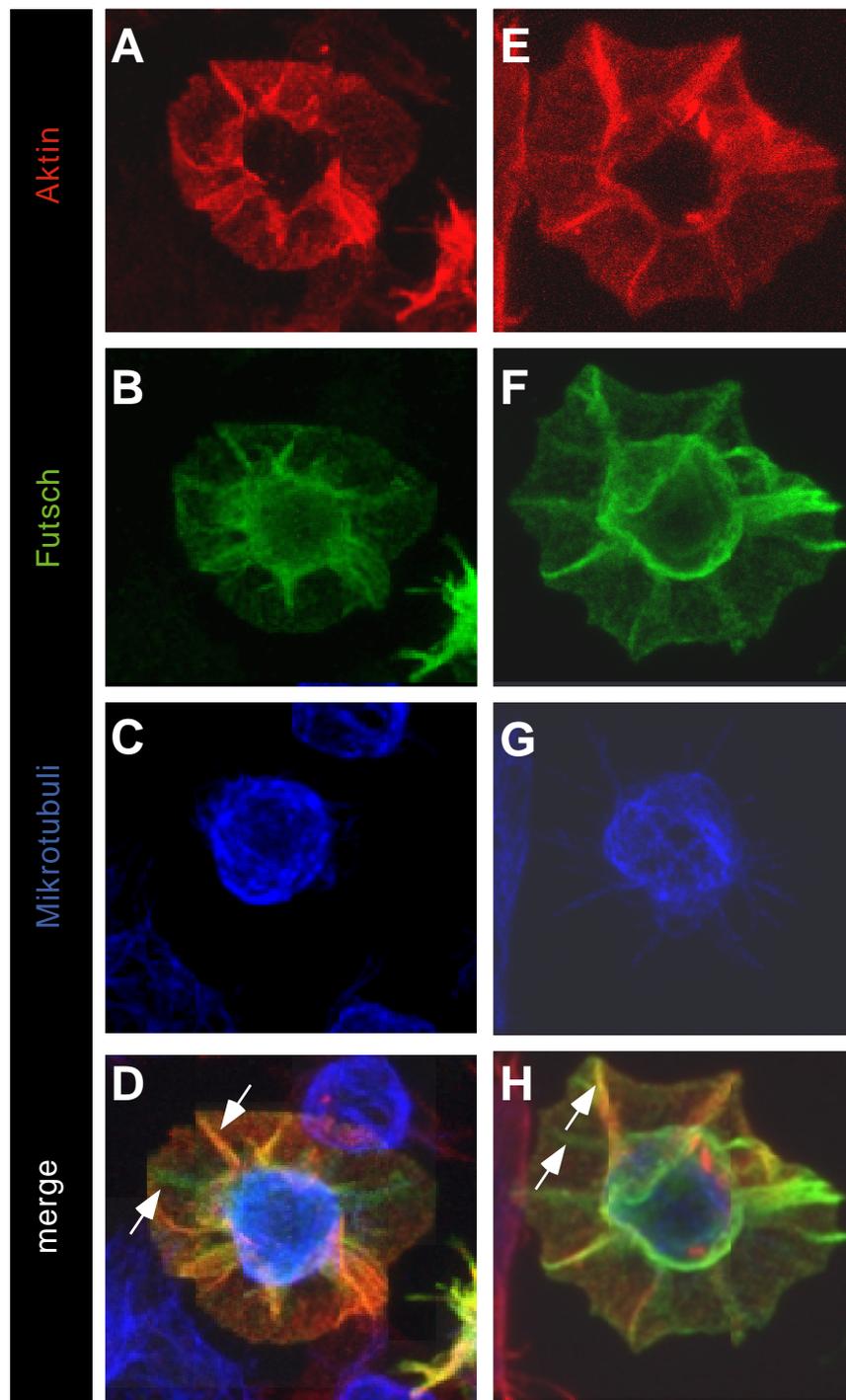


Abb. 14: Subzelluläre Lokalisation von *futsch*^{N-Term} und *futsch*^{C-Term} in *Drosophila* Schneider-(S2) Zellen. S2-Zellen wurden auf Fibronectin-besetzten Plättchen ausplattiert. Rekombinantes Futsch Protein wurde über die Antikörper anti-N-Term und anti-C-Term detektiert. Ektopische Expression von UAS-*futsch*^{N-Term} (A-D), UAS-*futsch*^{C-Term} (E-H). Das Aktin-Cytoskelett wurde über eine Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht. Mikrotubuli wurden über den mAb anti-Tubulin detektiert. Es kommt zu einer Colokalisation von Futsch^{N-Term} bzw. Futsch^{C-Term} mit dem Aktin-Cytoskelett, nicht jedoch mit den Mikrotubuli.

Es konnte gezeigt werden, dass Futsch direkt oder indirekt an die Mikrotubuli bindet (Hummel, 2000). In Zellkultur-Experimenten sollte untersucht werden, ob der konservierte N- oder C-Terminus diese Bindung vermitteln kann. Hierfür wurden *Drosophila* Schneider-Zellen (S2^{R+}) auf Fibronectin-beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Dort heften sie sich an die Plättchen an und nehmen eine charakteristische „Pfannkuchen-ähnliche“ Form an. Anschließend wurden sie mit den Konstrukten *futsch*^{N-Term} und *futsch*^{C-Term} transfiziert (siehe Material und Methoden). Das Aktin-Cytoskelett konnte über eine Phalloidin-Färbung sichtbar gemacht werden, die Mikrotubuli wurden mittels eines Antikörpers gegen α -Tubulin dargestellt. Die polyklonalen Antikörper anti-N-Term und anti-C-Term erkennen das ektopische Protein. Abbildung 14 zeigt die mit *futsch*^{N-Term} bzw. *futsch*^{C-Term} transfizierten S2-Zellen. Sowohl das N-terminale Protein als auch das C-terminale Protein sind im Cytoplasma der S2-Zellen nachweisbar, besonders in der perinukleären Region. Sie sind aber nicht im Zellkern exprimiert. Die Doppelfärbung mit den Cytoskelettmarkern zeigt, dass beide Proteine mit dem Aktin-Cytoskelett colokalisieren, nicht aber mit den Mikrotubuli. Futsch-reiche speichenähnliche Strukturen erstrecken sich vom Nucleus zur Zellmembran. F-Aktin ist ähnlich verteilt wie Futsch. Die Speichenstrukturen zeigen eine starke Futsch-Expression und entsprechen den F-Aktinbündeln in der Zelle. Auffallend ist aber, dass das Futsch Protein auch ungebunden an Aktin eine filamentähnliche Verteilung zeigt (siehe Pfeil in Abbildung 14 D und H).

Die Transfektion der S2-Zellen mit *futsch*^{N+C-Term}, *futsch*^{1-6p+8p-10} bzw. *futsch*^{1-6p+7p-10} führte leider zu keinen eindeutigen Ergebnissen in Bezug auf die Lokalisation dieser Fusionsproteine mit dem Cytoskelett.

3.6.2 F-Aktin-Bindungstest

Die Colokalisation von Futsch mit Aktin in S2-Zellen ließ vermuten, dass Futsch wie MAP1B direkt an Aktinfilamente binden kann. Daher sollte ein Cosedimentationstest über eine mögliche Bindung Aufschluss geben (siehe Material und Methoden). Das für den Versuch benötigte G-Aktin wurde freundlicherweise von Prof. M. Bähler, Münster zur Verfügung gestellt. Es wurde nach Pardee und Spudich (1982) aus einem Kaninchenmuskel gereinigt. G-Aktin wurde zunächst zu F-Aktin polymerisiert (siehe Material und Methoden).

Formal kann nicht ausgeschlossen werden, daß das N-terminale MBP die Proteine sterisch so verändert, daß die Aktin-Bindungsstelle verdeckt ist. Deshalb wurde versucht, den Protein-

N-Term			1		1		C-Term			1		1	
Aktin	1				1		Aktin	1				1	
	Ü	P	Ü	P	Ü	P		Ü	P	Ü	P	Ü	P

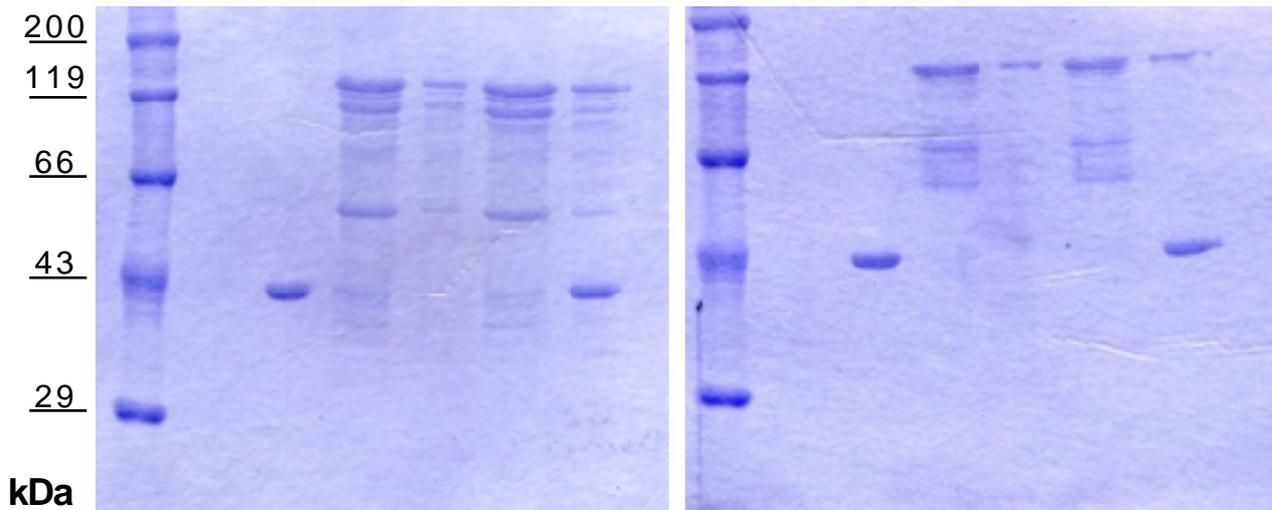


Abb. 15: Cosedimentationstest der Futsch-Fusionsproteine mit F-Aktin. Lösliches Futsch Protein wurde als MBP-(Maltose-Bindungsprotein) Fusionsprotein generiert und bleibt nach Zentrifugation bei 100.000 g für 30 Minuten größtenteils im Überstand (Ü). Im Gegensatz dazu findet man F-Aktin im Pellet (P). Nach Inkubation von Futsch mit F-Aktin für 10 Minuten und anschließender Zentrifugation konnte die Menge von Futsch in der Pellet-Fraktion nicht signifikant erhöht werden. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Comassie blue gefärbt.

„Tag“ durch Faktor Xa-Verdau zu entfernen und die Protein ohne „Tag“ zu analysieren. Allerdings wurde nach dem Faktor Xa-Verdau die Proteine in zahlreiche Fragmente gespalten, deren Identität nicht eindeutig war (Daten nicht gezeigt).

Für den F-Aktin-Bindungstest wurde der N-Terminus und der C-Terminus von Futsch untersucht. Anhand der Abbildung 15 ist zu erkennen, dass beide Fusionsproteine zum größten Teil im löslichen Überstand bleiben. Im Gegensatz dazu findet man F-Aktin im Pellet. Inkubiert man den löslichen N-Terminus bzw. C-Terminus des Futsch Proteins mit F-Aktin, kann die Menge an Fusionsprotein in der Pellet-Fraktion nicht erhöht werden, d.h., dass keine direkte Bindung an F-Aktin erfolgt ist.

3.6.3 Mikrotubuli-Bindungstest

3.6.3.1 Mikrotubuli-Bindung der Fusionsproteine mit Hilfe des „Microtubule/Tubulin Biochem Kit“ der Firma Cytoskeleton

Das Vertebraten-Homolog von Futsch, MAP1B, ist bereits eingehend hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften an die Mikrotubuli untersucht worden. Die Homologie zwischen diesen Proteinen beschränkt sich auf den relativ kleinen N- und C-terminalen Bereich des Futsch Proteins, wobei die Mikrotubuli-Bindungsdomäne von MAP1B nicht konserviert ist.

In einem Mikrotubuli-Bindungstest sollte eine eventuelle Bindung von Futsch an die Mikrotubuli untersucht werden, bzw. die Frage geklärt werden, mit welcher Domäne Futsch an die Mikrotubuli binden kann. Zunächst wurde eine mögliche Mikrotubuli-Bindung der Fusionsproteine mit Hilfe des „Microtubule/Tubulin Biochem Kit“ der Firma Cytoskeleton durchgeführt (siehe Material und Methoden). Nach Inkubation der Fusionsproteine mit den Taxol-stabilisierten Mikrotubuli konnte die Menge an sich in der Pellet-Fraktion befindlichen Fusionsproteinen nicht erhöht werden, was auf eine fehlende Bindung an die Mikrotubuli deutete (Abbildung 16). Auffallend war jedoch, daß nach Inkubation der Taxol-stabilisierten Mikrotubuli mit dem C-Terminus von Futsch eine deutliche Proteinbande in Höhe von ca. 55 kDa im Überstand zu sehen war, was der Größe von Mikrotubuli entspricht. Diese befanden sich also nach Inkubation mit dem C-Terminus zu ca. 50 % im löslichen Überstand, was auf eine Destabilisierung der Mikrotubuli hindeutete.

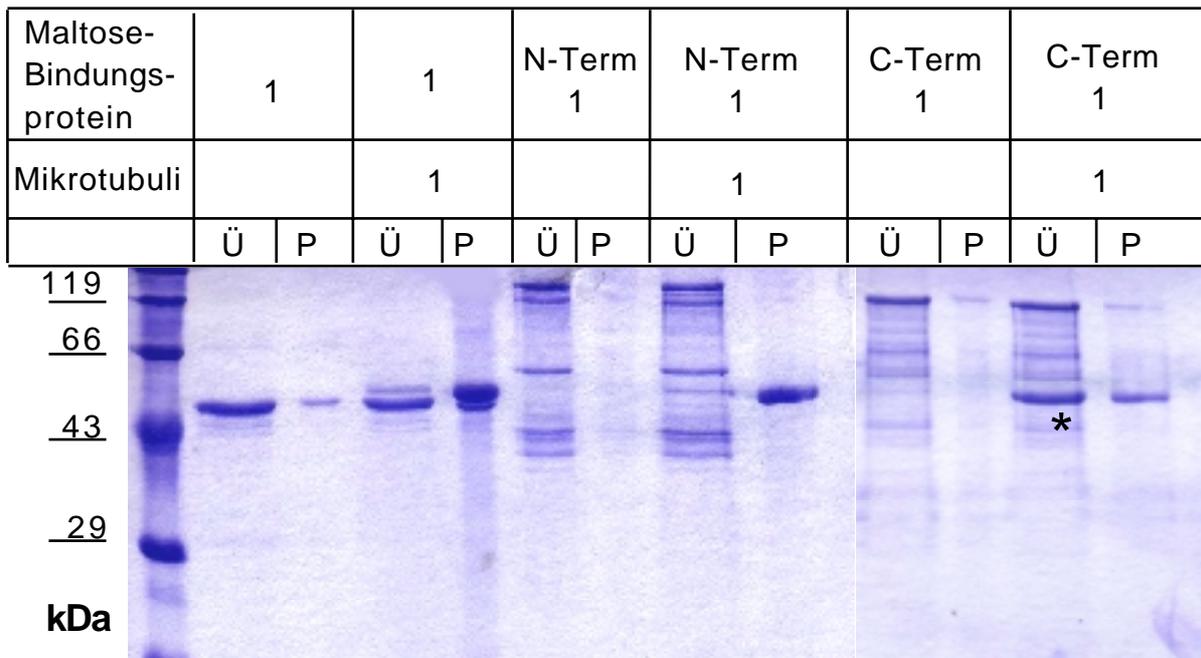


Abb. 16: Cosedimentationstest der Futsch-Fusionsproteine mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli. Lösliches Futsch Protein wurde als MBP-(Maltose-Bindungsprotein) Fusionsprotein generiert und bleibt nach Zentrifugation bei 100.000 g für 30 Minuten größtenteils im Überstand (Ü). Nach Inkubation von Futsch mit den Mikrotubuli für 10 Minuten und anschließender Zentrifugation konnte die Menge von Futsch in der Pellet-Fraktion nicht erhöht werden. Allerdings findet man nach Inkubation des C-Terminus von Futsch mit den Mikrotubuli diese z.T. im löslichen Überstand (Stern). Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Commassie blue gefärbt.

3.6.3.2 Mikrotubuli-Bindungstest der Fusionsproteine mit aus Kalbshirn gewonnenen Mikrotubuli

Ein weiterer Mikrotubuli-Bindungstest wurde im Labor von R. Brandt, Osnabrück durchgeführt. Hierfür wurden die Mikrotubuli frisch aus Kalbshirn gewonnen (siehe Material und Methoden) und für den Test verwendet. Für den Cosedimentationstest wurden die Fusionsproteine mit 15 μ M Taxol-stabilisierten Mikrotubuli versehen (mit „2“ gekennzeichnet in Abbildung 17 und 18). Beide Proteine degradierten stark, so dass für den Test 70 μ g Protein bzw. 35 μ g Protein eingesetzt wurden. Die Menge nicht degradierten Proteins wurde auf ca. 15 % geschätzt (R. Brandt, persönliche Mitteilung), so dass letztendlich ca. 10 bzw. 5 μ g aktiven Proteins eingesetzt wurden (mit „2“ bzw. „1“ gekennzeichnet in Abbildung 17 und 18), das entspricht 12 mM bzw. 6 mM Protein.

Das Commassie-Gel zeigte, dass nach Inkubation der Taxol-stabilisierten Mikrotubuli mit dem N-Terminus von Futsch die Menge an Fusionsprotein in der Pellet-Fraktion nicht signifikant erhöht werden konnte, unabhängig davon, ob 10 oder 5 μ g aktiven Proteins eingesetzt wurden. Das gleiche Ergebnis wurde für den C-Terminus konstatiert, wenn 10 μ g aktiven Proteins eingesetzt wurden. Verringert man die Menge an Fusionsprotein um die Hälfte auf ca. 5 μ g aktives Protein, so konnte man eine deutliche Bande in Höhe von ca. 55 kDa im Überstand sehen. Die Mikrotubuli befanden sich also nach Inkubation mit dem C-Terminus teilweise im löslichen Überstand, was auf eine Destabilisierung der Mikrotubuli hindeutete (Abbildung 17).

Weiterhin wurde versucht, einen immunohistochemischen Nachweis der Fusionsproteine mit mAb anti-MBP durchzuführen, einem monoklonalen Antikörper gegen den Fusionsanteil MBP der zu testenden Proteine. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 wiedergegeben. Geringe Mengen des MBP pelletieren auch ohne Zugabe von Mikrotubuli. Die Menge an MBP nimmt aber nicht zu, wenn man Mikrotubuli hinzugibt. Sowohl N- als auch C-Terminus von Futsch bleiben im löslichen Überstand, wenn sie alleine zentrifugiert werden. Nach Inkubation von 10 μ g aktiven Protein mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli ist ein Teil der Fusionsproteine in der Pelletfraktion zu finden, was auf eine Bindung der Fusionsproteine an die Mikrotubuli deutet. Die Menge an Protein wurde auf ca. 50 % densitometrisch gemessen. Dieses Ergebnis konnte aber nicht erreicht werden, wenn nur die Hälfte des aktiven Fusionsproteins im Test eingesetzt wurde. Daher ist davon auszugehen, dass der N-Terminus von Futsch nur eine geringe Affinität zu den Mikrotubuli hat. Unterstützt wird diese Überlegung dadurch, dass nur mit dem kompletten N-Terminus, der vermutlich in der höchsten Konzentration vorliegt, eine Interaktion zu sehen ist.

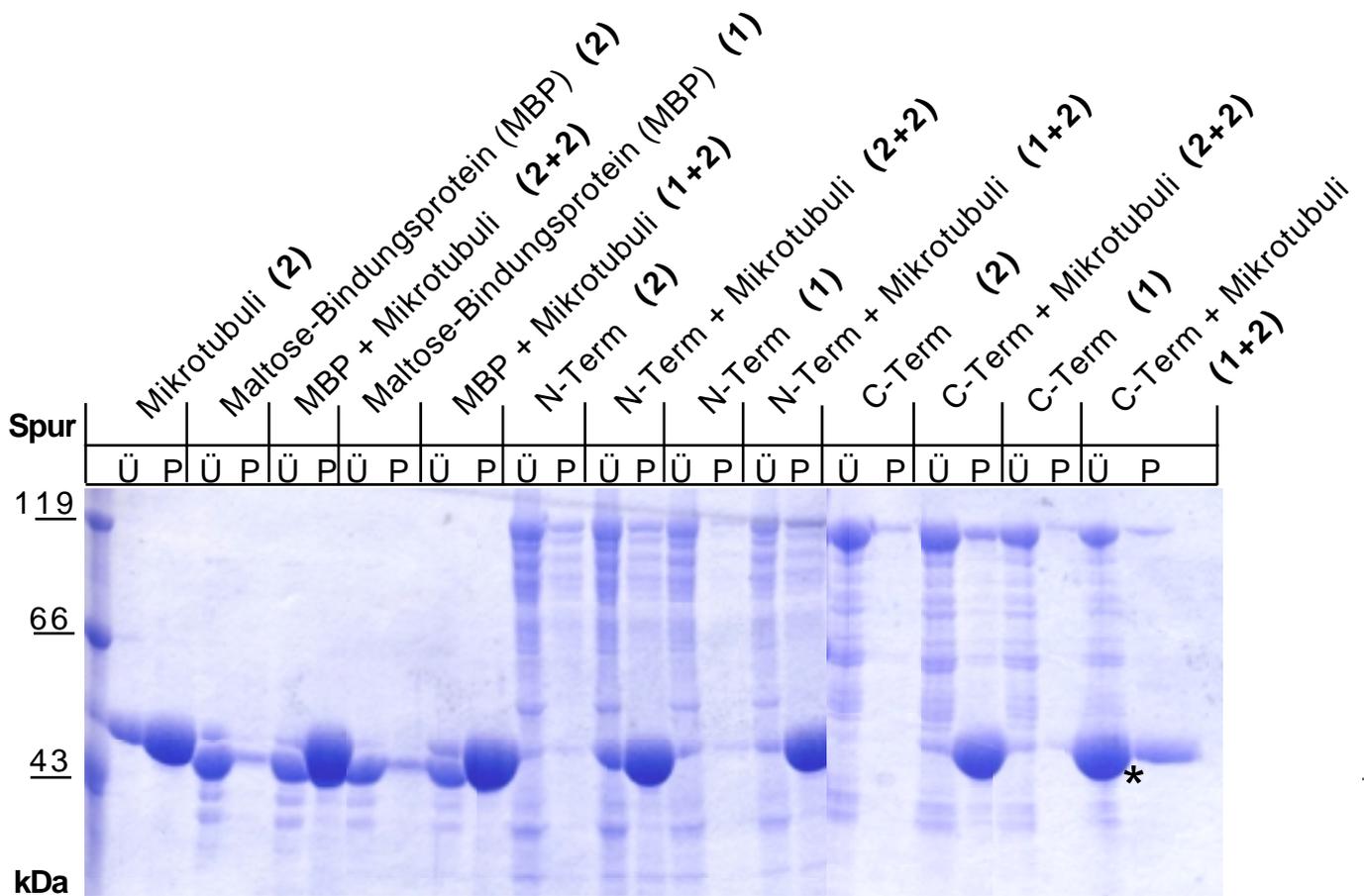
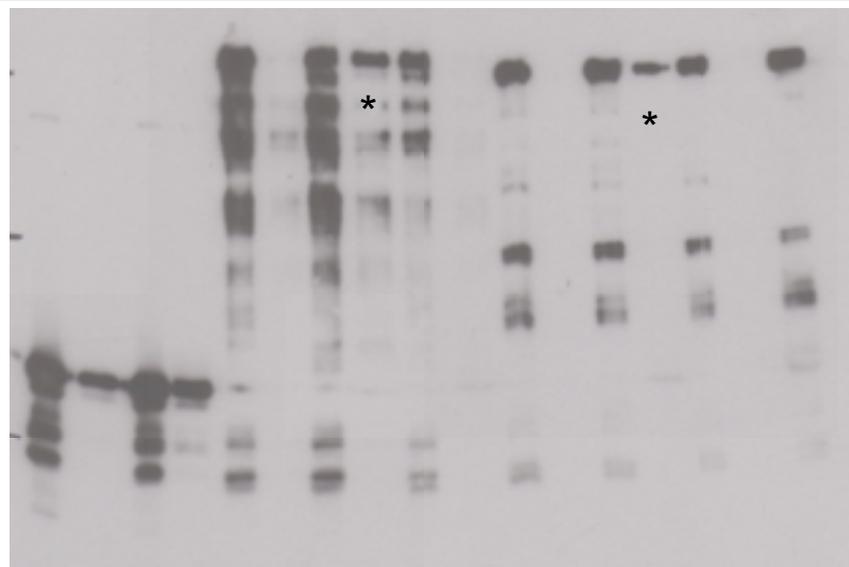


Abb. 17: Cosedimentationstest der Fusch-Fusionsproteine mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli. Lösliches Fusch Protein wurde als Maltose-Bindungsprotein (MBP) generiert und bleibt nach Zentrifugation bei 100.000 g für 30 Minuten größtenteils im Überstand (Ü). Nach Inkubation von Fusch mit den Mikrotubuli für 10 Minuten und anschließender Zentrifugation konnte die Menge von Fusch in den Pellet-Fractionen nicht erhöht werden. Allerdings findet man nach Inkubation des C-Terminus von Fusch mit den Mikrotubuli diese z.T im löslichen Überstand (Stern). Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgereinigt und mit Commassie blue gefärbt.

MBP	2	2								
N-Term			2	2	1					
C-Term						2	2	1	1	
MT		2		2	2		2		2	
	Ü	P	Ü	P	Ü	P	Ü	P	Ü	P

119



kDa

Abb. 18: Immunohistochemischer Nachweis der Futsch-Fusionsproteine mit dem mAb anti-MBP. Lösliches Futsch Protein wurde als MBP- (Maltose-Bindungsprotein) Fusionsprotein generiert und bleibt nach Zentrifugation bei 100.000 g für 30 Minuten größtenteils im Überstand (Ü). Nach Inkubation von Futsch mit den Mikrotubuli für 10 Minuten und anschließender Zentrifugation konnte die Menge von Futsch in der Pellet-Fraktion erhöht werden (Stern).

Ganz ähnlich verhält sich der C-Terminus von Futsch, allerdings binden hier nur ca. 30 % des Proteins.

3.7 Etablierung von transgenen UAS-*futsch*-Fliegen

In einem genetischen Experiment sollte die Frage geklärt werden, ob durch Expression von *futsch*-Konstrukten im *futsch*-mutanten Hintergrund eine Abschwächung bzw. Rettung des *futsch*-mutanten Synapsenphänotyps erreicht werden kann.

Mittels des GAL4-Aktivator/UAS-Effektor Systems ist es möglich, in Abhängigkeit vom zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster des GAL4-Aktivators, jedes gewünschte Gen zu aktivieren (Brand und Perrimon, 1993).

Die o.g. Konstrukte wurden über Mikroinjektion in frühe Blastoderm-Stadien eines *white*⁻ Stammes gebracht und anschließend transgene Fliegenstämme etabliert (siehe Material und Methoden).

Es konnten für das N-terminale Konstrukt 6, für das C-terminale Konstrukt 3 und für das N+C-terminale Konstrukt 4 unabhängige transgene Fliegenstämme etabliert werden. Durch die Verwendung eines Doppelbalancer-Stammes wurde anschließend das Chromosom bestimmt, auf dem die UAS-*futsch*-Integration stattgefunden hat (siehe Material und Methoden). Eine Tabelle im Anhang listet die verschiedenen transgenen UAS-*futsch*-Stämme auf.

3.8 Ektopische Expression der UAS-*futsch*-Konstrukte

Es sollte die Frage geklärt werden, ob eine Überexpression der UAS-*futsch*-Konstrukte in einem wildtypischen Hintergrund zu einem Phänotyp führt. Hierfür wurden die Linien *da-GAL4*, *elav-GAL4*, *rho-GAL4*, *sca-GAL4* und die PNS-spezifische Linie *P163* zur ektopischen Expression in verschiedenen Geweben bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung der Embryonen verwendet. Die ektopische Expression hat keine Auswirkung auf das axonale Muster, was durch eine Färbung mit den Antikörpern BP102, 22C10 und anti-fasII sichtbar gemacht wurde (Daten nicht gezeigt). Die ektopische Expression der Konstrukte wurde auch an der NMJ von L3-Larven untersucht. Als synaptischer Marker diente wiederum der mAb nc46. Die synaptische Organisation in L3-Larven, die die Konstrukte in den o.g.

Gewebe überexprimieren, entspricht der wildtypischer L3-Larven (Daten nicht gezeigt). Die Lebensfähigkeit der entsprechenden Nachkommen ist nicht beeinträchtigt.

3.9 Partielle Rettung des *futsch* Synapsenphänotyps durch spezifische Expression der UAS-*futsch*-Konstrukte

Mittels der etablierten transgenen UAS-*futsch*-Stämme (siehe oben) sollte die Frage geklärt werden, ob der in den *futsch*-Mutanten sichtbare Synapsenphänotyp durch eine ubiquitäre oder panneurale Expression der UAS-*futsch*-Konstrukte abgeschwächt bzw. gerettet werden kann.

Hierfür wurden Fliegenstämme etabliert, die ein *futsch*-mutantes Chromosom und eine drittchromosomale UAS-*futsch*-Insertionen tragen, bzw. ein *futsch*-mutantes Chromosom und eine drittchromosomale GAL4-Insertionen. Verwendet wurden die Linien *da*-GAL4 (ubiquitäre Expression) oder *elav*-GAL4 (panneurale Expression). Die Kreuzung der entsprechenden Stämme gegeneinander führt zu einer ektopischen Expression der UAS-*futsch*-Konstrukte in entsprechenden Geweben in *futsch*-mutanten Embryonen. Die *futsch*-Letalität in den Linien *M454*, *P158* und *P28* konnte weder durch die panneurale noch durch die ubiquitäre Expression der UAS-*futsch*-Konstrukte revertiert werden. Jedoch konnte der Synapsenphänotyp der homozygot lebensfähigen *futsch*-Linien *K68* und *N94* partiell gerettet werden. Untersucht wurde wiederum die Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren. Eine Tabelle im Anhang listet die aus der Untersuchung einzelner Larven gewonnenen Daten auf. Tabelle 5 fasst die Daten für die Rettung des *futsch*^{K68}-Synapsenphänotyps zusammen. Die angegebenen Zahlen geben die durchschnittliche Anzahl der Boutons an, die den Muskel 4 in den Larven des 3. Larvenstadiums innervieren.

Tabelle 5: Übersicht über die durchschnittliche Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren. Gezeigt ist die Boutonzahl in den *futsch*^{K68}-mutanten Tieren, die ein UAS-*futsch*-Konstrukt und eine GAL4-Insertion tragen

Wildtyp		UAS-Aktivatorlinien		
51,1 ± 14	GAL4-Treiberlinien	<i>K68/UAS-futsch</i> ^{N-Term}	<i>K68/UAS-futsch</i> ^{C-Term}	<i>K68/UAS-futsch</i> ^{N+C-Term}
K68	<i>K68/da</i> -GAL4	33,4 ± 20	30,0 ± 13	39,9 ± 18
16,4 ± 6	<i>K68/elav</i> -GAL4	22,3 ± 11	26,6 ± 14	26,8 ± 14

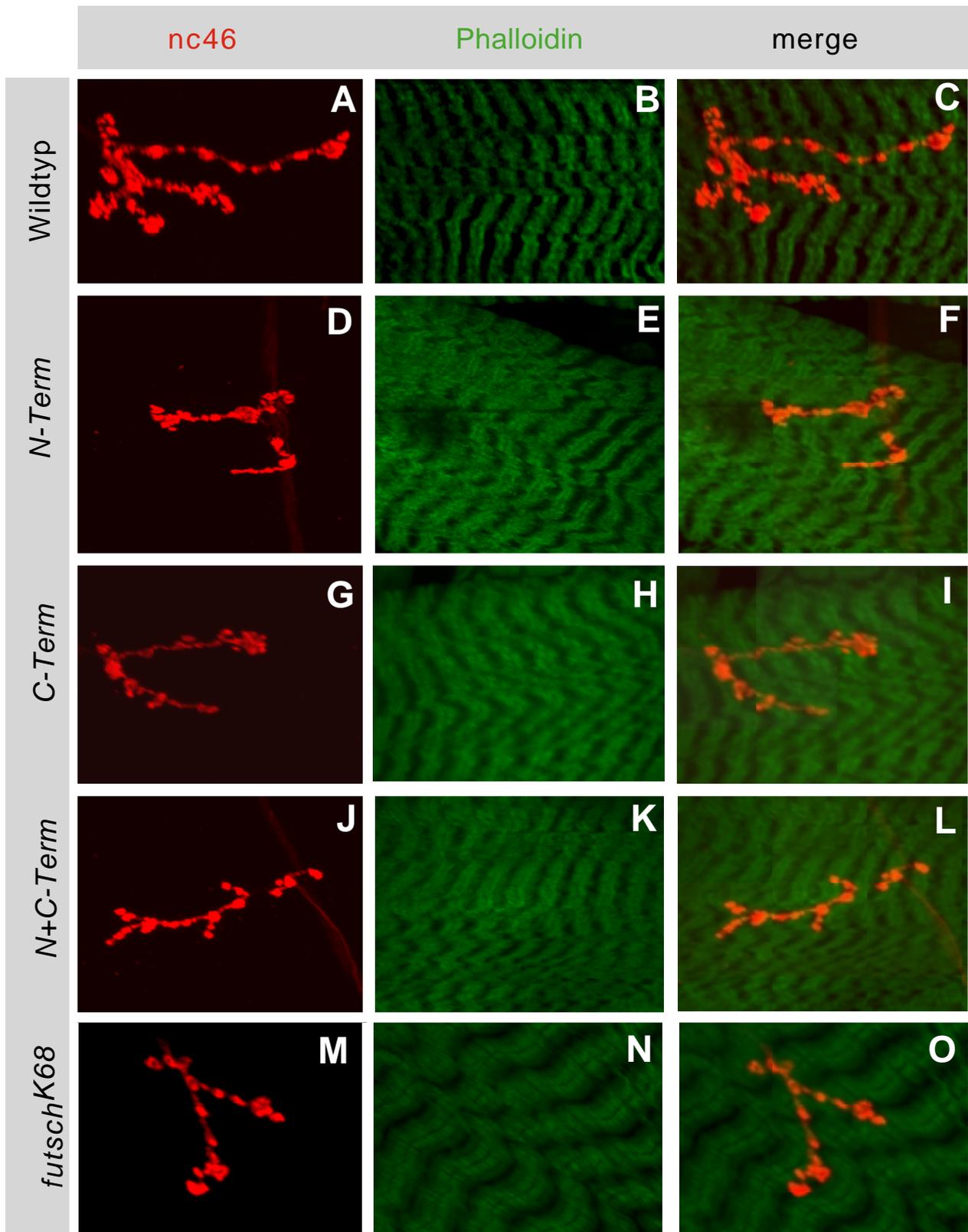


Abb. 19: Präparationen der larvalen NMJ am Muskel 4.

(A-C) Wildtyp, ektopische Expression von (D-F) UAS-*futsch*^{N-Term}, (G-I) UAS-*futsch*^{C-Term}, (J-L) UAS-*futsch*^{N+C-Term} mittels *da*-GAL4 im *futsch*^{K68}-mutantem Hintergrund und (M-O) *futsch*^{K68}. Der mAb nc46 färbt die Boutons, die Muskel 4 innervieren (A, D, G, J, M). Die Muskulatur wurde durch eine Phalloidininfärbung sichtbar gemacht (B, E, H, K, N). Der *futsch*-mutante Synapsenphänotyp lässt sich leicht abschwächen.

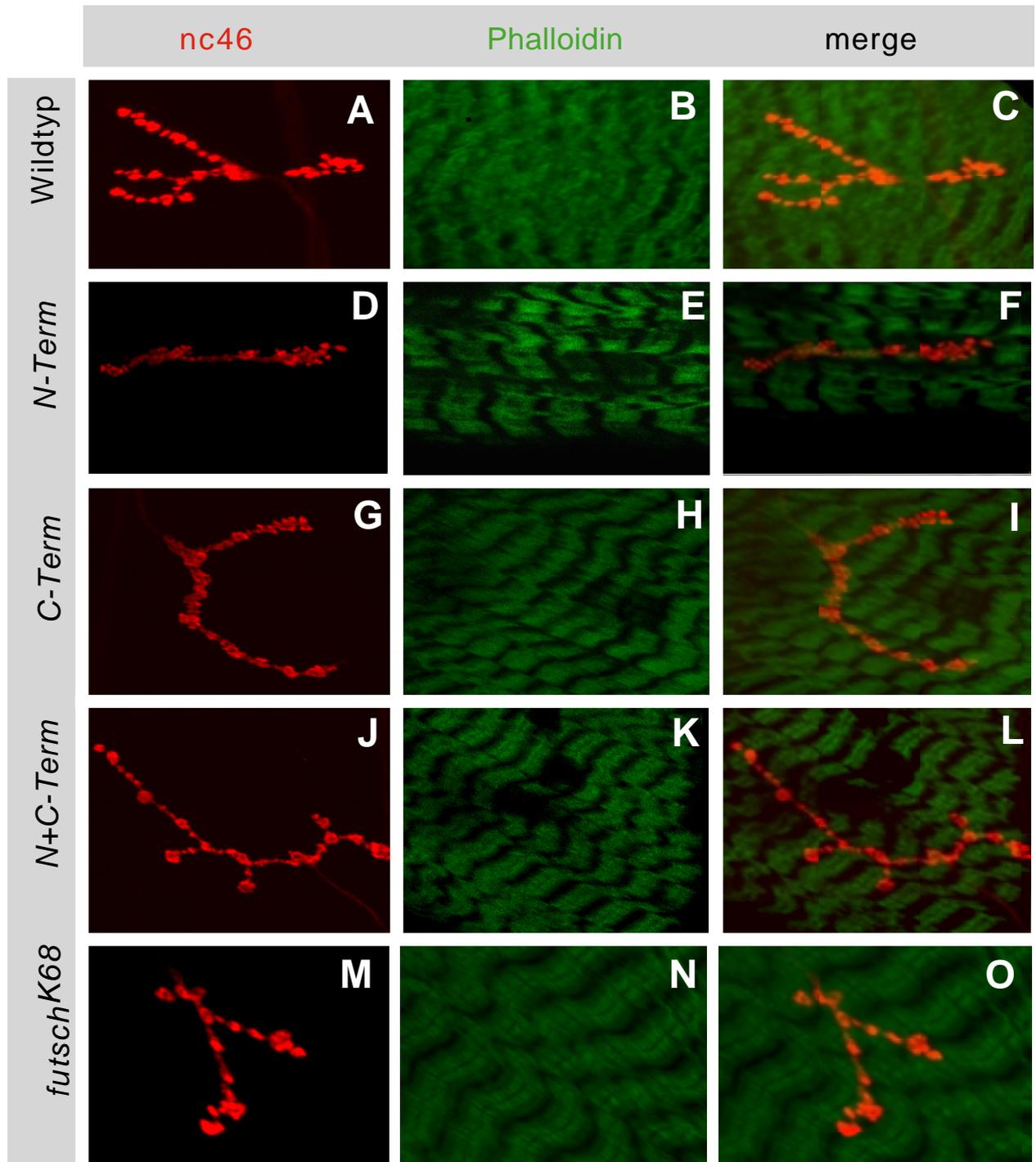


Abb. 20: Präparationen der larvalen NMJ am Muskel 4.

(A-C) Wildtyp, ektopische Expression von (D-F) UAS-*futsch*^{N-Term}, (G-I) UAS-*futsch*^{C-Term}, (J-L) UAS-*futsch*^{N+C-Term} mittels *elav*-GAL4 im *futsch*^{K68}-mutantem Hintergrund und (M-O) *futsch*^{K68}. Der mAb nc46 färbt die Boutons, die Muskel 4 innervieren (A, D, G, J, M). Die Muskulatur wurde durch eine Phalloidin färbung sichtbar gemacht (B, E, H, K, N). Der *futsch*-mutante Synapsenphänotyp lässt sich leicht abschwächen.

Aus den Daten wird ersichtlich, dass die ektopische Expression der UAS-*futsch*-Konstrukte im *futsch*^{K68}-mutantem Hintergrund zu einer partiellen Rettung des Synapsenphänotyps führen, wobei die ubiquitäre Expression dieser Konstrukte mittels der *da*-GAL4-Linie den Phänotyp stärker retten kann als eine panneuronale Expression mittels der *elav*-GAL4-Linie (siehe Tabelle 5 und Abbildungen 19 und 20). Die durchschnittliche Boutonzahl am Muskel 4 lag in *futsch*^{K68}-mutanten Larven bei 16,4. Da der wildtypische Wert innervierender Boutons von 51,1 offensichtlich nicht erreicht wurde, kann man nur von einer Abschwächung des *futsch*-Phänotyps sprechen. Eine deutlichere Rettung konnte durch die Überexpression des Konstruktes *futsch*^{N+C-Term} mittels der *da*-GAL4-Linie erreicht werden. Hier lag der durchschnittliche Wert bei 39,9 Boutons pro Muskel.

In *futsch*^{N94} Larven kann der Synapsenphänotyp durch die ektopische Expression des UAS-*futsch*^{N-Term}-Konstruktes und des UAS-*futsch*^{C-Term}-Konstruktes nicht gerettet werden, unabhängig davon, ob die Konstrukte ubiquitär oder panneural exprimiert werden. Die in *futsch*^{N94} Larven ermittelte Zahl von 17,2 Boutons, die im Durchschnitt Muskel 4 innervieren, kann nicht signifikant erhöht werden. Durch die Expression des UAS-*futsch*^{N+C-Term}-Konstruktes kann zumindest bei ubiquitärer Expression die Anzahl der Muskel 4 innervierenden Boutons leicht erhöht werden (siehe Abbildungen 21 und 22). Die nachfolgende Tabelle 6 fasst die Daten dieses Versuchs zusammen.

Tabelle 6: Übersicht über die durchschnittliche Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren. Gezeigt ist die Boutonzahl in den *futsch*^{N94}-mutanten Tieren, die ein UAS-*futsch*-Konstrukt und eine GAL4-Insertion tragen

Wildtyp		UAS-Aktivatorlinien		
51,1 ± 14	GAL4-Treiberlinien	<i>N94/UAS-futsch</i> ^{N-Term}	<i>N94/UAS-futsch</i> ^{C-Term}	<i>N94/UAS-futsch</i> ^{N+C-Term}
N94	<i>N94/da</i> -GAL4	19,5 ± 10	16,4 ± 12	28,2 ± 13
17,2 ± 10	<i>N94/elav</i> -GAL4	17,9 ± 15	22,7 ± 21	23,4 ± 14

Die ektopische Expression der UAS-*futsch*-Konstrukte *N-Term* und *C-Term* kann den *futsch*^{N94}-Synapsenphänotyp nicht retten. Die ektopische Expression des UAS-*futsch*-Konstruktes *N+C-Term* führt zu einer leichten Abschwächung des *futsch*-Synapsenphänotyps. Da die Funktion des MAP1B Proteins durch Phosphorylierung reguliert werden kann, wurde vermutet, dass auch die Futsch-Funktion phosphorylierungsabhängig ist. Ein Konstrukt, das die potentiellen Phosphorylierungsstellen beinhaltet, sollte daher möglicherweise die Anzahl

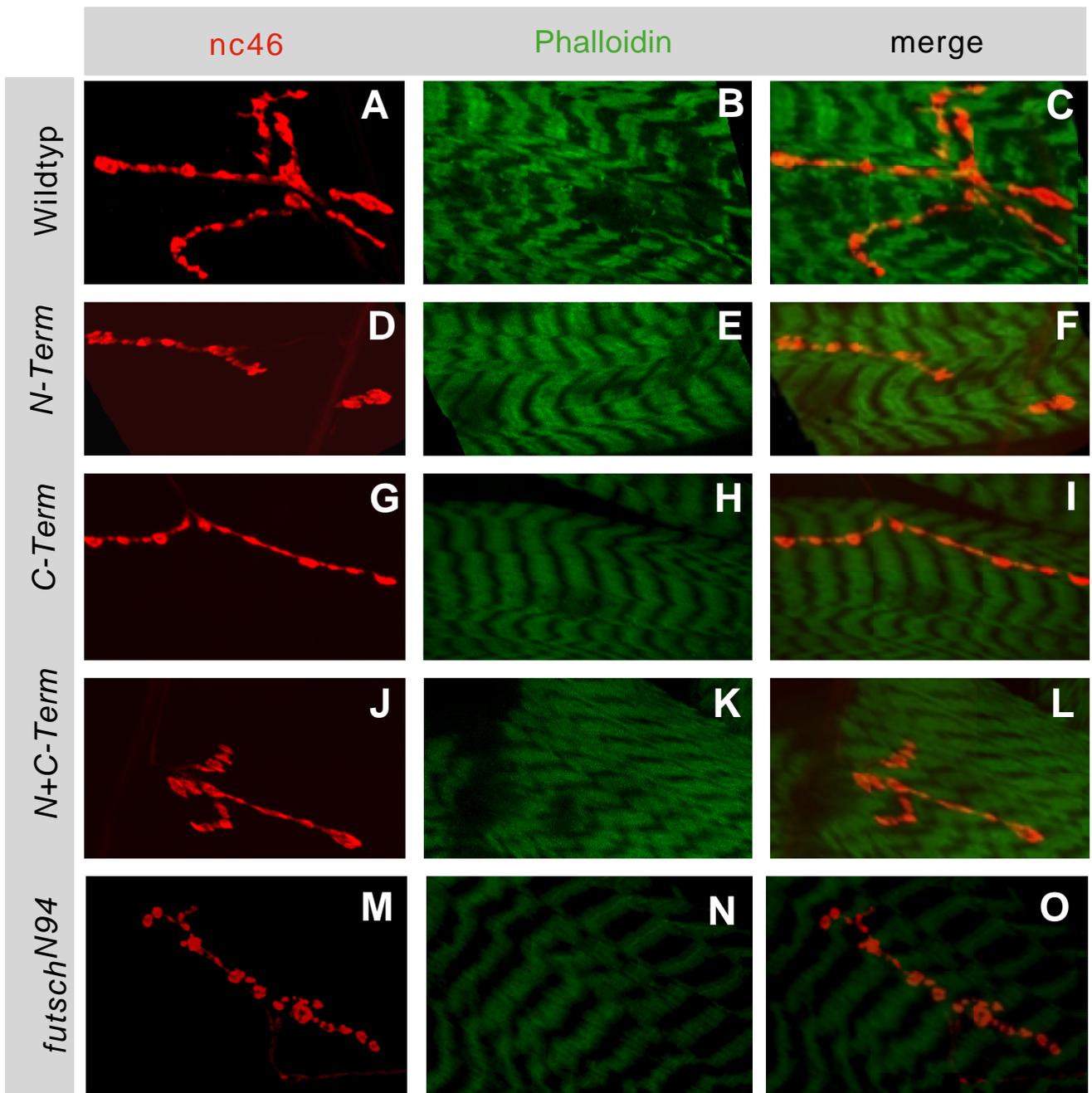


Abb. 21: Präparationen der larvalen NMJ am Muskel 4.

(A-C) Wildtyp, ektopische Expression von (D-F) UAS-*futsch*^{N-Term}, (G-I) UAS-*futsch*^{C-Term}, (J-L) UAS-*futsch*^{N+C-Term} mittels *da*-GAL4 im *futsch*^{N94}-mutantem Hintergrund und (M-O) *futsch*^{N94}. Der mAb nc46 färbt die Boutons, die Muskel 4 innervieren (A, D, G, J, M). Die Muskulatur wurde durch eine Phalloidinfärbung sichtbar gemacht (B, E, H, K, N). Der *futsch*-mutante Synapsenphänotyp lässt sich nicht abschwächen.

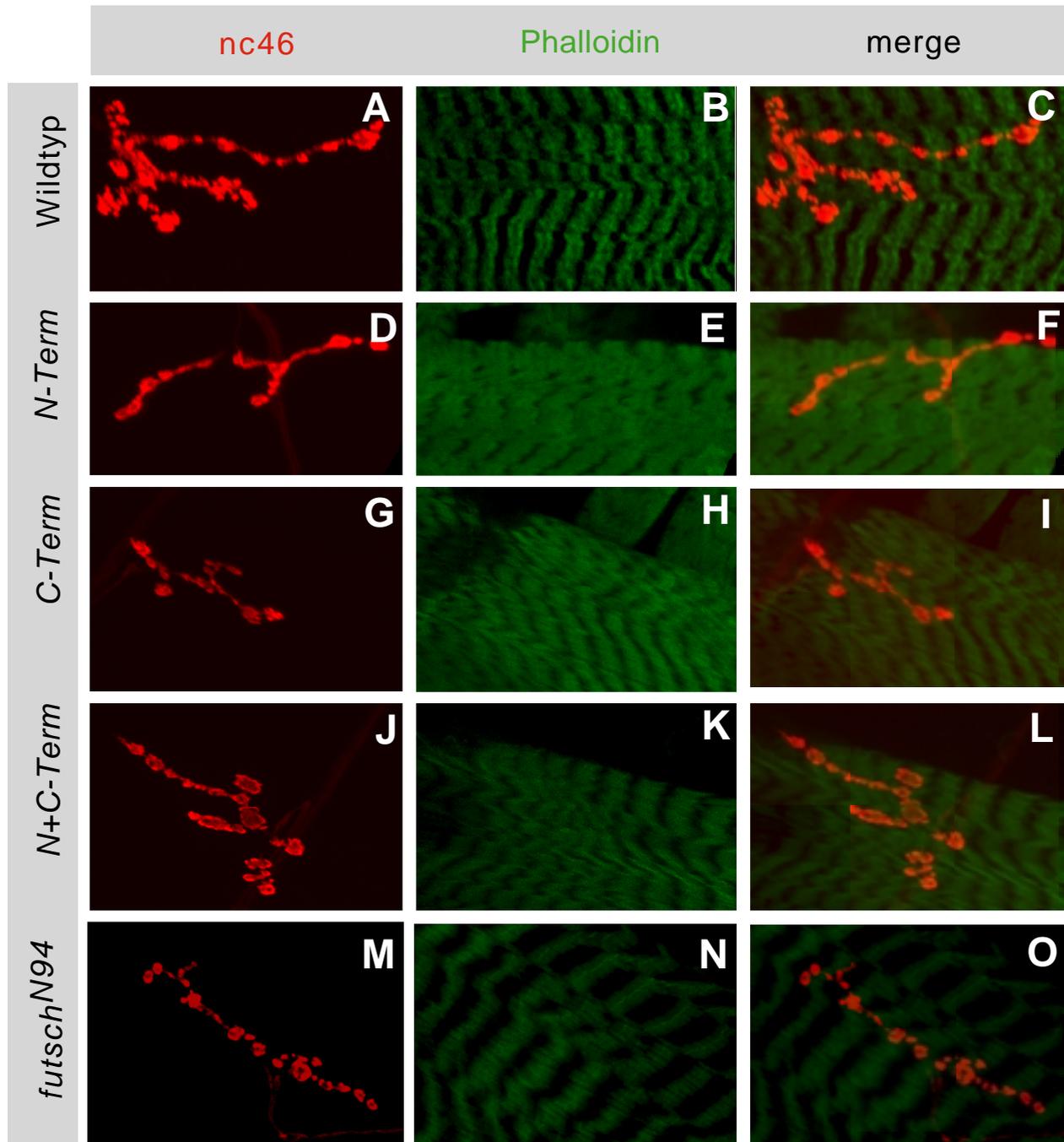


Abb. 22: Präparationen der larvalen NMJ am Muskel 4.

(A-C) Wildtyp, ektopische Expression von (D-F) UAS-*futsch*^{N-Term}, (G-I) UAS-*futsch*^{C-Term}, (J-L) UAS-*futsch*^{N+C-Term} mittels *elav*-GAL4 im *futsch*^{N94}-mutantem Hintergrund und (M-O) *futsch*^{N94}. Der mAb nc46 färbt die Boutons, die Muskel 4 innervieren (A, D, G, J, M). Die Muskulatur wurde durch eine Phalloidin-färbung sichtbar gemacht (B, E, H, K, N). Der *futsch*-mutante Synapsenphänotyp lässt sich nicht abschwächen.

der Boutons weiter erhöhen und den Phänotyp stärker retten könne. Daher wurden 4 weitere pUAST-Konstrukte kloniert (siehe Abbildung 10), um diese in wildtypische *Drosophila*-Embryonen injizieren zu können. Bis dato konnten erst 3 unabhängige transgene Fliegenstämme etabliert werden, die das Konstrukt pUAST/1-6p-7p-10 tragen. Da diese Fliegenlinien, die ein UAS-Transgen tragen, aus Zeitgründen noch nicht in den *futsch*-mutanten Hintergrund gebracht werden konnten, konnte noch keine Untersuchung bezüglich einer eventuellen Rettung des Phänotyps im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

3.10 Generierung weiterer anti-Futsch Antikörper

Das Futsch Protein wird durch den monoklonalen Antikörper 22C10 erkannt. Zur weiteren Charakterisierung des Futsch Proteins wurden zwei polyklonale Antikörper erzeugt, anti-N-Term und anti-C-Term. Hierfür wurde der N-Terminus von Futsch über PCR amplifiziert und so zusätzliche Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und Sall eingebracht. Über eine Restriktion mit diesen Restriktionsenzymen wurde der N-Terminus in den Vektor pMAL kloniert. Das N-terminale Fusionsprotein beinhaltet die Aminosäuren 1-612. Das C-terminale Konstrukt von *futsch* wurde über eine Restriktion mit den Restriktionsenzymen Sall und SphI aus dem Vektor pGEM in den HisTag-Vektor pQE-31 kloniert. Das daraus resultierende C-terminale Fusionsprotein beinhaltet die Aminosäuren 4799-5327.

Die Klonierungen wurden sowohl durch Testrestriktionen als auch durch Sequenzierung der Konstrukte bestätigt. Da es durch die PCR-Amplifikation zu Basenaustauschen und somit zur Bildung trunkierter Fusionsproteine kommen kann, wurden mehrere unabhängige Klone getestet (Daten nicht gezeigt).

Zur Generierung der polyklonalen Antikörper wurden jeweils ca. 2,5 mg der Fusionsproteine aufgearbeitet und direkt zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (Davids Biotechnologie, Regensburg).

3.10.1 Die Expressionsmuster der polyklonalen Antikörper im Embryo entsprechen dem 22C10-Expressionsmuster

Die polyklonalen anti-Futsch Antikörper sollten zur näheren Charakterisierung der Futsch-Lokalisation dienen. Die so gewonnenen Seren (anti-N-Term und anti-C-Term) wurden in verschiedenen Konzentrationen (von 1:100 – 1:10.000) an Wildtyp-Embryonen und Augenimaginalscheiben getestet. Der polyklonale Antikörper anti-C-Term zeigt in wildtypischen Embryonen das gleiche Expressionsmuster wie 22C10, jedoch ist die Spezifität gegenüber dem monoklonalen Antikörper reduziert (Abbildung 23). Leider konnten für den N-Terminalen Antikörper nur deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt werden, aber auch hier ist eine Färbung in den Axonen erkennbar. Um die Spezifität der Seren zu testen, wurden die Konstrukte $UAS-futsch^{N-Term}$, $UAS-futsch^{C-Term}$, $UAS-futsch^{N+C-Term}$ und $UAS-mini-futsch$ (Hummel et al., 2000) ektopisch exprimiert. Hierfür wurden die o.g. Fliegenstämme mit Tieren der *ftz*-GAL4-Linie gekreuzt. In der nachfolgenden Generation kommt es so zu einer ektopischen Expression des Proteins im *ftz*-Expressionsmuster. Die *Ftz*-Expression wurde für die Konstrukte $UAS-futsch^{N-Term}$ und $UAS-mini-futsch$ mit Hilfe des Antikörpers anti-N-Term sichtbar gemacht (Abbildung 24, A und D), für die Konstrukte $UAS-futsch^{C-Term}$ und $UAS-futsch^{N+C-Term}$ mit Hilfe des Antikörpers anti-C-Term (Abbildung 24, B und C). Beide Antikörper erkennen das ektopisch exprimierte Protein sehr gut.

3.10.2 Das Expressionsmuster des polyklonalen Antikörper anti-C-Term in der Augenimaginalscheibe entspricht dem 22C10-Expressionsmuster

Abbildungen 25 und 26 zeigen die Augenimaginalscheiben wildtypischer L3-Larven, an denen die polyklonalen Antikörper getestet wurden. Der Antikörper anti-C-Term wurde in verschiedenen Konzentrationen (von 1:100 – 1:10.000) an Wildtyp-Augenimaginalscheiben getestet. Er zeigt hier das gleiche Expressionsmuster wie 22C10, jedoch ist die Spezifität gegenüber dem monoklonalen Antikörper deutlich reduziert. Es ist aber eine Färbung der Photorezeptoren, des Bolwig-Nervs und die Projektion in die Lamina zu erkennen (Abbildung 25). Ebenso wurde der Antikörper anti-N-Term in verschiedenen Konzentrationen (von 1:100 – 1:10.000) an Wildtyp-Augenimaginalscheiben getestet. Leider konnte mit dem N-terminalen Antikörper keine spezifische Färbung erzielt werden (Abbildung 26).

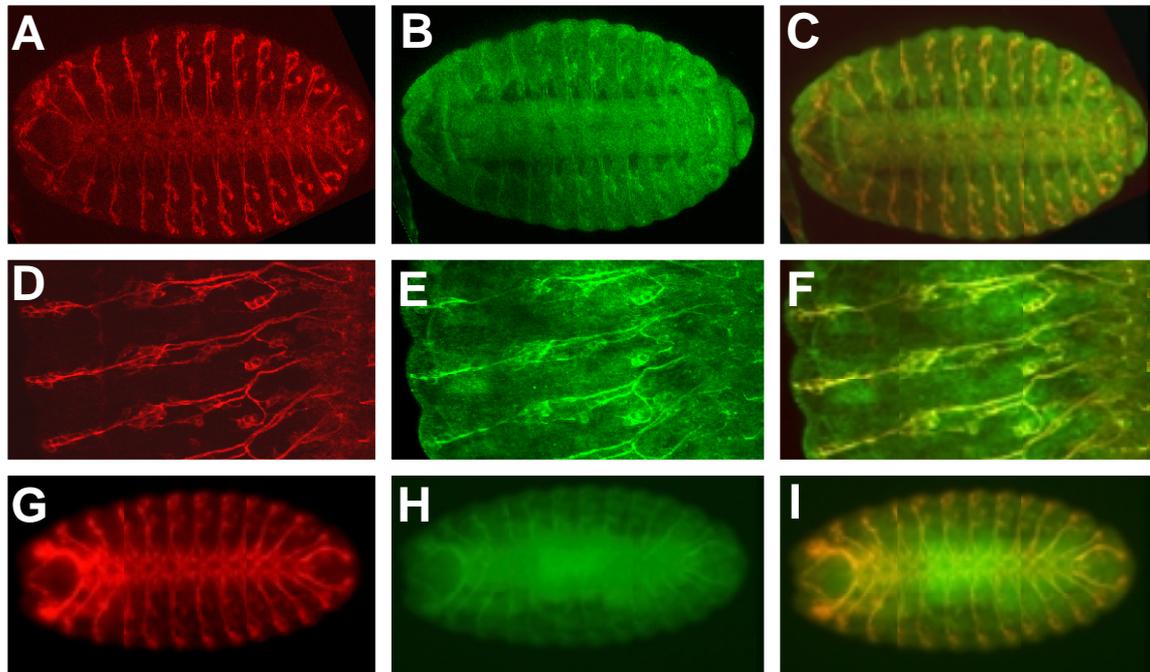


Abb. 23: Antikörperfärbungen mit den polyklonalen Antikörpern anti-N-Term und anti-C-Term an wildtypischen Embryonen. "Whole mount"-Antikörperfärbung mit dem mAb 22C10 (A, D, G) und den polyklonalen Antikörpern anti-N-Term (H) und anti-C-Term (B+E). Anterior ist links. Der polyklonale Antikörper anti-C-Term erkennt Axone, Dendriten und Somata (B+E). Das Signal, das mit dem polyklonalen Antikörper anti-N-Term gezeigt werden konnte, ist weniger spezifisch (H). Eine deutliche Färbung der Axone ist jedoch auszumachen.

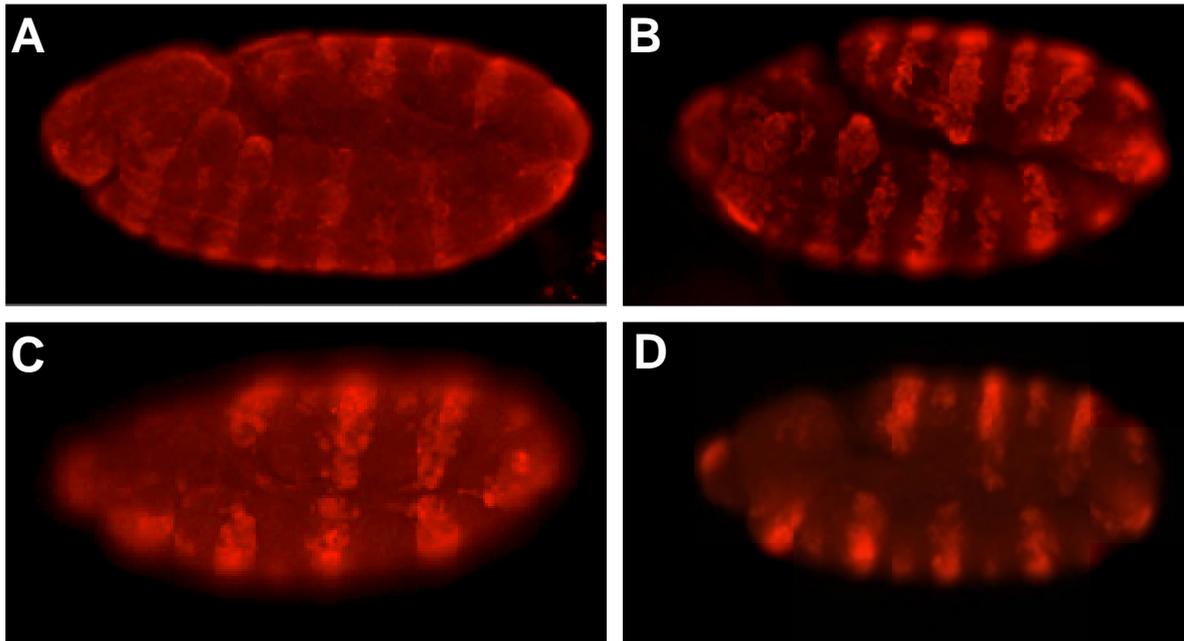


Abb. 24: Ektopische Expression der *UAS-futsch*-Konstrukte mittels der *ftz*-GAL4-Treibers. "Whole mount"-Antikörperfärbung mit den polyklonalen Antikörpern anti-N-Term (A+D) und anti-C-Term (B+C). Laterale Ansichten, Stadium 8. Anterior ist links.

Embryonen, die eine *ftz*-GAL4-Insertion und ein *UAS-futsch*-Transgen tragen: (A) *UAS-futsch*^{N-Term}, (B) *UAS-futsch*^{C-Term}, (C) *UAS-futsch*^{N+CTerm}, (D) *UAS-mini-futsch*, exprimieren ektopisch im *ftz*-Muster die Futsch-Konstrukte. Die Antikörper erkennen spezifisch die ektopisch exprimierten Proteine.

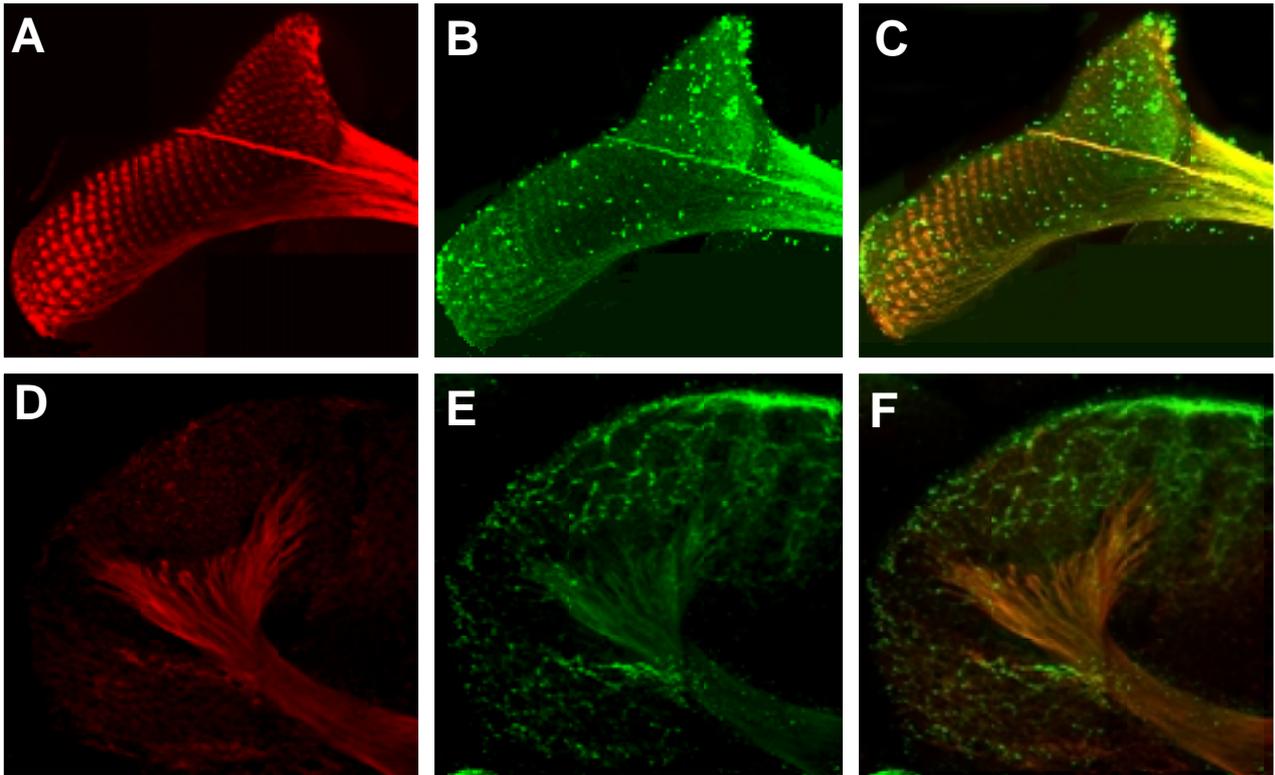


Abb. 25: Präparationen der Augenimaginalscheiben wildtypischer Larven des 3. Larvenstadiums. Der mAb 22C10 (A+D) erkennt differenzierte Photorezeptorneurone und ihre axonalen Fortsätze. Außerdem markiert er den Bolwig'schen-Nerv. Der polyklonale Antikörper anti-C-Term (B-E) erkennt ebenfalls diese Strukturen.

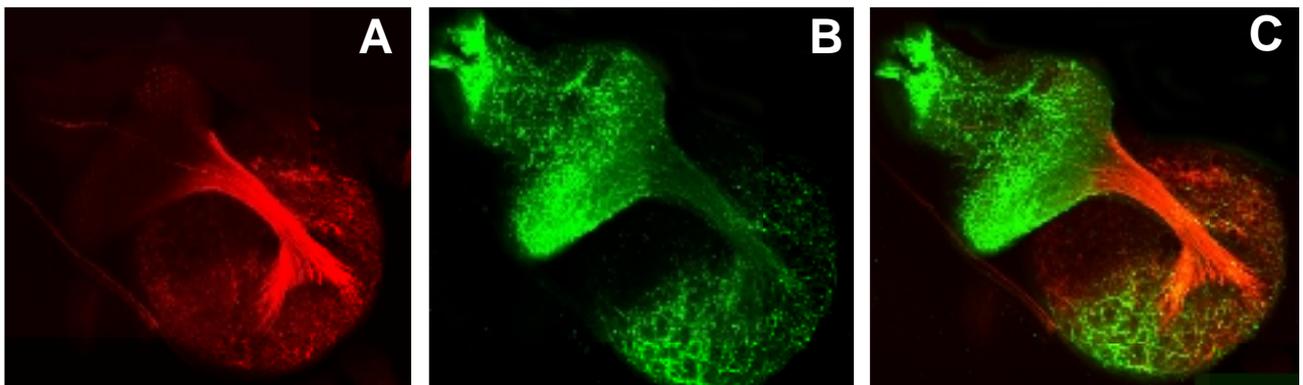


Abb. 26: Präparationen der Augenimaginalscheiben wildtypischer Larven des 3. Larvenstadiums. Der mAb 22C10 (A) erkennt differenzierte Photorezeptorneurone und ihre axonalen Fortsätze. Außerdem markiert er den Bolwig'schen-Nerv. Mit dem polyklonalen Antikörper anti-N-Term (B) konnte kein spezifisches Signal in der Augenimaginalscheibe erkannt werden.

3.11 Kartierung des 22C10 Epitops

Für die Kartierung des 22C10 Epitops wurde das Futsch Protein einer sauren Hydrolyse unterzogen, so dass einzelne Peptide in einer Größenordnung von 260, 89, 86, 38, 34, 31, 25 und 12 kDa generiert wurden. Das 31 kDa große Fragment zeigte im Western Blot ein Signal mit dem 22C10 Antikörper. Es kartiert in den C-terminalen Bereich zwischen die Aminosäuren 4685 und 4982 (Hummel et al., 2000).

Nach ektopischer Expression des C-Terminus in der F1-Generation durch Kreuzen der Linien *UAS-futsch^{C-Term}* und *ftz-GAL4* sollte nach diesen Ergebnissen ein Signal im *ftz*-Muster erhalten werden können nach einer Antikörperfärbung mit mAb 22C10. Dies konnte aber nicht gezeigt werden, so dass der C-Terminus als Epitop ausgeschlossen werden musste. Aus den Ergebnissen beider Experiment war zu folgern, dass das Epitop sich zwischen den Aminosäuren 4685 und 4798 befindet. Diese Aminosäuren konnten als pMAL-Fusionsprotein (pMAL/Exon 8p) exprimiert werden. Die Fusionsproteine pMAL/Exon 7p und pMAL/Exon 8p wurden in einem Western Blot mit dem mAb 22C10 getestet (Abbildung 27). Überraschenderweise zeigte das Fusionsprotein Exon 7p ein deutliches Signal, so dass das 22C10 Epitop zwischen die 2324-2565 Aminosäuren kartiert werden konnte.

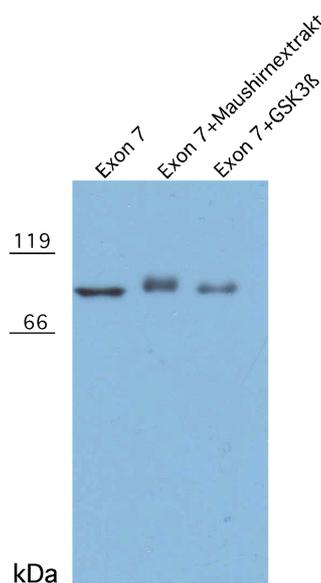


Abb. 27: Das 22C10 Epitop befindet sich innerhalb des Exons 7. Immunohistochemischer Nachweis des pMAL-Fusionsproteins Exon 7p mit dem mAb 22C10. Aufgetragen wurde das Fusionsprotein, das Fusionsprotein nach Inkubation mit Maushirnextrakt, das Fusionsprotein nach Inkubation mit GSK3 β . Der mAb 22C10 zeigte kein Signal für das Fusionsprotein pMAL/Exon 8p.

3.12 Eine Phosphorylierungsstelle von MAP1B für die GSK3 β findet man auch im Futsch Protein

Für das Futsch Protein sind bereits potentielle Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen postuliert worden (Hummel et al., 2000). So ist das KSPXXXP Motiv, das häufig im hochrepetitiven zentralen Bereich von Futsch vorkommt, eine Zielsequenz der Erk 2 Kinase (Veeranna et al., 1998). Es wurde allerdings noch nicht untersucht, ob Futsch an diesen Positionen phosphoryliert wird.

Das homologe MAP1B Protein wird unter anderem von der GSK3 β Kinase phosphoryliert. Die Phosphorylierungsstelle konnte durch Deletionskonstrukte kartiert werden. Ein Serinrest an der Position 1.260 wird von der GSK3 β Kinase phosphoryliert. Der Serinrest befindet sich in der sogenannten SPAKS-Region (das sind die Aminosäuren 1244-1264); die Sequenz lautet: SPSPPSPIEKT (P. Gordon-Weeks, pers. Mitteilung).

Das unterstrichene Serin gibt den Aminosäurerest an, der von der GSK3 β Kinase phosphoryliert wird. Es wurde ein polyklonaler Antikörper in Kaninchen generiert („BUGS“), der gegen diese GSK3 β -Zielsequenz im MAP1B Protein der Maus gerichtet ist (P. Gordon-Weeks, pers. Mitteilung). In Zellkulturexperimenten konnte bestätigt werden, dass GSK3 β das MAP1B Protein am Serinrest 1.260 phosphoryliert. Eine Cotransfektion von COS7-Zellen mit GSK3 β und wildtypischen MAP1B bzw. MAP1B Δ S1.260 und anschließender Immunohistochemie zeigte, dass eine BUGS-Färbung nur bei Cotransfektion von wildtypischen MAP1B und GSK3 β zu sehen war (Gordon-Weeks, pers. Mitteilung).

Sequenzanalysen haben gezeigt, daß sich im Futsch ORF zwei Bereiche befinden, die gewisse Homologien zu der SPAKS-Region aufweisen.

Der erste Bereich befindet sich zwischen den Aminosäuren 2524 und 2530 am Ende des Exons 7 und lautet: AGETASSSPIEEAP

Der zweite Bereich befindet sich zwischen den Aminosäuren 4767 und 4791 am Ende des Exons 8 und lautet: TPESSPKPTSPFPRVSKDE

Diese Domänen mit den potentiellen Phosphorylierungsstellen wurden in den pMAL-Vektor kloniert, um die rekombinanten Proteine in einem *in-vitro* Kinase-Test zu untersuchen. Beide Proteine konnten induziert und in ausreichender Menge in löslicher Form isoliert werden. Sie wurden in jeweils neun Elutionsschritten über eine Amylose-Säule gereinigt (Abbildungen 28 und 29).

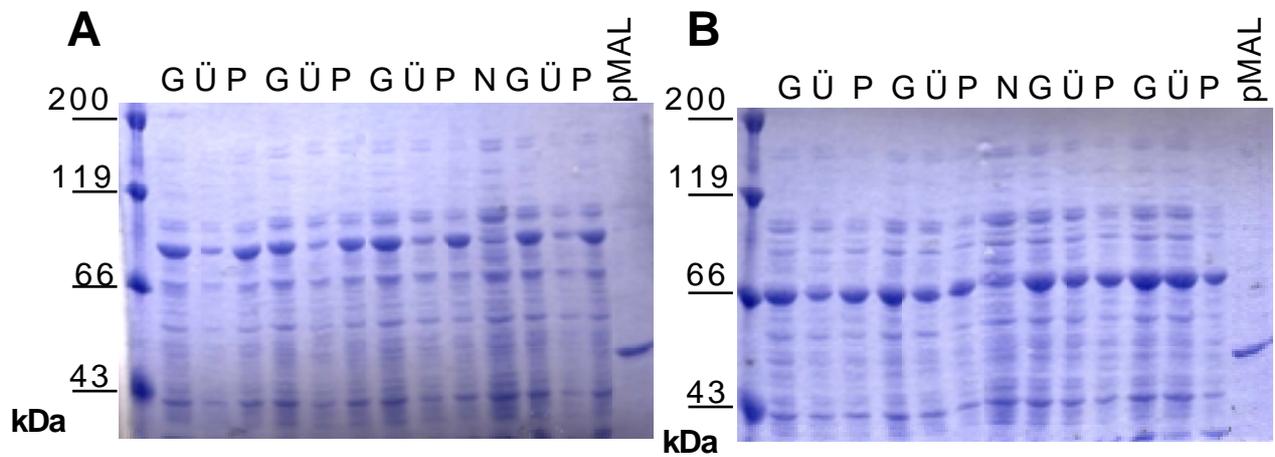


Abb. 28: Test auf Löslichkeit der pMAL-Fusionsproteine. Commassie-Färbungen von SDS-PAGE Analysen. Als Kontrolle wurde der Proteinextrakt eines induzierten MBP-Ausgangsvektors aufgetragen (pMAL). Das Fusionsprotein pMAL/Exon 7p (A) und das Fusionsprotein pMAL/Exon 8p (B) sind im Gesamtextrakt (G), im löslichen Überstand (Ü) und im unlöslichen Pellet (P) nachweisbar.

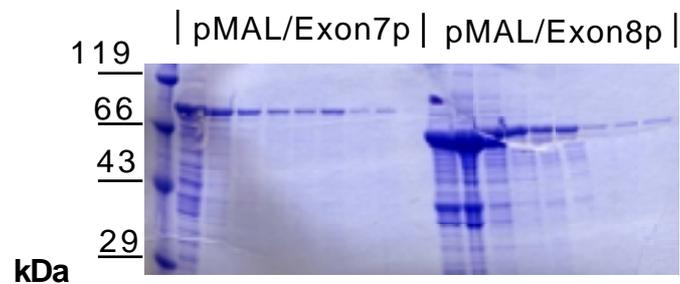


Abb. 29: pMAL-Fusionsproteine nach Aufreinigung über eine Amylose-Säule. Commassie-Färbungen von SDS-PAGE Analysen. Die Fusionsproteine pMAL/Exon 7p und pMAL/Exon 8p wurden in je 9 Elutionsschritten über eine Amylose-Säule gereinigt.

3.12.1 *In-vitro* Kinase-Test

In einem *in-vitro* Kinase-Test wurden die rekombinanten Proteine pMAL/Exon 7p und pMAL/Exon 8p untersucht, sowie die Proteine pMAL/1-6p-7p-10 und pMAL/1-6p+8p-10. Abbildung 30 (Spuren 1-5) zeigt die gereinigten Proteine. Die Fusionsproteine pMAL/1-6p-7p-10 und pMAL/1-6p+8p-10 degradierten trotz unterschiedlich gewählter Induktionsbedingungen sehr stark, so dass sie für weiter Untersuchungen nur bedingt einsetzbar waren.

Als Positivkontrolle für eine *in-vitro* Phosphorylierung wurde das gereinigte rekombinante GST-Fusionsprotein 1B750 verwendet, das die Aminosäuren 1.109-1.360 des MAP1B Proteins, also auch die SPAKS-Region, enthält (Lucas et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass dieses Protein *in-vitro* von postnatalen Maushirnextrakten phosphoryliert werden kann (Johnstone et al., 1997) und dass diese Phosphorylierung auf die Aktivität der GSK3 β -Kinase zurückzuführen ist (Lucas et al., 1998). Dieses konnte schließlich auch in Zellkulturexperimenten bestätigt werden.

Die Fusionsproteine wurden über Nacht mit Maushirnextrakt oder mit rekombinantem GSK3 β Protein inkubiert. Anschließend wurden sie in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membran geblottet. Eine positive Phosphorylierung konnte durch ein Signal mit dem BUGS-Antikörper dargestellt werden (Abbildung 31). Außerdem wurden die Proben in einer weiteren SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend das Gel mit Commassie gefärbt (Abbildung 30, Spuren 6-10). Da sich die Laufeigenschaften von Proteinen im SDS-Gel nach posttranslationaler Modifikation ändern, deutet ein „Shift“ der Proteinbanden im Gel auf eine mögliche Phosphorylierung hin.

Nach Inkubation des Fusionsproteins pMAL/Exon 7p über Nacht mit Maushirnextrakt oder mit rekombinantem GSK3 β Protein kam es zu einem deutlichen Signal mit dem BUGS-Antikörper (Abbildung 31). Nach Inkubation des Fusionsproteins pMAL/Exon1-6p+7p-10 über Nacht mit Maushirnextrakt oder mit rekombinanten GSK3 β Protein war ebenfalls ein schwächeres Signal mit dem BUGS-Antikörper zu erkennen. Die Fusionsproteine pMAL/Exon1-6p+7p-10 und pMAL/Exon1-6p+8p-10 wurden nicht im Commassie-Gel bezüglich ihrer Laufeigenschaften untersucht.

Wenn weder Hirnextrakt noch GSK3 β Kinase mit dem Protein inkubiert wurden, konnte kein Signal beobachtet werden. Die Fusionsproteine pMAL/Exon 8p und pMAL/1-6p-8p-10 zeigten kein Signal, weder nach Inkubation mit Hirnextrakt noch mit GSK3 β Kinase. Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass nur das rekombinante Protein pMAL/Exon 7p *in-vitro* von

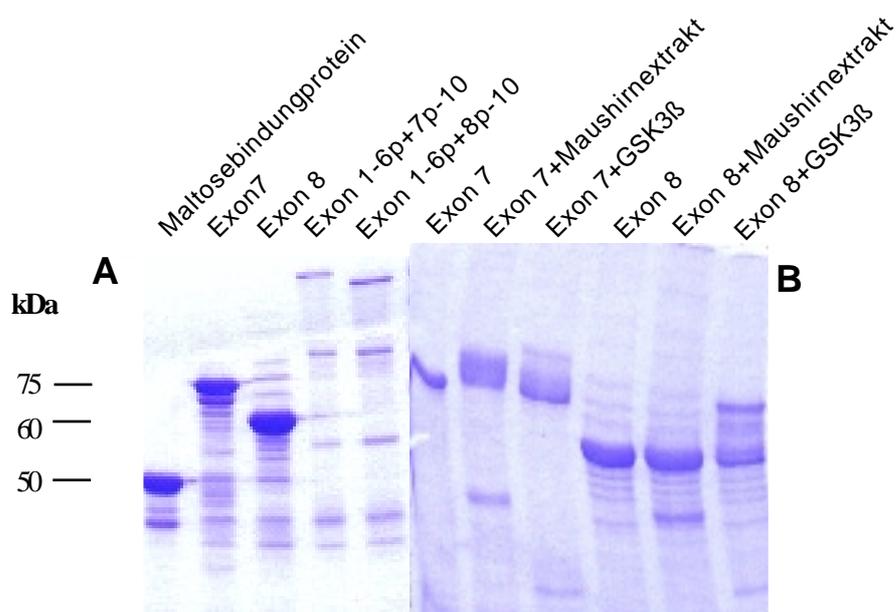


Abb. 30: Commissie-Färbungen der pMAL-Fusionsproteine. Commissie-Färbung von SDS-PAGE Analysen. Die Proteine, die im *in-vitro* Kinase-Test eingesetzt wurden, degradieren z.T. stark (A). Nach Inkubation der Proteine mit Maushirnextrakt oder rekombinanter GSK3 β Kinase kommt es zu einem "Shift" der Proteinbanden (B).

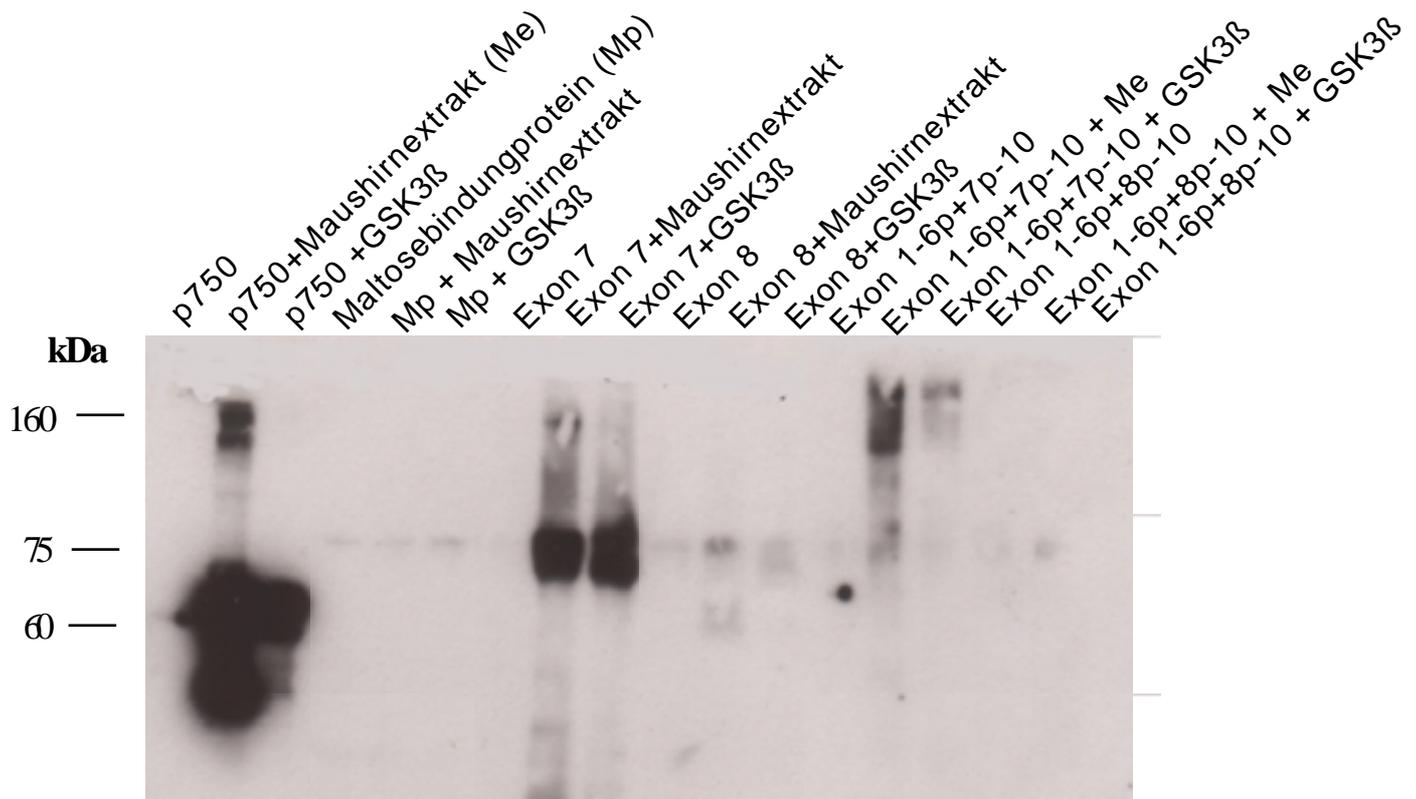


Abb. 31: Immunohistochemischer Nachweis der *in-vitro*-Phosphorylierung der Phosphorylierungsstelle in Exon 7. Nach Inkubation der Proteine mit Maushirnextrakt oder rekombinanter GSK3 β Kinase kommt es zu einem Signal mit dem polyklonalem BUGS-Antikörper in den Konstrukten, in denen die Phosphorylierungsstelle des Exons 7 enthalten ist. Als Positivkontrolle diente p750, ein rekombinantes MAP1B Protein.

der GSK3 β -Kinase am BUGS-Epitop phosphoryliert werden kann und nicht das rekombinante Protein pMAL/Exon 8p, in dem aufgrund der Sequenzanalyse ebenfalls eine potentielle Phosphorylierungsstelle der GSK3 β -Kinase vermutet wurde.

Das Commassie-Gel bestätigt für das Fusionsprotein pMAL/Exon 7p die erhaltenen Daten. Nach Inkubation des Proteins mit Maushirnextrakt oder rekombinater GSK3 β kommt es zu einem „Shift“ der Proteinbande. Dieser konnte aber auch beobachtet werden nach Inkubation des Fusionsproteins pMAL/ Exon 8p mit der GSK3 β . Möglicherweise wird das Fusionsprotein auch von der GSK3 β phosphoryliert, aber zumindest nicht am BUGS-Epitop.

3.12.2 Zellkulturexperimente zeigten keine Phosphorylierung von Futsch durch die Shaggy Kinase

Der *in-vitro* Kinase-Test zeigte, dass wahrscheinlich nur das rekombinante Protein pMAL/Exon 7p *in-vitro* von der GSK3 β Kinase phosphoryliert wird. Daher lag die Vermutung nahe, dass das GSK3 β Homolog Shaggy das Futsch Protein phosphoryliert, was bis dato noch nicht *in-vivo* gezeigt werden konnte. Um dies zu untersuchen, wurden *Drosophila* S2-Zellen cotransfiziert, und zwar mit den Konstrukten pUAST/Exon 7p, pUAST/Exon 8p, pUAST/Exon 1-6p+7p-10 oder pUAST/Exon 1-6p+8p-10, die die potentiellen Phosphorylierungsstellen enthalten und den Konstrukten pUAST/*sgg*^{wt}, pUAST/*sgg*^{activated} oder pUAST/*sgg*^{DN}. Bei einer Phosphorylierung der Futsch Fusionsproteine durch die rekombinante Shaggy Kinase sollte eine BUGS-Färbung in den S2 Zellen zu sehen sein, zumindest in den Fusionsproteinen, die die Aminosäuren beinhalten, die von Exon 7p kodiert werden (vgl. *in-vitro* Kinase-Test). Jedoch konnte eine Phosphorylierung der Futsch-Fusionsproteine nicht gezeigt werden. Möglicherweise wird *Drosophila* Futsch an dieser Stelle nicht von der Shaggy Kinase phosphoryliert, so dass das BUGS-Signal nicht sichtbar wird.

3.12.3 Der phosphospezifische Antikörper BUGS

Der BUGS Antikörper wurde an *Drosophila* Embryonen getestet (Abbildung 32). BUGS färbt in jungen Embryonen Mikrotubuli in sich teilenden Zellen (Abbildung 32 H). In späten Embryonen (Stadium 16+) ist eine Färbung im Nervensystem und in den Gonaden zu

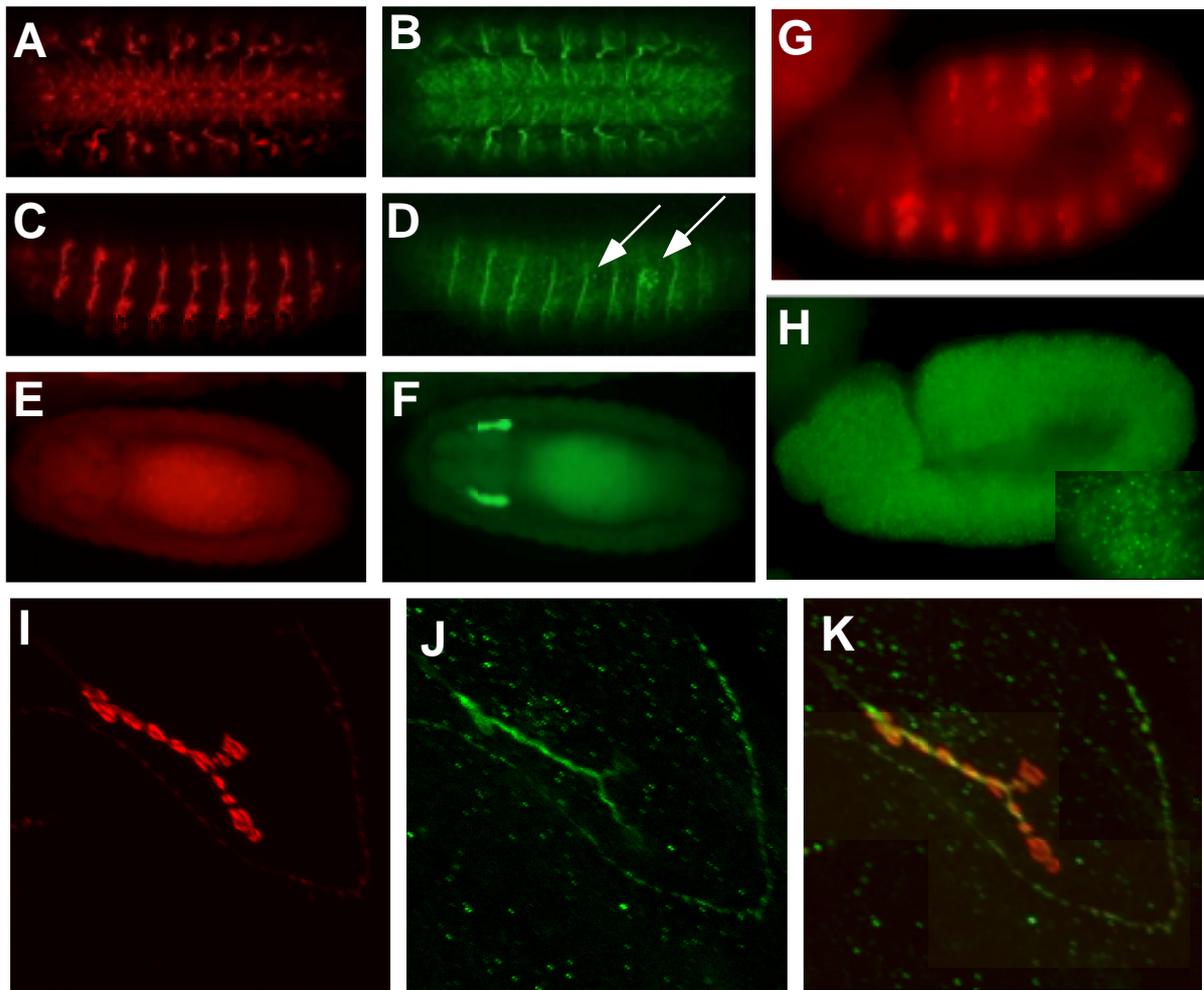


Abb. 32: Der polyklonale Antikörper "BUGS", der eine GSK3 β Phosphorylierungsstelle in MAP1B erkennt, färbt im *Drosophila* Embryo Axone und Dendriten, nicht aber die Somata. "Whole mount"-Antikörperfärbung mit dem mAb 22C10 (A,C,E,G) und dem polyklonalem BUGS (B, D, F, H). Anterior ist links. Antikörperfärbung an der *Drosophila* NMJ mit dem mAb nc46 (I) und dem polyklonalem BUGS (J). In Wildtyp-Embryonen färbt BUGS wachsende Axone und Dendriten (B+D, Pfeile), nicht aber die Somata wie mAb 22C10 (A+C). Embryonen der Defizienz Df (1) AC7 (1E3-4; 2A) sind 22C10 und BUGS negativ (E-F). An der *Drosophila* NMJ von Larven des 3. Lavenstadiums färbt BUGS die Axone (J). In *P (EP)1419/en-GAL4* Embryonen (G+H) kommt es zur Überexpression von Volllänge-Futsch im *engrailed*-Muster. mAb 22C10 erkennt im Gegensatz zu BUGS spezifisch das ektopisch exprimierte Protein (G). BUGS färbt mitotische Spindeln sich teilender Zellen (H, kleines Bild, Pfeil) und die Gonaden (D, Pfeil). Erläuterungen siehe Text.

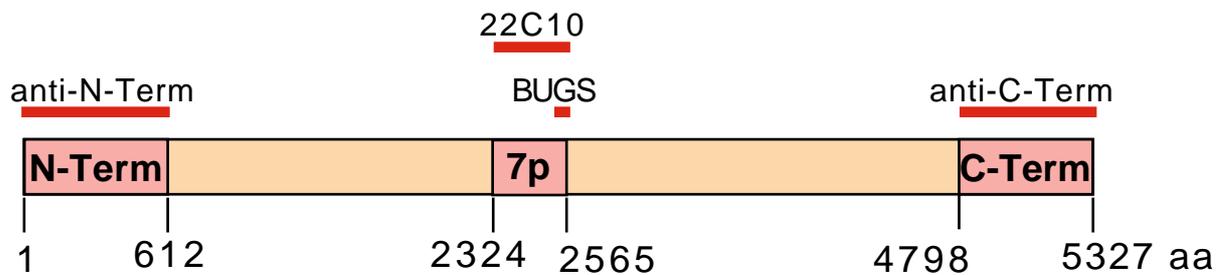
erkennen. Der Antikörper erkennt spezifisch die Axone im PNS und ZNS, nicht aber die Zellkörper (Abbildung 32 B und D). In *futsch*-defizienten Tieren der Defizienz *Df(1) AC7, w/FM7c* ist keine Färbung zu erkennen, weder mit 22C10 noch mit BUGS (Abbildung 32 E und F). In *futsch*^{K68}-Tieren ist ebenfalls keine Färbung zu erkennen (nicht gezeigt). In Augenimaginalscheiben von Larven des 3. Larvenstadium konnte für BUGS ebenfalls keine eindeutige immunohistochemische Reaktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

An der NMJ in wildtypischen Larven des 3. Larvenstadium ist eine Färbung von BUGS auf die Axone beschränkt, während die Expression des 22C10-Epitops im Axon und in den Boutons zu finden ist. Daher scheint der BUGS Antikörper nur einen Teil der 22C10-Expression detektieren zu können. Um zu untersuchen, ob BUGS überhaupt das *Drosophila* MAP1B erkennt, wurde Futsch mit Hilfe der EP1419-Insertion ektopisch exprimiert. Als Treiber wurde die *en*-GAL4-Linie verwendet. In der F1-Generation liefert der mAB 22C10 ein *en*-GAL4-spezifisches Signal, nicht jedoch BUGS. Erst durch die Analyse von Proteinextrakten aus *Drosophila*-Köpfen konnte gezeigt werden, dass BUGS Futsch erkennt (siehe Abschnitt 3.13).

3.13 Futsch wird nicht in eine leichte und schwere Kette gespalten wie MAP1B

Das MAP1B Protein wird nach seiner Translation in eine schwere und eine leichte Kette gespalten (Tögel et al., 1998), wobei die leichte Kette an den N-Terminus der schweren Kette binden kann. Die leichte Kette von MAP1B hat eine ungefähre Größe von 30 kDa (vgl. Abbildung 33). Eine potentielle Spaltungsregion findet sich im Futsch Protein um die Aminosäuren 5100, was bei Spaltung ein Fragment von knapp 30 kDa freisetzen würde. Für das Futsch Protein sollte eine derartige posttranslationale Modifikation untersucht werden. Dot Blot Experimente haben gezeigt, dass die höchste Konzentration von Futsch im Kopf adulter Fliegen nachweisbar ist. Daher wurden Proteinextrakte aus Wildtyp-Köpfen und Köpfen *futsch*^{K68}- und *futsch*^{N94}-mutanter Tiere im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Da Futsch ein sehr großes Protein ist, wurden die Proben mit Hilfe eines Gradientengels aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration reichte von 4-18 %, was zur Auftrennung niedermolekularer Proteine ausreicht (Sambrook and Russel, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001). Verwendet wurden die Antikörpern 22C10, anti-C-Term und „BUGS“. Abbildung 33 zeigt die Epitope der verwendeten Antikörper sowie die potentielle leichte Kette von Futsch. Abbildung 34 zeigt das Ergebnis der Blots. Eine

Commassiefärbung diente als Kontrolle dafür, dass äquimolare Mengen an Protein aufgetragen wurden. Diese Experimente zeigten, dass Futsch ein sehr großes Protein von über 570 kDa darstellt. In *futsch*^{K68}-mutanten Köpfen konnte mit keinem der genannten Antikörper ein Protein nachgewiesen werden, in *futsch*^{N94}-mutanten Köpfen geringere Mengen eines leicht verkürzten Proteins. Im Gegensatz zu 22C10 und anti-C-Term ist im BUGS-Blot noch ein Signal bei ca. 70 kDa zu erkennen, das darauf hindeutet, dass das BUGS-Epitop noch anderen Proteinen vorkommt. Da mit den Antikörpern kein Signal in niedermolekularem Bereich gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass Futsch nicht wie MAP1B posttranslational gespalten wird.



Potentielle leichte Kette von Futsch (30 kDa)

Abb. 33 Schematische Darstellung der verwendeten Antikörper und der potentiellen leichten Kette von Futsch. Die verwendeten Antikörper binden im N- und im C-terminalen Bereich von Futsch (anti-N-Term und anti-C-Term), sowie in der zentralen Region (mAb 22C10 und BUGS). Gezeigt ist auch das potentielle Spaltungsprodukt im Futsch Protein. Futsch wird aber nicht in eine schwere und eine leichte Kette gespalten.

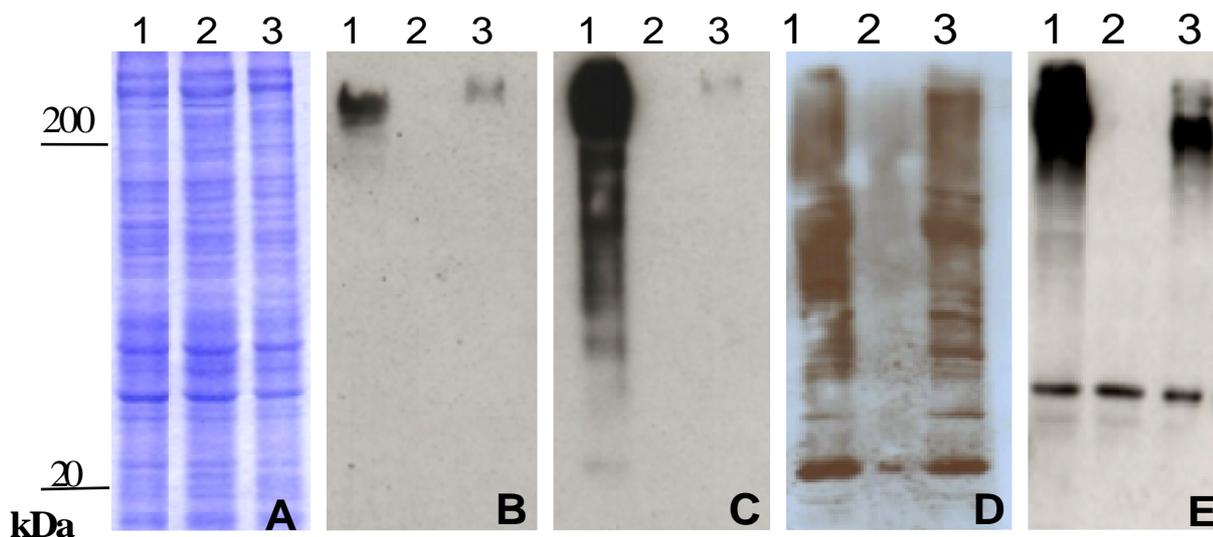


Abb. 34: Das Futsch Protein wird nicht posttranslational gespalten. Proteinextrakte aus Köpfen von wildtypischen Fliegen (1), *futsch*^{K68} (2) und *futsch*^{N94} (3) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Immunohistochemische Nachweis der Proteine erfolgte mit dem mAb 22C10 (B), anti-C-Term (C), anti-N-Term (D) und BUGS (E). Alle drei Antikörper erkennen ein sehr großes Protein in den Kopfextrakten wildtypischer Fliegen, ein schwächeres Signal zeigt sich in *futsch*^{N94}-Tieren, kein Signal in *futsch*^{K68}-Tieren. Der polyklonale Antikörper anti-N-Term ist sehr unspezifisch. Zu erkennen sind eine ganze Reihe von Banden in den Spuren 1 und 3 (Kopfextrakten wildtypischer Fliegen bzw. Kopfextrakte von *futsch*^{N94}-Tieren). Ein Signal im niedermolekularen Bereich ist zu erkennen in den Kopfextrakten von *futsch*^{K68}-Tieren. Ein weiteres BUGS-Signal ist in Höhe von ca. 70 kDa zu erkennen. Ein Commassie-Gel verdeutlicht, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden (A).

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war die genetische und molekulare Charakterisierung der Funktion von Futsch. Hierfür wurden zunächst eine Reihe von Fusionsproteinen generiert, mit Hilfe derer untersucht wurde, mit welcher Domäne Futsch an die Mikrotubuli und an das Aktin-Cytoskelett bindet und wie Futsch die Organisation der Mikrotubuli beeinflusst. Durch verschiedene *futsch*-Minigene wurden die *in-vitro* erhaltenen Daten auf ihre *in-vivo* Relevanz getestet. Außerdem wurde das Futsch Protein auf eine mögliche Phosphorylierung untersucht, da vom Vertebraten Homolog MAP1B bekannt ist, dass die Aktivität durch Phosphorylierung durch u.a. die GSK3 β Kinase beeinflusst wird.

4.1 Die Methode des Gene SOEing zur Generierung einer „cDNA“

Für den *futsch*-Lokus ist aufgrund der Größe des Transkriptes (ca. 16 kb) keine komplette cDNA erhältlich. Daher sollten als Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit zunächst DNA-Bereiche generiert werden, die die MAP1B homologen Bereiche beinhalteten. Aufgrund der Größe des Transkriptes war es nicht möglich, mittels RT-PCR an genomischer DNA aus *Drosophila* eine cDNA zu klonieren. Daher wurden durch die Gene SOEing Methode (Horton et al., 1989; Higuchi, 1990) Sequenzen, die der vom EDGP vorhergesagten mRNA Sequenz entsprachen, partiell kloniert.

Der zu MAP1B homologe N-terminale Bereich liegt innerhalb der vorhergesagten Exons 1-6, der homologe C-terminale Bereich liegt innerhalb der Exons 9 und 10. Eine Vielzahl von PCR's war zur Generierung dieser Konstrukte nötig. Da die Einzelschritte sequenziert wurden, können Punktmutationen, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz führten, ausgeschlossen werden. Setzt man voraus, dass die vorhergesagte Sequenz den *futsch*-Lokus angibt, sollten die zu MAP1B homologen Bereiche korrekt amplifiziert worden sein.

Die funktionelle Relevanz der Termini von MAP1B in Bezug auf Aktin- und Mikrotubulibindung und die Regulation des Proteins durch Phosphorylierung an zahlreichen Stellen ist von verschiedenen Autoren bestätigt (Hermann et al., 1985; Tombes et al., 1991; Tögel et al., 1998; Gordon-Weeks et al., 1993). Für die Charakterisierung der Funktion von Futsch wurden zunächst mini-*futsch*-Konstrukte kloniert, die den N- oder den C-Terminus beinhalteten, da hier die für die Funktion von Futsch als MAP relevanten Domänen zu erwarten waren. Aufgrund der starken Homologie zu MAP1B wurden in diesen Domänen

eine Mikrotubuli- und eine Aktin-Bindungsdomäne, sowie eine regulatorische Funktion des N-Terminus für den C-Terminus vermutet.

MAP1B wird nach der Translation in eine schwere und eine leichte Kette (LC1) gespalten (Tögel et al., 1998). Beide Proteinfragmente binden einander, was für die korrekte Funktion von MAP1B unabdingbar ist. Für die schwere Kette ist eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Aktinbindung vermutet worden (Tögel et al., 1998). Fehlt die schwere Kette, induziert die leichte Kette eine Stabilisation der Mikrotubuli (Tögel et al., 1998). Eine posttranslationale Spaltung konnte für Futsch nicht bestätigt werden. Dennoch könnte auch in Futsch das Zusammenspiel des N- und des C-Terminus für die Funktion von Bedeutung sein. Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt kloniert, das beide Termini von *futsch* beinhaltet.

4.2 Futsch interagiert mit cytoskelettalen Komponenten

4.2.1 Futsch colokalisiert mit F-Aktin

Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von Futsch mit dem Cytoskelett wurden *Drosophila* Schneiderzellen mit den Konstrukten *futsch*^{N-Term}, *futsch*^{C-Term} und *futsch*^{N+C-Term} transfiziert. Sowohl das resultierende N-terminale Protein als auch das C-terminale Protein sind im Cytoplasma der S2-Zellen nachweisbar, besonders in der perinukleären Region. Die Doppelfärbung mit den Cytoskelettmarkern zeigt, dass beide rekombinanten Proteine mit dem Aktin-Cytoskelett colokalisieren. F-Aktin ist ähnlich verteilt wie Futsch. Die „Speichenstrukturen“, die eine starke Futsch-Expression zeigen, entsprechen den F-Aktinbündeln in der Zelle. Auffallend ist aber, dass das Futsch Protein auch ohne an das Aktin- oder Mikrotubuli-Cytoskelett gebunden zu sein, eine filamentähnliche Verteilung zeigt.

Denkbar ist, dass Futsch eine Funktion in der Aktinorganisation ausübt. Eine ähnliche Funktion für Futsch wurde schon für das Mikrotubuli-Cytoskelett in der Synapse vermutet (Roos et al., 2000).

In Zellkulturexperimenten bindet Futsch mit beiden Termini an Aktin. Eine Untersuchung des Fusionsproteins *Futsch*^{N+C-Term} über die Lokalisation mit dem Cytoskelett führte nicht zu eindeutigen Ergebnissen.

Da die Colokalisation von Futsch mit Aktin vermuten ließ, dass Futsch wie MAP1B direkt an die Aktinfilamente binden kann, wurden Cosedimentationstests mit F-Aktin und *Futsch*^{N-Term}

bzw. Futsch^{C-Term} durchgeführt. Es konnte aber keine Bindung konstatiert werden. Dies kann zum einen an der Struktur des Fusionsproteins liegen; das N-terminale Protein-„Tag“ könnte die Proteine sterisch so verändert, dass die Aktin-Bindungsstelle verdeckt ist. Zum anderen wäre eine indirekte Bindung von Futsch an Aktin denkbar, so dass nach dem Cosedimentationstest beide Fusionsproteine zum größten Teil im löslichen Überstand bleiben. Eine mögliche Funktion von Futsch als Aktinfilament-stabilisierendes Protein wäre damit von indirekter Natur. Im Gegensatz zu Futsch bindet MAP1B nur über die C-terminale leichte Kette direkt Aktin.

4.2.2 Futsch interagiert mit dem Mikrotubuli-Cytoskelett

Die Mikrotubuli-Bindungsdomäne von MAP1B ist in Futsch nicht konserviert, jedoch wurde für die homologen terminalen Domänen eine funktionelle Relevanz vermutet. Die Zellkulturexperimente ergaben, dass weder Futsch^{N-Term} noch Futsch^{C-Term} mit den Mikrotubuli colokalisiert. Möglicherweise binden beide Proteine nicht an die Mikrotubuli oder ihre Affinität zu den Mikrotubuli ist so gering, dass eine Bindung in den S2-Zellen nicht sichtbar war.

Die mittlere Domäne von Futsch zeigt eine hochrepetitive Struktur, und zwar 60 Wiederholungen einer 37 Aminosäuren großen Sequenz. Diese große Domäne erstreckt sich von den Aminosäuren 1379-3763 und ist bis auf die Aminosäuren 2324-2565 nicht kloniert. Möglicherweise liegt in diesem Bereich des Futsch Protein die Bindungsdomäne für Mikrotubuli.

Interessanterweise besteht auch die Mikrotubuli-Bindungsdomäne von Tau aus einer 18 Aminosäuren großen Sequenz, die drei oder vier mal wiederholt wird (Goedert et al., 1989; Himmler et al., 1989). Dabei erhöht sich die Affinität von Tau zu den Mikrotubuli mit der Anzahl der „repeats“ (Goedert und Jakes, 1990).

Die Interaktion der Futsch-Termini mit den Mikrotubuli wurde auch *in-vitro* untersucht. Die Versuche ergaben, dass beide Fusionsproteine nur sehr schwach an die Mikrotubuli binden. Auffallend war jedoch, dass der C-Terminus von Futsch in geringer Konzentration eine Destabilisierung der Mikrotubuli verursachte. Wurde die Konzentration von Futsch^{C-Term} erhöht, war diese Destabilisierung nicht mehr zu erkennen. Möglicherweise interagieren die Futsch^{C-Term} Fusionsproteine miteinander, so dass sie in dimerisierter oder oligomerisierter Form keine destabilisierende Wirkung ausüben. Für die C-terminale leichte Kette von MAP1B

ist beschrieben, dass sie oligomerisieren kann (Tögel et al., 1998). Trotz der starken Homologie des C-Terminus von Futsch zu MAP1B scheint sich die Funktion der C-terminalen Domänen in beiden Proteine zu unterscheiden. Transfektionsexperimente mit der LC1 haben gezeigt, dass diese eine stabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli hat und diese auch direkt bindet (Tögel et al., 1998). Obwohl der C-Terminus von Futsch die Mikrotubuli nur schwach bindet, scheint er die Mikrotubuli-Dynamik zu kontrollieren. Möglicherweise interagiert der C-Terminus stärker mit den Tubulinuntereinheiten (Tubulin-Dimeren) als mit dem Polymer, so dass es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des unpolymerisierten Proteins kommt.

4.3 Wird die Funktion von Futsch durch Phosphorylierung reguliert?

Für das Vertebraten Homolog MAP1B ist bekannt, dass es durch eine Vielzahl von Kinasen phosphoryliert wird (Hermann et al., 1985; Tombes et al., 1991; Gordon-Weeks und Fischer, 2000). Man unterscheidet zwei Klassen der Phosphorylierung: die Klasse I-phosphorylierte Form von MAP1B wird im Laufe der Entwicklung herunterreguliert und erfolgt durch u.a. CDK5 und GSK3 β (DiTella et al., 1996; Lucas et al., 1998). Die Klasse II-phosphorylierte Isoform ist auch im adulten Tier exprimiert und wird über Casein Kinase II vermittelt (Diaz-Nido et al., 1988; Ulloa et al., 1993). Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die GSK3 β Kinase, die durch die Phosphorylierung von MAP1B das Mikrotubuli-Cytoskelett beeinflusst (Lucas et al., 1997 und 1998). Die von GSK3 β phosphorylierte Form von MAP1B behält die Mikrotubuli im Zustand der Instabilität, was besonders im Prozess der Axonogenese, aber auch später in der Synaptogenese relevant ist (Goold et al., 1999; Mack et al., 2000).

Im Futsch Protein wurden zwei potentielle Phosphorylierungsstellen für die GSK3 β gefunden (Gordon-Weeks, pers. Mitteilung), die hinsichtlich einer Phosphorylierung untersucht wurden. Zumindest eine der Phosphorylierungsstellen konnte verifiziert werden. Bei beiden untersuchten Fusionsproteinen war nach Inkubation mit der GSK3 β ein „Shift“ in der Mobilität zu beobachten. Diese Veränderung in der Mobilität von Proteinen beobachtet man bei Klasse I-Phosphorylierungen, nicht jedoch bei Klasse II-Phosphorylierungen (Garcia-Perez et al., 1998). Da nach dem *in-vitro* Kinase-Test im Western Blot kein BUGS-Signal für das Fusionsprotein pMAL/Exon 8p zu sehen war, lässt sich der „Shift“ der Proteinbande nur durch eine Phosphorylierung erklären, die nicht das BUGS-Epitop betrifft. Nach Inkubation

des Fusionsproteins mit dem Hirnextrakt war dieser „Shift“ nicht zu beobachten. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die relative Menge an GSK3 β im Hirnextrakt wesentlich geringer war als bei einer reinen Inkubation mit der rekombinanten Kinase und daher eine Phosphorylierung nur im geringen Maße stattfand.

In Zellkulturexperimenten wurde versucht, die Phosphorylierung des Futsch Proteins durch das *Drosophila* Homolog der GSK3 β Kinase, Shaggy, nachzuweisen. Ein immunohistochemischer Nachweis mit dem BUGS-Antikörper, dessen Epitop gegen eine von GSK3 β phosphorylierte Sequenz von MAP1B gerichtet ist, hätte bei Phosphorylierung ein Signal zeigen müssen. Dieses konnte nicht beobachtet werden, daher wird möglicherweise *Drosophila* Futsch an dieser Stelle nicht von der Shaggy Kinase phosphoryliert.

Möglicherweise beeinflusst eine Phosphorylierung von Futsch auch die Bindungseigenschaften des Proteins an das Mikrotubuli-Cytoskelett. Für MAP1B ist gezeigt worden, dass die nicht-phosphorylierte Form nicht an stabile Mikrotubuli bindet (Goold et al., 1999). Eine *in-vitro* Phosphorylierung von Futsch und ein anschließender Cosedimentationstest mit Mikrotubuli könnte hierüber Aufschluss geben.

In-vitro Experimente haben gezeigt, dass MAP1B an Aktin bindet, aber eine Phosphorylierung diese Bindung inhibiert (Noiges et al., 2002; Pedrotti und Islam, 1996).

Im Wachstumskegel wurde die Funktion der GSK3 β auf die Aktin-Dynamik untersucht. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass eine Inhibition von GSK3 β durch Lithium oder SB-216763 zu einer signifikanten Reduktion der Filopodia-Dynamik in Wachstumskegel führt (Owen und Gordon-Weeks, 2003). Die Filopodia Extension bzw. Retraktion hängt von der Aktinfilament-Dynamik ab (Suter und Forscher, 2000), so dass vermutet wurde, dass GSK3 β die Aktinfilament-Dynamik im Wachstumskegel beeinflusst. Unklar ist, ob der Effekt der GSK3 β Inhibition auf die Filopodia-Dynamik von einer MAP1B Phosphorylierung abhängig ist. Erste Hinweise dafür liefern Zellkulturexperimente von kultivierten Neuronen von MAP1B „knockout“-Mäusen. Hier beobachtet man eine Reduktion der Filopodia-Dynamik im Wachstumskegel dieser Neurone (Gonzalez-Billault et al., 2002). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Änderungen in der Filopodia-Dynamik nach Inhibition der GSK3 β durch eine MAP1B Phosphorylierung vermittelt wird.

Interessant wäre daher in diesem Zusammenhang die Colokalisation von Futsch^{1-6p+7p-10} mit dem Aktin-Cytoskelett, da dieses Fusionsprotein eine Phosphorylierungsstelle enthält, die zumindest *in-vitro* von der GSK3 β phosphoryliert wird.

4.4 Die Phosphorylierung erfolgt in spezifischen subzellulären Kompartimenten

Vergleicht man die Expressionsmuster von BUGS und 22C10, wird deutlich, dass diese sehr ähnlich, aber nicht identisch sind. Beide Antikörper erkennen ein Epitop an den Axonen im ZNS und PNS, BUGS erkennt jedoch nicht die Zellkörper. Da das BUGS-Epitop gegen eine von der GSK3 β phosphorylierte Sequenz von MAP1B gerichtet ist und eine Färbung nur in den Axonen zu beobachten ist, wird Futsch an dieser spezifischen Phosphorylierungsstelle wahrscheinlich nur im Axon phosphoryliert. Dies würde mit den Daten der von der GSK3 β phosphorylierten Form des MAP1B Proteins übereinstimmen. Diese phosphorylierte Form ist nur im Axon exprimiert (Gordon-Weeks und Fischer, 2000). Ihre Funktion liegt in der Regulierung der Mikrotubuli-Dynamik in wachsenden Axonen und im Wachstumskegel (Goold et al., 1999). Dies ist wichtig für das axonale Wachsen und Änderungen der Wachstumsrichtung eines Wachstumskegels (Mack et al., 2000; Gordon-Weeks, 2003). Die stabilisierende Rolle von P1-MAP1B im Wachstumskegel konnte durch die Induktion einer Wachstumsrichtungsänderung durch Laserinaktivierung des Proteins direkt gezeigt werden (Mack et al., 2000). Die lokale Inaktivierung von P1-MAP1B in einer Hälfte des Wachstumskegels führt zu lokaler Destabilisierung der Mikrotubuli in dieser Hälfte. Daher ziehen sich hier die Lamellipodien des Wachstumskegels zurück. Eine derartige phosphorylierungsabhängige Funktion wäre für Futsch auch denkbar.

Eine „BUGS-Färbung“ im Nervensystem ist erst ab Stadium 16 am Ende der Axonogenese zu erkennen, wenn kein Auswachsen der Axone mehr erfolgt. Möglicherweise bindet Futsch im phosphorylierten Zustand an das Mikrotubuli-Cytoskelett und stabilisiert dieses.

Für MAP1B wurde vermutet, dass eine Phosphorylierung an spezifischen Stellen zu Konformationsänderungen führt, so dass der inhibitorische Einfluss der schweren Kette auf die leichte Kette aufgehoben ist (Tögel et al., 1998). Dies wäre für Futsch auch denkbar, dann würde eine Phosphorylierung von Futsch die destabilisierende Funktion des C-Terminus unterdrücken.

Die Phosphorylierung von Futsch scheint aber auch die Bindungseigenschaften dieses Proteins zu verändern. So konnte an Untersuchungen an der *Drosophila* NMJ gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von Futsch durch die atypische Proteinkinase C (aPKC) die Assoziation an die Mikrotubuli fördert, was letztendlich zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli führt (Ruiz-Canada et al., 2004).

Das BUGS-Epitop ist aber auch in anderen Proteinen präsent, da BUGS in sich teilenden Zellen junger Embryonen (vor Stadium 12) eine Färbung zeigt, die 22C10 Expression jedoch erst im Stadium 12 beginnt. Dieses unbekannte Protein stabilisiert in phosphorylierter Form möglicherweise auch die Mikrotubuli, denn die dynamische Instabilität der Mikrotubuli ist auch bei der Bildung der Mitosespindeln von Bedeutung. Von den Spindelpolen ausgehend wachsen die Mikrotubuli in viele Richtungen. Dabei werden nur die Mikrotubuli stabilisiert, die die Kinetochoren an den Centromeren der Chromosomen erreichen, die übrigen zerfallen, weil sie ein freies Plusende haben (Kirschner und Mitchison, 1986). Die Wanderung der Chromosomen zu den entgegengesetzten Polen setzt daher eine Stabilisierung der Mikrotubuli voraus.

4.5 Die Bedeutung der Wingless-Signaltransduktionskaskade während der Synaptogenese an der *Drosophila* NMJ

Während der Synaptogenese an der *Drosophila* NMJ tauschen präsynaptische und postsynaptische Zellen Signale aus, die die Differenzierung der Synapse stimulieren und koordinieren (Burden, 1998; Hall et al., 2000; Packard et al., 2002).

Die Bedeutung der WNT-Signaltransduktionskaskade ist vielfach hinsichtlich ihrer Bedeutung für die neuronale Plastizität untersucht (Burden, 1998; Salinas und Hall, 1999; Burden 2000; Hall et al., 2000; Packard et al., 2002). WNTs dienen als retrograde Signale während der Axon- und Wachstumskegeldifferenzierung (Burden, 2000). An der NMJ von *Drosophila* ist Wingless prä- und postsynaptisch lokalisiert (Packard et al., 2002). Das Protein wird von TypI-Boutons exprimiert und sekretiert, schließlich vom Muskel aufgenommen (Packard et al., 2002). Die WNT-Funktion wird über die GSK3 β vermittelt (Lucas et al., 1998; Hall et al., 2000; Packard et al., 2002; Ciani et al., 2003). GSK3 β wiederum reguliert durch Phosphorylierung von MAP1B die Stabilität der Mikrotubuli (Cook et al., 1996; Lucas et al., 1998; Goold et al., 1999).

Eine Untersuchung an der NMJ in L3-Larven der *wg^{ts}*-Mutante ergab, dass ein Verlust von Wingless zu einer Reduktion in der Anzahl der Boutons führt. Diese sind größer als in wildtypischen NMJ und bilden außerdem keine aktiven Zonen aus (Packard et al., 2002).

WNT-Signale wirken inhibitorisch auf die GSK3 β (Cook et al., 1996) und diese wiederum kann über die Phosphorylierung von MAP1B auf die Mikrotubuli-Dynamik einwirken (Lucas et al., 1998; Goold et al., 1999). Daher sollte die Funktion des *Drosophila* GSK3 β -Homologs

Shaggy während der Synaptogenese untersucht werden. Hierfür wurden „loss-of-function“ und „gain-of-function“ Experimente mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems durchgeführt (Brand und Perrimon, 1993). Zunächst wurde in *sgg*-mutanten L3-Larven die NMJ untersucht. Da eine Verlustmutation im *sgg*-Gen embryonal letal ist, wurde ein hypomorphes Allel verwendet, bei dem noch Restfunktion vorhanden ist (Bourouis et al., 1989 und 1990). Diese Untersuchungen ergaben, dass in diesen Tieren die Anzahl der Boutons reduziert ist. Die Muskelgröße entspricht der des Wildtyps.

Die Boutonteilung setzt eine starke Reorganisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts voraus. Die Expansion der synaptischen Struktur während des Wachstums der Larve und damit auch ihrer Muskulatur geschieht zumeist durch das Knospen von „buds“ aus den bereits bestehenden Boutons, die sich dann vom Bouton lösen und selber zu einem solchen reifen.

Eine Phosphorylierung von Futsch durch die atypische Proteinkinase C (aPKC) fördert die Assoziation von Futsch an die Mikrotubuli und stabilisiert somit die Mikrotubuli in den Boutons (Ruiz-Canada et al., 2004). In einem anfänglichen Stadium der Boutonteilung sind die Mikrotubuli ungebündelt und nicht-assoziiert mit Futsch sind; später dann assoziieren die Mikrotubuli mit Futsch und werden so stabilisiert.

Der Verlust der Shaggy Kinase könnte zu einer reduzierten Phosphorylierung von Futsch führen, was die Bindung von Futsch an die Mikrotubuli herabsetzen würde und damit die Reorganisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts stören würde. Dies würde in *sgg*-mutanten Larven zu einer verringerten Boutonteilung führen und letztendlich in einer geringeren Anzahl an Boutons pro Muskel resultieren, die eventuell größer sind als im Wildtyp.

Eine Überexpression der Shaggy Kinase lässt eine Hyperphosphorylierung von Futsch vermuten, was zu einer stärkeren Bindung von Futsch an die Mikrotubuli führen sollte. Dies sollte die Mikrotubuli stabilisieren und somit auch die Boutonteilung inhibieren.

Eine panneurale Expression der verschiedenen Formen der Kinase (Shaggy^{Wt} und Shaggy^{activated}) führte zu einer erwarteten Reduktion der Anzahl der Boutons. Ebenso führte die Überexpression einer dominant negativen Kinase zu einer Reduktion der Boutons. Allerdings phosphoryliert Shaggy noch weitere Proteine, die am Prozess der Synaptogenese beteiligt sind. Für das Vertebraten Homolog GSK3 β sind zahlreiche wichtige Substrate bekannt, die in differenzierenden Neuronen phosphoryliert werden, u.a. APC und Tau (Doble und Woodgett, 2003; Gordon-Weeks, 2003).

Interessanterweise führt die Überexpression der verschiedenen Shaggy Kinasen im Embryo zu keinem Phänotyp. Das Nervensystem entwickelt sich normal. Daher ist die Shaggy Kinase für den Prozess der Axonogenese offensichtlich nicht essentiell ist, wohl aber für den Prozess

der Synaptogenese. Sollte Shaggy Futsch phosphorylieren und sich daher der *futsch*-ähnliche Phänotyp in der NMJ in *sgg*-mutanten Larven zeigen, würde das bedeuten, dass der Prozess der Axonelongation unabhängig von Futsch gesteuert wird. Dafür spricht die Tatsache, dass in den *futsch*-Mutanten die Entwicklung des embryonalen Nervensystems normal verläuft (Hummel et al., 2000) und die *futsch*^{K68}-Mutante, bei der es sich um eine Nullmutation handelt, lebensfähig ist.

4.6 Der *futsch*-mutante Synapsenphänotyp kann durch die Expression funktionell wichtiger Domänen abgeschwächt werden

Um von der Sequenzhomologie zwischen Futsch und MAP1B auf die funktionelle Relevanz dieser konservierten Bereiche Rückschlüsse ziehen zu können, wurde versucht, den *futsch*-mutanten Synapsenphänotyp durch eine ubiquitäre oder panneurale Expression verschiedener UAS-*futsch*-Konstrukte zu retten. Eine eingehende Analyse der NMJ in Bezug auf die Boutonzahl, die Muskel 4 innervieren, ergab, dass der Synapsenphänotyp, der in den *futsch*-Mutanten sichtbar ist, abgeschwächt werden kann. Dabei ist die Stärke der partiellen Rettung zum einen von dem verwendeten UAS-*futsch*-Konstrukt abhängig, zum anderen auch von der GAL4-Linie, die die UAS-*futsch*-Konstrukte in entsprechenden Geweben treibt. Die untersuchten *futsch*-Allele *futsch*^{N94} und *futsch*^{K68} zeigen zudem unterschiedliche Ergebnisse. Der *futsch*^{K68}-mutante Phänotyp konnte durch die Expression des N- oder des C-Terminus mit Hilfe des *elav*-GAL4-Treibers abgeschwächt werden (vgl. Tabelle 5). Die Expression von *futsch*^{N+C Term} führte zu einer weiteren leichten Erhöhung der Boutonzahl.

Daraus lässt sich schliessen, dass für die Synaptogenese funktionell wichtige Domänen in diesen Konstrukten enthalten sind. Da zumindest durch ubiquitäre Expression von *futsch*^{N+C Term} eine deutlichere Rettung erzielt wurde, als durch Expression des N- oder C-Terminus alleine, könnte man vermuten, dass die terminalen Bereiche unterschiedliche Funktion haben. Dies ist bereits für MAP1B beschrieben ist. Für Futsch konnte dies zumindest für den C-Terminus in Bezug auf seine destabilisierende Wirkung gezeigt werden. Die Interaktion der terminalen Bereiche ist für die korrekte Funktion von MAP1B von Bedeutung. In Zellkulturexperimenten wurde die leichte Kette ohne die schwere Kette von MAP1B transfiziert. Dies führte zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli. Diese Wirkung der LC1 wird durch die schwere Kette supprimiert (Tögel et al., 1998). Ein ähnliches Zusammenspiel der terminalen Domänen wäre daher auch für Futsch denkbar, wobei allerdings die Funktion der

C-terminalen Domäne nicht in der Stabilisierung, sondern in der Destabilisierung der Mikrotubuli liegt.

Der *futsch*^{N94}-mutante Phänotyp konnte weder durch ubiquitäre noch durch panneurale Expression des *futsch*^{N-Term} bzw. des *futsch*^{C-Term} abgeschwächt werden. Da dies im Gegensatz zu den Ergebnissen steht, die mit der *futsch*^{K68}-Mutante gezeigt wurden, muss dies auf die EMS-induzierte Mutation auf dem Chromosom N94 zurückzuführen sein. Die *futsch*^{K68}-Mutante ist 22C10, anti-C-Term, anti-N-Term und BUGS negativ. Daher handelt es sich bei der *futsch*^{K68}-Mutante um eine Nullmutation.

Für den C-Terminus von Futsch kann eine die Mikrotubuli destabilisierende Funktion konstatiert werden. Der N-Terminus bindet wie der C-Terminus direkt oder indirekt an die Aktinfilamente. Denkbar ist, dass der N-Terminus von Futsch die Funktion des C-Terminus inhibiert. Damit ließe sich erklären, dass bei der Rettung des *futsch*^{K68}-Mutante die beiden Termini alleine nur schwach retten; beide zusammen würden eine Proteininteraktion und damit die korrekte Funktion gewährleisten. Die ektopische Expression des N- oder C-Terminus in der *futsch*^{N94}-Mutante würde so zu einem erhöhten Proteinlevel bezüglich des N- oder C-Terminus führen, was die Funktion von Futsch stören würde. Übereinstimmend wäre hiermit auch das Ergebnis der partiellen Rettung des *futsch*^{N94}-Synapsenphänotyps nach Expression von *futsch*^{N+C-Term}, da hier die Proteinmengen beider terminaler Domänen nicht gestört ist. Da die Futsch Proteinmenge in *futsch*^{N94}-Mutante gegenüber dem Wildtyp stark reduziert ist, prägt sich der Phänotyp nach Überexpression der Konstrukte im wildtypischen Hintergrund in der NMJ in L3-Larven nicht aus.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Überexpression der *futsch*-Konstrukte die normale Entwicklung nicht stören. Im Prozess der Axonogenese scheint Futsch daher nicht essentiell, wohl aber während der Synaptogenese. Futsch könnte die Boutonteilung fördern, indem es die Mikrotubuli im synaptischen „loop“ in dynamischer Instabilität hält.

Für Futsch konnte eine Phosphorylierung *in-vitro* bestätigt werden. Über eine Funktion der Phosphorylierung von Futsch lässt sich daher nur spekulieren. Ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Funktion der Phosphorylierung von Futsch fand in dieser Arbeit bereits Verwendung, die *Drosophila* NMJ. Die ektopische Expression eines Konstruktes, das die Sequenzen für die potentiellen Phosphorylierungsstellen enthält, könnte indirekt Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung dieser Phosphorylierungsstellen erlauben. Möglicherweise könnte die Expression eines Konstruktes, das die zu MAP1B homologen Bereiche und die Phosphorylierungsstellen von Futsch enthält, den Synapsenphänotyp stärker retten als die

bereits getesteten Konstrukte. Die hierfür notwendigen Experimente konnten aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Wichtige Aspekte der Entwicklung eines Nervensystems wie neuronale Differenzierung und Verschaltung der Neurone des peripheren und des zentralen Nervensystems erfordern einen präzise regulierten Aufbau des Cytoskeletts. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Futsch während der Entwicklung des neuronalen Cytoskeletts bei *Drosophila melanogaster* analysiert.

Futsch ist ein sehr großes Mikrotubuli-assoziiertes Protein (>570kDa), das für die korrekte Ausbildung des Mikrotubuli-Cytoskeletts von Bedeutung ist. Es handelt sich um das Homolog des Vertebraten MAP1B Proteins.

Zu Beginn der Arbeit mussten zunächst die zu MAP1B homologen Bereiche des Futsch Proteins kloniert werden. Da aufgrund der Größe des Transkriptes keine cDNA erhältlich war, wurden mittels Gene SOEing die homologen Bereiche amplifiziert (Horton et al., 1989; Higuchi, 1990).

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass der N-terminale und der C-terminale Bereich von Futsch mit dem Aktin-Cytoskelett interagieren. Cosedimentationstest mit Futsch^{N-Term} bzw. Futsch^{C-Term} und F-Aktin legten jedoch eine indirekte Interaktion nahe.

Für die zu MAP1B homologen Bereiche Futsch^{N-Term} bzw. Futsch^{C-Term} konnte keine Colokalisation mit dem Mikrotubuli-Cytoskelett in *Drosophila* S2-Zellen konstatiert werden, jedoch lassen Cosedimentationstest mit Futsch^{N-Term} bzw. Futsch^{C-Term} und Taxol-stabilisierten Mikrotubuli eine die Mikrotubuli destabilisierende Funktion für den C-Terminus von Futsch vermuten.

Die Generierung spezifischer anti-Futsch Antikörper sollte zum weiteren Verständnis des Futsch Proteins beitragen.

Rettungsexperimente an der *Drosophila* NMJ haben gezeigt, dass der *futsch*-mutante Synapsenphänotyp durch die Expression funktionell wichtiger Domänen abgeschwächt werden kann.

Die Aktivität des Vertebraten Homologs MAP1B wird durch Phosphorylierung durch u.a. der GSK3 β Kinase beeinflusst, die auch im *Drosophila* Genom gefunden wurde. Die Sequenz dieser Phosphorylierungsstelle findet man auch im Futsch Protein. Eine Phosphorylierungsstelle konnte in einem *in-vitro* Kinase-Test bestätigt werden, Versuche zur *in-vivo* Funktion einer Phosphorylierung von Futsch stehen noch aus.

6. Literatur

- Avila, J.** (1991). Does MAP1B bind to tubulin through the interaction of alpha-helices? *Biochem J* **274** (Pt 2), 621-2.
- Bardoni, B., Giglio, S., Schenck, A., Rocchi, M. and Mandel, J. L.** (2000). Assignment of NUFIP1 (nuclear FMRP interacting protein 1) gene to chromosome 13q14 and assignment of a pseudogene to chromosome 6q12. *Cytogenet Cell Genet* **89**, 11-3.
- Bardoni, B. and Mandel, J. L.** (2002). Advances in understanding of fragile X pathogenesis and FMRP function, and in identification of X linked mental retardation genes. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 284-93.
- Bourouis, M., Heitzler, P., el Messal, M. and Simpson, P.** (1989). Mutant Drosophila embryos in which all cells adopt a neural fate. *Nature* **341**, 442-4.
- Bourouis, M., Moore, P., Ruel, L., Grau, Y., Heitzler, P. and Simpson, P.** (1990). An early embryonic product of the gene shaggy encodes a serine/threonine protein kinase related to the CDC28/cdc2+ subfamily. *Embo J* **9**, 2877-84.
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D. et al.** (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* **107**, 477-87.
- Brugg, B., Reddy, D. and Matus, A.** (1993). Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth. *Neuroscience* **52**, 489-96.
- Burden, S. J.** (1998). The formation of neuromuscular synapses. *Genes Dev* **12**, 133-48.
- Burden, S. J.** (2000). Wnts as retrograde signals for axon and growth cone differentiation. *Cell* **100**, 495-7.
- Caceres, A. and Kosik, K. S.** (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**, 461-3.
- Caceres, A., Mautino, J. and Kosik, K. S.** (1992). Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* **9**, 607-18.
- Canal, I. and Ferrus, A.** (1986). The pattern of early neuronal differentiation in Drosophila melanogaster. *J Neurogenet* **3**, 293-319.
- Casso, D., Ramirez-Weber, F. and Kornberg, T. B.** (2000). GFP-tagged balancer chromosomes for Drosophila melanogaster. *Mech Dev* **91**, 451-4.
- Chang, L., Jones, Y., Ellisman, M. H., Goldstein, L. S. and Karin, M.** (2003). JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* **4**, 521-33.
- Cook, J. R. and Van Buskirk, R. G.** (1996). Disruption of microfilaments alters laminin synthesis but not laminin trafficking in NHEK in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **32**, 300-6.
- Degelmann, A.** (1993). Genetic analysis of the X-chromosomal region 1E-2A of Drosophila melanogaster. *Mol Gen Genet* **239**, 257-68.
- Dent, E. W., Callaway, J. L., Szebenyi, G., Baas, P. W. and Kalil, K.** (1999). Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J Neurosci* **19**, 8894-908.
- Diaz-Nido, J., Armas-Portela, R., Correas, I., Dominguez, J. E., Montejo, E. and Avila, J.** (1991). Microtubule protein phosphorylation in neuroblastoma cells and neurite growth. *J Cell Sci Suppl* **15**, 51-9.
- Dickson, B. J. and Senti, K. A.** (2002). Axon guidance: growth cones make an unexpected turn. *Curr Biol* **12**, R218-20.

- Doble, B. W. and Woodgett, J. R.** (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* **116**, 1175-86.
- Dockendorff, T. C., Su, H. S., McBride, S. M., Yang, Z., Choi, C. H., Siwicki, K. K., Sehgal, A. and Jongens, T. A.** (2002). Drosophila lacking *dfmr1* activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. *Neuron* **34**, 973-84.
- Edelmann, W., Zervas, M., Costello, P., Roback, L., Fischer, I., Hammarback, J. A., Cowan, N., Davies, P., Wainer, B. and Kucherlapati, R.** (1996). Neuronal abnormalities in microtubule-associated protein 1B mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1270-5.
- 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**, 5443-56.
- Fryns, J. P., Borghgraef, M., Brown, T. W., Chelly, J., Fisch, G. S., Hamel, B., Hanauer, A., Lacombe, D., Luo, L., MacPherson, J. N. et al.** (2000). 9th international workshop on fragile X syndrome and X-linked mental retardation. *Am J Med Genet* **94**, 345-60.
- Gao, F. B.** (2002). Understanding fragile X syndrome: insights from retarded flies. *Neuron* **34**, 859-62.
- Garcia-Perez, J., Avila, J. and Diaz-Nido, J.** (1998). Implication of cyclin-dependent kinases and glycogen synthase kinase 3 in the phosphorylation of microtubule-associated protein 1B in developing neuronal cells. *J Neurosci Res* **52**, 445-52.
- Garner, C. C., Garner, A., Huber, G., Kozak, C. and Matus, A.** (1990). Molecular cloning of microtubule-associated protein 1 (MAP1A) and microtubule-associated protein 5 (MAP1B): identification of distinct genes and their differential expression in developing brain. *J Neurochem* **55**, 146-54.
- Goedert, M. and Jakes, R.** (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J* **9**, 4225-30.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D. and Crowther, R. A.** (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**, 519-26.
- Gonzalez-Billault, C. and Avila, J.** (2000). Molecular genetic approaches to microtubule-associated protein function. *Histol Histopathol* **15**, 1177-83.
- Gonzalez-Billault, C., Demandt, E., Wandosell, F., Torres, M., Bonaldo, P., Stoykova, A., Chowdhury, K., Gruss, P., Avila, J. and Sanchez, M. P.** (2000). Perinatal lethality of microtubule-associated protein 1B-deficient mice expressing alternative isoforms of the protein at low levels. *Mol Cell Neurosci* **16**, 408-21.
- Gonzalez-Billault, C., Owen, R., Gordon-Weeks, P. R. and Avila, J.** (2002). Microtubule-associated protein 1B is involved in the initial stages of axonogenesis in peripheral nervous system cultured neurons. *Brain Res* **943**, 56-67.
- Goold, R. G. and Gordon-Weeks, P. R.** (2001). Microtubule-associated protein 1B phosphorylation by glycogen synthase kinase 3beta is induced during PC12 cell differentiation. *J Cell Sci* **114**, 4273-84.
- Goold, R. G., Owen, R. and Gordon-Weeks, P. R.** (1999). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* **112 (Pt 19)**, 3373-84.
- Gordon-Weeks, P. R.** (1991a). Growth cones: the mechanism of neurite advance. *Bioessays* **13**, 235-9.
- Gordon-Weeks, P. R.** (1991b). Microtubule organization in growth cones. *Biochem Soc Trans* **19**, 1080-5.
- Gordon-Weeks, P. R.** (1993). Organization of microtubules in axonal growth cones: a role for microtubule-associated protein MAP 1B. *J Neurocytol* **22**, 717-25.

- Gordon-Weeks, P. R. and Fischer, I.** (2000). MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc Res Tech* **48**, 63-74.
- Gordon-Weeks, P. R., Johnstone, M. and Bush, M.** (1995). Phosphorylation of microtubule-associated protein 1B and axonal growth. *Biochem Soc Trans* **23**, 37-40.
- Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14.
- Hall, A. C., Lucas, F. R. and Salinas, P. C.** (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* **100**, 525-35.
- Hammarback, J. A., Obar, R. A., Hughes, S. M. and Vallee, R. B.** (1991). MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron* **7**, 129-39.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T. and Hirokawa, N.** (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* **369**, 488-91.
- Himmler, A.** (1989). Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* **9**, 1389-96.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R.** (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-8.
- Hummel, T., Krukkert, K., Roos, J., Davis, G. and Klambt, C.** (2000). Drosophila Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* **26**, 357-70.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klambt, C.** (1999). Commissure formation in the embryonic CNS of Drosophila. *Dev Biol* **209**, 381-98.
- Ishizuka, A., Siomi, M. C. and Siomi, H.** (2002). A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16**, 2497-508.
- Jin, P. and Warren, S. T.** (2000). Understanding the molecular basis of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* **9**, 901-8.
- Johnstone, M., Goold, R. G., Bei, D., Fischer, I. and Gordon-Weeks, P. R.** (1997). Localisation of microtubule-associated protein 1B phosphorylation sites recognised by monoclonal antibody SMI-31. *J Neurochem* **69**, 1417-24.
- 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**, 545-75.
- Kirschner, M. and Mitchison, T.** (1986a). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**, 329-42.
- Kirschner, M. W. and Mitchison, T.** (1986b). Microtubule dynamics. *Nature* **324**, 621.
- Klambt, C., Hummel, T., Menne, T., Sadlowski, E., Scholz, H. and Stollewerk, A.** (1996). Development and function of embryonic central nervous system glial cells in Drosophila. *Dev Genet* **18**, 40-9.
- Kogan, C. S., Boutet, I., Cornish, K., Zangenehpour, S., Mullen, K. T., Holden, J. J., Der Kaloustian, V. M., Andermann, E. and Chaudhuri, A.** (2004). Differential impact of the FMR1 gene on visual processing in fragile X syndrome. *Brain* **127**, 591-601.
- Krylova, O., Herreros, J., Cleverley, K. E., Ehler, E., Henriquez, J. P., Hughes, S. M. and Salinas, P. C.** (2002). WNT-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. *Neuron* **35**, 1043-56.
- Kutschera, W., Zauner, W., Wiche, G. and Propst, F.** (1998). The mouse and rat MAP1B genes: genomic organization and alternative transcription. *Genomics* **49**, 430-6.
- Kuznetsov, S. A., Nadezhdina, E. S., Rodionov, V. I., Murphy, D. B. and Gel'fand, V. I.** (1986a). [Localization of the light chain (LC-1) of the microtubule-associated protein MAP-1 in the tubulin-binding portion of the molecule]. *Dokl Akad Nauk SSSR* **286**, 224-6.

- Kuznetsov, S. A., Rodionov, V. I., Nadezhkina, E. S., Murphy, D. B. and Gelfand, V. I.** (1986b). Identification of a 34-kD polypeptide as a light chain of microtubule-associated protein-1 (MAP-1) and its association with a MAP-1 peptide that binds to microtubules. *J Cell Biol* **102**, 1060-6.
- Lien, L. L., Feener, C. A., Fischbach, N. and Kunkel, L. M.** (1994). Cloning of human microtubule-associated protein 1B and the identification of a related gene on chromosome 15. *Genomics* **22**, 273-80.
- Liu, C. W., Lee, G. and Jay, D. G.** (1999). Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons. *Cell Motil Cytoskeleton* **43**, 232-42.
- Lucas, F. R., Goold, R. G., Gordon-Weeks, P. R. and Salinas, P. C.** (1998). Inhibition of GSK-3 β leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J Cell Sci* **111** (Pt 10), 1351-61.
- Lucas, F. R. and Salinas, P. C.** (1997). WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol* **192**, 31-44.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A. and Worley, P. F.** (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-45.
- Mack, T. G., Koester, M. P. and Pollerberg, G. E.** (2000). The microtubule-associated protein MAP1B is involved in local stabilization of turning growth cones. *Mol Cell Neurosci* **15**, 51-65.
- Meixner, A., Haverkamp, S., Wasse, H., Fuhrer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., Bittner, R. E., Lassmann, H., Wiche, G. and Propst, F.** (2000). MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* **151**, 1169-78.
- Morales, J., Hiesinger, P. R., Schroeder, A. J., Kume, K., Verstreken, P., Jackson, F. R., Nelson, D. L. and Hassan, B. A.** (2002). Drosophila fragile X protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain. *Neuron* **34**, 961-72.
- Noble, M., Lewis, S. A. and Cowan, N. J.** (1989). The microtubule binding domain of microtubule-associated protein MAP1B contains a repeated sequence motif unrelated to that of MAP2 and tau. *J Cell Biol* **109**, 3367-76.
- Noiges, R., Eichinger, R., Kutschera, W., Fischer, I., Nemeth, Z., Wiche, G. and Propst, F.** (2002). Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci* **22**, 2106-14.
- Nusslein-Volhard, C., Kluding, H. and Jurgens, G.** (1985). Genes affecting the segmental subdivision of the Drosophila embryo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**, 145-54.
- Owen, R. and Gordon-Weeks, P. R.** (2003). Inhibition of glycogen synthase kinase 3 β in sensory neurons in culture alters filopodia dynamics and microtubule distribution in growth cones. *Mol Cell Neurosci* **23**, 626-37.
- 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**, 319-30.
- Pardee, J. D. and Spudich, J. A.** (1982). Purification of muscle actin. *Methods Enzymol* **85 Pt B**, 164-81.
- Pedrotti, B., Francolini, M., Cotelli, F. and Islam, K.** (1996a). Modulation of microtubule shape in vitro by high molecular weight microtubule associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2. *FEBS Lett* **384**, 147-50.
- Pedrotti, B. and Islam, K.** (1996). Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *FEBS Lett* **388**, 131-3.

- Pedrotti, B., Ulloa, L., Avila, J. and Islam, K.** (1996b). Characterization of microtubule-associated protein MAP1B: phosphorylation state, light chains, and binding to microtubules. *Biochemistry* **35**, 3016-23.
- Pigino, G., Paglini, G., Ulloa, L., Avila, J. and Caceres, A.** (1997). Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci* **110** (Pt 2), 257-70.
- Roche, J. P., Packard, M. C., Moeckel-Cole, S. and Budnik, V.** (2002). Regulation of synaptic plasticity and synaptic vesicle dynamics by the PDZ protein Scribble. *J Neurosci* **22**, 6471-9.
- Roos, J., Hummel, T., Ng, N., Klambt, C. and Davis, G. W.** (2000). Drosophila Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* **26**, 371-82.
- Ruiz-Canada, C., Ashley, J., Moeckel-Cole, S., Drier, E., Yin, J. and Budnik, V.** (2004). New Synaptic Bouton Formation Is Disrupted by Misregulation of Microtubule Stability in aPKC Mutants. *Neuron* **42**, 567-80.
- Salinas, P. C.** (2003). Synaptogenesis: Wnt and TGF-beta take centre stage. *Curr Biol* **13**, R60-2.
- Salinas, P. C. and Hall, A. C.** (1999). Lithium and synaptic plasticity. *Bipolar Disord* **1**, 87-90.
- Schenck, A., Bardoni, B., Langmann, C., Harden, N., Mandel, J. L. and Giangrande, A.** (2003). CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in Drosophila and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* **38**, 887-98.
- Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C. and Mandel, J. L.** (2001). A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8844-9.
- Schoenfeld, T. A. and Obar, R. A.** (1994). Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol* **151**, 67-137.
- Shea, T. B. and Beermann, M. L.** (1994). Respective roles of neurofilaments, microtubules, MAP1B, and tau in neurite outgrowth and stabilization. *Mol Biol Cell* **5**, 863-75.
- Soderling, T. R.** (2000). CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 375-80.
- Suter, D. M. and Forscher, P.** (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* **44**, 97-113.
- Takei, Y., Kondo, S., Harada, A., Inomata, S., Noda, T. and Hirokawa, N.** (1997). Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J Cell Biol* **137**, 1615-26.
- Tamanini, F., Bontekoe, C., Bakker, C. E., van Unen, L., Anar, B., Willemssen, R., Yoshida, M., Galjaard, H., Oostra, B. A. and Hoogeveen, A. T.** (1999). Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Hum Mol Genet* **8**, 863-9.
- Tanaka, E. and Sabry, J.** (1995). Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* **83**, 171-6.
- Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C. S.** (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-33.
- Togel, M., Wiche, G. and Propst, F.** (1998a). Evidence against structural and functional identity of microtubule-associated protein 1B and proteoglycan claustrin. *FEBS Lett* **423**, 254-8.
- Togel, M., Wiche, G. and Propst, F.** (1998b). Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol* **143**, 695-707.

- Tombes, R. M., Peloquin, J. G. and Borisy, G. G.** (1991). Specific association of an M-phase kinase with isolated mitotic spindles and identification of two of its substrates as MAP4 and MAP1B. *Cell Regul* **2**, 861-74.
- Tonge, D. A., Golding, J. P. and Gordon-Weeks, P. R.** (1996). Expression of a developmentally regulated, phosphorylated isoform of microtubule-associated protein 1B in sprouting and regenerating axons in vitro. *Neuroscience* **73**, 541-51.
- Ulloa, L., Avila, J. and Diaz-Nido, J.** (1993a). Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *J Neurochem* **61**, 961-72.
- Ulloa, L., Dombradi, V., Diaz-Nido, J., Szucs, K., Gergely, P., Friedrich, P. and Avila, J.** (1993b). Dephosphorylation of distinct sites on microtubule-associated protein MAP1B by protein phosphatases 1, 2A and 2B. *FEBS Lett* **330**, 85-9.
- Vallee, R. B. and Davis, S. E.** (1983). Low molecular weight microtubule-associated proteins are light chains of microtubule-associated protein 1 (MAP 1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1342-6.
- Vandecandelaere, A., Pedrotti, B., Utton, M. A., Calvert, R. A. and Bayley, P. M.** (1996). Differences in the regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2. *Cell Motil Cytoskeleton* **35**, 134-46.
- Verheij, C., Bakker, C. E., de Graaff, E., Keulemans, J., Willemsen, R., Verkerk, A. J., Galjaard, H., Reuser, A. J., Hoogeveen, A. T. and Oostra, B. A.** (1993). Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* **363**, 722-4.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F. P. et al.** (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**, 905-14.
- Williamson, T., Gordon-Weeks, P. R., Schachner, M. and Taylor, J.** (1996). Microtubule reorganization is obligatory for growth cone turning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15221-6.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. and Bagni, C.** (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* **112**, 317-27.
- Zauner, W., Kratz, J., Staunton, J., Feick, P. and Wiche, G.** (1992). Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B. *Eur J Cell Biol* **57**, 66-74.
- Zhang, Y. Q., Bailey, A. M., Matthies, H. J., Renden, R. B., Smith, M. A., Speese, S. D., Rubin, G. M. and Broadie, K.** (2001). Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell* **107**, 591-603.
- Zipursky, S. L., Venkatesh, T. R., Teplow, D. B. and Benzer, S.** (1984). Neuronal development in the Drosophila retina: monoclonal antibodies as molecular probes. *Cell* **36**, 15-26.
- Zito, K., Parnas, D., Fetter, R. D., Isacoff, E. Y. and Goodman, C. S.** (1999). Watching a synapse grow: noninvasive confocal imaging of synaptic growth in Drosophila. *Neuron* **22**, 719-29.

7. Anhang

I. Einzeldaten aus der Analyse der Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren

Dargestellt sind der Wildtyp und die *futsch*-Mutanten.

Genotyp/Larve	Muskel 4, Nr.1	Muskel 4, Nr.2	Muskel 4, Nr.3	Muskel 4, Nr.4	Muskel 4, Nr.5
Wildtyp					
Larve 1	47	46	63	58	47
Larve 2	44	40	50	55	50
Larve 3	53	44	56	56	56
Larve 4	57	51	53	50	44
Larve 5	49	45	58	53	52
Larve 6	50	48	52	51	56
K68					
Larve 1	20	14	17	16	17
Larve 2	12	14	15	15	16
Larve 3	17	16	17	16	13
Larve 4	18	16	18	15	17
Larve 5	20	16	21	17	16
M455					
Larve 1	17	17	14	18	24
Larve 2	20	21	16	15	17
Larve 3	19	13	24	16	22
Larve 4	13	17	24	20	17
Larve 5	20	23	17	18	23
N94					
Larve 1	16	23	15	22	20
Larve 2	15	13	17	15	15
Larve 3	15	18	19	16	23
Larve 4	12	15	14	14	15
Larve 5	17	20	20	23	18
P158					
Larve 1	10	14	12	17	16
Larve 2	23	19	17	15	17
Larve 3	16	14	16	16	13
Larve 4	14	13	15	12	12
Larve 5	15	14	17	16	14
P28					
Larve 1	11	17	15	13	12
Larve 2	14	13	15	15	13
Larve 3	17	12	15	16	16
Larve 4	13	17	15	15	19
Larve 5	14	13	17	13	15

II. Einzeldaten aus der Analyse der Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren

Dargestellt sind die *wingless*-Mutante und die *shaggy*-Mutante.

Genotyp/Larve	Muskel 4, Nr.1	Muskel 4, Nr.2	Muskel 4, Nr.3	Muskel 4, Nr.4	Muskel 4, Nr.5
<i>wingless</i>					
Larve 1	19	20	17	21	23
Larve 2	17	18	17	24	17
Larve 3	16	21	20	17	17
Larve 4	25	26	18	23	22
Larve 5	23	22	23	17	18
Larve 6	19	14	18	23	17
<i>shaggy</i>					
Larve 1	23	28	18	25	13
Larve 2	15	15	22	14	23
Larve 3	21	18	16	25	23
Larve 4	30	28	34	31	22
Larve 5	23	35	26	21	32

Genotyp/Larve	Muskel 4, Nr.1	Muskel 4, Nr.2	Muskel 4, Nr.3	Muskel 4, Nr.4	Muskel 4, Nr.5
<i>elav-GAL4/UAS- fraX</i>					
Larve 1	29	33	27	28	33
Larve 2	28	29	31	26	27
Larve 3	32	30	34	29	27
Larve 4	33	33	29	33	31
<i>shaggy/fragile X</i>					
Larve 1	23	27	25	18	24
Larve 2	22	18	22	26	23
Larve 3	21	21	18	25	22
Larve 4	28	28	24	21	26

III. Einzeldaten aus der Analyse der Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren

Dargestellt sind die Larven, die ein UAS-Transgen und eine GAL4-Insertion tragen.

Genotyp/Larve	Muskel 4, Nr.1	Muskel 4, Nr.2	Muskel 4, Nr.3	Muskel 4, Nr.4	Muskel 4, Nr.5
<i>elav-GAL4/UAS-sgg</i>					
Larve 1	28	13	18	19	15
Larve 2	18	17	22	23	15
Larve 3	17	25	19	16	16
Larve 4	19	15	18	23	15
<i>elav-GAL4/UAS-sgg^{activated}</i>					
Larve 1	27	24	27	25	29
Larve 2	26	26	30	33	30
Larve 3	26	27	29	29	24
Larve 4	27	23	28	25	31
<i>elav-GAL4/UAS-sgg^{DN}</i>					
Larve 1	27	25	33	26	24
Larve 2	27	21	20	23	24
Larve 3	21	20	24	21	22
Larve 4	24	25	24	27	23

IV. Transgene UAS-*futsch* Fliegenstämme

Injiziertes Konstrukt	Injizierte Embryonen	Geschlüpfte Larven	Geschlüpfte Fliegen	Unabhängige transgene Stämme
N-Term	1000	90	24	6
C-Term	1800	205	54	3
N+C-Term	1500	112	29	4

V. Experiment zur Rettung des *futsch*^{K68}-mutanten Synapsenphänotyps. Aufgelistet sind die Einzeldaten aus der Analyse der Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren

Genotyp/Larve	Muskel 4, Nr.1	Muskel 4, Nr.2	Muskel 4, Nr.3	Muskel 4, Nr.4	Muskel 4, Nr.5
<i>K68,K68;da-GAL4,UAS-futsch</i>^{N-Term}					
Larve 1	28	46	31	29	32
Larve 2	28	33	37	26	39
Larve 3	34	42	35	37	34
Larve 4	26	26	34	40	37
Larve 5	33	27	29	43	29
<i>K68,K68;da-GAL4,UAS-futsch</i>^{C-Term}					
Larve 1	37	27	27	25	33
Larve 2	28	29	39	33	29
Larve 3	27	26	29	29	37
Larve 4	34	32	27	26	27
Larve 5	30	25	28	33	34
<i>K68,K68;da-GAL4,UAS-futsch</i>^{N+C-Term}					
Larve 1	31	33	34	37	39
Larve 2	45	35	47	51	43
Larve 3	49	39	42	37	35
Larve 4	41	35	47	43	37
Larve 5	37	40	42	35	44

VI. Experiment zur Rettung des *futsch*^{K68}-mutanten Synapsenphänotyps. Aufgelistet sind die Einzeldaten aus der Analyse der Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren

Genotyp/Larve	Muskel 4, Nr.1	Muskel 4, Nr.2	Muskel 4, Nr.3	Muskel 4, Nr.4	Muskel 4, Nr.5
<i>K68,K68;elav-GAL4,UAS-futsch</i>^{N-} <i>Term</i>					
Larve 1	23	32	21	26	17
Larve 2	18	19	29	27	22
Larve 3	23	17	22	21	26
Larve 4	25	20	22	19	19
Larve 5	19	22	21	18	25
<i>K68,K68;elav-GAL4,UAS</i>^{C-Term}					
Larve 1	14	26	21	25	31
Larve 2	21	38	34	23	31
Larve 3	28	22	30	22	35
Larve 4	29	26	18	26	27
Larve 5	25	30	26	28	25
<i>K68,K68;elav-GAL4,UAS-futsch</i>^{N+C-} <i>Term</i>					
Larve 1	24	22	28	27	20
Larve 2	37	23	32	28	26
Larve 3	32	34	29	27	27
Larve 4	26	28	24	26	20
Larve 5	20	26	28	30	26

VII. Experiment zur Rettung des *futsch*^{N94}-mutanten Synapsenphänotyps. Aufgelistet sind die Einzeldaten aus der Analyse der Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren.

Genotyp/Larve	Muskel 4, Nr.1	Muskel 4, Nr.2	Muskel 4, Nr.3	Muskel 4, Nr.4	Muskel 4, Nr.5
<i>N94,N94;da-GAL4,UAS-futsch</i> ^{N-Term}					
Larve 1	17	19	16	21	24
Larve 2	15	16	25	17	19
Larve 3	25	22	15	16	18
Larve 4	19	15	22	21	25
Larve 5	19	15	23	23	21
<i>N94,N94;da-GAL4,UAS-futsch</i> ^{C-Term}					
Larve 1	10	11	18	22	12
Larve 2	17	10	22	16	18
Larve 3	19	19	16	15	18
Larve 4	22	16	18	14	14
Larve 5	13	17	16	20	18
<i>N94,N94;da-GAL4,UAS-futsch</i> ^{N+C-Term}					
Larve 1	34	21	34	29	27
Larve 2	24	32	23	27	21
Larve 3	28	25	25	30	32
Larve 4	34	30	27	27	26
Larve 5	28	30	30	29	32

VIII. Experiment zur Rettung des *futsch*^{N94}-mutanten Synapsenphänotyps. Aufgelistet sind die Einzeldaten aus der Analyse der Anzahl der Boutons, die Muskel 4 innervieren

Genotyp/Larve	Muskel 4, Nr.1	Muskel 4, Nr.2	Muskel 4, Nr.3	Muskel 4, Nr.4	Muskel 4, Nr.5
<i>N94,N94;elav-GAL4,UAS-futsch</i> ^{N-Term}					
Larve 1	21	12	17	18	20
Larve 2	17	16	16	19	22
Larve 3	20	18	25	19	16
Larve 4	19	17	21	15	16
Larve 5	16	15	21	15	17
<i>N94,N94;elav-GAL4,UAS-futsch</i> ^{C-Term}					
Larve 1	18	21	21	30	33
Larve 2	20	18	19	25	21
Larve 3	19	19	24	19	23
Larve 4	22	32	23	27	26
Larve 5	22	19	23	25	18
<i>N94,N94;elav-GAL4,UAS-futsch</i> ^{N+C-Term}					
Larve 1	28	21	18	16	18
Larve 2	27	22	20	23	29
Larve 3	33	25	20	20	19
Larve 4	21	19	25	24	21
Larve 5	28	25	30	25	29

IX. Verwendete Oligonucleotide

Primer für das GeneSOEing

Exon1 for	5` atgggacagcagcgagcagag
Bridge 1/2 for	5` ttcgatatacgcacgcgtggcaactgcgcc
Bridge 1/2 rev	5` ggcgcagttgccacgccgtgcgtatacgca
Bridge 3/4 for	5` tctggatattgcaggacggaacctctcg
Exon 6 rev	5` ggcttaacctcagcccgcggctta
Exon 5 rev	5` aagcatgttaaagccgttgatcc
Bridge 2/3 for	5` ccacttgatgcgcctatgccagcgagaat
Bridge 2/3 rev	5` attctcgctggcatagggcgcatcaagtgg
Bridge 4/5 for	5` atcaacggattcattgattacctcgcgcc
Bridge 4/5 rev	5` gggcgcgaggtaatcaatgaatccgttgat
Exon 5 for	5` gattacctcgcgcccatggtgatg
Exon 3 for	5` tatgccagcgagaatctggtcacg
Bridge 5/6 rev	5` gaagccgccgtcaacaagcatgttaaagcc
Bridge 5/6 for	5` ggcttaacatgcttggtagcggcgcttc
Bridge 3/4 rev	5` cgagaaggttcctcctgcaatatccagga
Exon 4 rev	5` aatgaatccgttgatgcactcgt
Exon 3 rev	5` ctgcaatatccaggaaccatttc
Exon 6 rev	5` gttgacggcggcttaaccgcaa
Exon 4 for	5` gacggaaccttctcggtagcggac
Exon 2 rev	5` gggcgcacatcaagtgggttgaatt
Exon 1-4 rev	5` gctggcatagggcgcatcaagt
Exon 9 for	5` caccactcgcaggagcagatgttg
Bridge 9/10 for	5` gaggacaaggagttggaggtcaccattata
Bridge 9/10 rev	5` tataatggtgacctccaactccttgcctc
Exon 10 rev	5` gaactctaggcggtaggccgagca

Primer für die RT-PCR

Upper primer	5` atgggacagcagcgagcagcagaggtggaga
Lower primer	5` tgggcggctcagaactttagccttggcattttg

Sequenzierprimer Exon 1-6p

For 1	5` atattgcaggacggaaccttc
For 2	5` catggtgatgccaacctcgt
For 3	5` cggccaacctctatcacaagg
For 4	5` cagcaggataacaaagcgaag
Rev 1	5` ctcgtgctccggttctgcatc
Rev 2	5` tgagtcacgcgctggacttat
Rev 3	5` gcagcattgtggctttagatc
Rev 4	5` agacatataacgttgatggg

Sequenzierprimer Exon 9+10

For 1	5` tcccggccgccatggcggccg
For 2	5` ggcagcaggacgacgaggac
For 3	5` gcacttgaggacacgtacag

For 4 5`cccaagaaggaacgccgctg
Rev 1 5`ccatatggtcgacctgcagge
Rev 2 5`ggccttgttggtgattcgct
Rev 3 5`ttcatttcctcggccttcga
Rev 4 5`cacacggagctagagtgtg

Klonierung der Exons 1-6p in den pMAL

1-6p for +BamHI 5`gggaatggatccatgggacagcagcga
1-6p rev +Sall 5`taggtcgaccagaagatgcatcaactc

Klonierung der Exons 9+10 in den pUAST

Exon 9+10+ATG for 5`tcgattatgcaccactcgcaggagcag

Klonierung der Exons 9+10 in den MAL

For 5`cggaattcatgcatcaccatcaccatcac
Rev 5`gcaagcttgaactctaggcggttaggc

Klonierung der Exons 1-6p+9-10 in den pMAL

For 5`ccacgtcgacctcaccactcgcaggag
Rev 5`agatctaagcttgaattcactagtgat

Klonierung der Bereiche in den MAL, die die potentiellen Phosphorylierungsstellen enthalten

Exon 7p for 5`gtttctggatccctatctgtggcc
Exon 7p rev 5`gaagtcgacatgagccacatctac
Exon 8p for 5`gacgtcgacgagcgggtccagt
Exon 8p rev 5`taaaagcttctgcattccag

Klonierung der Bereiche in das Konstrukt pMAL/1-6p-9-10, die die potentiellen Phosphorylierungsstellen enthalten

Exon 7p for 5`cgacgtcgacctgtggccagt
Exon 7p rev 5`gactcgagcatgagccacatc
Exon 8p for 5`agtgttaagggtcgacgttccaag
Exon 8p rev 5`gcttactcgagcctgcattccag

X. Abkürzungen

aa	Aminosäuren
AK	Antikörper
AMP	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
bHLH	basic Helix loop Helix - ein DNA Bindungsmotif
bp	Basenpaare
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DER	<i>Drosophila melanogaster</i> EGF - Rezeptor
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid
DTT	Dithiothreitol
ECM	<i>extracellular matrix</i> - extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiaminetetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> - epidermaler Wachstumsfaktor
EGF-R	EGF - Rezeptor
EMS	Ethylmethylsulfonat
EtOH	Ethanol
FBS	<i>fetal bovine serum</i> - fötales Kälberserum

Fix	Fixativ
GFP	<i>green flourescent protein</i> - grün floureszierendes Protein
GMR	Glass Multimer Reporter
GS	<i>goat serum</i> - Ziegen Serum
h	<i>hour</i> - Stunde
HRP	horseradish peroxidase - Meerretich Peroxidase
ISN	Intersegmentaler Nerv
JNK	Jun - N - terminale Kinase
kb	Kilobasen
mAb	<i>monoclonal Antibody</i> - monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
MG	Mittellinien Glia
min (')	Minute
ML	Mittellinie
MWP	Multiwell-Plexiglasplatte
NBT	Salzpuffer zur pH-Wert Pufferung um pH 9
n.d.	nicht bestimmt
OAc	Acetat
ORF	<i>open reading frame</i> - offenes Leseraster
pBS	Bluescript Vektor (Stratagene)
PBS	Phosphatpuffer zur pH-Wert Pufferung um pH 7
PBT	PBS mit 0,1% Triton X100 versetzt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pCC	<i>posterior corner cell</i> - posteriore Eckzelle
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

PNS	peripheres Nervensystem
PT	Phänotyp
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease A
rpm	<i>rounds per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor - Tyrosin - Kinase
s (')	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
UAS	<i>upstream activating sequence</i> - oberhalb aktivierende Sequenz
ü.N.	über Nacht
UAS	<i>upstream activating sequenz</i>
UTR	<i>untranslated region</i> - untranslatierter Bereich
VUM	<i>ventral unpaired median</i> (Neurone der Mittellinie)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. Christian Klämbt am Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster angefertigt.

Christian danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine permanente Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Martin Bähler möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Monika Fröhlich für ihre Hilfe während der Zellkulturexperimente.

Bedanken möchte ich mich auch bei Ingrid Bunse für die unzähligen perfekten Sequenzen und Sven Bogdan für viele Anregungen und interessante Gespräche.

Ein herzliches Dankeschön an Jörn Hülsmeier und Jens Hillebrand für die Hilfsbereitschaft am Computer.

Ausserdem danke ich Uwe Lammel, Sven Bogdan, Jens Hillebrand, Dirk Langehans, Jörn Hülsmeier, Gundula Edenfeld, Ingrid Bunse, Karin Krukkert, Alexandra Mertens, Mareike Strunk, Tobias Stork und Raiko Stephan für die tolle Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Studium ermöglicht haben.

