

**Intramolekulare Determinanten des Membran-assoziierten
Guanylatkinase-Homologen DLG (Discs Large) für die
subzelluläre Lokalisation in larvalen Körperwandmuskeln
von *Drosophila melanogaster***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.),

genehmigt durch
die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von **DIPLOMBIOLOGIN SUSANNE EBITSCH**
geb. am 12. März 1972 in Bamberg

Gutachter:
PROF. DR. ECKART D. GUNDELFINGER
PROF. DR. BURKHART SCHRAVEN
PD. DR. ANDREAS PROKOP

Eingereicht am:
28. August 2002

Verteidigung am:
06. Februar 2003

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neurobiologie in Magdeburg angefertigt.

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Prof. Eckart Gundelfinger für seine Betreuung, sein Interesse und ständige Diskussionsbereitschaft bedanken

Dr. Uli Thomas danke ich für die Betreuung der Arbeit, das Erwecken meiner Begeisterung für Fliegen, nächtelangen Diskussionen und für die Fahrradreparaturen.

Dr. Ute Kuchinke möchte ich für die vielen Aufmunterungen und ihren Elan danken.

Prof. Reiser möchte ich für die Betreuung im Graduiertenkolleg danken, durch das ich einen Einblick in die Vielfalt der Neurobiologie bekommen habe.

Ilona Linke danke ich für die Hilfe im Labor.

Dr. Carsten Reissner danke ich für die geduldige Erklärung der intramolekularen Interaktion und für die Vorschläge der Punktmutationen in der GuK-Domäne.

Dr. Thomas Behnisch danke ich für die Hilfe am Konfokalmikroskop und den Korrekturen.

Martin Helmuth danke ich für die Hilfe bei den Hefe-Zwei-Hybrid-Versuchen.

Dr. Rainer Pielot möchte ich dafür danken, dass er immer wieder bei den vielen großen und kleinen Problem mit den Computer geholfen hat.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie/Molekularbiologie für die Hilfsbereitschaft und die gute Stimmung die einen wesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte.

Meinen Eltern und Dirk Friedrich danke ich für ihre Unterstützung, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht hat.

Zusammenfassung

Das *Drosophila* Tumorsuppressorprotein DLG (Discs Large) findet sich, wie seine Vertebratenhomologen, in stark angereicherter Form an Zell-Zell-Kontakten, insbesondere an den sogenannten „septate junctions“ in Epithelien und an glutamatergen Nerv-Muskelsynapsen. DLG gehört zur Proteinfamilie der Membran-assoziierten Guanylatkinase-Homologen (MAGuK). Diese Proteine sind durch verschiedene konservierte Domänen charakterisiert, nämlich drei aminoterminalen PDZ-Domänen, eine zentrale SH3-Domäne und eine carboxyterminale GuK-Domäne. Durch Bindung an diese Domänen werden z.B. Ionenkanäle, Zelladhäsionsmoleküle und Signalmoleküle an Synapsen gruppiert. Aufgrund der evolutionären Konservierung der MAGuK-Proteine lässt sich vermuten, dass ähnliche Mechanismen an der Organisation von Synapsen und anderen Zellverbindungen sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten beteiligt sind, so dass durch die Analyse der Funktion von DLG-Domänen in *Drosophila* auf mögliche Funktionen der MAGuKs in Vertebraten geschlossen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von DLG die Funktion konservierter Regionen durch Deletion dieser Bereiche und anschließender Expression der mutierten DLG-Varianten in Muskeln von *Drosophila*-Larven charakterisiert. Außer an der neuromuskulären Synapse ist DLG auch in extra-synaptischen Kompartimenten des Larvenmuskels lokalisiert. Nach biochemischen und immunhistochemischen Analysen sprachen starke Evidenzen für eine Lokalisation von DLG an Subkompartimenten des endoplasmatischen Retikulums (ER). Ferner wurde gezeigt, dass DLG in einem geringeren Maße an Subkompartimenten des Golgi-Apparats lokalisiert ist. Zudem interagiert DLG mit Mikrotubuli und ist an bestimmten Domänen der Plasmamembran und an der neuromuskulären Synapse mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett assoziiert. Die Expression von mutierten DLG-Proteinen im Larvenmuskel zeigte, dass Teilbereiche der Hook-Region, der Region zwischen der SH3- und GuK-Domäne, die Lokalisation am ER vermitteln. Die Rekrutierung an die Plasmamembran bzw. an die Synapse wird durch ein Zusammenspiel der ersten beiden PDZ-Domänen und dem Teilbereich I3 der Hook-Region vermittelt. Für einen effektiven Transport an die Synapse wird zudem die GuK-Domäne benötigt, die möglicherweise einen Transport entlang von Mikrotubuli vermittelt. Somit kann ein schrittweiser Transport von DLG aus dem ER über die Plasmamembran an die Synapse postuliert werden.

Zudem wurden neuartige DLG-Spleißvarianten charakterisiert, die Homologie zum N-Terminus des Vertebraten-MAGuKs SAP97 besitzen. Immunhistochemische und Western-Blot-Analysen zeigten, dass an der neuromuskulären Synapse vor allem eine der neuartigen Varianten exprimiert wird, nämlich DLG-S97. Ferner sind die Isoformen in unterschiedlichen Geweben exprimiert und auch innerhalb des Muskels konnte eine differentielle Lokalisation beobachtet werden. Der alternative N-Terminus birgt vermutlich ein eigenes synaptisches Lokalisierungssignal, so dass unterschiedliche Transportwege der Isoformen und möglicherweise unterschiedliche Funktionen vermutet werden können

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Synapse.....	1
1.2	Die neuromuskuläre Synapse von <i>Drosophila</i> als Modell glutamaterger Synapsen des Zentralnervensystems der Vertebraten.....	1
1.2.1	Kurze Einführung in die neuromuskuläre Synapse von <i>Drosophila</i> -Larven	2
1.3	Die Familie der <u>M</u> embran- <u>a</u> ssoziierten <u>G</u> uanylat <u>k</u> inase-Homologen (MAGuKs).....	4
1.3.1	Domänen der MAGuKs.....	5
1.3.2	Das <i>Drosophila</i> -MAGuK DLG	7
1.4	Ziel der Arbeit	9
2	MATERIAL	10
2.1	Escherichia coli Stämme	10
2.2	Fliegenstämme.....	10
2.3	Vektoren.....	11
2.4	Kits, Enzyme und Marker.....	11
2.5	Chemikalien.....	11
2.6	Allgemeine Lösungen	11
2.7	Oligonukleotide.....	12
2.8	Antikörper	12
3	METHODEN	13
3.1	Molekularbiologie.....	13
3.1.1	DNA-Präparation.....	13
3.1.1.1	Mini-, Midipräparation.....	13
3.1.1.2	Präparation genomischer DNA aus Fliegen	14

3.1.2	Enzymatische Behandlung von DNA.....	14
3.1.2.1	Fragmentierung mit Restriktionsenzymen	14
3.1.2.2	Behandlung von linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase	15
3.1.3	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese sowie Elution von DNA aus Agarose-Gelen	15
3.1.4	Ligation von DNA-Fragmenten	15
3.1.5	Transformation von Bakterien.....	15
3.1.6	Polymerasenkettenreaktion (PCR).....	16
3.1.7	Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus cDNA- Banken	16
3.1.8	ExSite PCR-Mutagenese.....	16
3.1.9	Einfügen des Flag-Epitops	16
3.1.10	Subklonierung der Deletionen und Punktmutationen.....	17
3.2	Biochemie	17
3.2.1	Proteinextraktion aus Larven	17
3.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot.....	17
3.2.3	Präzipitation von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli.....	18
3.2.4	Immunpräzipitation.....	18
3.2.5	Zellfraktionierung nach (Rietveld <i>et al.</i> , 1999).....	19
3.3	Hefe-Zwei-Hybridsystem	19
3.3.1	Konstrukte	19
3.3.2	Simultane Ko-Transformation von Hefen.....	19
3.3.3	Filtertest.....	20
3.4	Immunhistochemie	21
3.4.1	Immunhistochemie an Körperwandpräparaten	21
3.4.2	Transfektion von COS Zellen und Immuncytochemie.....	21
3.4.3	Dokumentation	22
3.5	Fliegenarbeiten	22
3.5.1	Fliegenzucht.....	22
3.5.2	Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i>	22
3.5.3	Das Gal4-UAS-Expressionssystem	23
4	ERGEBNISSE	24
4.1	Analyse der Funktion von Domänen und Teilbereichen von DLG-A ...	25

4.1.1	Erzeugung von Deletionen und Punktmutationen	25
4.1.2	Erzeugung von transgenen Fliegen und Nachweis der Expression	27
4.1.3	Deletion des N-Terminus	28
4.1.4	Deletion der PDZ-Domänen	29
4.1.5	Deletionen im Bereich der Hook-Region	30
4.1.6	Deletion und Punktmutation in der GuK-Domäne	33
4.1.7	Rettung des <i>dlg</i> -Tumorphänotyps	35
4.2	Immunhistochemische Charakterisierung des Cytoskeletts und intrazellulärer Kompartimente der larvalen Körperwandmuskulatur...	36
4.2.1	Charakterisierung der Verteilung des endoplasmatischen Retikulums..	36
4.2.1.1	Markierung mit Antikörpern gegen das KDEL-Antigen und Hinweise auf eine Lokalisation von DLG im ER	37
4.2.1.2	Markierung mit Antikörpern gegen das Poly A-Bindungsprotein und den eukaryotischen Initiationsfaktor 4	40
4.2.2	Charakterisierung der Verteilung des Golgi-Apparats	43
4.2.2.1	Markierung mit Antikörpern gegen das 120 kDa-Antigen	43
4.2.2.2	Die anti-Syntaxin-6- und anti-58K-Immunreaktivität markiert Golgi-Elemente im subsynaptischen Retikulum	46
4.3	Charakterisierung von Cytoskelettelementen des Larvenmuskels	47
4.3.1	Markierung der Mikrotubuli mit anti- α -Tubulin-Antikörper	47
4.3.1.1	Wird DLG entlang von Mikrotubuli an die Synapse transportiert?	49
4.3.1.2	D-CRIPT interagiert nicht mit DLG an der neuromuskulären Synapse	50
4.3.2	Assoziation von DLG mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett	52
4.4	Neuartige DLG-Spleißvarianten	55
4.4.1	Genomische Organisation und Transkripte	55
4.4.2	Immunhistochemische Untersuchung zur Expression der SAP97N-Varianten im Wildtyp und in <i>dlg</i> -Mutanten	57
4.4.3	Nachweis durch Western-Blot-Analyse	60
4.4.4	Der alternative N-Terminus als synaptisches Lokalisierungssignal	60
4.4.5	Regulation der Lokalisation von DLG-S97 durch CaMKII	61
5	DISKUSSION	63
5.1	Lokalisation von DLG am ER - nur eine Zwischenstation?	63

5.2	Lokalisation von DLG am Golgi-Apparat?.....	66
5.3	Vermittelt die GuK-Domäne den Transport entlang von Mikrotubuli? .	68
5.4	Vermittlung der Assoziation von DLG an Subkompartimenten des Muskels durch das Actin-Spectrin-Cytoskelett.....	70
5.5	Möglicher Einfluß von intramolekularen Interaktionen auf die DLG-Lokalisation.....	72
5.6	Mögliche Rolle der neuartigen Spleißvarianten	74
5.7	Modell und Ausblick	78
6	LITERATURVERZEICHNIS	81
7	ANHANG	96
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	96
7.2	Vergleichende Zusammenstellung der Orginalsequenzen	98
7.3	Klonierungsschema.....	100

1 Einleitung

1.1 Die Synapse

Neurone stellen Schlüsselemente für die Informationsverarbeitung im Nervensystem dar. An spezifischen Kontaktstellen zwischen den Neuronen, den Synapsen, werden Signale verarbeitet und weitergeleitet. Die Synapsen des Zentralnervensystems (ZNS) sind hochspezialisierte asymmetrisch aufgebaute Strukturen, die in Prä- und Postsynapse unterschieden werden. An der Präsynapse akkumulieren mit Transmitter gefüllte Vesikel an der aktiven Zone. Durch eine elektrische Potentialänderung an der präsynaptischen Membran wird die Freisetzung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt induziert. Der Transmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an Rezeptor- und Kanalkomplexe in der Membran der postsynaptischen Zelle. Diese Komplexe sind durch eine Vielzahl von Proteinen miteinander verknüpft, weshalb sie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als elektronendichtes Netzwerk, die postsynaptische Dichte (PSD), erscheinen. Exzitatorische Synapsen im ZNS von Vertebraten nutzen Glutamat als Hauptneurotransmitter. Die Antwort auf die Ausschüttung des Transmitters wird deshalb durch die präzise Gruppierung und Immobilisierung verschiedener Glutamatrezeptoren und weiterer Ionenkanäle an der PSD durch Verknüpfen der Membranproteine mit dem Cytoskelett ermöglicht. Um eine Aktivierung der intrazellulären Signalweiterleitung zu ermöglichen, müssen die Rezeptoren und Ionenkanäle zudem mit intrazellulären Signalmolekülen und Modulatoren verknüpft sein (Übersicht in Sheng, 2001; Shirao und Sekino, 2001).

Die plastische Umgruppierung von Proteinen an exzitatorischen Synapsen stellt möglicherweise einen wichtigen Mechanismus für Lern- und Gedächtnisprozesse dar (Yuste and Bonhoeffer, 2001). Um diese Prozesse, die durch ein komplexes Zusammenspiel synaptischer Komponenten reguliert werden, besser verstehen zu können, muss zunächst der molekulare Aufbau der Synapsen und der Transport von Komponenten an die Synapse untersucht werden. Hierfür bieten sich einfachere Modellsysteme, wie die im Rahmen dieser Arbeit verwendete neuromuskuläre Synapse von *Drosophila*, an.

1.2 Die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila* als Modell glutamaterger Synapsen des Zentralnervensystems der Vertebraten

Die neuromuskuläre Synapse in *Drosophila* dient als Modellsystem, um eine Vorstellung zu entwickeln, wie einzelne Genprodukte den Aufbau individueller Synapsen und vor allem deren strukturelle und funktionelle Reorganisation beeinflussen. Viele Erkenntnisse über den Aufbau von Synapsen, sowie über die Rekrutierung und synaptische Verknüpfung von Rezep-

turen, wurden an cholinergen neuromuskulären Verbindungen von Vertebraten gewonnen (Übersicht in Colledge und Froehner, 1998; Sanes und Lichtman, 1999). Dennoch bietet die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila*-Larven wesentliche Vorteile gegenüber dem Vertebratenmodell:

1. *Drosophila* ist genetisch charakterisiert und Techniken zur Manipulation des Genoms sind seit langem etabliert.
2. Hauptneurotransmitter ist, wie bei exzitatorischen Synapsen des Zentralnervensystems der Vertebraten, Glutamat. Zudem sind viele Moleküle, wenn auch nicht alle, die an der funktionellen und strukturellen Plastizität von Synapsen beteiligt sind, zwischen Invertebraten und Vertebraten konserviert. Dazu gehören neben Glutamatrezeptoren auch Ionenkanäle z. B. der Shaker-Kaliumkanal, Zelladhäsionsproteine, Proteine der cAMP-Signalkaskade und Cytoskelett assoziierte und regulierende Proteine.

1.2.1 Kurze Einführung in die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila*-Larven

Die Körperwandmuskulatur von *Drosophila*-Larven ist pro Segment in einem sich wiederholenden Muster organisiert (Abb.1-1), die zur besseren Identifizierung der Muskeln durchnummeriert wurden (Bate, 1993; Campos-Ortega, 1997; Crossley, 1978). Die einzelnen Muskeln werden durch charakteristische Motorneurone innerviert. Die Motornervendigungen an der Körperwandmuskulatur setzen sich aus vielen synaptischen Boutons zusammen, die durch axonale Fortsätze verbunden sind. Die Motorneurone bestimmter Zielmuskel bilden drei Typen morphologisch unterscheidbarer Boutons aus, die sich zudem durch eine spezifische Transmitterkomposition der Vesikel auszeichnen:

Typ-I-Boutons sind die größten Bouton-Typen. Sie innervieren alle Muskeln und enthalten den Hauptneurotransmitter Glutamat (Jan und Jan, 1976; Johansen *et al.*, 1989). Sie sind die morphologisch und elektrophysiologisch am besten untersuchten Boutons. Sie werden in zwei Subtypen unterteilt, Typ-Ib und Typ-Is. Die größeren Ib-Boutons sind von einem ausgeprägt gefaltetem subsynaptischen Retikulum (SSR), einer Spezialisierung der Muskelmembran, umgeben. Die kleineren Is-Boutons sind von einem weniger ausgeprägten SSR umgeben.

An den Spitzen des SSRs sind Glutamatrezeptoren gegenüber von aktiven Zonen lokalisiert. Funktionell ist es vermutlich analog zu dendritischen Dornfortsätzen („spines“) (Rheuben *et al.*, 1999). Vom ersten bis zum dritten Larvenstadium wächst der Muskel und damit einhergehend das SSR um ca. das 100-fache. Gleichzeitig nimmt die Anzahl der innervierenden Boutons sowie der aktiven Zonen pro Bouton um etwa das 10-fache zu (Guan *et al.*, 1996;

Schuster *et al.*, 1996a; Schuster *et al.*, 1996b). Im dritten Larvenstadium umschließt das SSR fast den gesamten Bouton.

Typ-II-Boutons innervieren fast alle Muskeln und erstrecken sich am weitesten über die Muskelfaser. Sie verlaufen in Vertiefungen der Muskeloberfläche und besitzen kein oder ein sehr wenig ausgeprägtes SSR. Als Neurotransmitter enthalten sie neben Glutamat auch Octopamin und sind vermutlich für die Modulation des Exzitationszustands verantwortlich (Jia *et al.*, 1993).

Typ-III-Boutons innervieren nur Muskel 12 und enthalten Peptide wie Proctolin (Anderson *et al.*, 1988b), Insulin-ähnliches Peptid (Gorczyca *et al.*, 1993), Leukokinin I (Cantera und Nassel, 1992) und PCAP (pituitary adenylyl cyclase activating peptide) (Zhong und Pena, 1995).

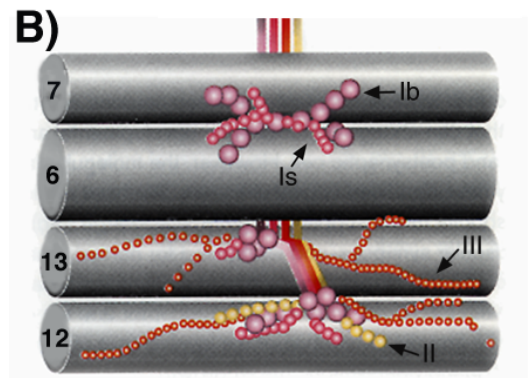
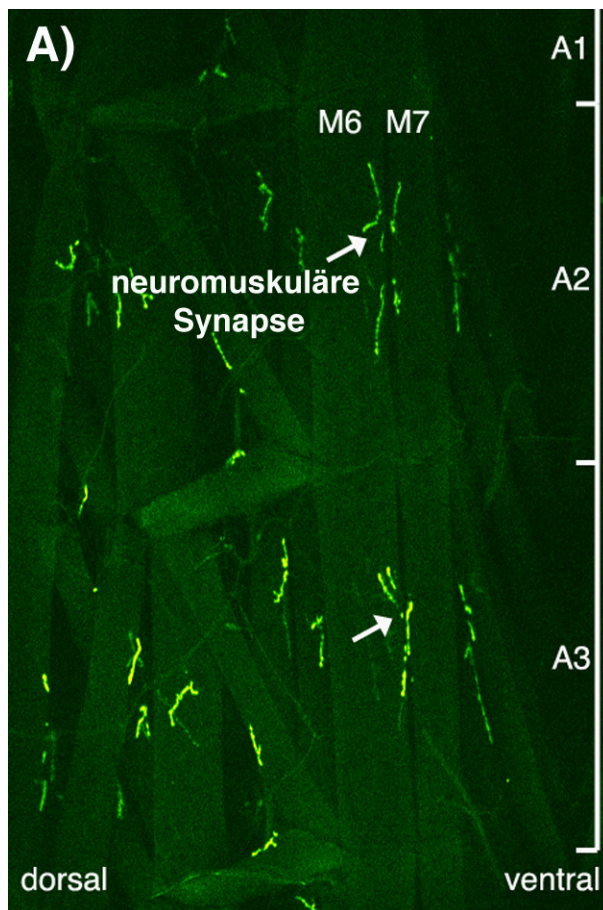


Abb. 1-1: Ausschnitt aus einem Hemisegment einer Larve im dritten Stadium. A) Mit Hilfe eines larvalen Körperwandpräparates können die regelmäßig angeordneten Muskeln und die Lage der neuromuskulären Synapsen mittels eines gegen das Synapsenprotein DLG gerichteten Antikörpers dargestellt werden. Gezeigt wird die anti-DLG-Immunreaktivität in den abdominalen Hemisegmenten A1-A3. DLG markiert die in regelmäßigen Mustern angeordneten Muskeln (M) und neuromuskuläre Synapsen (Pfeil). Die neuromuskulären Synapsen der ventralen longitudinalen Muskel 6 und 7 sind sowohl elektrophysiologisch als auch anatomisch am besten charakterisiert. Um die Ergebnisse mit Literatur vergleichen zu können, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen an diesen Synapsen durchgeführt. B) Schematische Darstellung der Boutontypen der neuromuskulären Synapse an Muskel 6/7 und 12/13 (aus Budnik, 1996a; modifiziert).

1.3 Die Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinase-Homologen (MAGuKs)

Die Proteine der MAGuK-Familie spielen eine zentrale Rolle bei der Gruppierung synaptischer Komponenten und der Plastizität glutamaterger Synapsen (Übersicht in Hata und Takai, 1999; Lisman und Zhabotinsky, 2001). Prototypen dieser Proteinfamilie sind das *Drosophila*-Tumorsuppressorprotein Discs Large (DLG-A) (Woods und Bryant, 1991) und in Vertebraten PSD-95/SAP90 (Cho *et al.*, 1992; Kistner *et al.*, 1993) sowie drei weitere verwandte Moleküle: SAP97/hDLG (Lue *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1995), Chapsyn 110/PSD-93 (Brennan *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1995) und SAP-102 (Muller *et al.*, 1996). Diese Proteine sind durch ihre modulare Domänen-Struktur charakterisiert:

drei N-terminalen PSD-95/ DLG-A/ ZO-1-Domänen (PDZ), einer „Src-homology-type-3“-Domäne (SH3) und einer Guanylatkinase-ähnlichen Domäne (GuK). Neben den prototypischen DLG-artigen MAGuKs wurden in letzter Zeit noch weitere Subfamilien charakterisiert, die ebenfalls an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert sind und hier nur kurz erwähnt werden sollen. Aufgrund der unterschiedlichen Domänenkomposition können vier Subfamilien unterschieden werden (siehe Abb. 1-2):

Hierzu zählen die Säugerproteine zonula-occludens-1 (ZO-1), ZO-2 und ZO-3 (Anderson *et al.*, 1988a; Haskins *et al.*, 1998; Jesaitis und Goodenough, 1994), die an Kontaktstellen epithelialer Zellen, den sogenannten „tight junctions“ in Vertebraten lokalisiert sind. Das verwandte *Drosophila*-Protein Tamou ist an Zell-Zell-Verbindungen proneuraler Zellen lokalisiert (Takahisa *et al.*, 1996). Sie unterscheiden sich vom strukturellen Aufbau der DLG-artigen nur durch eine lange C-terminale prolinreiche Sequenz.

Eine dritte Subfamilie, die p55-ähnlichen MAGuKs (DLG2: Mazoyer *et al.*, 1995; p55: Ruff *et al.*, 1991; DLG3: Smith *et al.*, 1996), besitzen nur eine PDZ-Domäne. p55 ist an der Verknüpfung des Cytoskeletts mit der Plasmamembran in Erythrozyten beteiligt (Marfatia *et al.*, 1997).

Die vierte Subfamilie besteht aus Strukturhomologen des Proteins Lin-2 aus *Caenorhabditis elegans*. Diese besitzen, ähnlich wie p55, eine PDZ-, SH3- und GuK-Domäne und darüberhinaus eine N-terminale Domäne mit hoher Sequenzähnlichkeit zur Ca²⁺/CaM-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII). Hierzu gehören außerdem CaMGuK/CAKI aus *Drosophila* (Dimitratos *et al.*, 1997) und das Vertebratenprotein CASK (Cohen *et al.*, 1998; Hata *et al.*, 1996).

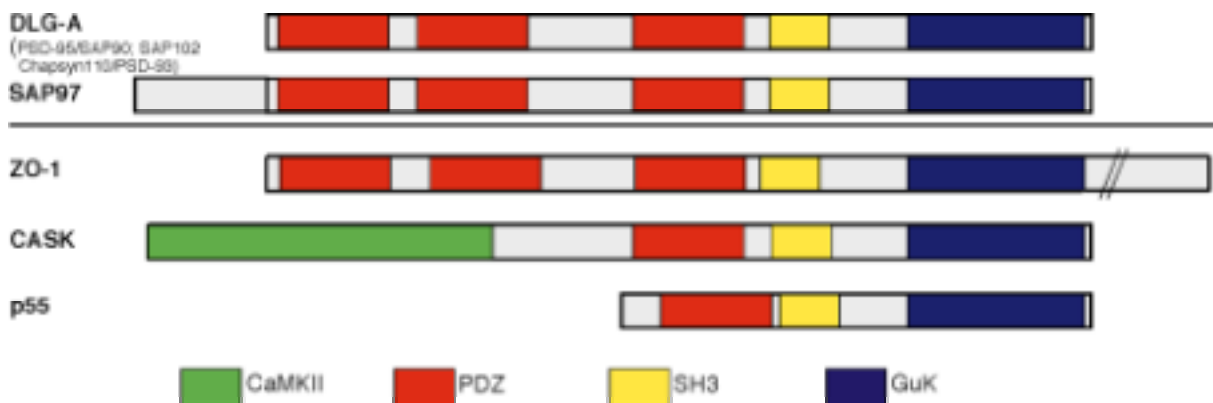


Abb. 1-2: Prototypen der MAGuK Subfamilien. Die unterschiedlichen Domänen sind farblich hervorgehoben: Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase-homologe (CaMKII)-Domäne (grün), PSD-95/ DLG-A/ ZO-1 (PDZ)-Domäne (rot), Src-homologe (SH3)-Domäne (gelb), Guanylatkinase-homologe (GuK)-Domäne (blau).

1.3.1 Domänen der MAGuKs

Die Bindung verschiedenster Interaktionspartner an die einzelnen Proteindomänen gewährleistet die Zusammenführung unterschiedlicher Funktionen an Zell-Zell-Kontakten, die letztendlich eine Signalweiterleitung ermöglichen (Abb. 1-3).

Eine bedeutende Rolle für die Protein-Protein-Interaktion nimmt hierbei die PDZ-Domäne ein. PDZ- (PSD-95/SAP90, DLG-A, ZO-1)-Domänen sind Domänen von ca. 90 Aminosäuren Länge, die spezifische C-terminale Peptidsequenzen vieler Signalproteine und Cytoskelett-assoziiierter Proteine binden können (Übersicht in Ponting *et al.*, 1997):

1. Ionenkanäle und Rezeptoren:

Die ersten Hinweise auf Interaktionen der PDZ-Domänen DLG-artiger MAGuKs wurden im Hefe-Zwei-Hybridsystem gewonnen. Hier konnte gezeigt werden, dass die erste und zweite PDZ-Domäne von PSD-95/SAP90 mit dem cytoplasmatischen Teil des spannungsabhängigen Shaker-Kaliumkanals und der NR2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors interagieren (Kim *et al.*, 1995; Kornau *et al.*, 1995). Diese Interaktion wird durch ein C-terminales PDZ-Bindungs-motiv, t-E-S/T-D-V, vermittelt. Der Beleg dafür, dass Proteine der SAP90/PSD-95 Familie tatsächlich *in vivo* an der Lokalisierung und Vernetzung von Ionenkanälen beteiligt sind, wurde jedoch erst durch genetische Studien des *Drosophila*-Homologen DLG an der neuromuskulären Synapse erhalten (Tejedor *et al.*, 1997).

2. Signalmoleküle:

Es wurden ferner PDZ-Bindungspartner identifiziert, die an der intrazellulären Signalkaskade oder deren Modulation beteiligt sind. An die zweite PDZ-Domäne von PSD-95 bindet die neuronale Isoform der NO-Synthase (nNOS), was vermutlich die nNOS-Aktivität mit dem Ca²⁺-Einstrom durch den NMDA-Rezeptor verknüpft (Brenman *et al.*, 1996). Weitere Bindungspartner, die an verschiedenen Signalwegen beteiligt sind, sind das GTPase-aktivierende Protein SynGAP (Chen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998), der Rho-Effektor Citron

(Furuyashiki *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999) sowie der Rho-Guaninnucleotid-Austauschfaktor Kalirin-7 (Penzes *et al.*, 2001).

3. Zelladhäsionsmoleküle:

Die Erhaltung der postsynaptischen Struktur und die Verankerung der Ionenkanäle und Rezeptoren gegenüber der aktiven Zone wird vermutlich durch die Interaktion der PDZ-Domänen mit Zelladhäsionsmolekülen wie Neuroligin, Neurexin oder das *Drosophila*-Zelladhäsionsmolekül Fasciclin II erreicht. Zum Beispiel bindet die PDZ3-Domäne von PSD-95 an den C-Terminus von Neuroligin (Irie *et al.*, 1997), während die PDZ-Domänen von präsynaptisch lokalisiertem CASK an Neurexin binden können (Hata *et al.*, 1996). Der Kontakt zwischen prä- und postsynaptischen MAGuKs wird wiederum durch die Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle gewährleistet (Missler *et al.*, 1998).

Die SH3-Domäne ist ebenfalls ein Protein-Interaktions-Modul, das spezifisch an kurze prolinreiche Sequenzen bindet. Die SH3-Domäne von SAP90/PSD-95 interagiert z. B. mit einer prolinreichen Sequenz am C-Terminus der Kainat-Rezeptor-Untereinheit KA2 (Garcia *et al.*, 1998). Diese Interaktion moduliert nicht nur die Kanaleigenschaften, sondern führt auch, zumindest in heterologen Zellsystemen, zum Clustern der Rezeptoren. Neben der „klassischen“ Bindung von prolinreichen Sequenzen, kann die SH3-Domäne der MAGuKs auch eine atypische Interaktion mit der GuK-Domäne eingehen (McGee und Bredt, 1999; Shin *et al.*, 2000). Diese kann sowohl in trans (intermolekular) als auch in cis (intramolekular) erfolgen. *In vitro*-Studien zeigten, dass die cis-Bindung die Interaktion mit dem GuK-Interaktionspartner GKAP („guanylate kinase-associated protein“) reguliert (Wu *et al.*, 2000). Des Weiteren wird die Bildung eines cytoskelettalen Netzwerkes in der postsynaptischen Dichte durch weitere Bindungspartner der C-terminalen GuK-Domäne gewährleistet. Diese Vernetzung wird durch die GuK-Bindungspartner GKAP/SAPAP („SAP90/PSD-95-associated proteins“) (Kim, 1997; Takeuchi *et al.*, 1997) und deren Interaktionspartner deutlich. GKAP/SAPAP binden dann an die PDZ-Domäne eines weiteren Multidomänenproteins, ProSAP/Shank (Boeckers *et al.*, 1999; Naisbitt *et al.*, 1999). Dieses interagiert wiederum mit dem Actin-bindenden Protein Cortactin und einem Bindungsprotein des metabotropen Glutamaterezeptors, Homer. Durch diese Verknüpfung mit Homer könnten verschiedene Glutamaterezeptoren über das Actin-Cytoskelett miteinander verbunden sein (Boeckers *et al.*, 2002; Thomas, 2002; siehe Abb. 1-3).

Neben den konservierten Domänen besitzen die MAGuKs auch weniger konservierte Bereiche, wie die N-terminale Region, was in einer funktionellen Heterogenität dieser Region bei verschiedenen MAGuKs resultiert. PSD-95 und Chapsyn110/PSD93 werden durch Palmitoylierung von im N-Terminus enthaltenen Cystein-Resten in der Plasmamembran verankert werden (Topinka und Bredt, 1998; Hsueh und Sheng, 1999). Durch das Anfügen dieses Fett-

säurerests wird der Transport aus dem Golgi-Apparat an die Synapse und dort eine aktivitätsabhängige Lokalisierung bewirkt (El-Husseini *et al.*, 2000, 2002). Trotzdem werden auch die nicht N-terminal palmitoylierten MAGuKs SAP97 und SAP102 an die Synapse transportiert, was auf unterschiedliche Lokalisierungssignale innerhalb des N-Terminus schließen lässt (Firestein *et al.*, 2000). Zudem kann SAP97 ebenfalls mittels der N-terminalen Domäne multimerisieren (Marfatia *et al.*, 2000).

Da jedoch oft mehrere Isoformen der MAGuKs an der gleichen Synapse lokalisiert sind (Aoki *et al.*, 2001; Valtschanoff und Weinberg, 2001), ist es aufgrund möglicher Redundanz schwer zu untersuchen, welchen Einfluss die Interaktion eines bestimmten MAGuKs auf die Struktur und Funktion von Synapsen hat. So zeigte kürzlich die Untersuchung von PSD-95/SAP90 mutanten Mäusen (Migaud, 1998), dass NMDA-Rezeptoren auch ohne eine Interaktion mit PSD-95 an die Synapse transportiert werden. Jedoch ist die NMDA-Rezeptor-vermittelte synaptische Plastizität erheblich gestört, so dass als Hauptfunktion von PSD-95/SAP90 die Verknüpfung des Rezeptors mit intrazellulären Signalmolekülen angenommen werden kann. Ob die Rekrutierung des Rezeptors an die Synapse durch andere MAGuKs vermittelt sein könnte, wurde nicht untersucht.

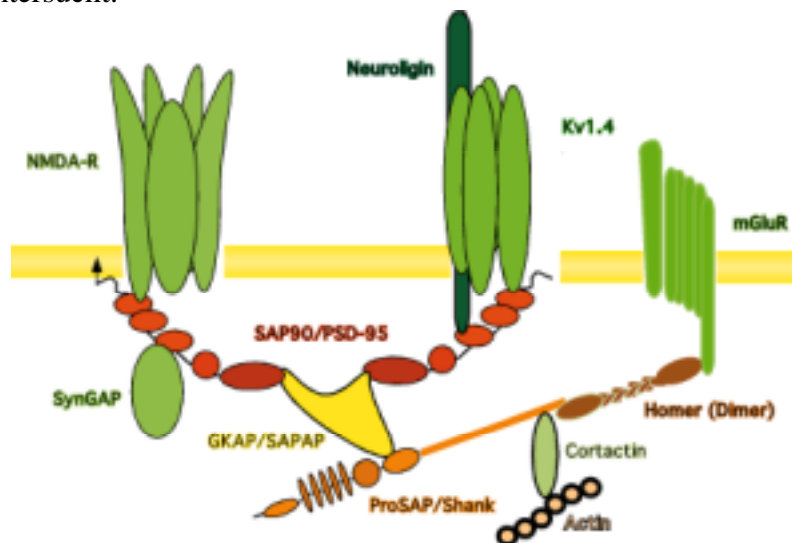


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Interaktion von synaptischen Proteinen an der postsynaptischen Dichte (PSD). Die Verknüpfung von Ionenkanälen und Rezeptoren mit dem Cytoskelett wird vermutlich durch mehrere Gerüstproteine vermittelt. Am besten untersucht sind die DLG-artigen MAGuKs. SAP90/PSD-95 interagiert über die PDZ-Domänen mit den C-Termini von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten, Untereinheiten des Shaker-Kaliumkanals (z. B. Kv1.4) und dem Zelladhäsionsprotein Neuroigin. Durch Bindung der GuK-Domäne an GKAP/SAPAP wird dieser Komplex mit dem Cytoskelett verbunden. GKAP/SAPAP bindet wiederum an die PDZ-Domäne von ProSAP/Shank. Dieses interagiert mit dem Actin-bindenden Protein Cortactin und einem Bindungspartner der metabotropischen Glutamatrezeptoren, Homer.

1.3.2 Das *Drosophila*-MAGuK DLG

DLG bietet sich als Untersuchungsobjekt der Funktion von MAGuKs an, da es das einzige SAP90/PSD95-Homologe an der neuromuskulären Synapse ist, was genetische als auch funktionelle Analysen erleichtert. Anders als bei Säugern kann deshalb eine Kompensation von

Ausfallmutationen durch eng verwandte Proteine ausgeschlossen werden. Der Modellcharakter zeigt sich auch darin, dass die Ratten-MAGuKs SAP97 und SAP102 DLG im Fliegenmodell funktionell ersetzen können (Thomas *et al.*, 1997a; Thomas *et al.*, 1997b).

Das *Drosophila*-Tumorsuppressorprotein DLG findet sich, wie die Vertebratenhomologen, in stark angereicherter Form an Zell-Zell-Kontakten, insbesondere an den sogenannten septierten Desmosomen („septate junctions“) in Epithelien und an glutamatergen Nerv-Muskelsynapsen (Woods und Bryant, 1991; Lahey *et al.*, 1994). Die Bedeutung von DLG bei der Aufrechterhaltung der septierten Desmosomen wird bei Mutationen im *dlg* (*discs large*)-Gen deutlich, die zu einer unvollständigen Ausbildung dieser Struktur führen. Infolgedessen kommt es zu einem partiellen Verlust der Zellpolarität epithelialer Gewebe und zur Bildung von Tumoren (Woods *et al.*, 1996).

DLG nimmt zudem eine zentrale Rolle am Aufbau der neuromuskulären Synapse ein. Hier ist DLG an prä- und postsynaptischen Membranen von Typ-I-Nervenendigungen lokalisiert (Lahey *et al.*, 1994). Phänotypische Analysen von *dlg*-Mutanten wiesen auf die Bedeutung von DLG für die SSR-Struktur hin. Starke *dlg*-Allele zeigen im dritten Larvenstadium unregelmäßig geformte und vergrößerte Boutons. Auf ultrastruktureller Ebene wird eine deutliche Reduzierung des SSRs erkennbar, sowie präsynaptisch eine erhöhte Anzahl von aktiven Zonen. Jedoch zeigten Entwicklungsstudien, dass im ersten Larvenstadium dieser Mutanten das SSR normal gebildet wird, aber nicht mit dem wachsenden Muskel expandiert (Lahey *et al.*, 1994; Budnik *et al.*, 1996b). Eine Möglichkeit, wie DLG die Form der Boutons beeinflussen könnte, stellt die Interaktion mit dem Zelladhäsionsmolekül Fasciclin II (FasII) dar. Diese Interaktion wird durch ein C-terminales PDZ-Bindungsmotiv vermittelt (Thomas *et al.*, 1997a; Zito *et al.*, 1997). FasII reguliert die Stabilisation und das Wachstum von Synapsen. In Mutanten mit erhöhter synaptischer Aktivität ist die synaptische FasII-Expression reduziert, was zu einem verstärkten Synapsenwachstum führt. Eine Modellvorstellung ist, dass Aktivität die Interaktion von DLG und FasII antagonisiert und so synaptische Restrukturierung bzw. Wachstum möglich wird.

Zudem interagiert DLG, wie die Vertebratenhomologen, über PDZ-Domänen mit dem C-terminalen PDZ-Bindungsmotiv des Kaliumkanals Shaker (Tejedor *et al.*, 1997). Durch Untersuchungen von *shaker*-Mutanten und im Muskel exprimierten Chimären aus dem Transmembranteil des Lymphocyten-Zelloberflächenmoleküls CD8 und dem cytoplasmatischen Teil von Shaker wurde gezeigt, dass diese Interaktion für die Rekrutierung des Kanals aus Bereichen der Muskelmembran an die Synapse essentiell ist (Tejedor *et al.*, 1997; Zito *et al.*, 1997).

Die synaptische Lokalisation von DLG selbst ist wiederum durch CaMKII reguliert. CaMKII und DLG sind an Synapsen kolokalisiert und können koimmunopräzipitiert werden. Die

Überexpression von konstitutiv aktiven CaMKII-Mutanten führt zu einem Anstieg von extrasynaptischen DLG und Strukturabnormalitäten, die ähnlich den Strukturdefekten in *dlg*-Mutanten sind. Das SSR ist z. B. in konstitutiv aktiven CaMKII reduziert, wohingegen die Inhibierung der CaMKII zu einem überentwickelten SSR führt (Koh *et al.*, 1999).

1.4 Ziel der Arbeit

Aufgrund der evolutionären Konservierung der MAGuK-Proteine lässt sich vermuten, dass ähnliche Mechanismen an der subzellulären Strukturierung und cytoskelettalen Organisation von Synapsen und anderen Zellverbindungen sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten beteiligt sind, so dass durch die Charakterisierung von DLG-Domänen in *Drosophila* auf mögliche Funktionen der MAGuKs in Vertebraten geschlossen werden kann.

Deshalb sollte im ersten Teil der Arbeit die Rolle von konservierten Domänen und weniger konservierten Teilbereichen von DLG an der subzellulären Verteilung im Muskel und der synaptischen Lokalisation charakterisiert werden. Hierfür wurden *in vitro* verschiedene *dlg*-cDNA-Konstrukte hergestellt, die gezielte Punktmutationen und Deletionen einzelner DLG-Domänen bzw. von Teilbereichen aufweisen. Anschließend wurden für *in vivo*-Untersuchungen transgene Tiere durch Keimbahntransformation hergestellt, um die Auswirkung der DLG-Mutationen auf die Lokalisierung mittels Immunhistochemie untersuchen zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit interessierte ich mich für die Verteilung der Subkompartimente und des Cytoskeletts im *Drosophila*-Larvenmuskel, über die wenig bekannt war. Diese Kompartimente sollten mittels verschiedener Marker immunhistochemisch charakterisiert werden.

Als weiteren Aspekt sollten die Mechanismen des Transports von MAGuKs an die Synapse hinterfragt werden. Dies sollte durch immunhistochemische Kollokalisationsstudien und biochemische Untersuchungen der Assoziation von DLG mit Subkompartimenten des Muskels und des Cytoskeletts geschehen.

Im letzten Teil sollten erst kürzlich gefundene DLG-Spleißvarianten charakterisiert werden. Da Spleißvarianten zu einer funktionellen Diversität führen können, war das Ziel, diese zunächst genomisch zu charakterisieren und anschließend deren Expression durch Western-Blot-Analyse und Immunhistochemie mit der bisher bekannten Variante DLG-A zu vergleichen.

Die gewonnenen Ergebnisse sollten als Grundlage für die Erstellung eines Modells der DLG Lokalisation und des Transports von DLG im larvalen Muskel von *Drosophila* dienen.

2 Material

2.1 Escherichia coli Stämme

Stamm	Verwendung	Hersteller
DH5 α TM	Transformation	Life Technologies
Epicurian Coli SSC 110 (dam-)	Subklonierung aus EGFP C1	Stratagene

2.2 Fliegenstämme

Stamm	Bemerkung	Referenz
Canton S [CS]	Wildtyp	(Lindsley und Zimm, 1992)
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>w</i> -Mutanten, weißäugig	“
<i>w¹¹¹⁸</i> ; Tft / CyO	Balancerstamm für das II. Chromosom	“
<i>w¹¹¹⁸</i> ; TM3 / TM6	Balancerstamm für das III. Chromosom	“
<i>y w sn dlg</i> [XI-2] / <i>Basc</i>	<i>dlg</i> -Mutanten (hypomorph)	(Woods <i>et al.</i> , 1996)
<i>y w dlg</i> [m30] / <i>Binsn</i> / <i>Dp</i>	<i>dlg</i> -Mutanten (hypomorph)	“
<i>y w dlg</i> [m52] / FM7 / <i>Dp</i>	<i>dlg</i> -Mutanten (null)	“
C57-Gal4-Aktivatorstamm	Expression muskelspezifisch	(Koh <i>et al.</i> , 1999)
T80-Gal4-Aktivatorstamm	Expression ubiquitär	(Lindsley und Zimm, 1992)
BG487-Gal4-Aktivatorstamm	Expression von anterior nach posterior in 6/7, 12/13	(Budnik <i>et al.</i> , 1996b)
<i>y w sn dlg</i> [XI-2]; T80/ (CyO)	<i>dlg</i> -Mutanten mit Gal4-Aktivatoren rekombiniert	U. Thomas, IfN-Magdeburg, unpubliziert
<i>y w dlg</i> [m30]; T80 / (CyO)	“	“
<i>y w dlg</i> [m52]; T80/ (CyO)	“	“

Transgene Linien (die chromosomale Insertion ist in römischen Zahlen angegeben)

Stamm		markiert mit	Referenz
UAS- <i>dlg</i> [50-1]-FLAG	II	Flag-Epitop	(Hough <i>et al.</i> , 1997)
UAS- <i>dlg</i> Δ PDZ1+2	II	Flag-Epitop	“
UAS- <i>dlg</i> Δ SH3 [10F1]	II	Flag-Epitop	“
UAS- <i>dlg</i> Δ HOOK [125F1]	II	Flag-Epitop	“
UAS-HOOK+		Flag-Epitop	“
UAS- Δ GUK	II	Flag-Epitop	“
UAS-EGFP- <i>dlg</i> [ES50]	II	EGFP	(Koh <i>et al.</i> , 1999)
UAS- <i>dlg</i> Δ N1.1	II		diese Arbeit
UAS- <i>dlg</i> Δ N2.1	II		“
UAS- <i>dlg</i> Δ E-F [05] / (TM6)	III	Flag-Epitop	“
UAS- <i>dlg</i> Δ E-F [08]	II	Flag-Epitop	“
UAS- <i>dlg</i> Δ I3 [03]	III	Flag-Epitop	“
UAS- <i>dlg</i> Δ I3 [05]	III	Flag-Epitop	“
UAS-EGFP- <i>dlg</i> GuK _{PM}	II	EGFP	“
UAS-EGFP-SAP97 N-term [2692] / (CyO)	II	EGFP	“
UAS-EGFP-SAP97 N-term [2692] / (TM6)	III	EGFP	“
UAS-EGFP-SAP97 Δ PDZ1+2 [1985.1a] / (TM6)	III	EGFP	“
UAS-EGFP-SAP97 Δ PDZ1+2 [1985.05] / (TM3)	III	EGFP	“
UAS-EGFP-SAP97 Δ I3 [2590.10] / (CyO)	II	EGFP	“
UAS-EGFP-SAP97 Δ I3 [2590.11] / (CyO)	II	EGFP	“
UAS- <i>dscript</i> [0.1] / (CyO)	II		“
UAS- <i>dscript</i> [0.6] / (TM6)	III		“
UAS-EGFP-SAP97 [1951.07]	III	EGFP	U. Thomas, IfN-Magdeburg, unpubliziert
UAS-WT-CaMKII R3 (7a/b)	X		(Jin <i>et al.</i> , 1998)
UAS-CaMKII T287A ^{F14}	X		“
UAS-CaMKII T287D ^{10A}	III		“
MHC-GluRIIA-Myc [500]		Myc-Epitop	(Petersen <i>et al.</i> , 1997)
MHC-GluRIIB-Myc [499]		Myc-Epitop	“
UAS-Fringe-Myc [MF916]		Myc-Epitop	(Munro <i>et al.</i> , 2000)

2.3 Vektoren

Vektor/Plasmid	Verwendung	Hersteller
pBluescript (SK)	Subklonierung von <i>dlg-A</i> cDNA Konstrukten	(Hough <i>et al.</i> , 1997)
pEGFP-C1	Living Colors™ Fluorescent Protein Expression in COS-Zellen, Subklonieren in pUAST	Clontech
pUAST	Transformation von Fliegen	(Brand und Perrimon, 1993)
pUC hs π Δ 2-3	„Helferplasmid“	(Laski <i>et al.</i> , 1986)
pGADT7 AD „prey“	Hefe-Zwei-Hybridsystem	Clontech
pACT 2 AD „prey“	“	
pAS2-1 DNA BD „bait“	“	
pCR 2.1-TOPO „bait“	Subklonieren von PCR-Fragmenten	Invitrogen

2.4 Kits, Enzyme und Marker

Produkt	Hersteller
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
Calf Intestine Phosphatase (CIP)	Boehringer
Gene Clean II Kit	Bio 101, Inc.
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen
T4-DNA-Ligase	Boehringer
Lysozym	Eurogentec
Restriktionsenzyme	Gibco/ NEB Biolabs
Oligonukleotide	Gibco Life Technologies
Desoxynucleoside Triphosphate Set	Gibco Life Technologies
Lambda/Hind III Marker	Gibco Life Technologies
smart Ladder	Eurogentec
100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas
Protein-Molekulargewichtsstandard „rainbow“	Amersham Buchler
ExSite PCR Kit	Stratagene
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Purification Kit	Qiagen
TA-Cloning Kit	Invitrogen
ECL Western Blotting Detection Kit	Amersham-Buchler

2.5 Chemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien der Qualitätsstufe pro Analysis der Firmen Serva (Heidelberg), Merck AG (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) verwendet. Spezielle Chemikalien, Kits und Lösungen werden zusätzlich in der Methodenbeschreibung aufgeführt. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

2.6 Allgemeine Lösungen

LB-Medium	5 g Hefe-Extrakt, 10g Bacto-Trypton, 5 g NaCl, ad 1 l H ₂ O
LB-Platten	1 l LB-Medium, 15 g Agar, 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin
50 x TAE	2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA
10 x TBE	0,89 M Tris-Base, 0,89 M Borsäure, 0,02 M EDTA
10 x PBS	1,5 M NaCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, pH 7,4
10 x TBS	1,5 M NaCl, 500 mM Tris-HCl, pH 7,6

2.7 Oligonukleotide

Nummerierung bezogen auf die <i>dlg-A</i> -cDNA m73529.gb_in		
für ExSite Mutagenese der <i>dlg-A</i> -cDNA (Woods und Bryant, 1991)		
Bezeichnung	ab	Sequenz und Bemerkungen
DelN.s	492-512	TAC GAG GAC ATT CAG CTG GA G
DelN.a	389-369	CG TTG TCA TAT CGC AGC GGC
DelE-N.s	2418-2442	CA GGG ACA TGC GGC AGC TAA TAA TA
Del E-N.a	2378-2355	CC AAC GCC TTT TCG ATG GTA CAA T
Del Hook.s	2684-2708	TA CAC GCG CCC GGT GAT TAT TCT G
Del Hook.a	2384-2361	GC GCT CCC AAC GCC TTT TCG ATG G
Del I3.s	2554-2574	AG CCC AAT GGA GTT GTG AGC
Del I3.a	2454-2429	GC TTA TCC AGA TTA TTA TTA GCT GCC
GK1Y-W.s	2820-2843	AGG GAC TGG CAC TTT GTA TCC TCT Austausch Y ₈₁₆ →W
GK1Rsa.a	2819-2795	ACC ATC CAC CTC ATA CTC TCG CTT konservativer Austausch, um RsaI-Schnittstelle zu mutieren
GK2Y-S.s	2899-2924	ATA ACG ACA ATC TGT CCG GCA CAT CG Austausch Y ₈₄₅ →S, gleichzeitig Mutation der RsaI-Schnittstelle
GK2E-W.a	2898-2873	ACT GTC CCG CC CAGA TGA ACA GAT GA Austausch E ₈₃₆ →W
Sequenzierung von <i>dlg</i> -Konstrukten		
Dlg1171.s	1171-1190	AAT TGT CGC AGT CCC AAT CG
Dlg 1784.a	1784-1766	TGG AAC GGC GGC TAG GAC
RT.s	2349-2372	CCG AAT TCG GTA TTG TAC CAT CGA AAA GGC G
RT.GK2.a	2756-2735	CA CGG ATC CGG GAT ACT CTG ATA TAA GGT C
OI DHR2.1	748-780	GTT GAA GCG AAA ACG TGG AAC GGC CAC CAC CCC GGC AGC G
OI DHR2.2	1113-1081	GTG GAA TTC CAA TGA TCA GCG TCA CCT TGT CGG
Oligo SH3.1	2109-2130	ATT CAA GAG TTG AAA CAA CAG G
GH18.s		AAT GCC AAG GAG CCA ACT GT zum Sequenzieren des ESTs GH18117
Dlgb. s	305-321	CCC TCG AAC GCC ATA AGA
Dlge a	600-583	GCT TGG TGA TGT AGA TGG
FLAG-Epitop kodierende Oligonukleotide		
FLAG sense		AAT TCG ACT ACA AGG ACG ACG ATG ACA AGT AG EcoRI
FLAG anti		GAT CC T ACT TGT CAT CGT CGT CCT TGT AGT CG BamHI
Amplifizieren von D-CRIPT		
D-CRIPT-09.s		CGG ATC CAA ATG GTT TGC GAG AAG TG BamHI Start
D-CRIPT-08.a		GGA TCC A TCA CG TTG AGC TCT GCT TG BamHI Stop
D-CRIPT-T→V		GGA TCC ATC ACA CTG AGC TCT GCT TG BamHI ; Mutagenese des PDZ-Bindungsmotivs

2.8 Antikörper

Primäre Antikörper

IHC: Immunhistochemie
WB: Western-Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung in		Hersteller
		IHC	WB	
anti-DLG _{PDZ}	Kaninchen, polyklonal	1: 20.000	1: 20.000	(Koh <i>et al.</i> , 1999)
anti-DLG _{GUK}	Ratte, polyklonal	1: 150		(Koh <i>et al.</i> , 1999)
anti-FLAG M2	Maus, monoklonal	1: 300	1: 1000	SIGMA
anti-FasII	Kaninchen, polyklonal	1: 300		(Thomas <i>et al.</i> , 1997a)
anti-FasII (1D42F3)	Maus, monoklonal	1: 100		C. Goodman

anti- α Tubulin	Maus, monoklonal	1: 10.000	1: 50.000	Sigma
anti- α Spectrin	Maus, monoklonal	1: 10		A. Wodarz
anti-58K	Maus, monoklonal	1: 100	1: 1000	SIGMA
anti-GFP	Maus, monoklonal		1: 1000	Clontech
anti-Syntaxin-6	Maus, monoklonal	1: 200		BD Transduction Laboratories
anti-Syntaxin-6	Kaninchen, polyklonal		1: 4000	(Bongarzone <i>et al.</i> , 2001)
anti-120 kDa	Maus, monoklonal	1: 100	1: 1000	CALBIOCHEM
anti-PABP	Kaninchen, polyklonal	1: 1000		(Sigrist <i>et al.</i> , 2000)
anti-eIF4	Kaninchen, polyklonal	1: 2000		(Sigrist <i>et al.</i> , 2000)
anti-KDEL	Maus, monoklonal	1: 100		StressGen Biotechnologies
anti-DLG _{S97N}	Kaninchen, polyklonal	1: 150	1: 2000	Jimena Serralta
anti-c-Myc	Kaninchen, polyklonal	1: 2000	1: 5000	Santa Cruz biotechnology

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
anti-HRP-FITC	1: 1000	Molecular Probes
Ziege anti-Maus-ALEXA Fluor TM 488	1: 300- 400	Molecular Probes
Ziege anti-Maus-ALEXA Fluor TM 488, <i>highly cross-absorbed</i>	1: 300- 400	Molecular Probes
Ziege anti-Kaninchen-ALEXA Fluor TM 488	1: 300	Molecular Probes
Esel anti-Kaninchen IgG, HRP gekoppelt	1: 10.000	Dianova
Esel anti-Maus IgG, HRP gekoppelt	1: 10.000	Dianova
Esel anti-Maus-Cy3	1: 250	Dianova
anti-Kaninchen-Cy3	1: 250	Dianova
Esel anti-Kaninchen-Cy3	1: 250	Dianova
Esel anti-Ratte-Cy3	1: 250	Dianova
Phalloidin-TRITC	1: 20.000	Sigma

3 Methoden

3.1 Molekularbiologie

In der Regel wurden Standardprotokolle nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. Herstellerangaben verwendet. Erwähnt werden deshalb nur abweichende Protokolle.

3.1.1 DNA-Präparation

3.1.1.1 Mini-, Midipräparation

S1-Puffer 8 % Sucrose, 50 mM Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA), 50 mM Tris-HCl pH 8
S2-Puffer wie S1 + 10 % TritonX 100 (v/v)
S3-Puffer 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8

Zur Isolierung kleiner Mengen (ca. 10 μ g) bakterieller Plasmid-DNA für analytische Zwecke aus transformierten Bakterien wurde die von Holmes *et al.* (1981) beschriebene Kochmethode verwendet:

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden für 30 s bei 14.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 25 μ l S1 Puffer mit ca. 100 μ g/ml Lysozym (Eurogentec) resuspendiert. Der Aufschluß der

Zellen erfolgte durch Zugabe von 25 µl S2-Puffer und anschließendem 1-minütigem Kochen im Wasserbad. Nach Abkühlen im Eisbad für 2 min wurden die Zellextrakte durch Zugabe von 300 µl S3-Puffer neutralisiert und ausgefallene Proteine und chromosomale DNA durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm pelletiert. Die im Überstand vorhandene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 350 µl Isopropanol gefällt, für 20 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und mit 300 µl 70-%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend im Vakuumrotor oder an der Luft getrocknet und in 60 µl H₂O mit RNase A (5 µg/ml) aufgenommen.

Für die Gewinnung größerer Plasmid-Mengen wurden Chromatographie-Säulen der Firma Qiagen nach Qiagen-Anleitung verwendet. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde für Sequenzierung, Klonierung und Fliegen-Transformation eingesetzt.

3.1.1.2 Präparation genomischer DNA aus Fliegen

Für die Präparation wurden 50 mit CO₂ betäubte Fliegen in 500 µl kaltem Lysepuffer (0,1 M Tris/HCl pH 9,0; 0,1 M EDTA; 1% Sodiumdodecylsulfat (SDS)) gesammelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Pro Ansatz wurden 100 µl 10 % Diethyloxydifformat (DEPC) zugegeben und die angedauten Fliegen homogenisiert. Die Homogenate wurden mit 300 µl frischem Lysispuffer versetzt und unter mehrmaligem Durchmischen 30 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 154 µl 8 M Kaliumacetat erfolgte eine 20 – 30-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (20 min, 7.000 g, 4 °C), danach die Überstände für weitere 15 min. Zur Fällung der DNA wurden diesen Überständen je 75 µl 2 M NaCl und 700 µl Isopropanol zugegeben, die Ansätze gut gemischt und erneut zentrifugiert (RT, 15 min, 11.000 g). Das resultierende Pellet wurde mit 70-%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 60 µl H₂O mit RNase A (5 µg/ml) resuspendiert.

3.1.2 Enzymatische Behandlung von DNA

3.1.2.1 Fragmentierung mit Restriktionsenzymen

Der Einsatz von Restriktionsendonukleasen diente der Gewinnung bestimmter DNA-Fragmente für die Klonierung oder der Überprüfung von Klonierungsschritten. Die verschiedenen Restriktionsnukleasen wurden den Herstellerangaben gemäß eingesetzt. Für einige Klonierungsschritte war eine partielle Fragmentierung nötig. Dies wurde durch Abstoppen der Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten und der anschließenden Identifizierung der gewünschten Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.3) erreicht.

3.1.2.2 Behandlung von linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase

Um die Rezirkularisierung linearisierter Plasmidvektoren zu verhindern, wurden deren terminale 5'-Phosphatgruppen durch Einwirkung von CIP („Calf Intestine Phosphatase“, Boehringer, Mannheim) gemäß Herstellerangaben entfernt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von 5 mM EDTA und 20-minütigem Erhitzen auf 65°C. Die DNA wurde anschließend durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

3.1.3 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese sowie Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2-%ige Agarose-Gele in Laufpuffer (1x TBE oder TAE, siehe 2.6) verwendet. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht wurde dem Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung zugegeben. Die Elektrophorese der in 1 x DNA-Probenpuffer aufgetragenen Proben erfolgte in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (BioRad) bei konstanter Spannung von 10 Volt/cm. Zur Längen- und Mengenabschätzung wurden handelsübliche Molekulargewichts-standards (λ Hind III, 1 kb-Leiter) verwendet. Für präparative Gele wurde TAE-Laufpuffer verwendet, die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe verschiedener Kits (Gene Clean II, QIAEX II) aus den Gelblöcken eluiert.

Agarose	Ultra Pure, Gibco
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8
5x DNA-Probenpuffer	0,25 % (w/v) Xylolecyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % (v/v) Glycerin

3.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die durch präparative Gelelektrophorese isolierten linearisierten Vektor- und Insertfragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1: 3 eingesetzt. Die Ligrationsreaktion erfolgte nach Zugabe von ATP-abhängiger T4-DNA-Ligase (Boehringer) in einer Konzentration von 0,5 U pro 20 µl Reaktionsansatz abweichend vom Standardprotokoll für 20-30 min bei RT.

3.1.5 Transformation von Bakterien

Die Transformation von Ligrationsansätzen oder Plasmid-DNA in chemisch kompetent gemachte Bakterien (DH5αTM, Life TechnologiesTM) erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

3.1.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde mit entsprechenden Oligodesoxynucleotiden als Primerpaaren durchgeführt. Der typische 50 µl Reaktionsansatz enthielt neben ca. 100 ng DNA-Template, 10 nM Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs, d [A, C, G, T] TP), 50 pMol Primerpaar, 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase und Reaktionspuffer des Herstellers (Amersham) zusätzlich 5 µl Gelatine (1 mg/ml) und 5 µl BSA (10 mg/ml).

Vor Beginn der PCR wurde die DNA bei 95 °C für 3 min denaturiert und nach Abkühlen auf 80 °C die Polymerase zugegeben („hot start“). Anschließend wurde das Fragment in 30 Zyklen von 1 min 94 °C, 30 sec, je nach Schmelztemperatur der Primer, zwischen 50 °C und 60 °C und 1 min 72 °C amplifiziert. Sollten die PCR-Fragmente kloniert werden (TOPO TA-KIT), wurde ein abschließender Elongationsschritt für 15 min bei 72 °C angefügt.

3.1.7 Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus cDNA- Banken

Bezeichnung der Bank	Vektor	Stadium	Amplifizierung von:	Referenz
LD	pOT 2	0-22 h Embryo	<i>d-cript</i>	BDGP
Hovemann	λ _{gt11}	0-16 h, Embryo	<i>dlg-S97</i>	(Hovemann <i>et al.</i> , 1991)

0,5 µl der entsprechenden cDNA-Bank wurden zu 3 µl dH₂O gegeben und 5 min gekocht. Anschließend wurde ad 50 µl PCR-Mix zugefügt. Die PCR erfolgt wie in 3.1.6 beschrieben.

3.1.8 ExSite PCR-Mutagenese

Zur Erzeugung von *dlg*-Deletions- und Punktmutationen wurde der „ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis“ Kit (Stratagene) verwendet. Es wurden terminal phosphorylierte Primer gewählt, die 3` und 5` von der gewünschten Deletion bzw. „Kopf an Kopf“ bei Punktmutationen an die cDNA binden und bei der anschließenden PCR die gesamte cDNA (außer der Deletion) und Vektor amplifizieren. Da mit der im ExSite-Kit enthaltenen „ExSite DNA-Polymerase blend“ und der vorgeschlagenen Anzahl der Zyklen kein PCR-Produkt erhalten wurde, wurde das Protokoll modifiziert. Die PCR erfolgte wie in 3.1.6 beschrieben, die Elongation bei 72 °C wurde auf 4 min verlängert. Die resultierenden Deletionen und Punktmutationen wurden durch Sequenzierung überprüft und sind im Anhang dokumentiert (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

3.1.9 Einfügen des Flag-Epitops

Das Flag-Epitop ist ein Peptid aus 8 Aminosäuren, das zur Detektion rekombinanter Proteine eingesetzt wird. Das Epitop wurde in Form von angelagerten („annealed“) Oligodesoxynucleotiden in die cDNA eingebracht. Zunächst wurden die für das Flag-Epitop kodierenden

und mit Überhängen der Restriktionsenzyme EcoRI und BglII versehenen sense und antisense Oligodesoxynucleotide (je 1 µl einer 1 µg/µl Verdünnung) zu 18 µl dH₂O gegeben. Das „annealing“ erfolgte bei 3 min 95 °C, 3 min 65 °C, 3 min 50 °C und 3 min 21 °C. Anschließend wurde das Produkt in ein EcoRI-BglII-Fragment der *dlg*-cDNA kloniert (siehe Hough *et al.*, 1997), die für die weitere Subklonierung der Deletionskonstrukte verwendet wurde.

3.1.10 Subklonierung der Deletionen und Punktmutationen

Die einzelnen Subklonierungsschritte der DLG-Konstrukte sind als Schema dem Anhang beigelegt (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). EGFP-SAP97-Konstrukte und EGFP-GuK_{PM} wurden über NheI und XbaI aus pEGFP-C1 ausgeschnitten und in die XbaI-Schnittstellen des pUAST-Vektors kloniert.

3.2 Biochemie

3.2.1 Proteinextraktion aus Larven

Für die Proteinextraktion wurden Muskelwände von 10 Wanderlarven präpariert und in Stickstoff schockgefroren. Nach Zugabe von 52,5 µl RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris pH 8,0; 1% (Octylphenoxy)polyethoxyethanol (Igepal CA-630, Sigma); 0,5 % Deoxycholat; 0,1 % SDS; 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); Proteinaseinhibitor: 0,5 µg/ml Leupeptin, 0,5 µg/ml Aprotinin) wurden die Muskelwände auf Eis homogenisiert und nicht lösliche Bestandteile bei 3.000 rpm, 5 min, 4 °C abzentrifugiert. Für SDS-PAGE-Analyse wurde der Überstand mit 15 µl 5x Proteinpuffer für SDS-PAGE (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 10 % SDS; 2 % Glycerol; 90 µl/ml β-Mercaptoethanol; 300 mM Dithiothreitol (DTT); 0,01 % Bromphenolblau) versehen und 5 min gekocht.

3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen durch diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Die verwendeten Gele bestanden aus 5-%igen Sammel- und 7,5-%igen Trenngelen.

Für Western-Blot-Analysen wurden die Proteine auf eine Nylon-Membran (Millipore, Immobilon-P) transferiert. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde bei RT mit einer Milchpulverlösung (5 % Milchpulver; 2 % Rinderserumalbumin (BSA); 1x TBS; 0,1 % Tween20) vorinkubiert (blockiert). Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte 1 Stunden

bei Raumtemperatur in Milchpulverlösung oder TBSA (1x TBS + Azid [2mM]). Danach wurde dreimal 15 Minuten mit TBST (1x TBS; 0,1 % Tween20) gewaschen und 1 Stunde bei RT mit Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper (Dianova; 1: 10.000) in Milchpulverlösung inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen der Membran wurde diese zur Chemolumineszenz-Detektion des gebundenen Antikörpers mit einer ECL-Lösung (Amersham) inkubiert und das emittierte Signal auf einem Röntgenfilm detektiert.

3.2.3 Präzipitation von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli

Die Präzipitation von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli aus Larvenhomogenaten erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll zur Aufreinigung von MAP-1A/MAP-1B aus Rattengehirn (Fujii *et al.*, 1990). Es wurden pro Genotyp 15 Körperwände von Wanderlarven präpariert und bis zum Ende der Präparation auf Eis in 50 µl Puffer B (100 mM Morpholinoethansulfonsäure; 0,5 mM Mg(CH₃COO)₂; 1mM DTT; 1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF; Proteinaseinhibitoren; pH 6,5) gesammelt. Nach dem Homogenisieren wurden feste Bestandteile durch Zentrifugation für 5 min bei 3.000 rpm, 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und ad 150 µl mit Puffer B aufgefüllt. Der Überstand wurde durch eine weitere Zentrifugation bei 18.000 x g (Rotor TLA100, Ultrazentrifuge T-100, Serva), 4 °C geklärt. Der resultierende Überstand wurde mit 10 µM Taxol (Sigma) versetzt und 10 min bei 25 °C inkubiert und anschließend bei 100.000 g (55.000 rpm) 30 min bei 25 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 150 µl Puffer B + 10 µM Taxol und 10 µg/ml poly-(L-Aspartat), (47 kD, Sigma) gelöst und für 45 min bei 25 °C inkubiert. Die stabilisierten Mikrotubuli wurden bei 100.000 x g für 30 min (25 °C) abzentrifugiert.

Die aus den Zentrifugationsschritten resultierenden Pellets wurden in 150 µl Puffer B aufgenommen und wie die Überstände mit 15 µl 5 x Proteinpuffer für SDS PAGE versetzt und je 15 µl mittels Western-Blot analysiert (siehe 3.2.2).

3.2.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden pro Genotyp 15 Körperwandpräparate in 50 µl Puffer B (siehe 3.2.3) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 4 °C, 3.000 rpm). Nach Zugabe von 2 µl anti-Flag M2 (SIGMA) wurden die Homogenate 1h auf Eis inkubiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mittels Protein-G-gekoppelten magnetischen Kügelchen nach Herstellerangaben (MAGmol MicroBEADS, Milteyi Biotec, Bergisch Gladbach).

3.2.5 Zellfraktionierung nach (Rietveld *et al.*, 1999)

Je 40 Körperwände wurden frisch präpariert und auf Eis in 50 µl TNE-Puffer (150 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,2 mM EGTA; + 0,3 M Sucrose + Proteinaseinhibitor) bis zur Homogenisation auf Eis gelagert. Nach Klärung der Homogenate (5 min, 3.000 rpm, 4 °C) wurde ad 500 µl TNE-Puffer aufgefüllt und ein weiteres Mal zentrifugiert (5 min, 3.000 rpm, 4 °C). Die Überstände wurden ad 6 ml mit TNE + Sucrose (Endkonzentration 1,4 M) aufgefüllt, gemischt und in Polyallomerröhrchen (Beckman, 14x 95 mm) gefüllt. Darauf wurden je 3 ml TNE + 1,22 M Sucrose und TNE + 0,1 M Sucrose geschichtet, die Interphasen markiert und anschließend in einem Beckman SW40-Rotor zentrifugiert (18 h, 140.000 x g, Ultrazentrifuge L 70K, Beckman). Die Gradienten wurden in 1 ml Schritten bis zu den Interphasen von oben her fraktioniert. Die Interphasen wurden in 500 µl Schritten fraktioniert. Durch eine 1: 10 Verdünnung mit eiskaltem Aceton wurden Proteine durch Inkubation für 2 h bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde für 30 min bei 14.000 rpm (4 °C) abzentrifugiert. Die resultierenden Pellets der Interphasen wurden in 50 µl, alle weiteren Fraktionen in 100 µl RIPA (3.2.1) + Proteinprobenpuffer aufgenommen und im Western-Blot analysiert (siehe 3.2.2).

3.3 Hefe-Zwei-Hybridsystem

Das Hefe-Zwei-Hybridsystem wurde zum Nachweis einer möglichen Interaktion von D-CRIPT mit DLG verwendet. Die Herstellung von elektrokompetenten Hefen wurde von Martin Helmuth wie in Helmuth *et al.* (2001) beschrieben, durchgeführt.

3.3.1 Konstrukte

PDZ Domänen wurden aus pACT Konstrukten (Thomas *et al.*, 1997a) in pGADT7 kloniert. *d-cript* und *d-cript*_{T→V} wurden über die in der PCR eingeführten BamHI Restriktionsschnittstellen in den Vektor pAS2-1 kloniert (2.6 und 3.1.7).

3.3.2 Simultane Ko-Transformation von Hefen

Bei der simultanen Ko-Transformation wurden die Hefen, im Gegensatz zur sequentiellen Ko-Transformation, gleichzeitig mit „bait“- und „prey“-Plasmiden transfiziert. Dazu wurden Hefen in Vollmedium kultiviert und elektrokompetent gemacht. Zur Ko-Transformation wurden 10 µg *bait*-Plasmide mit 1 µg cDNA-Bibliothek und 300 µl der eiskalten, elektrokompetenten Hefen gemischt. Der Ansatz wurde leicht geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz in eine eisgekühlte 0,2 cm Küvette überführt und bei 25 µF, 200 Ω und 2,0 kV elektroporiert. Nach der Elektroporation wurde in die Küvette sofort

1,2 ml warmes YPDA-Medium gegeben. Die Resuspension wurde dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 Stunde bei 30 °C und 1.200 rpm im Thermomixer geschüttelt. Danach wurde der Ansatz in einem geeigneten Verhältnis verdünnt und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Diese wurden dann etwa eine Woche im Brutschrank bei 30 °C inkubiert.

SD-Dropout-Medien (SD-DO-Medien)	26,7 g Minimal-SD-Base (Clontech) -L: 0,69 g -Leu-DO (nur für -L -Medien) -W: 0,74 g -W DO (nur für -W -Medien) -LW: 0,64 g -LW-DO (nur für -LW -Medien) -LWH: 0,69 g -LWH-DO (nur für -LWH -Medien) -ALWH: 0,69 g -ALWH-DO (nur für -ALWH -Medien) 20 g Select-Agar (nur für Festmedien) 182,4 g Sorbitol ad 1 l dH ₂ O pH 5,8, Autoklavieren steriles 3-AT (nur für 3-AT-haltige Medien) nach Autoklavieren hinzugeben
YPAD-Medium	50 g YPD Media (Clontech oder Gibco) 30 mg Adeninhemisulfat (nur für YPAD) ad 1 l dH ₂ O pH 5,8 20 g Select-Agar (nur für Festmedien)

3.3.3 Filtertest

Z-Puffer	16,1 g Na ₂ HPO ₄ x7 H ₂ O; 5,5 g NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O; 0,75 g KCl; 0,246 g MgSO ₄ x 7H ₂ O; pH 7,0; ad 1 l 0,5 M EDTA, pH 8,0; ad 2 l dH ₂ O
X-Gal	20 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid) in N,N-Dimethylformamid (DMF)
Detektionslösung	100 ml Z-Puffer, 1,67 ml X-Gal-Stammlösung, 0,27 ml β-Mercapto-Ethanol

Die Interaktion wurde mittels Filtertest über die Aktivität von β-Galaktosidase nachgewiesen. Dazu wurde Filterpapier (Whatman, Cat. No 1001 125) auf die frischen Hefeklone der Selektionsplatten gelegt und mit einem Spatel vorsichtig angedrückt. Anschließend wurde durch Einstechen mit einer sterilen Kanüle die Position des Filters zu der der Klone auf der Selektionsplatte markiert. Dann wurde das Filterpapier von der Selektionsplatte vorsichtig abgezogen und mit den anhaftenden Hefen für etwa 10 sec in flüssigen Stickstoff gegeben, um die Hefenzellen aufzubrechen. Nach Auftauen wurde der Filter mit der hefetragenden Seite nach oben auf einen zweiten Filter gelegt, der vorher mit 4 ml Detektionslösung getränkt wurde. Der mit Hefen behaftete Filter wurde durch Kapillarkräfte auch mit Detektionslösung durchtränkt. Nach einer Inkubation von 3-8 Stunden bei 30 °C wurden die blaugefärbten und damit positiven Klone auf dem Filterpapier den Klonen auf der Selektionsplatte zugeordnet.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Immunhistochemie an Körperwandpräparaten

Für Lokalisationsstudien wurden in der Regel Körperwände von Larven im dritten Stadium unter Ca^{2+} freier Saline (128 mM NaCl; 2 mM KCl; 4 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 35,5 mM Sucrose; 5 mM HEPES; 1 mM EGTA, pH 7,2) präpariert und 20 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) (4 % PFA; 0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7,2) oder Bouins-Fixativ (37 % Formalin; 75 ml gesättigte Pikrinsäure; 5 ml Essigsäure; ad 500 ml dH_2O) fixiert. Anschließend wurde 3 mal 15 Minuten mit PBT (0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7,2; 0,2 % Triton X-100) gewaschen. Die Bindung der primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C, die Bindung der Fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpers erfolgte 1 Stunde bei RT.

Für die anti- α -Tubulin-Färbung wurden die Larven bei Raumtemperatur präpariert, um eine Dissoziation der Mikrotubuli zu verhindern. Durch zügige Präparation (5 min) wurde eine Vakuolisierung vermieden.

Vakuolisierung (siehe 4.2.1.1):

Um eine gezielte Vakuolisierung herbeizuführen, wurden Körperwandpräparate mit raumtemperierter Saline nach Johansen, als Kontrolle mit hämolymphartiger Saline (HL3) (Stewart *et al.*, 1994) präpariert und nach 15-minütiger Inkubation fixiert.

Brefeldin A-Experiment (siehe 4.2.2.2):

Um eine Umorganisation des Golgi-Apparats zu erreichen, wurden Larven in HL3-Saline präpariert und die Körperwandpräparate für 10 min in einer 1: 100 Verdünnung der Brefeldin A-Stammlösung (Sigma, 3 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO)) in raumtemperierter HL3-Saline inkubiert. Das Kontrollpräparat wurde für 10 min in einer 1: 100 Verdünnung DMSO in HL3-Saline inkubiert. Anschließend wurden die Präparate kurz mit Ca^{2+} -freier Saline (RT) gewaschen und fixiert.

Cytochalasin D (siehe 4.3.2)

Um eine Destabilisierung von Actin zu erreichen, wurden Körperwandpräparate für 30 min in HL3 + 10 mM Cytochalasin D (Sigma; Stammlösung 50 mg/ 1 ml 1 N NaOH) inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit PFA fixiert.

3.4.2 Transfektion von COS Zellen und Immuncytochemie

Da im Rahmen dieser Arbeit keine Kultivierung von COS-Zellen erfolgte, soll hier lediglich die durchgeführte Transfektion und Immuncytochemie beschrieben werden. Die COS-Zellen wurden von Ina Forner (IfN, Magdeburg) zur Verfügung gestellt.

Hierfür wurden COS-Zellen in einer 24-well-Platte (Nunc) auf Deckgläschen (12 mm) in Kulturmedium (DMEM, 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) ausplattiert. Die Deckgläschen wurden zuvor über Nacht in 70-%igem Ethanol sterilisiert und anschließend abgeflammt. Nach 24 h in Kultur wurde die Transfektion mittels des liposomalen Transfektionsagens DAC-30TM (Eurogentec) durchgeführt. Nach einem Medienwechsel (500 µl/Vertiefung) wurden die Transfektionsansätze zusammenpipettiert (pro 400 µl DMEM 2 µg DAC-30TM und 1 µg pEGFP-DLG) und zur Entstehung des Liposom-DNA-Komplexes 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je 400 µl des Ansatzes wurden pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und nach 4-6 stündiger Inkubation durch einen Medienwechsel mit Kulturmedium entfernt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen auf Expression untersucht und fixiert. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von 400 µl 8-%igem Paraformaldehyd auf 400 µl Restmedium pro Vertiefung für 20 min. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in 3.4 beschrieben.

3.4.3 Dokumentation

Die Färbungen wurden entweder mittels einer CCD-Kamera (KAPPA) oder konfokaler Laserscan Mikroskopie (Leica) dokumentiert. Z-Serien wurden in der Regel in 0,5 µm Schritten aufgenommen. Die resultierenden Bilder wurden in Adobe Photoshop 5.5 weiterbearbeitet.

3.5 Fliegenarbeiten

3.5.1 Fliegenzucht

Die Fliegen wurden bei 18 °C oder 25 °C auf Maisgrießbrei (8 g Agar, 100 g Maisgrieß, 60 g Zuckerrübensirup, 15 g Trockenhefe, 5 ml Propionsäure, 0,3 % Nipagin ad 1000 ml H₂O) gehalten.

3.5.2 Keimbahntransformation von *Drosophila*

Transgene Fliegen wurden durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation erzeugt (Spradling, 1986). Hierzu wurden pUAST-Konstrukte mit dem Helferplasmid pΔ2-3 („Turbo“) im Verhältnis 300 ng: 100 ng/µl gemischt und in die Polregion von präblastodermalen *w¹¹¹⁸*-Embryonen mikroinjiziert (ca. 4 nl/Embryo). Die Integration des Konstrukts in das Fliegen genom wird durch die vom Helferplasmid kodierte Transposase katalysiert. Die resultierenden Fliegen wurden zur Selektion von Keimbahntransformanten

und zur Segregationsanalyse mit *w;Tft/CyO*- oder *w;TM3/TM6*- Fliegen gekreuzt. Transgene Fliegen konnten hiernach aufgrund des mit dem pUAST-Konstrukts verknüpften *w*-Minigens anhand der orange-gelben Augenfarbe identifiziert werden.

3.5.3 Das Gal4-UAS-Expressionssystem

Das Gal4-UAS-System dient der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression von Transgenen (Brand und Perrimon, 1993). Das jeweilige Zielgen steht dabei unter der Kontrolle cis-regulatorischer „upstream activating sequences“ (UAS), die den Transkriptionsaktivator Gal4 binden. Eine Vielzahl transgener *Drosophila*-Stämme, die Gal4 in unterschiedlichen Stadien und Geweben exprimieren, ist verfügbar. Werden derartige „Gal4-Treiberstämme“ gegen einen „UAS-Zielstamm“ gekreuzt, so folgt in der Nachkommenschaft die Expression des Zielgens der des Aktivators.

Verwendete Gal4-AktivatorStämme:

Aktivator-Stamm	Expression
T80	ubiquitär
C57	muskelspezifisch
BG487	Gradient von anterior nach posterior in den Muskeln 6/7, 12/13

4 Ergebnisse

Das *Drosophila*-MAGuK DLG ist an glutamatergen Nerv-Muskelsynapsen (Lahey *et al.*, 1994; Woods und Bryant, 1991) exprimiert. Im dritten Larvenstadium ist DLG nicht nur am subsynaptischen Retikulum der neuromuskulären Synapse angereichert, sondern befindet sich auch in Subkompartimenten der Muskelmembran und in einer netzwerkartigen Struktur im Cytoplasma des Muskels (Abb. 4-1). Neben der Lokalisation an der neuromuskulären Synapse wurde deshalb, im Gegensatz zu früheren Studien, ein besonderes Augenmerk auf die extrasynaptische Lokalisation gerichtet, da diese Verteilung Hinweise auf den Transportweg von DLG an die Synapse liefern könnte.

Die Analyse bekannter *dlg*-Allele lieferte erste Hinweise, welche Bereiche von DLG für eine synaptische Lokalisierung von Bedeutung sein könnten. Eine genaue Analyse ist jedoch nur durch Einführen von gezielten Mutationen möglich. Deshalb sollten in dieser Arbeit vor allem Bereiche, die sich bereits in Lokalisationsstudien in Epithelien als wichtig für den Transport von DLG herauskristallisierten (Hough *et al.*, 1997), näher charakterisiert werden.

Dieser Teil der Arbeit diente der Komplettierung der in Zusammenarbeit mit Ulrich Thomas und Vivian Budnik durchgeführten Lokalisationsstudie von DLG an der neuromuskulären Synapse (Thomas *et al.*, 2000).

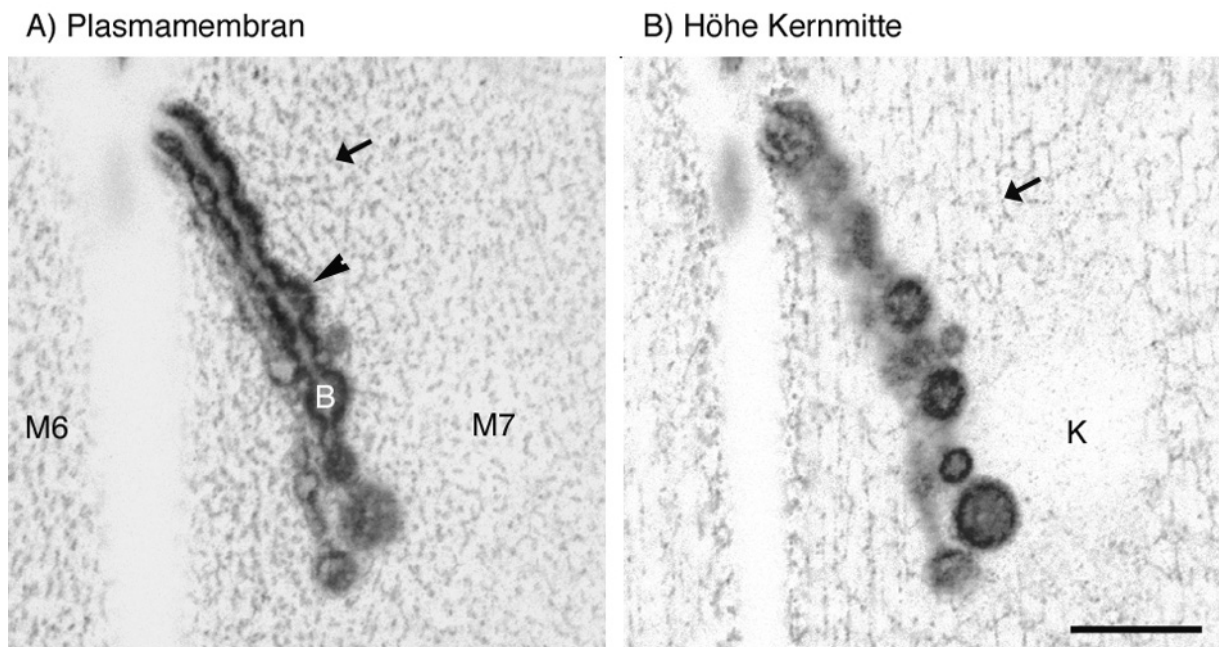


Abb. 4-1: Lokalisation von endogenem DLG in Kompartimenten des Muskels von Larven im dritten Stadium. A) Einzelne Konfokalbilder zeigen anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität an der Muskeloberfläche der Muskel (M) 6 und 7, sowie an Subkompartimenten der Innenseite der Plasmamembran (Pfeil) und am SSR (Pfeilspitze). B) Auf Höhe der Zellkerne (d. h. ca. 5 - 6 μm unterhalb der Plasmamembran) ist diese über ein subzelluläres Netzwerk (Pfeil) verteilt. M = Muskel, B = Bouton, K = Zellkern, Maßstab = 10 μm .

4.1 Analyse der Funktion von Domänen und Teilbereichen von DLG-A

4.1.1 Erzeugung von Deletionen und Punktmutationen

Um die Domänen, die am Transport zur Synapse und der dortigen Verankerung des Proteins beteiligt sind, zu charakterisieren, wurden für die Lokalisation und Funktion von DLG-A an der neuromuskulären Synapse potentiell bedeutsame Abschnitte deletiert bzw. punktmutiert (Abb. 4-2). Hierzu wurde die unter 3.1.8 beschriebene ExSite-PCR-Mutagenese verwendet, wobei eine *dlg*-cDNA (Hough *et al.*, 1997) mit der kompletten kodierenden Region als Ausgangspunkt diente. Um in immunhistochemischen Untersuchungen eine Unterscheidung zwischen endogenem und transgenem DLG zu ermöglichen, wurden in Anlehnung an Hough *et al.* (Hough *et al.*, 1997) die letzten 40 Aminosäuren durch das Flag-Epitop ersetzt (siehe 3.1.9). Deshalb wurde zu Beginn der Studie die korrekte Lokalisation von DLG-Flag in allen Kompartimenten durch Vergleich der DLG-Immunreaktivität von endogenem DLG und von überexprimiertem DLG-Flag sichergestellt. Als weitere Kontrolle diente die synaptische Lokalisation des C-terminal verkürzten Genprodukts des hypomorphen Allels *dlg*^{1P20}, dem ebenso wie DLG-Flag die letzten 40 Aminosäuren fehlen (Thomas *et al.*, 2000).

Im Verlauf der Studie stellte sich heraus, dass die letzten 40 Aminosäuren von PSD-95 und SAP97 für bestimmte Interaktionen von Bedeutung sind (McGee und Bredt, 1999; Wu *et al.*, 2000). Deshalb wurde bei der Herstellung der Deletion (Δ) des N-Terminus (Δ N) auf das Einfügen des Flag-Epitops verzichtet. Das Konstrukt mit Punktmutationen in der GuK-Domäne (GuK_{PM}) wurde am N-Terminus mit EGFP (enhanced green fluorescent protein) markiert. Als Kontrolle diente hier EGFP-DLG (Koh *et al.*, 1999).

Sämtliche Konstrukte wurden einer Überprüfung durch Sequenzierung (siehe Anhang) und Restriktionskartierung unterzogen. Die Motivation, die zur Deletion bzw. Punktmutation bestimmter Abschnitte führte, wird in den jeweiligen Abschnitten des Ergebnisteils erläutert. Im Einzelnen wurden als Ergänzung zu bereits vorhandenen Varianten (Hough *et al.*, 1997) im Rahmen dieser Arbeit folgende Mutationen *in vitro* erzeugt:

1. Δ N: (R4 - L37)
2. Δ Hook: (R668 - L765)
3. Δ E-F: (E667 - F679)
4. Δ I3: (S693 - E725)
5. GuK_{PM}: (Y816W; E836W; Y845S)

Δ = Deletion; Nummerierung entsprechend (Woods und Bryant, 1991; Hough *et al.*, 1997)

Um konservierte „targeting“ Mechanismen zu untersuchen, wurden folgende von Craig Garner (Wu *et al.*, 1998) zur Verfügung gestellten EGFP-SAP97-Konstrukte in den Vektor pUAST kloniert:

1. N-PDZ1/2: (M1 - G232)
2. Δ PDZ1+2: (G186 - G369)
3. Δ I3: (D635 - T683)

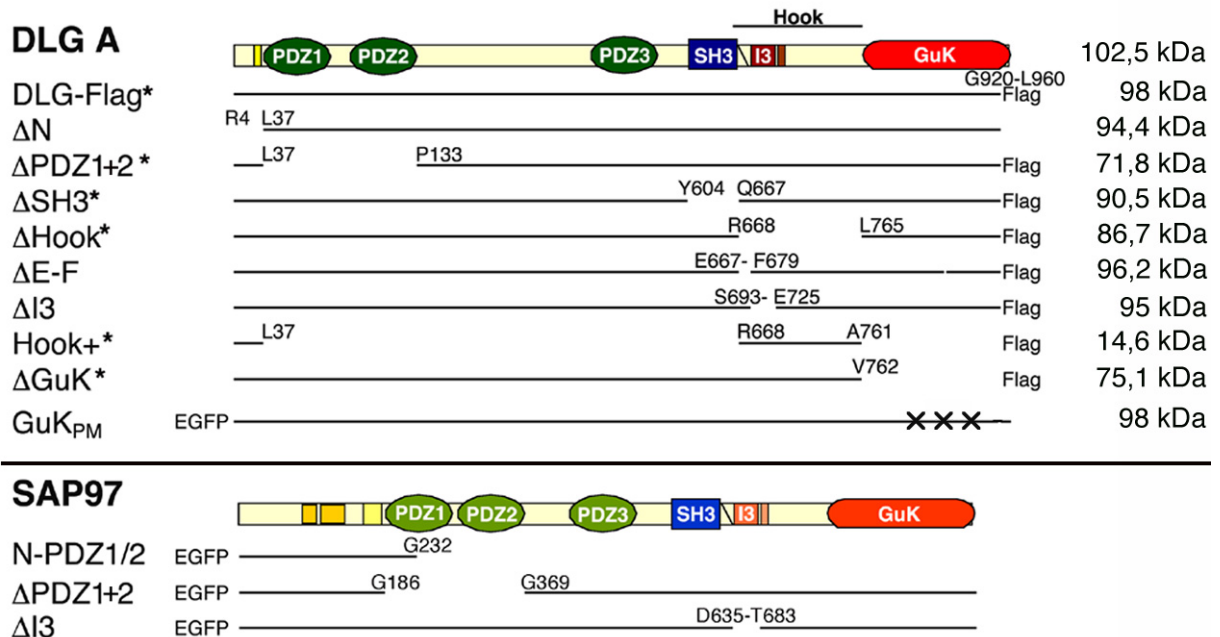


Abb. 4-2: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte. Die Domänenstruktur von DLG-A und SAP97 ist anhand der farbigen Schemata dargestellt. Schwarze Linien repräsentieren die einzelnen Konstrukte, die Deletionen umschließende Aminosäuren und die berechneten Molekulargewichte der DLG-Deletionskonstrukte sind angegeben. Die mit „*“ markierten Deletionskonstrukte bzw. transgenen Fliegenstämme wurden von Dan Woods und Peter Bryant zur Verfügung gestellt.

Um eine räumlich und zeitlich kontrollierbare Expression zu ermöglichen, wurden die mutierten cDNA-Derivate in den P-Element-Vektor pUAST subkloniert, und um eine Keimbahn-Transformation zu erreichen, in präblastodermale Embryonen mikroinjiziert (siehe 3.5.2). Die gezielte Expression in Fliegen wurde durch das von Brand und Perrimon (1993) beschriebene UAS-Gal4-System ermöglicht (siehe 3.5.3). Hierfür werden zwei verschiedene Fliegenstämme, ein Aktivator- und ein Effektorstamm, benötigt. Der Aktivatorstamm trägt das ursprünglich aus der Hefe stammende Gen für den Transkriptionsfaktor Gal4, der Effektorstamm, z. B. einer der hier erzeugten transgenen Stämme, enthält das für die ektopische Expression vorgesehene Gen, welches durch die vorgeschaltete UAS-Sequenz zum Zielgen für Gal4 wird. Nach Kreuzung des Effektorstamms gegen Fliegen eines Aktivatorstamms wird das transgene Produkt in der Nachkommenschaft in bestimmten Geweben exprimiert. Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Aktivatorstämme und deren Expressionsmuster sind in Abschnitt 3.5.3 aufgelistet.

4.1.2 Erzeugung von transgenen Fliegen und Nachweis der Expression

Aus der Mikroinjektion von Embryonen des weißäugigen Stammes *w¹¹¹⁸* mit den oben aufgeführten pUAST-Konstrukten gingen 2 bis 30 unabhängige Transformanten pro Konstrukt hervor (siehe 3.5.2). Für jedes Konstrukt wurden mindestens zwei unabhängige transgene Stämme etabliert. Die transgenen Konstrukte wurden mittels des muskel-spezifischen Gal4-Aktivatorstamms C57 exprimiert und die Expression durch Western-Blot-Analyse von larvalen Körperwandhomogenaten (siehe 3.2.2) sichergestellt.

Die mit Flag markierten DLG-Varianten wurden sowohl mit anti-Flag- als auch zum Teil mit anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern nachgewiesen (Abb. 4-3A/B). ΔN und endogenes DLG (WT) wurden nur mit anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern nachgewiesen. Die anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität zeigte, dass endogenes DLG und die transgen exprimierten Varianten vergleichbare Expressionsmengen aufwiesen. Die detektierten Banden liefen wie endogenes DLG bzw. überexprimiertes DLG stets etwas oberhalb des berechneten Molekulargewichts (siehe Abb. 4-2). Zudem entsprach das Molekulargewicht von DLG-Flag der größeren der beiden charakteristischen Banden des endogenen DLGs (116 kDa und 97 kDa). Der Nachweis der mit EGFP fusionierten Konstrukte erfolgte mit anti-GFP-Antikörpern (Abb. 4-3C/D). EGFP-GuK_{PM} zeigte, wie erwartet, das gleiche Molekulargewicht und ähnliche Expressionsmengen wie das exprimierte Kontrollkonstrukt, EGFP-DLG (Koh *et al.*, 1999) (Abb. 4-3C). Die Expression von EGFP-SAP97 und der SAP97-Deletionskonstrukte konnte ebenfalls in Körperwandhomogenaten nachgewiesen werden. Die detektierten Banden entsprachen den bereits publizierten Molekulargewichten nach Expression in Zellkultur (Wu *et al.*, 1998) (Abb. 4-3D).

Weitere Analysen wurden an je ein bis zwei repräsentativen transgenen Linien durchgeführt. Für die Expression der transgenen Konstrukte wurde in der Regel der muskelspezifische Gal4-Aktivator C57 verwendet (siehe 3.5.3). Die Konstrukte wurden sowohl im wild-typischen (*dlg⁺*)-Hintergrund als auch, um einen Einfluß von endogenem DLG zu testen, im *dlg*-mutanten Hintergrund (*dlg^{XI-2}/dlg⁻*) exprimiert.

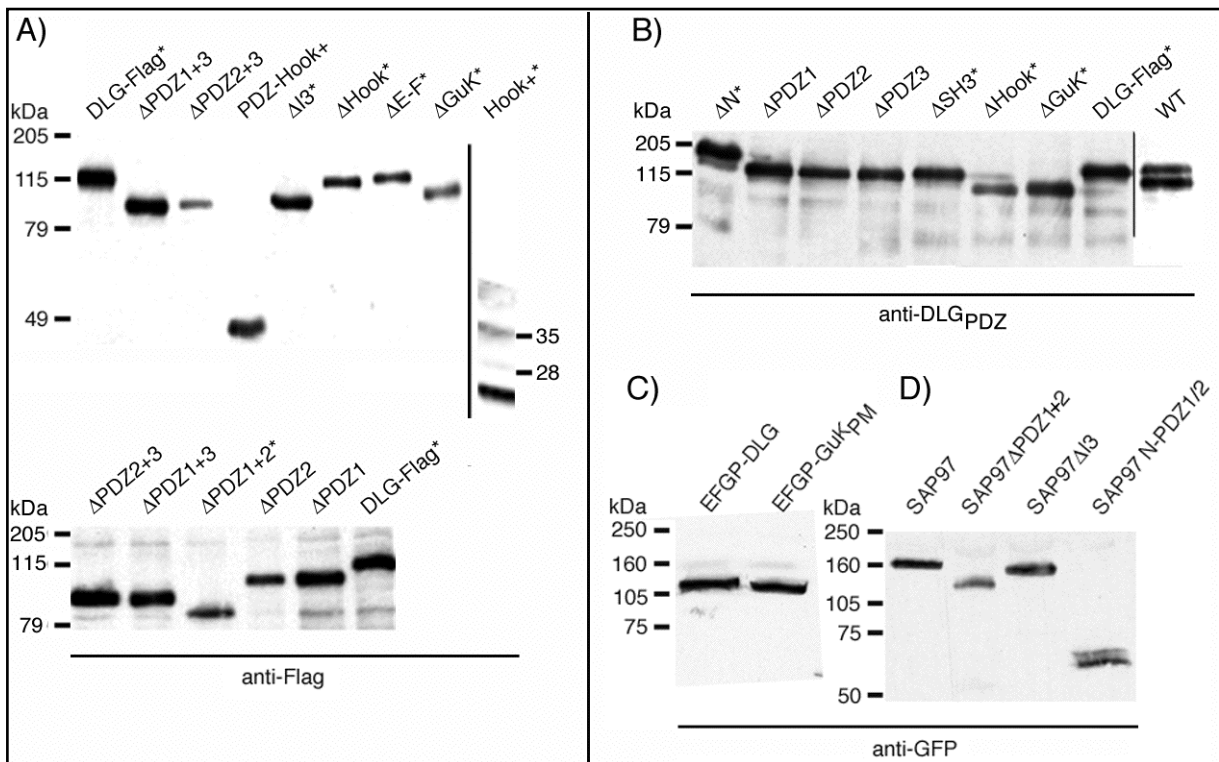


Abb. 4-3: Nachweis der *in vivo*-Expression der Konstrukte durch Western-Blot-Analyse von Körperwandhomogenaten aus Larven im dritten Stadium. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind mit „*“ gekennzeichnet (A/B). A) Nachweis der mit dem Flag-Epitop markierten DLG-Konstrukte durch anti-Flag-Antikörper. B) Nachweis von ΔN und Vergleich der Expression mit endogenem DLG (WT) durch anti-DLG_{PDZ}-Antikörper. C) Nachweis der Expression von EGFP-GuK_{PM} im Vergleich zu EGFP-DLG. D) Nachweis von EGFP-SAP97 und von SAP97-Deletionskonstrukten durch anti-GFP-Antikörper.

4.1.3 Deletion des N-Terminus

Die N-terminale Region (vor PDZ1) ist zwischen DLG-A und den DLG-artigen Familienmitgliedern in Säugern nur wenig konserviert. Den N-Termini der Vertebratenhomologe SAP97/hDLG und PSD95 wird jedoch eine wichtige Rolle beim Transport an epitheliale Zell-Zell-Kontakte bzw. an die Synapse und bei der dortigen Vernetzung der Moleküle untereinander zugeschrieben (El-Husseini *et al.*, 2000; Hsueh und Sheng, 1999; Marfatia *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1998).

Deshalb sollte durch Deletion des im Vergleich zu anderen MAGuKs relativ kurzen N-Terminus von DLG-A überprüft werden, ob dieser von ähnlicher Bedeutung ist. Jedoch soll bereits an dieser Stelle auf weitere, durch alternatives Spleißen entstehende Varianten des N-Terminus von DLG hingewiesen werden (siehe Abschnitt 4.5).

Um die Lokalisierung des nicht mit Flag markierten ΔN s zu untersuchen, wurden ΔN und DLG-Flag im *dlg*^{XI-2}-Hintergrund exprimiert. Dieses Allel führt durch einen Spleißdefekt zu einem Genprodukt ohne GuK-Domäne (Woods *et al.*, 1996), das demzufolge nicht durch anti-DLG_{GuK}-Antikörper erkannt wird (Abb. 4-4A). Somit wurden durch anti-DLG_{GuK}-Antikörper ausschließlich die im Muskel überexprimierten Varianten nachgewiesen. Die Deletion des

DLG-N-Terminus (Abb. 4-4D) hatte im Vergleich zu Wildtyp und DLG-Flag weder Einfluß auf die synaptische Lokalisation noch auf die Lokalisierung in Subkompartimente des Muskels (Abb. 4-4B/C).

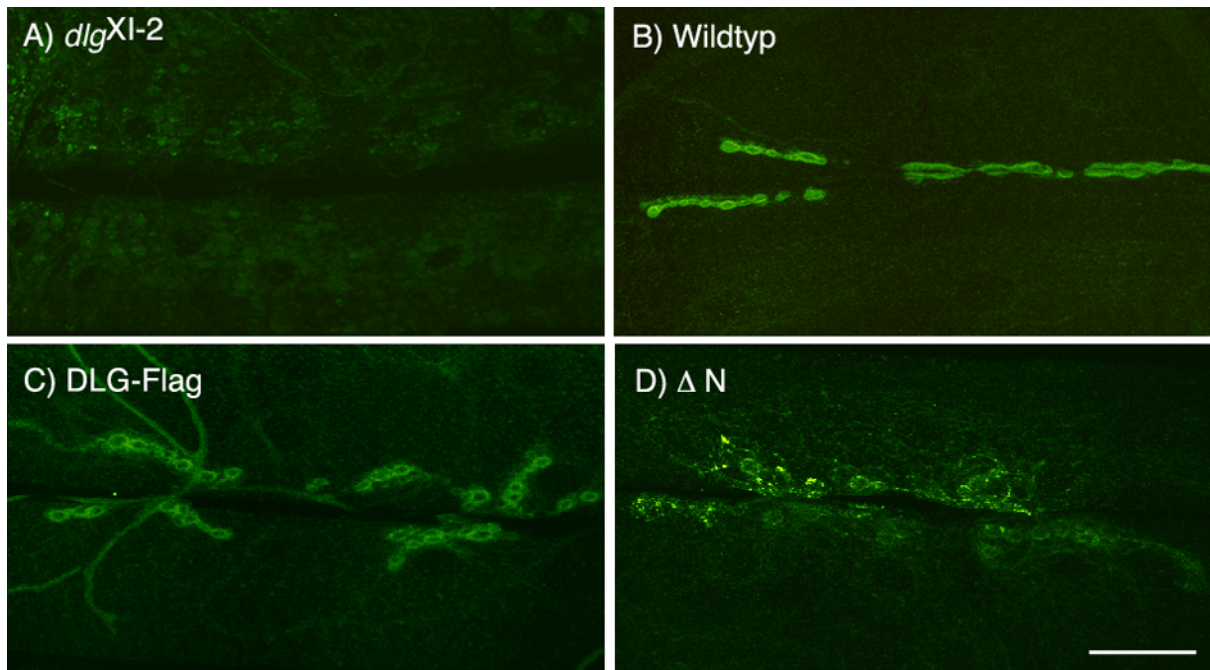


Abb. 4-4: Lokalisation der ΔN -Variante in Körperwandpräparaten. Gezeigt werden Projektionen von konfokalen Aufnahmen der neuromuskulären Synapse von Muskel 6/7 des Segments A3. A) In dlg^{XI-2} Mutanten zeigt die lediglich unspezifische anti-DLG_{GuK}-Immunreaktivität im Muskel. B-D) Die anti-DLG_{GuK}-Immunreaktivität zeigt keinen qualitativen Unterschied der synaptischen und extrasynaptischen Lokalisation von endogenem DLG (B) und von im dlg^- -Hintergrund exprimiertem DLG-Flag (C) und ΔN (D). Maßstab = 16 μm .

4.1.4 Deletion der PDZ-Domänen

Die Deletion von einzelnen PDZ-Domänen oder von PDZ2+3 oder PDZ1+3 in Kombination hatte keinen Effekt auf die Lokalisation von DLG (Thomas *et al.*, 2000). Wurden jedoch die ersten beiden PDZ-Domänen deletiert, zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine schwächere Lokalisation von Immunreaktivität im subzellulären Netzwerk (Abb. 4-5A'/B'). $\Delta PDZ1+2$ befand sich nicht in den feinverteilten Subkompartimenten der Plasmamembran, sondern akkumulierte zu Aggregaten unterhalb der Plasmamembran. Diese Cluster wurden auch an der Synapse beobachtet (Abb. 4-5A).

Nach Expression von EGFP-SAP97- $\Delta PDZ1+2$ im Muskel zeigten sich ebenfalls aggregatartige Strukturen unterhalb der Plasmamembran und an synaptischen Boutons, die nach Expression von EGFP-SAP97 nicht auftraten (Abb. 4-5C/D). Diese Aggregate waren, deutlicher als bei DLG- $\Delta PDZ1+2$, im Cytoplasma des Muskels verteilt (Abb. 4-5C'). Im Unterschied zu DLG- $\Delta PDZ1+2$ lokalisierte SAP97- $\Delta PDZ1+2$ in den Muskelkernen, jedoch nicht im sub-

zellulärem Netzwerk (Abb. 4-5C'). Zudem zeigte sich neben den synaptischen Clustern eine gleichmäßig über die Boutons verteilte Fluoreszenz (Abb. 4-5C).

Demnach kann sowohl DLG als auch das Vertebratenhomologe SAP97 ohne die ersten beiden PDZ-Domänen an die Plasmamembran und an synaptische Boutons transportiert werden. Die ersten beiden PDZ-Domänen werden jedoch für die Feinverteilung an der Synapse und in die Subkompartimente der Plasmamembran benötigt.

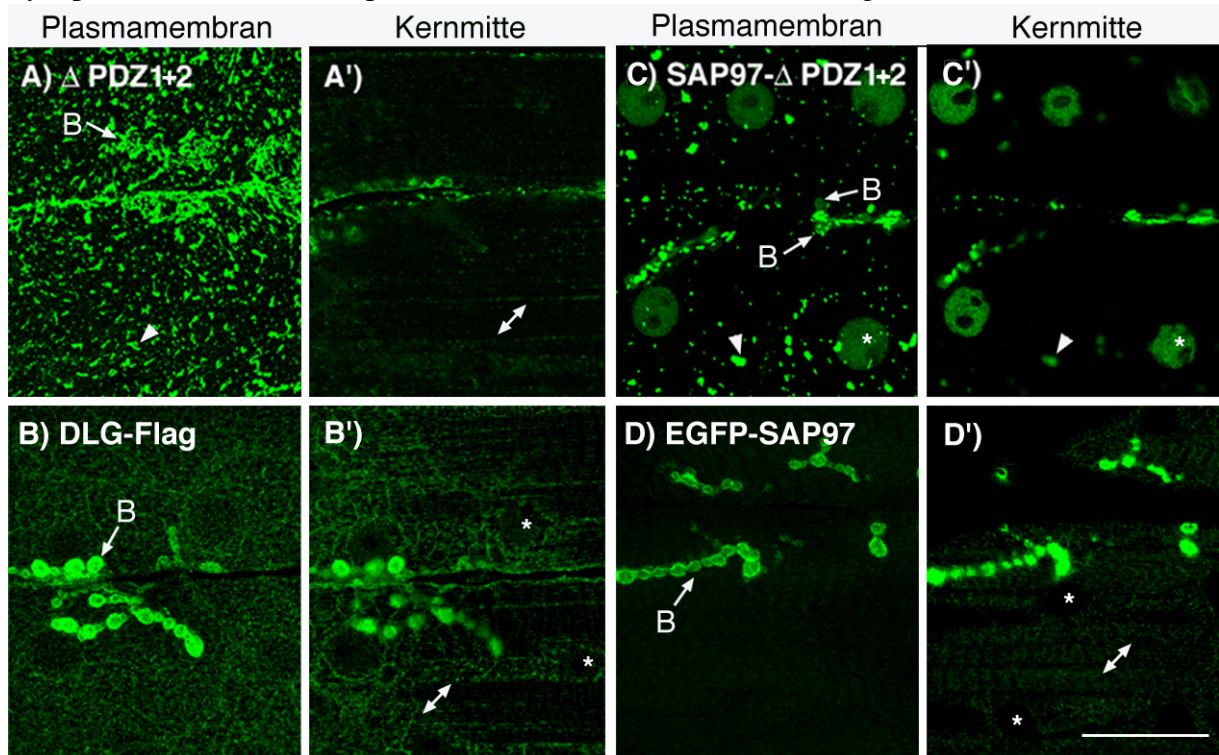


Abb. 4-5: Lokalisierung der Δ PDZ1+2-Konstrukte. Die einzelnen Konfokalbilder wurden auf Höhe der Plasmamembran (A/B/C/D) und der Kernmitte (A'/B'/C'/D') aufgenommen. Beispielfhaft sind einige Zellkerne mit „*“ markiert. A/B) Anti-Flag-Immunreaktivität nach Expression von Δ PDZ1+2 und DLG-Flag. C/D) EGFP-Fluoreszenz nach Expression von EGFP-SAP97- Δ PDZ1+2 und EGFP-SAP97. Nach Deletion von PDZ1+2 bilden sich Aggregate (s) unterhalb der Plasmamembran (A, C), im Cytosol (C') und an Boutons (B'), wobei SAP97- Δ PDZ1+2 auch gleichmäßiger verteilt wird (A/C). Im Vergleich zu DLG-Flag und EGFP-SAP97 (B'/D') ist weniger DLG- Δ PDZ1-2 im subzellulären Netzwerk (\diamond) lokalisiert (A') und SAP97- Δ PDZ1-2 war nicht nachweisbar (D'). Maßstab = 10 μ m.

4.1.5 Deletionen im Bereich der Hook-Region

Die sogenannte Hook-Region zwischen der SH3- und GuK-Domäne ist zwischen den MAGuKs nur zum Teil konserviert. In Epithelien erwies sich diese Region als essentiell für die Lokalisierung von DLG an den sogenannten „septate junctions“ (Hough *et al.*, 1997). Um die Funktion dieses Bereichs am synaptischen Transport bzw. der Lokalisation von DLG an der neuromuskulären Synapse genauer zu charakterisieren, wurde der Bereich als Ganzes sowie zwei weitere, höher konservierte Teilbereiche einzeln deletiert. Durch Δ E-F im N-terminalen Bereich der Hook-Region wird eine bei allen MAGuKs konservierte mutmaßliche

α -helicale Calmodulin-Bindungsstelle deletiert (Masuko *et al.*, 1999). Der zweite Teilbereich, I3, ist nur zwischen DLG, SAP97/hDLG und Chapsyn-110/PSD-93 konserviert. In den Vertebratenhomologen wird I3 von einem alternativ gespleißten Exon kodiert und ist Bindungsstelle für das Cytoskelettprotein Band 4.1.

Überraschenderweise hatte die Deletion von lediglich 13 Aminosäuren, $\Delta E-F$, im Vergleich zu $\Delta Hook$ an der Synapse einen stärkeren Effekt: An der Plasmamembran und der Synapse wurden im Vergleich zu DLG-Flag nur geringe Mengen beider DLG-Varianten nachgewiesen (Abb. 4-6A/B), wobei $\Delta E-F$ im Vergleich zu $\Delta Hook$ in viel geringerem Maße an der Synapse lokalisiert wurde (Abb. 4-6B). Die anti-Flag-Immunreaktivität beider Varianten befand sich zudem unabhängig davon, ob im dlg^+ - oder dlg^{XI-2} -Hintergrund exprimiert wurde, in den Muskelkernen und diffus im Cytoplasma verteilt (Abb. 4-6A'/B').

Die Expression von $\Delta I3$ führte ähnlich wie $\Delta E-F$ zu einer Verteilung des Proteins im Cytoplasma, die sich jedoch vor allem flächig zwischen den Muskelkernen ausbreitete (Abb. 4-6C, siehe auch 4.2.1.2). Die Markierung dieses Areals mit den unter 4.4.1 beschriebenen Markern weisen auf eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum hin. In den Muskelkernen selbst konnte keine anti-Flag-Immunreaktivität nachgewiesen werden. Im dlg^+ -Hintergrund war die synaptische Lokalisation im Vergleich zu DLG-Flag relativ schwach (Abb. 4-6C). Das Verhältnis von cytoplasmatisch zu synaptisch lokalisiertem $\Delta I3$ verschob sich im dlg^{XI-2} -Hintergrund deutlich zur synaptischen Lokalisation hin (Abb. 4-6C'). Um auszuschließen, dass dieser Effekt aufgrund von unterschiedlichen Expressionsmengen in beiden genetischen Hintergründen auftrat, wurde die exprimierte Proteinmenge durch Aufzucht der Larven bei 18°C und 25°C überprüft. Der Effekt konnte sowohl bei geringeren Expressionsmengen (18°C) als auch unter Standardbedingungen beobachtet werden (Daten sind nicht gezeigt). Die Deletion der I3-Domäne des Vertebratenhomologen, EGFP-SAP97- $\Delta I3$, führte ebenfalls zu einer diffusen Verteilung des Proteins im Muskel (Abb. 4-6D). Im Gegensatz zu DLG- $\Delta I3$ wurde es aber unabhängig von endogenem DLG effektiv an die Synapse transportiert (Abb. 4-6D'/D'').

Die Deletion der gesamten Hook-Region sowie einzelner Teilbereiche führten zu unterschiedlichen Expressionsmustern. An dieser Stelle sei auf einen Erklärungsansatz anhand eines Strukturmodells von SAP97 in der Diskussion hingewiesen werden (5.5).

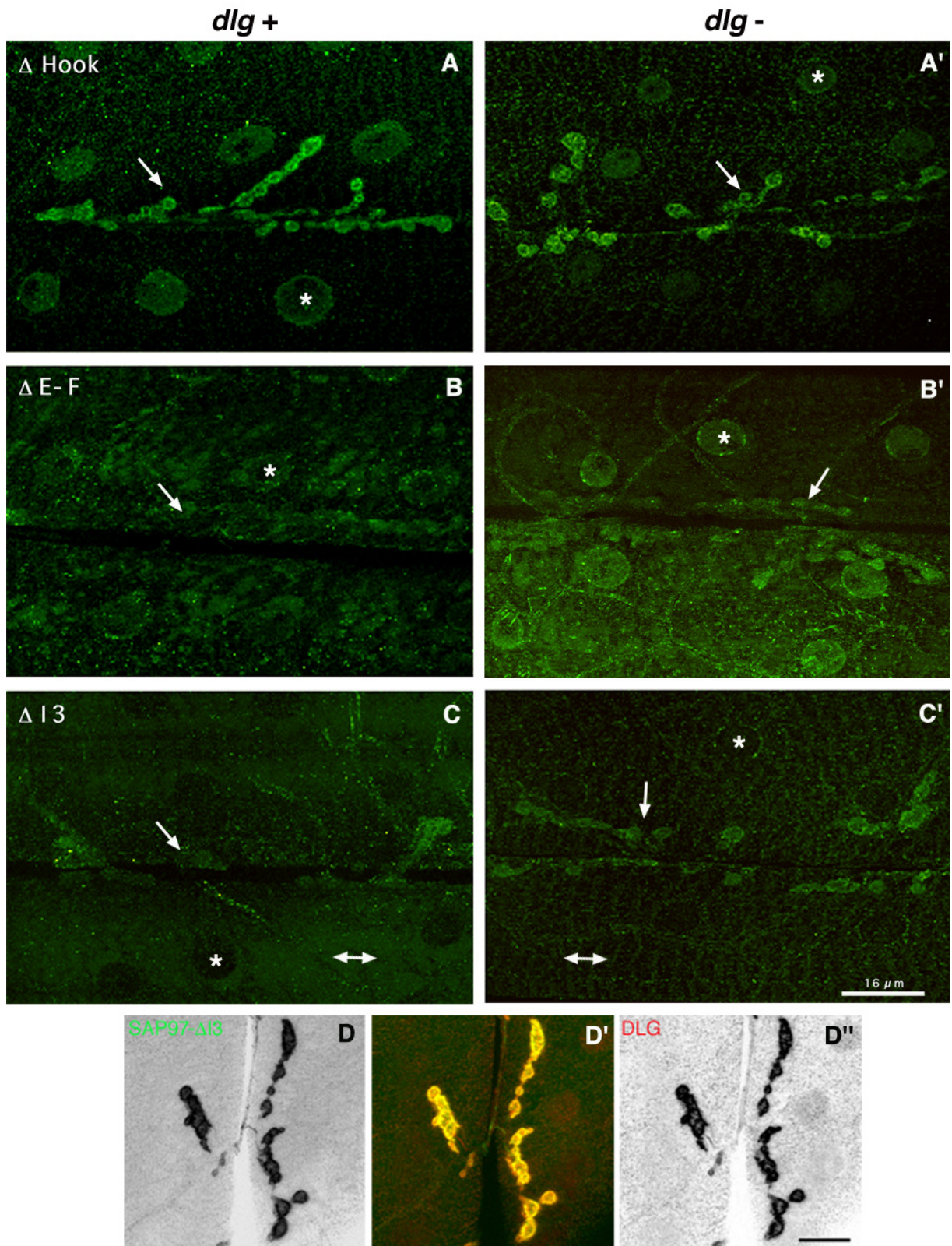


Abb. 4-6: Lokalisation der Δ Hook-, Δ E-F- und Δ I3-Konstrukte. Konfokale Projektionen repräsentieren die anti-Flag-Immunreaktivität in Körperwandpräparaten von Larven im dritten Stadium im dlg^+ - (A-C) oder dlg^- -Hintergrund (A'-C'). Besonders hervorzuheben ist die Anreicherung von Δ I3 im Cytoplasma im dlg^+ -Hintergrund (\diamond) und die vermehrte synaptische Lokalisation von Δ I3 im dlg^- -Hintergrund. „*“= Zellkern, \rightarrow neuromuskuläre Synapse. Maßstab = 16 μ m. D) Die EGFP-Fluoreszenz ist nach Expression von SAP97- Δ I3 im Muskel diffus verteilt, SAP97- Δ I3 wird, im Gegensatz zu DLG- Δ I3 (C), auch im dlg^+ -Hintergrund vergleichbar effektiv wie endogenes DLG (D'') an der Synapse lokalisiert. Maßstab = 10 μ m.

4.1.6 Deletion und Punktmutation in der GuK-Domäne

Die GuK-Domäne der MAGuKs besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu Guanylatkinasen. Mit Ausnahme des MAGuKs p55 konnte eine enzymatische Funktion jedoch nicht nachgewiesen werden (Marfatia *et al.*, 1995). Dennoch ist die GMP-Bindungsstelle der DLG-artigen MAGuKs hochkonserviert (Kistner *et al.*, 1995; Kuhlendahl *et al.*, 1998). Zudem ist die GuK-Domäne Bindungspartner für zahlreiche Motorproteine und Cytoskelett-assoziiierter Proteine (Übersicht in Tomita *et al.*, 2001; Ziv und Garner, 2001).

Die Funktion der GuK-Domäne sollte deshalb durch Deletion der gesamten Domäne und durch Einführen von Punktmutationen, die die GMP-Bindung sterisch verhindern sollen ohne die Gesamtstruktur zu verändern, untersucht werden. Diese Punktmutationen wurden anhand eines Modells der GuK-Domäne ausgewählt (erstellt von Carsten Reissner, IfN Magdeburg), das durch spätere Publikationen der Röntgenstruktur bestätigt wurde (McGee *et al.*, 2001b).

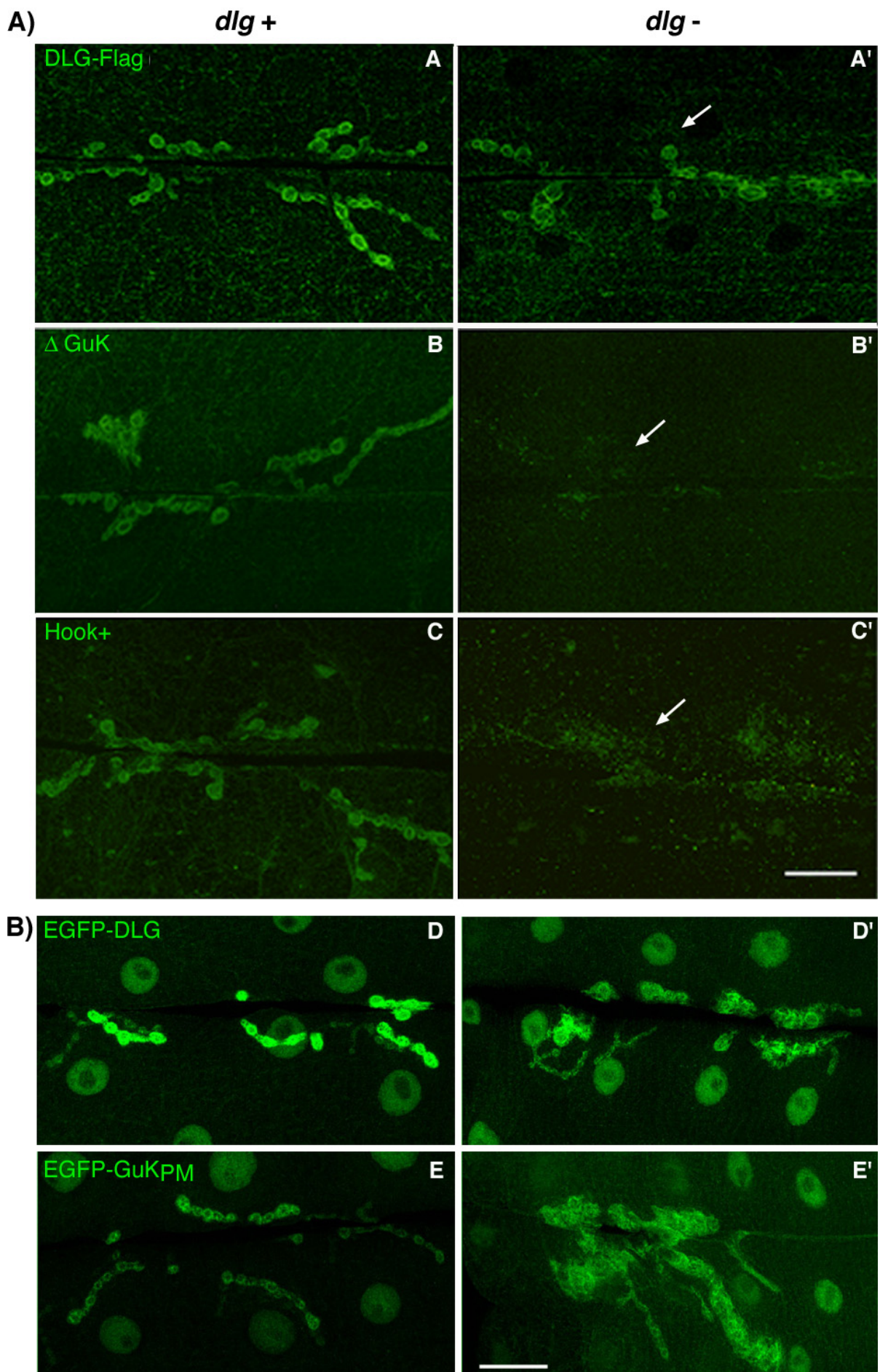
Die sterische Verhinderung der GMP-Bindung sollte durch gezielte Punktmutation zweier an der Phosphatbindung beteiligter Tyrosinreste und durch Einführen von Tryptophan in die GMP-Bindungstasche bewerkstelligt werden.

Wurden Δ GuK und DLG-Flag im Wildtyp-Hintergrund mittels C57 exprimiert, konnte kein Unterschied zur Lokalisation von DLG-Flag festgestellt werden (Abb. 4-7B). In Abwesenheit von endogenem DLG hingegen wurde Δ GuK nicht oder nur in sehr geringen Mengen an die Synapse transportiert (B'). Diese Abhängigkeit des Transports von endogenem DLG konnte bei einem weiteren Konstrukt, das lediglich den N-Terminus und die Hook-Region enthielt (Hook+), beobachtet werden (Abb.4-7C/C'). Die Expression von EGFP-GuK_{PM} im Muskel zeigte, dass die mutmaßliche Verhinderung der GMP-Bindung sowohl im dlg^+ - als auch dlg^- -Hintergrund im Vergleich zu EGFP-DLG keinen Effekt auf die synaptische Lokalisation hatte (Abb. 4-7D/E).

Ob die Abhängigkeit der synaptischen Lokalisation der DLG-Varianten ohne GuK-Domäne von endogenem DLG auf einer möglichen Interaktion während des Transports an die Synapse beruht, wird in Kapitel 4.3.3.1 näher untersucht.

Abbildung S. 34

Abb. 4-7: Lokalisation der Δ GuK- und EGFP-GuK_{PM}-Konstrukte. Konfokale Projektionen repräsentieren die anti-Flag-Immunreaktivität nach Expression in Körperwandpräparaten von Larven im dritten Stadium im dlg^+ - (links) und dlg^- -Hintergrund (rechts). A-C) Die synaptische Lokalisation von Konstrukten ohne GuK-Domäne ist, im Gegensatz zur Lokalisation von DLG-Flag, von endogenem DLG abhängig. (Vergleiche A'/B'/C'). E/E') Lokalisierung von EGFP-GuK_{PM} im Vergleich zu EGFP-DLG (D/D'). Maßstab = 10 μ m.



4.1.7 Rettung des *dlg*-Tumorphänotyps

Mutationen im *dlg*-Gen führen zu einem teilweisen Verlust der Zellpolarität in epithelialen Geweben und zur Bildung von Tumoren (Woods *et al.*, 1996). Tiere, die homo- bzw. hemizygot bezüglich der *dlg*^{XI-2}-, *dlg*^{m52}- oder *dlg*^{m30}-Mutation sind, entwickeln während der Larvenstadien Neoplasien in den Imaginalscheiben-Epithelien. Diese Larven entwickeln sich bis zum dritten Stadium, können sich aber nicht mehr verpuppen oder bilden lediglich eine Präpuppe. Das Allel *dlg*^{m52} kodiert für ein stark verkürztes Protein, das nur die ersten beiden PDZ-Domänen enthält, in dem von *dlg*^{m30} kodierten Protein führt eine Punktmutation in der SH3-Domäne vermutlich zu einer Zerstörung der Domänenstruktur. In *dlg*^{XI-2}-Mutanten führt ein Spleißdefekt zur Expression eines trunkeierten Proteins ohne GuK-Domäne und einer verkürzten Hook-Region (Woods und Bryant, 1991).

Da die verschiedenen *dlg*-Mutationen in der Regel zu Deletionen führen, die über größere Bereiche als nur einzelne Domänen hinausgehen, sollte die Bedeutung bestimmter Domänen an der tumorsuppressiven Wirkung durch Expression der gezielt mutierten DLG-Varianten genauer analysiert werden (Tab. 4-1).

Um zu testen, welche Bereiche von DLG-A den Tumorphänotyp von *dlg*-Allelen retten können, wurden die Deletionskonstrukte mit Hilfe des ubiquitär exprimierten Gal4-Aktivators „T80“ in allen Geweben exprimiert. Die Koppelung der Allele mit den genetischen Markern *yellow* (*y*) und *singed* (*sn*) ermöglichte die zweifelsfreie Identifizierung der geretteten Tiere.

Die Rettung des Tumorphänotyps der untersuchten Allele wurde sowohl durch die Expression der Kontrollkonstrukte EGFP-DLG und DLG-Flag, als auch durch ΔN , ΔGuK und EGFP-GuK_{PM} erreicht. Die Deletion einzelner PDZ-Domänen hatte keinen Einfluß auf die Tumorsuppression (Hough *et al.*, 1997). Wurden jedoch PDZ1 und PDZ2 in Kombination deletiert, konnte keines der *dlg*-Allele gerettet werden. Obwohl $\Delta SH3$ an den „septate junctions“ und der neuromuskulären Synapse lokalisiert wird, führte die Expression dieses Konstrukts zu keiner Unterdrückung der Tumorbildung. Als ebenso essentiell erwiesen sich die Hook-Region und deren N-terminaler Teilbereich „E-F“. Die Expression von $\Delta I3$ ermöglichte die Rettung des durch *dlg*^{m30} verursachten Tumorphänotyps. Das stärkere *dlg*-Allel XI-2 konnte jedoch nur teilweise gerettet werden, d. h. die Larven konnten sich bis zum pupalen Stadium entwickeln, überlebende adulte Tiere konnten jedoch nicht beobachtet werden. Demnach lassen sich die Domänen in zwei Kategorien einteilen: Für die Tumorunterdrückung entbehrliche Domänen, wie der N-Terminus, einzelne PDZ-Domänen sowie die GuK-Domäne, unabhängig von der GMP-Bindung, und essentielle Domänen wie die SH3-Domäne und die Hook-Region.

Konstrukt	<i>dlg</i> ^{m52}	<i>dlg</i> ^{XI-2}	<i>dlg</i> ^{m30}
EGFP-DLG x T80	+	nicht untersucht	+
DLG-Flag x T80	nicht untersucht	+	+
Δ N x T80	nicht untersucht	+	+
Δ PDZ1+2 x T80	- *	-	-
Δ SH3 x T80	-*	-	-
Δ Hook x T80	-*	-	-
Δ I3 x T80	nicht untersucht	- (bis Puppe)	+
Δ E-F x T80	nicht untersucht	-	-
Δ GuK x T80	+*	-	-
EGFP-GuK _{PM} x T80	+	nicht untersucht	+

Tabelle 4-1: Tabellarische Übersicht der zur Untersuchung der Tumorrettung eingesetzten *dlg*-Allele und der jeweils exprimierten Konstrukte. „+“ symbolisiert die erfolgreiche Tumorrettung, „-“ das Absterben der Larven im 3. Stadium. Die mit „*“ gekennzeichneten Ergebnisse wurden von Hough *et al.*, (1997) erbracht.

4.2 Immunhistochemische Charakterisierung des Cytoskeletts und intrazellulärer Kompartimente der larvalen Körperwandmuskulatur

Die in 4.1 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass DLG nicht nur am subsynaptischen Retikulum der neuromuskulären Synapse, sondern auch in subzellulären Kompartimenten im Muskel und in Subdomänen der Plasmamembran lokalisiert ist. Das Gruppieren von Ionenkanälen und deren Verknüpfung mit dem Cytoskelett am Zielort, der Synapse, durch MAGuKs und deren Bindungspartner ist sehr gut untersucht. An welchem Kompartiment die verschiedenen Bindungspartner jedoch zusammentreffen, und wie der Transport an die Synapse gewährleistet wird, wird erst zur Zeit intensiv untersucht (Bresler *et al.*, 2001; Okabe *et al.*, 2001).

Da über die Verteilung der subzellulären Kompartimente wie endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi-Apparat und des Cytoskeletts im *Drosophila*-Larvenmuskel nur wenig bekannt war, sollte durch Immunhistochemie ein Beitrag zur Charakterisierung dieser Elemente geleistet werden. Dies ist notwendig, um die subzelluläre Lokalisierung von DLG und von mutierten DLG-Varianten im Muskel einordnen zu können und den Transportweg von DLG zur Synapse genauer beschreiben zu können.

4.2.1 Charakterisierung der Verteilung des endoplasmatischen Retikulums

Das ER ist ein kontinuierliches System intrazellulärer Membranen, das in Subdomänen mit spezialisierten Funktionen unterteilt ist. Deshalb wurde die Verteilung des ERs mit unter

schiedlichen Markern untersucht. Die weitverbreitete Verteilung von DLG in subzellulären Strukturen des Muskels legte eine Lokalisierung an der cytoplasmatischen Seite von Subkompartimenten des ERs nahe. Diese Vermutung wurde durch immunhistochemische Kolokalisationsstudien und biochemische Ansätze überprüft.

4.2.1.1 Markierung mit Antikörpern gegen das KDEL-Antigen und Hinweise auf eine Lokalisation von DLG im ER

Für die Charakterisierung des ERs des Larvenmuskels wurde ein gegen das ER-Retentions-signal (KDEL-Motiv) des luminalen Proteins BiP gerichteter Peptid-Antikörper verwendet. Dieser wurde für Kofärbungen mit anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern an Körperwandpräparaten von Larven im zweiten und dritten Stadium verwendet (Abb. 4-8A-C).

Im zweiten Larvenstadium zeigte die anti-KDEL-Färbung eine feinkörnige großflächige Struktur oberhalb der kontraktile Elemente sowie unterhalb der Plasmamembran kleine punktförmige Strukturen (A). Diese kolokalisierten nicht mit dem in diesem Stadium markanten, durch anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität markierten subzellulären Netzwerk. Im dritten Larvenstadium dominierten die punktförmigen durch anti-KDEL-Immunreaktivität markierten Strukturen unterhalb der Muskelmembran (C''), die nicht mit der anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität kolokalisierte (C/C'). Zudem dehnte sich die diffuse Färbung bandförmig um und zwischen den Muskelkernen aus (B''). Diese diffuse Färbung erstreckte sich zwar über den gleichen Bereich wie das von DLG markierte subzelluläre Netzwerk (B'), eine spezifische Markierung des Netzwerkes konnte im überlagerten Bild jedoch nicht beobachtet werden (B').

Da DLG und die anti-KDEL-Immunreaktivität nicht kolokalisierten, könnte daraus geschlossen werden, dass DLG nicht am ER lokalisiert ist. Jedoch wird auch das SSR, für das ER-Eigenschaften postuliert wurden (Parnas *et al.*, 2001; Sigrist *et al.*, 2000), nicht von anti-KDEL-Immunreaktivität markiert. Deshalb kann vermutet werden, dass DLG an ER-Kompartimenten, die nicht von anti-KDEL-Antikörpern markiert werden, lokalisiert sein könnte.

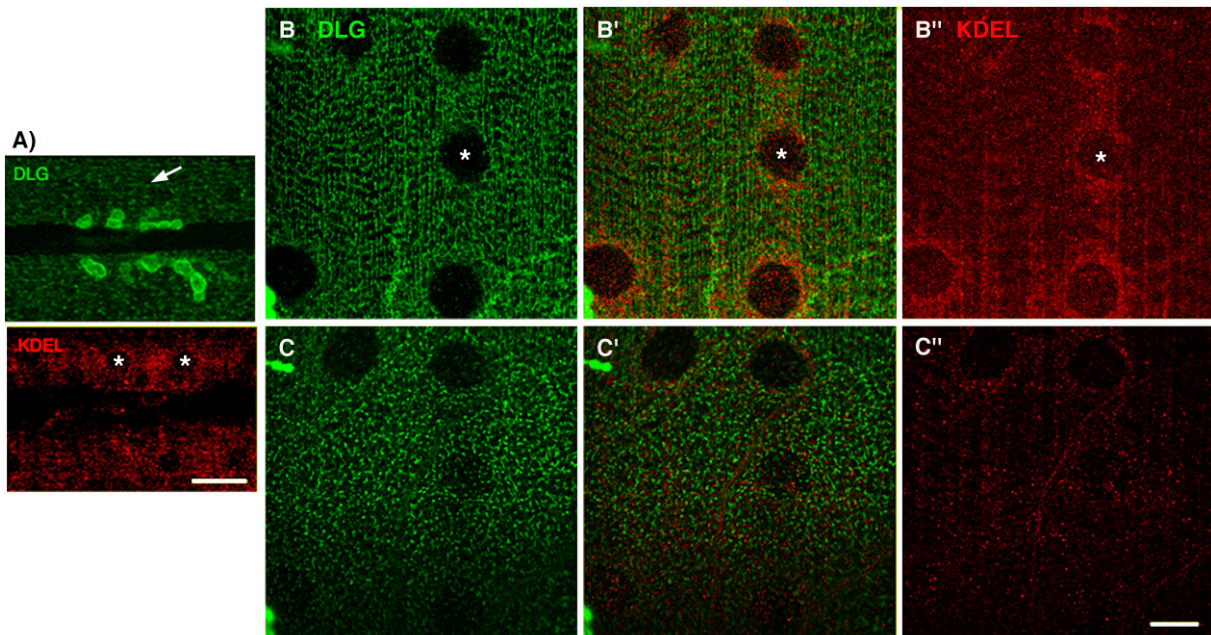


Abb. 4-8: Subzelluläre Verteilung der anti-KDEL- und anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität. A) Konfokale Projektionen eines Körperwandpräparats von Larven im zweiten Stadium. Das von DLG markierte subzelluläre Netzwerk (grün) wird nicht von anti-KDEL-Immunreaktivität (rot) markiert. B/C) Einzelne konfokale Aufnahmen zeigen die Verteilung auf Höhe der Kernmitte (B/B'/B'') und der Plasmamembran im dritten Larvenstadium (C/C'/C''). Zellkerne sind beispielhaft mit „*“ markiert. Die von DLG markierten subzellulären Strukturen koloalisieren nicht mit der anti-KDEL-Immunreaktivität (B'/C'). Maßstab = 10 μm.

Diese Vermutung unterstützten Hinweise aus der Literatur. Tiffany *et al.* (2000) beschrieben, dass das Vertebratenhomologe von DLG, SAP97, in heterologen Zellsystemen bereits im ER mit dem Shaker-Kaliumkanal interagiert und dadurch regulierend auf die Kanalverteilung an der Plasmamembran einwirkt.

Einen Hinweis auf eine ebensolche Lokalisation von DLG im ER lieferte die Transfektion von COS-Zellen mit EGFP-DLG (Abb. 4-9C). DLG ist zum einen diffus über die ganze Zelle verteilt, zum anderen, ähnlich wie SAP97, in retikulären Strukturen rund um den Nukleus angereichert.

Um eine mögliche ER-Lokalisation von DLG in larvalen Körperwandmuskeln weiter zu untersuchen, wurde ein von Stewart *et al.* (1994) publizierter Effekt zunutze gemacht. Stewart *et al.* beschrieben das Auftreten von Vakuolen im Muskel nach Präparation von Körperwänden unter Verwendung bestimmter Puffer. Ursache sind unphysiologische Abweichungen des Na²⁺ zu K⁺ Verhältnisses der *Drosophila*-Standardsaline zur Hämolymphe, die vermutlich zu einer Fraktionierung des ERs führen. Diese Vakuolisierung konnte durch Präparation mit Saline nach Johansen (Johansen *et al.*, 1989) bei Raumtemperatur gezielt herbeigeführt werden bzw. durch Präparation in hämolymphartiger Saline (HL3) vermieden werden (Abb. 4-9A/B).

Unter diesen unphysiologischen Bedingungen wurde auf Höhe der Kernmitte die längs der Muskelfaser verlaufende und zwischen den Kernen situierte netzwerkartige DLG-Färbung durch vakuoläre Strukturen ersetzt (Abb. 4-9B''). Zudem wurde die sonst punktförmige anti-

KDEL-Färbung unterhalb der Muskelmembran zu einer großflächigen feinkörnigen Struktur umverteilt (Abb. 4-9A). Die anti-KDEL-Immunreaktivität war zwar nur an einem geringen Anteil der Vakuolen zu beobachten (Ausschnitt A'), jedoch erstreckten sich sowohl die umverteilte anti-KDEL-Markierung als auch die Vakuolen über gleiche Bereiche des Muskels (Abb.4-9A/B).

Diese Beobachtung könnte für eine Lokalisierung von DLG und des KDEL-Antigens in verschiedenen Subkompartimenten des ERs sprechen.

Da das subzelluläre Netzwerk von keinem der ER-Marker erkannt wurde, sollte die Hypothese, es handele sich hier um ein spezielles Subkompartiment des ERs, durch Zellfraktionierung überprüft werden. Hierfür wurde ein von Rietveld *et al.* (1999) publiziertes Protokoll verwandt (siehe 3.2.5), in dem die Anreicherung von *Drosophila*-ER- und Golgi-Proteinen nach Ultrazentrifugation in den Interphasen eines diskontinuierlichen Sucrosegradienten beschrieben wird. Durch Ultrazentrifugation von Larvenhomogenaten sollte überprüft werden, ob DLG in den beschriebenen Interphasen angereichert wird (Abb. 4-9D).

Hierfür wurde ein mit dem Myc-Epitop markiertes Golgi-Protein (UAS-Fringe, siehe nächstes Kapitel) in Larvenmuskeln überexprimiert und das Körperwandhomogenat unter einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten geschichtet. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Gradient fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mittels Western-Blot analysiert. Immunreaktivität konnte nur im Pellet und in Fraktionen der Interphasen nachgewiesen werden. Sowohl die anti-DLG_{PDZ}- als auch die anti-Myc-Immunreaktivität zeigten eine Anreicherung beider Proteine im Pellet (Abb. 4-9D). In der Interphase zeigten sich Unterschiede: In der Interphase zwischen 1,2 / 1,4 M Sucrose wurde DLG in den Fraktionen b/c angereichert, Fringe-Myc in den Fraktionen a/b. In der Interphase zwischen 0,1 / 1,2 M Sucrose wurde in Fraktion c durch anti-DLG_{PDZ}-Antikörper eine Bande bei ca. 50 kDa detektiert. Fringe-Myc wurde in den Fraktionen b/c angereichert.

Da nur von Membranen umschlossene Strukturen im Sucrosegradienten flottieren, lässt die Anreicherung von DLG in der Interphase auf eine tatsächliche Lokalisierung in intrazellulären membranösen Strukturen schließen, die aufgrund des Erscheinungsbildes in der immunhistochemischen Analyse als ER-Kompartimente eingeordnet werden können.

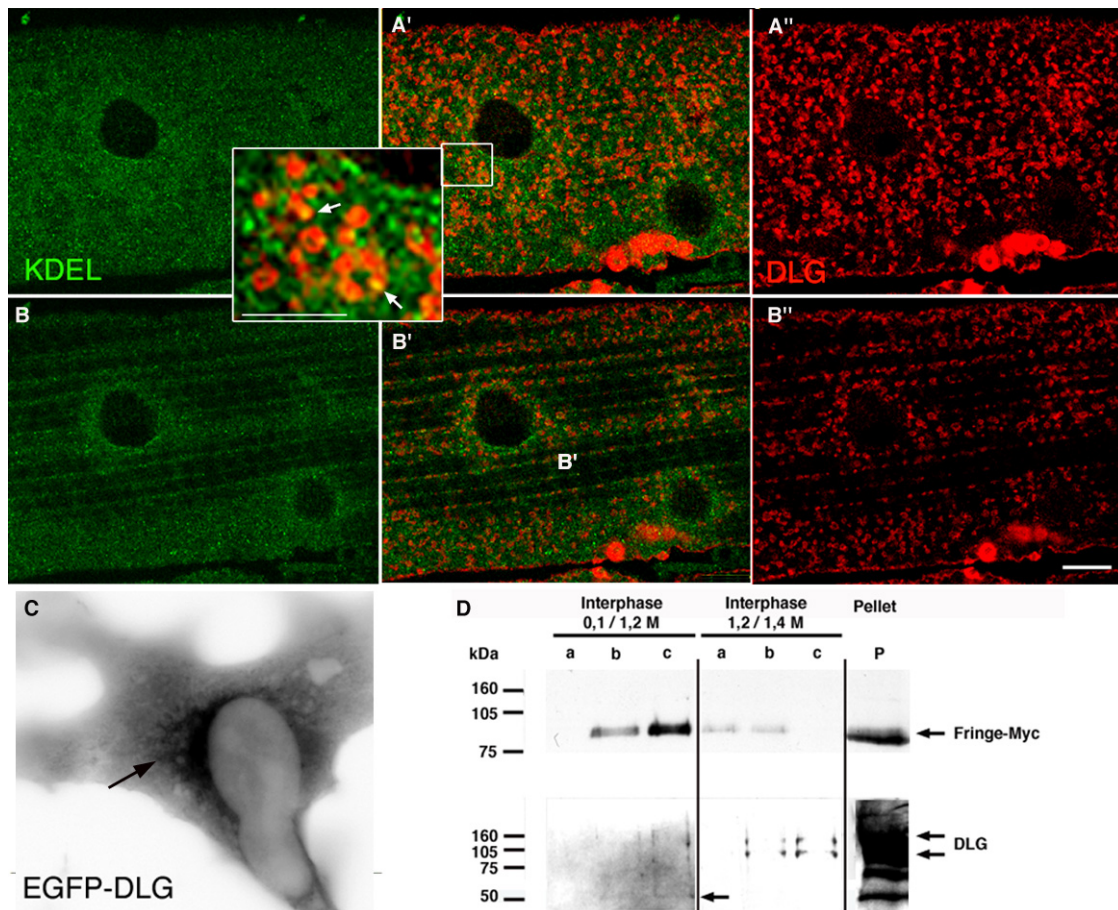


Abb.

4-9: Weitere Untersuchungen zu einer potentiellen ER-Assoziation von DLG. Die einzelnen konfokalen Aufnahmen zeigen die Verteilung der anti-KDEL-Färbung (grün) und die mit DLG markierten Vakuolen (rot) unterhalb der Plasmamembran (A-A') sowie auf Höhe der Kernmitte (B-B'). Maßstab = 10 μ m. Die partielle Kolokalisation von anti-KDEL- und anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität ist im Ausschnitt des Bildes A' mit Pfeilen hervorgehoben. Maßstab = 5 μ m. C) Anreicherung von EGFP-DLG an den Zellkern umgebende retikuläre Strukturen in COS-Zellen. D) Western-Blot-Analyse der Interphasen- und Pellet-Fractionen eines diskontinuierlichen Sucrosegradienten. Die Verteilung des Golgi-Proteins Fringe-Myc wurde mittels anti-c-Myc-Antikörpern, die von DLG mittels anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern untersucht. Die stärkste anti-c-Myc-Immunreaktivität konnte in den Fraktionen a/b der Interphase 0,1/1,2 M Sucrose und im Pellet detektiert werden. In den Fraktionen a/b der Interphase 1,2/1,4 M Sucrose wurde eine schwächere Immunreaktivität nachgewiesen. Der anti-DLG_{PDZ}-Antikörper zeigte Immunreaktivität im Pellet und in Fraktion b/c der Interphase 1,2/1,4 M Sucrose. In Fraktion c der Interphase 0,1/1,2 M Sucrose wurde eine Bande von ca. 50 kDa detektiert.

4.2.1.2 Markierung mit Antikörpern gegen das Poly A-Bindungsprotein und den eukaryotischen Initiationsfaktor 4

Um mögliche Unterschiede der ER-Kompartimentisierung genauer zu untersuchen, wurden als weitere ER-Marker Antikörper gegen das Poly A-Bindungsprotein (PABP) und den eukaryotischen Initiationsfaktor 4 (eIF4) (Sigrist *et al.*, 2000) verwendet.

Die anti-KDEL-immunreaktiven punktförmigen Strukturen unterhalb der Plasmamembran (siehe Abb. 4-8C'') wurden von beiden Markern nicht erkannt. Jedoch erstreckte sich, ähnlich zur anti-KDEL-Immunreaktivität (Abb. 4-10A'') eine feinkörnige, bandartige Färbung zwischen den Muskelkernen (Abb. 4-10A/E''). Ob PABP und eIF4 deckungsgleich lokalisiert sind, konnte nicht untersucht werden, da beide Antikörper in Kaninchen gewonnen wurden.

Eine ähnliche cytoplasmatische Verteilung wurde auch bei postsynaptischer Expression von $\Delta I3$ beobachtet (siehe 4.1.5). Um eine mögliche Kollokalisierung zu untersuchen, wurden DLG-Flag und $\Delta I3$ postsynaptisch exprimiert und die Präparate mit anti-FLAG- und anti-PABP-Antikörpern gefärbt (Abb. 4-10B/C).

Abb. 4-10B/C zeigt einzelne konfokale Bilder, die auf Höhe der Kernmitte aufgenommen wurden. Die übereinandergelagerten Bilder der $\Delta I3$ -FLAG- und PABP-Färbung zeigten eine ähnliche Verteilung um die Muskelkerne herum (B'). Das durch DLG-Flag markierte subzelluläre Netzwerk grenzte an die PABP-Färbung, d. h. es scheint etwas weiter vom Zellkern entfernt lokalisiert zu sein (Abb. 4-10C'). Nach Färbung mit anti-eIF4-Antikörpern konnte zwischen den Muskelkernen eine Verteilung ähnlich zur PABP-Immunreaktivität beobachtet werden (Abb. 4-10E'). An der neuromuskulären Synapse befanden sich die anti-eIF4- und anti-Flag-Immunreaktivität hingegen in deutlich abgegrenzten Bereichen (Abb. 4-10D').

Die punktförmigen Strukturen unterhalb der Membran wurden nur durch anti-KDEL-Antikörper markiert, an der neuromuskulären Synapse hingegen wurden nur anti-PABP- und anti-eIF4-Immunreaktivität in größeren Strukturen angereichert (Sigrist *et al.*, 2000). Diese Beobachtung macht die Kompartimentierung des ERs im *Drosophila*-Larvenmuskel deutlich. Zwischen den Muskelkernen erstreckte sich zwar die Immunreaktivität der drei Marker über das gleiche Areal, eine deutliche Überlappung konnte aber auch hier nicht beobachtet werden. Im selben Bereich wurde auch $\Delta I3$ lokalisiert, was auf eine Anreicherung dieser DLG-Variante in bestimmten ER-Bereichen nahe legt.

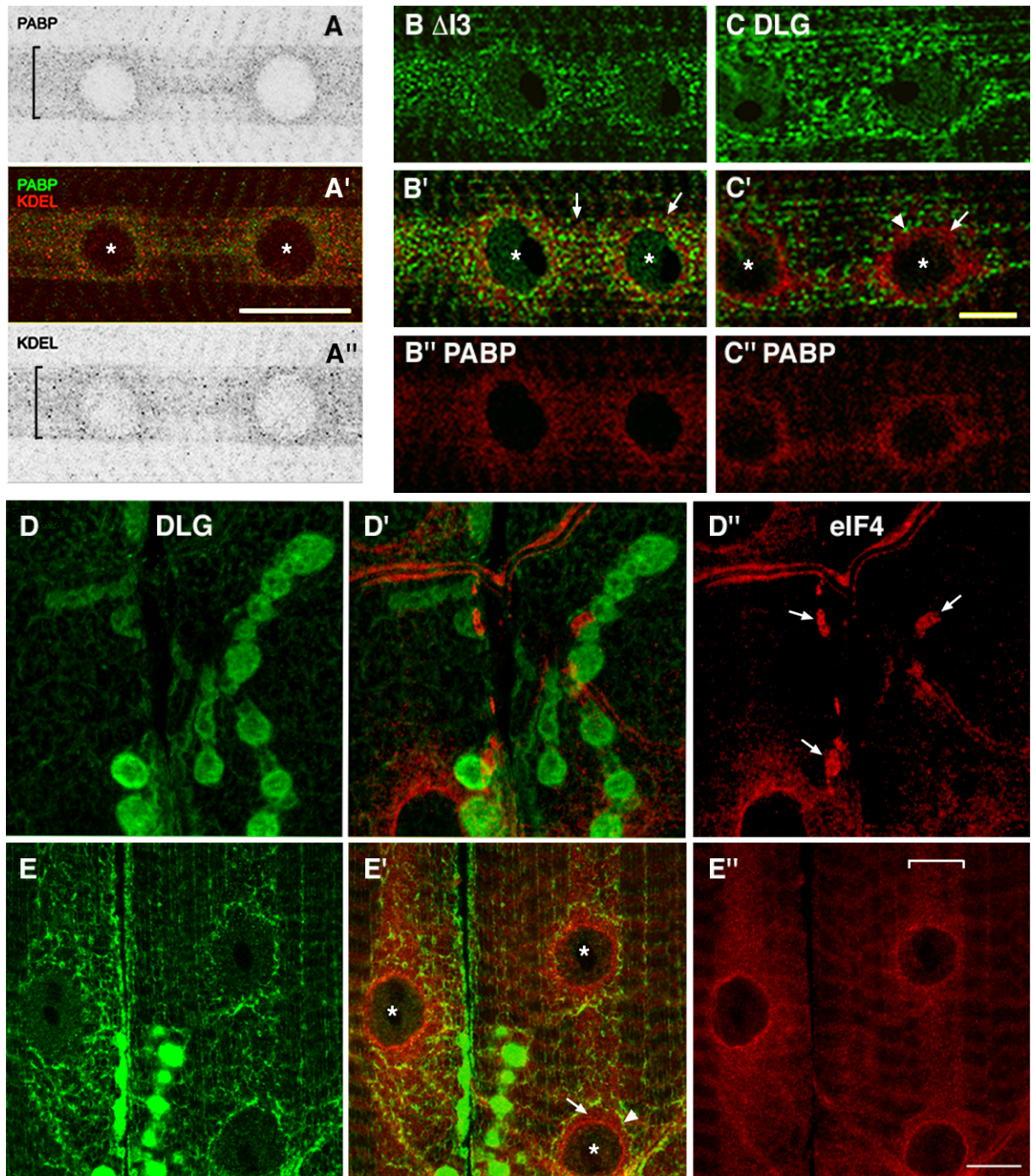


Abb. 4-10: Lokalisation von PABP und eIF4. Einzelne konfokale Aufnahmen von Körperwandpräparaten von Larven im dritten Stadium zeigen A) die Koverteilung von anti-PABP- (A) und anti-KDEL-Immunreaktivität zwischen den Muskelkernen (A'/A''). Maßstab = 20 μ m. B/C) Verteilung von Δ I3 und DLG-Flag mit PABP. Δ I3 erstreckt sich über den gleichen Bereich wie PABP (B'/B''), wohingegen DLG-Flag im deutlich abgegrenzten subzellulären Netzwerk lokalisiert ist (C'/C''). D/E) Lokalisierung von eIF4 und DLG: An der neuromuskulären Synapse befinden sich die anti-eIF4- und anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität in unterschiedlichen Bereichen (D-D''). Zwischen den Muskelkernen zeigt die anti-eIF4-Färbung ein ähnliches Verteilungsmuster wie die anti-PABP-Immunreaktivität (E-E''). Maßstab = 10 μ m.

4.2.2 Charakterisierung der Verteilung des Golgi-Apparats

Der Golgi-Apparat ist ein Membransystem, das aus Ansammlungen flacher Zisternen besteht. Er liegt morphologisch und funktionell zwischen dem ER und der Plasmamembran und ist polar aufgebaut. An der cis-Seite wird Material, z. B. Transmembranproteine wie Ionenkanäle oder Zelladhäsionsmoleküle, aus dem rauhen ER aufgenommen und weiter verarbeitet. An der trans-Seite wird Material abgegeben und mittels Vesikel an den Zielort transportiert. Diese Polarität manifestiert sich auch in einer unterschiedlichen Proteinkomposition der Zisternen, weshalb die Verteilung des Golgi-Apparats durch verschiedene Golgi-Marker untersucht werden sollte.

4.2.2.1 Markierung mit Antikörpern gegen das 120 kDa-Antigen

Zunächst wurde die Verteilung des Golgi-Komplexes im Larvenmuskel mittels eines Antikörpers gegen ein integrales Golgi-Membranprotein (120 kDa) aus *Drosophila* (Stanley *et al.*, 1997) untersucht.

Unterhalb der Muskeloberfläche zeigten sich im Vergleich zur anti-KDEL-Immunreaktivität größere und gleichmäßiger angeordnete punktförmige Strukturen (Abb. 4-11A). Auf Höhe der Zellkernmitte verteilten sich diese ringförmig um die Kerne (A') und zeigten zwischen den Kernen und unmittelbar über den Myofibrillen eine streifenförmige Anordnung (A'/A'').

Zur weiteren Überprüfung der Golgi-Lokalisation dienten zudem transgene Fliegen, die ein mit dem Myc-Epitop markiertes UAS-Fringe-Konstrukt enthielten. Die Glycosyltransferase Fringe ist im Golgi-Apparat an der Regulierung des Notch-Signalwegs beteiligt (Munro und Freeman, 2000). UAS-Fringe-Myc wurde im Muskel exprimiert und die Verteilung des Myc-Epitops mit der des 120 kDa-Markers in Körperwandpräparaten verglichen. Beide markierten zum großen Teil gleiche punktförmige Strukturen, was auf eine Golgi-Spezifität schließen ließ, jedoch überlappten die Färbungen nicht vollständig (Abb. 4-11B-B''). Eine Kollokalisierung überwog vor allem unterhalb der Plasmamembran und auf Höhe der Kernmitte (B/B'). Dies könnte auf eine unterschiedliche Lokalisierung verschiedener Golgi-Kompartimente innerhalb des Muskels hindeuten.

Sans *et al.* (2001) beschrieben die Interaktion der AMPA-Untereinheit GluR1 mit SAP97 bereits im ER bzw. cis-Golgi-Zisternen und deren Kotransport an die Plasmamembran. Es sollte deshalb untersucht werden, ob DLG, ähnlich wie SAP97, in Golgi-Elementen lokalisiert sein könnte.

Für die Untersuchung der möglichen Kollokalisierung wurde DLG-Flag im Muskel exprimiert und die Körperwandpräparate von Larven im 3. Stadium mit anti-DLG_{PDZ}- und anti-120 kDa-Antikörpern gefärbt (Abb. 4-11D).

Auf Höhe der Kernmitte schienen die punktförmigen Golgi-Elemente mit dem durch anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität markierten, subzellulären Netzwerk und den longitudinalen Streifen assoziiert zu sein (D). Vor allem an den Muskelkernen konnte teilweise auch eine Überlappung beider Strukturen beobachtet werden (D'). Diese Überlappung trat im zweiten Larvenstadium, in dem aufgrund des immensen Muskel- und Synapsenwachstums ein vermehrter Transport erwartet wurde, nicht häufiger auf (Abb. 4-11C'). Demnach ist DLG zumindest an den 120 kDa-immunreaktiven Golgi-Strukturen nur zu einem geringen Anteil vorhanden. Da die unvollständige Überlappung von anti-120 kDa- und anti-Myc-Immunreaktivität vermutlich verschiedene Golgi-Kompartimente markierten, sollten weitere Kompartimente durch Einsatz zusätzlicher Marker untersucht werden.

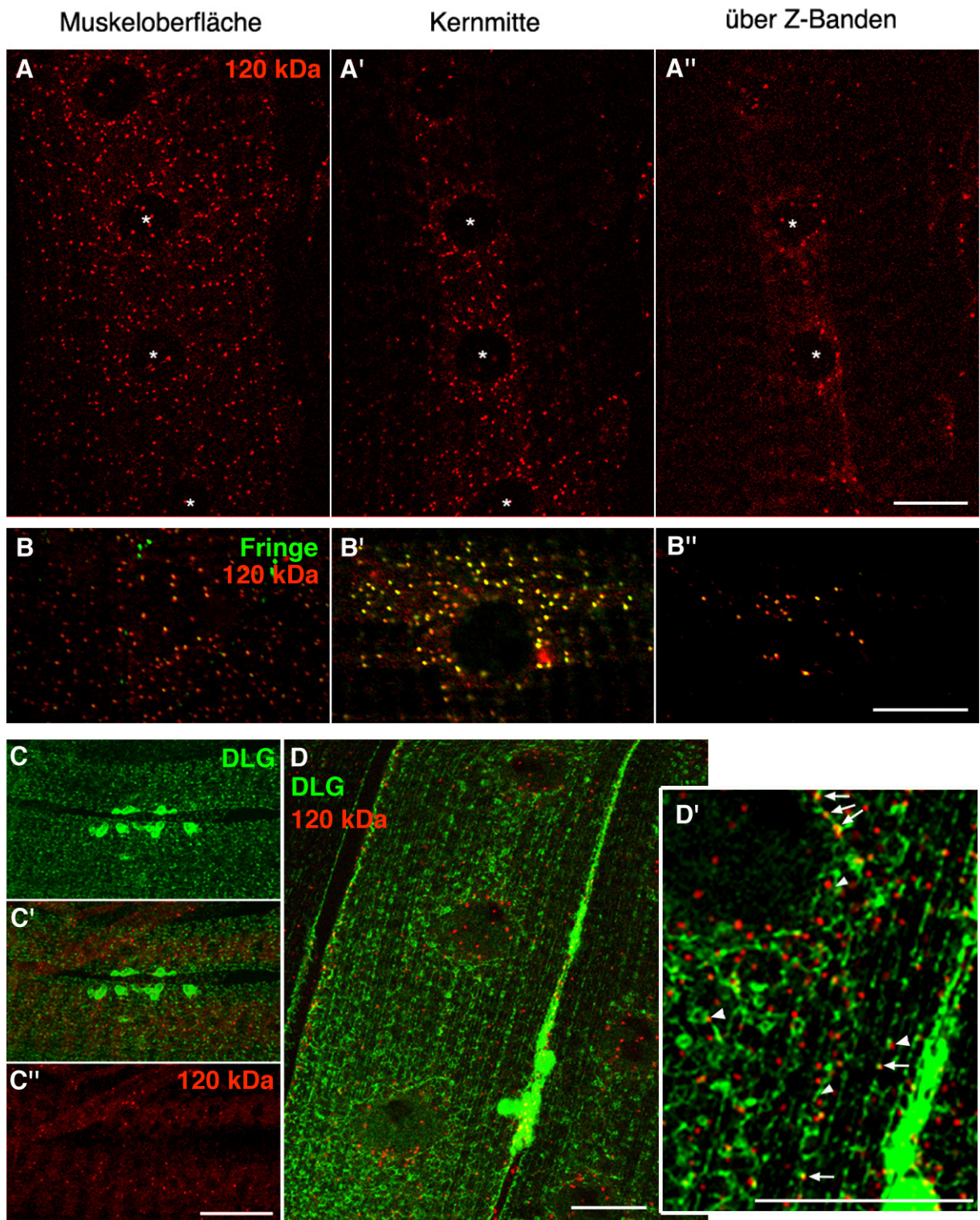


Abb. 4-11: Verteilung des Golgi-Apparats und von DLG im Muskel. Die Bilder zeigen einzelne konfokale Aufnahmen von Körperwandpräparaten von Larven im dritten Stadium (A/B/D) und konfokale Projektionen von Körperwandpräparaten von Larven im zweiten Stadium (C). A) Verteilung der mit anti-120 kDa-Immunreaktivität markierten Golgi-Elemente auf Höhe der Muskeloberfläche (A), der Kernmitte (A') und über den Myofibrillen (A''). Zellkerne sind beispielhaft mit „*“ markiert. B-B'') Die Ausschnitte aus den in A) gezeigten Bildern zeigen die Verteilung des 120 kDa-Antigens und UAS-Fringe-Myc, die vor allem auf Höhe der Kernmitte (B') überlappen. C) Auch im zweiten Stadium konnte keine vermehrte Kolo-kalisation des 120 kDa-Antigens und DLG (C') im Vergleich zu Larven im 3. Stadium beobachtet werden. D) Übereinander gelagerte Bilder der anti-DLG- und anti-120 kDa-Immunreaktivität auf Höhe der Kernmitte. Im Ausschnitt D' sind Golgi-Elemente, die mit dem von DLG markierten subzellulärem Netzwerk überlappen mit (⤴) hervorgehoben. Elemente, die am Netzwerk lokalisiert sind, aber nicht überlappen, sind mit (⬛) markiert. Maßstab = 10 µm.

4.2.2.2 Die anti-Syntaxin-6- und anti-58K-Immunreaktivität markiert Golgi-Elemente im subsynaptischen Retikulum

Die Lokalisierung von trans-Golgi-Kompartimenten wurde durch zwei in Vertebraten charakterisierte Marker, den gegen das 58K-Antigen (Hennig *et al.*, 1998) und gegen Syntaxin-6 (Syx-6) gerichteten Antikörpern (Bock *et al.*, 1997), untersucht. Für den Nachweis von Syntaxin-6 wurden zwei unabhängig erzeugte Antikörper verwendet. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Markern, das 120 kDa-Antigen und UAS-Fringe-Myc, zeigten diese neben den punktförmigen Strukturen im Muskel auch Immunreaktivität an synaptischen Boutons, was bisher noch nicht beschrieben wurde (Abb. 4-12A/B). Die synaptische Färbung bestand aus ringförmig angeordneten Punkten innerhalb der von der anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität weitgehend ausgesparten Zonen (Abb. 4-12A, Ausschnitt). Durch diese Kofärbung konnten diese potentiellen Golgi-Elemente jedoch weder der Post- noch der Präsynapse zugeordnet werden. Eine Kolokalisation von anti-58K-Immunreaktivität mit der postsynaptisch überexprimierten GluRIIB-Untereinheit hingewies auf eine Lokalisation der mit anti-58K-Antikörpern markierten Elemente im SSR schließen (Abb. 4-12C).

Einen Hinweis auf die Golgi-Spezifität der synaptischen Immunreaktivität lieferte die Inkubation von Körperwandpräparaten mit dem Pilztoxin Brefeldin A (BfA), das eine Umorganisation des Golgi-Apparats bewirkt (Chardin und McCormick, 1999). Durch BfA wurden die an der Synapse lokalisierten und durch 58K markierten Punkte im Vergleich zum Kontrollpräparat weitgehend eliminiert (Abb. 4-12D/E).

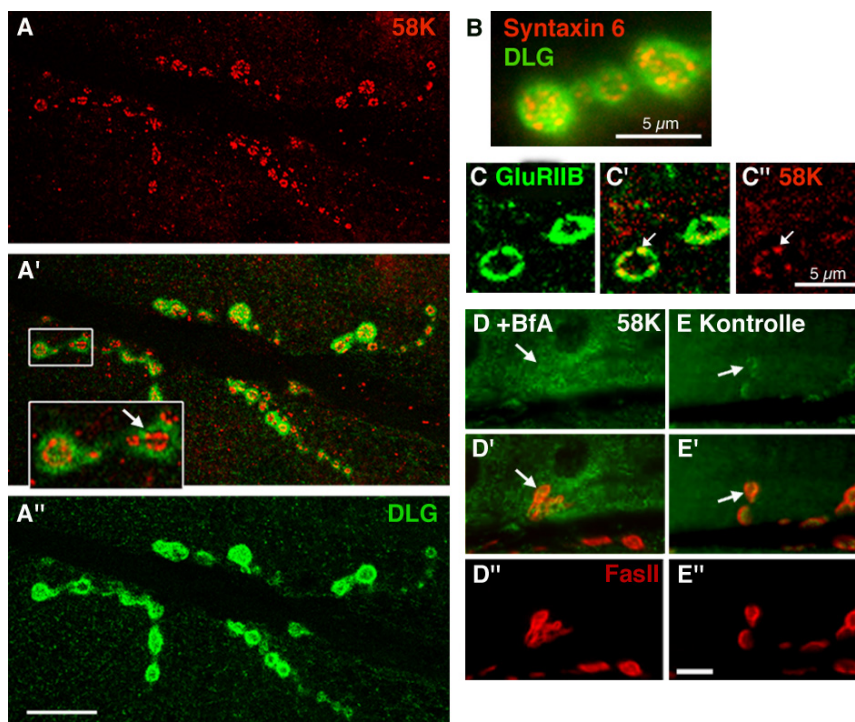


Abb. 4-12: Lokalisierung der trans-Golgi-Marker 58K und Syntaxin-6. A/C) zeigen einzelne konfokale Aufnahmen von Körperwandpräparaten, B/D) zeigen CCD-Kameraaufnahmen. A/B) Anti-58K- und anti-Syx-6-Antikörper (rot) zeigen Immunreaktivität an der neuromuskulären Synapse. Die übereinander gelagerten konfokalen Bilder zeigen in A) deren Lokalisation in den von DLG (grün) weitgehend ausgesparten Bereichen (siehe Ausschnitt). Maßstab = 10 μ m. C) Die postsynaptische Lokalisation wurde durch Kolokalisation (↗) mit postsynaptisch überexprimiertem GluRIIB bestätigt. D) Durch 10-minütige Inkubation der Körperwandpräparate mit BfA wird die

synaptische anti-58K-Immunreaktivität im Vergleich zum Kontrollpräparat (E) deutlich reduziert. Die Lage eines der mit FasII markierten synaptischen Boutons (D'/E'') ist zum besseren Vergleich mit Pfeil markiert (D/D'/E/E'). Maßstab = 10 μ m.

4.3 Charakterisierung von Cytoskelettelementen des Larvenmuskels

Unter dem Begriff Cytoskelett wird die Gesamtheit aller zellulären Faserproteine, die Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente, zusammengefasst. Diese sind u. a. an der Stabilität und Strukturierung der Zelle und an Transportprozessen beteiligt. Im folgenden Kapitel soll die Verteilung einiger Komponenten - Mikrotubuli, Spectrin und Actin – und deren Einfluß auf die Lokalisation von DLG näher untersucht werden.

4.3.1 Markierung der Mikrotubuli mit anti- α -Tubulin-Antikörper

Die mittels anti- α -Tubulin-Antikörper untersuchte Verteilung der Mikrotubuli im Muskel (Abb. 4-13) erwies sich als dreigeteilt: Über den kontraktilelementen zeigten sich vor allem längs des Muskels ausgerichtete Streifen (C). Zwischen den Zellkernen befanden sich vor allem längs ausgerichtete Mikrotubuli und von den Kernen ausgehende radiale Mikrotubuli (B), die Richtung Oberfläche dominierten (A). An den synaptischen Boutons konnte neben dem bereits beschriebenen präsynaptischen Ring (Roos *et al.*, 2000) auch ein postsynaptischer Ring, der den mit DLG markierten Bereich umschließt, beobachtet werden (D/D').

Untersuchungen zur möglichen Kovertelung von Mikrotubuli und DLG waren nur nach sequenzieller Inkubation mit anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern und anschließender Inkubation mit anti- α -Tubulin-Antikörpern möglich. An den längsgerichteten Streifen oberhalb der Myofibrillen schienen sich beide Färbungen zu komplementieren (C'). Eine Kolokalisation konnte teilweise an der Plasmamembran beobachtet werden (A'/C').

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die von Δ PDZ1+2 unterhalb der Plasmamembran gebildeten Cluster mit Mikrotubuli assoziiert sind (Abb. 4-13E-G). Für den Nachweis von Δ PDZ1+2 stand in diesem Fall nur ein gegen die GuK-Domäne gerichteter Antikörper zur Verfügung, der einer Fixierung mit Bouins-Fixativ bedurfte. Da durch eine Bouins-Fixierung Mikrotubuli weitgehend zerstört wurden, wurde eine mögliche Kolokalisation der Cluster durch Expression des mit EGFP markierten SAP97- Δ PDZ1+2-Konstrukts untersucht. Oberhalb der kontraktilelemente konnten punktförmige Strukturen beobachtet werden (G), die Richtung Plasmamembran vermehrt nachgewiesen werden konnten (Abb. 4-13E/F, siehe auch 4.1.4). Übereinandergelagerte Konfokalbilder der anti- α -Tubulin-Immunreaktivität und der EGFP-Fluoreszenz dokumentierten eine Assoziation dieser Strukturen mit Mikrotubuli in allen Bereichen des Muskels. Die beobachtete Interferenz des anti-DLG_{PDZ}- und des anti- α -Tubulin-Antikörpers könnte auf eine räumliche Nähe der durch die Antikörper erkannten Antigene hinweisen. Zudem sind die durch EGFP-SAP97- Δ PDZ1+2 gebildeten Aggregate mit Mikrotubuli assoziiert, weshalb eine Interaktion von DLG mit Mikrotubuli biochemisch untersucht werden sollte.

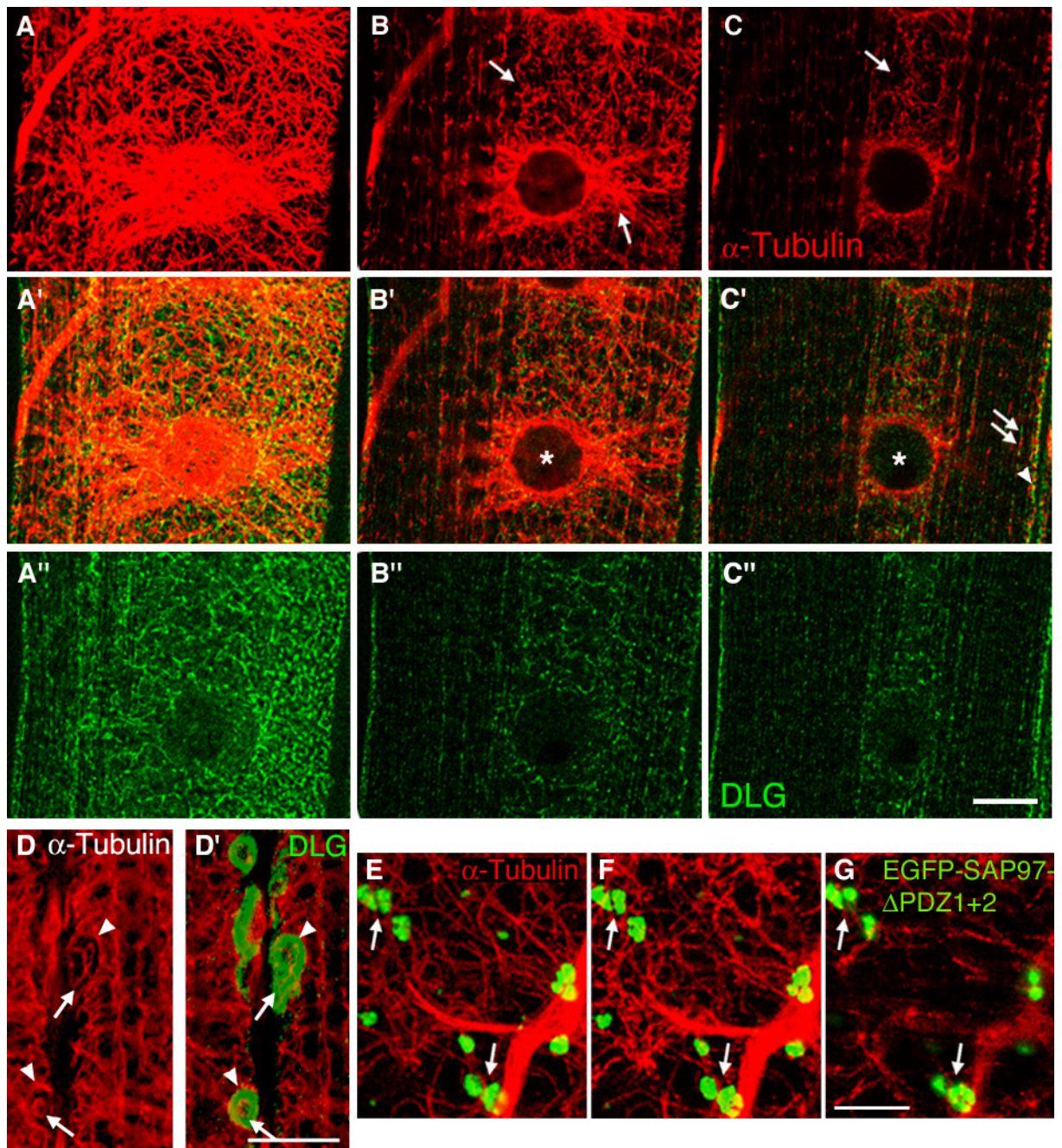


Abb. 4-13: Anordnung der Mikrotubuli im *Drosophila*-Larvenmuskel und partielle Kolokalisation mit DLG. Einzelne konfokale Aufnahmen zeigen die anti- α -Tubulin-Immunreaktivität (A-C) auf Höhe der Plasmamembran (A/D/E), der Kernmitte (B/F) und über den Myofibrillen (C/G). Zellkerne sind beispielhaft mit „*“ markiert. DLG kolokalisiert mit Mikrotubuli an der Plasmamembran (A‘; in C‘ mit \blacktriangle markiert), nicht jedoch am subzellulären Netzwerk (B‘. C‘) zeigt die komplementäre Lokalisation an den längsgerichteten Streifen. D) Prä- (°) und postsynaptischer Mikrotubuli-Ring (\blacktriangle). In D‘ ist das SSR durch anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität markiert. (E-G) Assoziation der von EGFP-SAP97- Δ PDZ1+2 gebildeten Akkumulation mit Mikrotubuli. Maßstab = 10 μ m.

4.3.1.1 Wird DLG entlang von Mikrotubuli an die Synapse transportiert?

In Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten wurden als Interaktionspartner der GuK-Domäne von Vertebraten-MAGuKs Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie MAP1a, CRIPT und das Motorprotein GAKIN ermittelt (Brenman *et al.*, 1998; Hanada *et al.*, 2000; Naisbitt *et al.*, 2000). Die Abhängigkeit der synaptischen Δ GuK-Lokalisation von endogenem DLG (siehe 4.1.6) könnte deshalb durch einen Kotransport entlang der Mikrotubuli erklärt werden. Diese Hypothese, die eine Interaktion der GuK-Domäne von DLG mit Mikrotubuli voraussetzt, sollte durch Präzipitation von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli überprüft werden (Abb. 4-14A).

Hierfür wurden sowohl Körperwandpräparate von Larven, die im Muskel Δ GuK im *dlg*⁺- bzw. *dlg*^{XI-2}-Hintergrund exprimieren, als auch DLG-Flag exprimierende Larven und Wildtyp-Larven homogenisiert. Nach Klärung der Homogenate befand sich noch ein Großteil der anti- α -Tubulin- und anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität im Pellet (P1 in Abb. 4-15A). Der geklärte Überstand wurde nach Protokoll für 10 min mit Taxol inkubiert. Dies war nicht für eine vollständige Präzipitation von α -Tubulin ausreichend (S1). Eine effektive Präzipitation der Mikrotubuli wurde erst nach der zweiten, 45-minütigen Inkubation mit Taxol erreicht (P2). Δ GuK wurde unabhängig vom genetischen Hintergrund kopräzipitiert. Endogenes DLG und DLG-Flag wurden ebenfalls präzipitiert. Da auch eine geringe Menge Δ GuK im *dlg*⁻-Hintergrund mit Mikrotubuli kopräzipitierte, könnten weitere Domäne an der Mikrotubuli-Assoziation beteiligt sein.

Um herauszufinden, ob die Abhängigkeit der synaptischen Δ GuK Lokalisation von endogenem DLG auf einer direkten Interaktion beruht, wurde versucht, mit Hilfe des Flag-Antikörpers Δ GuK und endogenes DLG zu kopräzipitieren (Abb. 4-14B). Die Western-Blot-Analyse der Präzipitate zeigte die erfolgreiche Präzipitation der mit Flag markierten Konstrukte (IP). Im Überstand konnten durch anti-DLG_{PDZ}-Antikörper sowohl endogenes DLG als auch Δ GuK und DLG-Flag nachgewiesen werden. Jedoch unterschied sich die im Δ GuK-Präzipitat (Spur 2) enthaltene Menge an endogenem DLG nicht von der unspezifisch gebundenen Menge der Kontrolle (Spur 4, Wildtyp). Eine Kopräzipitation von endogenem DLG erfolgte jedoch mit DLG-Flag (Spur 3). Demnach scheint ein Kotransport durch direkte Interaktion von Δ GuK und endogenem DLG unwahrscheinlich.

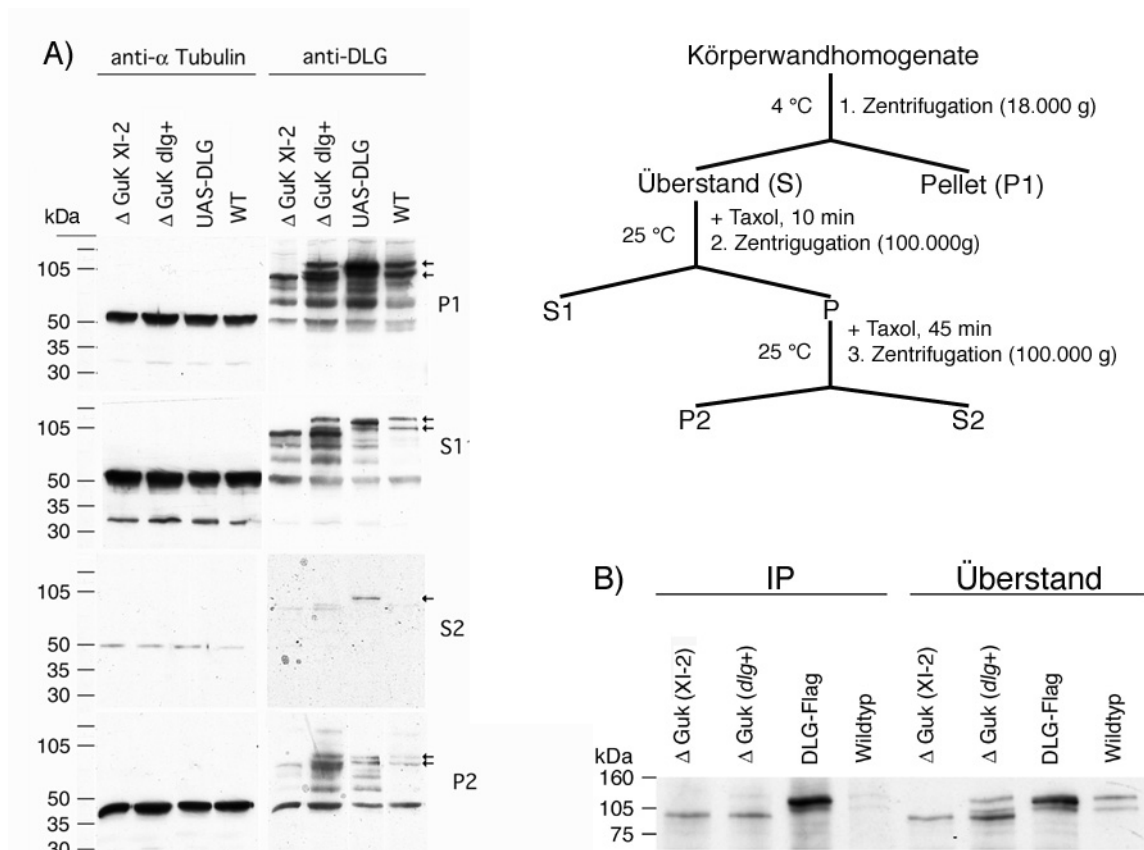


Abb. 4-14: Kopräzipitation von DLG mit taxolstabilisierten Mikrotubuli. A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs und der Nachweis von anti- α -Tubulin und anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität in den sukzessiv gewonnenen Pellets und Überständen durch Western-Blot-Analyse. DLG-Flag (S2) und die charakteristischen Doppelbanden des endogenen DLGs (P1, S1, P2) sind mit Pfeilen markiert. B) Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitation (IP) von Δ GuK und DLG-Flag mittels anti-Flag-Antikörper. Der Nachweis erfolgte mit anti-DLG_{PDZ}-Antikörper. Immunpräzipitate und Überstände wurden in folgender Reihenfolge aufgetragen: Spur 1: Δ GuK im *dlg*⁻-Hintergrund, Spur 2: Δ GuK im *dlg*⁺-Hintergrund, Spur 3: DLG-Flag im *dlg*⁺-Hintergrund, Spur 4: Wildtyp/Kontrolle.

4.3.1.2 D-CRIPT interagiert nicht mit DLG an der neuromuskulären Synapse

Die Verknüpfung von MAGuKs mit Mikrotubuli wird in Vertebraten unter anderem durch CRIPT („cysteine-rich interactor of PDZ3“), das sowohl spezifisch an die 3. PDZ-Domäne von Proteinen der PSD-95-Familie als auch an Mikrotubuli bindet, vermittelt (Brenman *et al.*, 1998; Niethammer *et al.*, 1998; Passafaro *et al.*, 1999). Durch Datenbankanalyse konnte das Vorhandensein eines *Drosophila*-Homologen nachgewiesen werden. D-CRIPT ist auf Proteinebene zu 75 % konserviert und unterscheidet sich am C-Terminus in zwei Aminosäuren (SST) vom PDZ-Bindungsmotiv des Vertebratenproteins (TSV) (Abb.4-15A). Um zu überprüfen, ob D-CRIPT dennoch mit DLG interagieren könnte, wurde die *d-cript*-cDNA mittels PCR aus einer cDNA-Bank amplifiziert und nach Sequenzierung für Untersuchungen im Hefe-Zwei-Hybridsystem und für die Keimbahntransformation in Fliegen in die entsprechenden Vektoren kloniert. Im Hefe-Zwei-Hybridsystem wurde die Spezifität der PDZ-Bindung von D-CRIPT untersucht (Abb. 4-15 B). D-CRIPT interagierte mit PDZ3 und PDZ1-

3, jedoch nicht mit PDZ1+2. Wurde das C-terminale Threonin durch Valin substituiert (D-CRIPT_{T→V}), zeigte sich dagegen eine erhöhte Bindungspräferenz an PDZ1+2.

Der Nachweis von endogenem und überexprimiertem D-CRIPT in der Immunhistochemie erfolgte mit einem gegen CRIPT gerichteten Antikörper (Niethammer *et al.*, 1998). Endogenes D-CRIPT war an der neuromuskulären Synapse im Motorneuron nachweisbar, kolokalisierte aber weder mit anti-DLG_{PDZ}- noch anti-FasII-Immunreaktivität an synaptischen Boutons (Abb. 4-15C1 und C3). Wurden die Körperwandpräparate mit Bouins fixiert, zeigte sich eine Kolokalisation von D-CRIPT mit DLG in Epithelien (C2). Die Spezifität des gegen das Vertebratenhomologe CRIPT gerichteten Antikörpers wurde durch Nachweis von postsynaptisch exprimierten UAS-D-CRIPT überprüft. Im Muskel von Wildtyp-Präparaten wurden durch anti-CRIPT-Antikörper einige punktförmige Strukturen an der Oberfläche markiert (C3), die nach Expression von UAS-D-CRIPT vermehrt auftraten. Jedoch wurde auch UAS-D-CRIPT nicht an der Synapse lokalisiert (C4), weshalb eine Verankerung von DLG am SSR durch D-CRIPT ausgeschlossen werden kann.

A)

```

CRIPT:      1 MVCEKCEKKLGRVITPDTWKDGARNFTTESGGRKLNENKALTSKKARFDYPYGNKFSTCRI 60
              MVCEKCE KL +V P+ W+ +T +GGRK+NENKAL+S + R++P G CRI
D-CRIPT:    1 MVCEKCEAKLSKVSAPNPWRT---STAPAGGRKINENKALSSARERYNPIG-TALPPCRI 56

CRIPT:      61 CKSSVHQPGSHYCQGCAYKKGICAMCGKKVLDTKNYKQTSV 101
              C+ VHQ GSHYCQ CAYKK ICAMCGKK+++TKNYKQ+S+
D-CRIPT:    57 CRQKVHQMGSHYCQACAYKKAICAMCGKKIMNTKNYKQSSV 97
  
```

B) +: Interaktion, -: keine Interaktion /Experiment

	pGADT7 PDZ1+2	pGADT7 PDZ1-3	pACT PDZ3	pACT	pGADT7
pAS2-1 D-CRIPT	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-
pAS2-1 D-CRIPT _{T→V}	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-

Abb. 4-15A/B: Interaktion von D-CRIPT mit DLG und Vergleich der Expression der beiden Proteine im Muskel und Epithelien. A) Homologie von CRIPT und D-CRIPT auf Proteinebene. Das putative C-terminale PDZ-Bindungsmotiv ist schwarz umrandet, die für die PDZ3-Bindung kritischen Aminosäuren (Niethammer *et al.*, 1998) sind farbig markiert. B) Tabellarische Übersicht der für die Untersuchung der Interaktion von DLG mit D-CRIPT im Hefe-Zwei-Hybridsystem eingesetzten Konstrukte. "+" symbolisiert den Nachweis der Interaktion durch Filtrertest pro Experiment (siehe 3.3.3.), und "-" keine Interaktion.

Abb. 4-15C siehe Seite 52

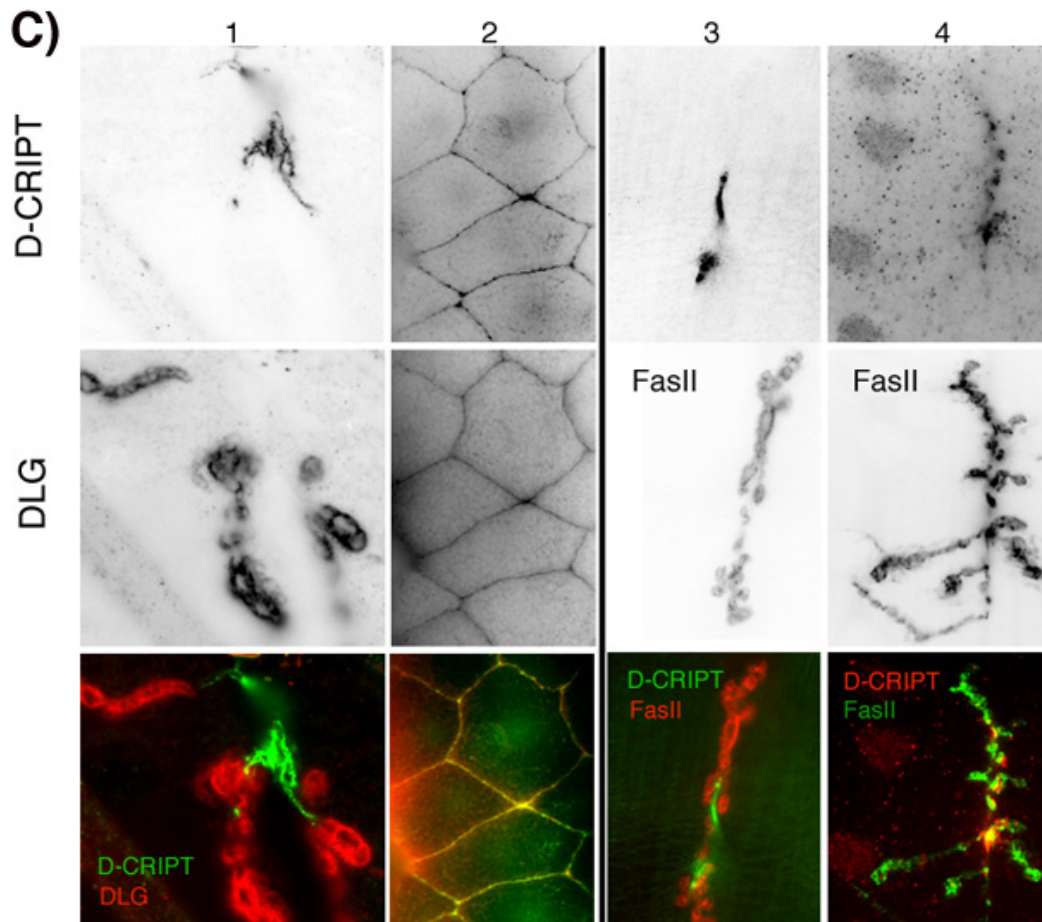


Abb. 4-15: C) Immunhistochemischer Nachweis von D-CRIPT in Körperwandpräparaten von Larven im dritten Stadium: 1) Anti-CRIPT-Immunreaktivität befindet sich im Motoneuron, DLG an der neuromuskulären Synapse. 2) DLG und D-CRIPT koloalisieren an der Plasmamembran epithelialer Zellen. 4) Postsynaptisch überexprimiertes D-CRIPT ist in punktförmigen Strukturen an der Muskelmembran lokalisiert und befindet sich, wie endogenes D-CRIPT (3), nicht an mit anti-FasII-Immunreaktivität markierten synaptischen Boutons.

4.3.2 Assoziation von DLG mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett

Die anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität zeigte unterhalb der Plasmamembran eine gemaserte Struktur. Dass es sich hier nicht um eine Zufallsverteilung, sondern um spezielle Subkompartimente handelte, zeigte die Markierung von Teilbereichen der Plasmamembran durch das Lektin Concanavalin A. Die Struktur beider Markierungen war sehr ähnlich, jedoch überlappten sie nur teilweise (Abb. 4-16A'').

Spezialisierte Zellen, wie Epithelzellen, Neurone und Muskel, benötigen funktional verschiedene Subdomänen der Membran, um z. B. durch Gruppieren von Rezeptoren den ortsspezifischen Transport von Ionen oder die gerichtete Signalausbreitung zu gewährleisten. Diese Subdomänen werden durch das membranassoziierte Cytoskelett organisiert und stabilisiert. Ein wichtiger Faktor des membranassoziierten Cytoskeletts ist Spectrin. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Strukturierung der submembranen anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität durch Assoziation mit Spectrin vermittelt werden könnte.

In der Tat überlappten die weitgehend parallel verlaufende anti- α -Spectrin- und anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität an den Subkompartimenten der Plasmamembran (Abb. 4-16B''). Zudem sind weite Teile des subzellulären Netzwerks und der Längsstreifen über den Myofibrillen mit Spectrin assoziiert (Abb. 4-16D''). An der neuromuskulären Synapse ist Spectrin in Nervendigungen prä- und postsynaptisch lokalisiert (C'). An der Postsynapse formt Spectrin - vermutlich am äußeren Rand des SSRs - einen Ring, der nur teilweise mit DLG überlappt (Abb. 4-16C'').

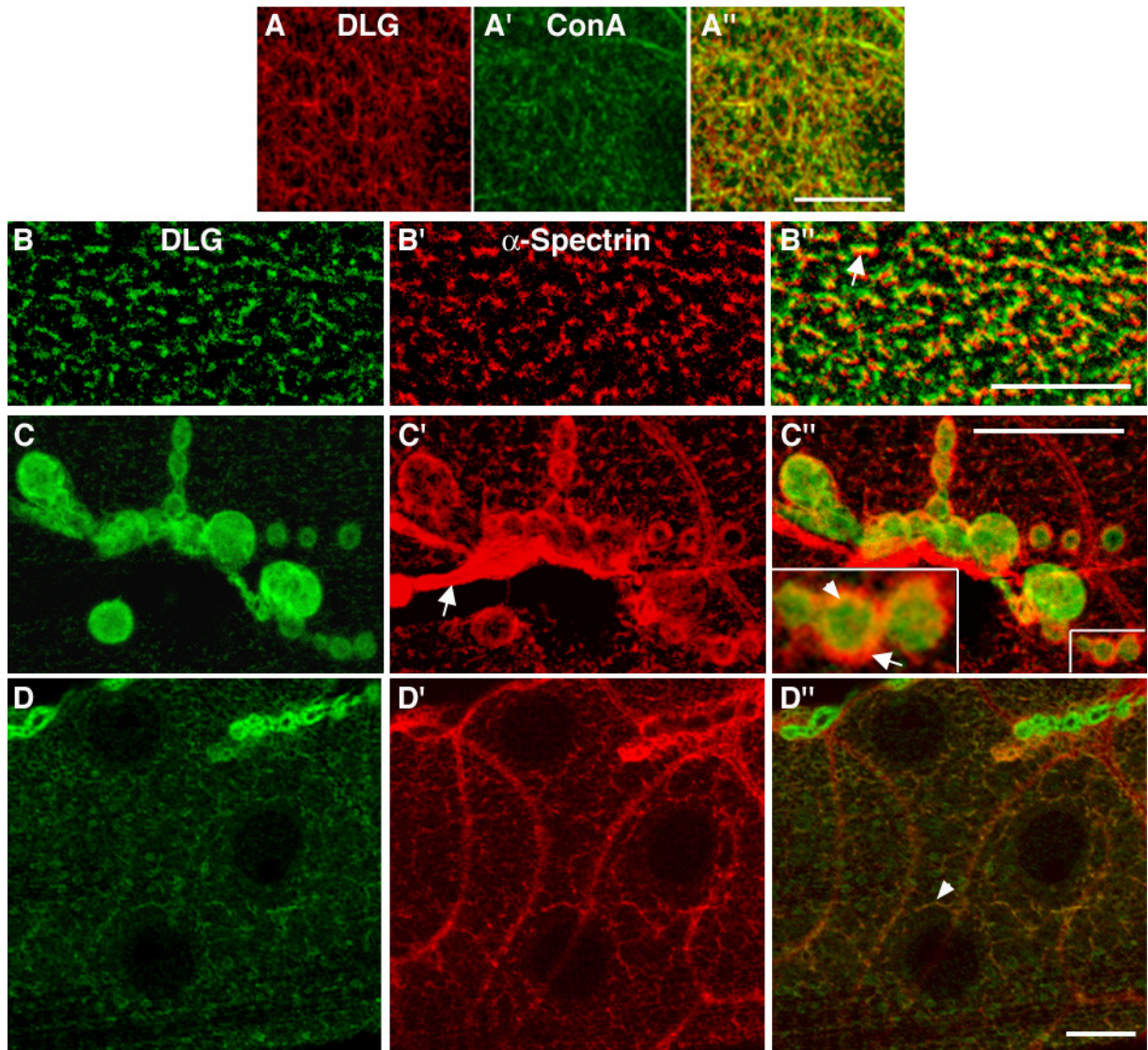


Abb. 4-16: Kovertelung von DLG mit α -Spectrin an Subkompartimenten des *Drosophila*-Larvenmuskels. A) Einzelne konfokale Bilder der Muskeloberfläche zeigen die zum Teil überlappende Markierung (A'') an Subkompartimenten der Plasmamembran von DLG (A) und Concanavalin A (A'). B) Anti-DLG_{PDZ} und anti- α -Spectrin-Immunreaktivität (B') überlappen an Subkompartimenten der Plasmamembran (B''). C) An der neuromuskulären Synapse kolokalisiert die anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität am inneren Rand mit einer durch anti- α -Spectrin-Immunreaktivität markierten ringförmigen Struktur (C''). Der Pfeil in C' weist auf das Motorneuron. D) Am subzellulären Netzwerk ist DLG nur teilweise mit α -Spectrin kovertelt (D''). Maßstab = 10 μ m.

Die Cytoskelett-Assoziation von hDLG wird durch die unabhängige Bindung von Band 4.1 an die ersten beiden PDZ-Domänen und der I3-Domäne vermittelt (Lue *et al.*, 1996). Ob diese Domänen an einer Assoziation von DLG mit α -Spectrin beteiligt sind, sollte durch die

Koverteilung von im Muskel exprimiertem Δ PDZ1+2 und Δ I3 mit α -Spectrin untersucht werden (Abb. 4-17).

In Δ PDZ1+2 exprimierenden Körperwandpräparaten zeigte die anti- α -Spectrin-Immunreaktivität neben der Lokalisierung in den Subkompartimenten der Plasmamembran Akkumulationen, die mit den von Δ PDZ1+2 gebildeten Clustern kolokalisierten (A'). Dieser Befund konnte auch durch Färbung mit anti- α -Spectrin-Antikörpern allein verifiziert werden (Daten sind nicht gezeigt). Δ I3 war zum Teil im gleichen Bereich wie das von α -Spectrin markierte Netzwerk verteilt, zeigte aber keine Anreicherung an diesen Strukturen (B'). Da α -Spectrin durch die Expression von Δ PDZ1+2 umorganisiert wurde, sollte durch Vergleich der Spectrinorganisation im Wildtyp und *dlg*-Mutanten überprüft werden, ob DLG am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt ist. Jedoch zeigten sich keine offensichtlichen Unterschiede (C).

Die PDZ-Domänen von DLG scheinen für die Interaktion mit Spectrin, falls überhaupt, eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, da erstens Spectrin in die von Δ PDZ1+2 gebildeten Cluster rekrutiert werden kann. Zweitens reichen die im Δ I3-Konstrukt vorhandenen PDZ-Domänen nicht für eine spezifische Lokalisation an den mit Spectrin markierten Subkompartimenten. Eine Lokalisation an diesen Subkompartimenten wird demnach vermutlich durch die I3-Domäne vermittelt.

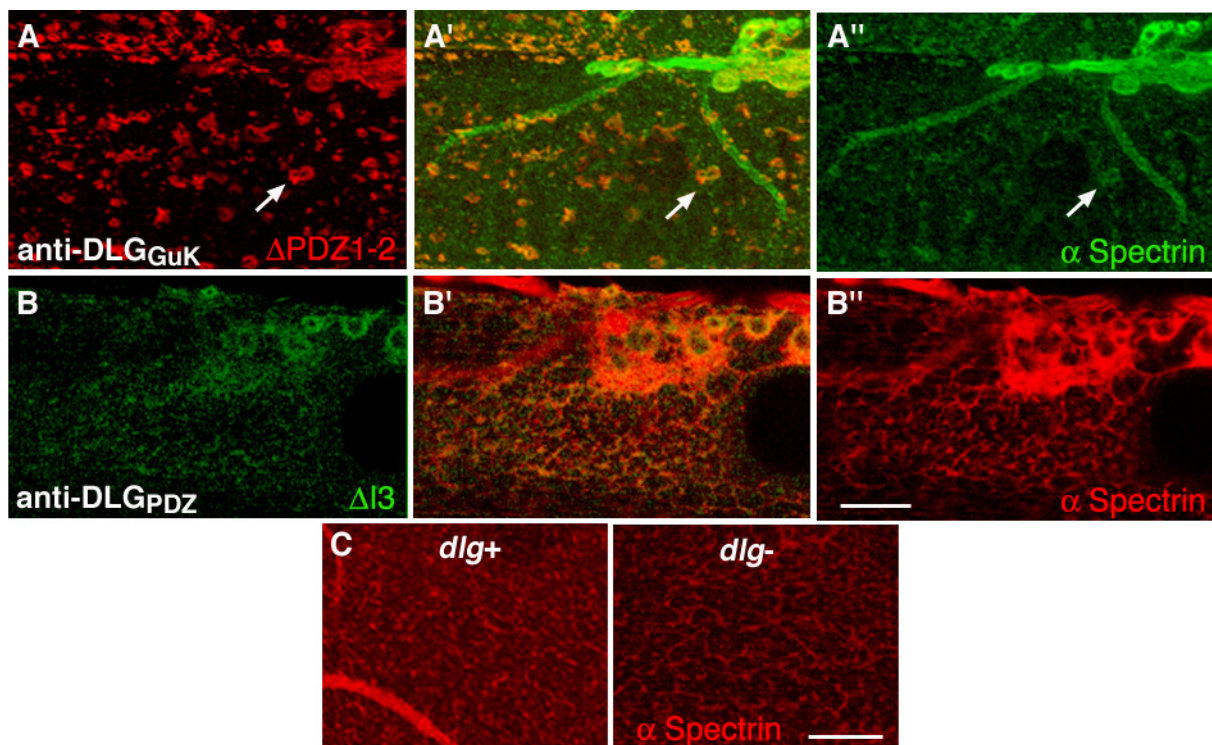


Abb. 4-17: I3 vermittelt die Lokalisation an Subkompartimente, die mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett assoziiert sind. Gezeigt werden einzelne konfokale Aufnahmen. A) Rekrutierung von α -Spectrin (A''/A') in Akkumulationen von Δ PDZ1+2 an der Plasmamembran (A/A''). B) Δ I3 (B) und α -Spectrin (B'') sind in einem ähnlichen Bereich des Muskels verteilt. Δ I3 bleibt jedoch, im Gegensatz zu DLG (Abb. 4-16), diffus verteilt. C) anti- α -Spectrin-Immunreaktivität an der Plasmamembran von Wildtyp- und *dlg*^{X1-2}-Körperwandpräparaten. Maßstab = 10 μ m.

Die immunhistochemische Lokalisierung von Actin in Subkompartimenten des Muskels mittels TRITC-gekoppeltem Phalloidin ließ, aufgrund der massiven Färbung von Actin in den Myofibrillen, keine räumliche Auflösung zu. Deshalb wurde eine mögliche Assoziation von DLG mit Actin durch Inkubation von Körperwandpräparaten mit der F-Actin destabilisierenden Substanz Cytochalasin D (CytoD) getestet (Abb. 4-18). Durch CytoD wurde DLG weitgehend aus den Subkompartimenten der Plasmamembran und dem subzellulärem Netzwerk abgelöst (B/B'), die synaptische Lokalisation blieb im Vergleich zum Kontrollpräparat jedoch weitgehend unverändert (A). Zudem schien die direkte oder indirekte Verknüpfung von DLG mit dem Cytoskelett nicht sehr stabil zu sein, da extrasynaptisches und synaptisches DLG durch zwei-minütiges Waschen mit TritonX-100 haltigem Puffer ausgewaschen bzw. solubilisiert werden konnte (D'). Die nach Expression von Δ PDZ1+2 auftretenden Cluster an der Oberfläche blieben jedoch unverändert (C/D). Ob dies aufgrund einer stabileren Interaktion mit dem Cytoskelett durch Akkumulation von Spectrin oder anderen Interaktionen beruht, konnte nicht geklärt werden.

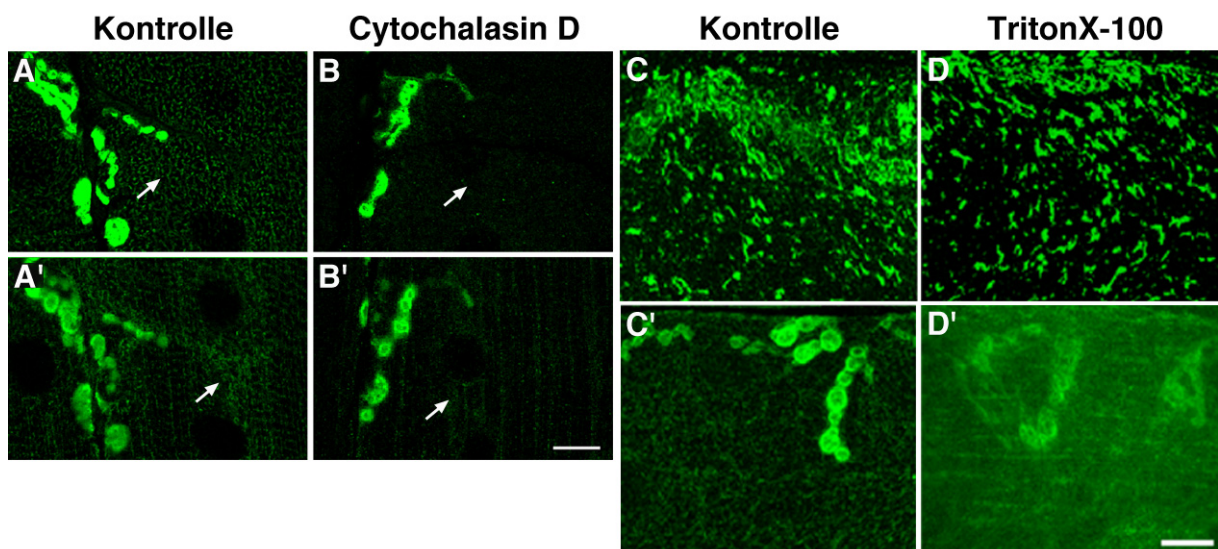


Abb. 4-18: Unterschiedliche Cytoskelettverankerung von Δ PDZ1+2 und DLG. A/B) Die Lokalisierung von DLG an den Subkompartimenten der Plasmamembran und dem subzellulärem Netzwerk (Kontrolle, A/A') wird durch Inkubation mit CytoD vermindert (B/B'). C/D) DLG wird im Gegensatz zu Δ PDZ1+2 durch 0,02 % TritonX-100 aus den Subkompartimenten der Plasmamembran ausgewaschen (D/D'). Maßstab = 10 μ m.

4.4 Neuartige DLG-Spleißvarianten

4.4.1 Genomische Organisation und Transkripte

In Western-Blot-Analysen von larvalen Körperwandhomogenaten konnten mit anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern zwei unterschiedliche Banden (116 kDa und 97 kDa) nachgewiesen werden. Ursache hierfür könnte alternatives Spleißen des Genprodukts sein. Bei den Vertebraten-MAGuKs sind etliche Spleißvarianten bekannt, die sich vor allem in den nicht konservierten Bereichen, der N-terminalen Region und der Hook-Region, unterscheiden. Nach der voll-

ständigen Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms konnten in der Berkeley Drosophila Genome Project- (BDGP)-Datenbank „expressed sequence tags“ (ESTs) festgestellt werden, die für neuartige DLG-Spleißvarianten kodierten. Diese zeigten auf Proteinebene eine 66-%ige Identität mit den ersten 65 Aminosäuren des N-Terminus des Vertebratenhomologen SAP97 (Abb. 4-19A). Die kodierende Region konnte 5' der bisher bekannten *dlg*-Transkriptionseinheit lokalisiert werden (Abb. 4-19B).

Zur Analyse der Transkriptionseinheiten wurden 5 verschiedene ESTs (siehe Abb. 4-19C) sequenziert und die Exon-Intron-Struktur durch Vergleich der cDNA-Sequenzen mit der Sequenz der genomischen BDGP-Klone AE003485 und AE003486 analysiert. Hieraus ergab sich, dass sich der *dlg*-Locus über eine Region von 34,7 kb erstreckt und sich die kodierende Region über 23 Exone verteilt. Die bisher bekannte DLG-Isoform (DLG-A) wird, mit Ausnahme des Exons 19, von Exon 9-23 kodiert. Die Analyse der ESTs ergab drei weitere, neuartige DLG-Varianten (Abb. 4-19C):

- 1. S97N:** Basierend auf drei der EST-Sequenzen aus embryonalen und larvalen cDNA-Banken (LD33841, LP07807, LD02441) konnte eine von der bisher bekannten *dlg*-Transkriptionseinheit unabhängige Variante von 208 Aminosäuren (24,4 kDa) vorhergesagt werden, die im 5' Bereich für den SAP97-N-Terminus ähnlichen Abschnitt kodiert (Exon 2, 4, 5) und im 3' Bereich keine Homologie zu bekannten Proteinen aufweist (Exon 6-8).
- 2. PEST-DLG:** Eine weitere Transkriptionseinheit (GH01107) beginnt in Exon 3, welches für ein PEST-Motiv kodiert. Das PEST-Motiv ist eine Sequenz, die die proteosomale Degradation kurzlebiger Proteine vermittelt (Rogers *et al.*, 1986). PEST-DLG beinhaltet weiter Exon 4-7 der S97N-Form und wird zu Exon 11 der ursprünglichen *dlg*-Variante (vor PDZ1) gespleißt. Hinter PDZ2 (Exon 12a) wird zu einem, für 15 Aminosäuren kodierenden, alternativen Exon gespleißt und zu Exon 19, das den Translationsstop beinhaltet. Diese Variante kodiert somit für ein Protein mit einem Teil des alternativen N-Terminus und den ersten beiden PDZ-Domänen mit einem errechneten Molekulargewicht von 88,7 kDa.
- 3. DLG-S97:** Bei Klon GH18117 (adulte Kopf-cDNA-Bank) handelte es sich um eine *dlg*-Variante, die bis Exon 7 zu S97N identisch ist, dann wie S97N-PEST zu Exon 11 (vor PDZ1) gespleißt wird. Von Exon 12a wird alternativ zu Exon 13 gespleißt, was gegenüber DLG-A zu einer Verkürzung des Bereichs zwischen PDZ2+3 führt. Die weitere Sequenz war bis Exon 18 identisch zur bisher bekannten *dlg*-Transkriptionseinheit. Allerdings konnte das Stopcodon nicht ermittelt werden, da GH18117 eine Chimäre aus unterschiedlichen cDNAs ist. Jedoch kann aufgrund der im Western-Blot (siehe 4.5.2) detektierten Größe (116 kDa) das Vorhandensein der Hook-Region und der GuK-Domäne

(Exon 20-23) vermutet werden. Durch PCR auf zwei unabhängigen cDNA-Banken konnte die Spleißvariante ohne Exon 12b bestätigt werden (Abb. 4-20D).

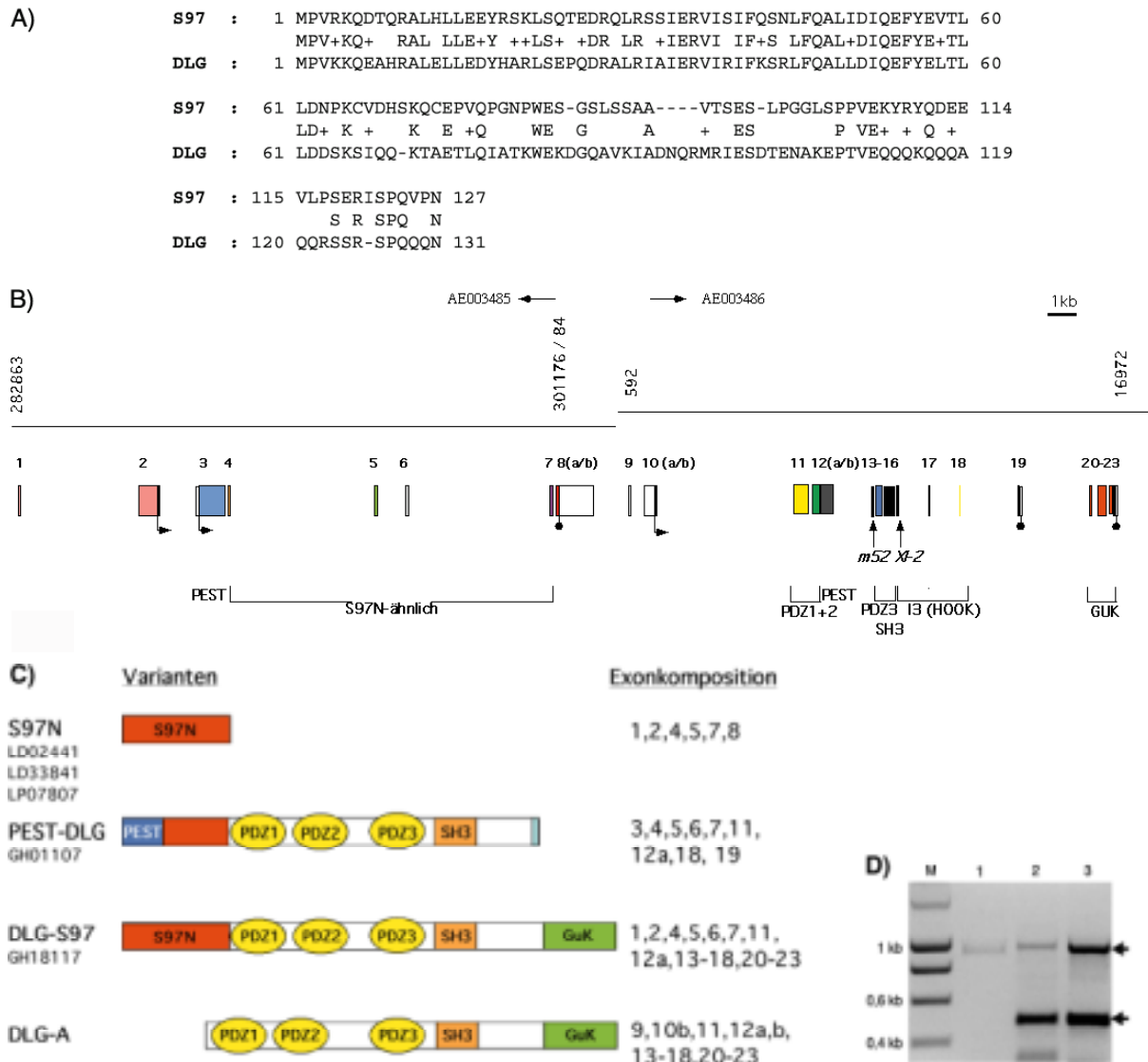


Abb. 4-19: Genomische Organisation von *dlg* und Transkriptionsvarianten. A) Sequenzhomologie des N-Terminus von SAP97 und DLG auf Proteinebene. B) Exon-Intron-Struktur von *dlg*: Die Linien markieren die überlappenden genomischen Klone AE003485 und AE003486. Darunter ist die Lage der Exone und die kodierten Domänen eingezeichnet. Putative Translationsstarts sind durch Pfeile, Translationsstops durch Punkte gekennzeichnet. C) Schema der durch verschiedene ESTs kodierten alternativen Varianten und Exonkomposition der einzelnen Varianten. D) Nachweis der verkürzten Region zwischen PDZ2+3 der Spleißvariante DLG-S97 durch Amplifikation aus zwei unterschiedlichen cDNA-Banken. Spur 1: *dlg*-cDNA-Kontrolle, Spur 2: Hovemann-cDNA-Bank, Spur 3: LD-cDNA-Bank.

4.4.2 Immunhistochemische Untersuchung zur Expression der SAP97N-Varianten im Wildtyp und in *dlg*-Mutanten

Durch Immunhistochemie wurde untersucht, ob die „*in silico*“ gefundenen Varianten an der neuromuskulären Synapse lokalisiert sind. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der gegen den zu SAP97 konservierten Bereich des neuartigen DLG-N-Terminus gerichtet ist (anti-DLG_{S97N}, zur Verfügung gestellt von Jimena Serralta, Universidad de Chile, Santiago).

Zunächst wurde die Verteilung der Varianten im Verlauf der larvalen Entwicklung untersucht (Abb. 4-20A). Die anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität war im ersten und zweiten Larvenstadium (L1/L2) an der neuromuskulären Synapse und an extrasynaptischen Bereichen, d. h. dem subzellulären Netzwerk und unterhalb der Plasmamembran, angereichert. Im dritten Larvenstadium (L3) dominierte dagegen die postsynaptische Lokalisierung. In L1 und L2 war die anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität hinsichtlich der subzellulären Verteilung identisch zur anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität. Im dritten Larvenstadium wurde die neuromuskuläre Synapse von beiden Antikörpern markiert, die extrasynaptischen Kompartimente hingegen ausschließlich von anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Expression der Varianten in *dlg*-Mutanten beeinträchtigt ist. Hierfür wurden Körperwandpräparate und Gehirne von Wildtyp-Larven und *dlg*^{XI-2}-, *dlg*^{m52}- und *dlg*^{m30}-Mutanten im dritten Stadium parallel mit anti-DLG_{PDZ}- und anti-DLG_{S97N}-Antikörpern untersucht. Die beiden Reihen der Abb. 4-20B zeigen Aufnahmen vom Larven-ZNS des Wildtyps und der Mutanten in der genannten Reihenfolge. Sowohl die anti-DLG_{PDZ}- als auch anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität zeigten im Neuropil lichtmikroskopisch kaum Unterschiede in der Proteinexpression und Lokalisation. Dagegen zeigte sich ein deutlicher Effekt an der neuromuskulären Synapse (Abb. 4-20C). In Wildtyp und *dlg*^{m30} zeigte sich eine starke Immunreaktivität von DLG an der Plasmamembran und an synaptischen Boutons, die anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität befand sich dagegen fast ausschließlich an synaptischen Boutons. In *dlg*^{XI-2}- und *dlg*^{m52}-Mutanten war die verbleibende Immunreaktivität beider Antikörper im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Diese beschränkte sich bei der anti-DLG_{PDZ}-Färbung auf die Synapse, wohingegen die anti-DLG_{S97N}-Färbung neben einer schwachen Markierung der Boutons vermehrt im Muskel zu beobachten war.

Dieser überraschende Befund, d. h. die unterschiedliche Expression im larvalen Neuropil und an der neuromuskulären Synapse, könnte durch zwei verschiedene Mutmaßungen erklärt werden. Erstens ließe sich ein Teil der Immunreaktivität auf Spleißvarianten, die nicht von der Mutation betroffen sind, zurückführen. Die Mutationen in den Allelen *dlg*^{m52} und *dlg*^{XI-2} führen zu einem Spleißdefekt und dadurch zum Abbruch der Translation nach Exon 13 bzw. 16. Diese beiden Exone sind in den Varianten S97N und PEST-DLG nicht enthalten, weshalb deren Expression in den beiden Allelen unabhängig von den Mutationen sein sollte.

Zweitens könnten mutierte Genprodukte im Neuropil stabiler sein und so eine intensivere Färbung des Neuropils im Vergleich zur neuromuskulären Synapse bewirken.

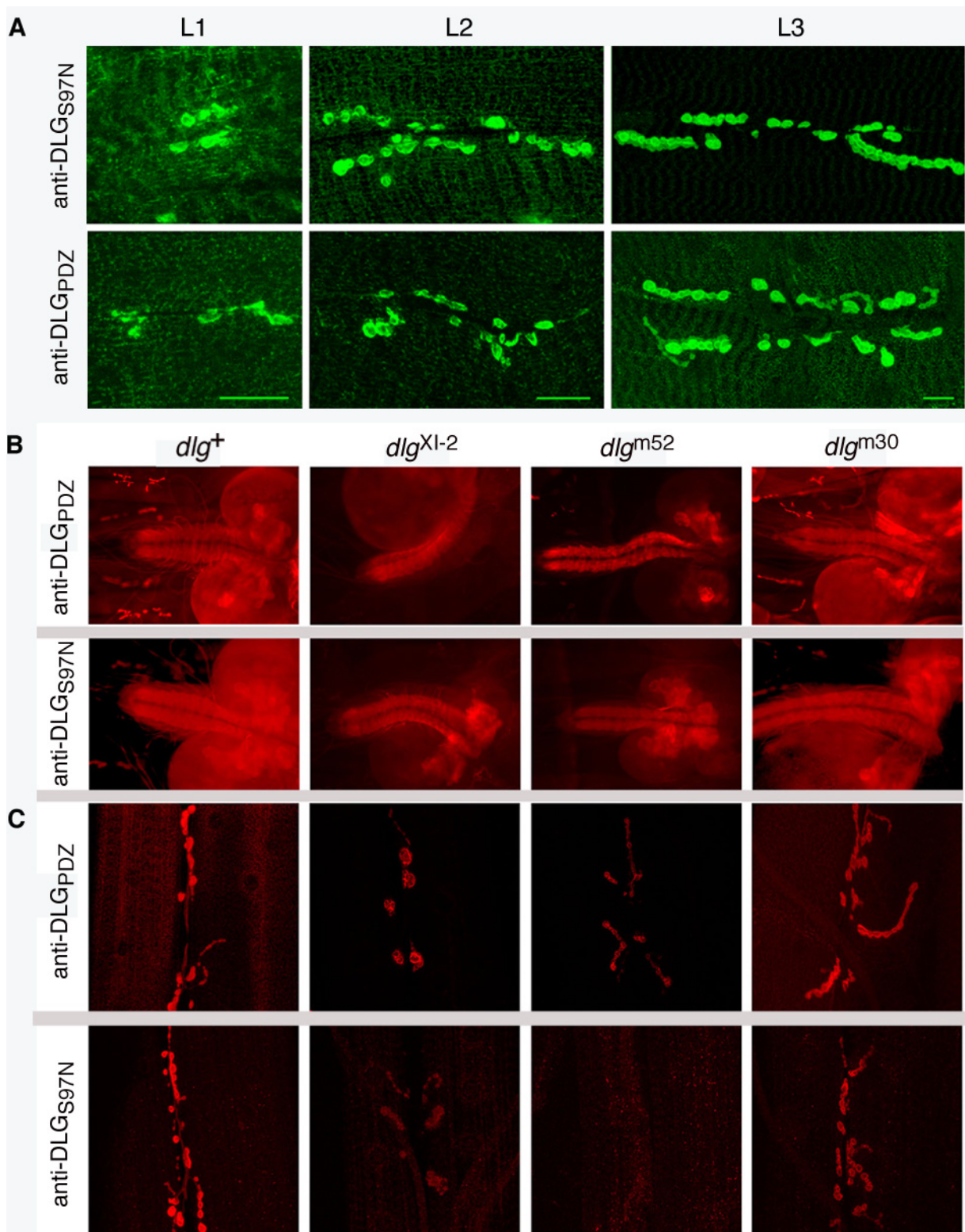


Abb. 4-20: Die neuartigen DLG-Varianten sind im Neuropil des ZNS und an der neuromuskulären Synapse lokalisiert. Gezeigt werden A/C) konfokale Aufnahmen von neuromuskulären Synapsen, B) CCD-Kameraaufnahmen von larvalen Gehirnen. Um einen Intensitätsvergleich zu ermöglichen, wurden die Aufnahmen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. A) In den ersten beiden Larvenstadien (L1/L2) ist sowohl die anti-DLG_{S97N}- als auch die anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität im subsynaptischen Netzwerk und an der neuromuskulären Synapse lokalisiert. Im dritten Larvenstadium (L3) werden synaptische Boutons von beiden Antikörpern markiert, extrasynaptische Bereiche, wie die Subdomänen der Plasmamembran, zeigen hingegen nur anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität. Maßstab = 10 μ m. B) Anti-DLG_{PDZ}- und anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität im ZNS/Neuropil von Wildtyp (w1118) und von *dlg*-Mutanten. C) Immunreaktivität beider Antikörper in Körperwandpräparaten von Wildtyp und *dlg*-Mutanten im dritten Larvenstadium.

4.4.3 Nachweis durch Western-Blot-Analyse

Um zu klären, welche der Varianten tatsächlich an der neuromuskulären Synapse bzw. im Muskel exprimiert werden, wurden Körperwandhomogenate von Wildtyp und den in der Immunhistochemie verwendeten *dlg*-Mutanten mittels Western-Blot überprüft. Die Proteinmenge der aus Wildtyp-, *dlg*^{XI-2}-, *dlg*^{m52}- und *dlg*^{m30}-Larven gewonnenen Homogenate wurde mittels Coomassie-Blau-Färbung eines SDS-Gels abgeschätzt (Abb. 4-21A).

Die anti-DLG_{PDZ}-Färbung zeigte sowohl bei Wildtyp als auch bei *dlg*^{m30} die charakteristische Doppelbande von 97 kDa und 116 kDa, die anti-DLG_{S97N}-Färbung dagegen zeigte lediglich eine Bande, die der 116 kDa-Bande der anti-DLG_{PDZ}-Färbung entsprach. Im Homogenat aus *dlg*^{XI-2}-Larven konnte mit anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern eine im Vergleich zum Wildtyp-Homogenat geringere Menge des durch einen Spleißdefekt verkürzten DLGs (circa 80 kDa) detektiert werden. Mit anti-DLG_{S97N}-Antikörpern konnte in den beiden Allelen *dlg*^{m52} und *dlg*^{XI-2} kein Protein nachgewiesen werden. Aus diesen Beobachtungen kann abgeleitet werden, dass DLG-S97, neben dem bisher bekannten DLG-A, eine prominente Variante im Muskel bzw. an der neuromuskulären Synapse ist.

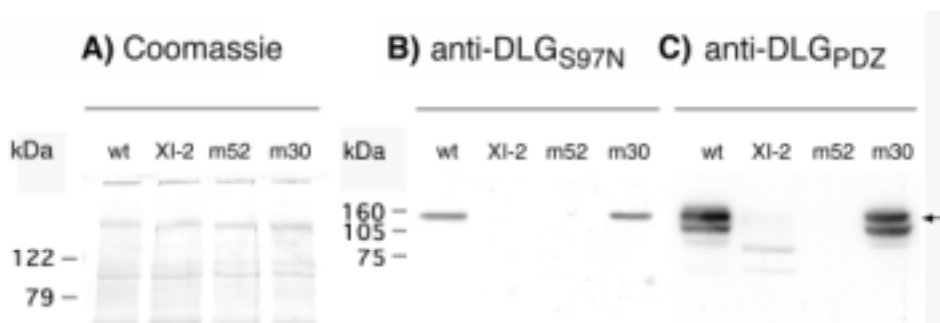


Abb. 4-21: Vergleich der Expression von DLG-Isoformen mit alternativem N-Terminus und DLG-A im Wildtyp und in *dlg*-Mutanten durch Western-Blot-Analyse von Körperwandhomogenaten aus *Drosophila*-Larven im dritten Stadium. A) Die Coomassie-Färbung eines SDS-Gels zeigt, dass gleiche Proteinmengen in der Western-Blot-Analyse eingesetzt wurden. B) Durch anti-DLG_{S97N}-Antikörper wird nur eine Bande im wt- und m30-Homogenat detektiert. C) Anti-DLG_{PDZ}-Antikörper zeigen die charakteristischen Doppelbanden im wt- und m30-Homogenat und ein verkürztes Protein im XI-2-Homogenat. 1: Wildtyp, 2: *dlg*^{XI-2}, 3: *dlg*^{m52}, 4: *dlg*^{m30}.

4.4.4 Der alternative N-Terminus als synaptisches Lokalisierungssignal

DLG-S97 ist vermutlich die im Muskel vorherrschend exprimierte Form der neuartigen Varianten und zeigt im dritten Larvenstadium relativ zu extrasynaptischen Stellen eine deutliche Anreicherung an der neuromuskulären Synapse. DLG-S97 und DLG-A unterscheiden sich vor allem durch den N-Terminus, weshalb ein zusätzliches synaptisches Lokalisierungssignal innerhalb dieser Domäne vermutet werden kann.

Einen möglichen Hinweis darauf lieferte die postsynaptische Expression des mit EGFP markierten SAP97-N-Terminus (Abb. 4-22). EGFP-SAP97-N-PDZ1/2 (siehe Abb. 4-2) zeigte neben einer diffusen cytoplasmatischen Verteilung auch eine von *dlg* unabhängige synaptische Lokalisation. Demnach könnte der alternative DLG-N-Terminus ein synaptisches Lokalisierungssignal für die spezifische Rekrutierung an die Synapse darstellen.

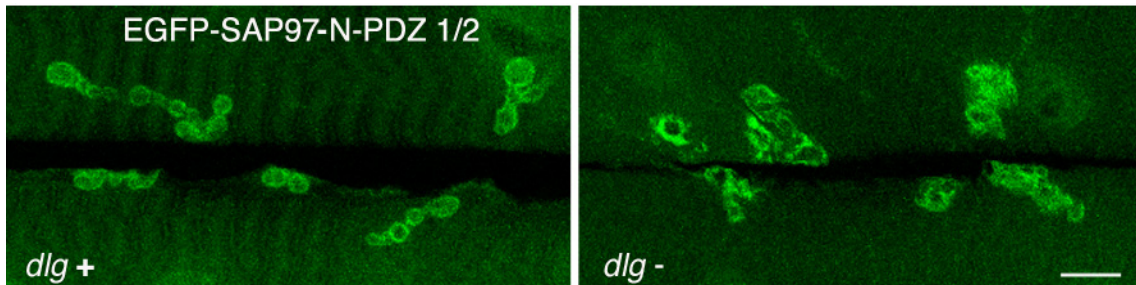


Abb. 4-22: Lokalisierung des postsynaptisch exprimierten SAP97-N-Terminus. Gezeigt werden konfokale Projektionen von Körperwandpräparaten von Larven im dritten Stadium. Lokalisierung von EGFP-SAP97N-PDZ1/2 im *dlg*⁺- und *dlg*⁻-Hintergrund. Maßstab = 10 μ m.

4.4.5 Regulation der Lokalisation von DLG-S97 durch CaMKII

Die synaptische Lokalisation von DLG wird durch CaMKII vermittelte Phosphorylierung der 1. PDZ-Domäne reguliert (Koh *et al.*, 1999). Um die Rolle der CaMKII auf die Lokalisation von DLG-S97 zu ergründen, wurde Wildtyp-CaMKII (UAS-CaMKII R3) und CaMKII-Mutanten im Muskel exprimiert (Jin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Bei einer der mutanten Formen wurde durch Substitution des Threonins 287 durch Aspartat (CaMKII_{T→D}) eine Autophosphorylierung des Enzyms simuliert, die zu einer Ca²⁺-unabhängigen konstitutiv aktiven Form führt. CaMKII_{T→A} ist eine Ca²⁺-abhängig konstitutiv aktive Form, bei der aufgrund des Austauschs von Threonin 287 nach Alanin die Autophosphorylierung blockiert ist (Jin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu den von (Koh *et al.*, 1999) beschriebenen Befunden führte die Expression der Wildtyp-CaMKII, im Vergleich zu den Wildtyp-Präparaten, zu einer Anreicherung von anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität. Diese Anreicherung zeigte auch die anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität (Abb. 4-23A). Um die Spezifität dieses Effekts zu überprüfen, wurde UAS-WT-CaMKII mittels des Gal4-Effektorstamms BG487 in den longitudinalen Muskeln 6/7 und 12/13 exprimiert (Abb. 4-23B). Die Immunreaktivität beider Antigene in diesen Muskeln hob sich deutlich von der benachbarter Muskeln ab. CaMKII_{T→D} führte, wie publiziert, zu einer veränderten Synapsenstruktur und einhergehender verminderter anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität (Abb. 4-24A). Die synaptische anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität war ebenfalls reduziert. Zusätzlich konnte eine punktierte Färbung im Muskel und den Muskelkernen beobachtet werden. Diese Muskel- und Kernfärbung zeigte sich auch nach Expression von

CaMKII_{T→A}. Im Vergleich zum Wildtyp schien jedoch die Immunreaktivität beider DLG-Varianten an der Synapse unverändert.

Demnach kann die Lokalisierung aller DLG-Varianten, die im Muskel exprimiert sind, durch CaMKII reguliert werden.

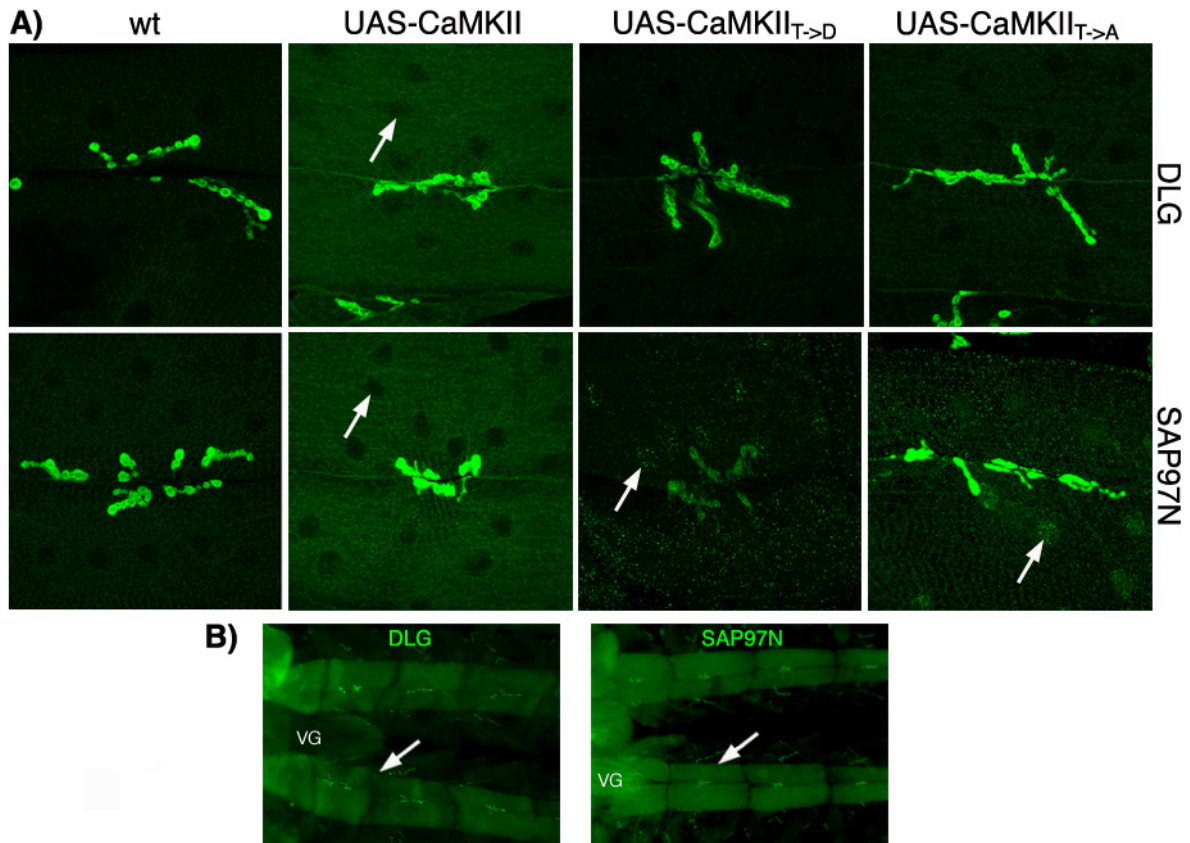


Abb. 4-23: Die Lokalisierung von DLG-Varianten wird durch CaMKII reguliert. A) Konfokale Projektionen zeigen die anti-DLG_{S97N}- und anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität in Wildtyp-Präparaten und nach Expression von WT-CaMKII, CaMKII_{T→D} und CaMKII_{T→A}. Nach Expression von CaMKII_{T→D} und CaMKII_{T→A} zeigt sich, im Gegensatz zu WT-CaMKII, eine körnig erscheinende anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität im Zellkern und Muskel. Zum besseren Vergleich sind Zellkerne in diesen Präparaten mit Pfeil markiert. B) Die Überexpression von WT-CaMKII in den Muskeln 6/7 und 12/13 führt ausschließlich in diesen Muskeln zu einer diffusen cytoplasmatischen Verteilung der anti-DLG_{S97N}- und anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität.

5 Diskussion

Während der larvalen Entwicklung ist DLG zunächst in Subkompartimenten des Muskels und erst zu einem späteren Zeitpunkt an der neuromuskulären Synapse angereichert (Thomas *et al.*, 2000). Dieser Befund lässt auf einen schrittweisen Transport von DLG an die Synapse schließen. Durch Deletion einzelner Domänen wurde deren Bedeutung für die Lokalisation an verschiedenen Subkompartimenten und für den synaptischen Transport analysiert. Um mehr über den Transportweg zu erfahren, wurden diese Kompartimente näher charakterisiert.

5.1 Lokalisation von DLG am ER - nur eine Zwischenstation?

Das ER des Muskels lässt sich in drei Subkompartimente einteilen: in ein ausgeprägtes Ca^{2+} -Speicher-Subkompartiment, das sarcoplasmatische Retikulum (SR), sowie in rauhes und glattes ER. Die Verteilung von DLG an ausgeprägten subzellulären Strukturen des Muskels, an longitudinalen Streifen über den Myofibrillen und an einer netzwerkartigen Struktur zwischen den Muskelkernen, legte eine Lokalisierung in Subkompartimenten des ERs nahe. Da diese Strukturen nach Präparation unter spezifischen Bedingungen in mit DLG-dekorierte Vakuolen zerfallen, handelt es sich um intrazelluläre membranöse Strukturen.

Zudem wies auch das Flottieren von DLG in Sucrosegradienten darauf hin, dass DLG zum großen Teil an intrazellulären Membranstrukturen lokalisiert ist. Es kann aufgrund der Vakuolisierung vermutet werden, dass es sich bei einem Großteil der flottierenden Membranstrukturen um das subzelluläre Netzwerk handelt.

Immunhistochemisch wurde die Verteilung des ERs mit drei Antikörpern, die als Marker des rauhen ERs gelten (Tooze *et al.*, 1989; Sigrist *et al.*, 2000), charakterisiert. Diese Antikörper waren gegen das ER-Lokalisierungssignal des luminalen Proteins BiP (anti-KDEL) und gegen die mit Ribosomen-assoziierten Proteine PABP und eIF4 gerichtet. Diese zeigten eine sehr ähnliche bandförmige Verteilung zwischen den Muskelkernen, die jedoch nicht deckungsgleich war. Auch unmittelbar unterhalb der Plasmamembran zeigten sich Unterschiede. Hier zeigte nur die anti-KDEL-Färbung eine feinkörnige Struktur direkt unterhalb der Plasmamembran. Die Markierung unterschiedlicher Subdomänen wurde auch am subsynaptischen Retikulum (SSR) deutlich. Die anti-KDEL-Immunreaktivität wurde nicht wie die anti-PABP- und die anti-eIF4-Immunreaktivität in auffälligen Komplexen angereichert. Da die anti-KDEL-Markierung unter unphysiologischen Bedingungen parallel zu den mit DLG-dekorierten Vakuolen umverteilt wurde und nur ein geringer Anteil der Vakuolen mit anti-KDEL-Immunreaktivität markiert wurden, kann vermutet werden, dass das subzelluläre

Netzwerk ein weiteres Subkompartiment des ERs, möglicherweise das glatte ER oder das SR, ist.

Das SR spielt bei der Kontraktion des Muskels eine wichtige Rolle. Die Kontraktion des Muskels wird nach der Depolarisierung der Oberflächenmembran durch Freisetzung von Ca^{2+} aus cytoplasmatischen Speichern (SR) aktiviert. Dieser Prozess, der Exzitations-Kontraktions-Koppelung genannt wird, findet an intrazellulären Verbindungen der Plasmamembran und deren Einstülpungen, den transversen Tubuli (T-Tubuli) und dem SR, statt (Übersicht in Franzini-Armstrong, 1999). Razzaq *et al.* (2001) und Zelhof *et al.* (2001) zeigten kürzlich, dass Amphiphysin (Amph) an der Ausbildung von T-Tubuli beteiligt ist und sowohl im SSR von Typ-I-Boutons als auch an T-Tubuli mit DLG kolokalisiert. Eine direkte Interaktion mit DLG konnte nicht nachgewiesen werden. In *amph* Mutanten ist das T-Tubuli-System stark beeinträchtigt und auch das subzelluläre Netzwerk zeigt eine Veränderung des Erscheinungsbildes. DLG wird in nicht näher charakterisierten Subkompartimenten des Muskels verstärkt angereichert. Da in der Veröffentlichung die longitudinalen Kompartimente über bzw. zwischen den Myofibrillen gezeigt werden, deren Erscheinungsbild in *amph*-Mutanten im Vergleich zu den T-Tubuli weniger betroffen ist, besteht die Möglichkeit, dass es sich hier um das sarcoplasmatische Retikulum handelt. Möglicherweise ist auch die netzwerkartige Struktur zwischen den Muskelkernen Teil des SRs. Dies könnte durch Kofärbung mit Markern des SRs, z. B. der SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), überprüft werden, die zum Zeitpunkt der Arbeit nicht zur Verfügung standen.

Durch die DLG-Deletionsstudie konnte gezeigt werden, dass für die Lokalisation an subzellulären Kompartimenten die Hook-Region essentiell ist. Eine essentielle Rolle spielt der putative α -helicale Teilbereich ($\Delta\text{E-F}$), da die Expression von $\Delta\text{E-F}$ zu einer gleichen Verteilung im Muskel wie die Deletion der gesamten Region (ΔHook) führte, nämlich zu einer diffusen Verteilung im Cytoplasma und einer Lokalisation in Muskelkernen. Interessanterweise führte die Deletion eines weiteren Teilbereichs, der I3-Domäne, zu einem anderen Verteilungsmuster. Eine Markierung der Muskel mit den drei unterschiedlichen Markern des rauhen ERs zeigte eine Lokalisation von ΔI3 im gleichen Bereich zwischen den Muskelkernen. Jedoch wurde ΔI3 , im Gegensatz zu überexprimiertem DLG-Flag-Protein und endogenem DLG, nicht im subzellulären Netzwerk lokalisiert.

Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass das ER und das SR ineinander übergehen (Rahkila *et al.*, 1996). Zudem werden bestimmte ER/SR-Komponenten, wie SERCA, direkt vom ER in das SR transportiert (Karin und Settle, 1992). Dieser Transport wird durch Proteine der Ankyrin-G-Proteinfamilie vermittelt, die Ionenkanäle und Zelladhäsionsproteine mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett verknüpfen (Tuvia *et al.*, 1999). Demnach könnten das rER und das subzelluläre Netzwerk zwei ineinander übergehende Subkompartimente des ERs

darstellen. Denkbar wäre, dass DLG eine ähnliche Transportfunktion wie Ankyrin erfüllt und die I3-Domäne, die bisher als Bindungspartner des Cytoskelettproteins Band 4.1 beschrieben wurde, für eine Rekrutierung aus dem rauhen ER in das Actin-Spectrin-Cytoskelett des subzellulären Netzwerks benötigt wird.

Was könnte die Funktion von DLG am ER sein?

Eine Lokalisation von MAGuKs am ER könnte zwischen Invertebraten und Vertebraten konserviert zu sein. So wurde beschrieben, dass das Vertebratenhomologe PSD-93 in Purkinjenzellen am glatten ER und an Zisternen unterhalb der Plasmamembran lokalisiert ist, wobei die Zisternen nicht näher charakterisiert wurden (Brenman *et al.*, 1998). Ein weiteres Homologes, SAP97, ist an T-Tubuli mit dem Kaliumkanal Kir2.2 assoziiert (Leonoudakis *et al.*, 2001).

Aus der Literatur gibt es zunehmend mehr Hinweise, dass Gerüstproteine nicht nur am Aufbau von Synapsen beteiligt sind, sondern schon im ER oder in cis-Golgi-Zisternen mit Ionenkanälen und Rezeptoren interagieren und somit den Transport zum Golgi-Apparat bzw. an die Synapse regulieren (Übersicht in Ma und Jan, 2002). Diese Interaktion kann den Transport zum Golgi-Apparat erleichtern oder erschweren. Zum Beispiel führt die Koexpression von SAP97 und des Shaker-Kaliumkanals Kv1.4 in heterologen Zellsystemen zu einer Zurückhaltung beider Proteine im ER, wohingegen Kv1.4 alleine oder mit PSD-95 koexprimiert, effizient die Plasmamembran erreicht (Tiffany *et al.*, 2000). Ein Beispiel der Transporterleichterung bietet die Interaktion von SAP97 und der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluR1. Diese interagieren bereits im ER oder in den cis-Golgi-Zisternen. Nach Induktion von Langzeit-Potenzierung (LTP) im Hippocampus von Ratten erfolgt ein von dieser Interaktion abhängiger Transport von GluR1-Rezeptor-Komplexen an die Synapse (Hayashi *et al.*, 2000; Sans *et al.*, 2001). Diese Transporterleichterung durch Interaktion mit PDZ-Domänen zeigten auch Untersuchungen der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Zwei der NR1 Spleißvarianten (NR1-1a und NR1-1b) enthalten ein ER-Retentionssignal, zwei weitere Spleißvarianten (NR1-3a und NR1-3b) enthalten zusätzlich ein PDZ-Bindungsmotiv. NR1-1a und NR1-1b verbleiben aufgrund des Retentionssignals im ER, wohingegen die Bindung von PDZ-Proteinen an die Untereinheiten NR1-3a / NR1-3b dieses Signal antagonisiert und somit eine Oberflächenexpression dieser Untereinheiten ermöglichen (Standley *et al.*, 2000).

Jedoch sind die genauen Mechanismen, wie PDZ-Proteine den Transport vom ER zum Golgi-Apparat beeinflussen, noch unklar. Bisher konnte, aufgrund der schlechten Qualität der verfügbaren anti-Shaker-Antikörper in der Immunhistochemie, die Kolokalisation von DLG und dessen Bindungspartner, dem Shaker-Kaliumkanal, im Muskel nicht untersucht werden.

So könnte auch DLG, neben dem Transport aus dem ER an die Synapse, den Transport bzw. die Lokalisierung von Ionenkanälen innerhalb der ER-Subkompartimente vermitteln. Da die synaptische Lokalisation von DLG in *amph*-Mutanten nicht beeinträchtigt wurde, könnte es sich um zwei unabhängige Transportwege handeln.

5.2 Lokalisation von DLG am Golgi-Apparat?

Falls DLG einen Kotransport von Transmembranproteinen aus dem ER vermittelt, müsste DLG auch am Golgi-Apparat lokalisiert sein. Das Flottieren im Sucrosegradienten parallel zu dem Golgi-Protein Fringe könnte ein Hinweis darauf sein, dass DLG neben dem ER auch am Golgi lokalisiert ist. Deshalb wurde der Golgi-Apparat im Muskel von *Drosophila*-Larven immunhistochemisch charakterisiert. Färbungen mit den Markern 120 kDa und UAS-Fringe-Myc zeigten, dass die Golgi-Zisternen über das gesamte Cytoplasma verteilt sind. Da beide Marker direkt unterhalb der Plasmamembran und über den Myofibrillen weniger Kolokalisation als auf Höhe der Kernmitte zeigten, könnten sie möglicherweise unterschiedliche Golgi-Zisternen markieren. Eine verstreute Verteilung von Golgi-Elementen wurde auch in kultivierten *Drosophila*-Zellen (S2) beobachtet (Rabouille *et al.*, 1999). Die verstreute Verteilung über den *Drosophila*-Larvenmuskel scheint zudem sehr ähnlich zu der von cis/medialen Golgi-Elementen des Vertebratenmuskels zu sein (Ralston, 1993; Ralston *et al.*, 1999; Ralston *et al.*, 2001). Ob das 120 kDa-Protein und das Fringe-Myc-Protein ebenfalls cis/mediale Golgi-Elemente markieren, könnte durch Kolokalisationsstudien mit weiteren Markern, z. B. dem *Drosophila*-Homologe der α -Mannosidase II (GMII, Rabouille *et al.*, 1999), überprüft werden, die zum Zeitpunkt der Arbeit nicht verfügbar waren. Für eine Beschränkung auf eine cis/mediale Golgi-Lokalisation spricht indirekt die Beobachtung, dass die Vertebraten-trans-Golgi-Marker anti-58K und anti-Syntaxin-6 im *Drosophila*-Larvenmuskel andere Elemente als die Golgi-Marker anti-120 kDa und anti-Myc färbten (siehe unten).

Die immunhistochemische Untersuchung zeigte, dass nur in der Nähe der Muskelkerne wenige der von anti-120 kDa-Antikörper erkannten Elemente mit dem von DLG markierten subzellulären Strukturen überlappten. Ein weiterer Teil war mit dem subzellulären Netzwerk assoziiert. Auch in Körperwandpräparaten von Larven des zweiten Stadiums trat keine vermehrte Überlappung auf. Dies könnte daran liegen, dass trotz des immensen Wachstums nur eine konstante Menge von Interaktionspartnern kotransportiert wird. Da DLG vor allem im SR und nur geringe Mengen oder nur kurzzeitig im rauhen ER lokalisiert ist, mag ein Kotransport an die Plasmamembran bzw. an die Synapse zweifelhaft erscheinen. Jedoch zeigten auch die überexprimierten Transmembranproteine GluRIIa und FasII keine vermehrte

Kolokalisation mit der anti-120 kDa-Färbung (Daten wurden nicht gezeigt). Eine mögliche Interaktion von DLG könnte deshalb in anderen Subkompartimenten des Golgi-Apparats stattfinden oder nur ein temporäres Ereignis sein.

Golgi-Elemente im SSR der neuromuskulären Synapse

Die anti-58K- und anti-Syntaxin-6-Antikörper zeigten Immunreaktivität unterhalb der Plasmamembran und an der neuromuskulären Synapse. Durch Kolokalisationstudien mit DLG und mit der postsynaptisch exprimierten Glutamatrezeptor-Untereinheit GluRIIB konnten die potentiellen trans-Golgi-Elemente im SSR in von DLG ausgesparten Zonen lokalisiert werden.

Welche Proteine werden von den anti-Syx-6- und anti-58K-Antikörpern in *Drosophila* erkannt?

D-Syx-6 ist zum Homologen aus Ratte zu 75 % konserviert. Erste Versuche des Antigennachweises mittels Western-Blot-Analyse zeigten, dass von den monoklonalen Antikörpern nur unspezifische Banden detektiert wurden. Um zu überprüfen, ob D-Syx-6 von dem anti-Syx-6- und vielleicht von anti-58K-Antikörpern erkannt wird, soll in weiterführenden Experimenten die konservierte cytoplasmatische Region (Kasai und Akagawa, 2001) als Fusionsprotein exprimiert werden, um dieses anschließend im Western-Blot zu analysieren. Das 58K-Antigen wurde als eine spezifisch im Golgi-Kompartiment von Leberzellen ansässige Formiminotransferase-Cyclodeaminase (FTCD) beschrieben (Bashour und Bloom, 1998; Gao *et al.*, 1998; Hennig *et al.*, 1998). Dies ist insofern kritisch zu bewerten, da anti-58K-Antikörper als Golgi-Marker der unterschiedlichsten Zelltypen verwendet werden. Es bedarf demnach noch weiterer Untersuchungen, die Identität der durch anti-58K- und anti-Syx-6-Antikörper erkannten Antigene endgültig zu klären.

Syntaxin-6 ist Mitglied der sogenannten SNARE Proteine, die eine Verschmelzung von Vesikeln mit verschiedenen Membrankompartimenten ermöglichen. Viele SNARE-Proteine sind von Hefe bis Mammalia hochkonserviert, was auf konservierte Mechanismen des Vesikel-Transports in allen eukaryotischen Zellen schließen lässt. Syx-6 ist vor allem am trans-Golgi-Kompartiment (Bock *et al.*, 1996; 1997), aber auch an frühen Endosomen (Simonsen *et al.*, 1999) lokalisiert.

Die Umverteilung der synaptischen anti-58K-Immunreaktivität nach Inkubation von Körperwänden mit Brefeldin A spricht dafür, dass tatsächlich das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) erkannt wurde. Brefeldin A inhibiert Proteine, die die Proteinsortierung und somit den Transport ans Zielkompartiment regulieren. Die Inhibierung des Transports führt zum Kollaps der trans-Golgi-Zisternen und zu deren Umverteilung ins ER (Dascher und Balch, 1994; Sciaky *et al.*, 1997).

Rauhes ER und trans-Golgi-Zisternen wurden bereits an der neuromuskulären Synapse von Vertebraten (Jasmin *et al.*, 1995) und in Dentrinen von Vertebraten-Neuronen beschrieben (Gardiol *et al.*, 1999). Es ist jedoch noch nicht abschließend bearbeitet, ob die Golgi-Elemente auch unmittelbar an der Synapse lokalisiert sind (Steward und Schuman, 2001). Eine mögliche Funktion könnte die Beteiligung an langfristigen synaptischen Veränderungen sein, die, wie bereits bei Vertebraten beschrieben, die Einlagerung neuer Proteine benötigen. Diese werden z. T. direkt an der Synapse translatiert und in Golgi-Elementen prozessiert (Richter und Lorenz, 2002; Steward und Schuman, 2001). Sigrist *et al.* (2000) fanden an der neuromuskulären Synapse von *Drosophila* neben Komponenten der Translationsmaschinerie, den mit Ribosomen assoziierten Proteinen PABP und eIF4, auch mRNA der Glutamat-rezeptor-Untereinheit GluRIIA. Dies lässt auf eine lokale Translation an der neuromuskulären Synapse schließen. Rezeptoren werden in der Regel im Golgi-Apparat zum funktionellen Rezeptor prozessiert, so dass die beobachteten trans-Golgi-Elemente im SSR durchaus Sinn machen.

5.3 Vermittelt die GuK-Domäne den Transport entlang von Mikrotubuli?

Die Vertebratenhomologen PSD-95 und PSD-93 werden aus dem Golgi-Apparat in Vesikeln entlang von Mikrotubuli an die Synapse transportiert (Brenman *et al.*, 1998; El-Husseini *et al.*, 2000). Ob DLG auf ähnlichem Weg transportiert werden könnte, wurde durch immunhistochemische und biochemische Analysen untersucht.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass DLG an den längsgerichteten Subkompartimenten über den Myofibrillen und unmittelbar unterhalb der Plasmamembran mit Mikrotubuli kolokalisierte. Eine Interaktion von DLG mit Mikrotubuli konnte durch Kopräzipitation von DLG-Flag mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli aus Körperwandpräparaten nachgewiesen werden.

Ein Resultat der Deletionsstudie war, dass Δ GuK nur in Gegenwart von endogenem DLG effizient an die Synapse transportiert wurde. Deshalb konnte angenommen werden, dass die GuK-Domäne des endogenen DLGs einen Kotransport vermittelt. Durch Koimmunpräzipitation von DLG-Flag konnte eine Interaktion mit endogenem DLG, nicht aber mit Δ GuK nachgewiesen werden. Δ GuK könnte demnach, wie bereits in Thomas *et al.* (2000) postuliert, unabhängig von einer Interaktion zusammen mit endogenem DLG transportiert werden. Ein Kotransport könnte über Vesikel, die gleichzeitig endogenes DLG und Δ GuK enthalten, erreicht werden. Dies würde auch erklären, warum die GuK-Domäne bei Studien in unterschiedlichen Zellsystemen nicht für eine Lokalisation benötigt wurde, da in den untersuchten Zellen auch endogene MAGuKs vorhanden waren (Arnold und Clapham, 1999;

Craven *et al.*, 1999; Hough *et al.*, 1997). Da aber auch die Δ GuK-Variante im *dlg*-mutanten Hintergrund mit Taxol-stabilisierten Mikrotubuli kopräzipitierte, könnten auch andere Bereiche von DLG eine Interaktion vermitteln. Diese wäre aber nicht für einen effizienten Transport an die Synapse ausreichend. Deshalb muss diese Hypothese z. B. durch Aufreinigung von Vesikeln oder durch Studien in besser zugänglichen heterologen Zellsystemen weiter untersucht werden.

Die Assoziation von MAGuKs mit Mikrotubuli kann auch durch die Bindung von CRIPT an die dritte PDZ-Domäne erreicht werden (Brenman *et al.*, 1998; Niethammer *et al.*, 1998; Passafaro *et al.*, 1999). Brenman *et al.* (1998) zeigten, dass diese Interaktion die Bindungsaktivität eines weiteren Mikrotubuli-assoziierten Proteins, MAP1a, an die GuK-Domäne erhöht.

Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen zeigten, dass das *Drosophila*-Homologe D-CRIPT präferentiell mit der dritten PDZ-Domäne von DLG interagiert. Immunhistochemische Studien von DLG mit endogenem und überexprimiertem D-CRIPT zeigten aber eine Kolokalisation ausschließlich in Epithelien. Da die Deletion der dritten PDZ-Domäne von DLG keinen Einfluß auf die synaptische Lokalisation hatte, kann vermutet werden, dass die Interaktion von DLG mit Mikrotubuli im Muskel entweder nicht durch D-CRIPT vermittelt, oder nicht für den synaptischen Transport benötigt wird.

Die Δ PDZ1+2-Variante akkumulierte unterhalb der Plasmamembran zu großen Aggregaten, die in ähnlicher Weise nach Expression des SAP97- Δ PDZ1+2-Deletionskonstrukts zu beobachten waren. Letztere waren sowohl im Cytoplasma des Muskels als auch unterhalb der Plasmamembran mit Mikrotubuli assoziiert. Da auch endogenes DLG unmittelbar unterhalb der Plasmamembran mit Mikrotubuli kolokalisierte, könnte dies auf einen Mikrotubuli vermittelten Transport zunächst an die Membran hindeuten. Der weitere synaptische Transport scheint eine Interaktion der PDZ-Domänen vorauszusetzen. Tejedor *et al.* (1997) zeigten, dass in *shaker*-Mutanten, in denen ein verkürztes Protein ohne C-terminales PDZ-Bindungsmotiv exprimiert wird, Shaker zwar an die Muskelmembran transportiert, aber nicht an die Synapse rekrutiert wird. Zito *et al.* (1997) zeigten zudem, dass Chimären aus dem Transmembranteil des Lymphocyten-Zelloberflächenmoleküls CD8 und dem cytoplasmatischen Bereich von Shaker oder Fasciclin II vor der Anreicherung an der Synapse ebenfalls über die gesamte Membran verteilt sind. Dies könnte einen generellen Transportweg für synaptische Proteine darstellen, da z. B. auch Glutamatrezeptoren vor der Anreicherung an der neuromuskulären Synapse gleichmäßig über die Plasmamembran verteilt sind (Broadie und Bate, 1993a; Broadie und Bate, 1993b).

5.4 Vermittlung der Assoziation von DLG an Subkompartimenten des Muskels durch das Actin-Spectrin-Cytoskelett

Das Membran-assoziierte Cytoskelett ist ein zweidimensionales Netzwerk aus α - und β -Spectrin-Multimeren ($\alpha 2/\beta 2$), die wiederum durch einen Komplex aus kurzen Actin-Oligomeren und weiteren Proteinen, wie das Band 4.1-Protein, verknüpft sind (Ursitti *et al.*, 1991). Es wurde zuerst in Erythrocyten untersucht, wo es zur Stabilisierung der Plasmamembran und der Formgestaltung der Zelle beiträgt. Spätere Studien zeigten, dass dieses Netzwerk z. B. auch in Neuronen (Lazarides und Nelson, 1983), im Vertebratenmuskel (Pumplin, 1995) und *Drosophila*-Zellen (Dubreuil *et al.*, 1997) konserviert ist. Neben der strukturellen Rolle tragen Spectrine durch Akkumulation von Transmembranproteinen zur Plasmamembranorganisation bei. Daneben ist Spectrin auch an Subkompartimenten wie dem Golgi-Apparat, dem ER und dem SR lokalisiert (Übersicht in De Matteis und Morrow, 2000). Deshalb konnte angenommen werden, dass DLG aufgrund einer Cytoskelett-Assoziation an solchen Subkompartimenten verankert wird. Diese Assoziation wurde durch Experimente, die das Cytoskelett verändern, belegt. Die Inkubation von Körperwandpräparaten mit der F-Actin destabilisierenden Substanz Cytochalasin D führte zu einer diffusen Verteilung von DLG im Muskel. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass DLG mit α -Spectrin am subzellulären Netzwerk, an Subkompartimenten der Plasmamembran und dem SSR koverteilt ist. Vor allem an den Subkompartimenten der Plasmamembran und an der Synapse zeigte sich deutlich, dass die DLG- und α -Spectrin-Färbung stets unmittelbar aneinander lagen, aber nur zum Teil überlappten (siehe Abb. 4-16C1/C2, S. 53). Dieser Abstand könnte durch Interaktion mit Proteinen, die die Assoziation vermitteln, hervorgerufen werden. Die bisher bekannten *Drosophila*-Band 4.1-Homologen Coracle und Merlin sind jedoch nicht im Muskel lokalisiert (Fehon *et al.*, 1994; McCartney und Fehon, 1996; LaJeunesse *et al.*, 1998). Nach Fertigstellung des *Drosophila*-Genomprojekts konnten mittlerweile weitere Homologe identifiziert werden (Goldstein und Gunawardena, 2000), deren Funktion noch untersucht werden muss.

Lue *et al.* (1996) zeigten, dass sowohl die ersten beiden PDZ-Domänen und die I3-Domäne von hDLG/SAP97 an die Cytoskelett-assoziierten Proteine Band 4.1 und Ezrin binden können und somit diese Domänen unabhängig voneinander ausreichend für die subzelluläre Zielsteuerung sind.

Die DLG-A-Deletionsstudie zeigte, dass die Assoziation mit dem Cytoskelett vermutlich ausschließlich durch die I3-Domäne vermittelt wird. Für eine Feinverteilung in die einzelnen Kompartimente wird jedoch eine, möglicherweise von Spectrin unabhängige, Interaktion der ersten beiden PDZ-Domänen mit weiteren Interaktionspartnern, z. B. Transmembranproteinen, benötigt.

Hierfür spricht: 1., dass Spectrin in die von der Δ PDZ1+2-Variante gebildeten Cluster an der Plasmamembran rekrutiert wurde.

2. Das im Muskel exprimierte Δ PDZ1+2-Konstrukt lokalisierte im Vergleich zur DLG-Flag-Variante in geringeren Mengen an dem mit Spectrin markierten subzellulären Netzwerk. Die Δ I3-Variante wurde hier überhaupt nicht lokalisiert.

3. Im *dlg*-mutanten Hintergrund ist eine größere Menge an Δ I3-Protein als im Wildtyp-Hintergrund an der Synapse lokalisiert. Dies könnte durch eine Kompetition des endogenen DLGs, dem beide Bereiche für eine Interaktion zur Verfügung stehen, erklärt werden.

Die Interaktion mit Cytoskelett-assoziierten Proteinen und somit die Verknüpfung von Transmembranproteinen mit dem Cytoskelett wurde bereits bei mehreren MAGuKs gezeigt (Cohen *et al.*, 1998; Fanning *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1997; Katsube *et al.*, 1998; Marfatia *et al.*, 1995).

Eine Cytoskelett abhängige Lokalisation von DLG postulierten auch Featherstone *et al.* (2001), da DLG in α - und β -Spectrin-Mutanten von *Drosophila* diffus im Muskel verteilt erscheint. Ein weiteres Molekül, das Einfluß auf die DLG-Lokalisation hat, ist der Rho-Typ Guaninnucleotid-Austauschfaktor dPIX. Ursprünglich wurde dPIX bei der Untersuchung von Mutanten, die die Struktur der neuromuskulären Synapse beeinflussen, gefunden. Mutationen in *dpix* führen zu einer geringeren synaptischen Expression von DLG, FasII und der Glutamatrezeptor-Untereinheit GluRIIA, sowie zu einer Eliminierung des SSRs (Parnas *et al.*, 2001). dPIX könnte deshalb in einem gewissen Umfang durch Regulation der Architektur des Cytoskeletts direkt oder indirekt die postsynaptische Lokalisation bzw. Stabilisation von DLG beeinflussen.

Viele Ionenkanäle und Rezeptoren sind mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett in Subkompartimenten der Zelle assoziiert (Übersicht in Nelson *et al.*, 1997). Da die Muskelmembran an der Weiterleitung synaptischer Signale beteiligt ist, müssen auch hier Signalkomplexe lokalisiert sein. Die Anreicherung des Lektins Concanavalin A an den Subkompartimenten der Muskelmembran könnte auf eine Anhäufung von glycosylierten Transmembranproteinen hinweisen. Deshalb könnte DLG auch hier eine Cluster-Funktion von funktionalen Komplexen einnehmen. Durch elektrophysiologische Untersuchungen könnte herausgefunden werden, ob durch die Expression der Δ PDZ1+2-Variante solche Komplexe umorganisiert werden und so die Signalweiterleitung im Muskel verändert würde. Die Assoziation mit Subkompartimenten der Plasmamembran könnte jedoch auch schlichtweg eine Zwischenstation auf dem Weg zur Synapse darstellen.

5.5 Möglicher Einfluß von intramolekularen Interaktionen auf die DLG-Lokalisation

Biochemische Untersuchungen zeigten, dass die SH3- und die GuK-Domäne einiger MAGuKs (PSD-95, Chapsyn-110, SAP97, DLG, CASK, p55) über konservierte Aminosäuren sowohl inter- als auch intramolekular interagieren können (McGee *et al.*, 2001a; Nix *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000). Dies wurde mittlerweile auch durch Aufklärung der Kristallstruktur dieses Komplexes bestätigt (Li *et al.*, 2002; Tavares *et al.*, 2001).

Die Hook-Region zwischen der SH3- und GuK-Domäne konnte aufgrund ihrer Flexibilität nicht kristallisiert werden. Jedoch zeigten biochemische Experimente, dass Bereiche der Hook-Region die oben beschriebene Interaktion regulieren. Wu *et al.* (2000) zeigten durch ELISA-Analysen von SAP97-Fusionsproteinen, dass diese Interaktion die Bindung des GuK-Interaktionspartners GKAP reguliert. Im geschlossenen Zustand, also bei Interaktion von SH3- und GuK-Domäne, verdeckt die I3-Domäne vermutlich die GKAP-Bindungsstelle und wirkt somit als inhibitorisches Element. Die Bindung des N-Terminus (Aminosäuren 1-104) an die SH3- und die I3-Domäne stellt eine Art molekularen Schalter dar, der die intramolekulare Interaktion löst und somit die Interaktion der GuK-Domänen mit ihren Bindungspartnern ermöglicht (Abb. 5-1).

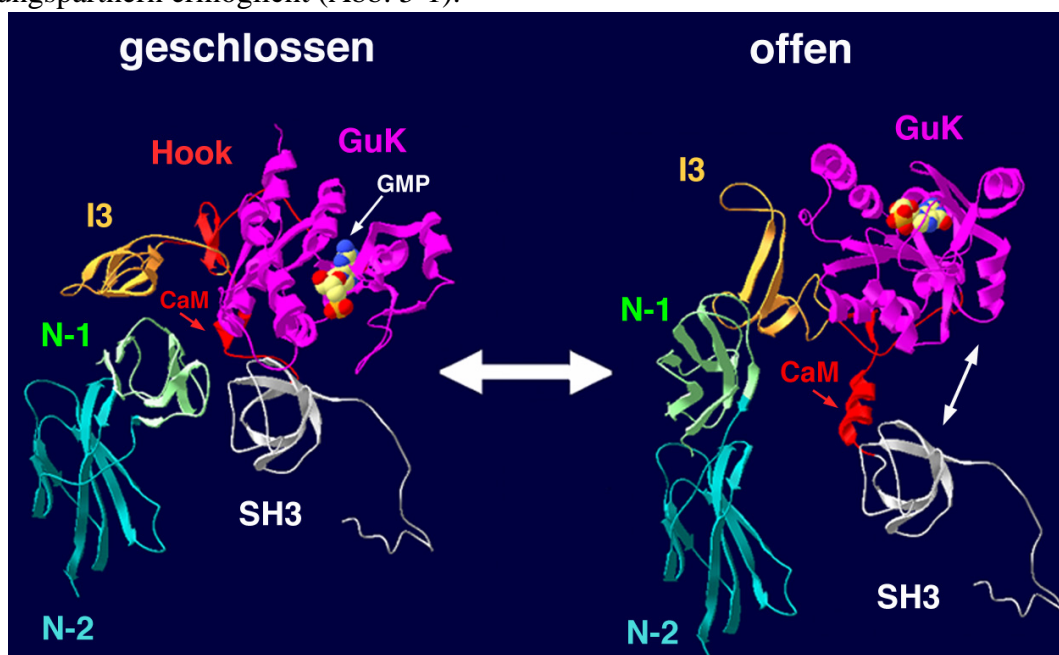


Abb. 5-1: Strukturmodell der intramolekularen Interaktion von SH3- und GuK-Domäne, der Hook-Region und von Teilen des SAP97-N-Terminus (N1/N2). Gezeigt wird auch die Bindung von GMP in der GuK-Domäne. Im geschlossenen Zustand interagiert die SH3- mit der GuK-Domäne. Dadurch wird die α -helicale Calmodulin (CaM)-Bindungsstelle verdeckt. Im offenen Zustand ist diese für putative Bindungspartner frei zugänglich. Durch die Interaktion des N-Terminus (N1) mit der I3-Domäne wird die offene Form stabilisiert und vermutlich die GKAP/SAPAP-Bindungsstelle der GuK-Domäne freigegeben. (Modell nach Wu *et al.*, 2000, modifiziert).

Die Interaktion zwischen SH3- und GuK-Domäne von PSD-95 kann auch durch Einführen einer zur Mutation von *dlg*^{m30} äquivalenten Punktmutation (L₄₆₀→P) in die SH3-Domäne

unterbrochen werden (Shin *et al.*, 2000). Da dlg^{m30} zur Tumorbildung in epithelialen Geweben führt (Woods *et al.*, 1996), könnte dies ein Hinweis auf die physiologische Bedeutung dieser intramolekularen Interaktion sein.

Diese physiologische Bedeutung wird auch durch den Befund unterstützt, dass die Deletion der gesamten SH3-Domäne, der Hook-Region und deren Teilbereiche zu einem Verlust der tumorsuppressiven Wirkung von DLG führen.

Anhand eines von Carsten Reissner (IFN, Magdeburg) erstellten Modells, das auf den von Wu *et al.* (2000) gewonnenen Daten basiert, könnten zumindest einige Lokalisierungsphänomene erklärt werden:

Durch Δ Hook wird die flexible Region entfernt, die für die Positionierung der SH3 und GuK-Domäne zueinander notwendig ist. SH3 und GuK liegen zwar aufgrund der Deletion nahe beieinander, eine geschlossene Form ist aber nicht möglich, d. h. mögliche GuK-Bindungspartner könnten weiterhin interagieren. Der Transport an Subkompartimente, wie das ER, könnte durch eine zu frühe Interaktion erschwert werden und deshalb zu einer diffusen Verteilung im Cytoplasma führen.

Das Molekül tendiert vermutlich zur geschlossenen Form. Es wurde kürzlich berichtet, dass die putative α -Helix (E-F) eine Calmodulin bindet (Masuko *et al.*, 1999). Die offene Form könnte daher z. B. durch Ca^{2+} -regulierte Bindung von Calmodulin an die putative α -helicale Domäne erreicht werden. Durch die Deletion dieser Helix (Δ E-F) würde das Molekül immer in geschlossener Form vorliegen. Damit wäre eine Interaktion der SH3-, der I3- und der GuK-Domäne unterbunden. Dies könnte erklären, warum die Δ E-F- ebenso wie die Δ Hook-Variante diffus im Cytoplasma verteilt ist und im Vergleich zur Deletion der gesamten Hook-Region noch weniger effektiv an die Synapse transportiert wird.

Des Weiteren könnte die geringe Effizienz der synaptischen Lokalisation von der Δ I3-Variante erklärt werden. Wie von Wu *et al.* (2000) beschrieben, fungiert die I3-Domäne als negativer Regulator der GKAP-Bindung. In epithelialen Zellen wird die Interaktion von GKAP/SAPAP mit PSD-95 für die Rekrutierung von PSD-95 an die Membran benötigt (Takeuchi *et al.*, 1997). Demnach wäre es möglich, dass die GuK-Domäne, genauso wie bei Δ Hook, zu früh mit einem GuK-Interaktionspartner interagiert und somit kein effektiver Transport an die Synapse möglich ist.

Zusammengefasst scheint im Gegensatz zu der von Wu *et al.* (2000) postulierten geschlossenen Transportform, das Vorliegen einer offenen Form Voraussetzung für einen effektiven Transport an die Synapse zu sein. Vermutlich wird der Transport durch ein komplexes Zusammenspiel von intra- und intermolekularen Interaktionen reguliert.

Da bisher nur *in vitro*-Daten vorliegen, muss die *in vivo*-Bedeutung der intramolekularen Interaktion untersucht werden. Hierfür könnten DLG-Varianten exprimiert werden, die durch

gezielten Austausch von Aminosäuren nicht mehr intramolekular interagieren können. Die Bedeutung der offenen Form könnte z. B. durch Punktmutation der an der intramolekularen Interaktion beteiligten Aminosäuren in der SH3- oder GuK-Domäne untersucht werden, die der geschlossenen Form durch Punktmutationen, die die Calmodulin-Bindung an die α -Helix verhindern.

Tavares *et al.* (2001) zeigten, dass die konservierte GMP-Bindungsaktivität der GuK-Domäne keinen Einfluß auf die intramolekulare Interaktion hat. Das Krisstallisieren der GuK-Domäne im GMP-gebundenen-Zustand gelang nur nach Zugabe von Guanidin. Das Guanidin könnte die Guanidin-Gruppe eines Arginins putativer Bindungspartner mimen. Daher wurde vorgeschlagen, dass die GMP-Bindung die Bindung eines Interaktionspartners fördern bzw. stabilisieren könnte. Die Verhinderung der GMP-Bindung an die GuK-Domäne von DLG (GuK_{PM}) hatte aber keinen Einfluß auf die synaptische Lokalisation. Ob jedoch an der Synapse die Interaktion, z. B. mit dem einzigen bisher bekannten Interaktionspartner Gukholder (Mathew *et al.*, 2002) verändert ist, bedarf weiterer Überprüfung.

5.6 Mögliche Rolle der neuartigen Spleißvarianten

Northern Blot-Analysen wiesen darauf hin, dass mehrere *dlg*-Genprodukte exprimiert werden (Woods und Bryant, 1989). Desweiteren wurden in Western-Blot-Analysen von Körperwandpräparaten durch anti-DLG_{PDZ}-Antikörper mindestens zwei unterschiedliche Banden detektiert.

Neben der bisher bekannten Variante DLG-A konnten drei weitere neuartige *dlg*-Spleißvarianten festgestellt werden, die Homologie zur N-terminalen Region von SAP97 zeigen. Die Analyse der Exon-Intron Struktur zeigte, dass die Variationen sowohl durch alternative Transkriptionsstarts als auch durch alternatives Spleißen entstehen (siehe Abb.4-19). Frühere immunhistochemische Untersuchungen, die auf eine Verteilung von DLG in allen Geweben schließen ließen, wurden mit Antikörpern durchgeführt, die gegen PDZ1+2 (anti-DLG_{PDZ}) und gegen den Bereich SH3-GuK (anti-DLG_{GuK}) gerichtet sind. Durch anti-DLG_{PDZ}-Antikörper werden die Varianten PEST-DLG, DLG-S97 und DLG-A detektiert, durch anti-DLG_{GuK}-Antikörper DLG-S97 und DLG-A. Immunhistochemische Untersuchungen mit einem gegen den zum SAP97-N-Terminus homologen Bereich gerichteten Antikörper (anti-DLG_{S97N}) zeigten, dass die neuen Spleißvarianten in Embryonen ausschließlich in Neuronen (J. Serralta, Universidad de Chile, Santiago) und in Larven (diese Arbeit) in Neuronen und im Muskel exprimiert werden. Demnach scheint ebenso wie bei SAP97 eine gewebespezifische Expression verschiedener Isoformen zu existieren (Mori *et al.*, 1998).

Die synaptische Immunreaktivität beider Antikörper war in den Mutanten dlg^{m52} und dlg^{XI-2} deutlich reduziert, die Färbung im Neuropil blieb jedoch weitgehend unverändert. Diese Mutationen beeinträchtigen nur die Expression der DLG-S97- und DLG-A-Isoform. In Western-Blot-Analysen von larvalen Gehirnhomogenaten (U. Thomas, IFN Magdeburg) und Körperwandhomogenaten (diese Arbeit) konnte mit dem anti-DLG_{S97N}-Antikörper nur eine Bande detektiert werden, die dem berechneten Molekulargewicht von DLG-S97 entsprach. Diese Bande konnte in Körperwandhomogenaten der Mutanten dlg^{m52} und dlg^{XI-2} nicht nachgewiesen werden. Zusammen mit den immunhistochemischen Daten kann deshalb geschlossen werden, dass zumindest im dritten Larvenstadium DLG-S97 eine der vorherrschenden Varianten an der neuromuskulären Synapse und im Neuropil ist. Die Aufrechterhaltung der Immunreaktivität im Neuropil von dlg -Mutanten könnte durch unterschiedliche Durchsatzraten von DLG-S97 an der neuromuskulären Synapse und im Neuropil erklärt werden, da ein langsamerer Durchsatz zu einer Anreicherung führen könnte. Ferner könnten im Neuropil zusätzlich die beiden von den dlg -Punktmutationen nicht betroffenen Varianten (PEST-DLG, S97N) lokalisiert sein, die möglicherweise aufgrund des schnellen Abbaus (PEST-DLG) oder schlechter Extrahierbarkeit im Western-Blot nicht detektiert werden konnten.

Im zweiten Larvenstadium zeigte die anti-DLG_{PDZ}- und anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität eine ähnliche Verteilung im subzellulären Netzwerk und an der neuromuskulären Synapse. Im dritten Larvenstadium war die anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität an der neuromuskulären Synapse und im Neuropil des Ventralganglions angereichert, wohingegen durch anti-DLG_{PDZ}-Antikörper auch extrasynaptische Bereiche markiert wurden. Demnach scheint es auch innerhalb des Muskels eine unterschiedliche Verteilung der Isoformen zu geben. Da beide Varianten mit den zur Verfügung stehenden anti-DLG_{PDZ}- und anti-DLG_{GuK}-Antikörpern nicht unterschieden werden können, kann eine Kolo-kalisation in einigen Bereichen, z. B. im subzellulären Netzwerk im zweiten Larvenstadium oder der neuromuskulären Synapse, nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl die in der DLG-A-Deletionsstudie untersuchten Domänen auch in DLG-S97 enthalten sind, ist es fraglich, inwieweit die Ergebnisse auf DLG-S97 übertragen werden können. Im Vergleich zu den korrespondierenden DLG-A-Deletionskonstrukten zeigten die Expressionsmuster der SAP97-Deletionskonstrukte EGFP-SAP97- $\Delta I3$ und EGFP-SAP97- $\Delta PDZ1+2$ einen effektiveren Transport an die Synapse. Zudem war EGFP-SAP97- $\Delta PDZ1+2$ nicht an Subkompartimenten des Muskels lokalisiert. Obwohl DLG-A auch ohne N-terminalen Bereich (ΔN) an die Synapse transportiert wurde, weist die Lokalisation des postsynaptisch exprimierten SAP97-N-Terminus (EGFP-SAP97-N-PDZ1/2) darauf hin, dass der zu SAP97 homologe N-terminale Bereich alleine für eine synaptische Lokalisation ausreichend sein

könnte. Dies könnte durch ein spezifisches synaptisches Lokalisierungssignal im alternativen DLG-N-Terminus vermittelt werden.

Bisherige Studien betonen die kritische Rolle der N-Termini von MAGuKs bei der subzellulären Verteilung. Studien in Epithelzellen zeigten, dass der SAP97-N-Terminus für die Lokalisierung an der lateralen Membran benötigt wird (Wu *et al.*, 1998). Der N-Terminus des SAP97-Homologen in *C. elegans*, DLG-1, war ebenfalls ausreichend für eine Lokalisation in Epithelien (Firestein und Rongo, 2001). Bei zwei weiteren MAGuKs, PSD-93 und PSD-95 α , wird der synaptische Transport durch Palmitoylierung zweier N-terminaler Cysteinreste erreicht (Craven *et al.*, 1999; El-Husseini *et al.*, 2000).

Des Weiteren ist der N-Terminus an intra- und intermolekularen Interaktionen beteiligt. Marfatia *et al.* (2000) zeigten, dass der N-Terminus von hDLG/SAP97 oligomerisieren kann und so möglicherweise zur Vernetzung synaptischer Komponenten beiträgt. Durch Bindung des N-Terminus an die SH3- und I3-Domäne wird die intramolekulare Interaktion und somit die Interaktion der GuK-Domäne mit GKAP/SAPAP reguliert (siehe 5.5 und Wu *et al.*, 2000).

Lee *et al.* (2002) zeigten, dass der N-Terminus von SAP97 an ein neuartiges Protein-Protein-Interaktionsmotiv (L27) eines Gerüstproteins, Lin-2/CASK, bindet und dadurch der Transport an die laterale Membran von Epithelzellen vermittelt wird. Lin-2/CASK bindet wiederum an einen Komplex, der in Epithelien von *C. elegans* die Lokalisierung der Rezeptor-Tyrosinkinase LET-23 vermittelt und bei Mammalia an der Präsynapse Komponenten der Vesikel-exocytose mit dem Cytoskelett verbindet (Butz *et al.*, 1998; Kaeck *et al.*, 1998). Das *Drosophila*-Homologe von Lin-2/CASK, CaMGuK, ist möglicherweise an der neuromuskulären Synapse lokalisiert (Lopes *et al.*, 2001). Zudem wurde biochemisch eine Interaktion des alternativen DLG-N-Terminus mit CaMGuK nachgewiesen (Lee *et al.*, 2002), so dass sich eine *in vivo*-Interaktion von DLG-S97 mit CaMGuK zu untersuchen lohnte.

Kürzlich wurde beschrieben, dass das L27-Motiv in weiteren MAGuKs, unter anderem im N-Terminus von SAP97 und einer PSD-95-Spleißvariante (PSD-95 β) konserviert ist (Chetkovich *et al.*, 2002). Dieses Motiv vermittelt die Interaktion von PSD-95 β mit Lin-2/CASK und der endosomalen ATPase Hrs. Durch das Unterbinden der Hrs-regulierten frühen endosomalen Sortierung in hippocampalen Neuronen wird die synaptische Lokalisierung von PSD-95 β , nicht aber von PSD-95 α , verhindert (Chetkovich *et al.*, 2002). L27 ist auch in dem zu SAP97 homologen Bereich von DLG konserviert, so dass der unterschiedliche Transport von DLG-S97 und DLG-A durch dieses Motiv vermittelt werden könnte.

Koh *et al.* (1999) beschrieben die Regulation der DLG-Lokalisation durch CaMKII-vermittelte Phosphorylierung der PDZ1-Domäne. Da im N-Terminus von DLG-S97 ein

zusätzliches Lokalisierungssignal enthalten ist, sollte überprüft werden, ob sich DLG-S97 hinsichtlich der Regulierung durch CaMKII genauso verhält wie bereits in Koh *et al.* beschrieben. Die synaptische Immunreaktivität der anti-DLG_{PDZ}- und anti-DLG_{S97N}-Antikörper wich nicht von den von Koh *et al.* beobachteten Befunden ab, nämlich einer unveränderten Immunreaktivität nach Expression von Wildtyp- (WT-) CaMKII und der Ca²⁺-abhängigen konstitutiv aktiven Mutante (CaMKII_{T→A}) und einer Reduktion nach Expression der Ca²⁺-unabhängigen konstitutiv aktiven Mutante (CaMKII_{T→D}). Anders jedoch im Muskel: Die Expression von WT-CaMKII führte zu einer erhöhten Expression von DLG-A und DLG-S97 im Muskel. Nach Expression der beiden konstitutiv aktiven Mutanten wurde eine vermehrte anti-DLG_{S97N}-Immunreaktivität im Muskel und im Zellkern festgestellt. Da diese Färbung nicht von anti-DLG_{PDZ}-Antikörpern erkannt wurde, wurde vermutlich entweder S97N oder PEST-DLG nachgewiesen. Möglicherweise werden diese Varianten in Abhängigkeit von aktiver CaMKII hochreguliert.

Koh *et al.* beobachteten eine diffuse Verteilung der anti-DLG_{PDZ}-Immunreaktivität nach gleichzeitiger prä- und postsynaptischer Expression von CaMKII_{T→D}, wohingegen hier diese Variante nur postsynaptisch exprimiert wurde. Die präsynaptische Expression von CaMKII_{T→D} führt zu einer veränderten synaptischen Aktivität (Wang *et al.*, 2002), was die durch anti-DLG_{PDZ}-Antikörper nachgewiesene DLG-Lokalisation zusätzlich beeinflussen könnte. Koh *et al.* zeigten außerdem, dass die Expression von WT-CaMKII keinen Effekt auf die Lokalisation von DLG hat. In dieser Arbeit wurde jedoch eine diffuse Verteilung von DLG im Muskel beobachtet. Die Spezifität des Effekts wurde durch mehrmalige Wiederholungen und durch Expression der WT-CaMKII ausschließlich in den Muskeln 6/7 und 12/13 überprüft. Die diffuse Verteilung könnte aber dennoch, wie bei Koh *et al.*, auf eine erhöhte Menge an aktiver CaMKII zurückzuführen sein. Die Überexpression von WT-Ras1 führte z. B. auch zu ähnlichen Effekten wie die Überexpression der konstitutiv aktiven Form (Koh *et al.*, 2002). Es müsste aber noch nachgewiesen werden, ob z. B. nach Expression der WT-CaMKII tatsächlich mehr phosphoryliertes DLG vorhanden ist

Eine Translokation von MAGuKs in den Zellkern wurde von CASK nach Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Tbr-1 (Hsueh *et al.*, 2000) und von ZO-1/ZO-2 während der Umorganisation von Zell-Zell-Kontakten beschrieben (Gottardi *et al.*, 1996; Islas *et al.*, 2002). Kürzlich zeigten McLaughlin *et al.* (2002), dass auch bestimmte Spleißvarianten von hDLG/SAP97 im Zellkern lokalisiert sind. Die genaue Funktion und die Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt.

5.7 Modell und Ausblick

Die Charakterisierung von Subkompartimenten des Muskels zeigte, dass DLG an membranösen intrazellulären Strukturen lokalisiert ist, die aufgrund mehrerer Evidenzen vermutlich als SR eingeordnet werden können. Die Anreicherung der $\Delta I3$ -Variante in einem ähnlichen Bereich wie Marker des rauhen ERs könnte auf eine zusätzliche, möglicherweise temporäre Lokalisation von DLG am rauhen ER hinweisen. Ein geringer Anteil von DLG ist zudem an Golgi-Zisternen lokalisiert. Ferner konnte gezeigt werden, dass DLG mit Mikrotubuli interagiert und an extrasynaptischen und synaptischen Bereichen, die mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett assoziiert sind, lokalisiert ist. Die in der Deletionsstudie gewonnenen Daten und die Analyse der neuartigen Spleißvarianten ließen den Schluß zu, dass die Lokalisierung an Subkompartimenten bzw. die Interaktion mit Cytoskelett-Komponenten durch individuelle Domänen vermittelt wird (Abb. 5-2). Neben einer noch unbekanntem Funktion in den subzellulären Kompartimenten ist diese Lokalisierung für einen effektiven Transport von DLG an die Synapse notwendig.

Die putative α -helicale Calmodulin-Bindungsstelle in der Hook-Region wird für die Translokation an das ER benötigt. Durch Assoziation der I3-Domäne mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett wird DLG vermutlich durch laterale Diffusion aus dem rauhen ER in ein weiteres ER-Subkompartiment, das SR, rekrutiert. Durch Interaktion der PDZ-Domänen mit Transmembranproteinen könnte zudem der Transport aus dem ER in den Golgi-Apparat erfolgen. Von dort könnte DLG durch die Interaktion der GuK-Domäne mit Motorproteinen in Vesikeln entlang von Mikrotubuli an die Plasmamembran transportiert werden. Das Zusammenspiel der ersten beiden PDZ-Domänen und der I3-Domäne wird für eine Lokalisation in den mit Spectrin-assoziierten Subkompartimenten der Plasmamembran und für eine effektive Lokalisierung bzw. Rekrutierung an die Synapse benötigt. Bisher wurde angenommen, dass DLG an der Muskelmembran mit FasII und Shaker interagiert und zusammen mit diesen an die Synapse rekrutiert wird. Da die neuartige Variante DLG-S97 im dritten Stadium ausschließlich synaptisch lokalisiert ist, scheint ein weiterer direkter Transportweg zu existieren. Dieser direkte Transport könnte mittels eines zusätzlichen Lokalisierungssignals im alternativen N-Terminus vermittelt werden.

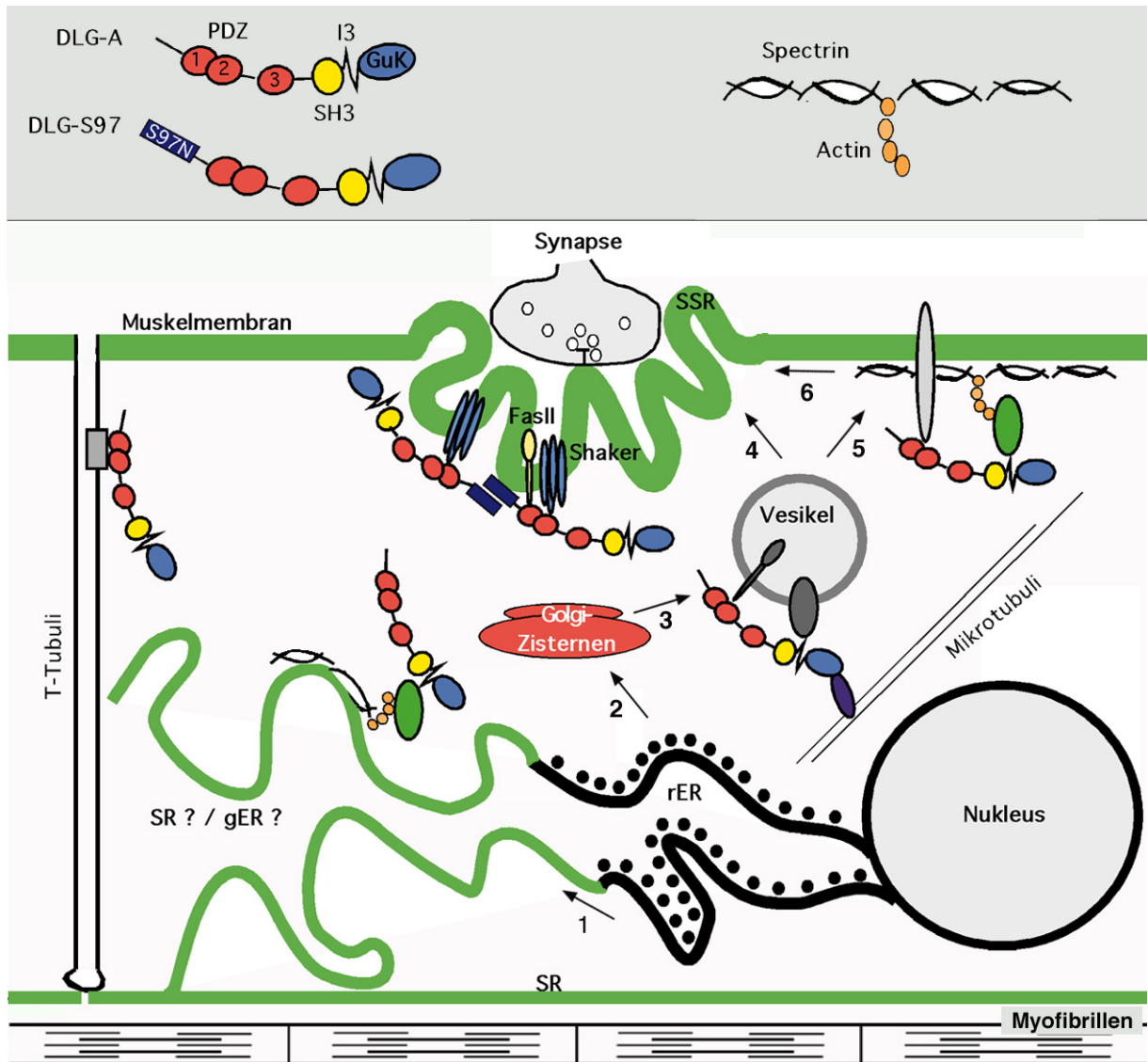


Abb. 5-2: Modell der DLG-Lokalisation und der möglichen Transportwege (Y) im *Drosophila*-Larvenmuskel. 1) Transport aus dem rauhen ER (rER) - möglicherweise durch laterale Diffusion - an das sarcoplasmatische Retikulum (SR) und/oder an das glatte ER (gER). Dort könnte DLG durch Interaktion der I3-Domäne mit einem Band 4-1-Homologen mit dem Actin-Spectrin-Cytoskelett verknüpft werden. 2) Möglicher Kotransport von DLG mit Transmembranproteinen an den Golgi-Apparat und von dort (3) an Vesikeln entlang von Mikrotubuli an das SSR der neuromuskulären Synapse (4) oder an die Muskelmembran (5). Der Transport könnte durch Motorproteine, die an die GuK-Domäne binden, vermittelt werden. Die Lokalisation in den mit Spectrin-assoziierten Subkompartimenten der Muskelmembran wird durch die I3-Domäne und durch die putative Interaktion von PDZ1+2 mit einem Transmembranprotein vermittelt. 6) Kotransport von Shaker und FasII von der Muskelmembran an das SSR. Durch Multimerisieren der N-Termini von DLG-S97 könnte eine weitere Vernetzung synaptischer Komponenten bewirkt werden. Zudem könnte DLG die Lokalisation von Ionenkanälen an T-Tubuli vermitteln.

Zu Beginn der Deletionsstudie wurde ein Modell entwickelt, welche Bereiche von DLG interessant sein könnten. Es kristallisierte sich heraus, dass vor allem die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Teilbereiche in der Hook-Region in Bezug auf die Lokalisation eine sehr wichtige Rolle spielen. Um deren Bedeutung für inter- und intramolekulare Interaktionen

weiter zu untersuchen, könnte eine Feinkartierung der Bereiche durch gezielte Punktmutationen durchgeführt werden.

Um die Funktion der Lokalisation an den einzelnen Subkompartimenten besser verstehen zu können, müssten z. B. durch Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen und genetische Untersuchungen Bindungspartner von DLG in den einzelnen Subkompartimenten ermittelt werden.

Eine Vielzahl von Studien weisen darauf hin, dass der Transport und die Zielsteuerung synaptischer Ionenkanäle und Rezeptoren bereits im ER unter anderem durch Interaktion mit MAGuKs reguliert wird. Jedoch ist noch nicht bekannt, ob diese Regulation zur neuronalen Funktion, z. B. plastischen Prozessen, beiträgt. Zudem sind die genauen Mechanismen des ER-Exports noch nicht bekannt. Diese interessanten Fragestellungen könnten *in vivo* im *Drosophila*-Modell, z. B. durch Analyse des Transports der DLG-Interaktionspartner FasII und des Shaker-Kanals, untersucht werden.

Die Untersuchung der neuartigen Spleißvarianten wird Antworten auf die Fragen liefern, wie die Zielsteuerung verschiedener Isoformen eines Moleküls/MAGuKs in unterschiedliche Bereiche der Zelle erfolgen kann, beispielsweise durch Expression von EGFP markierten Varianten oder durch Nutzen der RNA-Interferenz-Methode.

6 Literaturverzeichnis

- Anderson, J.M., Stevenson, B.R., Jesaitis, L.A., Goodenough, D.A. und Mooseker, M.S. (1988a) Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, **106**, 1141-1149.
- Anderson, M.S., Halpern, M.E. und Keshishian, H. (1988b) Identification of the neuropeptide transmitter proctolin in larvae: characterization of muscle fiber-specific neuromuscular endings. *J Neurosci*, **8**, 242-255.
- Aoki, C., Miko, I., Oviedo, H., Mikeladze-Dvali, T., Alexandre, L., Sweeney, N. und Bredt, D.S. (2001) Electron microscopic immunocytochemical detection of PSD-95, PSD-93, SAP-102, and SAP-97 at postsynaptic, presynaptic, and nonsynaptic sites of adult and neonatal rat visual cortex. *Synapse*, **40**, 239-257.
- Arnold, D.B. und Clapham, D.E. (1999) Molecular determinants for subcellular localization of PSD-95 with an interacting K⁺ channel. *Neuron*, **23**, 149-157.
- Bashour, A.M. und Bloom, G.S. (1998) 58K, a microtubule-binding Golgi protein, is a formiminotransferase cyclodeaminase. *J Biol Chem*, **273**, 19612-19617.
- Bate, M. (1993) The mesoderm and its derivatives. In Bate, M.u.M.-A., A. (ed.) *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Vol. 2, pp. 1013-1090.
- Bock, J.B., Klumperman, J., Davanger, S. und Scheller, R.H. (1997) Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol Biol Cell*, **8**, 1261-1271.
- Bock, J.B., Lin, R.C. und Scheller, R.H. (1996) A new syntaxin family member implicated in targeting of intracellular transport vesicles. *J Biol Chem*, **271**, 17961-17965.
- Boeckers, T.M., Bockmann, J., Kreutz, M.R. und Gundelfinger, E.D. (2002) ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem*, **81**, 903-10.
- Boeckers, T.M., Winter, C., Smalla, K.H., Kreutz, M.R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., Garner, C.C. und Gundelfinger, E.D. (1999) Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 247-252.
- Bongarzone, E.R., Jacobs, E., Schonmann, V. und Campagnoni, A.T. (2001) Classic and soma-restricted proteolipids are targeted to different subcellular compartments in oligodendrocytes. *J Neurosci Res*, **65**, 477-484.
- Brand, A.H. und Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401-415.

- Brenman, J.E. und Brecht, D.S. (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol*, **7**, 374-378.
- Brenman, J.E., Christopherson, K.S., Craven, S.E., McGee, A.W. und Brecht, D.S. (1996) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci*, **16**, 7407-7415.
- Brenman, J.E., Topinka, J.R., Cooper, E.C., McGee, A.W., Rosen, J., Milroy, T., Ralston, H.J. und Brecht, D.S. (1998) Localization of postsynaptic density-93 to dendritic microtubules and interaction with microtubule-associated protein 1A. *J Neurosci*, **18**, 8805-8813.
- Bresler, T., Ramati, Y., Zamorano, P.L., Zhai, R., Garner, C.C. und Ziv, N.E. (2001) The dynamics of sap90/psd-95 recruitment to new synaptic junctions. *Mol Cell Neurosci*, **18**, 149-167.
- Broadie, K. und Bate, M. (1993a) Innervation directs receptor synthesis and localization in *Drosophila* embryo synaptogenesis. *Nature*, **361**, 350-353.
- Broadie, K.S. und Bate, M. (1993b) Development of the embryonic neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*, **13**, 144-166.
- Budnik, V. (1996) Synapse maturation and structural plasticity at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 858-67.
- Budnik, V., Koh, Y.H., Guan, B., Hartmann, B., Hough, C., Woods, D. und Gorczyca, M. (1996) Regulation of synapse structure and function by the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg*. *Neuron*, **17**, 627-640.
- Butz, S., Okamoto, M. und Sudhof, T.C. (1998) A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell*, **94**, 773-782.
- Campos-Ortega, A.C.u.H., V. (1997) *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin.
- Cantera, R. und Nassel, D.R. (1992) Segmental peptidergic innervation of abdominal targets in larval and adult dipteran insects revealed with an antiserum against leucokinin I. *Cell Tissue Res*, **269**, 459-471.
- Chardin, P. und McCormick, F. (1999) Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell*, **97**, 153-155.
- Chen, H.J., Rojas-Soto, M., Oguni, A. und Kennedy, M.B. (1998) A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron*, **20**, 895-904.
- Chetkovich, D.M., Bunn, R.C., Kuo, S.H., Kawasaki, Y., Kohwi, M. und Brecht, D.S. (2002) Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms. *J Neurosci*, **22**, 6415-6425.

- Cho, K.O., Hunt, C.A. und Kennedy, M.B. (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron*, **9**, 929-942.
- Cohen, A.R., Woods, D.F., Marfatia, S.M., Walther, Z., Chishti, A.H., Anderson, J.M. und Wood, D.F. (1998) Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells [published erratum appears in *J Cell Biol* 1998 Aug 24;142(4):following 1156]. *J Cell Biol*, **142**, 129-138.
- Colledge, M. und Froehner, S.C. (1998) Signals mediating ion channel clustering at the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 357-363.
- Craven, S.E., El-Husseini, A.E. und Brecht, D.S. (1999) Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron*, **22**, 497-509.
- Crossley, A.C. (1978) The morphology and development of the *Drosophila* muscular system. In Ashburner, M.a.W., T. (ed.) *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, New York, Vol. 2b, pp. 499-560.
- Dascher, C. und Balch, W.E. (1994) Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, **269**, 1437-1448.
- De Matteis, M.A. und Morrow, J.S. (2000) Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J Cell Sci*, **113**, 2331-2343.
- Dimitratos, S.D., Woods, D.F. und Bryant, P.J. (1997) Camguk, Lin-2, and CASK: novel membrane-associated guanylate kinase homologs that also contain CaM kinase domains. *Mech Dev*, **63**, 127-130.
- Dubreuil, R.R., MacVicar, G.R. und Maddux, P.B. (1997) Functional studies of the membrane skeleton in *Drosophila*: identification of a positional cue that targets polarized membrane skeleton assembly. *Soc Gen Physiol Ser*, **52**, 91-106.
- El-Husseini, A.E., Craven, S.E., Chetkovich, D.M., Firestein, B.L., Schnell, E., Aoki, C. und Brecht, D.S. (2000) Dual Palmitoylation of PSD-95 Mediates Its Vesiculotubular Sorting, Postsynaptic Targeting, and Ion Channel Clustering. *J Cell Biol*, **148**, 159-172.
- El-Husseini, D., Schnell, E., Dakoji, S., Sweeney, N., Zhou, Q., Prange, O., Gauthier-Campbell, C., Aguilera-Moreno, A., Nicoll, R.A. und Brecht, D.S. (2002) Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell*, **108**, 849-863.
- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A. und Anderson, J.M. (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **273**, 29745-29753.

- Featherstone, D.E., Davis, W.S., Dubreuil, R.R. und Broadie, K. (2001 Jun 15) *Drosophila* alpha- and beta-spectrin mutations disrupt presynaptic neurotransmitter release. *J Neurosci*, **21**, 4215-4224.
- Fehon, R.G., Dawson, I.A. und Artavanis-Tsakonas, S. (1994) A *Drosophila* homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development*, **120**, 545-557.
- Fire, A. (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet*, **15**, 358-363.
- Firestein, B.L., Craven, S.E. und Bredt, D.S. (2000) Postsynaptic targeting of MAGUKs mediated by distinct N-terminal domains. *Neuroreport*, **11**, 3479-3484.
- Firestein, B.L. und Rongo, C. (2001) DLG-1 is a MAGUK similar to SAP97 and is required for adherens junction formation. *Mol Biol Cell*, **12**, 3465-3475.
- Franzini-Armstrong, C. (1999) The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *Faseb J*, **13**, S266-270.
- Furuyashiki, T., Fujisawa, K., Fujita, A., Madaule, P., Uchino, S., Mishina, M., Bito, H. und Narumiya, S. (1999) Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J Neurosci*, **19**, 109-118.
- Gao, Y.S., Alvarez, C., Nelson, D.S. und Sztul, E. (1998) Molecular cloning, characterization, and dynamics of rat formiminotransferase cyclodeaminase, a Golgi-associated 58-kDa protein. *J Biol Chem*, **273**, 33825-33834.
- Garcia, E.P., Mehta, S., Blair, L.A., Wells, D.G., Shang, J., Fukushima, T., Fallon, J.R., Garner, C.C. und Marshall, J. (1998) SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization. *Neuron*, **21**, 727-739.
- Gardiol, A., Racca, C. und Triller, A. (1999) Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J Neurosci*, **19**, 168-179.
- Gardoni, F., Schrama, L.H., Kamal, A., Gispen, W.H., Cattabeni, F. und Di Luca, M. (2001) Hippocampal Synaptic Plasticity Involves Competition between Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Postsynaptic Density 95 for Binding to the NR2A Subunit of the NMDA Receptor. *J Neurosci*, **21**, 1501-1509.
- Goldstein, L.S. und Gunawardena, S. (2000 Jul 24) Flying through the *drosophila* cytoskeletal genome. *J Cell Biol*, **150**, F63-68.
- Gorczyca, M., Augart, C. und Budnik, V. (1993) Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. *J Neurosci*, **13**, 3692-3704.
- Gottardi, C.J., Arpin, M., Fanning, A.S. und Louvard, D. (1996) The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10779-10784.

- Guan, B., Hartmann, B., Kho, Y.H., Gorczyca, M. und Budnik, V. (1996) The *Drosophila* tumor suppressor gene, *dlg*, is involved in structural plasticity at a glutamatergic synapse. *Curr Biol*, **6**, 695-706.
- Hanada, T., Lin, L., Tibaldi, E.V., Reinherz, E.L. und Chishti, A.H. (2000) GAKIN, a novel kinesin-like protein associates with the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor in T lymphocytes. *J Biol Chem*, **275**, 28774-28784.
- Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J. und Stevenson, B.R. (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, **141**, 199-208.
- Hata, Y., Butz, S. und Sudhof, T.C. (1996) CASK: a novel *dlg*/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins. *J Neurosci*, **16**, 2488-2494. Arbor, MI 48109, USA.
- Hata, Y., Takai, Y., (1999) Roles of postsynaptic density-95/synapse-associated protein 90 and its interacting proteins in the organization of synapses. *Cell Mol Life Sci*, **56**, 461-72.
- Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C. und Malinow, R. (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*, **287**, 2262-2267.
- Helmuth, M., Altrock, W., Bockers, T.M., Gundelfinger, E.D. und Kreutz, M.R. (2001) An electrotransfection protocol for yeast two-hybrid library screening. *Anal Biochem*, **293**, 149-152.
- Hennig, D., Scales, S.J., Moreau, A., Murley, L.L., De Mey, J. und Kreis, T.E. (1998) A formiminotransferase cyclodeaminase isoform is localized to the Golgi complex and can mediate interaction of trans-Golgi network-derived vesicles with microtubules. *J Biol Chem*, **273**, 19602-19611.
- Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, **114**, 193-197.
- Hough, C.D., Woods, D.F., Park, S. und Bryant, P.J. (1997) Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs large. *Genes Dev*, **11**, 3242-3253.
- Hovemann, B.T., Dessen, E., Mechler, H. und Mack, E. (1991) *Drosophila* snRNP associated protein P11 which specifically binds to heat shock puff 93D reveals strong homology with hnRNP core protein A1. *Nucleic Acids Res*, **19**, 4909-4914.
- Hsueh, Y.P. und Sheng, M. (1999) Requirement of N-terminal cysteines of PSD-95 for PSD-95 multimerization and ternary complex formation, but not for binding to potassium channel kv1.4 [In Process Citation]. *J Biol Chem*, **274**, 532-536.

- Hsueh, Y.P., Wang, T.F., Yang, F.C. und Sheng, M. (2000) Nuclear translocation and transcription regulation by the membrane-associated guanylate kinase CASK/LIN-2. *Nature*, **404**, 298-302.
- Irie, M., Hata, Y., Takeuchi, M., Ichtchenko, K., Toyoda, A., Hirao, K., Takai, Y., Rosahl, T.W. und Sudhof, T.C. (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science*, **277**, 1511-1515.
- Islas, S., Vega, J., Ponce, L. und Gonzalez-Mariscal, L. (2002) Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res*, **274**, 138-148.
- Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S. und Tsukita, S. (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*, **138**, 181-192.
- Jan, L.Y. und Jan, Y.N. (1976) L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Physiol*, **262**, 215-236.
- Jasmin, B.J., Antony, C., Changeux, J.P. und Cartaud, J. (1995) Nerve-dependent plasticity of the Golgi complex in skeletal muscle fibres: compartmentalization within the subneural sarcoplasm. *Eur J Neurosci*, **7**, 470-479.
- Jesaitis, L.A. und Goodenough, D.A. (1994) Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol*, **124**, 949-961.
- Jia, X.X., Gorczyca, M. und Budnik, V. (1993) Ultrastructure of neuromuscular junctions in *Drosophila*: comparison of wild type and mutants with increased excitability. *J Neurobiol*, **24**, 1025-1044.
- Jin, P., Griffith, L.C. und Murphey, R.K. (1998) Presynaptic calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates habituation of a simple reflex in adult *Drosophila*. *J Neurosci*, **18**, 8955-8964.
- Johansen, J., Halpern, M.E., Johansen, K.M. and Keshishian, H. (1989) Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *J Neurosci*, **9**, 710-725.
- Kaech, S.M., Whitfield, C.W. and Kim, S.K. (1998) The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell*, **94**, 761-771.
- Karin, N.J. and Settle, V.J. (1992) The sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, SERCA1a, contains endoplasmic reticulum targeting information. *Biochem Biophys Res Commun*, **186**, 219-227.
- Kasai, K. and Akagawa, K. (2001) Roles of the cytoplasmic and transmembrane domains of syntaxins in intracellular localization and trafficking. *J Cell Sci*, **114**, 3115-3124.

- Katsube, T., Takahisa, M., Ueda, R., Hashimoto, N., Kobayashi, M. and Togashi, S. (1998) Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *J Biol Chem*, **273**, 29672-29677.
- Kim, E., Niethammer, M., Rothschild, A., Jan, Y.N. and Sheng, M. (1995) Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature*, **378**, 85-88.
- Kim, E.e.a. (1997) GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J. Cell Biol.*, **136** (3), 669-678.
- Kim, J.H., Liao, D., Lau, L.F. and Huganir, R.L. (1998) SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron*, **20**, 683-691.
- Kistner, U., Garner, C.C. and Linial, M. (1995) Nucleotide binding by the synapse associated protein SAP90. *FEBS Lett*, **359**, 159-163.
- Kistner, U., Wenzel, B.M., Veh, R.W., Cases-Langhoff, C., Garner, A.M., Appeltauer, U., Voss, B., Gundelfinger, E.D. and Garner, C.C. (1993) SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg-A*. *J Biol Chem*, **268**, 4580-4583.
- Koh, Y.H., Popova, E., Thomas, U., Griffith, L.C. and Budnik, V. (1999) Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell*, **98**, 353-363.
- Koh, Y.H., Ruiz-Canada, C., Gorczyca, M. and Budnik, V. (2002) The Ras1-mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway regulates synaptic plasticity through fasciclin II-mediated cell adhesion. *J Neurosci*, **22**, 2496-2504.
- Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. and Seeburg, P.H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, **269**, 1737-1740.
- Kuhlendahl, S., Spangenberg, O., Konrad, M., Kim, E. and Garner, C.C. (1998) Functional analysis of the guanylate kinase-like domain in the synapse-associated protein SAP97. *Eur J Biochem*, **252**, 305-313.
- Lahey, T., Gorczyca, M., Jia, X.X. and Budnik, V. (1994) The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron*, **13**, 823-835.
- LaJeunesse, D.R., McCartney, B.M. and Fehon, R.G. (1998) Structural analysis of *Drosophila* merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. *J Cell Biol*, **141**, 1589-1599.
- Laski, F.A., Rio, D.C. and Rubin, G.M. (1986) Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell*, **44**, 7-19.

- Lazarides, E. and Nelson, W.J. (1983) Erythrocyte and brain forms of spectrin in cerebellum: distinct membrane-cytoskeletal domains in neurons. *Science*, **220**, 1295-1296.
- Lee, S., Fan, S., Makarova, O., Straight, S. and Margolis, B. (2002) A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin-2/CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. *Mol Cell Biol*, **22**, 1778-1791.
- Leonoudakis, D., Mailliard, W., Wingerd, K., Clegg, D. and Vandenberg, C. (2001) Inward rectifier potassium channel Kir2.2 is associated with synapse-associated protein SAP97. *J Cell Sci*, **114**, 987-998.
- Li, Y., Spangenberg, O., Paarmann, I., Konrad, M. and Lavie, A. (2002) Structural basis for nucleotide-dependent regulation of membrane-associated guanylate kinase-like domains. *J Biol Chem*, **277**, 4159-4165.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press. Inc., San Diego USA.
- Lisman, J.E. and Zhabotinsky, A.M. (2001) A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron*, **31**, 191-201.
- Lopes, C., Gassanova, S., Delabar, J.M. and Rachidi, M. (2001) The CASK/Lin-2 *Drosophila* homologue, Camguk, could play a role in epithelial patterning and in neuronal targeting. *Biochem Biophys Res Commun*, **284**, 1004-1010.
- Lue, R.A., Brandin, E., Chan, E.P. and Branton, D. (1996) Two independent domains of hDlg are sufficient for subcellular targeting: the PDZ1-2 conformational unit and an alternatively spliced domain. *J Cell Biol*, **135**, 1125-1137.
- Lue, R.A., Marfatia, S.M., Branton, D. and Chishti, A.H. (1994) Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9818-9822.
- Ma, D. and Jan, L.Y. (2002) ER transport signals and trafficking of potassium channels and receptors. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 287-292.
- Marfatia, S.M., Byron, O., Campbell, G., Liu, S.C. and Chishti, A.H. (2000) Human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein forms an oligomer in solution. Identification of the self-association site. *J Biol Chem*, **275**, 13759-13770.
- Marfatia, S.M., Leu, R.A., Branton, D. and Chishti, A.H. (1995) Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, **270**, 715-719.
- Marfatia, S.M., Morais-Cabral, J.H., Kim, A.C., Byron, O. and Chishti, A.H. (1997) The PDZ domain of human erythrocyte p55 mediates its binding to the cytoplasmic carboxyl

- terminus of glycophorin C. Analysis of the binding interface by in vitro mutagenesis. *J Biol Chem*, **272**, 24191-24197.
- Masuko, N., Makino, K., Kuwahara, H., Fukunaga, K., Sudo, T., Araki, N., Yamamoto, H., Yamada, Y., Miyamoto, E. and Saya, H. (1999) Interaction of NE-dlg/SAP102, a neuronal and endocrine tissue-specific membrane-associated guanylate kinase protein, with calmodulin and PSD-95/SAP90. A possible regulatory role in molecular clustering at synaptic sites. *J Biol Chem*, **274**, 5782-5790.
- Mathew, D., Gramates, L.S., Packard, M., Thomas, U., Bilder, D., Perrimon, N., Gorczyca, M. and Budnik, V. (2002) Recruitment of Scribble to the Synaptic Scaffolding Complex Requires GUK-holder, a Novel DLG Binding Protein. *Curr Biol*, **12**, 531-539.
- Mazoyer, S., Gayther, S.A., Nagai, M.A., Smith, S.A., Dunning, A., van Rensburg, E.J., Albertsen, H., White, R. and Ponder, B.A. (1995) A gene (DLG2) located at 17q12-q21 encodes a new homologue of the *Drosophila* tumor suppressor dlg-A. *Genomics*, **28**, 25-31.
- McCartney, B.M. and Fehon, R.G. (1996) Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J Cell Biol*, **133**, 843-852.
- McGee, A.W. and Brecht, D.S. (1999) Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J Biol Chem*, **274**, 17431-17436.
- McGee, A.W., Dakoji, S.R., Olsen, O., Brecht, D.S., Lim, W.A. and Prehoda, K.E. (2001a) Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Mol Cell*, **8**, 1291-1301.
- McGee, A.W., Topinka, J.R., Hashimoto, K., Petralia, R.S., Kakizawa, S., Kauer, F., Aguilera-Moreno, A., Wenthold, R.J., Kano, M. and Brecht, D.S. (2001b) PSD-93 knock-out mice reveal that neuronal MAGUKs are not required for development or function of parallel fiber synapses in cerebellum. *J Neurosci*, **21**, 3085-3091.
- McLaughlin, M., Hale, R., Ellston, D., Gaudet, S., Lue, R.A. and Viel, A. (2002) The distribution and function of alternatively spliced insertions in hDlg. *J Biol Chem*, **277**, 6406-6412.
- Migaud. (1998) enhanced long term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *nature*, **396**, 433-439.
- Missler, M., Fernandez-Chacon, R. and Sudhof, T.C. (1998) The making of neurexins. *J Neurochem*, **71**, 1339-1347.
- Mori, K., Iwao, K., Miyoshi, Y., Nakagawara, A., Kofu, K., Akiyama, T., Arita, N., Hayakawa, T. and Nakamura, Y. (1998) Identification of brain-specific splicing variants

- of the hDLG1 gene and altered splicing in neuroblastoma cell lines. *J Hum Genet*, **43**, 123-127.
- Muller, B.M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W.J., Kuhlendahl, S., Fenster, S.D., Lau, L.F., Veh, R.W., Haganir, R.L., Gundelfinger, E.D. and Garner, C.C. (1996) SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron*, **17**, 255-265.
- Muller, B.M., Kistner, U., Veh, R.W., Cases-Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E.D. and Garner, C.C. (1995) Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Neurosci*, **15**, 2354-2366.
- Munro, S. and Freeman, M. (2000) The notch signalling regulator fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DXD. *Curr Biol*, **10**, 813-820.
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F. and Sheng, M. (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, **23**, 569-582.
- Naisbitt, S., Valtschanoff, J., Allison, D.W., Sala, C., Kim, E., Craig, A.M., Weinberg, R.J. and Sheng, M. (2000) Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein. *J Neurosci*, **20**, 4524-4534.
- Nelson, W.J., Beck, K.A. and Piepenhagen, P.A. (1997) Roles of the membrane cytoskeleton in protein sorting. *Soc Gen Physiol Ser*, **52**, 47-54.
- Niethammer, M., Valtschanoff, J.G., Kapoor, T.M., Allison, D.W., Weinberg, T.M., Craig, A.M. and Sheng, M. (1998) CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron*, **20**, 693-707.
- Nix, S.L., Chishti, A.H., Anderson, J.M. and Walther, Z. (2000) hCASK and hDlg associate in epithelia, and their src homology 3 and guanylate kinase domains participate in both intramolecular and intermolecular interactions. *J Biol Chem*, **275**, 41192-41200.
- Okabe, S., Urushido, T., Konno, D., Okado, H. and Sobue, K. (2001) Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. *J Neurosci*, **21**, 9561-9571.
- Parnas, D., Haghighi, A.P., Fetter, R.D., Kim, S.W. and Goodman, C.S. (2001) Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix. *Neuron*, **32**, 415-424.

- Passafaro, M., Sala, C., Niethammer, M. and Sheng, M. (1999) Microtubule binding by CRIPT and its potential role in the synaptic clustering of PSD-95. *Nat Neurosci*, **2**, 1063-1069.
- Penzes, P., Johnson, R.C., Sattler, R., Zhang, X., Huganir, R.L., Kambampati, V., Mains, R.E. and Eipper, B.A. (2001) The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, **29**, 229-242.
- Perrimon, N. (1988) The maternal effect of lethal(1)discs-large-1: a recessive oncogene of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, **127**, 392-407.
- Petersen, S. A. Fetter, R. D. Noordermeer, J. N. Goodman, C. S. and DiAntonio, A. (1997) Genetic analysis of glutamate receptors in *Drosophila* reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron*, **6**, 1237-48.
- Ponting, C.P., Phillips, C., Davies, K.E. and Blake, D.J. (1997) PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays*, **19**, 469-479.
- Pumplin, D.W. (1995) The membrane skeleton of acetylcholine receptor domains in rat myotubes contains antiparallel homodimers of beta-spectrin in filaments quantitatively resembling those of erythrocytes. *J Cell Sci*, **108**, 3145-3154.
- Rabouille, C., Kuntz, D.A., Lockyer, A., Watson, R., Signorelli, T., Rose, D.R., van den Heuvel, M. and Roberts, D.B. (1999) The *Drosophila* GMII gene encodes a Golgi alpha-mannosidase II. *J Cell Sci*, **112**, 3319-3330.
- Rahkila, P., Alakangas, A., Vaananen, K. and Metsikko, K. (1996) Transport pathway, maturation, and targetting of the vesicular stomatitis virus glycoprotein in skeletal muscle fibers. *J Cell Sci*, **109**, 1585-1596.
- Ralston, E. (1993) Changes in architecture of the Golgi complex and other subcellular organelles during myogenesis. *J Cell Biol*, **120**, 399-409.
- Ralston, E., Lu, Z. and Ploug, T. (1999) The organization of the Golgi complex and microtubules in skeletal muscle is fiber type-dependent. *J Neurosci*, **19**, 10694-10705.
- Ralston, E., Ploug, T., Kalhovde, J. and Lomo, T. (2001 Feb 1) Golgi complex, endoplasmic reticulum exit sites, and microtubules in skeletal muscle fibers are organized by patterned activity. *J Neurosci*, **21**, 875-883.
- Razzaq, A., Robinson, I.M., McMahon, H.T., Skepper, J.N., Su, Y., Zehlf, A.C., Jackson, A.P., Gay, N.J. and O'Kane, C.J. (2001) Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev*, **15**, 2967-2979.
- Rheuben, M., Yoshihara, M. and Kidokoro, Y. (1999) Ultrastructural Correlates of Neuromuscular Junction Development. In Budnik, V. and Gramates, S.L. (eds.), *Neuromuscular Junctions in Drosophila*. Academic Press, San Diego, Vol. 43, pp. 69-89.

- Richter, J.D. and Lorenz, L.J. (2002) Selective translation of mRNAs at synapses. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 300-304.
- Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K. and Eaton, S. (1999) Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains. *J Biol Chem*, **274**, 12049-12054.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-8.
- 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**, 371-382.
- Ruff, P., Speicher, D.W. and Husain-Chishti, A. (1991) Molecular identification of a major palmitoylated erythrocyte membrane protein containing the src homology 3 motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6595-6599.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanes, J.R. and Lichtman, J.W. (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 389-442.
- Sans, N., Racca, C., Petralia, R.S., Wang, Y.X., McCallum, J. and Wenthold, R.J. (2001) Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci*, **21**, 7506-7516.
- Schuster, C.M., Davis, G.W., Fetter, R.D. and Goodman, C.S. (1996a) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth [see comments]. *Neuron*, **17**, 641-654.
- Schuster, C.M., Davis, G.W., Fetter, R.D. and Goodman, C.S. (1996b) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity [see comments]. *Neuron*, **17**, 655-667.
- Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K.J., Cole, N., Moreira, J.E., Terasaki, M., Siggia, E. and Lippincott-Schwartz, J. (1997) Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol*, **139**, 1137-1155.
- Sheng, M. and Kim, E. (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7058-7061.
- Shin, H., Hsueh, Y.P., Yang, F.C., Kim, E. and Sheng, M. (2000) An intramolecular interaction between Src homology 3 domain and guanylate kinase-like domain required for channel clustering by postsynaptic density-95/SAP90. *J Neurosci*, **20**, 3580-3587.
- Shirao, T. and Sekino, Y. (2001) Clustering and anchoring mechanisms of molecular constituents of postsynaptic scaffolds in dendritic spines. *Neurosci Res*, **40**, 1-7.

- Sigrist, S.J., Thiel, P.R., Reiff, D.F., Lachance, P.E., Lasko, P. and Schuster, C.M. (2000) Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature*, **405**, 1062-1065.
- Simonsen, A., Gaullier, J.M., D'Arrigo, A. and Stenmark, H. (1999) The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J Biol Chem*, **274**, 28857-28860.
- Smith, S.A., Holik, P., Stevens, J., Mazoyer, S., Melis, R., Williams, B., White, R. and Albertsen, H. (1996) Isolation of a gene (DLG3) encoding a second member of the discs-large family on chromosome 17q12-q21. *Genomics*, **31**, 145-150.
- Standley, S., Roche, K.W., McCallum, J., Sans, N. and Wenthold, R.J. (2000 Dec) PDZ Domain Suppression of an ER Retention Signal in NMDA Receptor NR1 Splice Variants. *Neuron*, **28**, 887-898.
- Stanley, H., Botas, J. and Malhotra, V. (1997) The mechanism of Golgi segregation during mitosis is cell type-specific. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14467-14470.
- Steward, O. and Schuman, E.M. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 299-325.
- Stewart, B.A., Atwood, H.L., Renger, J.J., Wang, J. and Wu, C.F. (1994) Improved stability of Drosophila larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol [A]*, **175**, 179-191.
- Takahisa, M., Togashi, S., Suzuki, T., Kobayashi, M., Murayama, A., Kondo, K., Miyake, T. and Ueda, R. (1996) The Drosophila tamou gene, a component of the activating pathway of extramacrochaetae expression, encodes a protein homologous to mammalian cell-cell junction-associated protein ZO-1. *Genes Dev*, **10**, 1783-1795.
- Takei, K., Stukenbrok, H., Metcalf, A., Mignery, G.A., Sudhof, T.C., Volpe, P. and De Camilli, P. (1992) Ca²⁺ stores in Purkinje neurons: endoplasmic reticulum subcompartments demonstrated by the heterogeneous distribution of the InsP₃ receptor, Ca(2+)-ATPase, and calsequestrin. *J Neurosci*, **12**, 489-505.
- Takeuchi, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M. and Takai, Y. (1997) SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J Biol Chem*, **272**, 11943-11951.
- Tavalin, S.J., Colledge, M., Hell, J.W., Langeberg, L.K., Huganir, R.L. and Scott, J.D. (2002) Regulation of GluR1 by the A-kinase anchoring protein 79 (AKAP79) signaling complex shares properties with long-term depression. *J Neurosci*, **22**, 3044-3051.
- Tavares, G.A., Panepucci, E.H. and Brunger, A.T. (2001) Structural characterization of the intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *Mol Cell*, **8**, 1313-1325.

- Tejedor, F.J., Bokhari, A., Rogero, O., Gorczyca, M., Zhang, J., Kim, E., Sheng, M. and Budnik, V. (1997) Essential role for *dlg* in synaptic clustering of Shaker K⁺ channels in vivo. *J Neurosci*, **17**, 152-159.
- Thomas, U. (2002) Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *J Neurochem*, **81**, 407-413.
- Thomas, U., Ebitsch, S., Gorczyca, M., Koh, Y.H., Hough, C.D., Woods, D., Gundelfinger, E.D. and Budnik, V. (2000) Synaptic targeting and localization of discs-large is a stepwise process controlled by different domains of the protein. *Curr Biol*, **10**, 1108-1117.
- Thomas, U., Kim, E., Kuhlendahl, S., Koh, Y.H., Gundelfinger, E.D., Sheng, M., Garner, C.C. and Budnik, V. (1997a) Synaptic clustering of the cell adhesion molecule fasciclin II by discs-large and its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron*, **19**, 787-799.
- Thomas, U., Phannavong, B., Muller, B., Garner, C.C. and Gundelfinger, E.D. (1997b) Functional expression of rat synapse-associated proteins SAP97 and SAP102 in *Drosophila* *dlg-1* mutants: effects on tumor suppression and synaptic bouton structure. *Mech Dev*, **62**, 161-174.
- Tiffany, A.M., Manganas, L.N., Kim, E., Hsueh, Y.P., Sheng, M. and Trimmer, J.S. (2000) PSD-95 and SAP97 exhibit distinct mechanisms for regulating K(+) channel surface expression and clustering. *J Cell Biol*, **148**, 147-158.
- Tomita, S., Nicoll, R.A. and Brecht, D.S. (2001) PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J Cell Biol*, **153**, F19-24.
- Topinka, J.R. and Brecht, D.S. (1998) N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron*, **20**, 125-134.
- Tooze, J., Kern, H. F., Fuller, S. D. and Howell, K. E. (1989) Condensation-sorting events in the rough endoplasmic reticulum of exocrine pancreatic cells. *J Cell Biol*, **109**, 35-50.
- Tuvia, S., Buhusi, M., Davis, L., Reedy, M. and Bennett, V. (1999) Ankyrin-B is required for intracellular sorting of structurally diverse Ca²⁺ homeostasis proteins. *J Cell Biol*, **147**, 995-1008.
- Ursitti, J.A., Pumplin, D.W., Wade, J.B. and Bloch, R.J. (1991) Ultrastructure of the human erythrocyte cytoskeleton and its attachment to the membrane. *Cell Motil Cytoskeleton*, **19**, 227-243.
- Valtschanoff, J.G. and Weinberg, R.J. (2001) Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. *J Neurosci*, **21**, 1211-1217.

- Wang, Z., Palmer, G. and Griffith, L.C. (1998) Regulation of Drosophila Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by autophosphorylation analyzed by site-directed mutagenesis. *J Neurochem*, **71**, 378-387.
- Wang, Z., Wilson, G.F. and Griffith, L.C. (2002) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates and regulates the Drosophila Eag potassium channel. *J Biol Chem*, **29**, 29.
- Woods, D.F. and Bryant, P.J. (1989) Molecular cloning of the lethal(1)discs large-1 oncogene of Drosophila. *Dev Biol*, **134**, 222-235.
- Woods, D.F. and Bryant, P.J. (1991) The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell*, **66**, 451-464.
- Woods, D.F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G. and Bryant, P.J. (1996) Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in Drosophila epithelia. *J Cell Biol*, **134**, 1469-1482.
- Wu, H., Reissner, C., Kuhlendahl, S., Coblenz, B., Reuver, S., Kindler, S., Gundelfinger, E.D. and Garner, C.C. (2000) Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *Embo J*, **19**, 5740-5751.
- Wu, H., Reuver, S.M., Kuhlendahl, S., Chung, W.J. and Garner, C.C. (1998) Subcellular targeting and cytoskeletal attachment of SAP97 to the epithelial lateral membrane. *J Cell Sci*, **111**, 2365-2376.
- Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1071-1089.
- Zelhof, A.C., Bao, H., Hardy, R.W., Razzaq, A., Zhang, B. and Doe, C.Q. (2001) Drosophila Amphiphysin is implicated in protein localization and membrane morphogenesis but not in synaptic vesicle endocytosis. *Development*, **128**, 5005-5015.
- Zhang, W., Vazquez, L., Apperson, M. and Kennedy, M.B. (1999) Citron binds to PSD-95 at glutamatergic synapses on inhibitory neurons in the hippocampus. *J Neurosci*, **19**, 96-108.
- Zhong, Y. and Pena, L.A. (1995) A novel synaptic transmission mediated by a PACAP-like neuropeptide in Drosophila. *Neuron*, **14**, 527-536.
- Zito, K., Fetter, R.D., Goodman, C.S. and Isacoff, E.Y. (1997) Synaptic clustering of Fascilin II and Shaker: essential targeting sequences and role of Dlg. *Neuron*, **19**, 1007-1016.
- Ziv, N.E. and Garner, C.C. (2001) Principles of glutamatergic synapse formation: seeing the forest for the trees. *Curr Opin Neurobiol*, **111**, 536-543.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicilin
ATP	Adenosintriphosphat
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
BfA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin „bovine serum albumin“
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca ²⁺ /CaM abhängige Kinase II
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	Phosphatase aus Kälberdarm „calf intestinal phosphatase“
D- / d-	<i>Drosophila</i> -
DEPC	Diethyloxydifformat
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
<i>dlg</i>	<i>discs large</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
EGTA	Ethylenglycol-bis-tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
g/rER	glattes/rauhes endoplasmatisches Retikulum
Gal4	Galaktosidase 4
GMP	Guanosinmonophosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde (n)
HCl	Salzsäure
hDLG	humanes DLG
HL3	„hemolymphlike solution 3“
HRP	Meerrettichperoxidase
IGEPAL	(Octylphenoxy)polyethoxyethanol

IHC	Immunhistochemie
kb	kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
M	Molar
m	milli
MAGuK	„ <u>m</u> embrane <u>a</u> ssociated <u>g</u> uanylate <u>k</u> inase homologue“
MHC	„ <u>m</u> yosin-heavy-chain promotor“
min	Minuten
mRNA	Botenribonukleinsäure, „messenger RNA“
NaOH	Natronlauge
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerasen Kettenreaktion, „polymerase chain reaction“
PFA	Paraformaldehyd
pH	Wasserstoffionenkonzentration
PLAA	poly (L-Aspartatsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PSD	Postsynaptische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute, „rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SAP	„synapse associated protein“
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SR	sarcoplasmatisches Retikulum
SSR	subsynaptisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Tubuli	Transverse Tubuli
U	„unit“
u.a.	unter anderem
UAS	„upstream activating sequence“
UV	ultraviolett
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentralnervensystem

7.2 Vergleichende Zusammenstellung der Originalsequenzen

Nachweis der Deletion der N-terminalen Region

```

      1                               50
N      ATGACAACGA GGAAAAAGAA GCGCGACGGC GCGGCGAGCG GCGGCGGATT
Del N  ATGACAACG. ....
      51                               100
N      CATCAAGAAA GTTTCGTCAC TCTTCAATCT GGATTCCGGTG AATGGCGATG
Del N  .....
      101                              150
N      ATAGCTGGTT ATACGAGATG ACAACGAGGA AAAAGAAGCG CGACGGCGGC
Del N  .....
      151                              200
N      GGCAGCGGCG GCGGATTCAT CAAGAAAGTT TCGTCACTCT TCAATCTGGA
Del N  .....
      201                              234
N      TTCGGTGAAT GCGGATGATA GCTGGTTATA CGAG
Del N  .....TA CGAG

```

N:	Sequenz der <i>dlg</i> cDNA m73529.gb_in , Startcodon (ATG) bis PDZ1
Del N:	Klon 37, 26.3.98

Nachweis der Deletionen in der Hook-Region

```

      2376                              2426
Hook   TGGGAGCGCA AAATGCGAGC TAGGGACCGC AGCGTTAAGT TCCAGGGACA
Del E-F TGG..... ..CAGGGACA
Del I3 TGGGAGCGCA AAATGCGAGC TAGGGACCGC AGCGTTAAGT TCCAGGGACA

      2427                              2477
Hook   TGCGGCAGCT AATAATAATC TGGATAAGCA ATCGACATTG GATCGAAAAGA
Del E-F TGCGGCAGCT AATAATAATC TGGATAAGCA ATCGACATTG GATCGAAAAGA
Del I3 TGCGGCAGCT AATAATAATC TGGATAAGCA .....

      2478                              2528
Hook   AAAAGAATTT CACATTCTCG CGCAAATTTT CGTTTATGAA GAGTCGCGAT
Del E-F AAAAGAATTT CACATTCTCG CGCAAATTTT CGTTTATGAA GAGTCGCGAT
Del I3 .....

      2529                              2579
Hook   GAGAAGAATG AAGATGGCAG CGACCAAGAG CCCAATGGAG TTGTGAGCAG
Del E-F GAGAAGAATG AAGATGGCAG CGACCAAGAG CCCAATGGAG TTGTGAGCAG
Del I3 .....G CCCAATGGAG TTGTGAGCAG

      2580                              2630
Hook   CACCAGCGAG ATTGACATCA ATAATGTCAA CAACAACCAG TCAAATGAAC
Del E-F CACCAGCGAG ATTGACATCA ATAATGTCAA CAACAACCAG TCAAATGAAC
Del I3 CACCAGCGAG ATTGACATCA ATAATGTCAA CAACAACCAG TCAAATGAAC

```

Hook:	Sequenz der Hook-Region der cDNA m73529.gb_in
Del E-F:	Klon 38, 24.6.98
Del I3:	Klon 2, 24.3.98

Nachweis der Punktmutationen in der GuK-Domäne

2758 **RsaI**

GuK ACAAGTTCGG CTCCTGTGTG CCACACACCA CCCGACCCAA GCGAGAGTAC

GK1-2 ACAAGTTCGG CTCCTGTGTG CCACACACCA CCCGACCCAA GCGAGAGTAC

~~**RsaI**~~

GuK GAGGTGGATG GTAGGGAC TA C CACTTTGTA TCCTCTCGCG AGCAAATGGA

GK1-2 GAGGTGGATG GTAGGGAC TG G CACTTTGTA TCCTCTCGCG AGCAAATGGA

Y->W

GuK ACGGGATATT CAGAATCATC TG TTCATC GA G GCGGGACAG TATAACGACA

GK1-2 ACGGGATATT CAGAATCATC TG TTCATC TG G GCGGGACAG TATAACGACA

E->W

RsaI

GuK ATCTG TAC GG CACATCGGTG GCCAGCGTGC GCGAAGTGGC CGAGAAGGGT

GK1-2 ATCTG TCC GG CACATCGGTG GCCAGCGTGC GCGAAGTGGC CGAGAAGGGT

~~**RsaI**~~; **Y->S**

GuK AAACACTGCA TCCTGGACGT GTCCGGGAAC GCCATCAAGC GACTCCAAGT

GK1-2 AAACACTGCA TCCTGGACGT GTCCGGGAAC GCCATCAAGC GACTCCAAGT

GuK TGCCAGCTG TATCCCGTCG CCGTGTTCAT CAAGCCCAAG TCGGTGGATT

GK1-2 TGCCAGCTG TATCCCGTCG CCGTGTTCAT CAAGCCCAAG TCGGTGGATT

GuK CAGTGATGGA AATGAATCGT CGCATGACGG AGGAGCAGGC CAAGAAGACT

GK1-2 CAGTGATGGA AATGAATCGT CGCATGACGG AGGAGCAGGC CAAGAAGACT

GuK TACGAGCGGG CGATTAAAAAT GGAGCAAGAA TTCGGCGAAT ACTTTACGGG

GK1-2 TACGAGCGGG CGATTAAAAAT GGAGCAAGAA TTCGGCGAAT ACTTTACGGG

GuK CGTTGTCCAG GCGGATACCA TCGAGGAGAT CTACAGCAAA GTGAAATCGA

GK1-2 CGTTGTCCAG GCGGATACCA TCGAGGAGAT CTACAGCAAA GTGAAATCGA

GuK TGATTTGGTC CCAGTCGGGA CCAACCATT TGGTACCTTC CAAGGAATCT

GK1-2 TGATTTGGTC CCAGTCGGGA CCAACCATT TGGTACCTTC CAAGGAATCT

3263

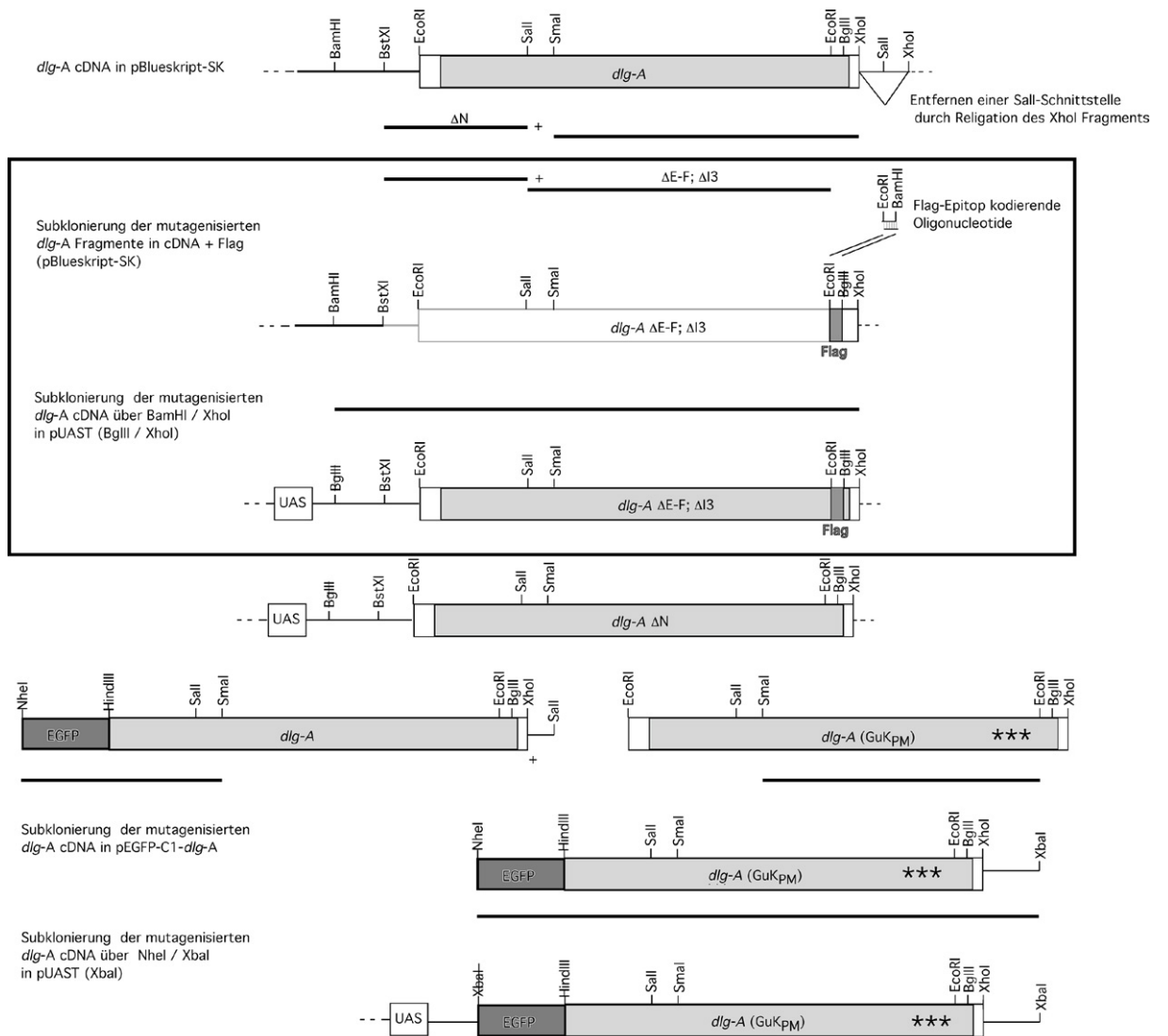
GuK CTATGA

GK1-2 CTATGA

Stop

GuK:	Sequenz der <i>dlg</i> cDNA m73529.gb_in der GuK-Domäne
RsaI	Durch Punktmutation zerstörte RsaI-Schnittstelle (<u>GTAC</u>)
	Durch Punktmutation veränderte Codons
	Basenaustausch
X->Y	Aminosäureaustausch

7.3 Klonierungsschema



Lebenslauf

Name	Susanne Ebitsch
Geburtstag	12. März. 1972
Geburtsort	Bamberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Marlene Ebitsch, geb. Thurn und Wilhelm Ebitsch
 Bildungsweg	
1978 – 1982	Besuch der Grundschule in Ebensfeld-Prächting
1982 – 1991	Besuch des Gymnasiums der Englischen Fräulein in Bamberg
Juni 1991	Abitur
Oktober 1991 – Juli 1994	Studium der Diplombiologie an der Universität Bayreuth
Oktober 1994 – April 1996	Studium der Diplombiologie an der Universität Göttingen
April 1996-Dezember 1997	Diplomarbeit am Deutschen Primatenzentrum, Abteilung Virologie, Göttingen
Dezember 1997 – August 2002	Anfertigung der Doktorarbeit am Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg

Magdeburg, den 28.08.2002

.....
Susanne Ebitsch

Verzeichnis der bisherigen wissenschaftlichen Publikationen:**Referierte Originalarbeiten**

Goldmann, C., Petry, H., Frye, S., Ast, O., Ebitsch, S., Jentsch, K.D., Kaup, F.J., Weber, F., Trebst, C., Nisslein, T., Hunsmann, G., Weber, T. and Luke, W. (1999)
Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J Virol*, **73**, 4465-4469.

Thomas, U., Ebitsch, S., Gorczyca, M., Koh, Y.H., Hough, C.D., Woods, D., Gundelfinger, E.D. and Budnik, V. (2000)
Synaptic targeting and localization of discs-large is a stepwise process controlled by different domains of the protein. *Curr Biol*, **10**, 1108-1117.

In Revision:

Mendoza, C., Olguin, P., Lafferte, G., Thomas, U., Ebitsch, S., Gundelfinger, E. D., Kukuljan, M. and Sierralta, J.
Neural specific products of *dlg* are fundamental for neuronal development in *Drosophila*. *J. Neurosci*.

Posterbeiträge:

S. Ebitsch, U. Thomas und E.D. Gundelfinger

Funktionelle Charakterisierung von Domänen des *Drosophila* Tumorsuppressor- und Synapsen-Proteins DlgA. 9. Neurobiologischer Doktorandenworkshop, 11.-13.9.98, Würzburg.

S. Ebitsch, U. Thomas, M. Gorczyca, V. Budnik und E.D. Gundelfinger (1999)

Characterization of functional domains of the *Drosophila* tumor suppressor and synapse protein DLG. *J. Neurochemistry* Vol. 73; Suppl., S86C (ISN Meeting; 8.-14.8.1999, Berlin)

S. Ebitsch, U. Thomas, Y.H. Koh, M. Gorczyca, V. Budnik und E.D. Gundelfinger (2000)

Step by step: different domains of the *Drosophila* protein DLG mediate synaptic targeting. 8th European Symposium on Drosophila Neurobiology Neurofly, 23.-27.9.00, Alicante

J. Neurogenet. 2001 May;15(1):1-74.

Magdeburg, den 28. August 2002

.....

Susanne Ebitsch