

**Klonierung, Überexpression und immuncytochemische
Lokalisation des axonalen Wachstumsfaktors GAP-43
bei Insekten: Invertebrate GAP-43 like Protein.**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Ronny Hänold
Geboren am 24. Dezember 1974 in Gera

Gutachter:

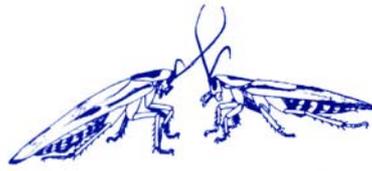
1. PD Dr. habil. H.-J. Agricola (Jena)
2. Prof. Dr. S.H. Heinemann (Jena)
3. Prof. Dr. M. Heisenberg (Würzburg)

Tag des Rigorosums: 26. Februar 2004

Tag der öffentlichen Verteidigung: 13. April 2004

Denken
ist interessanter
als Wissen,
aber nicht
als Anschauen.

Johann Wolfgang von Goethe



Die vorliegende Arbeit wurde durch die
Konrad-Adenauer-Stiftung e.V.
im Rahmen eines Promotionsstipendiums gefördert.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Growth-associated protein-43 (GAP-43)	2
1.1.1 Struktur	3
1.1.2 Lokalisation und Expression	5
1.1.3 Physiologische Funktion	8
1.2 GAP-43-Homologe bei Invertebraten	9
1.3 Ziel der Arbeit	11
2. Material und Methoden	13
2.1 Versuchstiere	13
2.1.1 Präparation	13
2.1.2 Axotomie	14
2.2 Klonierung von <i>igl</i>	14
2.2.1 Gewebeproben	14
2.2.2 mRNA-Isolation	14
2.2.3 Oligonukleotide	15
2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR); RT-PCR, RACE-PCR	18
2.2.5 DNA-Standardmethoden	20
2.2.6 Datenauswertung	21
2.3 Transiente Expression	21
2.3.1 Plasmidkonstruktion	21
2.3.2 Transfektion von CHO-Zellen	22
2.4 Antikörperherstellung	22
2.4.1 Plasmidkonstruktion	22
2.4.2 Proteinexpression	23
2.4.3 Immunisierung von Kaninchen	23
2.4.4 Serumreinigung	23

2.4.5 Antikörpertest	24
2.4.5.1 Western blotting	24
2.4.5.2 Immunfärbung	24
2.5 Immuncytochemie	25
2.5.1 Fixierung und Schneiden	25
2.5.2 Immunmarkierung	25
2.5.2.1 IGL-L Immunmarkierung	25
2.5.2.2 Doppelfärbungen (Perisulfakinin, Proctolin, GABA)	26
2.5.3 Einbettung	26
2.5.4 Auswertung	26
2.6 Ultrastrukturuntersuchung	27
2.6.1 Fixierung und Immunmarkierung	27
2.6.2 Einbettung, Schneiden und Auswertung	27
3. Ergebnisse	28
<hr/>	
3.1 Klonierung von <i>igl</i>	28
3.1.1 Klonierung von <i>Drosophila igloo-L</i> und <i>igloo-S</i>	28
3.1.2 Klonierung von <i>Periplaneta igl-L</i> und <i>igl-S</i>	29
3.1.3 Amplifikation der codierenden Sequenzen von <i>igl-L</i> und <i>igl-S</i>	32
3.2 Transiente Expression in CHO-Zellen	36
3.3 Antikörperherstellung	39
3.3.1 Proteinexpression	39
3.3.2 Spezifitätstests	40
3.4 Immuncytochemie	45
3.4.1 gewebespezifische Expression	45
3.4.2 Expression im zentralen Nervensystem	45
3.4.3 Expression im peripheren Nervensystem	46
3.4.4 Entwicklung der IGL-L Immunreaktivität	47
3.4.5 Genese und Regeneration der PDS-Interneurone	49
3.4.6 Kolokalisation mit Neurotransmittern	49
3.5 Ultrastrukturuntersuchung	50

4. Diskussion **57**

5. Zusammenfassung **75**

6. Referenzen **77**

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

Publikationsliste

Danksagung

Bildnachweis

Abkürzungsverzeichnis

A.S.....	Aminosäure
Alignment.....	computergestützter Vergleich von (homologen) Sequenzen
Amp ^r	ampicillinresistent
BLAST.....	Computerprogramm zum Vergleich von Sequenzen, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp.....	Basenpaare
CaM.....	Calmodulin
CHO-Zelllinie.....	chinese hamster ovary –Zellen
Da.....	Dalton
(d)dNTP.....	(Di)desoxynucleotid-5'-Triphosphat
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> : und andere
GAP-43.....	growth-associated protein-43 (B-50, F1, pp46, p57, Neuromodulin)
pIGL.....	Invertebrate GAP-43-like (IGL-L: long; IGL-S: short) <i>(Periplaneta americana)</i>
dIGLOO.....	Invertebrate GAP-43-like (IGLOO-L: long; IGLOO-S: short) <i>(Drosophila melanogaster)</i>
IR.....	Immunreaktivität
Kan ^r	kanamycinresistent
NCBI.....	<i>National Centers for Biotechnology Information</i>
NGF.....	nerve growth factor
ORF.....	open reading frame (offener Leserahmen)
PC12-Zelllinie.....	Pheochromocytoma-Zellen
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDS-Neuron.....	Protocerebrales Deszendierendes Sulfakinin-IR Interneuron
PKC.....	Proteinkinase C
Primer.....	für die Synthese von DNA- oder RNA-Strängen benötigtes Oligonukleotid mit 3'-OH Ende
PSK.....	Perisulfakinin
RNA.....	Ribonukleinsäure
Tet ^r	tetracyclinresistent
TITAN-Neurone.....	Temporary Identified Two pairs of Abdominal ganglia Neurons
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)aminoethan

1. Einleitung

Die koordinierte Reaktion von tierischen Organismen auf externe und interne Reize basiert auf der adäquaten Signalverarbeitung durch komplexe Nervensysteme. Sie stellen die am höchsten organisierte Struktur im Bereich der belebten Materie dar. Trotz unterschiedlicher Entwicklungsstufen ist allen Nervensystemen die Grundstruktur eines neuronalen Netzes gemeinsam, welches sich aus der Verknüpfung der einzelnen Bausteine, den Nervenzellen (Neuronen), assembliert. Im humanen Zentralnervensystem (ZNS) steht ein Neuron durchschnittlich mit 1000 weiteren Nervenzellen in Kontakt. Dem gerichteten Informationsfluss liegt dabei eine morphologische Polarisierung der Neurone zugrunde, welche auf der Bildung von dendritischen (Input-Region) und axonalen (Output-Region) Zellfortsätzen beruht. Das Wachstum dieser primär undifferenzierten Neurite sowie ihre Spezialisierung erfolgen während der Neurogenese und sind an die Expression spezifischer wachstumsassoziiierter Proteine (GAPs: growth-associated proteins) gebunden (Skene & Willard, 1981). Die Bildung dieser Proteine während der Entwicklung oder Regeneration erfolgt temporär und wird durch Faktoren, die eine stabilisierende Wirkung auf das neuronale Netzwerk ausüben, abgelöst (Kapfhammer & Schwab, 1994b; Kapfhammer, 1997). Solche Wachstumsinhibitoren werden häufig von Gliazellen exprimiert. Sie bewirken in den Neuronen die Aktivierung intrinsischer Faktoren, die die Transkription von GAP-Proteinen herunterregulieren und die Expression von „Ankerproteinen“ initiieren (Schwab & Caroni, 1988). Im Kontext der GAP-Hypothese (Skene & Willard, 1981; Skene, 1989; Bisby & Tetzlaff, 1992) werden die wachstumsregulatorischen Proteine in zwei funktionelle Klassen eingeteilt. (1) Konstitutiv exprimierte Faktoren wie Aktin, α -Tubulin und Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) formen als Strukturproteine das axonale bzw. dendritische Gerüst. Dabei spiegelt sich die Assemblierung dieser häufig filamentösen Partikel unmittelbar in der motorischen Aktivität des Wachstumskegels (growth cone) wieder (Heidemann, 1996). (2) Die zweite Gruppe von GAPs umfasst Proteine, die als molekulare Schalter agieren und zelluläre Differenzierungsprozesse regulieren. Ihre Funktion besteht z.B. in der Einleitung und Aufrechterhaltung des Neuritenwachstums (Initiation der Neuritogenese und Neuritelongation). Diese Proteine sind insbesondere für das gerichtete Wachstum der Axone verantwortlich. Als „Taster“ sind sie häufig an der Spitze des auswachsenden Axons an bzw. in der Membran

lokalisiert, wo sie in die Integration extrazellulärer Signale eingebunden sind. Die Navigation der auswachsenden Axone, die beim Menschen ihre Zielzellen in einer Entfernung von bis zu einem Meter kontaktieren, ist für die korrekte Verknüpfung des neuronalen Netzes von großer Bedeutung. Dabei werden die Wachstumskegel durch zahlreiche entwicklungsregulierte, extrinsische Signale geleitet. Aufgrund ihrer Struktur werden sie in Gruppen zusammengefasst, zu denen z.B. die Netrine (Manitt & Kennedy, 2002), Ephrine (Himanen & Nikolov, 2003; McLaughlin *et al.*, 2003) und Semaphorine (Püschel, 1996; Bagri & Tessier-Lavigne, 2002) gehören. Diese „Wegweiser“ stehen in direktem Kontakt mit dem auswachsenden Axon und navigieren den Wachstumskegel durch attraktive oder repulsive Wirkung (Sperry, 1963; Reichardt & Tomaselli, 1991; Brose *et al.*, 1999). Ihre evolutiv konservierte Funktion bei Vertebraten und Invertebraten wurde unter anderem für die Semaphorine nachgewiesen (Legg & O'Connor, 2003). Die Bindung dieser Moleküle an axonale Membranrezeptoren löst die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden aus. Am Beispiel des Integrinrezeptors konnte gezeigt werden, dass der aktivierte Rezeptor in Second-messenger-Systeme eingreift und zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt (Wu *et al.*, 2001). Diese Prozesse finden lokal begrenzt, in so genannten „hot spots“ der Zellmembran, statt. Innerhalb dieser Mikrodomänen übernehmen Kalziumionen eine entscheidende regulatorische Funktion. Neben der direkten Interaktion mit Effektoren reguliert das Ion über das Kalzium-bindende Protein Calmodulin zahlreiche Enzyme und Ionenkanäle (Anglister *et al.*, 1982; Spitzer, 1991; Zheng *et al.*, 1996; Gu & Spitzer, 1997). Das quantitativ dominierende Calmodulin-bindende Protein im Wachstumskegel bei Vertebraten-Neuronen repräsentiert den „Prototyp“ der GAP-Proteine. Es wird als growth-associated protein **GAP-43** bezeichnet (Skene & Willard, 1981; Benowitz & Routtenberg, 1997; Oestreicher *et al.*, 1997). Seine Nomenklatur richtet sich nach dem apparenten Molekulargewicht von 43kDa.

1.1 Growth-associated protein 43 (GAP-43)

Das growth-associated protein wurde in den 70er Jahren als synaptisches Phosphoprotein B-50 (Zwiers *et al.*, 1976; Aloyo *et al.*, 1983) bzw. F1 (Ehrlich & Routtenberg, 1974; Akers & Routtenberg, 1985; Lovinger *et al.*, 1986; Rosenthal *et al.*, 1987), als Ca²⁺-unabhängiges Calmodulin-bindendes Protein p57 (Andreasen *et al.*, 1983; Cimler *et al.*, 1987) bzw. Neuromodulin (Alexander *et al.*, 1988) sowie als membranständiges,

wachstums- und regenerationsassoziiertes Protein pp46 des axonalen Wachstumskegels (Katz *et al.*, 1985) bzw. GAP-43 (Skene & Willard, 1981; Meiri *et al.*, 1986; Skene *et al.*, 1986) unabhängig identifiziert (Skene, 1989). Der unterschiedliche Kontext, in dem GAP-43 entdeckt wurde, spiegelt die vielfältigen Interaktionen des Proteins wider.

1.1.1 Struktur

Das Protein GAP-43 wurde unter anderem bei Mensch (Kosik *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 1988), Ratte (Nielander *et al.*, 1987), Rind (Wakim *et al.*, 1987), Huhn (Baizer *et al.*, 1990), Goldfisch (LaBate & Skene, 1989) und Krallenfrosch (Shain *et al.*, 1995) sequenziert. Humanes GAP-43 besteht aus 238 Aminosäuren, im Sequenzvergleich mit dem GAP-43 anderer Vertebraten werden zwei konservierte Domänen (Skene, 1989; LaBate & Skene, 1989) deutlich (Abb.1.1).

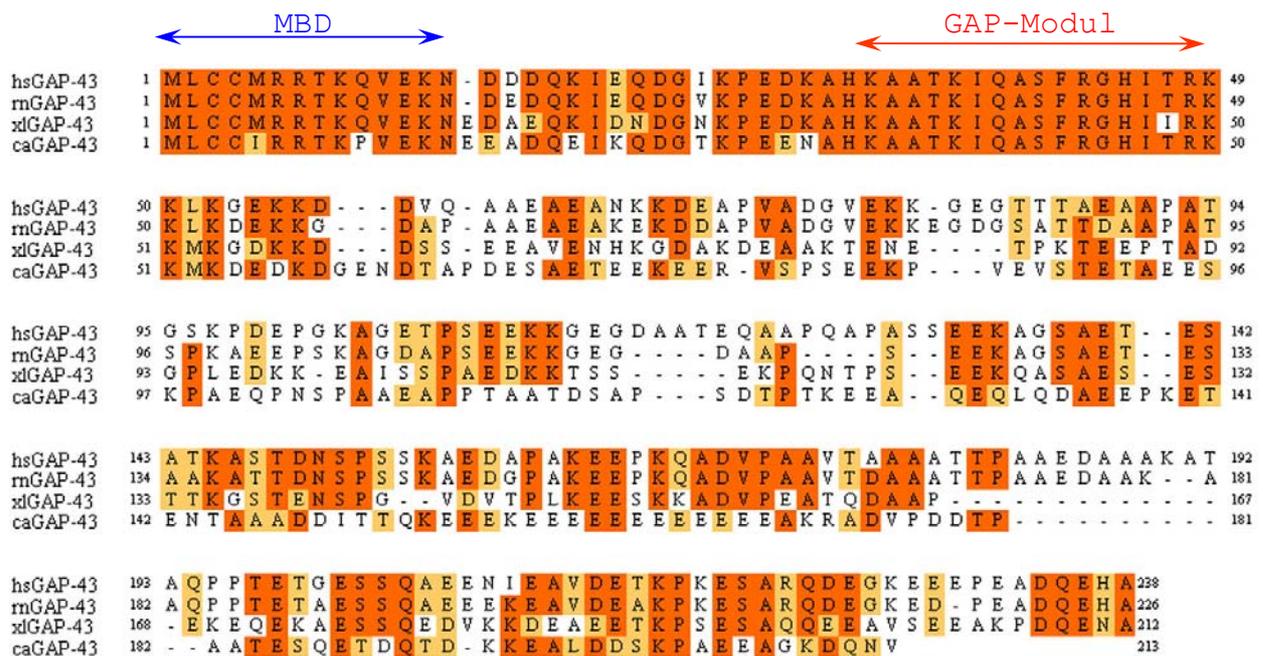


Abb.1.1: Sequenzvergleich des growth-associated protein (GAP-43) verschiedener Vertebraten. Im Alignment sind die Proteine von Mensch (hs), Ratte (rn), Krallenfrosch (xl) sowie Goldfisch (ca) dargestellt. Der konservierte Aminoterminus umfasst die Membranbindedomäne (MBD) mit den palmitoylierten Cys3 und Cys4 sowie die Proteinkinase C-regulierte Calmodulinbindedomäne vom IQ-Typ mit einem Serinrest (GAP-Modul).

Membranbindedomäne

Der aminoternale Bereich GAP-43[1-14] agiert als Membranbindedomäne. GAP-43 ist kein Transmembranprotein. Es wird durch einen hydrophoben Fettsäureanker an die innere Seite der Plasmamembran gebunden (Basi *et al.*, 1987; Skene & Virág, 1989; Wiederkehr *et al.*, 1997). Die posttranslationale Acylierung des Proteins erfolgt als Mono- oder Dipalmitoylierung der Cysteinreste Cys3 und Cys4 und ist reversibel (De Graan *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993). Für die Membranlokalisation von GAP-43 ist neben den beiden Cysteinen die aminoternale Domäne mit den basischen Aminosäuren Arginin (Arg6, Arg7) und Lysin (Lys9, Lys13) von wesentlicher Bedeutung (Liang *et al.*, 2002). Darüber hinaus enthält das Membranbindemotiv von GAP-43 die Konsensussequenz *hydrophob-Leu-Cys-Cys-X-basisch-basisch*, die als intrazelluläre Aktivierungsdomäne für die G-Proteine G₀ und G_i wirkt (Strittmatter *et al.*, 1990, 1991a, b; Aarts *et al.*, 1998). Die Palmitoylierung von GAP-43 verhindert diese Stimulation (Sudo *et al.*, 1992).

Calmodulinbindedomäne

Das 17 Aminosäuren umfassende, hoch konservierte Motiv KAATK**IQ**ASFRGHITRK stellt eine Proteinkinase C (PKC)-regulierte Calmodulinbindedomäne vom **IQ**-Typ dar (Alexander *et al.*, 1988): eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration oder die Phosphorylierung von Ser41 (hGAP-43) (Aloyo *et al.*, 1983; Akers & Routtenberg, 1985; Nelson & Routtenberg, 1985) beenden bzw. verhindern die Bindung von Calmodulin (Alexander *et al.*, 1987; De Graan *et al.*, 1990). Umgekehrt stellt das CaM-gebundene GAP-Modul für die PKC kein Substrat mehr dar. In Anwesenheit von Phosphatidylglycerol wurde eine Konformationsänderung des GAP-Moduls von einer random coil-Konformation in eine α -Helix beobachtet, die durch Phosphorylierung oder CaM-Bindung aufgehoben wurde (Hayashi *et al.*, 1997). Die Hypothese, nach der das amphiphile GAP-Modul an Membranen bindet und direkt an der Plasmalemmlokalisation von GAP-43 beteiligt ist (Hayashi *et al.*, 1997), wurde nicht bestätigt und gilt als unwahrscheinlich. Eine „funktionelle Minimallösung“ charakterisiert das GAP-Modul als Calmodulinspeicher, der Calmodulin in der Subplasmalemma-Zone bindet und es bei entsprechenden Second-messenger-Signalen (DAG, Ca²⁺-Anstieg) zur Aktivierung von CaM-abhängigen Kaskaden entlässt (Skene, 1989; Hens *et al.*, 1995; Verkade *et al.*, 1997).

Carboxyterminus

Der C-Terminus verschiedener GAP-43 Proteine besitzt zwar eine geringere Sequenzhomologie, zeigt aber eine konservierte Aminosäurezusammensetzung. Insbesondere dieser Bereich zeichnet sich durch negativ geladene Aminosäurereste aus (LaBate & Skene, 1989) und verleiht dem Protein seinen sauren Charakter mit einem isoelektrischen Punkt (IEP) zwischen 4,4 und 4,6 (Zwiers *et al.*, 1985). Er gilt als mögliche Bindestelle für Aktinfilamente (Moss *et al.*, 1990; Meiri & Gordon-Weeks, 1990, Strittmatter *et al.*, 1992; He *et al.*, 1997).

1.1.2 Lokalisation und Expression

GAP-43 ist ein selektiv neuronal exprimiertes Protein, dessen Lokalisation auf präsynaptische Areale konzentriert ist (Ramakers *et al.*, 1992). Das Expressionsniveau ist entwicklungsabhängig reguliert und erreicht Maximalwerte von 50-100 μ M (Apel & Storm, 1992) in auswachsenden und regenerierenden Axonen. Die Lokalisation an der cytoplasmatischen Seite des Axolemma sowie an Elementen des Cytoskeletts wurde elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Gispén *et al.*, 1985; Norden *et al.*, 1987; Van Lookeren Campagne *et al.*, 1991a, b; Wiederkehr *et al.*, 1997). GAP-43 Immunreaktivität wird in den Wachstumskegeln auswachsender Nervenzell-Fortsätze detektiert (Abb.1.2). Dabei erfolgt die Lokalisation in zahlreichen Neuriten einer Zelle. Mit Beginn der neuronalen Polarisierung weist das Protein eine exklusiv axonale Lokalisation auf (Goslin *et al.*, 1988, 1990), die durch seine aminoterminalen Domäne codiert wird (El-Husseini *et al.*, 2001).

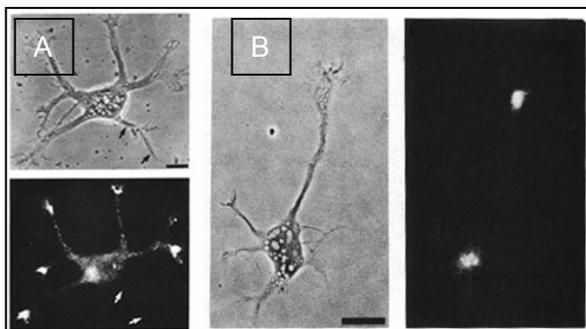


Abb.1.2: GAP-43 ist während der Neuritogenese in den Wachstumskegeln aller Neurite (A), nach der Differenzierung des Axons selektiv im axonalen Wachstumskegel (B) lokalisiert (Goslin *et al.*, 1990).

Dabei wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Navigation des Wachstumskegels und dem Phosphorylierungsstatus des Proteins identifiziert: während die Expansion des Wachstumskegels mit der Phosphorylierung von GAP-43 korreliert ist, überwiegt während stagnierender Wachstumsphasen sowie bei der Retraktion die Dephosphorylierung des Proteins (Dent & Meiri, 1998). Es wird diskutiert, ob GAP-43 am Neuritenwachstum oder an der Determination der axonalen Differenzierung beteiligt ist (Goslin *et al.*, 1990).

Über die ontogenetische Entwicklung der GAP-43 Immunreaktivität wurden umfangreiche Lokalisationsstudien an der Ratte (Fitzgerald *et al.*, 1991; Kawasaki *et al.*, 2001; Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2002), der Katze (Nacimiento *et al.*, 1993), dem Känguru (Hassiotis *et al.*, 2002) und dem Mensch (Kanazir *et al.*, 1996;) durchgeführt. Übereinstimmend wurde die intensive Expression des Proteins zu Beginn der Axogenese und während der axonalen Elongation beobachtet (Fitzgerald *et al.*, 1991; Kawasaki *et al.*, 2001). Mit Beginn der Synaptogenese und zunehmender Myelinisierung im ZNS kommt es zu einem nachhaltigen Absinken des GAP-43 Titers (Kapfhammer & Schwab, 1994a, b). Im Rattengehirn konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Differenzierung von Oligodendrocyten und der sinkenden GAP-43 Expression durch die gliale Expression der Wachstumsinhibitoren NI-35 (neurite-growth inhibiting protein-35) und NI-250 (Schwab *et al.*, 1993; Bandtlow & Schwab, 2000) nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass durch die Myelinisierung von Arealen des ZNS und der damit verbundenen Herabregulation von GAP-43 eine Stabilisierung des etablierten neuronalen Netzes eingeleitet wird. Grundlage für eine regelrechte Publikationsflut über neuronale Regeneration bildete der Nachweis, dass im ausdifferenzierten Nervensystem eine Reexpression des Proteins in axotomierten, regenerierenden Neuronen erfolgt (Tetzlaff *et al.*, 1991; Chong *et al.*, 1992; Linda *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1996; Kapfhammer, 1997; Chaisuksunt *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2002). Die regenerationsassoziierte Genexpression (RAG) (Fernandes *et al.*, 1999) von GAP-43 kann läSIONSINDUZIERT und unter Schaffung eines wachstumsfördernden Milieus, z.B. durch periphere Nerventransplantate (Bunge, 2001), Applikation von trophischen Faktoren (Plunet *et al.*, 2002) oder Myelininhibitor-Inhibition (Thallmair, 1999; Merkler *et al.*, 2001) embryonale Expressionswerte erreichen.

In weiten Bereichen des ausdifferenzierten Nervensystems erfolgt eine persistente Expression von GAP-43. Dazu zählen Regionen mit hoher synaptischer Plastizität, zu denen z.B. der Hippocampus und der Bulbus olfactorius gehören (Ramakers *et al.*, 1992).

Eine aktive Einbindung von GAP-43 bei der Langzeitpotenzierung wurde durch elektrophysiologische Untersuchungen an Hippocampus-Schnitten entdeckt (Fagnou & Tucek, 1995; Benowitz & Routtenberg, 1997). Im Mausmodell induziert die Expression einer permanent phosphorylierten GAP-43(Ser41Asp)-Mutante die Verstärkung von Langzeit-Potenzierung (Hulo *et al.*, 2002; Routtenberg *et al.*, 2000).

Darüber hinaus bleiben im ausdifferenzierten Nervensystem zahlreiche Areale GAP-43 immunreaktiv (Nacimiento *et al.*, 1993; Kapfhammer & Schwab, 1994b). Aus seiner präsynaptischen Konzentration resultiert eine immunhistologische Lokalisation in verschiedenen Neuropilbereichen des ZNS (Nacimiento *et al.*, 1993). Dazu zählen die olfaktorischen Glomeruli und das Neuropil der Granulazellen (De la Monte *et al.*, 1989; Ramakers, *et al.*, 1992) sowie das Neuropil im Rückenmark (Kawasaki *et al.*, 2001). Insbesondere die persistente GAP-43 Immunreaktivität der Lamina superficialis (Curtis *et al.*, 1993) wurde bei der Katze (Nacimiento, *et al.*, 1993) sowie dem Menschen (Brook *et al.*, 1998) bestätigt. Ebenso kann an zahlreichen Stellen des peripheren Nervensystems eine kontinuierliche GAP-43 Expression auf hohem Niveau nachgewiesen werden (Stewart *et al.*, 1992). Dazu zählen autonome Nervenfasern des enteralen Nervensystems (Sharkey *et al.*, 1990), perivaskuläre Nervenendigungen sowie Nervenendigungen am Herzen (McGuire *et al.*, 1988) und Pankreas (Houwing *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1992). In motorischen Fasern wird die Expression nach erfolgreicher Innervation und Synapsenbildung zwar herunterreguliert (Verhaagen *et al.*, 1988; Reynolds *et al.*, 1991; Caroni & Becker, 1992), aber nicht vollständig eingestellt (Li & Dahlström, 1993). In intramuskulären Nervenfasern und neuromuskulären Synapsen wurden beim adulten Menschen licht- und elektronenmikroskopisch persistente hGAP-43-Level detektiert (Hesselmans *et al.*, 1989). Die funktionelle Bedeutung der persistenten GAP-43 Expression wird mit synaptischer Plastizität dieser Nervenfasern interpretiert (Sharkey *et al.*, 1990; Kawasaki *et al.*, 2001).

Neurotransmitter

GAP-43 wurde in zahlreichen Transmittersystemen nachgewiesen. Eine Kollokalisierung des Proteins mit den Neurotransmittern GABA und Dopamin wurde im Gehirn beobachtet (Alonso *et al.*, 1995). Im Rückenmark adulter Ratten exprimieren serotonerge Fasern im Bereich von Motoneuronen und des dorsalen Horns GAP-43 (Ching *et al.*, 1994). Zudem

wurde ein funktioneller Zusammenhang zwischen GAP-43 und der Freisetzung von Noradrenalin, β -Endorphin und Cholecystokinin beobachtet (Dekker *et al.*, 1989b; Hens *et al.*, 1993; Kumagai-Tohda *et al.*, 1993). Dabei ist die Sekretion der Neurotransmitter an die Membranassoziation von GAP-43 sowie die Phosphorylierung des GAP-Moduls gebunden (Hens *et al.*, 1995; Gamby *et al.*, 1996). Die Freisetzung dieser Transmitter konnte durch die Applikation von GAP-43 Antiserum verhindert werden (Dekker *et al.*, 1989a; Hens *et al.*, 1995).

1.1.3 Physiologische Funktion

GAP-43 gilt als intrinsische Determinante der neuronalen Entwicklung und Plastizität (Benowitz & Routtenberg, 1997). Seine vitale Relevanz wird durch postnatale Letalität von Mäusen mit homozygotem GAP-43-Knockout unterstrichen (Zhu & Julien, 1999; Strittmatter *et al.*, 1995). Aufgrund des hohen GAP-43 Niveaus während Entwicklungs-, Regenerations- und Lernprozessen wird das Protein als Marker für axonales Wachstum und synaptische Plastizität verwendet. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen GAP-43 und Axonsprossung konnte auf molekularer Ebene bisher nicht aufgezeigt werden. Dennoch wurde dem Protein, trotz ungeklärter physiologischer Funktion, das Attribut eines „Axonmachers“ verliehen. Gestützt wird diese Hypothese durch Experimente, in denen die Überexpression des Proteins in nicht-neuronalen Zellen das Wachstum von Zellfortsätzen induziert (Zuber *et al.*, 1989; Widmer & Caroni, 1993; Strittmatter *et al.*, 1994; Gamby *et al.*, 1996; Widerkehr *et al.*, 1997; Aarts *et al.*, 1998). Diese langen, unverzweigten, senkrecht von der Zelloberfläche wachsenden Filopodien werden als neuritähnliche Fortsätze interpretiert (Abb.1.3). In GAP-43 transgenen Mäusen induziert die Überexpression des Proteins zusätzliche Aussprossungen axonaler Endigungen (Aigner *et al.*, 1995; Harding *et al.*, 1999). Ihre Bildung unterstreicht die morphogenetische Kompetenz des growth-associated protein-43.

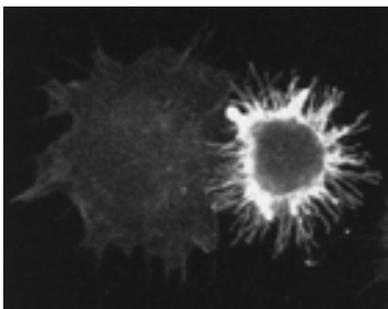


Abb.1.3: In Ratten-GAP-43-transfizierten Fibroblasten (rechte Zelle) ist das Protein membranlokalisiert und führt zur Bildung von Filopodien (Aarts *et al.*, 1998).

Einer primären Funktion in der Axogenese widersprechen allerdings Befunde an GAP-43-defiziten Neuronen, die zum axonalen Wachstum befähigt sind (Baetge & Hammang, 1991; Jap Tjoen San *et al.*, 1992; Shea, 1994; Shea & Benowitz, 1995, Meiri *et al.*, 1998). Aufgrund der Komplexität des Vertebraten-Nervensystems ist auch gegenwärtig umstritten, ob *in vivo* die Neurogenese jeder Nervenzelle obligat mit der Bildung von GAP-43 verbunden und dessen Expression ein charakteristisches Merkmal aller Neurone ist (Brook *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1999). Basierend auf der intensiven Immunreaktivität und *in situ*-Hybridisierungssignale embryonaler Nervensysteme gegenüber GAP-43 wird postuliert, dass alle Nervenzellen in bestimmten Entwicklungsstadien das Protein exprimieren (De la Monte *et al.*, 1989). Bisher wurden jedenfalls keine Nervenzellen identifiziert, deren normale Neurogenese (Axogenese, Weg- und Zielfindung, Synaptogenese) ohne die native Expression des Proteins verläuft (Strittmatter *et al.*, 1995).

1.2 GAP-43 Homologe bei Invertebraten

Die Genomanalysen von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* bildeten die Grundlage, um zahlreiche homologe Genprodukte bei Vertebraten, insbesondere dem Menschen, zu identifizieren. Im Gegensatz zur Historie dieser Moleküle wurde ein mögliches Invertebraten-Pendant zu GAP-43 erst 10 Jahre nach dessen Isolation detektiert. Dieses Invertebrate-GAP-43-Like (IGLOO) Protein (*Drosophila*) wird aufgrund der konservierten Calmodulinbindedomänen, die als GAP-Module bezeichnet werden, als GAP-43-Homologon charakterisiert (Neel & Young, 1994). Im Hybridisierungsexperiment wurden von *igloo* zwei Transkripte nachgewiesen, die als *igloo-L* und *igloo-S* bezeichnet werden. Die mRNA von *igloo-L* codiert für 240 Aminosäuren, das entsprechende Protein enthält drei GAP-Module. Das kürzere Transkript *igloo-S* codiert für 122 Aminosäuren. Es zeigt vollständige Sequenzhomologie zum Carboxyterminus von IGLOO-L und enthält zwei GAP-Module (Abb.1.4). Die GAP-Module der IGLOO-Proteine werden als V-, T- und S-Modul (IGLOO-L) bzw. T- und S-Modul (IGLOO-S) bezeichnet. Ihre Nomenklatur richtet sich nach der Aminosäure, die dem PKC-Substrat Ser41 im hGAP-43 Protein entspricht. Eine Phosphorylierung beider Proteine erfolgt durch die Proteinkinase C am T- und S-Modul, jedoch nicht am IGLOO-L spezifischen V-Modul (Neel & Young, 1994). Die Bindung von Calmodulin an die (unphosphorylierten) GAP-Module wurde

nachgewiesen (Neel & Young, 1994). Außerhalb der konservierten Module zeigen GAP-43 und IGLOO keine Sequenzhomologie. Die Isoform IGLOO-L enthält jedoch an ihrem Aminoterminus eine Sequenz, die eine Myristoylierung des Proteins am Gly2 ermöglicht. Diese Lipidmodifikation ist analog zur Palmitoylierung von GAP-43 und wurde im *in vitro* Reticulocyten-Translationsassay bestätigt (Neel & Young, 1994). Es ist jedoch nicht bekannt, ob durch die Myristoylierung von IGLOO-L das intrazelluläre Targeting des Proteins, z.B. eine Membranassoziation, beeinflusst wird.

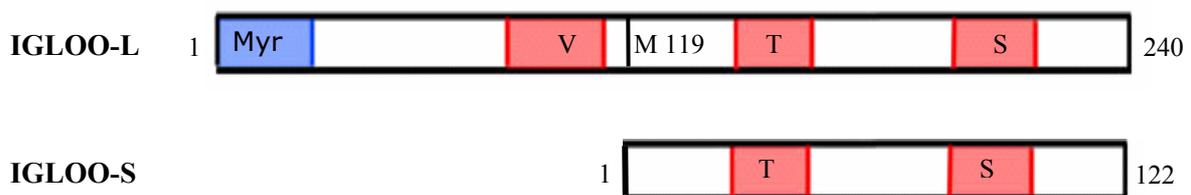


Abb.1.4: Schematische Darstellung der IGLOO-Proteine von *Drosophila melanogaster*. IGLOO-L besitzt eine aminoterminal Myristoylierungssequenz (Myr) sowie drei GAP-Module (V, T, S). Die Variante IGLOO-S enthält zwei GAP-Module (T, S) und entspricht IGLOO-L[119-240] (nach Neel & Young, 1994).

Die Expression beider *Drosophila* IGLOO-Isoformen erfolgt nervensystemspezifisch und ist ab 50% der Embryonalentwicklung nachweisbar. Im Northern Blot-Experiment wird eine maximale Expression der Transkripte im letzten Drittel der Embryogenese detektiert. Das temporäre Expressionsmuster beider *igloo*-Transkripte unterscheidet sich jedoch in der weiteren Entwicklung. *Igloo-S* mRNA ist bis in adulte Stadien nachweisbar. Dagegen zeigt *igloo-L* eine entwicklungspezifisch regulierte Expression, die sich auf die späte Phase der Embryogenese und abnehmend auf das erste und zweite Larvalstadium beschränkt. In adulten *Drosophila* wurden keine *igloo-L* Transkripte detektiert (Neel & Young, 1994). Aufgrund der strukturellen und biochemischen Homologie zum GAP-43 der Vertebraten gilt insbesondere die Isoform IGLOO-L als Kandidat für ein entsprechendes Invertebraten-Pendant. Zur Abklärung dieser Vermutung bedarf es Untersuchungen, die eine funktionelle Homologie zwischen IGLOO und GAP-43 belegen.

1.3 Ziel der Arbeit

Das Protein GAP-43 tritt bei Wirbeltieren hoch konserviert auf. Es gilt als intrinsische Determinante der neuronalen Entwicklung, obwohl auch gegenwärtig nicht bekannt ist, ob die Neurogenese aller Nervenzellen an die Expression des Proteins gebunden ist. Für entsprechende Expressionsstudien bieten sich Einzelzelluntersuchungen im Nervensystem von Insekten an. Identifiziert werden diese Neurone durch ihre spezifische Neurotransmitterexpression, zu denen z.B. die Neuropeptide Sulfakinin (Nachman *et al.*, 1986) und crustacean-cardioaktive peptide (CCAP; Stangier *et al.*, 1989) gehören. Aufgrund der günstigen experimentellen Handhabbarkeit ist die Amerikanische Schabe als Objekt für morphologische Untersuchungen zur neuronalen Genese und Regeneration prädestiniert (Boulton, 1969; Fourtner & Kaars, 1990). Ziel meiner vorgelegten Arbeit war es, die Expression des GAP-43 homologen Proteins bei Insekten, IGL-L, während der Genese eines identifizierten Neuronenpaares im Zentralnervensystem der Amerikanischen Schabe, *Periplaneta americana*, zu untersuchen. Ihr Nervensystem ist zwar morphologisch intensiv untersucht, auf molekularem Gebiet liegen gegenwärtig nur wenige Informationen vor. Basierend auf den Kenntnissen über GAP-43-Homologe bei *Drosophila* (Neel & Young, 1994) wurde bei der Schabe das Gen *Periplaneta igl* kloniert und sequenziert. Die identifizierten Transkriptionsprodukte, *igl-L* und *igl-S*, wurden auf ihre subzelluläre Lokalisation sowie die Kompetenz zur Filopodienbildung in überexprimierten nicht-neuronalen Zellen (CHO-Zellen) untersucht.

Für die immunocytochemische Detektion der Variante *Periplaneta* IGL-L wurde ein polyklonaler Antikörper generiert, mit dem die Expression des Proteins studiert werden sollte. Untersucht wurde, ob ein Paar protocerebraler deszendierender Interneurone (PDS-Neurone; Agricola & Bräunig, 1995) mit Immunreaktivität gegenüber Perisulfakinin (Veenstra, 1989) IGL-L exprimiert. Die Somata dieser PDS-Neurone sind in der Pars intercerebralis lokalisiert, ihr axonaler Ausläufer zieht kontralateral durch das Bauchmark bis ins Terminalganglion. In den Ganglien zeigen diese Interneurone ein stereotypes Arborisationsmuster und bilden zahlreiche Varikositäten. Aufgrund ihrer Morphologie wurde an diesen Nervenzellen die Genese und das Regenerationspotenzial zentralnervöser Interneurone bei Insekten untersucht (Hänold, 2000; Hänold & Agricola, 2000; Hänold & Agricola, 2001). Die Neuritogenese der PDS-Zellen beginnt bei 40% der embryonalen Entwicklungszeit. Durch das Streckungswachstum des Nervensystems nimmt die Länge

der Axone jedoch bis zum Erreichen des Imaginalstadiums beträchtlich zu (Länge_{embryonales ZNS} = 3mm, Länge_{adultes ZNS} = 2,5cm). Eine Axotomie der PDS-Neurone führt innerhalb weniger Tage zu Aussprossungen am proximalen Axonstumpf, die abortives, regeneratives Wachstum kennzeichnen. Die PDS-Zellen sind als Modellneurone prädestiniert, um die Expression von IGL-L während embryonalem und läSIONSINDUZIERTEM Neuritenwachstum auf Einzelzellebene zu studieren.

Weiterhin wurde während der embryonalen und postembryonalen Entwicklung von *Periplaneta americana* die Bildung von IGL-L im zentralen und peripheren Nervensystem sowie in nicht-neuronalem Gewebe untersucht. Anhand der Raum-zeitlichen Expression sollte analysiert werden, durch welche Eigenschaften IGL-L-exprimierende Nervenzellen charakterisiert sind. In diesem Zusammenhang wurde die Expression von IGL-L in proctolinergen Neuronen des Terminalganglions (Eckert *et al.*, 1981), viszerale Muskulatur (Hertel & Penzlin, 1992; Wegener & Nassel, 2000) und Skelettmuskulatur innervierenden Fasern (Witten & O'Shea, 1985) sowie FMRFamid-like peptidergen Nervenfasern am dorsalen Herzgefäß (Ude & Agricola, 1995) untersucht.

Die vorliegende Arbeit ist darauf ausgerichtet, durch Überexpression und immunocytochemische Detektion funktionelle Aspekte des Insektenproteins IGL-L zu untersuchen. Dabei soll die strukturelle Homologie zum Vertebratenprotein GAP-43 auf funktionelle Gemeinsamkeiten, bzw. Unterschiede, erweitert werden. Unter Berücksichtigung der Unterschiede zwischen dem Nervensystem von Vertebraten und Invertebraten soll die Bewertung der IGL-Proteine dazu beitragen, neue Ansätze für die kontrovers diskutierte Bedeutung des growth-associated protein-43 zu finden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an der Amerikanischen Schaben, *Periplaneta americana* (Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Tracheata; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Orthopteroidea; Dictyoptera; Blattaria; Blattoidea; Blattidae; Periplaneta) sowie der Taufliege, *Drosophila melanogaster*, Stamm *yellow-white* (Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Tracheata; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Brachycera; Muscomorpha; Ephydroidea; Drosophilidae; Drosophila) durchgeführt. Für Spezifitätstests des generierten IGL-L Antiserums wurden zusätzlich die Schabenarten *Periplaneta australasiae* und *Blatta orientalis* (Fam. Blattidae), *Blattella germanica* (Fam. Blattellidae) sowie *Leucophaea maderae* (Fam. Blaberidae) verwendet. Alle Tiere stammen aus der Laborzucht des *Institutes für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie/Zellbiologie* der *Friedrich-Schiller-Universität Jena*. Die Haltung der Tiere erfolgte unter konstanten Bedingungen. Für *Periplaneta americana* wurde eine Dauer der Embryonalentwicklung von 36 Tagen ermittelt. Postnatal durchläuft die Amerikanische Schabe bis zur Imaginalhäutung acht Larvalstadien. Für die Untersuchung der IGL-L Immunreaktivität bei Embryonen wurden definierte Entwicklungsstadien ab dem 14. Tag nach der Befruchtung fortlaufend bis zum Schlupf verwendet. Regenerationsexperimente wurden an Larven des achten Stadiums und an adulten Tieren durchgeführt.

2.1.1 Präparation

Zur Präparation von embryonalen Nervensystemen wurden die Kokons mit einem Skalpell geöffnet und die Embryonen vom Chorion befreit. Tiere aller Altersstadien wurden von dorsal in Tris-HCl-Puffer (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,4) präpariert. Es wurde das gesamte Zentralnervensystem, bestehend aus Ober- und Unterschlundganglion, Thorakal- und Abdominalganglien (whole mount-Präparat), entnommen. Schnittpräparate wurden von entsprechenden Bereichen des ZNS bzw. Embryonen angefertigt. Weiterhin wurden viszerale Muskulatur (Antennenherz, Hyperneuralmuskel, dorsales Herzgefäß), Skelettmuskulatur (Dorsoventralmuskulatur des Thorax, longitudinale intersegmentale Sternalmuskulatur des Abdomen, Beinmuskulatur), Speicheldrüsen, Darm, Malpigische Gefäße, Fettgewebe und Hoden präpariert.

2.1.2 Axotomie

Bei den kälteanästhesierten Tieren wurde das Abdomen medioventral fenestriert. Die Hemisektion abdominaler Konnektive erfolgte mit einer desinfizierten Pinzettenschere zwischen dem 4. und 5. oder dem 5. und 6. Abdominalganglion. Anschließend wurde die Wunde mit Chitin verschlossen und mit Dentalwachs versiegelt. Postoperativ wurden die Tiere zeitnah (1-14 Tage) sowie zeitfern (4 und 6 Monate) präpariert.

2.2 Klonierung von *igl*

2.2.1 Gewebeproben

Für die Amplifikation von *igloo-L* und *igloo-S* aus *Drosophila melanogaster* wurden Larven, Puppen und adulte Tiere verwendet. Zur Amplifikation von Transkripten der Amerikanischen Schabe wurden gesamte Embryonen unterschiedlichen Alters sowie Zentralnervensysteme von Imaginalstadien verwendet. Unmittelbar nach der Präparation wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -70°C gelagert.

2.2.2 mRNA-Isolation

Die Proben wurden unter Stickstoff-Kühlung mit einem sterilisierten Glashomogenisator aufgeschlossen und die mRNA nach dem *OligotexTM Protokoll* (QIAGEN) isoliert. Die erhaltenen Eluate wurden zum einen direkt für RT-PCRs verwendet. Zusätzlich wurden von der Amerikanischen Schabe zwei cDNA-Genbanken mit dem *ZAP Express[®] cDNA Synthesis Kit and ZAP Express[®] cDNA Gigapack[®] III Gold Cloning Kit* (Stratagene, USA) angefertigt. Als Gewebeproben wurden verschiedene Embryonalstadien (200mg; 4,48µg mRNA) sowie Nervensysteme von Imaginalstadien (90mg; 2,02µg mRNA) verwendet. Die Bestimmung des Phagentiters ergab 50.Tsd Phagen/µl für die embryonale und 22.Tsd Phagen/µl für die adulte Genbank.

2.2.3 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Alle Sequenzen sind vom 5'- zum 3'-Ende angegeben.

FW: Primer für Sense-Strang, BW: Primer für Antisense-Strang

IUB-Codes für Redundanzen (Wobble-Basen):

M=A+C, R=A+g, W=A+T, S=g+C, Y=C+T, K=g+T, V=A+g+C, H=A+C+T, D=A+g+T, B=g+T+C, N=A+g+C+T

Drosophila igloo Primer

Primer	Sequenz	Beschreibung
467	AAT TTG GAT CCA GAT GGG CTG CAA CAC CAG CC	<i>igloo-L</i> FW
468	AAT TTC TCG AGT TAC TCG GGA TTG GCA TCC TTG C	<i>igloo-L</i> BW
647	GAA GCT TCG ATG AAA AAA TCG GAA ACC AAA ACT GC	<i>igloo-S</i> FW
649	CTG GAT CCT CGG GAT TGG CAT CCT TGC GGG TC	<i>igloo-S</i> BW

Periplaneta RNA Polymerase Primer

395	CGA CGT CTG ATA AAG GCT ATG GAG TC	FW1
396	GCG TTC TCA TTG GCC TGC	BW1
397	GTG CGT AAC TCT GTG GGC CAG	FW2
398	TAT GAA AGA TCT TCT GCA CAT TCC	BW2

Periplaneta igl Primer

727	AAD GCY GCA ACV AAA ATT CAG	degeneriert, GAP-Modul
728	GTG DCC HCG GAA VVH GGC CTG	degeneriert, GAP-Modul
750	CGT TCG CGG CAG ACT ATG AAG	
766	GCG TTG CAC AAT TCT TGA TCG TT	
793	GCG TTG CAC AAT TCT TGA TCG TT	766-biotinyliert
794	CTT CAT AGT CTG CCG CGA ACG	
830	GGC ACG AGG CGA CGT CGT GTG T	
831	GAC GAC CCA GAA ACC GAG AAA GCT GC	
832	GTG ACC TCG GAA GAC GGC CTG GAT C	
843	GCT ACT AAG ATC CAG GCC GTC TTC	
852	CGT TCG CGG CAG ACT ATG AAG	biotinyliert
998	TCA TTG GCC CGC TGC TGC TTC	
1026	ATG GGM TGY AAC ACN WSB CAR GAR YTN AAR ACN AA	degeneriert, 5'-Ende
1037	GAA AGA ACA AGT TGG CAA CAA TGC	
1038	GCA GTC CCT GAG ATT GAC ATC G	
1039	CGA TGT CAA TCT CAG GGA CTG C	
1040	GCA TTG TTG CCA ACT TGT TCT TTC	

Proteinexpression:

1019	AAG CTT TCA TTG GCC CGC TGC TGC TTC	HindIII, BW
1105	GGA TCC ATG GGT TGC AAC ACA AGT AAA GAA GCT G	BamHI, FW
1123	AAG CTT AGT CTG CCG CGA ACG ATG GCC	HindIII, BW

Transfektion:

1132	CTC GAG ATG GGT TGC AAC ACA AGT AAA GAA G	XhoI, <i>igl-L</i> FW
1133	CTC GAG ATG AAG AGT GGA GAC GCT AAG GAG	XhoI, <i>igl-S</i> FW
1134	GGA TCC CGT TGG CCC GCT GCT GCT TCC TC	BamHI, <i>igl</i> BW

sonstige Primer :

767	GCT CGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	T3
768	CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GG	T7
1207	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTV	oligo d(T)- Ankerprimer
1208	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	PCR Anker-primer

IR-markierte Sequenzierprimer:

T7-IR	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	für pGEM-T
SP6-IR	CGA TTT AGG TGA CAC TAT AG	für pGEM-T
496-IR	GAC ACG CTG AAC TTG TGG CC	für pEGFP-N1
U-pQE-IR	GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG	für pQE-30

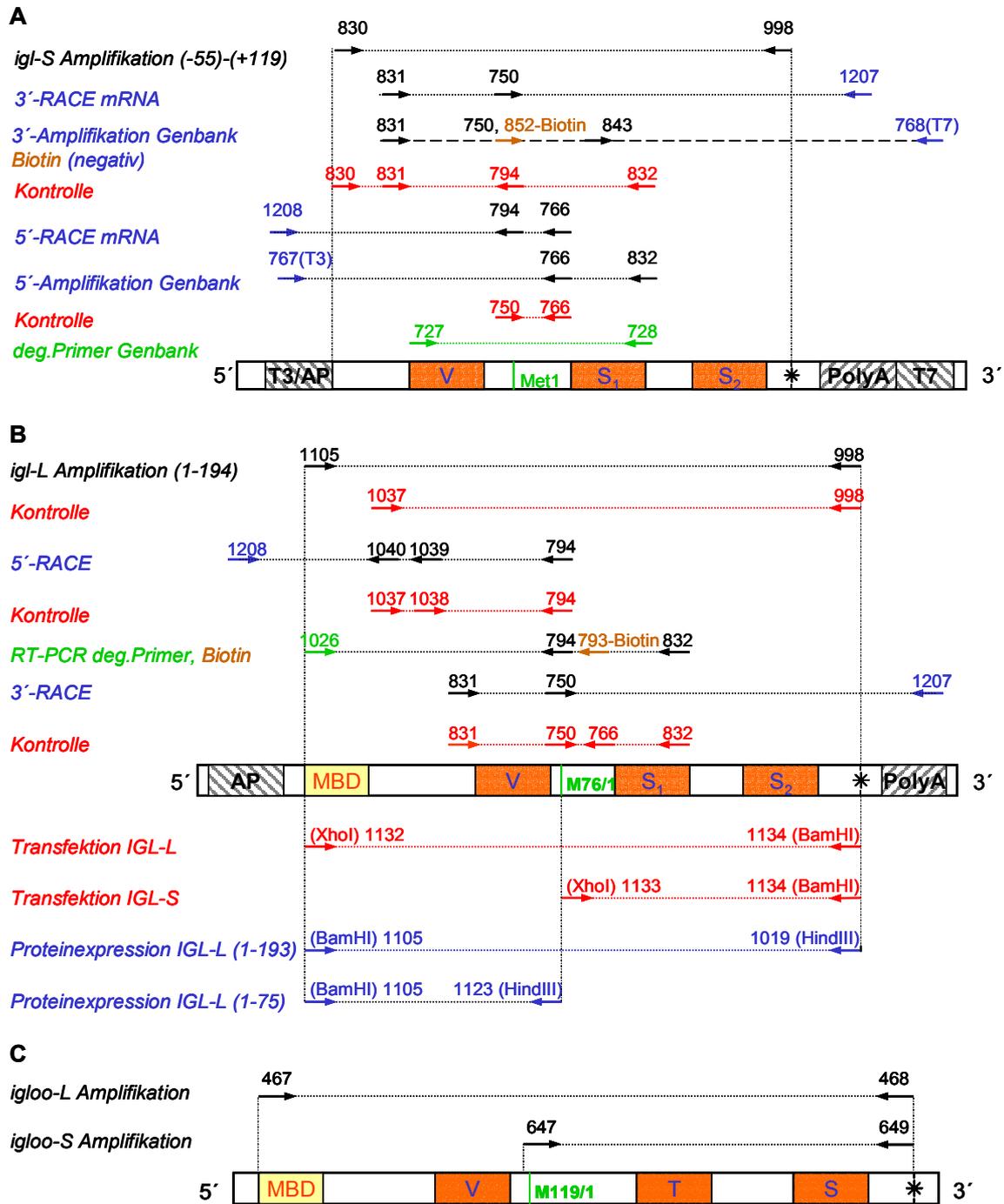


Abb.2.1: Schematische Darstellung der Primerpositionen zur Amplifikation von *Periplaneta igl-S* (A), *igl-L* (B) sowie *Drosophila igloo-S* und *igloo-L* (C). In B (untere Hälfte) sind die Primerpositionen für die Amplifikation der Konstrukte für **Transfektionsexperimente** und **Proteinexpression** dargestellt. Flankierende Sequenzen: T3, T7-Sequenz: Phagen-PCR (Genbank); PolyA, AP (Ankerprimer): RACE-PCR (mRNA)

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCRs wurden im T3-Thermocycler (Biometra[®], Göttingen) durchgeführt. Alle verwendeten Oligonukleotide sind in Tab.2.1 aufgelistet und die Primerpositionen in der Abb.2.1 dargestellt. Die Synthese erfolgte durch die JenaBioScience GmbH, Jena. Die Oligonukleotide wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-H₂O auf eine Konzentration von 50 pmol/µl verdünnt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

degenerierte Oligonukleotide

Die Modellierung der Oligonukleotide für (RT-)PCR-Amplifikationen aus Gewebematerial von *P. americana* orientierte sich an der Sequenz von *Drosophila igloo*. Um die Bindung der Oligonukleotide an das DNA-Template zu optimieren, wurden degenerierte Primer verwendet. Deren spezifische Sequenzvariabilität berücksichtigt die Redundanz des genetischen Codes bei konservierten Aminosäuren (GAP-Module, Membranbindedomäne).

biotinylierte Oligonukleotide

Bei der Verwendung von phagenspezifischen (T3-Primer, Genbank) und degenerierten (Primer 1026, *igl-L* Aminoterminus) Primern wurden die spezifischen, biotinylierten Primer 852 und 793 eingesetzt. Die Biotinylierung ermöglichte das Waschen der PCR-Produkte an Streptavidin mit Dynabeads M-280 (Dyna[®], Boehringer Mannheim GmbH). Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll *Biomagnetic Techniques in Molecular Biology*, Dyna[®].

Standard-PCRs

Für PCRs mit Phagen (Library) oder DNA-Templates wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) oder *Taq DNA Polymerase* (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Die Polymerasen wurden unter den angegebenen Pufferbedingungen eingesetzt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 50pmol, degenerierte Primer von 500pmol verwendet. Die Konzentration der Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) betrug 0,2mM. In nested PCRs wurden bei der zweiten Amplifikation 3µl des PCR-Produktes der ersten Reaktion verwendet.

Reaktionsprotokoll:

Schritt	Temperatur °C	Zeit	
1	95	2/4*min	* DNA-Template: Phagen
2	94	40sek	
3	Tm**	30sek	**Tm=69,3°C+0,41x (%GC-Gehalt) – 650 /
4	72	30sek	Primerlänge
→ 2	30 Zyklen		
5	72	8min	

Reverse Transkription (RT)-PCR; *Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)*-PCR

Aus der isolierten mRNA wurde in RT-PCRs unter Verwendung des *TitanTM One Tube RT-PCR Kit* (Boehringer Mannheim) cDNA synthetisiert. Die reverse Transkription erfolgte 30min bei einer Temperatur von 50°C. Die PCR wurde in 35 Zyklen durchgeführt. Die Amplifikation der cDNA-Enden wurde mit dem *5'/3'-RACE Kit* (Roche, Deutschland) durchgeführt.

2.2.4.1 *RNA Polymerase II largest subunit (Periplaneta americana)*

Als Qualitätskontrolle der mRNA wurde ein Fragment der *RNA Polymerase II largest subunit* (Regier & Shultz, 1997) mit den nested-Primerpaaren (395/396; 397/398) amplifiziert.

2.2.4.2 *igloo-L und igloo-S (Drosophila melanogaster)*

Die Sequenzen von *Drosophila igloo* lagen durch die Arbeit von Neel und Young (1994) vor. *Igloo-L* (Primerpaar 467/468) und *igloo-S* (Primerpaar 647/649) wurden in RT-PCRs aus Gewebeproben von Larven, Puppen und adulten Tieren amplifiziert.

2.2.4.3 *igl-L und igl-S (Periplaneta americana)*

Zum Nachweis von *igl* Transkripten und für die Ermittlung der codierenden Sequenz wurden verschiedene PCR-Techniken angewendet:

(A) Aus der Genbank wurde mit degenerierten Oligonukleotiden (Primerpaar 727/728) in einer PCR der Bereich zwischen zwei GAP-Modulen amplifiziert. Unter Verwendung der

phagenspezifischen T3 (767) und T7 (768)-Primer wurde versucht, die 5'- und 3'-Enden von *igl* zu amplifizieren.

(B) Mit *igl*-spezifischen Oligonukleotiden wurden in RACE-PCRs die 5'- und 3'-Enden amplifiziert. Für die Amplifikation des 5'-Endes von *igl-L* wurde das degenerierte Oligonukleotid 1026 (aminoternale Membranbindedomäne) verwendet.

(C) Amplifikation der codierenden Sequenzen von *igl-L* und *igl-S*

Zur Kontrolle eines durchgängigen Leserahmens wurde der codierende Bereich von *igl-L* (1-582) und *igl-S* (-165-357) in einer RT-PCR (Primerpaare 1105/998; 830/998) amplifiziert. Für die Amplifikation des *igl-S* Transkriptes wurde der downstream-Primer 830 verwendet, der am 5'-Ende an der nicht-codierenden Position [-165] bindet. Als Template wurden sowohl embryonale als auch adulte mRNA-Proben eingesetzt. Die amplifizierten Transkripte wurden für die Subklonierung in EGFP-*NI* und pQE-30 Vektoren verwendet.

2.2.5 DNA-Standardmethoden

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit einem 1,5%igen TBE-Agarosegel (90mM Tris-Base, 90mM Borsäure, 2mM EDTA, 0,04% Ethidiumbromid, 1,5% Agarose) aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Zur weiteren Verarbeitung der DNA wurden entsprechende Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit *QIAEX*[®] II (QIAGEN, Hilden) eluiert. Verdauungen wurden mit den entsprechenden Enzymen und den zugehörigen Puffern (New England BioLabs, Frankfurt) durchgeführt. Die Dephosphorylierung von pEGFP-*NI* und pQE-30-Vektoren erfolgte mit thermosensitiver alkalischer Phosphatase (TsAP, GIBCO/BRL Life Technologies, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Ligationen wurden mit dem *T4-DNA-Ligase Kit* (Promega Corporation, Madison, USA) durchgeführt. Zur Klonierung von *igl* wurde der Klonierungsvektor pGEM-T[®], für die Transfektion von Zelllinien der Vektor pEGFP-*NI* und für die Überexpression von IGL-Protein der Vektor UpQE-30 verwendet. Für die Transformation von *E. coli* wurde der Stamm XL1 verwendet, der mit dem *Z-Competent E.coli Transformation Kit* nach dem Standard-Protokoll (ZYMO Research, Orange, CA, USA) kompetent gemacht wurde. Die Auswahl von pGEM-T[®]-transformierten Kolonien erfolgte durch eine blau-weiß-Selektion, wobei den Agarplatten zusätzlich IPTG (100mM) und X-Gal (50mg/ml) zugegeben wurde. Die Isolation der Plasmide aus den Vorkulturen erfolgte mit dem *QIAprep*[®] *Miniprep Kit*

(QIAGEN). Für Midi-Preps wurden 100ml Kulturen nach dem *QIAGEN Plasmid Purification Protokoll* (09/2000) bearbeitet und die DNA in 200µl TE-Puffer mit RNase (10mM Tris, 1mM EDTA, 20µg/ml RNase; pH 8,0) aufgenommen. Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte mit dem LI-COR 4000 (LI-COR, Inc., Lincoln, Nebraska, USA; MWG-BIOTECH GmbH, Ebersberg) sowie den Programmen DataCollection™ (LI-COR) und BaseImagIR™ (LI-COR). Für die Vorbereitung der Proben wurde das *Thermo Sequenase System* (Amersham pharmacia, Buckinghamshire, England) verwendet. Die Sequenzierungs-PCR (25 cycles je 20s/94°C, 20s/55°C, 40s/70°C) wurde mit 1pmol IR-markiertem Oligonukleotid (Tab. A1 im Anhang) durchgeführt.

2.2.6 Datenauswertung

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit der Software *Gene Works*® 2.5.1 (Intelligenetics, Inc., Oxford Molecular Group, Inc., Oxford, U.K.) und *MacVector*® 6.5.3 (Genetics Computer Group, Inc., Oxford Molecular Company, Madison, USA) analysiert. Datenbankrecherchen erfolgten mit dem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Programm (Altschul *et al.*, 1990).

2.3 Transiente Expression in CHO-Zellen

2.3.1 Plasmidkonstruktion EGFP-Vektor

In einer PCR wurden die codierenden Bereiche von IGL-L[1-193] und IGL-S[1-118] amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BamHI* und *XhoI*. Ihre Bindeposition ist in Abb.2.1 dargestellt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den EGFP (enhanced green fluorescence protein)-*NI*-Vektor ligiert. Dessen Multi-Cloning-Site ermöglicht die Fusion des EGF-Proteins mit dem Carboxyterminus des Inserts (Abb.2.2). Zur Kontrolle wurden die Plasmide sequenziert.

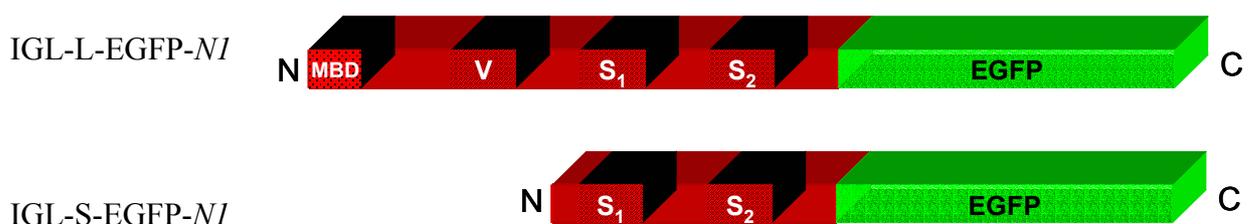


Abb.2.2: Schema der IGL-EGFP-*NI*-Fusionsproteine zur Transfektion von CHO-Zellen.

2.3.2 Transfektion

Die CHO (chinese hamster ovary) Zelllinie wurde in Ham's F12-Medium (GIBCO) mit 10% fetalem Kälberserum bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in Kulturschalen (Ø 3,5cm; mit eingesetztem Glasboden) ausplattiert. Die Transfektion wurde mit *PolyFect*[®] *Transfection Reagent* (QIAGEN) durchgeführt. Neben den Konstrukten IGL-L-EGFP-*NI* und IGL-S-EGFP-*NI* wurde der EGFP-*NI*-Vektor als Kontrolle eingesetzt. Für jeden Transfektionsansatz wurde 1µg Plasmid-DNA pro Zellkulturschale verwendet. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Zellen erfolgte nach 24 und 48 Stunden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss) mit der Software *LSM 510* (Zeiss).

2.4 Antikörperherstellung

Zur Bildung eines IGL-Antikörpers, der die membranassoziierte Isoform detektiert, wurde der aminoterminaler Proteinabschnitt IGL-L[1-75] rekombinant hergestellt und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

2.4.1 Plasmidkonstruktion pQE-30-Vektor

In einer PCR wurden die Bereiche für den aminoterminalen Abschnitt IGL-L[1-75] und für die vollständige Proteinsequenz IGL-L[1-193] amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III. Ihre Bindeposition ist in Abb.2.1 dargestellt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den QIAexpress pQE-30-Vektor (QIAGEN, QIAexpress[®] Expression System) umgesetzt. Für die Proteinexpression wurde der Stamm *E. coli* M15 mit den pQE-30-Konstrukten nach dem Protokoll des Herstellers transformiert.



Abb.2.3: Schema der rekombinant hergestellten His-tag-IGL-L-Konstrukte.

2.4.2 Proteinexpression

Für die Expression wurden je 200ml TY-Medium mit den entsprechenden Vorkulturen beimpft. Die Induktion der Proteinbildung erfolgte durch 1mM IPTG bei einer optischen Dichte von $OD=0,5$ ($\lambda=600\text{nm}$). Das Wachstum der Kulturen wurde bei $OD=2,2$ abgebrochen. Mit 1,5ml der induzierten Kultur wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt und die Konstrukte sequenziert. Zur Kontrolle der Expression wurden Proben der Kulturen vor sowie nach der Induktion abgenommen und auf ein Protein-Gel aufgetragen. Nach der Probenauftrennung (10min/10mA; 60min/25mA) wurde das Proteingel in Coomassie-Färbelösung (45% Methanol, 10% Essigsäure, 0,125% Brillant Blue R) gefärbt, entfärbt (5% Methanol, 10% Ethanol, 10% Essigsäure) und ausgewertet.

Die Isolation und Reinigung der Proteine erfolgte nach dem *QIAexpressionist* Protokoll (QIAGEN) über Ni-NTA Agarose. Die Proteine wurden in zwei mal drei Schritten eluiert (125mM bzw. 250mM Imidazol, 50mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl; pH 8,0) und alle erhaltenen Fraktionen auf einem Protein-Gel (5%iges Sammelgel, 15%iges Trenngel) analysiert. Die Eluationsstufen wurden mit einem *Ultrafree[®]-0.5 Centrifugal Filter Device* (Millipore) auf ein Volumen von 75 μl eingengt und in PBS pH 7,4 umgepuffert.

2.4.3 Immunisierung von Kaninchen

Für die Gewinnung eines IGL-L spezifischen Antiserums wurde ein Kaninchen (New Zealand White, Harland Winkelmann; 3740g) mit dem rekombinanten Protein IGL-L[1-75] immunisiert. Die Proteinprobe wurde mit PBS pH 7,4 auf 175 μl verdünnt und im Verhältnis 1:1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt. Nach der Entnahme von ca. 1,5ml Präimmenserum wurden 350 μl der Probe subcutan injiziert. Nach 10 Wochen erfolgten zwei Boosterungen mit 2mg und 3mg Protein, verdünnt im Verhältnis 1:1 mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans. Acht Tage nach der zweiten Boosterung wurde dem Kaninchen bei einem Gewicht von 3890g 90ml Blut entnommen.

2.4.4 Serumreinigung

Die Reinigung von Immunglobulin G erfolgte durch Caprylsäure-/Ammoniumsulfatfällung (McKinney & Parkinson, 1987). Das IgG-Pellet wurde in 500 μl dest. Wasser resuspendiert und 24h in 1l PBS pH 7,4 dialysiert.

2.4.5 Antikörpertest

2.4.5.1 Western blotting

Die Spezifität des Antikörpers wurde an rekombinantem IGL-L[1-75] und IGL-L[1-193] getestet. Dazu wurden die Proteine 1h bei $1\text{mA}/\text{cm}^2$ auf eine PVDF-Membran (Millipore Corp., Bedford, MA) transferiert (25mM Tris, 192mM Glycin, 0,05% SDS, 20% Methanol; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Der Nachweis von IGL-L Immunreaktivität auf der Membran erfolgte mit dem primären IGL-L Antiserum in verschiedenen Konzentrationen. Zur Detektion wurde die Membran in sekundären Antikörper (ECL™ + Western Blotting reagent pack, rabbit IgG, HRP linked whole antibody from donkey; Amersham Pharmacia Biotech, England, 1:10.000 in PBS, 0,1% Tween20, 2% BSA) überführt. Die Detektion erfolgte mit dem ECL™ Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech, Buckingham, U.K.).

2.4.5.2 Immunfärbung

I: Präimmuneserum; Präinkubation des Antiserums mit rekombinantem Protein

Um eine unspezifische Immunreaktivität von Kaninchen-Immuneserum auszuschließen, wurde eine Immunfärbung mit Präimmuneserum in einer Verdünnung von 1:200 an Schnitten eines Abdominalganglions durchgeführt. Zur Kontrolle der Antiserumspezifität wurde der gereinigte Antikörper mit rekombinant hergestelltem IGL-L Protein 1h bei 4°C auf einem Schüttler präinkubiert und anschließend an Schnitten eines Abdominalganglions getestet. Zur Präinkubation wurden das zur Immunisierung eingesetzte Peptid IGL-L[1-75] sowie das vollständige Protein IGL-L[1-193] verwendet.

II: Konzentrationsreihe

Zur Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration für Immunmarkierungen wurde das gereinigte Antiserum in den Verdünnungsstufen 1:5.000, 1:10.000, 1:50.000, 1:100.000 und 1:150.000 an Schnitten eines Abdominalganglions getestet.

III: IGL-L und IGL-S transient exprimierende CHO-Zellen

Um die Selektivität des IGL-L Antiserums gegenüber beiden IGL Varianten zu bestimmen, wurde der gereinigte Antikörper an IGL-L-EGFP-*NI* und IGL-S-EGFP-*NI* transfizierten CHO-Zellen getestet. Die transfizierten Zellen wurden nach 24h mit 4% Formaldehyd

fixiert und in primärem IGL-L Antikörper (1:30.000, in Milchpulverpuffer) inkubiert. Zur Detektion der Immunreaktivität wurde Cy3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Dianova, Hamburg) verwendet. Die Auswertung der Zellen erfolgte am konfokalen Laser Scanning Microscope (LSM 510, Zeiss) mit den Emissionswellenlängen $\lambda_1=507\text{nm}$ (EGF-Protein) und $\lambda_2=570\text{nm}$ (Indocarbocyanin Cy3).

IV: Spezifitätstest

Um die Spezifität des Antiserums gegenüber IGL-L von *P.americana* zu testen, wurde Nervengewebe der Taufliege, *Drosophila melanogaster* (Ordnung Ephydroidea), des Heimchens, *Acheta domesticus* (Ordnung Ensifera) sowie von Vertretern der Ordnung Blattodea (Schabenartige; *Periplaneta australasiae*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*, *Leucophaea maderae*) auf IGL-L-IR geprüft. Bei den Schaben erfolgte die Immunmarkierung an Schnitten des Gehirns sowie des Prothorakalganglions.

2.5 Immuncytochemie

2.5.1 Fixierung und Schneiden

Unmittelbar nach der Präparation wurde das Gewebe 24h bei Raumtemperatur in der Fixierlösung (85mM NaCl, 100mM Na₂HPO₄, 22mM NaH₂PO₄, 4% Formaldehyd; pH 7,4) konserviert. Für die Anfertigung von 50-60µm dicken Serienschnitten wurden ganze Embryonen und Larven bzw. präparierte Gehirne, Ganglien und Konnektive nach dem Fixieren in 5%igen Agar eingebettet und mit einem Vibratom (Agricola, Kästing, Raabe) geschnitten.

2.5.2 Immunmarkierung

2.5.2.1 IGL-L Immunmarkierung

Nach der Fixierung erfolgte ein gründliches Spülen in Tris-HCl-Puffer (50mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 145mM NaCl; pH 7,4). Anschließend wurden die whole mount-Präparate in einer Alkohol-Reihe (30, 50, 70, 90, 100% Ethanol, 1,2-Propylenoxid) auf- und abgeführt und drei Stunden in Milchpulverpuffer (Tris-HCl-Puffer, 0,03% Magermilchpulver, 0,0025% Rinderserumalbumin, 0,25% Triton; zentrifugieren (10min, 4°C, 16.000U), Überstand filtrieren) vorinkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären IGL-L Antikörper (Verdünnung 1:30.000) in Milchpulverpuffer (2%

Ziegennormalserum). Nach erneutem Spülen in Tris-HCl-Puffer wurden die Präparate in Milchpulverpuffer (2% Ziegennormalserum) mit dem sekundären, Cy3-gekoppelten Ziegenanti-Kaninchen Antikörper (Dianova, Hamburg; Verdünnung 1:600) inkubiert. Abschließend erfolgte ein erneutes Spülen in Tris-HCl-Puffer. Die Fluoreszenzmarkierung von Schnitten erfolgte nach der gleichen Prozedur. Sie wurden jedoch nicht vorinkubiert. Alle Spül- und Inkubationsschritte wurden 24h (whole mount-Präparate) bzw. 3h (Schnittpräparate) bei 4°C auf einem Schüttler durchgeführt.

2.5.2.2 Doppelfärbungen

Zum immuncytochemischen Nachweis von Kollokationen zwischen IGL-L und verschiedenen Neurotransmittern wurden Maus-Antiseren gegen die Neuropeptide Perisulfakinin und Proctolin sowie ein Kaninchen-Antiserum gegen γ -Aminobuttersäure (GABA) (alle aus dem Bestand von Dr. H.-J. Agricola, Inst. f. Allg. Zoologie und Tierphysiologie/Zellbiologie, Universität Jena) verwendet. Die Visualisierung der Immunmarkierungen erfolgte durch Cyanin (Cy2)-konjugierte sekundäre Antikörper (Dianova, Hamburg).

2.5.3 Einbettung der Präparate

Die whole mount-Präparate wurden durch eine Glycerolreihe (40, 60, 100% Glycerol in Tris-HCl pH 7,4) geführt und zwischen zwei Deckgläschen in Moviol-Einbettungsmedium (100mM PBS pH 7,4, 50% Glycerin, 25% Moviol (Fluka, Deisenhofen/ Deutschland), 0,15% Dabco 3348 (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland)) eingebettet. Vibratomschnitte wurden auf einen mit Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte 10min in Wasser rehydriert und anschließend 5min mit 60% Glycerol überschichtet. Danach erfolgte die Einbettung in Moviol.

2.5.4 Auswertung

Die Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) ausgewertet. Die Bearbeitung der aufgenommenen Bilder (Videokamera Sony 3CCD) erfolgte an einem Power Macintosh G3 mit der Software *Open Lab* (improvision[®]) und dem Bildbearbeitungsprogramm *Adobe Photoshop*, Version 5.0 (Adobe).

2.6. Ultrastrukturanalyse

2.6.1 Fixierung und Immunmarkierung

Die ultrastrukturelle Lokalisation von IGL-L wurde elektronenmikroskopisch am Prothorakalganglion des sechsten Larvalstadiums von *P. americana* untersucht. Das präparierte Nervengewebe wurde in Fixierlösung (85mM NaCl, 100mM Na₂HPO₄, 22mM NaH₂PO₄, 4% Formaldehyd; pH 7,4) 12h bei 4°C stabilisiert und Dickschnitte von 120µm (Schnittrichtung: frontal) angefertigt. Nach dem Spülen der Schnitte in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 wurden die Präparate viermal in Stickstoff schockgefroren, erneut in Tris-HCl-Puffer gespült und 48h mit dem primären IGL-L Antiserum in einer Konzentration von 1:10.000 in Milchpulverpuffer (2% Ziegennormalserum) inkubiert. Nach mehrfachem Spülen der Schnitte in Tris-HCl-Puffer erfolgte die 12-stündige Inkubation mit einem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Antikörper-Verdünnung 1:40) in Milchpulverpuffer (2% Ziegennormalserum). Erneut wurden die Präparate in Tris-HCl-Puffer gespült und mit einem Peroxidase-Antiperoxidase-Antikörper (Antikörper-Verdünnung 1:200) in Milchpulverpuffer 12h inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte je 60min in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 und Tris-HCl-Puffer pH 7,6 gespült, 20min in DAB-Lösung (2,5mM Ammonium-Nickelsulfat) vorinkubiert und die Peroxidase-Reaktion nach Zugabe von Wasserstoffperoxid eingeleitet. Die Reaktion wurde nach 20min durch Spülen in Tris-HCl-Puffer beendet und die Schnitte in PBS-Puffer überführt.

2.6.2 Einbettung, Schneiden und Auswertung

Nachfolgend wurden die Präparate in 1% Osmiumsäure (in PBS) für 1h gespült und in einer Alkoholreihe (30, 50, 70, 90, 2x100% Ethanol, Propylenoxid, jeweils 20min) dehydriert. Zur Einbettung wurden die Präparate durch Durcupan M1-Propylenoxid-Stufen geführt, die Polymerisation erfolgte in Durcupan M2 in 48h bei 60°C.

Mit einem Ultramikrotom (Reichert Ultracut E) wurden von den präparierten Ganglien im Bereich des Neuropils 70nm Dünnschnitte angefertigt und auf Formvar-Carbon-befilmte Kupferblenden gebracht. Nach der Kontrastierung mit Uranylacetat wurden die Schnitte am Elektronenmikroskop (Zeiss EM 900) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung von *invertebrate GAP-43 like (igl)*

Zur Kontrolle der mRNA-Isolation wurde ein 527bp langes PCR-Fragment der RNA Polymerase II, große Untereinheit von *Periplaneta americana* (Regier & Shultz, 1997) amplifiziert. Das Fragment wurde in embryonalem Gewebe als auch im Zentralnervensystem adulter Tiere nachgewiesen und durch Sequenzierung als Polymerase II bestätigt.

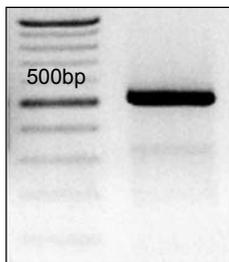


Abb.3.1: Amplifikation eines 527bp-Fragmentes der *RNA Polymerase II* (mRNA-Template: ZNS Imaginalstadium).

3.1.1 Klonierung von *igloo-L* und *igloo-S* aus *Drosophila melanogaster*

Für den Nachweis beider *igloo*-Varianten in RT-PCRs wurde jeweils der gesamte codierende Bereich amplifiziert. In Larven, Puppen und Imaginalstadien von *Drosophila melanogaster* konnten PCR-Fragmente der richtigen Größe nachgewiesen werden (Abb.3.2). Die amplifizierten Fragmente wurden sequenziert und in einer BLAST-Suche als *Drosophila igloo-L* und *igloo-S* (Neel & Young, 1994) identifiziert.

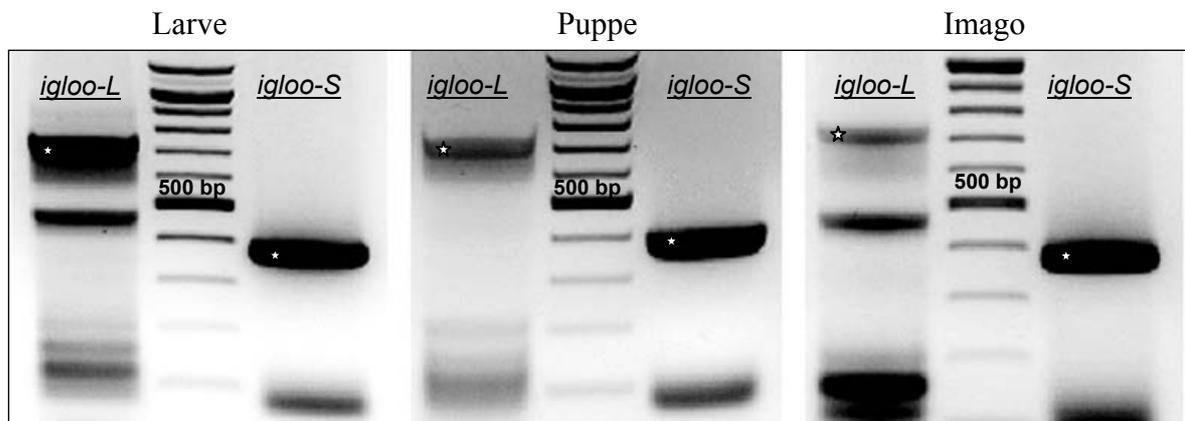


Abb.3.2: In RT-PCR Reaktionen wurden die Transkripte *igloo-L* (747bp) und *igloo-S* (382bp) aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* amplifiziert (☆).

3.1.2 Klonierung von *igl-L* und *igl-S* aus *Periplaneta americana*

A: Amplifikation von *igl-S* Fragmenten aus einer Genbank

Aus der adulten Library wurde mit einem degenerierten Oligonukleotidpaar ein 168bp-Fragment amplifiziert. Das resultierende Protein enthält an beiden Enden eine GAP-Modulesequenz. Ein Proteinvergleich mit *Drosophila* IGLOO-L zeigte neben diesem Motiv auch im restlichen Sequenzabschnitt homologe Bereiche. In einer BLAST-Suche (BLASTx, Database: nr) wurde bestätigt, dass das amplifizierte Fragment die höchste Homologie (Score=65bits) zu *Drosophila igloo* aufweist. Aufgrund dieser Merkmale wurde das Fragment als *Periplaneta*-Pendant zu *Drosophila igloo* gewertet und ausgeschlossen, dass es für ein anderes Genprodukt mit mehreren GAP-Modulen (z.B. *Drm* CG14687) codiert. Es stellt einen ersten Nachweis von *invertebrate GAP-43 like (igl)* Transkripten bei hemimetabolen Insekten dar. Ausgehend von der Sequenzinformation dieses Fragments wurde mit dem phagenspezifischen T3-Primer der 5'-Terminus von *igl* amplifiziert. Das resultierende 245bp Fragment wurde als 5'-Ende des *igl-S* Transkriptes identifiziert. Beide Fragmente konnten in der adulten, jedoch nicht in der embryonalen Genbank amplifiziert werden (Abb.3.3).

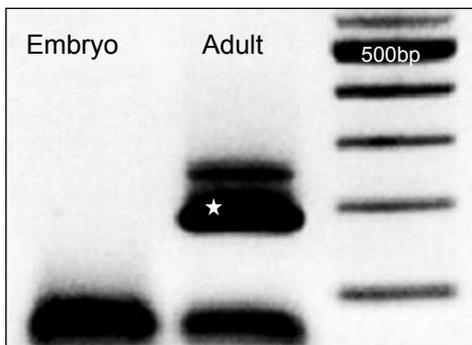


Abb.3.3: Nachweis von *igl*-Transkripten durch die Amplifikation eines 186bp Fragmentes (☆) mit dem Primerpaar 831/832 in der adulten, jedoch nicht in der embryonalen Genbank.

Bei der Amplifikation des 3'-Endes von *igl* wurden durch die Bindung des T7-Primers an eine phageneigene Sequenz zahlreiche Fragmente gebildet. Zur Selektion der Amplifikationsprodukte wurde die PCR mit einem biotinylierten downstream-Primer durchgeführt. Trotz Verwendung von Streptavidin-gereinigten (Dynabeads) PCR-Produkten in nested PCRs konnte das 3'-Ende von *igl* nicht nachgewiesen werden.

B: Amplifikation von *igl* aus mRNA

Mit nested PCRs konnten *igl*-Transkripte von 153bp (Primerpaar 831/766) sowie 129bp (Primerpaar 750/832) Länge in mRNA-Proben nachgewiesen werden. Die weitere Sequenzermittlung erfolgte durch RACE-PCRs (5′-, 3′-Ende) und RT-PCRs mit degenerierten Oligonukleotiden (5′-Ende *igl-L*):

I. In einer 3′-RACE-PCR wurde das 3′-Ende von *igl* amplifiziert (Abb.3.4). Das 563bp nested PCR-Produkt (Primerpaar 750/1207) translatiert einen codierenden Bereich von 369bp, dem sich nach einem Stop-Codon ein 174bp nicht-translatierter Abschnitt und eine 17bp Poly-A Sequenz anschließen.

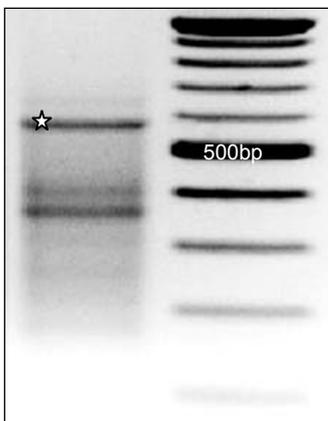


Abb.3.4: In einer 3′-RACE-PCR wurde ein 563bp Fragment (☆) amplifiziert, welches das 3′-Ende von *igl* codiert.

II. In einer 5′-RACE-PCR mit den Primern 766 und 794 wurde ein 215bp Fragment amplifiziert. Diese Sequenz enthält das 172bp lange nicht-codierende 5′-Ende von *igl-S*. Es entspricht dem T3/794-Produkt aus der adulten Genbank. Ein *igl-L* spezifischer Abschnitt von 89bp wurde mit dem degenerierten Oligonukleotid 1026 (aminoterminaler Membranbindedomäne) in einer triple-nested (RT-) PCR (1026/832; 1026/793-Biotin; 1026/794) isoliert. Diese Sequenz diente in einer 5′-RACE-PCR als Bindestelle für den upstream-Primer 1039 und 1040. Das resultierende 344bp PCR-Produkt enthält einen *igl-L* spezifischen codierenden Bereich von 148bp. Es charakterisiert in vollständiger Länge das 5′-Ende des *igl-L* Transkriptes.

igl-L 1 tttttttttttttgagtaaaaaggtgtttttgaaatgattaacgaggtgcgatcgatttctctctgtaacgataatc
 taacgagcgaaaaaaattaagaggattccaatgatgataactccgaaggaggtgaadatactggagacagcagac
 ga tataaaagaacgtcgagaacttagttttattgagtgtaagtgatataaa

```

      MBD           20           40           60           80           100
ATGGGTTGCAACACAAGTAAAGAAGCTGTACAACCTGTTGACGAAAGCAATACCGCGGAGGAGCAACGAACGACCAGAAACAAGGAGAAGAGAAGAAAG
TACCCAACGTTGTGTTCAATTTCTTCGACATGTTGGACAACCTGCTTTCGTTATGGCCGCCTCCTCGTTGCTTGCTGGTCTTTGTTCCCTTCTCTCTTTC
M G C N T S K E A V Q P V D E S N T G G G A T N D Q K Q G E E K K>

      120           140           160           180           200
AACAAAGTTGGCAACAATGCAACAAATGCAGTCCCTGAGATTGACATCGATCTAGACGACCCAGAAACCGAGAAGGCAGCCACAAAAATCCAGGCTGTATT
TTGTTCAACCGTTGTTACGTTGTTTACGTCAGGGACTCTAACTGTAGCTAGATCTGCTGGGTCTTTGGCTCTCCGTCGGTGTGTTTTAGGTCGGACATAA
E Q V G N N A T N A V P E I D I D L D D P E T E K A A T K I Q A V F>

      220           240           260           280           300
CCGGGGCCATCGTTTCGCGGCAGACTATGAAGAGTGGAGACGCTAAGGAGACAGTGAAGATCTGGAAGCAGAGTTCAACCCCAACGATCAAGAATTGTGC
GGCCCCGGTAGCAAGCGCGTCTGATACTTCTCACCTTGCATTCCTCTGTACAGTTCTAGACCTTCGTCTCAAGTTGGGGTTGCTAGTTCTTAAACAGC
R G H R S R Q T M K S G D A K E T V Q D L E A E F N P N D Q E L C>

      320           340           360           380           400
AACGCAGCTACTAAGATCCAGGCCTCTTTCCGGGGACACATGGCGAGGAAACAAGCACCAGCCGCCACAGGAGGCAAGGGAAAGCCCGAGGACGACCTCA
TTGCGTCGATGATTCTAGGTCGGAGAAAGGCCCTGTGTACCCTCCTTTGTTTCGTGGTTCGGCGGTGTCTCCGTTCCCTTTCCGGCTCCTGCTGGAGT
N A A T K I Q A S F R G H M A R K Q A P A A T G G K G K P E D D L>

      420           440           460           480           500
GCAAAGAGCTGCAGAAACTGGACGCCAAGGTTGACGATGAACTAGCTGACATTGACCTTACTGATCCCGATTTAAACAAGGCTGCAACAAAAATCCAAGC
CGTTTCTCGACGTTCTTACGCTGCGGTTCCAAGTCTACTTGTATCGACTGTAAGTGAATGACTAGGGCTAAATTTGTTCCGACGTTGTTTTAGGTTTCG
S K E L Q K L D A K V D D E L A D I D L T D P D L N K A A T K I Q A>

      520           540           560           580
ATCTTTCCGTTGGACACAAGGTGCGCAAGGAGACGACGACCAAAAGATGGCGAAGAGGGGGAGGAAGCAGCAGCGGGCCAATGA
TAGAAAGGCACCTGTGTTCCACGCGTTCTCTGCTGCTGTTTCTACCGCTTCTCCCTCCTTCGTCGTCGCGCGGTTACT
S F R G H K V R K E T T T K D G E E G E E A A A G Q *>

```

gcgacatccacgtcacgttcacaccacgacacgtcacgttgacgccccaacgcgatgactgaacctgctggagtcttgta
 tacagcggcattgttctacaatgctaattgcacaattttacataaccaattgttacagttattatTTTTTctctttatata
 tataaatttacgaaaaaaaaaaaaaaaaa 969/719

igl-S 1 gttggaggcaggactcgacgtcgtgtgctgcactgtgccgtatcttcggaggtgacgaccactcccactcctc
 atcggccactgatac (▼ ATCGATCTA.....)

Abb.3.5: Sequenzen der *igl* Transkripte von *Periplaneta americana*. *Igl-L* codiert ein 193 Aminosäuren langes Protein (IGL-L) mit einer Membranbindedomäne (MBD) sowie drei GAP-Modulen. Diese stellen putative CaM-Bindestellen (**IQ**) sowie Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen (Serin; S₁-, S₂-Modul) dar. In der 5' UTR des *igl-L* Transkriptes liegen die Promotorelemente TATA-Box (Hogness-Box) [-50], GC-Box [-58] und CAAT-Box [-104]. Die 5'-nicht-codierende Sequenz von *igl-S* ist am Ende aufgelistet. Die Sequenzen beider Transkripte überlappen sich ab der markierten Position (▼).

3.1.3 Amplifikation der codierenden Sequenzen von *igl-L* und *igl-S*

Die Zusammensetzung der RACE-PCR Fragmente ergibt für das *igl-L* Transkript eine Länge von 969bp und für das *igl-S* Transkript eine Länge von 719bp (Abb.3.5). Beide Transkripte enthalten einen offenen Leserahmen, der bei *igl-L* einen codierenden Bereich von 582bp, bei *igl-S* einen codierenden Bereich von 357bp umfasst. Die Leserahmen beider Transkripte wurden durch Amplifikation in RT-PCRs überprüft. Die Amplifikation der codierenden Sequenz von *igl-L* [1-582] führte zur Bildung eines 588bp (Primer 1105 mit Schnittstelle) Fragments (Abb.3.6). Für den spezifischen Nachweis des *igl-S* Transkriptes wurde der Bereich *igl-S* [-165-357] amplifiziert. Das generierte PCR-Produkt hat eine Länge von 522bp (Abb.3.6). Die Sequenzen beider PCR-Produkte entsprachen den theoretischen Konstrukten. Auf ihnen basierte die weitere Subklonierung von *igl* in EGFP-*N1* und pQE-30 Vektoren.

Die Expression der Transkripte *igl-L* (582bp) und *igl-S* (522bp) wurde in RT-PCR Amplifikationen mit mRNA aus Embryonen und adultem ZNS-Gewebe von *Periplaneta americana* nachgewiesen (Abb.3.6).

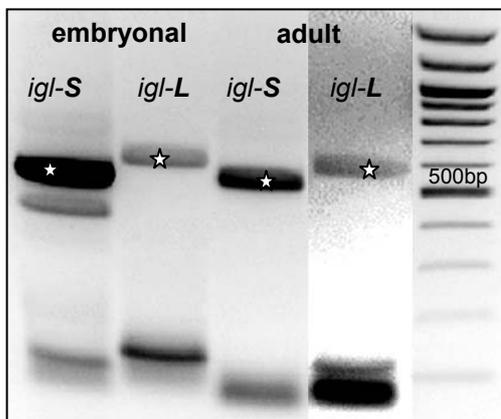


Abb.3.6: Amplifikation von *igl-S* (-165-357) und *igl-L* (1-582) in embryonalen und adulten Entwicklungsstadien.

Der Vergleich der Bandenintensität von *igl-L* und *igl-S* innerhalb der embryonalen oder adulten Entwicklungsstufe zeigt jeweils eine intensivere *igl-S* Bande. Die quantitativ stärkere Amplifikation von *igl-S* gegenüber *igl-L* deutet auf eine höhere Expressionsrate dieses Transkriptes hin. Ein direkter Vergleich der Expressionsraten zwischen den Entwicklungsstadien ist nicht möglich, da die mRNA-Templates beider Proben aus unterschiedlichen Gewebezusammensetzungen isoliert wurden (embryonale Probe: ganze Embryonen, adulte Probe: ZNS-Gewebe).

Isoformen

Von *igl* wurden bei *P. americana* zwei Transkripte nachgewiesen, die in Analogie zu den *Drosophila igloo*-Transkripten entsprechend ihrer Länge als *igl-L* („long“) und *igl-S* („short“) bezeichnet werden. Das *igl-L* Transkript codiert mit 193 Aminosäuren das Protein IGL-L (MG 20,8kDa). Die Translation des *igl-S* Transkripts führt zur Bildung des 118 Aminosäuren umfassenden Genproduktes IGL-S (MG 12,7kDa). Es zeigt im Bereich (-81)-719bp vollständige Sequenzidentität zu *igl-L* und stellt dementsprechend den carboxyterminalen Bereich IGL-L[76-193] dar. Eine Analyse der resultierenden Proteine zeigt, dass diese besonders alaninhaltig (IGL-L: 12,4%, IGL-S: 14,4%) und frei von Tyrosin und Tryptophan sind (Tab.3.1). Aus der Zusammensetzung der Aminosäuren ergibt sich, dass IGL-L als saures Protein mit einem isoelektrischen Punkt (IEP) von 4,6 charakterisiert ist.

unpolar:	#	%	polar:	#	%
A	24	12,37	G	16	8,25
V	8	4,12	S	7	3,61
L	9	4,64	T	15	7,73
I	6	3,09	C	2	1,03
P	7	3,61	<u>Y</u>	<u>0</u>	<u>0,00</u>
M	3	1,55	N	10	5,15
F	4	2,06	Q	13	6,70
<u>W</u>	<u>0</u>	<u>0,00</u>			
sauer:	#	%	basisch:	#	%
D	19	9,79	K	20	10,31
E	20	10,31	R	7	3,61
			H	3	1,55

Tab.3.1: Aminosäure-Zusammensetzung von IGL-L.

Domänen

1. GAP-Modul

In einer Conserved Domain (CD)-Suche (Marchler-Bauer *et al.*, 2002) wurden für IGL-L und IGL-S drei bzw. zwei konservierte Domänen identifiziert. Diese Abschnitte sind als Calmodulinbindungsdomänen (IQ: Short calmodulin-binding motif containing conserved Ile and Gln residues) charakterisiert (Deloulme *et al.*, 1997; Rhoads *et al.*, 1997). Aufgrund

ihrer modulartigen Wiederholung werden diese Domänen in Analogie zu *Drm* IGLOO als V-, S₁- und S₂-Modul nach der Aminosäure benannt, die bei hGAP-43 dem phosphorylierten Serin41 entspricht. Alle drei Module enthalten ein **IQ**-Motiv und stellen mögliche CaM-Bindestellen dar. Während die **S₁**- und **S₂**- Module potentielle Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen (IGL-L: Ser109, Ser168; IGL-S: Ser34, Ser93) besitzen, entspricht dieser Position im IGL-L spezifischen ersten Modul ein Valin (Val66).

GAP-43-Modul	1	K	A	H	K	A	A	T	K	I	Q	A	S	F	R	G	H	I	T	R	K	20
<i>Drm</i> IGLOO V-Modul	1	D	E	A	K	A	A	T	K	I	Q	A	V	F	R	G	H	K	V	R	E	20
<i>Drm</i> IGLOO T-Modul	1	D	L	C	H	A	A	L	K	I	Q	S	T	F	R	G	H	L	A	R	K	20
<i>Drm</i> IGLOO S-Modul	1	E	L	N	K	A	A	T	K	I	Q	A	S	F	R	G	H	K	T	R	K	20
<i>Pea</i> IGL V-Modul	1	E	T	E	K	A	A	T	K	I	Q	A	V	F	R	G	H	R	S	R	Q	20
<i>Pea</i> IGL S ₁ -Modul	1	E	L	C	N	A	A	T	K	I	Q	A	S	F	R	G	H	M	A	R	K	20
<i>Pea</i> IGL S ₂ -Modul	1	D	L	N	K	A	A	T	K	I	Q	A	S	F	R	G	H	K	V	R	K	20

Abb.3.7: Sequenzvergleich der Calmodulin-Bindedomäne von Vertebraten GAP-43 mit den GAP-Modulen von *Drosophila* IGLOO-L und *Periplaneta* IGL-L.

2. Aminoterminus

Außerhalb der konservierten CaM-Bindestellen besitzt das IGL-L Protein eine weitere homologe Domäne, die sechs Aminosäuren umfasst und N-terminal lokalisiert ist. Diese Sequenz ist als Myristoylierungssequenz (MGXXX(S/T)) beschrieben (Liang *et al.*, 2002; Maurer-Stroh *et al.*, 2002) und ermöglicht eine Membranassoziation des Proteins durch Acylierung (Myristoyle Säure) von Glycin (Gly2).

Homologievergleich

In einer Datenbankrecherche (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) wurden die Sequenzen von *Periplaneta igl-L* und *igl-S* analysiert. Unter Einbeziehung aller Datenbanken (Database: nr) zeigen die amplifizierte PCR-Produkte die höchste Homologie zu den Genprodukten von *Drosophila igloo* (Score=55.1 bits). Die Auswertung der Proteinvergleiche ergab, dass *Periplaneta* IGL und die *Drosophila* Analoga 64,7% (IGL-L) bzw. 64,4% (IGL-S) Homologie [51,8% (IGL-L) bzw. 51,7% (IGL-S) Identität] besitzen. Maßgeblichen Anteil an der konservierten Struktur der IGL-Proteine von *Drosophila* und *Periplaneta* haben die 17 Aminosäuren langen GAP-Module, die eine Sequenzhomologie (ähnliche Aminosäuren) von 94% aufweisen (Abb.3.8).

```

Drm 1 MGCNTSQE LKTKDGAAMD AVSNGEPEPSAPPLEGESKSSASNH TNHAKS 50
Pea 1 MGCNTSK E A - - - - - VQPVD - ES N - - TGGGA TNDQK Q 28

Drm 5 S S I I S N G E A K A A N G G G A V G G G S G K S E A T N G I D R P C D K A A I T E F N D D E D E A 100
Pea 2 - - - - - G E E K K E Q - - - - - V G - - - - - N N A T N A V P - - - - - E I D I D L D D P E T E 57

Drm 10 K A A T K I Q A V F R G H K V R E T M K K S E T K T A T N N G S A A G A A P S A A A A E A A A S A E 150
Pea 5 K A A T K I Q A V F R G H R S R Q T M K - - - - - S G - - - - - D A K 82

Drm 15 P T K A E L E A E F D P N D K D L C H A A L K I Q S T F R G H L A R K L V N - - - - K D A P E D - 194
Pea 8 E T V Q D L E A E F N P N D Q E L C N A A T K I Q A S F R G H M A R K Q A P A A T G G K G K P E D D 132

Drm 19 - - E D I Q E I T K K V A E E L - D I D L T D P E L N K A A T K I Q A S F R G H K T R K D A N P E 240
Pea 13 L S K E L Q K L D A K V D D E L A D I D L T D P D L N K A A T K I Q A S F R G H K V R K E T T T K D 182

Drm 24
Pea 18 G E E G E E A A A G Q 193

```

Abb.3.8: Vergleich der IGL-L Proteine von *Drosophila melanogaster* (*Drm*) und *Periplaneta americana* (*Pea*). Streng konserviert stellen sich die N-terminale Myristoylierungssequenz sowie die GAP-Module (umrahmt) dar.

Für den Bereich der GAP-Module wurde Sequenzhomologie zum growth-associated protein-43 (GAP-43) verschiedener Vertebraten (z.B. humanes GAP-43; Kosik *et al.*, 1988) und zu weiteren Proteinen mit entsprechenden IQ-Motiven (z.B. *Drm* CG14687; Adams *et al.*, 2000) ermittelt. Neben den konservierten Domänen (Membranbindestelle und GAP-Modul) weisen die IGL-Proteine keine weitere unmittelbare Sequenzhomologie zu GAP-43 auf. Substantielle Gemeinsamkeiten finden sich allerdings in der ähnlichen Aminosäurezusammensetzung. Dabei sind die Häufigkeit von Alanin (zum Vergleich: hGAP-43: 19,7%, *Drm* IGLOO-L: 17,4%, *Drm* IGLOO-S: 19,5%, *Pea* IGL-L: 12,4%, *Pea* IGL-S: 14,4%) sowie das Fehlen von Tyrosin und Tryptophan charakteristisch (Tab.3.1).

3. 2 Transiente Expression in CHO-Zellen

In Transfektionsexperimenten mit IGL-L-EGFPNI und IGL-S-EGFPNI Konstrukten wurden die intrazelluläre Lokalisation und das morphogenetische Potenzial beider IGL-Varianten untersucht. Um einen Einfluss von endogen exprimiertem GAP-43 auszuschließen, erfolgte die transiente Überexpression in nicht-neuronalen CHO (chinese hamster ovary)-Zellen. Als Klonierungsvektor für *igl-L* und *igl-S* wurde der EGFPNI Vektor gewählt. Bei den resultierenden Konstrukten bleiben die spezifischen Aminotermini beider Proteine unfusioniert. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde für IGL-L-EGFP mit 2,1µg/µl und IGL-S-EGFP mit 2,5µg/µl bestimmt. Die Expression des EGF-Proteins war 24h nach der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt war die Lokalisation der Fusionsproteine in verschiedenen Zellkompartimenten zu erkennen.

3.2.1 IGL-L transfizierte Zellen

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von IGL-L-EGFPNI transfizierten CHO-Zellen ergab für die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins und die Morphologie der Zellen deutliche Unterschiede zu IGL-S-EGFPNI und EGFP exprimierenden Zellen (Abb.3.9.A). IGL-L-EGFPNI transfizierte Zellen zeigten deutliche Veränderungen in der Zellmorphologie. Bei diesen Zellen wurde eine sphärische Zellform beobachtet, von deren Oberfläche zahlreiche filopodiale Fortsätze verliefen. Diese Filopodien wuchsen, ohne die Bildung von Arborisationen, senkrecht von der Zelloberfläche. Bereits die mikroskopische Betrachtung dieser Zellen zeigte, dass sich die Fluoreszenz nahezu auf den Bereich der Zellmembran beschränkte. Diese Beobachtung wurde durch Fluoreszenzmessungen über den Zellquerschnitt bestätigt und deutet auf eine Lokalisation von IGL-L-EGFPNI an (bzw. in) der Zellmembran hin. Das Fusionsprotein war nicht uniform am Plasmalemma verteilt. Es akkumulierte im Bereich des Zellkörpers an den Austrittstellen der Filopodien. Entlang der charakteristischen Fortsätze wurde eine besonders intensive Fluoreszenz beobachtet.

3.2.2 IGL-S transfizierte Zellen

Die mikroskopische Betrachtung von IGL-S-EGFPNI exprimierenden CHO-Zellen zeigte eine gleichmäßige Fluoreszenz innerhalb des Zellkörpers (Abb.3.9.B). In Fluoreszenzmessungen an einzelnen transfizierten CHO-Zellen konnte eine homogene Intensität über dem gesamten Zellquerschnitt ohne lokale Maximalwerte detektiert werden. Mit Ausnahme des Nukleus und intrazellulärer Vesikel liegt das Fusionsprotein diffus im Zytoplasma lokalisiert vor. IGL-S-EGFPNI exprimierende CHO-Zellen zeigen eine spindelförmige Gestalt mit kurzen Fortsätzen an den Zellpolen.

3.2.3 Kontrollzellen

Eine vergleichbare Fluoreszenzverteilung und Zellmorphologie konnte bei EGFP-transfizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden (Abb.3.9.C). Diese CHO-Zellen zeigen eine diffuse Fluoreszenz innerhalb eines spindelförmigen Zellkörpers. Ihre Morphologie unterscheidet sich nicht von nicht-transfizierten Kontrollzellen. Die zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins wurde durch Fluoreszenzmessungen verifiziert, wobei auch in diesen Zellen der Nukleus und intrazelluläre Vesikel kein Target für das EGF-Protein darstellen.

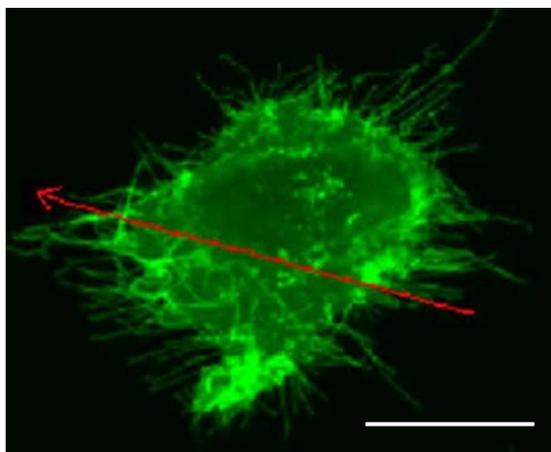
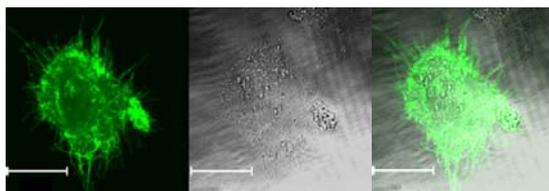
Abb.3.9: Transiente Expression von IGL-EGFP-Fusionsproteinen in chinese hamster ovary (CHO) Zellen 24h nach der Transfektion. Das IGL-L-EGFPNI-Konstrukt (A) zeigt eine Membranlokalisation in einer abgerundeten CHO-Zelle mit Filopodien. IGL-S-EGFPNI (B) und EGFPNI-Kontrollen (C) besitzen eine cytosolische Lokalisation in CHO-Zellen mit nativer bipolarer Zellmorphologie.

I: Übersicht mit Fluoreszenzbild (links), lichtmikroskopischem Bild (Mitte) sowie Doppelbild (rechts) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der transfizierten Zelle (untere Abbildungen)

II: Emissionsprofil der Zelle, der Messungsverlauf der Emissionsintensität erfolgte entlang dem Pfeil in I.

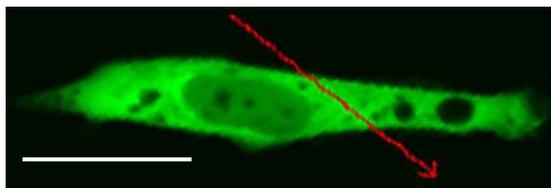
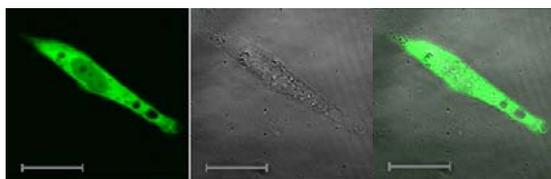
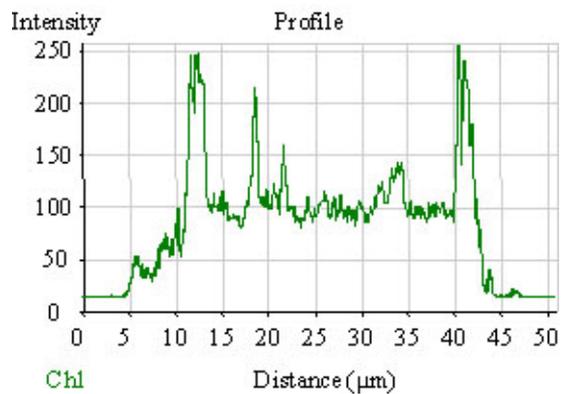
Maßstab: 20µm

I

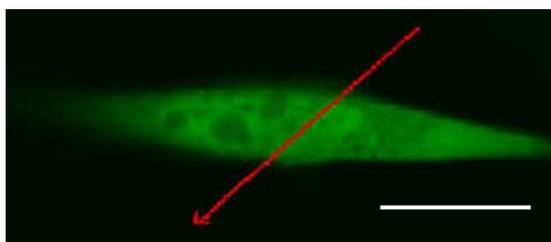
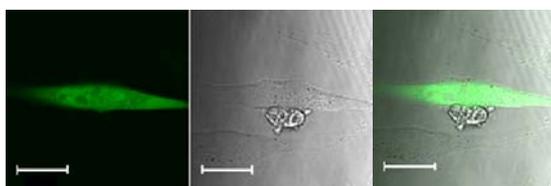


A

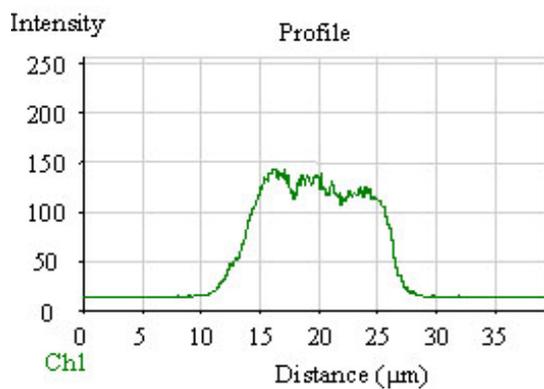
II



B



C



3.3 Antikörperherstellung

3.3.1 Proteinexpression

Zur Herstellung von rekombinantem Protein wurden die codierenden Sequenzen von *igl-L*[1-225] sowie *igl-L*[1-579] in den pQE-30-Vektor kloniert und im Stamm *E.coli* M15 überexprimiert. Die Proteinkonzentrationen für IGL-L[1-75] (aminoterminales Peptid) und IGL-L[1-193] (komplette Sequenz) betragen 13,8mg/ml bzw. 8,3mg/ml. Die fehlerfreie Sequenz der pQE-Konstrukte wurde nach der Zwischentransformation von XL1-Z Zellen sowie nach einer Plasmidisolation aus den induzierten Kulturen verifiziert (Abb.3.10).

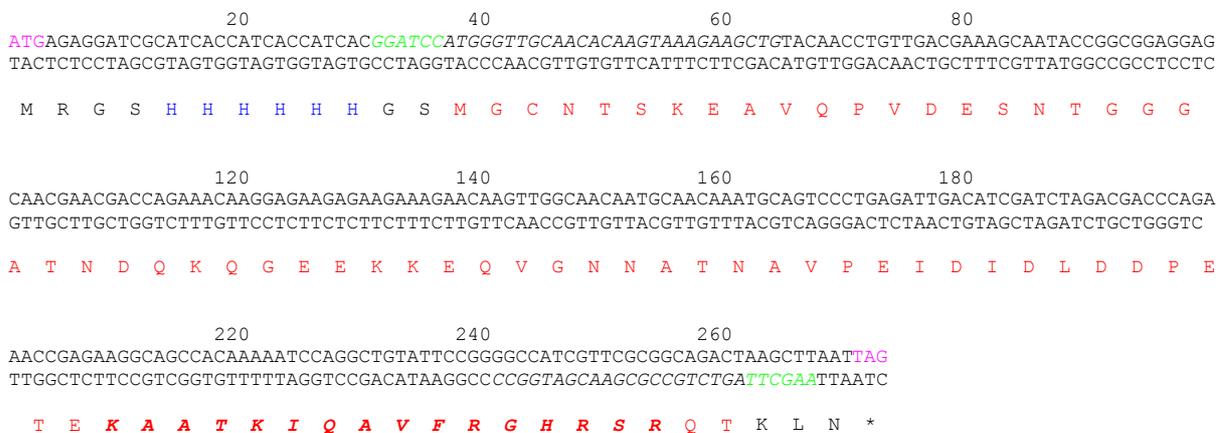


Abb.3.10: *Igl-L*[1-225] codiert den Bereich zwischen der aminoterminalen Myristoylierungsdomäne und dem *V-Modul*. Das rekombinante Peptid besteht aus 90 Aminosäuren und hat ein MG von 9.810 Da.

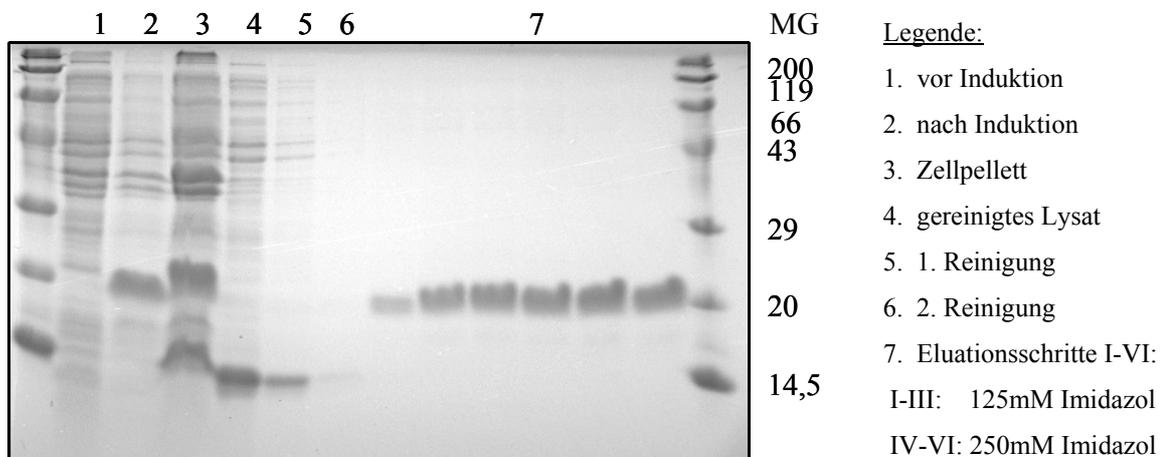


Abb.3.11: Proteingel von pQE-30-IGL-L[1-75] transformierten M15-Zellen.

Das Ergebnis der Proteinexpression von IGL-L[1-75] in M15 Zellen ist in Abb.3.11 dargestellt. Nach der Induktion mit IPTG ist eine intensive Proteinbande bei einem MG \approx 20kDa sichtbar. Dieses Protein wurde mit 125mM und 250mM Imidazol eluiert. Das Laufverhalten von IGL-L[1-75] deutet auf Dimerbildung des rekombinanten Proteinfragments (MG \approx 10kDa) durch Cys15 hin.

3.3.2 Spezifitätstests

3.3.2.1 Western Blotting

In konzentrationsabhängigen Western Blots wurde die Sensitivitätsgrenze des Antiserums für 6ng rekombinantes IGL-L[1-75]-Protein mit einer Serumkonzentration von 1:100.000 bestimmt (Abb.3.12). Die hohe Sensitivität des IGL-L-Antikörpers wurde zudem an rekombinantem IGL-L[1-193] Protein bestätigt. Dessen Detektion erfolgte ebenfalls bis zu einer primären Antikörperkonzentration von 1:100.000.

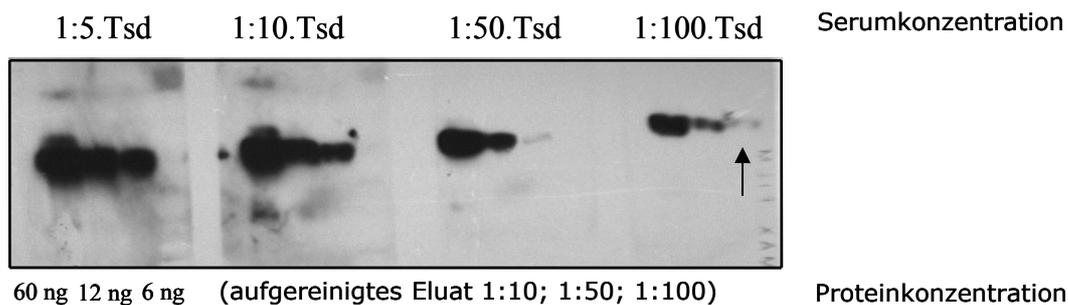
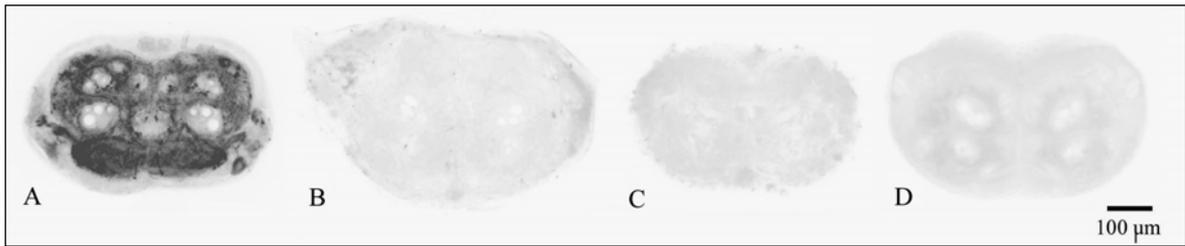


Abb.3.12: Die Detektion von rekombinantem IGL-L[1-75]-Protein im Bereich zwischen 60ng und 6ng wurde mit vier Serumkonzentrationen untersucht. Die Nachweisgrenze des IGL-L-Antikörpers für 6ng Protein liegt bei einer Verdünnung von 1:100.000 (Pfeil).

3.3.2.2 Immunfärbung

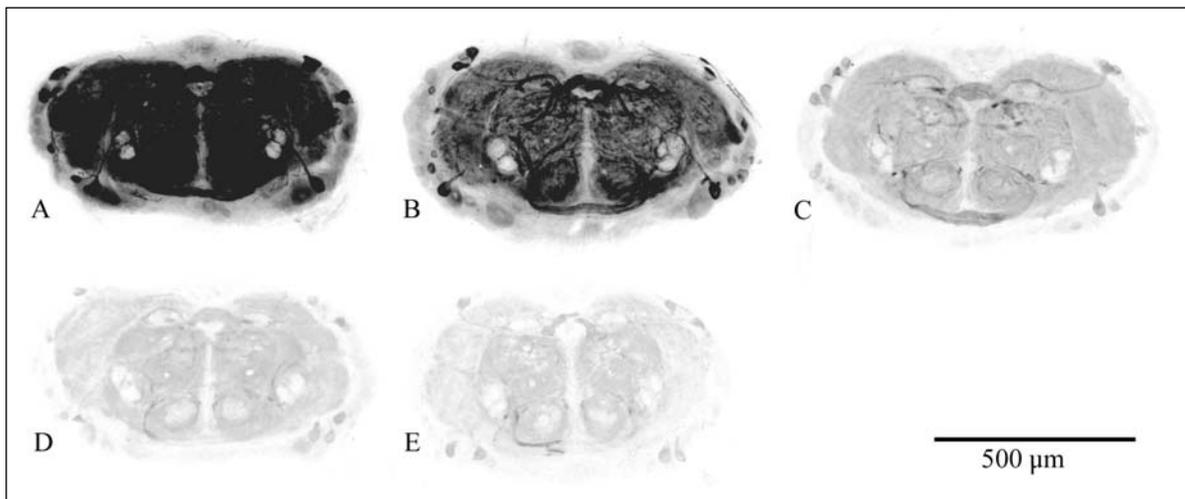
I: Verwendung von Präimmunserum und präinkubiertem Antiserum

Das IGL-L Antiserum markiert an Schnitten des Abdominalganglions den Bereich des Neuropils (A). Präimmunserum (B) bzw. die Präabsorption des Antiserums mit dem zur Immunisierung verwendeten rekombinanten Peptid IGL-L[1-75] (C) sowie dem vollständigen Protein IGL-L[1-193] (D) zeigt keine Immunmarkierung am Abdominalganglion. Eine unspezifische Immunmarkierung von Kaninchen-Immunsereum ist somit ausgeschlossen.



II: Sensitivitätstest

Die Sensitivität des Antiserums für immunocytochemische Untersuchungen wurde in Verdünnungsstufen von 1:5.000 (A), 1:10.000 (B), 1:50.000 (C), 1:100.000 (D) und 1:150.000 (E) an Schnitten von Abdominalganglien ermittelt. Für Immunmarkierungen wurde eine optimale Konzentration des gereinigten Antiserums von 1:30.000 bestimmt.



III: IGL-L und IGL-S transient exprimierende CHO-Zellen (Abb.3.13)

An IGL-L-EGFP-*NI* und IGL-S-EGFP-*NI* exprimierenden CHO-Zellen wurde die Selektivität des IGL-L Antiserums gegenüber beiden IGL Varianten bestimmt. Durch die spezifische Immunmarkierung von IGL-L, jedoch nicht von IGL-S transfizierten Zellen, konnte die Selektivität des Antikörpers gegenüber dem IGL-L-spezifischen Amino-terminus nachgewiesen werden. Der Bereich IGL-L[1-75] enthält das Calmodulin-bindende V-Modul, welches als konserviertes GAP-Modul bei IGL-S als S₁- und S₂-Modul vorkommt. Mit diesem Immunreaktivitätstest wird gleichzeitig gezeigt, dass der Antikörper nicht gegen Epitope im Bereich der GAP-Modul-Sequenz gerichtet ist.

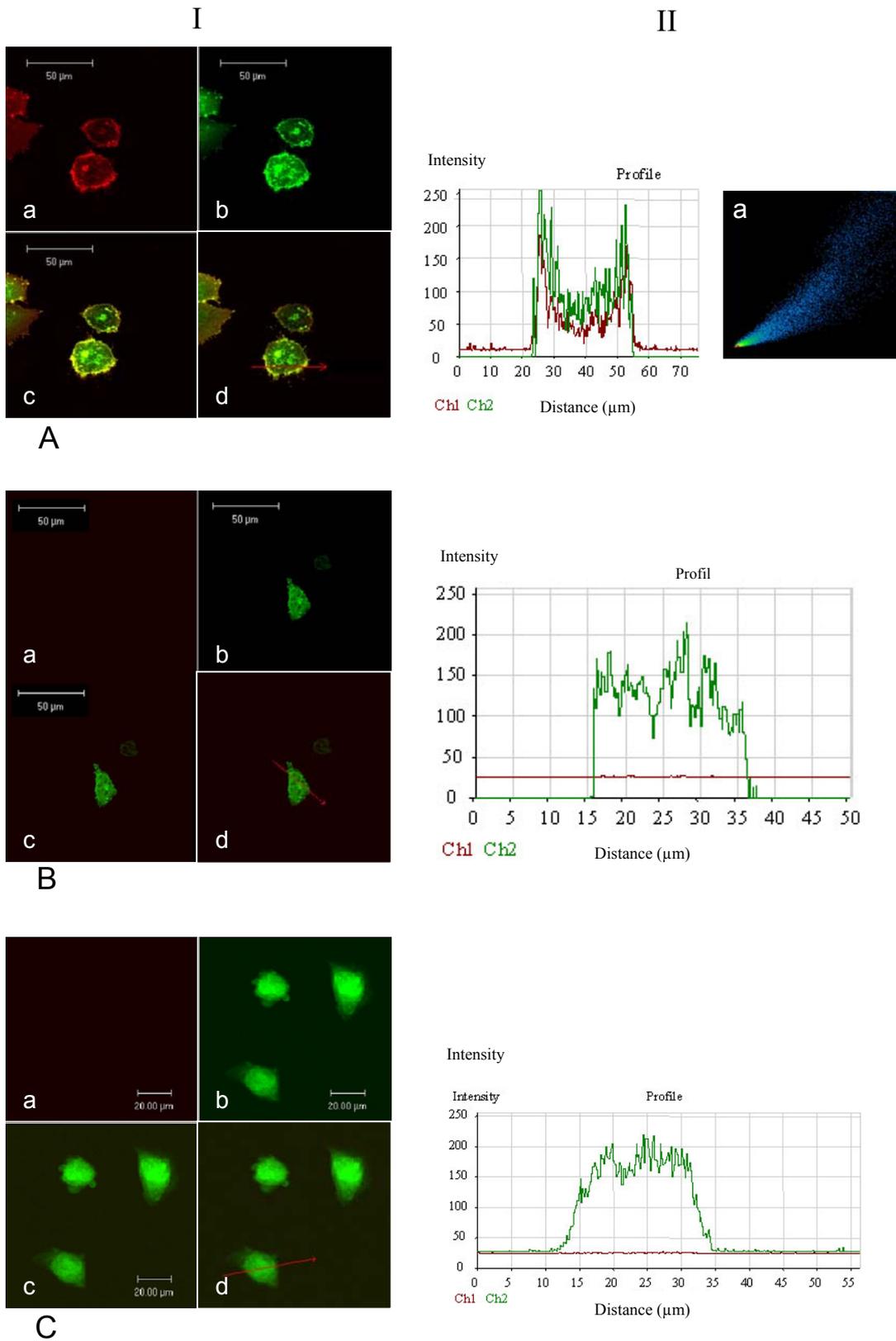


Abb.3.13: Spezifitätstest des pIGL-L Antiserums (1:30.000) an IGL-L-EGFP_{NI}(A), IGL-S-EGFP_{NI} (B) und EGFP_{NI} (C) transient exprimierenden CHO-Zellen.

I: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, a: Immunmarkierung IGL-L, b: EGF-Fusionsprotein, c: Doppelbelichtung, d: Verlauf der Fluoreszenzintensitäts-Messung durch eine transfizierte CHO-Zelle
 II: graphische Darstellung des Emissionsprofils der Zelle in Abb. I(A-C)d.

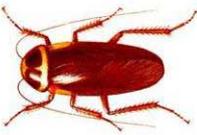
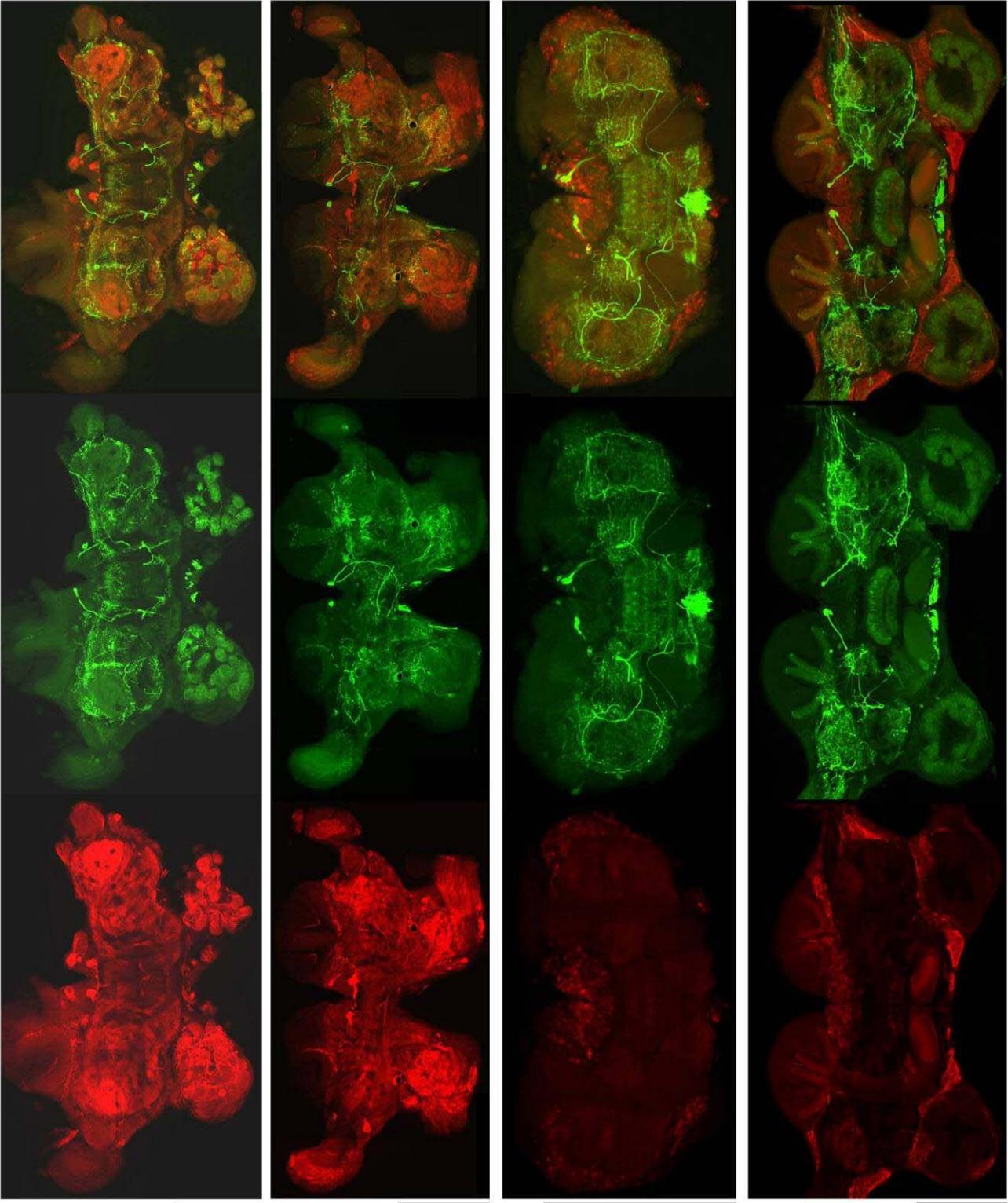
Ch1 = Immunmarkierung, Ch2 = EGF-Fusionsprotein; II(A)a: Scatter Plot

IV: Spezifitätstest bei Vertretern der Ordnung Blattodea (Abb.3.14)

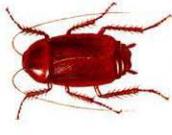
Die Spezifität des gereinigten Antiserums gegenüber *P.americana* IGL-L wurde durch eine spezifische Immunmarkierung innerhalb der Ordnung Blattodea nachgewiesen. Mit dem Antiserum wird in der Taufliege, *Drosophila melanogaster* (Ordnung Ephydroidea) und dem Heimchen, *Acheta domesticus* (Ordnung Ensifera) keine Immunreaktivität detektiert. Ebenso wurde innerhalb der Ordnung Blattodea (Schabenartige) bei Vertretern der Familien Blattellidae (Deutsche Schabe, *Blattella germanica*) und Blaberidae (Madera-Schabe, *Leucophaea maderae*) keine bzw. eine unspezifische IGL-L Immunreaktivität beobachtet. Eine *P.americana*-homologe IGL-L Immunmarkierung konnte bei den Mitgliedern der Familie Blattidae (Australischen Schabe, *Periplaneta australasiae*; Küchenschabe, *Blatta orientalis*) nachgewiesen werden. Kennzeichen dieser Immunreaktion waren die markante Färbung eines protocerebralen Trakts, von Neuropilarealen um die Pilzkörper (diese aber IGL-L immunnegativ), von Zellen der Pars intercerebralis sowie der Glomeruli. Zudem war die Detektion von IGL-L Immunreaktivität im Neuropil der Ganglien homolog zu *P.americana*.

Durch den Befund, dass das Antiserum nicht gegen *Periplaneta* IGL-S (Test III) sowie Antigene der Schabenfamilien Blattellidae und Blaberidae (Test IV) gerichtet ist, wird eine Kreuzreaktivität mit anderen GAP-Modul-enthaltenden Proteinen (z.B. Homologa zu *Drosophila* CG14687, *asp* Genprodukt oder *ninaC* Genprodukt) ausgeschlossen.

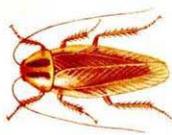
Abb.3.14: Detektion von IGL-L-Immunreaktivität (links) im Gehirn verschiedener Schabenspezies. Die Immunmarkierung erfolgte an Frontalschnitten im Bereich der Sulfakinin-immunreaktiven PDS-Interneurone (mitte). Mit dem gegen IGL-L (Amerikanische Schabe) generierten Antiserum wird eine *Periplaneta americana*-homologe Immunmarkierung (Abb.3.17) bei *Periplaneta australasiae* und *Blatta orientalis* nachgewiesen.



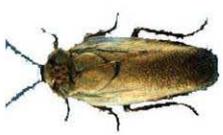
Periplaneta australasiae



Blatta orientalis



Blattella germanica



Leucophaea maderae

3.4 Immuncytochemie

Um die Translation der nachgewiesenen *igl-L* messenger RNA zu verifizieren, wurde das resultierende Genprodukt immuncytochemisch detektiert. Basierend auf dem Nachweis des Proteins IGL-L wurde eine detaillierte Studie des Raum-zeitlichen Expressionsmuster an ausgewählten Entwicklungsstadien von *Periplaneta americana* durchgeführt.

3.4.1 gewebespezifische Expression

Für die Analyse der räumlichen Expression wurden verschiedene Gewebeproben auf Immunreaktivität gegenüber IGL-L untersucht. Während im zentralen und peripheren Nervensystem eine intensive Markierung nachgewiesen werden konnte, zeigten Hoden, Speicheldrüsen, Fettkörper, gastrointestinales Gewebe sowie einzelne Fasern der Skelett- und viszeralen Muskulatur keine Immunreaktivität. Die ausschließlich neuronale Expression von IGL-L wurde an Körperschnitten von Embryonen bestätigt (Abb.3.15).

3.4.2 Expression im zentralen Nervensystem

IGL-L Immunreaktivität wurde in zahlreichen neuronalen Zellkörpern und Nervenzellfortsätzen des Gehirns und der ventralen Ganglienkette detektiert. Im Oberschlundganglion (Gehirn) zeigen einzelne Neuropilareale des Proto-, Deuto- und Tritocerebrums IGL-L Immunreaktivität. Ein charakteristisches Neuronencluster ist im anterioren Bereich der Pars intercerebralis lokalisiert. Die Fortsätze dieser Zellen bilden einen markanten Trakt, dessen IGL-L IR qualitative Maximalwerte innerhalb des Gehirns erreicht. In Horizontalschnitten wird der antero-posteriore Verlauf des Traktes an der Innenseite der Pars intercerebralis und um die Pedunculi der Pilzkörper deutlich (Abb.3.16/2). Im Deutocerebrum bilden IGL-L immunreaktive Axone ein dichtes, die Glomeruli umgebendes Fasernetzwerk. Aufgrund der feinmaschigen Struktur scheint es sich bei diesen Projektionen um primäre olfaktorische Eingänge aus den Antennen zu handeln. Stringent immunnegativ stellen sich die Pilzkörper sowie die protocerebrale Brücke dar (Abb.3.16).

Für die ventrale Ganglienkette des Bauchmarks unter Einbeziehung des Unterschlundganglions ist eine intensive Markierung der motorischen (dorsal) und sensorischen (ventral) Neuropilareale kennzeichnend (Abb.3.17). Die Neuropilhemisphären der

Abdominalganglien werden durch zwei intensiv markierte, dorsal und ventral verlaufende sowie schmalere Kommissuren verbunden. Innerhalb der homogen markierten Neuropilareale lassen sich die Querschnitte der IGL-L immunnegativen ascendierenden Riesenaxone klar identifizieren, deren Somata im Terminalganglion liegen. Ausgehend vom Ganglienneuropil kann innerhalb der Dorsal- und Ventralnerven sowie der Konnektive der Verlauf einzelner IGL-L immunreaktiver Axone beobachtet werden. Im Ganglienkortex lokalisierte Somata zeigen Immunreaktivität gegenüber IGL-L mit unterschiedlicher Intensität. Diese Neurone befinden sich überwiegend in motorischen und sensorischen Arealen, wo sie einzeln oder in Zellclustern angeordnet vorliegen. Innerhalb der immunmarkierten Zellkörper kann der IGL-L immunnegative Nukleus abgegrenzt werden. Häufig lässt sich der neuritische Fortsatz dieser Zellen bis zum Eintritt in das intensiv IGL-L immunreaktive Neuropil beobachten, wo eine weitere Projektion jedoch nicht mehr verfolgt werden kann. Für die Anzahl immunmarkierter Zellen zeichnet sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Thorakal- sowie den Abdominalganglien ab. Im Kortex der Abdominalganglien werden einzelne Somata detektiert. Dagegen ist die Anzahl IGL-L immunreaktiver Neurone in den Ganglien, die in die Steuerung der Beine und Flügel (Thorakalganglien) sowie einem Teil der Mundwerkzeuge (Unterschlundganglion) involviert sind, wesentlich höher. An den Neurohaemalorganen des Gehirns (Corpora cardiaca und Corpora allata) sowie der Thorakalganglien (perisymphatischen Organe) wurde keine IGL-L IR detektiert (Abb.3.20/V).

3.4.3 Expression im peripheren Nervensystem

Ausgehend von der intensiven IGL-L Immunmarkierung dorsaler und ventraler Nerven der Ganglien wurden periphere Nervenfasern an der Muskulatur und am Darm auf IGL-L IR untersucht. Die Innervation von Skelettmuskulatur mit IGL-L immunmarkierten Nervenfasern wurde bei der segmental-sternalen abdominalen Muskulatur (Abb.3.20/I), der Beinmuskulatur sowie der dorsoventralen thorakalen Muskulatur nachgewiesen. An einem Nerv-Muskel-Präparat konnte der Verlauf deszendierender Nervenfasern vom Thorakalganglion bis zur Dorsoventralmuskulatur rekonstruiert werden. Im Bereich der viszeralen Muskulatur innervieren IGL-L immunreaktive Axone den Hyperneuralmuskel und das Dorsalgefäß. Das axonale Netzwerk am Antennenherz weist keine IGL-L IR auf (Abb.3.20/II-IV).

3.4.4 Entwicklung der IGL-L Immunreaktivität im Nervensystem

Das beschriebene IGL-L immunreaktive Muster wird während der Embryogenese angelegt. Es nimmt bis in frühe Larvalstadien an Intensität zu und bleibt im Wesentlichen bis in das Adultstadium unverändert erhalten.

I. Gehirn

In frühen Phasen der Gehirnreifung wird keine IGL-L IR registriert. Eine zunehmende Immunreaktivität wurde in whole mount-Präparaten ab 50% Embryogenese im Bereich der Schlundkonnektive sowie zahlreicher Faserbündel im Tritocerebrum detektiert. Die vergleichsweise intensive Immunmarkierung dieser Fasertrakte bleibt bis in frühe Larvalstadien erhalten. Bereits in Schnitten des pränatalen Oberschlundganglions (90% Embryogenese) wird ein IGL-L Expressionsmuster detektiert, das dem des larvalen und adulten Gehirns entspricht. Neben wenigen IGL-L markierten Somata werden verschiedene immunreaktive Neuropilbereiche identifiziert. Dazu zählen die Glomeruli sowie Neuropilareale des Proto- und Deutocerebrums (Abb.3.16/1). Im weiteren Verlauf der Entwicklung werden keine wesentlichen Veränderungen dieses Musters festgestellt. An Gehirnschnitten des vierten Larvalstadiums wird die markante IGL-L IR ausdifferenzierter Gehirne mit Färbung der entsprechenden Neuropilareale eindrucksvoll sichtbar: intensiv markiert stellen sich unter anderem der protocerebrale Trakt und ein großes Zellcluster im anterioren Bereich der Pars intercerebralis dar (Abb.3.16/2).

Während der gesamten Gehirnentwicklung besitzen die Pilzkörper, mit Ausnahme einer schwachen Markierung der basalen Pedunculiregion bei 90% Embryogenese, keine Immunreaktivität gegenüber IGL-L.

II. Bauchmark

Die früheste IGL-L IR konnte in der ventralen Ganglienkette bei einem Entwicklungsstadium von 50% Embryogenese nachgewiesen werden (Abb.3.18). Zu diesem Zeitpunkt sind die Ganglienhemisphären noch unfusioniert. Entlang des Bauchmarks lassen sich longitudinal verlaufende Projektionen als einzelne oder gebündelt vorliegende Axone erkennen. Die weitere Entwicklung des IGL-L immunreaktiven Musters wird durch eine kontinuierlich zunehmende Markierung des Ganglienneuopils charakterisiert, das sich nach 58% embryonaler Entwicklungszeit erstmals vom unmarkierten Ganglienkorax

abgrenzt. In den fortschreitend fusionierten Ganglienhälften treten zu diesem Zeitpunkt erste kommissurale Verbindungen auf. Parallel zur weiteren Strukturierung des Neuropils steigt die Immunreaktivität dieser Areale intensiv an, so dass nach 78% der embryonalen Entwicklungszeit die immunmarkierten Neuropilhälften, die in den abdominalen Ganglien nun markant bohnenförmig erscheinen, innerhalb der Ganglienhemisphären deutlich abgrenzbar sind (Abb.3.18). Resultierend aus der selektiven Immunmarkierung des Ganglienneuropils ist zu diesem Zeitpunkt die Fusion des Metathorakalganglions mit dem ersten Abdominalganglion erkennbar. Darüber hinaus werden ab 78% Embryogenese in den thorakalen und abdominalen Ganglienkortizes IGL-L immunreaktive Somata detektiert. In den freien Abdominalganglien fällt die segmentale und stereotype Immunmarkierung von zwei markanten Neuronenpaaren auf. Ihre Somata sind im lateralen Bereich der Ganglien median und distal lokalisiert, die Neurite projizieren ins Neuropil (Abb.3.17). An Frontalschnitten embryonaler Abdominalganglien ist bei einem Zellpaar die Überkreuzung der neuritischen Zellfortsätze erkennbar. Über ihre Zielgebiete liegen gegenwärtig keine Kenntnisse vor. Beide Neuronenpaare wurden an whole mount-Präparaten bis ins vierte Larvalstadium verfolgt und werden aufgrund ihrer Größe und Charakteristik als TITAN-Neurone (Temporary Identified Two pairs of Abdominal ganglia Neurons) bezeichnet. In Präparaten älterer Larvalstadien sowie bei adulten Tieren ist die Identifizierung dieser Zellen nicht mehr möglich. Bei diesen Entwicklungsstadien werden in den Abdominalganglien verschiedene Somata mit IGL-L Immunreaktivität detektiert, wodurch die TITAN-Neurone ihre charakteristische Individualität verlieren.

Die wesentlich höhere Anzahl IGL-L immunreaktiver Neurone in dem Unterschlund- und den Thorakalganglien wird bereits pränatal detektiert. Dabei belegen embryonale Ganglienschnitte als auch whole mount-Präparate, dass intensiv markierte Neuronenpopulationen in den dorsalen Kappen sowie auf der Ventralseite der Thorakalganglien lokalisiert sind.

Analog zum ZNS wird im peripheren Nervensystem das IGL-L immunreaktive Muster im letzten Drittel der Embryogenese angelegt. In embryonalen und larvalen Entwicklungsstadien erscheint die intensive IGL-L IR von Nervenfasern der Skelettmuskulatur (z.B. Muskulatur der Coxa) besonders markant. Zudem wurden am embryonalen gastrointestinalen Trakt darminnervierende Nerven und gastrische Ganglien immunmarkiert. Am Antennenherz wurde auch in Larvalstadien keine IGL-L IR nachgewiesen.

3.4.5 Genese und Regeneration der PDS-Neurone

In Doppelfärbungsexperimenten an embryonalen (Abb.3.19/II-IV), larvalen (Abb.3.19/V) und adulten Stadien zeigen diese Nervenzellen keine Immunreaktivität gegenüber dem Protein IGL-L. Ebenso stellen sich die PDS-Neurone nach Transektion abdominaler Konnektive sowohl zeitnah (2 bis 10 Tage postoperativ) als auch zeitfern (4 bzw. 6 Monate postoperativ) IGL-L immunnegativ dar (Abb.3.19/VI;VII). Insbesondere im Aussprossungsareal wurde weder am Axon erster Ordnung noch in den filopodienartigen, neu auswachsenden (regenerierenden) Axonterminalen IGL-L Immunreaktivität detektiert. Somit erfolgt bei den PDS-Neuronen das Neuritenwachstum in frühen Phasen ihrer Neurogenese (zwischen 40% und 60% Embryogenese), das weitere Längenwachstum während der larvalen Stadien sowie läsionsinduziertes Aussprossen ohne IGL-L Expression.

3.4.6 Kolokalisation mit Neurotransmittern

In Doppelfärbungsexperimenten wurde IGL-L auf eine Kolokalisation mit Perisulfakinin (PSK) bzw. FMRFamide-like Peptiden und Proctolin untersucht. Innerhalb des ZNS zeigen PSK-immunreaktive Neurone des Gehirns (PDS-Neuronenpaar, PI-Zellcluster), des Unterschlundganglions (mediane SOG-Zelle) sowie der Thorakalganglien (vier Zellpaare) keine IGL-L Markierung. Proctolinerge Neurone des Terminalganglions (♂) weisen ebenfalls keine IGL-L IR auf. Durch den Vergleich von nachfolgend IGL-L- und GABA-immunmarkierten Schnitten des Mesothorakalganglions kann für eine Vielzahl von Neuronen eine Kolokalisation ausgeschlossen werden. Allerdings besteht bei einem lateroventral gelegenen Zellcluster, bestehend aus ca. sechs Neuronen, eine hohe Deckungsgleichheit zwischen beiden Immunmarkierungen. Für diese Zellen ist eine Kolokalisation wahrscheinlich.

Der Nachweis von IGL-L Immunreaktivität in proctolinergen Axonen erfolgte an Fasern des peripheren Nervensystems. Dabei tritt eine Kolokalisation zwischen IGL-L und Proctolin nicht-kongruent an motorischen Fasern der Sternalmuskulatur (Skelettmuskulatur) und dem Hyperneuralmuskel (viszerale Muskulatur) auf (Abb.3.20). Über den Ursprung dieser Fasern können gegenwärtig keine Aussagen getroffen werden. Eine entsprechende Kolokalisation tritt nicht in proctolinergen Fasern des Antennenherzens auf, da die innervierenden Axone IGL-L immunnegativ sind (Abb.3.20). Am Dorsalgefäß

wurden Nervenfasern identifiziert, die durch Immunreaktivität gegenüber FMRFamid-like Proteinen und IGL-L Protein charakterisiert sind (Abb.3.20). Dies deutet auf eine Kolokalisation beider Proteine in einzelnen Axonen am Herzen hin.

3.5 Ultrastrukturuntersuchung

Die intrazelluläre Lokalisation der IGL-L Immunmarkierung sowie die Verteilung IGL-L immunreaktiver Nervenzellfortsätze innerhalb des Neuropils wurden elektronenmikroskopisch am Thorakalganglion des sechsten Larvalstadiums untersucht. Im Neuropil wurde eine selektive Immunmarkierung einzelner Nervenzellfortsätze beobachtet. In diesen Zellen wurde das Produkt der Peroxidase-Reaktion nahezu durchgehend an der zytoplasmatischen Seite des Plasmalemma sowie an der äußeren Membran der Mitochondrien detektiert. Zudem lassen sich zahlreiche Markierungen im Cytoplasma nachweisen, die auf eine Akkumulation des Proteins am Cytoskelett hindeuten. Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei diesen Zellkompartimenten um prä- oder postsynaptische Areale handelt.

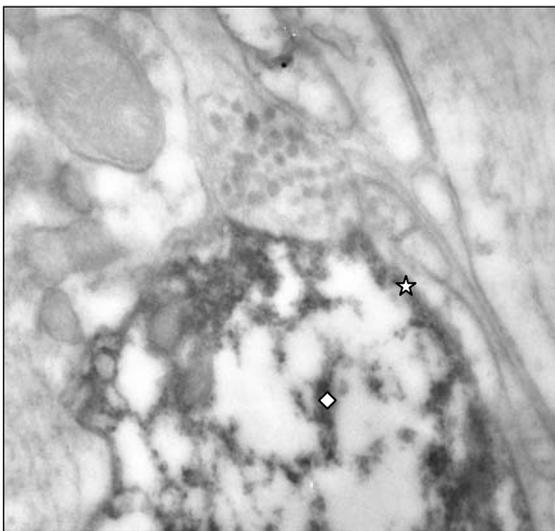


Abb.3.21: Elektronenmikroskopische Lokalisation von IGL-L im Neuropil des Thorakalganglions. Einzelne Nervenzell-Fortsätze zeigen Immunreaktivität am Plasmalemma (☆) sowie im Cytoplasma (◇).
Vergrößerung: 30.800

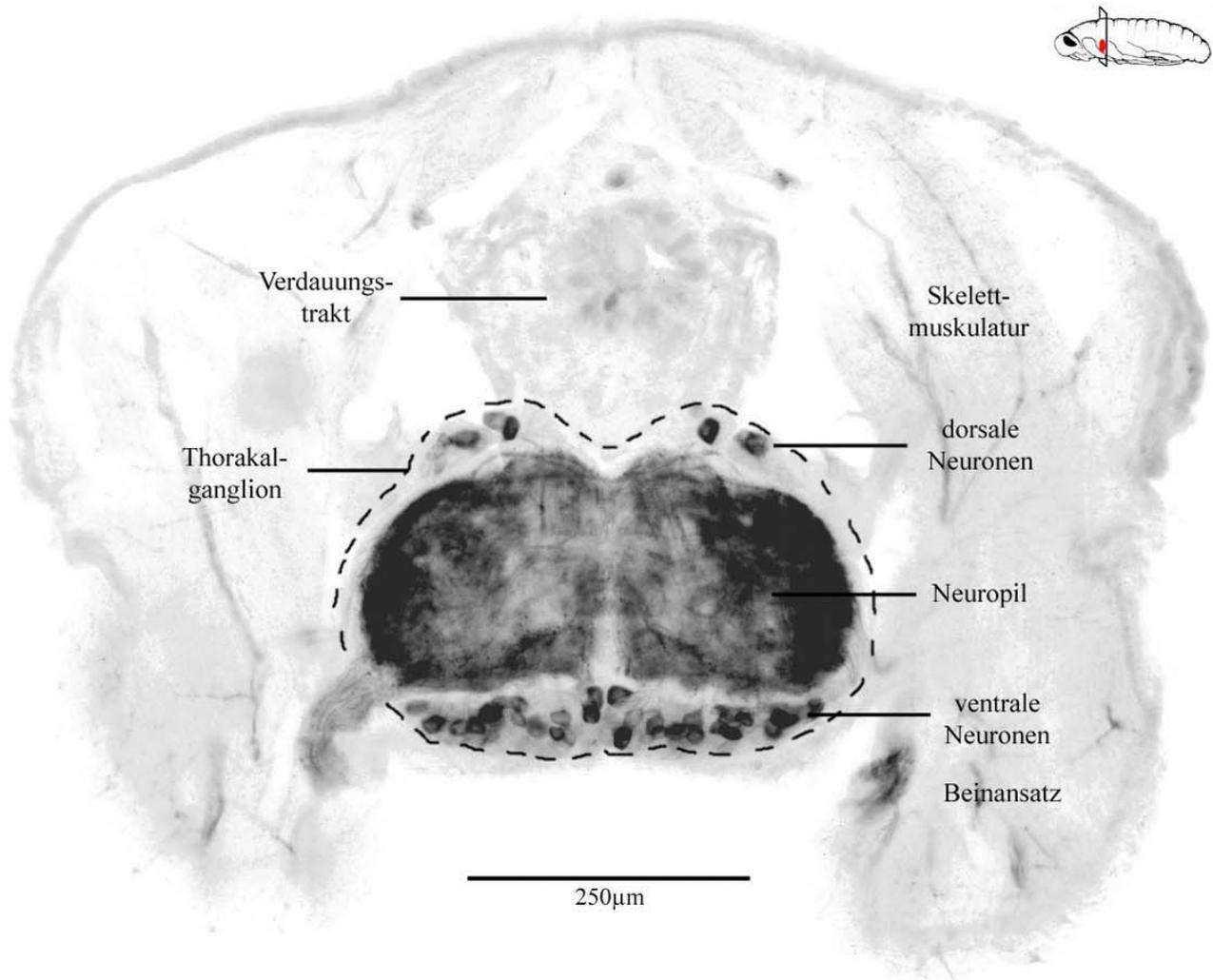


Abb. 3.15: IGL-L-Immunreaktivität in einem Querschnitt durch einen Embryo (90% Embryogenese). Das Protein zeigt eine neuronale Expression im zentralen und peripheren Nervensystem. Eine intensive Immunmarkierung wird im Neuropil sowie dorsal und ventral lokalisierten Zellkörpern der Ganglien detektiert.

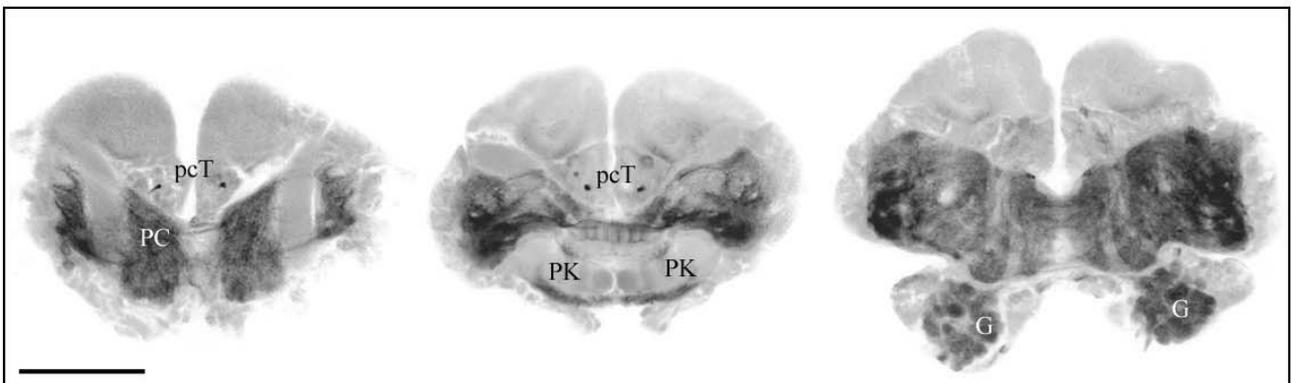


Abb. 3.16/1: Im embryonalen Gehirn (90% Embryogenese) wird IGL-L-Immunreaktivität im Neuropil des Protocerebrums (PC) sowie an den deutocerebralen Glomeruli (G) nachgewiesen. Intensiv markiert ist ein protocerebraler Trakt (pcT). IGL-L-immunnegativ stellen sich die Pilzkörper (PK) dar. Das Expressionsmuster bleibt auch postnatal erhalten (vgl. Abb. 3.16/2). Maßstab: 250µm

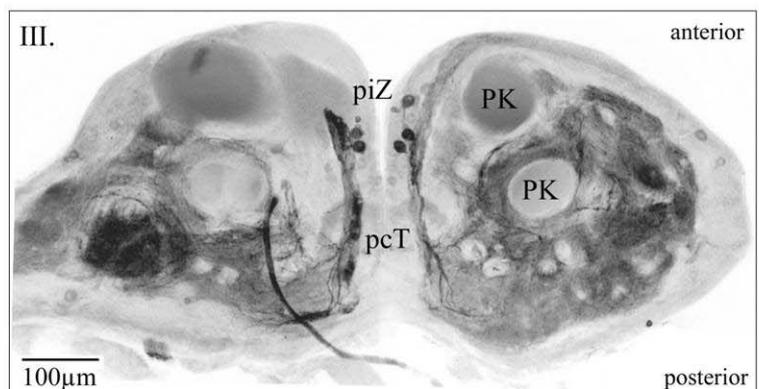
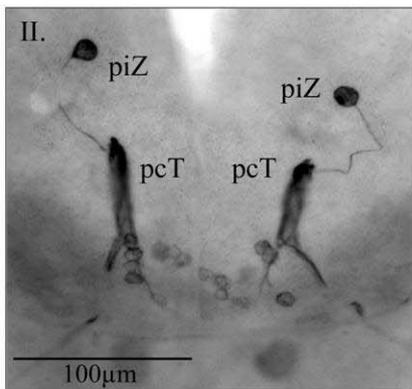
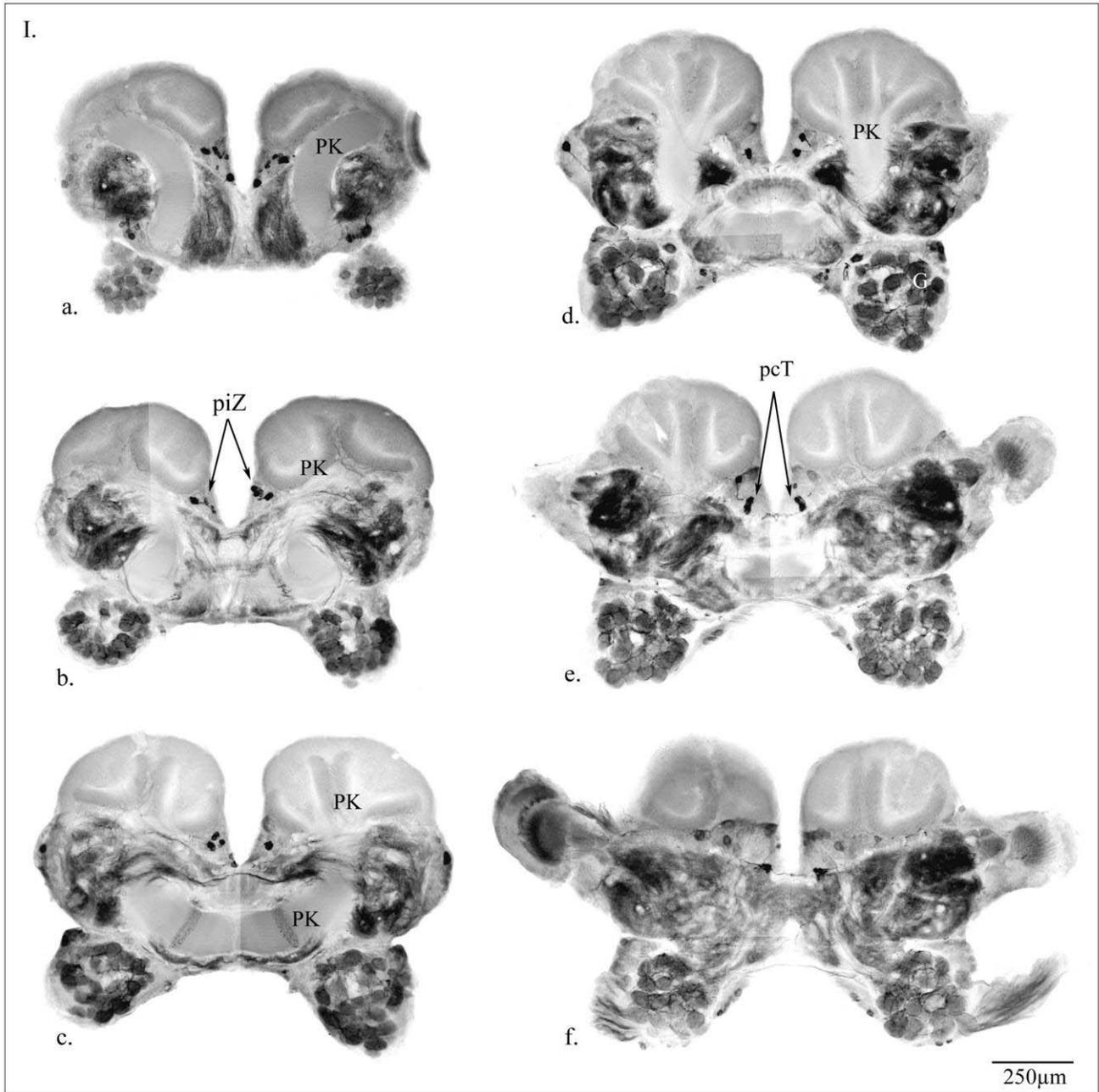


Abb. 3.16/2: IGL-L-Immunreaktivität im postnatalen Gehirn. Frontalschnitte durch das Oberschlundganglion (I.) zeigen Immunmarkierungen im protocerebralen Neuropil um die Pilzkörper (PK), diese bleiben jedoch IGL-L-immunnegativ. Deutlich markiert sind die Glomeruli (G) sowie eine Zellgruppe (piZ) im anterioren Bereich der Pars intercerebralis. Diese Neurone formen einen Trakt (pcT; II.), dessen antero-posteriore Verlaufe durch das Protocerebrum im Horizontalschnitt (III.) deutlich wird.

I.: viertes Larvalstadium; II.: erstes Larvalstadium; III.: Imaginalstadium

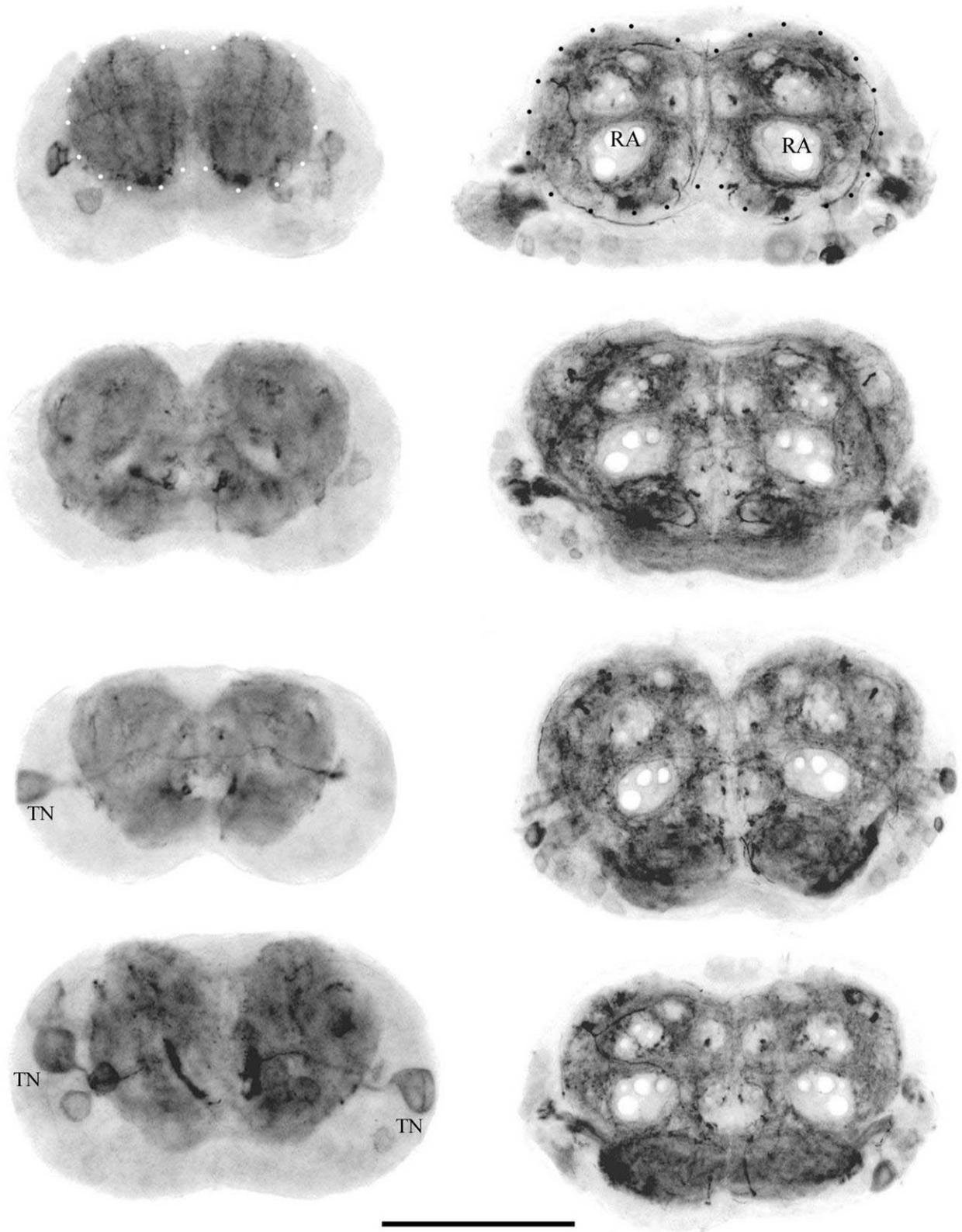


Abb. 3.17: Frontalschnitte eines abdominalen Ganglions von embryonalen (90% Embryogenese, links) und adulten (rechts) Entwicklungsstadien. IGL-L-Immunreaktivität wird im Neuropil (punktiert) des Ganglions detektiert. Markant stellen sich die Titan-Neurone (TN) in embryonalen Abdominalganglien dar. Die Riesanaxone (RA) zeigen im ausdifferenzierten ZNS keine IGL-L-Markierung.

dorsal: oben, ventral: unten

Maßstab: linke Spalte: 100µm, rechte Spalte: 250µm

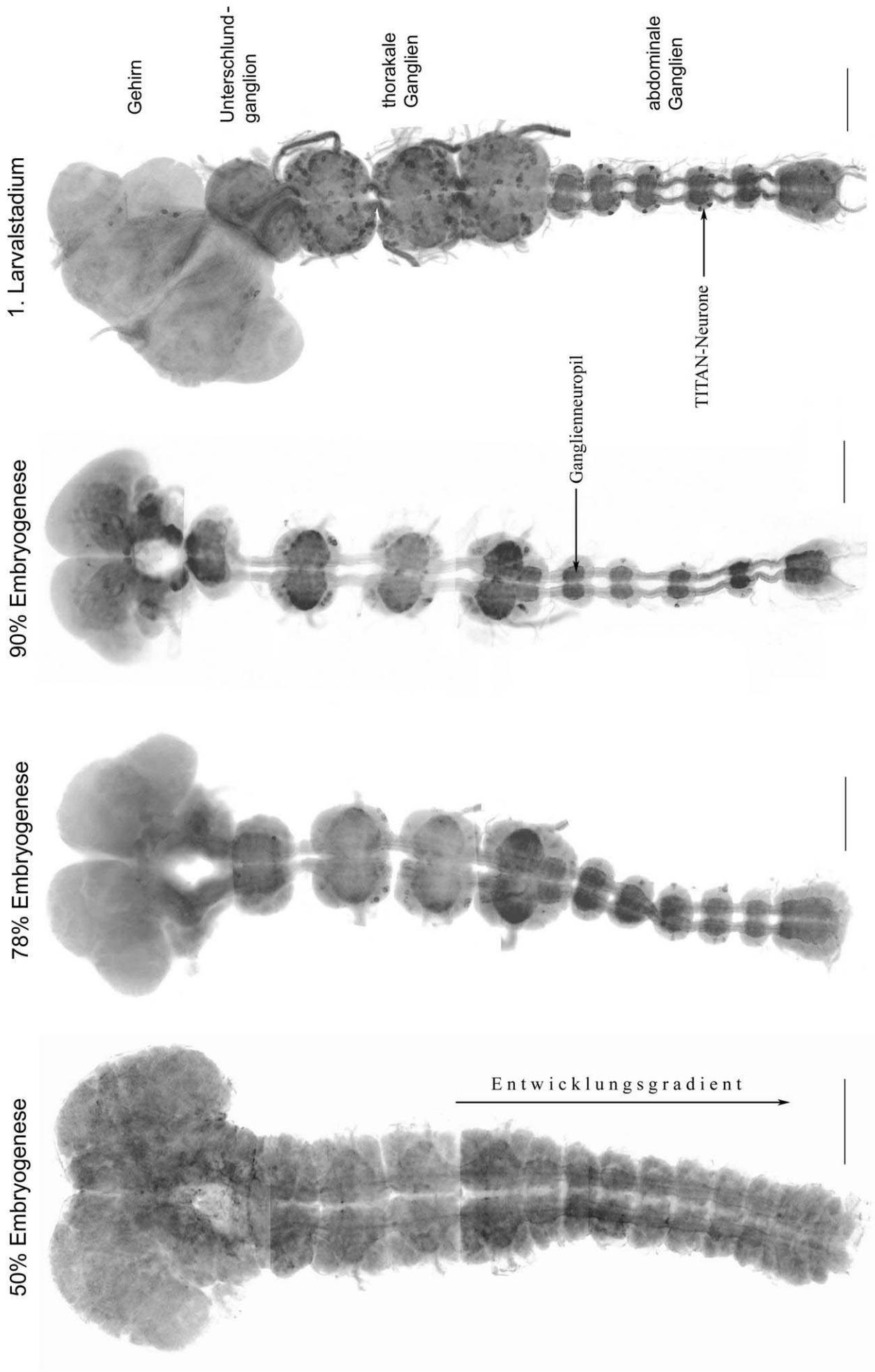


Abb. 3.18: Entwicklung der IGL-L-Expression im Zentralnervensystem embryonaler und larvaler Entwicklungsstadien. IGL-L-Immunreaktivität wird ab 50% Embryogenese im Neuropil der Ganglien detektiert und nimmt bis in frühe Larvalstadien an Intensität zu. Maßstab: 250µm

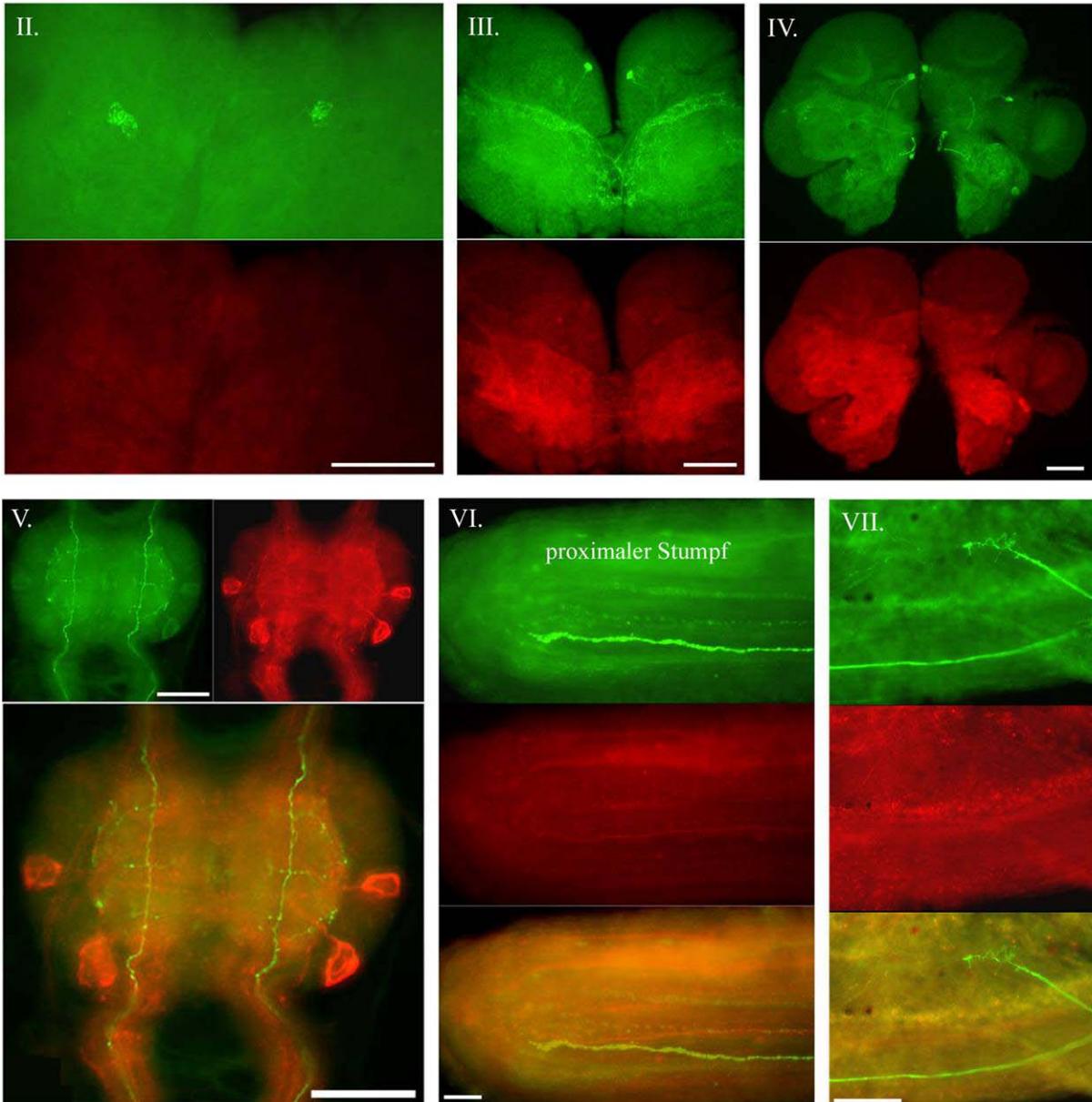
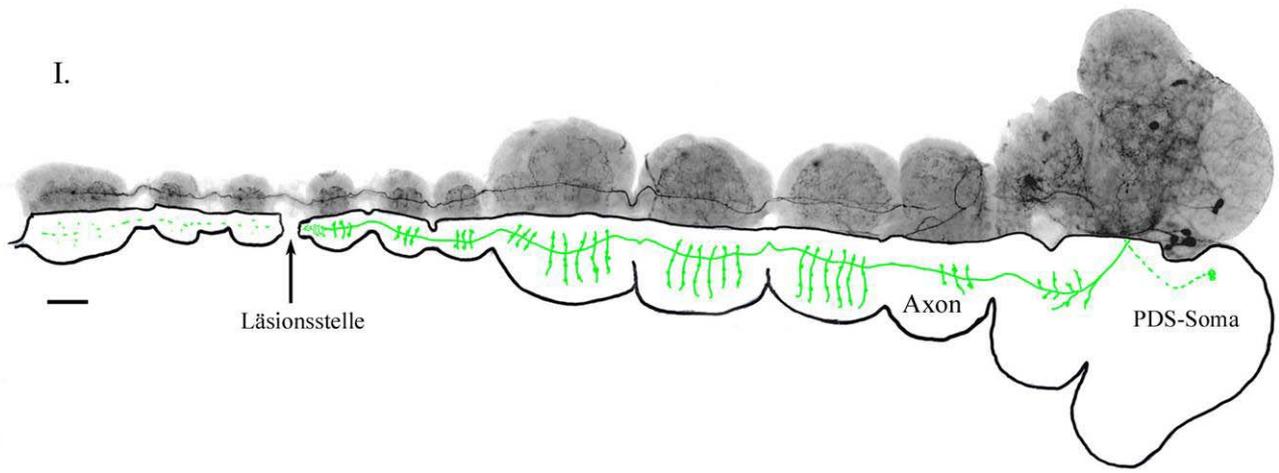


Abb. 3.19: Die Neurogenese und regeneratives Aussprossen der protocerebralen deszendierenden Sulfakinin-IR Interneurone (PDS-Neurone, grün) erfolgen ohne die Expression von IGL-L (rot). I. Halbschematische Darstellung der Projektion der PDS-Neurone im whole mount-Präparat des ersten Larvalstadiums. Zu Beginn der Axogenese (42% Embryogenese (II.)) sowie in späteren Stadien (75% (III.) und 90% (IV.) Embryogenese) zeigen weder Soma noch Axon (V.; 5. Abdominalganglion des ersten Larvalstadiums, rot: TITAN-Neurone) IGL-L IR. Am proximalen Axonstumpf tritt postoperativ nach drei Tagen eine Axonschwellung auf (VI.). Sechs Monate nach der Axotomie sind axonale Aussprossungen im Narbengewebe sichtbar (VII.) Maßstab: 100µm

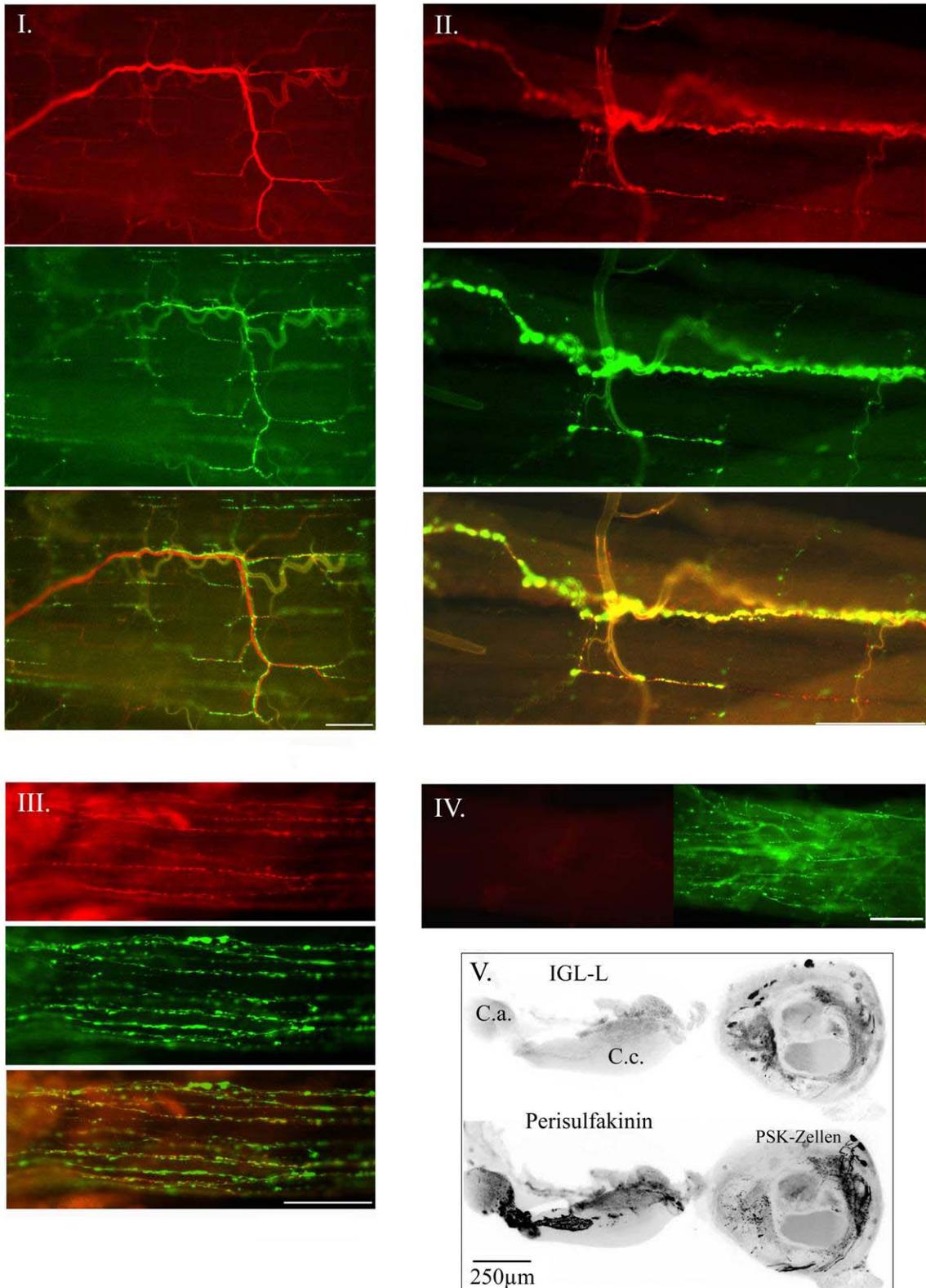


Abb. 3.20: IGL-L-Immunreaktivität (rot) im peripheren Nervensystem. In einzelnen Nervenfasern der Sternalmuskulatur (I.) und des Hyperneuralmuskels (II.) tritt IGL-L kolokalisiert mit Proctolin (grün) auf. Am Herzmuskel (III.) wurde in einzelnen IGL-L-markierten Fasern FMRFamid-like Immunreaktivität (grün) detektiert. Das Proctolin-immunmarkierte (grün) Antennenherz (IV.) zeigt keine IGL-L-Immunreaktivität. Die Corpora cardiaca (C.c.) und Corpora allata (C.a.) sind ebenfalls IGL-L-immunnegativ (V., obere Abbildung). Neurone der Pars intercerebralis (PSK-Zellen) setzen an diesen Neurohaemalorganen des Gehirns Perisulfakinin frei (V., untere Abbildung).

Maßstab: I.-IV.: 100μm

4. Diskussion

Die Selbstassemblierung des neuronalen Netzwerkes umfasst die Differenzierung von Neuroblasten, die Initiation der Neuritogenese und Polarisierung in axonale und dendritische Zellfortsätze, die Weg- und Zielfindung von Axonen sowie die Bildung und Stabilisierung synaptischer Verbindungen. Auf molekularer Ebene sind diese Prozesse an die Expression von „growth-associated proteins“ (GAPs) gebunden. Eine Reexpression dieser Proteine bei Regenerationsprozessen wird als „regeneration-associated gene expression“ (RAG) bezeichnet. Unter einer wachsenden Zahl bekannter Moleküle, die in die Regulation der Neurogenese involviert sind, gilt dem growth-associated protein GAP-43 (B-50, Neuromodulin) ein besonderes Interesse (Skene & Willard, 1981; Benowitz & Routtenberg, 1997). GAP-43 ist ein präsynaptisches Protein, dessen Bildung während Entwicklungs- und Regenerationsprozessen seit fast 30 Jahren bekannt ist. Aufgrund seiner intensiven und neuronspezifischen Expression wird es als präsynaptische Determinante für axonales Wachstum und synaptische Plastizität bewertet. Nach der Etablierung von synaptischen Kontakten wird die GAP-43-Expression herabreguliert. Ausgenommen davon sind Hirnareale, in denen Plastizität erhalten bleibt (Kapfhammer & Schwab, 1994b). Die Überexpression des Proteins führt in Mäusen zu spontanen sowie läSIONSINDUZIERTE gestiegenen Sprossungsvorgängen an der neuromuskulären Synapse und verschiedenen Hirnarealen (Harding *et al.*, 1999). In nicht-neuronalen Zelllinien induziert das Protein die Bildung von neuritähnlichen Filopodien (Aarts *et al.*, 1998), weshalb ihm das Attribut eines „Axonmachers“ zugeschrieben wird. Andererseits zeigen GAP-43-Knockout Mäuse Störungen der axonalen Wegfindung und Wachstumskegel-Adhäsion (Sretavan & Kruger, 1998; Shen *et al.*, 2002). GAP-43-defizite Neurone verfügen dennoch über die Kompetenz zur Filopodienbildung, insbesondere zur axonalen Sprossung und zur Elongation (Strittmatter *et al.*, 1995).

Die physiologische Einbindung des Proteins in die Axogenese und synaptische Signalübertragung ist ungeklärt. Das neuronale Expressionsmuster im embryonalen und ausdifferenzierten Nervensystem deutet auf multifunktionelle Eigenschaften des Proteins hin. Auf molekularer Ebene wird diese Hypothese durch den Nachweis verschiedener Interaktionsmöglichkeiten von GAP-43 mit G-Proteinen bzw. Elementen des Aktin-

Cytoskeletts gestützt, wobei diese Wechselwirkungen durch Membranassoziation und eine PKC-abhängige Calmodulinbindung moduliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression eines GAP-43 homologen Proteins während der neuronalen Entwicklung der Amerikanischen Schabe untersucht. Voraussetzung dafür bildete die Sequenzierung des entsprechenden Transkriptes aus *Periplaneta americana*. Der Nachweis eines strukturellen GAP-43-Analogon bei der Taufliege wurde von Neel und Young (1994) erbracht. Sie identifizierten im Hybridisierungsexperiment das Genprodukt von *Drosophila igloo*. Mit dem seit 2000 vorliegenden vollständigen Genom von *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000) wurde im Vorfeld der Untersuchung eine Datenbankrecherche durchgeführt, bei der nach weiteren strukturell GAP-43 homologen Proteinen der Taufliege gesucht wurde. An die Struktur eines Invertebraten-GAP-43 wurden folgende Kriterien gestellt:

1. Existenz einer oder mehrerer hoch konservierter GAP-Modul-Sequenzen (Calmodulinbindung an einem **IQ**-Motiv, Regulation durch eine Phosphorylierungsstelle (**S**); Sequenzmotiv: KAATK**IQ**ASFRGHITRK)
2. Existenz einer aminoterminalen Membranbindedomäne (Acylierungssequenz für Palmitoylierung oder Myristoylierung)

Das GAP-Modul stellt als CaM-Bindedomäne ein funktionelles Motiv dar, das in vielen Proteinen nachgewiesen wurde. Bei Vertebraten wird die Konsensussequenz außer bei GAP-43 z.B. auch bei Myosin IIIA, Obscurin oder Neurogranin gefunden. Die BLAST-Suche detektierte bei *Drosophila* neben dem Genprodukt von *igloo* 134 weitere Proteine mit (variieren) GAP-Modul-Sequenzen. Dabei handelt es sich um Proteine (z.B. *asp* Genprodukt, CG13544, *ninaC* Genprodukt, CG14687) mit bis zu drei GAP-Modulen, bei denen jedoch keine putative Palmitoylierungs- oder Myristoylierungssequenz vorhanden ist. Zudem sind die GAP-Module dieser Proteine häufig am IQ-Motiv oder der Phosphorylierungsstelle verändert. Das Ergebnis der BLAST-Analyse bestätigt, dass das Transkriptionsprodukt von *Drosophila igloo-L* (Neel & Young, 1994) die höchste strukturelle Homologie zum Vertebraten GAP-43 besitzt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Suche nach entsprechenden GAP-43 Proteinen bei *Periplaneta* auf die Invertebrate-GAP-43-Like Proteine (IGL-Proteine) fokussiert.

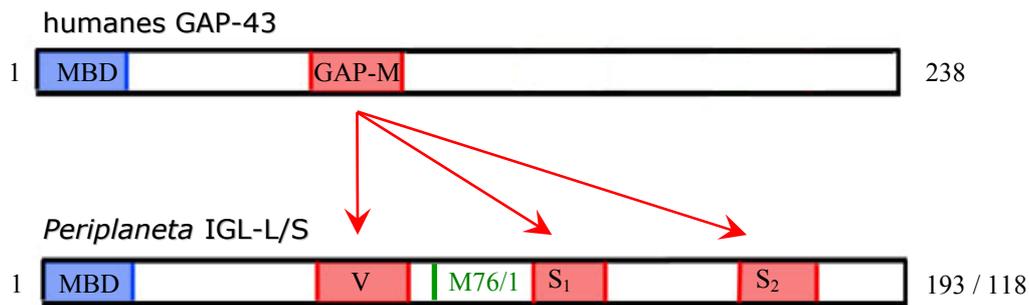


Abb.4.1: Schematische Darstellung homologer funktioneller Domänen (Membranbindedomäne [MBD] und GAP-Modul [GAP-M; V, S₁, S₂]) von humanem GAP-43 und den IGL-Proteinen (IGL-L und IGL-S) von *Periplaneta americana*.

Durch PCR-Amplifikation wurden zwei Transkripte der Amerikanischen Schabe, die als *igl-L* und *igl-S* bezeichnet werden, identifiziert. Die Expression beider Transkripte konnte in embryonalen und adulten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden (siehe Abb.3.6). Aufgrund der Sequenzidentität von *igl-S* gegenüber *igl-L* binden Oligonukleotide, die für die Amplifikation des codierenden Bereiches von *igl-S* verwendet werden, auch an *igl-L* Templates. Das resultierende PCR-Produkt stellt keinen eindeutigen Nachweis für *igl-S* Transkripte dar. Deshalb wurde für die Amplifikation von *igl-S* ein downstream-Primer gewählt, der am 5'-Ende der *igl-S* spezifischen, nicht-codierenden Position [-165] bindet. Ein Vergleich der Bandenintensitäten zwischen den RT-PCR Produkten deutet auf eine geringere Expression von *igl-L* gegenüber *igl-S* in beiden Gewebeproben hin. Dennoch wurde *igl-L* auch im ausdifferenzierten ZNS nachgewiesen. Dieser Befund stand im Widerspruch zur entwicklungsregulierten *igloo*-Expression, bei der mit einem Northern Blot-Test keine *igloo-L*-Transkripte in adulten Tauffliegen detektiert wurden (Neel & Young, 1994). Zur Klärung dieser Divergenz wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von *Drosophila igloo* in verschiedenen Entwicklungsabschnitten mit der Methode der RT-PCR Amplifikation untersucht. Im Ergebnis konnte durch die Sequenzierung von *igloo-S* und *igloo-L* in Larven-, Puppen- und Imaginalstadien ebenfalls eine dauerhafte Expression beider *igloo*-Transkripte nachgewiesen werden (siehe Abb.3.2). Das von Neel und Young (1994) beschriebene Gen *igloo* wurde bei *Drosophila melanogaster* auf dem Chromosom 2R lokalisiert (Adams *et al.*, 2000). Strukturell enthält dieses Gen drei Exons. Die translatierte Sequenz von Exon 1 codiert im offenen Leserahmen den Proteinbereich vom initialen Methionin bis zum unmittelbaren Beginn des

V-Moduls. Dieses Modul und der anschließende Bereich bis zum zweiten GAP-Modul werden von Exon 2 codiert. Die restlichen 75 Aminosäuren liegen auf dem dritten Exon, welches zwei GAP-Module (T- und S-Modul) einschließlich des Carboxyterminus codiert. Das Transkriptionsprodukt des *igloo*-Gens liegt als mRNA in zwei Varianten vor. Dabei codiert die Kombination aller drei Exons das Transkript *igloo-L*, während sich das *igloo-S* Transkript ausschließlich aus den Exons 2 und 3 zusammensetzt. Somit entspricht das *igloo-S* Transkript dem *igloo-L* Transkript ab dem ersten Codon von Exon 2 (Ala100). Aufgrund des ORF, der für *igloo-S* im Exon 2 bei Met20 beginnt, entspricht das Protein IGLOO-S dem Protein IGLOO-L ab Met119. Die Sequenzierung der Transkriptionsprodukte von *Periplaneta igl-L* und *igl-S* zeigte eine adäquate Homologie am 5'-Ende beider mRNAs (siehe Abb.3.5). Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit zu den Transkripten von *Drosophila igloo* lässt sich eine analoge genomische Struktur für *Periplaneta igl* postulieren. In Übereinstimmung zur Taufolie würde bei der Schabe das Gen *igl* aus drei Exons bestehen. Die wahlweise Transkription der Exons 1 bis 3 würde das Transkript *igl-L* und der Exons 2 und 3 das Transkript *igl-S* bilden.

GAP-Module der IGL-Proteine

Strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen den IGL(OO)-Proteinen von *Drosophila* und *Periplaneta* umfassen sowohl die Anzahl der GAP-Module (IGL(OO)-S: 2 GAP-Module; IGL(OO)-L: 3 GAP-Module) als auch die Präsenz einer aminoterminalen Myristoylierungssequenz (MGXXXS/T) bei den L-Isoformen (siehe Abb.3.8). In beiden Spezies stellen die IGL(OO)-S spezifischen Module mögliche PKC-Targets dar. Im Gegensatz dazu zeigen die V-Module beider IGL(OO)-L Proteine eine Aminosäuresubstitution mit einem entsprechend positionierten, konservierten Valinrest. Anzumerken ist der ursprüngliche Charakter des zweiten GAP-Moduls bei *Periplaneta* IGL-L (bzw. des ersten GAP-Moduls bei pIGL-S). Dessen Phosphorylierungsstelle wird, wie im dritten GAP-Modul, durch einen Serinrest gebildet. Die Serin-Substitutionen in den GAP-Modulen der IGL(OO)-Proteine von *Drosophila* und *Periplaneta* könnten die Evolution dieses repetitiven Motives widerspiegeln. Sie könnte vom ursprünglichen S-Modul (3. GAP-Modul) über das 2. GAP-Modul (T- bzw. S₁-Modul) zum ersten GAP-Modul (V-Modul) verlaufen sein.

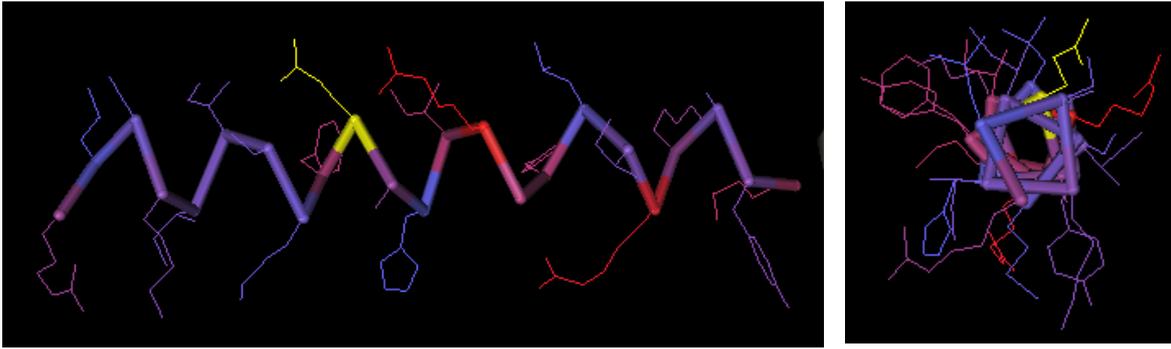


Abb.4.2: Tertiärstruktur des Short calmodulin binding motif containing conserved Ile and Gln residues (Deloulme *et al.*, 1997; Rhoads & Friedberg, 1997).

Alle drei GAP-Module von IGL-L zeigen Sequenzhomologie zu den Calmodulin-bindungsdomänen *smart00015.7*, *IQ* (Short calmodulin binding motif containing conserved Ile and Gln residues) und *pfam00612*, *IQ* (IQ calmodulin binding motif) (Deloulme *et al.*, 1997; Rhoads & Friedberg, 1997). Die dreidimensionale Struktur dieser Sequenzmotive ist durch eine helikale Anordnung der Aminosäurereste charakterisiert (Abb.4.2). Funktionell handelt es sich dabei um Calmodulinbindestellen (Neel & Young, 1994). Für die Tertiärstruktur von IGL-L können dementsprechend drei repetitiv angeordnete Helices postuliert werden. Ob die Calmodulinbindung bzw. Phosphorylierung der GAP-Module Auswirkungen auf weitere molekulare Interaktionen dieser Motive hat und wie sich diese auf die Funktion von IGL-L auswirken könnten, ist gegenwärtig nicht bekannt. Im Vergleich zum Vertebraten GAP-43 bedeutet die Multiplikation der Calmodulinbindungsdomäne bei den Invertebrate-GAP-43-like Proteinen eine höhere Anzahl an CaM-Bindungsstellen sowie eine größere regulatorische Variabilität. Über eine geordnete Calmodulinbesetzung der drei Module kann daher die folgende Überlegung angestellt werden: IGL-L kann durch die variable Besetzung der V-, S₁- und S₂-Module vier Zustände der Calmodulinbindung einnehmen. Aufgrund der Charakteristik des GAP-Moduls liegt IGL-L bei hohen intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentrationen ohne gebundenes CaM vor. Dieser erste Bindungszustand (BZ 1) kann als Ausgangszustand betrachtet werden. Eine kontinuierliche Verringerung der freien Ca⁺⁺-Konzentration könnte zu einer schrittweisen Besetzung der GAP-Module mit CaM über drei Bindungszustände führen, die der Assoziation von einem (BZ 2), zwei (BZ 3) bzw. drei (BZ 4) CaM-Molekülen entsprechen. Für die Bindungszustände BZ 2 und BZ 3 können zudem jeweils drei verschiedene Bindungsvarianten (BV) postuliert werden. Während im

BZ 2 die Bindung von einem Calmodulin als V-, S₁- oder S₂-Modul-Assoziation erfolgen kann, stehen im BZ 3 mit der Bindung von zwei CaM-Molekülen die Bindungsvarianten V/S₁, V/S₂ und S₁/S₂ zur Verfügung. Insgesamt ergeben sich somit für die Bindung von Calmodulin an IGL-L sieben verschiedene Bindungsvarianten (Tab.4.1). Dabei kann für sechs BV eine mögliche Regulation durch die Phosphorylierung der Serinreste in den S₁- und S₂-Modulen vermutet werden. Von diesen würden drei BV eine vollständige (S₁; S₂; S₁/S₂) und drei BV eine teilweise (V/S₁; V/S₂; V/S₁/S₂) Regulation durch die Proteinkinase C aufweisen.

Bindungszustand (BZ)	Anzahl CaM	Bindungsvarianten (BV); Anzahl BV
1	0	/
2	1	V; S ₁ ; S ₂ 3
3	2	V/S ₁ ; V/S ₂ ; S ₁ /S ₂ 3
4	3	V/S ₁ /S ₂ 1
Summe BV		7

Tab.4.1: Mögliche Bindungsvarianten von Calmodulin für die GAP-Module von IGL-L.

Ergänzend werden für die IGL-S Isoform drei BZ (ohne CaM, ein CaM, zwei CaM) mit insgesamt drei BV (S₁; S₂; S₁/S₂) postuliert.

Bei der Beladung des Proteins mit Calmodulin können nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand Unterschiede im CaM-Bindungsverhalten zwischen den V- und S_{1/2}-Modulen nicht ausgeschlossen werden. Zur Diskussion steht die Möglichkeit, dass die Besetzung von IGL-L mit CaM durch eine bevorzugte Reihenfolge oder kooperative Effekte beeinflusst wird. Somit könnten Veränderungen im Protein, insbesondere sterische Konformationsänderungen, z.B. für das V-Modul einen PKC-unabhängigen regulatorischen Mechanismus codieren.

Aus der Interaktion von IGL-L mit Calmodulin ergibt sich die zentrale Frage nach dessen molekularer Einbindung in die Prozesse der neuronalen Differenzierung und axonalen Signalübertragung. Für die Funktion von IGL-L werden zwei mögliche Szenarien diskutiert:

1. IGL-L als lokaler Calmodulin-Speicher

Die regulatorische Wirkung von Kalziumionen wurde durch Messung der Kalziumströme in auswachsenden Neuriten nachgewiesen (Anglistter *et al.*, 1982; Bolsover & Spector, 1986). Da zahlreiche Enzyme, Kanäle und Strukturproteine nicht direkt mit dem Botenstoff Kalzium interagieren, wird die Aktivität dieser Proteine durch Calmodulin kontrolliert. Die Bindung dieses intrazellulären Ca^{++} -Sensors an IGL-L reduziert die freie CaM-Konzentration und kann somit unmittelbaren Einfluss auf verschiedene Signaltransduktionswege nehmen. Andererseits würde eine steigende Ca^{++} -Konzentration zur CaM-Dissoziation von den GAP-Modulen führen (De Graan *et al.*, 1990; Liu & Storm, 1990) und eine Aktivierung nachgeschalteter Proteine durch freie Calmodulin-Moleküle ermöglichen. Die maximale Bindekapazität von drei CaM-Molekülen, im Zusammenhang mit der Lokalisation von IGL-L an der inneren Seite der Zellmembran, könnte mit der Funktion eines lokalen Calmodulin-Speichers interpretiert werden (Abb.4.5). Im Gegensatz zu IGL-S, das die freie CaM-Konzentration im gesamten Zytoplasma ändern würde, könnte IGL-L als räumlich begrenzter CaM-Puffer im Bereich zwischen Plasmalemma und Zytoskelett agieren. Insbesondere die Subplasmalemma-Zone ist ein wichtiges Kompartiment für zelluläre Differenzierungsprozesse. So erfolgt beim Neuritenwachstum die Verarbeitung extrazellulärer Signale zur intrazellulären Restrukturierung des Aktin-Zytoskeletts im kortikalen Zellbereich. Basierend auf dem intrazellulären Targeting von IGL-L und IGL-S könnte die unterschiedlich lokalisierte CaM-Freisetzung die gegensätzliche Kompetenz beider Proteine zur Filopodienbildung erklären.

2. IGL-L als Signaltransduktor mit katalytischer Aktivität

Die Bindung von Calmodulin sowie die Phosphorylierung durch Proteinkinasen führen zu Konformationsänderungen eines Proteins. Die damit verbundene Funktionsregulation kann die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Enzymen, das Öffnen bzw. Schließen von Kanälen oder intermolekulare Proteinwechselwirkungen umfassen. Das Protein IGL-L bietet mit den V-, S₁- und S₂-Modulen drei potentielle regulatorische Domänen, die Calmodulin binden oder, im Fall der S-Module, alternativ phosphoryliert werden können. Als Folge dieser Modifikationen könnten katalytische Domänen, mit denen das Protein in molekulare Signalkaskaden eingreift, aktiviert bzw. inaktiviert werden. Für GAP-43 werden diese

katalytischen Domänen am Aminoterminus (Aktivierung von G-Proteinen) und am C-Terminus (Interaktion mit Aktinfilamenten) vermutet. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Calmodulinbindungsstatus bzw. dem Phosphorylierungsstatus des GAP-Moduls und der Aktivität der effektorischen Domänen ist jedoch umstritten (He *et al.*, 1997; Meiri *et al.*, 1998). Sequenzhomologe Domänen dieser Art sind bei den IGL-Proteinen von *Periplaneta* und *Drosophila* nicht vorhanden. Allerdings deutet die GAP-43-homologe Aminosäurezusammensetzung auf ähnliche biophysikalische Eigenschaften hin. Deshalb könnten adäquate Wechselwirkungen, z.B. mit Elementen des Cytoskeletts, auch bei den IGL-Proteinen möglich sein (Abb.4.5). An dieser Stelle wird unter Bezug auf die sieben möglichen CaM-Bindungsvarianten die Frage aufgeworfen, ob durch eine variable Calmodulinbindung von IGL-L eine abgestufte Wechselwirkung des Proteins mit dem Cytoskelett reguliert werden könnte.

Membranlokalisierung und Filopodienbildung

Aus den Sequenzinformationen der *igl-L* und *igl-S* Transkripte leiteten sich zwei Fragen ab, die im Transfektionsassay beantwortet werden sollten:

1. IGL-L besitzt N-terminal eine putative Myristoylierungssequenz. Welche intrazelluläre Lokalisation besitzen die IGL-Proteine?
2. Verfügen die IGL-Proteine über eine morphogenetische Kompetenz und induzieren die Bildung von Zellfortsätzen?

1. intrazelluläre Lokalisation

Die Myristoylierungssequenz MGXXX(S/T) (Liang *et al.*, 2002; Kosloff *et al.*, 2002; Maurer-Stroh *et al.*, 2002) stellt einen strukturkonservierten Abschnitt der GAP-43-like Proteine von *Drosophila* IGLOO-L und *Periplaneta* IGL-L dar. Aufgrund der nachgewiesenen Myristoylierung von dIGLOO-L (Neel & Young, 1994) wurde eine membranständige Lokalisation beider Proteine postuliert. Durch die Überexpression von *Periplaneta* IGL-EGFPN1-Konstrukten in CHO-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit eine entsprechende Membranbindung für IGL-L nachgewiesen werden (siehe Abb.3.9). Bestätigt wird dieser Befund durch die elektronenmikroskopische Detektion von nativ exprimiertem pIGL-L. Im Ganglienneuropil der Schabe tritt IGL-L Immunreaktivität an

der Zellmembran von Nervenzell-Fortsätzen auf (siehe Abb.3.21). Im Gegensatz zu IGL-L verfügt das Protein IGL-S über eine cytoplasmatische Lokalisation in transfizierten CHO-Zellen. Es verhält sich wie die GAP-43-Mutanten Cys3Ala/Cys4Ala (Wiederkehr *et al.*, 1997) oder Cys3Ser/Cys4Gly (Aarts *et al.*, 1998). Deren Membrantargeting wird durch Veränderung der aminoterminalen Palmitoylierungsdomäne inhibiert.

2. Filopodienbildung

Der Einfluss von GAP-43 auf die Zellmorphologie, insbesondere auf die Kompetenz zur Bildung von Zellfortsätzen, wurde durch Überexpressionsexperimente in nicht-neuronalen Zellen untersucht (Zuber *et al.*, 1989; Aarts *et al.*, 1998). Bewertungsmaßstab in diesen Transfektionstests bildete die phänotypische Veränderung spindelförmiger Zellen ohne Zellfortsätze zu sphärischen Zellformen mit zahlreichen Filopodien. Sollten die *Periplaneta* IGL-Proteine neben einer strukturellen Homologie auch funktionelle Aspekte mit GAP-43 teilen, ist für das membranständige IGL-L eine ähnliche phänotypische Kompetenz zu erwarten. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nur die Überexpression von IGL-L die Bildung von filopodialen Zellfortsätzen induziert (siehe Abb.3.9). Bei der Überexpression von *Drosophila* IGLOO-L und IGLOO-S wurde eine homologe gegensätzliche Kompetenz beider Isoformen zur Filopodienbildung nachgewiesen (Kamprath, 2001). Da die cytoplasmatisch lokalisierte Variante IGL-S keine phänotypischen Veränderungen auslöst, muss für diesen Effekt der IGL-L-spezifische Aminoterminus verantwortlich sein. Dieser Bereich enthält zwei bekannte funktionelle Domänen: (1) eine zusätzliche Calmodulinbindedomäne, die keine Phosphorylierungsstelle besitzt (V-Modul), (2) eine Myristoylierungsstelle, deren Acylierung zur Membranassoziation des Proteins führt. Im Transfektionstest konnte gezeigt werden, dass bereits das N-terminale Peptid dIGLOO-L[1-10] ohne GAP-Modulsequenz die Filopodienbildung induziert (C. Kamprath, mündliche Mitteilung). Essentiell ist dabei die Assoziation des Peptides an die Membran, die durch die Mutation Gly2Ala/Cys3Ser verhindert werden konnte. Dieser Befund steht im Konsens zu GAP-43 Experimenten, in denen ebenfalls das aminoterminalen Proteinfragment GAP-43(1-10) das Wachstum von Zellfortsätzen auslöste (Strittmatter *et al.*, 1994). Durch die Arbeiten von Strittmatter *et al.* (1994) und Kamprath (2001, unveröffentlicht) wird eine essentielle Bedeutung der Calmodulinbindedomäne bei der Filopodienbildung sowohl bei GAP-43 als auch bei den IGL(OO)-Proteinen

ausgeschlossen. Allerdings wird dem GAP-Modul eine modulatorische Funktion zugesprochen, die sich abhängig vom Phosphorylierungszustand in der Anzahl und Länge der auswachsenden Zellfortsätze reflektiert (Widmer & Caroni, 1993). Als primäre Interaktionsdomäne für die Induktion von Filopodien wurde ein basisches Motiv am N-Terminus vorgeschlagen, welches G-Proteine aktiviert (Strittmatter *et al.*, 1990, 1991a, b, 1994; Aarts *et al.*, 1998). Eine Wechselwirkung zwischen G-Proteinen und GAP-43 erfolgt aber nur im nicht-palmitoylierten Zustand (Sudo *et al.*, 1992) und steht als Filopodien auslösender Mechanismus mit der dafür essentiellen Membranassoziation des Proteins im Widerspruch. Zudem enthält IGL-L keine entsprechende Konsensussequenz (RRXK). Deshalb wird ein Zusammenhang zwischen dem basischen Motiv von GAP-43 und der Veränderung der Zellmorphologie zusätzlich in Frage gestellt. Vielmehr deuten die Resultate der Transfektionsassays mit dIGLOO und pIGL darauf hin, dass die Filopodienbildung von IGL(OO)-L-überexprimierenden Zellen auf einer Akkumulation des Proteins am Zellkortex beruht. Dabei scheint neben der intrazellulären Lokalisation auch die Filopodienbildung auf der Fettsäureanker-basierenden Membranassoziation zu beruhen. Somit könnte die GAP-43 induzierte Filopodienbildung ebenfalls auf eine Konzentration von acyliertem Protein am Plasmalemma zurückzuführen sein. Gestützt wird diese Hypothese durch Experimente mit den ebenfalls acylierten und membranlokalisierten Proteinen CAP-23 (Zytoskelett-assoziiertes Protein) und MARCKS (myristoyliertes, alaninreiches Kinase C Substrate). Auch deren Überexpression führt in Fibroblasten zu einer GAP-43-homologen Filopodienbildung (Wiederkehr *et al.*, 1997; Frey *et al.*, 2000). Im Übrigen könnte das streng konservierte, basische Motiv von GAP-43 Bestandteil einer Palmitoylierungssequenz sein. Diese hier aufgeworfene Vermutung wird durch Strukturanalysen von palmitoylierten Proteinen, wie z.B. die G_{α} -Proteine G_q , G_{11} oder G_{12} , gestützt (Kosloff *et al.*, 2002). Deren N-Terminus trägt eine von basischen Aminosäuren geformte, positiv geladene Kappe, die an die negativ geladene Innenseite der Plasmamembran bindet. Im Gegensatz dazu tragen myristoylierte G_{α} -Proteine, wie z.B. G_0 , G_i oder G_z , N-terminal weniger positive, teilweise sogar saure Aminosäure-Reste (Kosloff *et al.*, 2002).

Unabhängig von der offenen Diskussion über die molekularen Grundlagen des GAP-43-induzierten Filopodienwachstums (Widmer & Caroni, 1993; Strittmatter *et al.*, 1994; Laux *et al.*, 2000) stellt dessen morphogenetische Kompetenz ein wesentliches Argument für die

postulierte Funktion als „Axonmacher“ dar. Trotz gleichartiger Effekte von überexprimiertem IGL-L schließt sich die vorliegende Arbeit dieser Argumentation jedoch nicht an. Im Gegensatz zu einer physiologischen Funktion wird vermutet, dass die Bildung der Zellfortsätzen als unspezifische Zellreaktion auf die Akkumulation von acyliertem IGL-L Protein an der Zellmembran erfolgt. In diesem Zusammenhang muss die Bewertung der Filopodien nicht-neuronaler Zellen als strukturelle und funktionelle Neurit- bzw. Axon-Homologa in Frage gestellt werden.

IGL-L-Expression im Nervensystem

Das temporäre Expressionsmuster von IGL-L wurde im ZNS der Schabe auf Einzelzellebene während der neuronalen Entwicklung eines protocerebralen Interneuronenpaares (PDS-Neurone) (Hänold, 2000) untersucht. Aufgrund der Länge und Morphologie des axonalen Zellfortsatzes sind diese Zellen als Modellneurone für Entwicklungs- und Regenerationsprozesse geeignet. Durch ihre Immunreaktivität gegenüber dem Neuropeptid Perisulfakinin, das strukturell mit dem Vertebraten-Neurotransmitter Cholezystokinin (CCK) verwandt ist, können sie individuell visualisiert werden. Grundlage für eine mögliche Kolo-kalisation zwischen IGL-L und PSK bildet der Befund, dass im Vertebraten-ZNS die Freisetzung von CCK durch GAP-43 induziert wird (Hens *et al.*, 1993; DeGraan *et al.*, 1994). Unerwartet zeigen PSK/IGL-L-Doppelfärbungen aller Entwicklungsstadien (40% Embryogenese bis Imaginalstadium), dass die PDS-Interneurone zu keinem Zeitpunkt ihrer neuronalen Genese das Protein IGL-L exprimieren (siehe Abb.3.19). Am Beispiel der PDS-Zellen weist die vorliegende Arbeit nach, dass axonales Wachstum bei *P.americana* nicht an die Expression von IGL-L gebunden ist. Das Protein stellt keine intrinsische Determinante der neuronalen Genese dar, deren Expression essentiell für die Entwicklung jedes Neurons ist.

Immuncytochemisch wurde gezeigt, dass IGL-L ein selektiv neuronal exprimiertes Protein ist (siehe Abb.3.15). Entgegen der IGL-L Immunnegativität der PDS-Neurone konnte in zahlreichen Arealen des Nervensystems eine intensive IGL-L Immunmarkierung detektiert werden. Anhand dieses Expressionsmuster kann die Bildung von IGL-L bestimmten Stadien der neuronalen Entwicklung zugeordnet werden. Unter Bezug auf die Resultate des Transfektionsassays wird nachfolgend erneut diskutiert, ob die physiologische Funktion des Proteins zumindest für Teile des neuronalen Zellpools in der Genese von Zellfortsätzen

besteht. Unter dieser Annahme ist eine Expression von IGL-L in frühen Phasen der Neurogenese, insbesondere während der Bildung von Neuriten, zu erwarten. Die Neuritogenese beginnt im ZNS der Amerikanischen Schabe bei 23,5% der Embryonalentwicklung (Denburg & Fülöp, 1982). Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wird jedoch noch keine IGL-L Immunreaktivität detektiert. Dieser Befund schließt eine Funktion von IGL-L in frühen Phasen der neuronalen Differenzierung, insbesondere für die Initiation der Neuritogenese, eindeutig aus.

Im weiteren Verlauf der Neurogenese erfolgt die Strukturierung der Neuropilbereiche, in denen die axonalen und dendritischen Endigungen in Kontakt treten und (synaptische) Verbindungen ausbilden. Im ventralen Bauchmark befinden sich diese Gebiete im Mark der Thorakal- und Abdominalganglien. Sie sind von den kortikal gelegenen neuronalen Somata anatomisch klar abgrenzbar. Im Neuropil wird die Synaptogenese, die eine stabile Verknüpfung des neuronalen Netzes einleitet, ab 47% der Embryogenese initiiert (Denburg & Fülöp, 1982). Der Nachweis einer ersten IGL-L Immunreaktivität erfolgt im Neuropil der Ganglien und trifft mit dem Beginn der Synaptogenese zusammen (siehe Abb.3.18). Mit der zunehmenden Ausbildung von synaptischen Verbindungen steigt die Expression von IGL-L intensiv an. Eine besonders markante Immunreaktivität wird am Ende der Embryonalentwicklung und in frühen Larvenstadien detektiert. Während der Embryogenese fällt eine Graduierung der IGL-L Immunreaktivität zwischen den thorakalen und abdominalen Ganglien auf. Dabei deutet die Intensitätsabnahme der Immunmarkierung nach posterior auf eine Differenzierung des ventralen Nervensystems entlang der Anterio-posterior-Achse hin. Dieser Befund steht im Konsens mit morphologischen Beobachtungen, bei denen eine graduelle Entwicklung des ZNS am Beispiel der Thorakalganglien-Segmentierung beschrieben wurde (Denburg & Fülöp, 1982).

Der immunocytochemisch detektierte Expressionsbeginn von *Periplaneta* IGL-L bestätigt das Resultat der Northern Blot-Detektion von *Drosophila igloo* (Neel & Young, 1994). In beiden Spezies erfolgt die Expression ab 50% Embryogenese und erreicht maximale Werte im letzten Drittel der Embryogenese. Anscheinend weisen die GAP-43-like Proteine in holometabolen (*Drosophila*) und hemimetabolen (*Periplaneta*) Insekten ein einheitliches Expressionsmuster auf.

An dieser Stelle soll nochmals auf die hohe Spezifität des Antiserums gegenüber dem Protein IGL-L von *Periplaneta americana* eingegangen werden, welches durch Immunisierung eines Kaninchens mit rekombinant hergestelltem pIGL-L[1-75] Peptid generiert wurde. Mit diesem Antiserum konnte im ZNS der Taufliege, *Drosophila melanogaster*, und des Heimchens, *Acheta domesticus*, keine Immunreaktivität detektiert werden. Innerhalb der Ordnung Blattodea (Schaben; Abb.4.3) zeigen neuronale Gewebepreparate der Blaberoidea *Blattella germanica* (Fam. Blattellidae; [2]) sowie *Leucophaea maderae* (Fam. Blaberidae; [3]) ebenfalls keine spezifische Immunmarkierung (siehe Abb.3.14). Eine *P.americana*-homologe IGL-L IR konnte nur bei Vertretern innerhalb der Familie Blattidae (*Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Blatta orientalis*; [1]) detektiert werden.

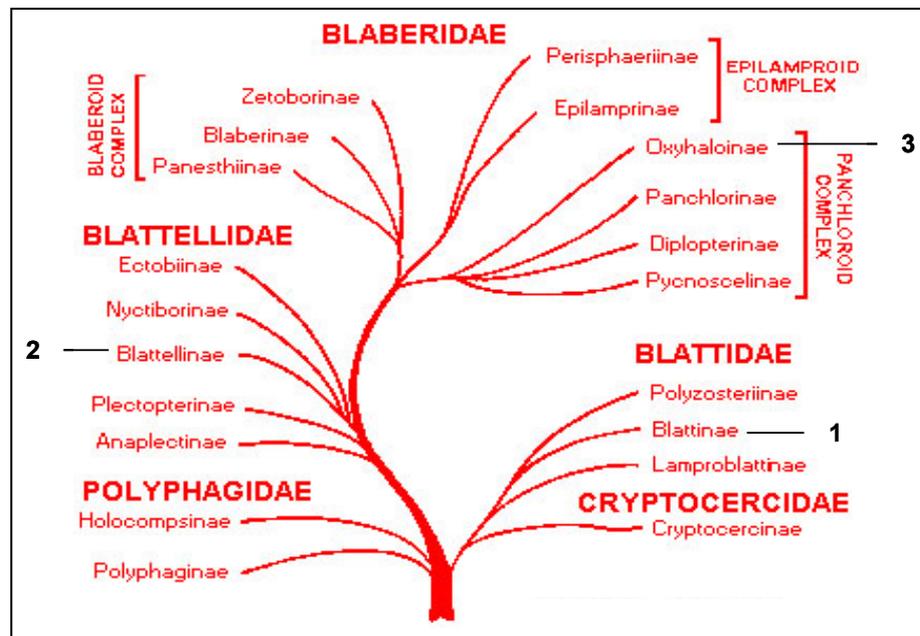


Abb.4.3: Phylogenetischer Stammbaum der Ordnung Blattodea (nach McKittrick, 1965).

Dieser Befund bestätigt das Ergebnis der Immunmarkierung von IGL-transfizierten CHO-Zellen (siehe Abb.3.13). Der Antikörper ist nicht gegen Epitope mit GAP-Modul-Sequenz gerichtet und erkennt demzufolge keine anderen Proteine mit einem entsprechenden Modul. Darüber hinaus wird die vermutete Variabilität der Invertebraten GAP-43-like Proteine außerhalb der konservierten GAP-Module sowie der Myristoylierungssequenz bestätigt. Diese Sequenzunterschiede wurden bereits durch den Proteinvergleich zwischen den IGL-Proteinen von *Drosophila* und *Periplaneta* deutlich (siehe Abb.3.8).

IGL-L und synaptische Stabilität

Im Gegensatz zum intensiv und homogen immunmarkierten Neuropil des Bauchmarks sowie des Unterschlundganglions zeigt das Gehirn, trotz einer weitaus höheren Zellzahl, nur eingeschränkte Areale mit IGL-L Immunreaktivität. Das markanteste Neuropilareal des Insektengehirns sind die Pilzkörper, deren Funktion in der Integration olfaktorischer Signale besteht. Ihr Neuropil bildet bei Insekten das neuronale Substrat für Lernen und Gedächtnis (Heisenberg *et al.*, 1985; Erber *et al.*, 1987; Menzel *et al.*, 1990), woraus sich die funktionelle Vergleichbarkeit zum Hippocampus des Vertebraten-Gehirns ableitet (Strausfeld *et al.*, 1998). Diese Analogie wird durch physiologische Studien und die Expression der *Drosophila* „Lerngene“ *dunce* und *rutabaga* gestützt (Nighorn *et al.*, 1991; Han *et al.*, 1992). Überraschend, und im Unterschied zur hippocampalen GAP-43 Expression, weist das Neuropil der Pilzkörper keine Immunreaktivität gegenüber IGL-L auf (siehe Abb.3.16). Dieser Befund schließt eine molekulare Beteiligung von IGL-L an Lernprozessen, und somit an synaptischer Plastizität, prinzipiell aus. Frei von IGL-L-IR stellen sich zudem die Neurohaemalorgane dar (siehe Abb.3.20/V). An diesen neuronalen Strukturen bilden die Axone keine Synapsen, sondern formen ein dichtes Fasernetzwerk, über das endokrin aktive Substanzen direkt in die Haemolymphe abgegeben werden. Mit dem Nachweis von IGL-L immunnegativen Axonterminalen an den Neurohaemalorganen kann eine mögliche Freisetzung des Proteins in die Hämolymphe ausgeschlossen werden. Die markante IGL-L Expression im ZNS dominiert in Bereichen, die als motorische oder sensorische Areale in Kontakt zur Körperperipherie stehen. Im Gehirn bezieht sich diese Feststellung auf die Immunmarkierung ascendierender Eingänge von den Antennen an den deutocerebralen Glomeruli. Dagegen sind im Unterschlundganglion, dem die komplexe Steuerung der Mundgliedmaßen obliegt, neben dem Neuropil zahlreiche kortikale Somata immunmarkiert. Ebenso wurde eine markante Immunreaktivität gegenüber IGL-L an den thorakalen Ganglien nachgewiesen, die in die Steuerung der Bein- und Flugmuskulatur involviert sind. Die Konzentration von IGL-L in senso-motorischen Arealen des ZNS wird von einer intensiven Immunreaktivität zahlreicher peripherer Nervenfasern begleitet. Dabei wurden IGL-L immunreaktive Nervenfasern am Darm sowie an bestimmten Muskeln identifiziert. Derzeit lässt sich noch kein Motiv für die selektive Verteilung des Proteins an den verschiedenen Muskelgruppen ableiten. Sowohl Skelettmuskulatur (z.B. Dorsoventralmuskulatur) als auch viszerale Muskulatur (z.B. Hyperneuralmuskel, Herzgefäß) wird

durch IGL-L immunreaktive Fasern innerviert, am Antennenherz wurde jedoch kein IGL-L detektiert (siehe Abb.3.20). Für die ausgedehnte Detektion des Proteins an den genannten Organen gilt ein Zusammenhang zwischen IGL-L-Expression und plastischen Eigenschaften der Nervenendigungen als unwahrscheinlich. Zwar ist bekannt, dass auch postnatal eine Reorganisation peripherer Nervenfasern, z.B. am Cercalnerv, erfolgen kann (Chiba *et al.*, 1988). Allerdings geht diese Plastizität bis zum Adultstadium verloren. Insbesondere für die präzise innervierte Beinmuskulatur der Schabe würde eine permanente Umstrukturierung der ausdifferenzierten neuromuskulären Kontakte im Widerspruch zum stereotypen und reflexartigen Verhalten stehen. Das Expressionsmuster von IGL-L deutet darauf hin, dass das Protein im Zusammenhang mit der Etablierung und Stabilisierung der synaptischen Signalübertragung steht. Ob dabei das Protein auf der prä- oder postsynaptischen Seite lokalisiert ist, konnte auf ultrastruktureller Ebene noch nicht eindeutig geklärt werden (siehe Abb.3.21). Aufgrund der pseudo-unipolaren Morphologie von Nervenzellen bei Invertebraten ist eine lichtmikroskopische Differenzierung neuritischer Zellfortsätze in axonale und dendritische Bereiche problematisch. Allerdings deuten verschiedene Beobachtungen auf eine GAP-43-homologe präsynaptische Konzentration von IGL-L hin. Dazu zählt insbesondere die Detektion des Proteins in proctolinergen, motorischen Nervenfasern. Die Endigungen dieser Zellfortsätze stellen präsynaptische Elemente dar. Die beobachtete Detektion von IGL-L Immunreaktivität schließt eine Kernlokalisierung des Proteins *in vivo* aus und steht im Konsens zur filopodialen und streng Nukleus-negativen Lokalisation in IGL-L überexprimierenden CHO-Zellen (siehe Abb.3.9).

Die anhaltend hohe Expression von IGL-L könnte auf systemischen Eigenschaften der Invertebraten-Nervensysteme basieren, die generell über eine geringe Kapazität für synaptisches Rearrangement verfügen. Im Gegensatz zu Vertebraten, deren Neurogenese gleichermaßen unter genetischer wie unter aktivitätsabhängiger Kontrolle steht, unterliegt bei Invertebraten dieser Prozess stärker einer genetischen Prädisposition (Easter *et al.*, 1985). Im Hinblick auf die geringere Anzahl von Neuronen kommt der Stabilisierung des neuronalen Netzwerkes bei Wirbellosen eine wichtige Bedeutung zu. Auf zellulärer Ebene könnte die umfangreiche Expression von IGL-L als Indiz für eine dauerhafte „Verdrahtung“ der Nervenzellen gelten.

IGL-L und GAP-43 – zwei funktionelle Homologa?

Von den Invertebraten GAP-43-like Proteinen IGL-L und IGL-S zeigt die Form IGL-L strukturelle Gemeinsamkeiten zum Vertebraten GAP-43 und gilt als Kandidat für ein funktionelles Homologon. Um diese Hypothese zu prüfen, werden zwei Parameter, die intrazelluläre Lokalisation und das Raum-zeitliche Expressionsmusters, verglichen. Bei einer Überexpression in Zellkultur lokalisiert dieses Protein, wie sein Vertebraten-Pendant (Aarts *et al.*, 1998), an der Zellmembran und induziert die Bildung von Filopodien. IGL-L zeigt, ebenso wie GAP-43 (Ramakers *et al.*, 1992), ein selektiv neuronales Expressionsmuster, das durch die immunocytochemische Markierung von Neuropilarealen gekennzeichnet ist. Gegenüber GAP-43 bestehen jedoch wesentliche Unterschiede im temporären sowie im lokalen Expressionsschema (Abb.4.4).

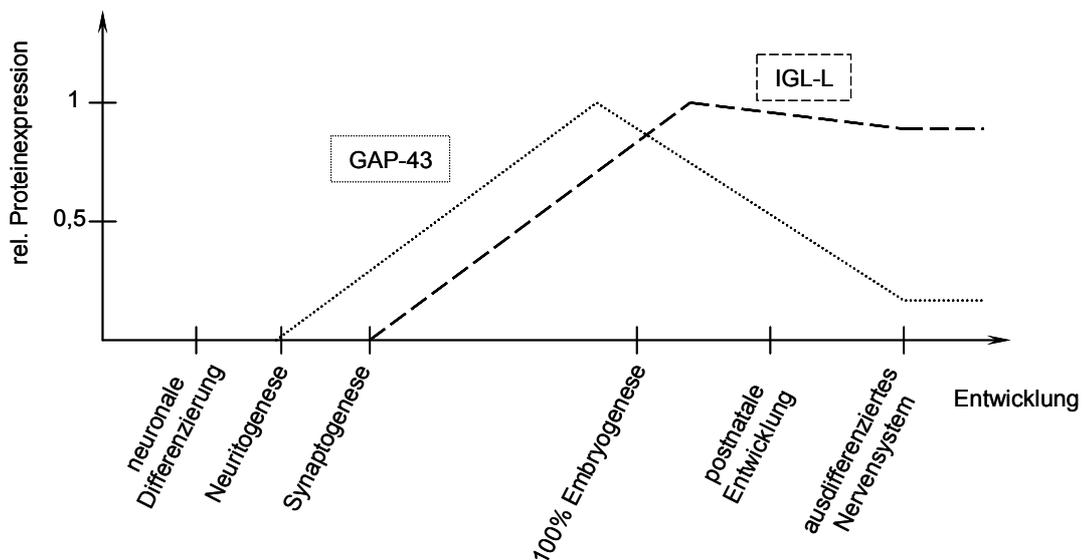


Abb.4.4: Schematische Darstellung der temporären Expression von IGL-L und GAP-43. Während die Bildung von GAP-43 mit der Initiation der Neurogenese einsetzt, korreliert der Expressionsbeginn von IGL-L mit der Synaptogenese. Nach der Etablierung des neuronalen Netzes sinkt die GAP-43-Konzentration in myelinisierten Arealen vollständig ab, persistiert aber auf hohem Niveau in plastischen Arealen und mittelmäßig in zahlreichen Gebieten des ZNS und PNS. Das IGL-L-Level bleibt postnatal im ZNS (u.a. nicht in den Pilzkörpern) und PNS auf hohem Niveau erhalten.

Diese Unterschiede schließen eine „Doppelfunktion“ von IGL-L bei der Axogenese und synaptischen Reorganisation, wie sie für GAP-43 diskutiert wird, aus. Auf molekularer Ebene könnte die Interaktion von IGL-L mit der präsynaptischen Signalmaschinerie Ähnlichkeit zur postulierten Einbindung von GAP-43 in den exocytotischen Apparat während der Langzeitpotenzierung besitzen (Routtenberg *et al.*, 2000) (Abb.4.5).

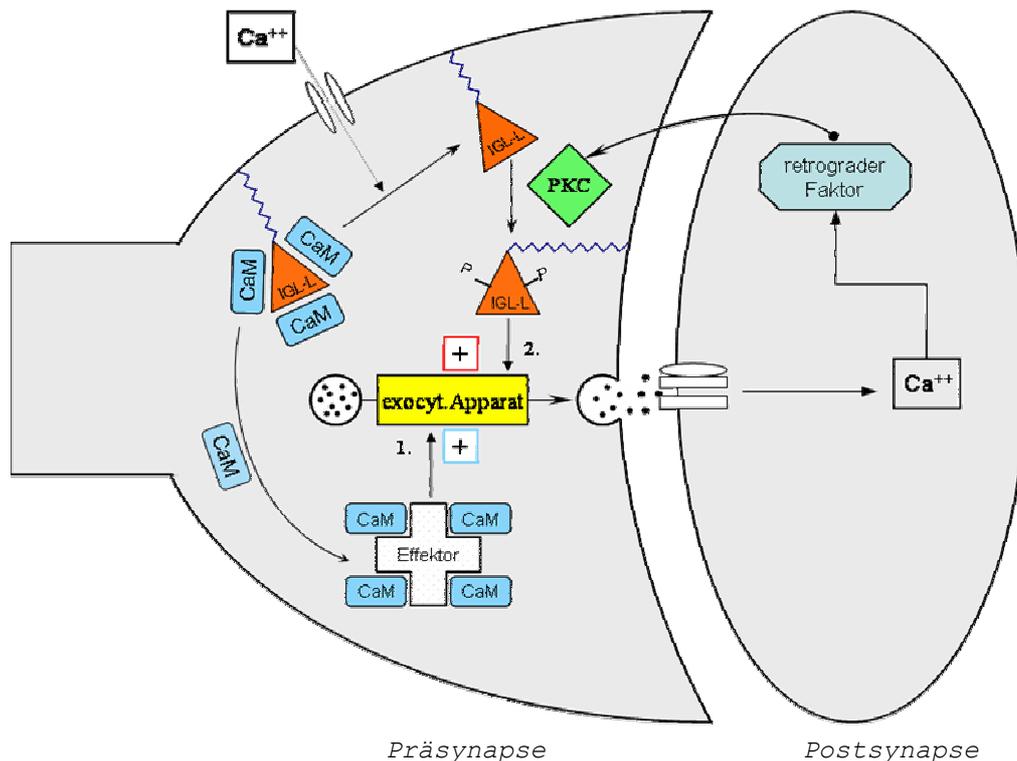


Abb.4.5: Modell zur Einbindung von IGL-L in die synaptische Signalübertragung. Bei einem Anstieg der intraterminalen Konzentration von Kalzium entlässt IGL-L Calmodulin, welches durch die Aktivierung präsynaptischer Effektoren die Freisetzung von Botenstoffen induziert (1.). Auf der postsynaptischen Seite könnte daraufhin ein retrograder Faktor gebildet werden, der die präsynaptisch lokalisierte Proteinkinase C aktiviert. Die Phosphorylierung von Calmodulin-freiem IGL-L an den GAP-Modulen würde als zusätzlicher Aktivator des exocytotischen Apparates wirken (2.) (nach Routtenberg *et al.*, 2000).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse muss hinterfragt werden, ob induziertes Filopodienwachstum bei nicht-neuronalen Zellen ein legitimes Argument darstellt, GAP-43 als „Axonmacher“ zu bewerten. Unter Berücksichtigung der Unterschiede zwischen dem Nervensystem von Vertebraten und Invertebraten unterstützt und erweitert die Charakterisierung von IGL-L die postulierte Funktion des growth-associated protein-43,

sowohl während der Etablierung von Lernprozessen als auch bei beständigen Synapsen die synaptische Signalübertragung zu konsolidieren. Dem entsprechend könnte die schwache, aber persistente GAP-43 Expression im enteralen Nervensystem (Sharkey *et al.*, 1990), an kardialen (McGuire *et al.*, 1988) und intramuskulären Nervenfasern (Hesselmans *et al.*, 1989) sowie in spinalen sensorischen und motorischen Nervenfasern (Linda *et al.*, 1992; Nacimiento *et al.*, 1993) nicht auf plastische Eigenschaften (Sharkey *et al.*, 1990; Nacimiento *et al.*, 1993; Kawasaki *et al.*, 2001), sondern auf eine dauerhafte Signalübertragung dieser Nervenendigungen zurückzuführen sein.

Zusammenfassung

Die Genese und Funktion von Nervensystemen ist mit der Expression von growth-associated proteins (GAPs) verbunden. Den Prototyp stellt das Protein GAP-43 dar, welches bei Vertebraten eine zentrale Rolle in der Axo- und/oder Synaptogenese einnimmt. Ziel meiner vorgelegten Arbeit war es, die Expression des GAP-43 homologen Proteins IGL-L während der Genese eines identifizierten Neuronenpaares im Zentralnervensystem der Amerikanischen Schabe, *Periplaneta americana*, zu untersuchen. Im Vorfeld dieser Studie wurden von *Periplaneta igl* zwei Transkriptionsprodukte, *igl-L* und *igl-S*, kloniert. Beide Varianten konnten in embryonalen und adulten Gewebeproben nachgewiesen werden. Das Protein IGL-L zeigt Sequenzhomologie zum Vertebratenprotein GAP-43. Die Homologie umfasst den Bereich von multiplen, putativen Proteinkinase C-regulierten Calmodulinbindedomänen (GAP-Module) sowie die Präsenz einer aminoterminalen Membranbindedomäne.

Die transiente Expression beider *igl*-Varianten in CHO-Zellen zeigt eine Membranassoziation von IGL-L sowie eine cytoplasmatische Lokalisation von IGL-S. Im Transfektionsassay mit nicht-neuronalen Zellen induziert ausschließlich die Variante IGL-L eine sphärische Zellform und die Bildung von Filopodien.

Ein polyklonaler Antikörper, der gegen rekombinant hergestelltes IGL-L[1-75] Peptid gerichtet ist, wurde in einem Kaninchen generiert. Er erkennt spezifisch die Isoform IGL-L bei Vertretern der Familie *Blattidae*. IGL-L ist durch eine exklusiv neuronale Expression im zentralen und peripheren Nervensystem charakterisiert.

Die Expression von IGL-L wurde während verschiedener Entwicklungsstadien eines identifizierten Neuronenpaares im ZNS der Schabe untersucht. Diese protozerebralen Sulfakinin-immunreaktiven Interneurone (PDS-Neurone) zeigen in allen Phasen der neuronalen Genese sowie beim läSIONSinduzierten Aussprossen keine IGL-L-Immunreaktivität.

IGL-L Immunreaktivität ist ab 50% Embryogenese in der ventralen Ganglienkettenkette detektierbar. Während der weiteren embryonalen Neurogenese (Synapsenbildung) sowie in frühen Larvalstadien tritt das Protein massiv im Neuropil der Ganglien auf, wo es elektronenmikroskopisch in einzelnen Nervenzell-Fortsätzen detektiert wird. Während der

Neurogenese existiert ein IGL-L-Expressionsgradient entlang der Anterio-posterior-Achse, der auf eine entsprechende Differenzierungsrichtung des Nervensystems hindeutet.

Das angelegte Expressionsmuster von IGL-L bleibt im Wesentlichen bis ins Imaginalstadium erhalten. Dazu gehören Neurone der Pars intercerebralis, die im Gehirn einen prominenten protocerebralen Trakt bilden, sowie die IGL-L IR dorsal-motorischer und ventral-sensorischer Ganglienbereiche. Im peripheren Nervensystem wird IGL-L an motorischen Nervenfasern detektiert und kolokalisiert teilweise mit dem Neuropeptid Proctolin. Der Nachweis in motorischen Nervenfasern deutet auf eine präsynaptische Lokalisation des Proteins hin. IGL-L-immunnegativ stellen sich synapsenfreie Areale wie die Neurohaemalorgane des Gehirns und der Thorakalganglien sowie Areale mit hoher synaptischer Plastizität wie die Pilzkörper dar.

Das Protein IGL-L zeigt aufgrund seiner Sequenzhomologie, der Lokalisation und Kompetenz zur Filopodienbildung in kultivierten Zellen sowie der selektiv neuronalen Expression Ähnlichkeiten zum Vertebratenprotein GAP-43. Das immuncytochemisch detektierte Expressionsmuster von IGL-L schließt eine Funktion des Invertebratenproteins in der frühen Neurogenese sowie während synaptischer Plastizität aus. Es deutet auf eine Funktion in der Etablierung und Stabilisierung der synaptischen Signalübertragung hin. Die Erkenntnisse über die IGL-Proteine bei Invertebraten unterstützen die Hypothese, nach der das Vertebratenprotein GAP-43 die synaptische Signalübertragung, insbesondere nach synaptischer Plastizität, stabilisiert.

Literatur

Aarts, L.H.J., Schrama, L.H., Hage, W.J., Bos, J.L., Gispen, W.H., P. Schotman (1998) B-50/GAP-43-induced formation of filopodia depends on Rho-GTPase. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1279-92.

Adams, M.D., Venter, J.C. *et. al.* (2000) The genomic sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**, 2185-95.

Agricola, H.J., P. Bräunig (1995) Comparative aspects of peptidergic signaling pathways in the nervous systems of arthropods. In: *The Nervous system of invertebrates: An evolutionary and comparative approach.*, Eds.: Breidbach, O., W. Kutsch, Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, 303-27.

Aigner, L., Arber, S., Kapfhammer, J.P., Laux, T., Schneider, C., Botteri, F., Brenner, H.-R., P. Caroni (1995) Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell*, **83**, 269-78.

Akers, R.F., A. Routtenberg (1985) Protein kinase C phosphorylates a 47 Mr protein (F1) directly related to synaptic plasticity. *Brain Res.*, **334**, 147-51.

Alexander, K.A., Cimler, B.M., Meier, K.E., D.R. Storm (1987) Regulation of Calmodulin binding to P-57. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6108-13.

Alexander, K.H., Wakim, B.T., Doyle, G.S., Walsh, K.A., D.R. Storm (1988) Identification and characterization of the calmodulin-binding domain of neuromodulin, a neurospecific calmodulin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7544-9.

Alonso, G., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H., A. Privat (1995) Immunolocalization of B-50 (GAP-43) in intact and lesioned neurohypophysis of adult rats. *Exp. Neurol.*, **131**, 93-107.

Aloyo, V.J., Zwiers, H., W.H. Gispen (1983) Phosphorylation of B-50 protein by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase and B-50 protein kinase. *J. Neurochem.*, **41**, 649-53.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., D.J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-10.

Andreasen, T.J., Luetje, C.W., Heideman, W., D.R. Storm (1983) Purification of a novel calmodulin binding protein from bovine cerebral cortex membranes. *Biochemistry*, **22**, 4615-8.

- Anglister, L., Farber, I.C., Shahar, A., A. Grinvald (1982) Localization of voltage-sensitive calcium channels along developing neurites: their possible role in regulating neurite elongation. *Dev. Biol.*, **94**, 351-65.
- Apel, E.D., D. Storm (1992) Functional domains of GAP-43. *Perspect. Dev. Neurobiol.*, **1**, 3-11.
- Baetge, E.E., J.P. Hammang (1991) Neurite outgrowth in PC 12 cells deficient in GAP-43. *Neuron*, **6**, 21-30.
- Bagri, A., M. Tessier-Lavigne (2002) Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **515**, 13-31.
- Baizer, L., Alkan, S., Stocker, K., G. Ciment (1990) Chicken growth-associated protein (GAP)-43: primary structure and regulated expression of mRNA during embryogenesis. *Molec. Brain Res.*, **7**, 61-8.
- Bandtlow, C.E., M.E. Schwab (2000) NI-35/250/nogo-a: a neurite growth inhibitor restricting structural plasticity and regeneration of nerve fibers in the adult vertebrate CNS. *Glia*, **29**, 175-81.
- Basi, G.S., Jacobson, R.D., Virag, I., Schilling, J., J.H.P. Skene (1987) Primary structure and transcriptional regulation of GAP-43, a protein associated with nerve growth. *Cell.*, **49**, 785-91.
- Benowitz, L.I., Perrone-Bizzozero, N.I., S.P. Finklestein (1987) Molecular properties of the growth-associated protein GAP-43 (B-50). *J. Neurochem.*, **48**, 1640-7.
- Benowitz, L.I., A. Routtenberg (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.*, **20**, 84-91.
- Bisby, M.A., W. Tetzlaff (1992) Changes in cytoskeletal protein synthesis following axon injury and during axon regeneration. *Mol. Neurobiol.*, **6**, 107-23.
- Bishop, C.A., M. O'Shea (1982) Neuropeptide proctolin (H-Arg-Try-Leu-Pro-Thr-OH): immunocytochemical mapping of neurons in the central nervous system of the cockroach. *J. Comp. Neurol.*, **207**, 223-38.
- Blehschmidt, K., Eckert, M., H. Penzlin (1990) Distribution of GABA-like immunoreactivity in the central nervous system of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *J. Chem. Neuroanat.*, **3**, 323-36.
- Bolsover, S.R., I. Spector (1986) Measurements of calcium transients in the soma, neurite, and growth cone of single cultured neurons. *J. Neurosci.*, **6**, 1934-40.

- Boulton, P.S. (1969) Degeneration and regeneration in the insect central nervous system.I.,II. *Z. Zellforsch.*, **101**, 98-134.
- Brose, K., Bland, K.S., Wang, K.H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M., T. Kidd (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*, **96**, 795-806.
- Brook, G.A., Schmitt, A.B., Nacimiento, W., Weis, J., Schröder, J.M., J. Noth (1998) Distribution of B-50 (GAP-43) mRNA and protein in the normal adult human spinal cord. *Acta Neuropathol.*, **95**, 378-86.
- Bunge, M.B. (2001) Bridging areas of injury in the spinal cord. *Neuroscientist*, **7**, 325-39.
- Campbell, G., Holt, J.K.L., Shotton, H.R., Anderson, P.N., Bavetta, S., A.R. Lieberman (1999) Spontaneous axonal regeneration after optic nerve injury in adult rat. *NeuroReport*, **10**, 3955-60.
- Caroni, P., M. Becker (1992) The downregulation of growth-associated proteins in motoneurons at the onset of synapse elimination is controlled by muscle activity and IGF1. *J. Neurosci.*, **12**, 3849-61.
- Caroni, P., M.E. Schwab (1988) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron*, **1**, 85-96.
- Chaisuksunt, V., Zhang, Y., Anderson, P.N., Campbell, G., Vaudano, E., Schachner, M., A.R. Liebermann (2000) Axonal regeneration from CNS neurons in the cerebellum and brainstem of adult rats: correlation with the patterns of expression and distribution of messenger RNAs for L1, CHL1, c-jun and growth-associated protein-43. *Neuroscience*, **100**, 87-108.
- Chiba, A., Shepherd, D., R.K. Murphey (1988) Synaptic rearrangement during postembryonic development in the cricket. *Science*, **240**, 901-5.
- Ching, Y.P., Averill, S., Wilkin, G.P., Wotherspoon, G., J.V. Priestley (1994) Serotonergic terminals express a growth associated protein (GAP-43) in the adult rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, **167**, 67-72.
- Chong, M.S., Fitzgerald, M., Winter, J., Hu-Tsai, M., Emson, P.C., Wiese, U., C.J. Woolf (1992) GAP-43 mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia neurons: Developmental changes and re-expression following peripheral nerve injury. *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 883-95.

- Cimler, B.M., Giebelhaus, D.H., Wakim, B.T., Storm, D.R., R.T. Moon (1987) Characterization of murine cDNAs encoding P-57, a neural-specific, calmodulin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **262**, 12158-63.
- Costello, B., Meymandi, A., J.A. Freeman (1990) Factors influencing GAP-43 gene expression in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Neurosci.*, **10**, 1398-406.
- Curtis, R., Averill, S., Priestley, J.V., G.P. Wilkin (1993) The distribution of GAP-43 in normal rat spinal cord. *J. Neurocytol.*, **22**, 39-50.
- Da Silva, J.S., C.G. Dotti (2002) Breaking the neuronal sphere: Regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nature*, **3**, 694-704.
- De Graan, P.N.E., Hens, J.J., W.H. Gispen (1994) Presynaptic PKC substrate B-50 (GAP-43) and neurotransmitter release: studies with permeated synaptosomes. *Neurotoxicology*, **15**, 41-7.
- De Graan, P.N.E., Moritz, A., De Wit, M., W.H. Gispen (1993) Purification of B-50 by 2-mercaptoethanol extraction from rat brain synaptosomal plasma membranes. *Neurochem. Res.*, **18**, 875-81.
- De Graan, P.N.E., Oestreicher, A.B., De Wit, M., Kroef, M., Schrama, L.H., W.H. Gispen (1990) Evidence for the binding of calmodulin to endogenous B-50 (GAP-43) in native synaptosomal plasma membranes. *J. Neurochem.*, **55**, 2139-41.
- De Graan, P.N.E., Van Hooff, C.O.M., Tilly, B.C., Oestreicher, A.B., Schotman, P., W.H. Gispen (1985) Phosphoprotein B-50 in nerve growth cones from fetal rat brain. *Neurosci. Lett.*, **61**, 235-41.
- De la Monte, S.M., Federoff, H.J., Ng, S.C., Grabczyk, E., M.C. Fishman (1989) GAP-43 gene expression during development: persistence in a distinctive set of neurons in the mature central nervous system. *Dev. Brain Res.*, **46**, 161-8.
- Dekker, L.V., De Graan, P.N.E., Oestreicher, A.B., Versteeg, D.H.G., W.H. Gispen (1989a) Inhibition of noradrenalin release by antibodies to B-50 (GAP-43). *Nature*, **342**, 7476.
- Dekker, L.V., De Graan, P.N.E., Versteeg, D.H.G., Oestreicher, A.B., W.H. Gispen (1989b) Phosphorylation of B-50 (GAP-43) is correlated with neurotransmitter release in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.*, **52**, 24-30.
- Deloulme, J.C., Prichard, L., Delattre, O., D.R. Storm (1997) The proto-oncoprotein EWS binds calmodulin and is phosphorylated by protein kinase C through an IQ domain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27369-77.

- Denburg, J.L., Z. Fülöp (1982) Formation of the leg neuromuscular system in embryos of the cockroach, *Periplaneta americana*: I. Light microscope studies. *J. Exp. Zool.*, **219**, 323-38.
- Dent, E.W., K.F. Meiri (1998) Distribution of phosphorylated GAP-43 (neuromodulin) in growth cones directly reflects growth cone behavior. *J. Neurobiol.*, **35**, 287-99.
- Donovan, S.L., L.A. Mamounas, A.M. Andrews, M.E. Blue, J.S. McCasland (2002) GAP-43 is critical for normal development of the serotonergic innervation of the forebrain. *J. Neurosci.*, **22**, 3543-52.
- Eckert, M., Agricola, H., H. Penzlin (1981) Immunocytochemical identification of proctolinlike immunoreactivity in the terminal ganglion and hindgut of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res.*, **217**, 633-45.
- Ehrlich, Y.H., A. Routtenberg (1974) Cyclic AMP regulates phosphorylation of three protein components of rat cerebral cortex membranes for thirty minutes. *FEBS Lett.*, **45**, 237-43.
- El-Husseini, A.E., Craven, S.E., Brock, S.C., D.S. Bredt (2001) Polarized targeting of peripheral membrane proteins in neurons. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44984-92.
- Erber, J., Homberg, U., W. Gronenberg (1987) The functional roles of the mushroom bodies in insects. In: *Arthropod Brain: Its evolution, development and functions.*, Ed.: A.P. Gupta, Wiley, New York, 485-511.
- Easter, S.S. Jr, Purves, D., Rakic, P., N.C. Spitzer (1985) The changing view of neural specificity. *Science*, **230**, 507-11.
- Fagnou, D.D., J.M. Toucek (1995) The biochemistry of learning and memory. *Mol. Cell. Biochem.*, **149/150**, 279-86.
- Fernandes, K.J., Fan, D.P., Tsui, B.J., Cassar, S.L., W. Tetzlaff (1999) Influence of the axotomy to cell body distance in rat rubrospinal and spinal motoneurons: differential regulation of GAP-43, tubulins, and neurofilament-M. *J. Comp. Neurol.*, **414**, 495-510.
- Fernandes, K.J.L., W. Tetzlaff (2000) Gene expression in axotomized neurons: identifying the intrinsic determinants of axonal growth. In: *Axonal regeneration in the central nervous system.*, Eds.: Ingoglia, N.A, M. Murray, Marcel Dekker Inc., New York, 219-66.
- Fishman, M.C. (1996) GAP-43: putting constraints on neuronal plasticity. *Perspect. Dev. Neurobiol.*, **4**, 193-8.

- Fitzgerald, M., Reynolds, M.L., L.I. Benowitz (1991) GAP-43 expression in the developing rat lumbar spinal cord. *Neuroscience*, **41**, 187-99.
- Fourtner, C.R., C.J. Kaars (1990) Anatomy of the central nervous system and its usefulness as a model for neurobiology. Cockroaches as models for neurobiology. *Applications in Biomedical Research*, **1**, 65-87.
- Frey, D., Laux, T., Xu, L., Schneider, C., P. Caroni (2000) Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity. *J. Cell Biol.*, **149**, 1443-53.
- Gamby, C., Waage, M.C., Allen, R.G., L. Baizer (1996) Analysis of the role of calmodulin binding and sequestration in neuromodulin (GAP-43) function. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26698-705.
- Gianotti, C., Nunzi, M.G., Gispen, W.H., R. Corradetti (1992) Phosphorylation of the presynaptic protein B-50 (GAP-43) is increased during electrically induced long-term potentiation. *Neuron*, **8**, 843-8.
- Gispen, W.H., Leunissen, J.L.M., Oestreicher, A.B., Verkleij, A.J., H. Zwiers (1985) Presynaptic localization of B-50 phosphoprotein: The (ACTH)-sensitive protein kinase C substrate involved in rat brain polyphosphoinositide metabolism. *Brain Res.*, **328**, 381-5.
- Goslin, K., Schreyer, D.J., Skene, J.H.P., G. Banker (1988) Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature*, **336**, 672-4.
- Goslin, K., Schreyer, D.J., Skene, J.H.P., G. Banker (1990) Changes in the distribution of GAP-43 during the development of neuronal polarity. *J. Neurosci.*, **10**, 588-602.
- Gu, X.N., N.C. Spitzer (1997) Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev. Neurosci.*, **19**, 33-41.
- Hänold, R. (2000) Neurogenese und Axogenese embryonaler und axotomierter identifizierter Interneurone. Diplomarbeit; Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Hänold, R., H.-J. Agricola (2000) Neurogenesis and axogenesis of embryonic and ventral cord injured identified cockroach interneurons. *Zoology*, **103**, Suppl.III, 6.
- Hänold, R. H.-J. Agricola (2001) Neurogenesis and axogenesis of protocerebral descending sulfakinin immunoreactive interneurons (PDS-interneurons) of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Abstract Book*, Central European Conference of Neurobiology, 11th-15th August 2001, Kraków, Poland.

Hänold, R., Schönherr, R., Hansel, A., Heinemann, S.H., H.-J. Agricola (2003) Immunocytochemical localization of IGL, a new GAP-43 like gene product in different developmental stages of the American cockroach. In: *The Neurosciences from Basic Research to Therapy*. Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference and the 5th Meeting of the German Neuroscience Society 2003. Eds.: Elsner, N., H. Zimmermann, Thieme Verlag, Stuttgart, 931.

Han, P.-L., Levin, L.R., Reed, R.R., R.L. Davis (1992) Preferential expression of the *Drosophila rutabaga* gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron*, **9**, 619-27.

Harding, D.I., Greensmith, L., Mason, M., Anderson, P.N., G. Vrbová (1999) Overexpression of GAP-43 induces prolonged sprouting and causes death of adult motoneurons. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 2237-42.

Hassiotis, M., Ashwell, K.W.S., Marotte, L.R., Lensing-Höhn, S., J.K. Mai (2002) GAP-43 immunoreactivity in the brain of the developing and adult wallaby (*Macropus eugenii*). *Anat. Embryol.*, **206**, 97-118.

Hayashi, N., Matsubara, M., Titani, K., H. Taniguchi (1997) Circular dichroism and ¹H nuclear magnetic resonance studies on the solution and membrane structures of GAP-43 calmodulin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7639-45.

He, Q., Dent, E.W., K.F. Meiri (1997) Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J. Neurosci.*, **17**, 3515-35.

Heidemann, S.R. (1996) Cytoplasmic mechanisms of axonal and dendritic growth in neurons. *Int. Rev. Cytol.*, **165**, 235-96.

Hens, J.J.H., De Wit, M., Boomsma, F., Mercken, M., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H., P.N. De Graan (1995) N-terminal specific anti-B-50 (GAP-43) antibodies inhibit Ca(2+)-induced noradrenalin release, B-50 phosphorylation and dephosphorylation, and calmodulin binding. *J. Neurochem.*, **64**, 1127-36.

Hens, J.J.H., Ghijsen, W.E.J.M., Dimjati, W., Wiegant, V.M., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H., P.N.E. De Graan (1993) Evidence for a role of protein kinase C substrate B-50 (GAP-43) in Ca²⁺ - induced neuropeptide cholecystokinin-8 release from permeated synaptosomes. *J. Neurochem.*, **61**, 602-9.

Heisenberg, M., Borst, A., Wagner, S., D. Byers (1985) *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J. Neurogenet.*, **2**, 1-30.

- Hertel, W., H. Penzlin (1992) Function and modulation of the antennal heart of *Periplaneta americana* (L.). *Acta Biol. Hung.*, **43**, 113-25.
- Hesselmans, L.F., Jennekens, F.G., van den Oord, C.J., Oestreicher, A.B., Veldman, H., W.H. Gispen (1989) A light and electron microscopical study of B-50 (GAP-43) in human intramuscular nerve and neuromuscular junctions during development. *J. Neurol. Sci.*, **89**, 301-11.
- Himanen, J.P., D.B. Nikolov (2003) Eph signaling: a structural view. *Trends Neurosci.*, **26**, 46-51.
- Houwing, H., Van Asperen, R.M., Van der Zee, E.A., Van Suylichem, P.T.R., Oestreicher, A.B., Steffens, A.B., J.H. Strubbe (1996) Noradrenergic and cholinergic reinnervation of islet grafts in diabetic rats. *Cell Transplant.*, **5**, 21-30.
- Hulo, S., Alberi, S., Laux, T., Muller, D., P. Caroni (2002) A point mutant of GAP-43 induces enhanced short-term and long-term hippocampal plasticity. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 1976-82.
- Jap Tjoen San, E.R.A., Schmidt-Michels, M., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H., P. Schotman (1992) Inhibition of nerve growth factor-induced B-50/GAP-43 expression by antisense oligomers interferes with neurite outgrowth of PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **187**, 839-46.
- Kamprath, K. (2001) Klonierung von GAP-43 Homologen und deren Einfluß auf die Morphologie von Nervenzellen. Diplomarbeit; Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Kanazir, S., Ruzdijic, S., Vukosavic, S., Ivkovic, S., Milosevic, A., Zecevic, N., L. Rakic (1996) GAP-43 mRNA expression in early development of human nervous system. *Mol. Brain Res.*, **38**, 145-55.
- Kapfhammer, J.P. (1997) Axon sprouting in the spinal cord: growth promoting and growth inhibitory mechanisms. *Anat. Embryol.*, **196**, 417-26.
- Kapfhammer, J.P., Christ, F., M.E. Schwab (1994) The expression of GAP-43 and synaptophysin in the developing rat retina. *Dev. Brain Res.*, **80**, 251-60.
- Kapfhammer, J.P., M.E. Schwab (1994a) Increased expression of the growth-associated protein GAP-43 in the myelin-free rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, **6**, 403-11.
- Kapfhammer, J.P., M.E. Schwab (1994b) Inverse patterns of myelination and GAP-43 expression in the adult CNS: neurite growth inhibitors as regulators of neuronal plasticity?. *J. Comp. Neurol.*, **340**, 194-206.

- Karimi-Abdolrezaee, S., Verge, V.M., D.J. Schreyer (2002) Developmental down-regulation of GAP-43 expression and timing of target contact in rat corticospinal neurons. *Exp. Neurol.*, **176**, 390-401.
- Kawasaki, T., Nishio, T., Kawaguchi, S., H. Kurosawa (2001) Spatiotemporal distribution of GAP-43 in the developing rat spinal cord: a histological and quantitative immunofluorescence study. *Neurosci. Res.*, **39**, 347-58.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bruns, G.A., Benowitz, L.I., MacDonald, G.P., Cox, D.R., R.L. Neve (1988) Human GAP-43: its deduced amino acid sequence and chromosomal localization in mouse and human. *Neuron*, **1**, 127-32.
- Kosloff, M., Elia, N., Z. Selinger (2002) Structural homology discloses a bifunctional structural motif at the N-termini of G alpha proteins. *Biochemistry*, **41**, 14518-23.
- Kruger, L., Bendotti, C., Rivolta, R., R. Samanin (1993) Distribution of GAP-43 mRNA in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.*, **333**, 417-34.
- Kumagai-Tohda, C., Tohda, M., Y. Nomura (1993) Increase in neurite formation and acetylcholine release by transfection of growth-associated protein-43 cDNA into NG108-15 cells. *J. Neurochem.*, **61**, 526-32.
- Kwon, B.K., Liu, J., Messerer, C., Kobayashi, N.R., McGraw J., L. Oschipok (2002) Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury. *PNAS*, **99**, 3246-51.
- LaBate, M.E., J.H. Skene (1989) Selective conservation of GAP-43 structure in vertebrate evolution. *Neuron*, **3**, 299-310.
- Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., P. Caroni (2000) GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J. Cell Biol.*, **149**, 1455-71.
- Legg, A.T., T.P. O'Connor (2003) Gradients and growth cone guidance of grasshopper neurons. *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 445-54.
- Li, J.-Y., A.B. Dahlström (1993) Distribution of GAP-43 in relation to CGRP and synaptic vesicle markers in rat skeletal muscles during development. *Dev. Brain Res.*, **74**, 269-82.
- Liang, X., Lu, Y., Neubert, T.A., M.D. Resh (2002) Mass spectrometric analysis of GAP-43/neuromodulin reveals the presence of a variety of fatty acylated species. *J. Biol. Chem.*, **277**, 33032-40.

- Linda, H., Piehl, F., Dagerlind, A., Verge, V.M.K., Arvidsson, U., Cullheim, S., Risling, M., Ulfhake, B., T. Hökfeld (1992) Expression of GAP-43 mRNA in the adult mammalian spinal cord under normal conditions and after different types of lesions, with specific references to motoneurons. *Exp. Brain Res.*, **91**, 284-95.
- Liu, Y., Fisher, D.A., D.R. Storm (1993) Analysis of the palmitoylation and membrane targeting domain of neuromodulin (GAP-43) by site-specific mutagenesis. *Biochemistry*, **32**, 10714-9.
- Liu, Y.C, D.R. Storm (1990) Regulation of free calmodulin levels by neuromodulin: neuron growth and regeneration. *Trends Pharmac. Sci.*, **11**, 107-11.
- Lovinger, D.M., Colley, P.A., Akers, R.F., Nelson, R.B., A. Routtenberg (1986) Direct relation of long-term synaptic potentiation to phosphorylation of membrane protein F1, a substrate for membrane protein kinase C. *Brain Res.*, **399**, 205-11.
- Manitt, C., T.E. Kennedy (2002) Where the rubber meets the road: netrin expression and function in developing and adult nervous systems. *Prog. Brain Res.*, **137**, 425-42.
- Marchler-Bauer, A., Panchenko, A.R., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Geer, L.Y., S.H. Bryant (2002) CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 281-3.
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B., F. Eisenhaber (2002) N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, **317**, 523-40.
- McGuire, C.B., Snipes, G.J., J.J. Norden (1988) Light-microscopic immunolocalization of the growth- and plasticity-associated protein GAP-43 in the developing rat brain. *Brain Res.*, **469**, 277-91.
- McKinney, M.M., A. Parkinson (1987) A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Meth.*, **96**, 271-8.
- McKittrick, F.A., M.J. Mackerras (1965) Phyletic relationships within the Blattidae. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **58**, 224-30.
- McLaughlin, T., Hindges, R., D.D. O'Leary (2003) Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **13**, 57-69.
- Meiri, K.F., P.R. Gordon-Weeks (1990) GAP-43 in growth cones is associated with areas of membrane that are tightly bound to substrate and is a component of a membrane skeleton subcellular fraction. *J. Neurosci.*, **10**, 256-66.

- Meiri, K.F., Pfenninger, K.H., M.B. Willard (1986) Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3537-41.
- Meiri, K.F., Saffell, J.L., Walsh, F.S., P. Doherty (1998) Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J. Neurosci.*, **18**, 10429-37.
- Menzel, R., Wittstock, S., M. Sugawa (1990) Chemical coding of learning and memory in honey bees. In: *The biology of memory.*, Eds.: Squire, L.R., E. Ludenlaub., Schattauer, Stuttgart, 335-59.
- Merkler, D., Metz, G.A., Raineteau, O., Dietz, V., Schwab, M.E., K. Fouad (2001) Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J. Neurosci.*, **21**, 3665-73.
- Moss, D.J., Fernyhough, P., Chapman, K., Baizer, L., Bray, D., T. Allsopp (1990) Chicken growth-associated protein GAP-43 is tightly bound to the actin-rich neuronal membrane skeleton. *J. Neurochem.*, **54**, 729-36.
- Nachman, R.J., Holman, G.M., Haddon, W.F., N. Ling (1986) Leukosulfakinin, a sulfated insect neuropeptide with homology to gastrin and cholecystokinin. *Science*, **234**, 71-3.
- Nacimiento, W., Topper, R., Fischer, A., Oestreicher, A.B., Nacimiento, A.C., Gispén, W.H., Noth, J., G.W. Kreutzberg (1993) Immunocytochemistry of B-50 (GAP-43) in the spinal cord and in dorsal root ganglia of the adult cat. *J. Neurocytol.*, **22**, 413-24.
- Neel, V.A., M.W. Young (1994) *igloo*, a GAP-43-related gene expressed in the developing nervous system of *Drosophila*. *Development*, **120**, 2235-43.
- Nelson, R.B., A. Routtenberg (1985) Characterization of protein F1 (47 kDa, 4.5 pI): A kinase C substrate directly related to neural plasticity. *Exp. Neurol.*, **89**, 213-24.
- Ng, S.C., De la Monte, S.M., Conboy, G.L., Karns, L.R., M.C. Fishman (1988) Cloning of human GAP-43: growth association and ischemic resurgence. *Neuron*, **1**, 133-9.
- Nielander, H.B., Schrama, L.H., Van Rozen, A.J., Kasperaitis, M., Oestreicher, A.B., De Graan, P.N.E., Gispén, W.H., P. Schotman (1987) Primary structure of the neuron-specific phosphoprotein B-50 is identical to growth-associated protein GAP-43. *Neurosci. Res. Commun.*, **1**, 163-72.

- Nighorn, A., Healy, M.J., R.L. Davis (1991) The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron*, **6**, 455-67.
- Oestreicher, A.B., De Graan, P.N.E., Gispen, W.H., Verhaagen, J., L.H. Schrama (1997) B-50, the growth associated protein-43: Modulation of cell morphology and communication in the nervous system. *Prog. Neurobio.*, **53**, 627-86.
- Plunet, W., Kwon, B.K., W. Tetzlaff (2002) Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy. *J. Neurosci. Res.*, **68**, 1-6.
- Püschel, A.W. (1996) The semaphorins: a family of axonal guidance molecules? *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 1317-21.
- Ramakers, G.M.J., De Graan, P.N., Urban, I.J., Kraay, D., Tang, T., Pasinelli, P., Oestreicher, A.B., W.H. Gispen (1995) Temporal differences in the phosphorylation state of pre- and postsynaptic protein kinase C substrates B-50/GAP-43 and neurogranin during long term potentiation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13892-8.
- Ramakers, G.M.J., McNamara, R.K., Lenox, R.H., P.N. De Graan (1999) Differential changes in the phosphorylation of the protein kinase C substrates myristoylated alanine-rich C kinase substrate and growth-associated protein-43/B-50 following Schaffer collateral long-term potentiation and long-term depression. *J. Neurochem.*, **73**, 2175-83.
- Ramakers, G.M.J., Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Margolis, F.L., van Bergen en Henegouwen, P.M., W.H. Gispen (1992) Immunolocalization of B-50 (GAP-43) in the mouse olfactory bulb: predominant presence in preterminal axons. *J. Neurocytol.*, **21**, 853-69.
- Regier, J.C., J.W. Shultz (1997) Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. *Mol. Biol. Evol.*, **14**, 902-13.
- Reichardt, L.F., K.J. Tomaselli (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 531-70.
- Reh, T.A., Tetzlaff, W., Ertlmaier, A., H. Zwiers (1993) Developmental study of the expression of B50/GAP-43 in rat retina. *J. Neurobiol.*, **24**, 949-58.
- Reynolds, M.L., Fitzgerald, M., L.I. Benowitz (1991) GAP-43 expression in developing cutaneous and muscle nerves in the rat hindlimb. *Neuroscience*, **41**, 201-11.

- Rhoads, A.R., F. Friedberg (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.*, **11**, 331-40.
- Rosenthal, A., Chan, S.Y., Henzel, W., Haskell, C., Kuang, W.-J., Chen, J.N., Wilcox, A., Ullrich, D.V., Goeddel, E., A. Routtenberg (1987) Primary structure and mRNA localization of protein F1, a growth-related protein kinase C substrate associated with synaptic plasticity. *EMBO J.*, **6**, 3641-6.
- Routtenberg, A., Cantalops, I., Zaffuto, S., Serrano, P., U. Namgung (2000) Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *PNAS*, **97**, 7657-62.
- Schmid, R.S., E.S. Anton (2003) Role of integrins in the development of the cerebral cortex. *Cereb. Cortex*, **13**, 219-24.
- Schotmann, P., Nielander, H.B., Van Rozen, A.J., Frankena, H., Schrama, L.H., W.H. Gispen (1989) Microheterogeneity of the growth-associated neuronal protein B-50 (GAP-43). Contribution of phosphorylation by protein kinase C. *J. Chromatogr.*, **483**, 301-9.
- Schwab, M.E. (2002) Repairing the injured spinal cord. *Science*, **295**, 1029-31.
- Schwab, M.E., D. Bartholdi (1996) Degeneration and Regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol. Rev.*, **76**, 319-70.
- Schwab, M.E., P. Caroni (1988) Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading *in vitro*. *J. Neurosci.*, **8**, 2381-93.
- Schwab, M.E., Kapfhammer, J.P., C.E. Bandtlow (1993) Inhibitors of neurite growth. *A. Rev. Neurosci.*, **16**, 565-95.
- Shain, D.H., Haile, D.T., Verrastro, T.A., M.X. Zuber (1995) Cloning and embryonic expression of *Xenopus laevis* GAP-43 (XGAP-43). *Brain Res.*, **697**, 241-6.
- Sharkey, K.A., Coggins, P.J., Tetzlaff, W., Zwiers, H., Bisby, M.A., J.S. Davison (1990) Distribution of growth-associated protein, B-50 (GAP-43) in the mammalian enteric nervous system. *Neuroscience*, **38**, 13-20.
- Shea, T.B. (1994) Delivery of Anti-GAP-43 antibodies into neuroblastoma cells reduces growth cone size. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **203**, 459-64.
- Shea, T.B., L.I. Benowitz (1995) Inhibition of neurite outgrowth following intracellular delivery of anti-GAP-43 antibodies depends upon culture conditions and method of neurite induction. *J. Neurosci. Res.*, **41**, 347-54.

- Shen, Y., S. Mani, S.L. Donovan, J.E. Schwob, K.F. Meiri (2002) Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J. Neurosci.*, **22**, 239-47.
- Skene, J.H.P. (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annu. Rev. Neurosci.*, **12**, 127-56.
- Skene, J.H.P., Jacobson, R.D., Snipes, G.J., McGuire, C.B., Norden, J.J., J.A. Freeman (1986) A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth cone membranes. *Science*, **233**, 783-6.
- Skene, J.H.P., I. Virag (1989) Post-translational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *J. Cell Biol.*, **108**, 613-24.
- Skene, J.H.P., M. Willard (1981) Axonally transported proteins associated with axon growth in rabbit central and peripheral nervous systems. *J. Cell Biol.*, **89**, 96-103.
- Sperry, R.W. (1963) Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **50**, 703-19.
- Spitzer, N.C. (1991) A developmental handshake: neuronal control of ionic currents and their control of neuronal differentiation. *J. Neurobiol.*, **22**, 659-73.
- Sretavan, D.W., K. Kruger (1998) Randomized retinal ganglion cell axon routing at the optic chiasm of GAP-43-deficient mice: Association with midline recrossing and lack of normal ipsilateral axon turning. *J. Neurosci.*, **18**, 10502-13.
- Stangier, J., Hilbich, C., R. Keller (1989) Occurrence of crustacean cardioactive peptide (CCAP) in the nervous system of an insect, *Locusta migratoria*. *J. Comp. Physiol.*, **159**, 5-11.
- Stewart, H.J., Cowen, T., Curtis, R., Wilkin, G.P., Mirsky, R., K.R. Jessen (1992) GAP-43 immunoreactivity is widespread in the autonomic neurons and sensory neurons of the rat. *Neuroscience*, **47**, 673-84.
- Strausfeld, N.J., Hansen, L., Li, Y., Gomez, R.S., K. Ito (1998) Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn. Mem.*, **5**, 11-37.
- Strittmatter, S.M., Fankhauser, C., Huang, P.L., Mashimo, H., M.C. Fishman (1995) Neuronal pathfinding is abnormal in mice lacking the neuronal growth cone protein GAP-43. *Cell*, **80**, 445-52.

- Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., M.C. Fishman (1994) An amino-terminal domain of the growth-associated protein GAP-43 mediates its effects on filopodial formation and cell spreading. *J. Cell Sci.*, **107**, 195-204.
- Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Kennedy, T.E., Neer, E.J., M.C. Fishman (1990) G₀ is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature*, **344**, 836-41.
- Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Sudo, Y., Lindner, M.E., M.C. Fishman (1991a) An intracellular guanine release protein for G₀. GAP-43 stimulates isolated alpha subunits by a novel mechanism. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22465-71.
- Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Vartanian, T., Sudo, Y., Zuber, M.X., M.C. Fishman (1991b) Growth cone transduction: G₀ and GAP-43. *J. Cell. Sci. Suppl.*, **15**, 27-33.
- Strittmatter, S.M., Vartanian, T., M.C. Fishman (1992) GAP-43 as a plasticity protein in neuronal form and repair. *J. Neurobiol.*, **23**, 507-20.
- Sudo, Y., Valenzuela, D., Beck-Sickinger, A.G., Fishman, M.C., S.M. Strittmatter (1992) Palmitoylation alters protein activity: blockade of G(o) stimulation by GAP-43. *EMBO J.*, **11**, 2095-2102.
- Tetzlaff, W., Alexander, S.W., Miller, F.D., M.A. Bisby (1991) Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: Changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. *J. Neurosci.*, **11**, 2528-44.
- Thallmair, M. (1999) ... und sie wachsen doch! Nervenwachstum nach ZNS-Verletzungen. *Neuroforum*, **1**, 16-22.
- Ude, J., H.J. Agricola (1995) FMRFamide-like and allatostatin-like immunoreactivity in the lateral heart nerve of *Periplaneta americana*: colocalization at the electron-microscopic level. *Cell Tissue Res.*, **282**, 69-80.
- Van Hooff, C.O.M., Oestreicher, A.B., DeGraan, P.N.E., W.H. Gispen (1989) Role of the growth cone in neuronal differentiation. *Mol. Neurobiol.*, **3**, 101-33.
- Van Lookeren Campagne, M., Oestreicher, A.B., Buma, P., Verkleij, A.J., W.H. Gispen (1991a) Ultrastructural localization of adrenocorticotrophic hormone and the phosphoprotein B-50/growth-associated protein 43 in freeze-substituted, lowicryl HM20-embedded mesencephalic central gray substance of the rat. *Neuroscience*, **42**, 517-29.

- Van Lookeren Campagne, M., Oestreicher, A.B., Van der Krift, T.P., Gispen, W.H., A.J. Verkleij (1991b) Freeze-substitution and Lowicryl HM20 embedding of fixed rat brain: suitability for immunogold ultrastructural localization of neural antigens. *Neuroscience*, **42**, 517-29.
- Veenstra, J.A. (1989) Isolation and structure of two gastrin/CCK-like neuropeptides from the American cockroach homologous to the leucosulfakinins. *Neuropeptides*, **14**, 145-9.
- Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Edwards, P.M., Veldman, H., Jennekens, F.G., W.H. Gispen (1988) Light- and electron-microscopical study of phosphoprotein B-50 following denervation and reinnervation of the rat soleus muscle. *J. Neurosci.*, **8**, 1759-66.
- Verkade, P., Schrama, L.H., Verkleij, A.J., Gispen, W.H., A.B. Oestreicher (1997) Ultrastructural co-localization of calmodulin and B-50/growth-associated protein-43 at the plasma membrane of proximal unmyelinated axon shafts studied in the model of regenerating rat sciatic nerve. *Neuroscience*, **79**, 1207-18.
- Verkade, P., Oestreicher, A.B., Verkleij, A.J., W.H. Gispen (1995) The increase in B-50/GAP-43 in regenerating rat sciatic nerve occurs predominantly in unmyelinated axons after shafts: A quantitative ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.*, **356**, 433-43.
- Wakim, B.T., Alexander, K.A., Masure, H.R., Cimler, B.M., Storm, D.R., K.A. Walsh (1987) Amino acid sequence of P-57, a neurospecific calmodulin-binding protein. *Biochemistry*, **26**, 7466-70.
- Wegener, C., D.R. Nassel (2000) Peptide-induced Ca²⁺ movements in a tonic insect muscle: effects of proctolin and periviscerokinin-2. *J. Neurophysiol.*, **84**, 3056-66.
- Widmer, F., P. Caroni (1993) Phosphorylation-site mutagenesis of the growth-associated protein GAP-43 modulates its effects on cell spreading and morphology. *J. Cell. Biol.*, **120**, 503-12.
- Wiederkehr, A., Staple, J., P. Caroni (1997) The motility-associated proteins GAP-43, MARCKS, and CAP-23 share unique targeting and surface activity-inducing properties. *Exp. Cell Res.*, **236**, 103-16.
- Witten, J.L., M. O'Shea (1985) Peptidergic innervation of insect skeletal muscle: immunochemical observations. *J. Comp. Neurol.*, **242**, 93-101.
- Wu, X., Davis, G.E., Meininger, G.A., Wilson, E., M.J. Davis (2001) Regulation of the L-type calcium channel by alpha 5beta 1 integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30285-92.

Zheng, J.Q., Poo, M., J.A. Connor (1996) Calcium and chemotropic turning of nerve growth cones. *Perspect. Dev. Neurobiol.*, **4**, 205-13.

Zhu, Q., J.P. Julien (1999) A key role for GAP-43 in the retinotectal topographic organization. *Exp. Neurol.*, **155**, 228-42.

Zuber, M.X., Goodman, D.W., Karns, L.R., M.C. Fishman (1989) The neuronal growth-associated protein GAP-43 induces filopodia in non-neuronal cells. *Science*, **244**, 1193-5.

Zwiers, H., Veldhuis, H.D., Schotman, P., W.H. Gispen (1976) ACTH, cyclic nucleotides, and brain protein phosphorylation *in vitro*. *Neurochem. Res.*, **1**, 669-77.

Zwiers, H., Verhaagen, J., Van Dongen, C.J., De Graan, P.N.E., W.H. Gispen (1985) Resolution of rat brain synaptic phosphoprotein B-50 into multiple forms by two-dimensional electrophoresis: evidence for multisite phosphorylation. *J. Neurochem.*, **44**, 1083-90.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 09. Januar 2004



Lebenslauf

Name: Ronny Hänold
Geburtsdatum: 24. Dezember 1974
Geburtsort: Gera
Familienstand: ledig

1981-1990 Polytechnische Oberschule in Gera, Abschluss: 10. Klasse

1990-1993 Friedrich-Schiller-Gymnasium in Gera
Abschluss: Abitur

1993-1994 Grundwehrdienst

1994-2000 Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss: Diplombiologe

2000-2003 Doktorand an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der FSU Jena

seit 10/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der FSU Jena

Stipendien

1997-1999 Studienstipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung

2000-2003 Promotionsstipendium der Konrad-Adenauer-Stiftung

Jena, den 09. Januar 2004



Publikationen

Hänold, R. (2000) Neurogenese und Axogenese embryonaler und axotomierter identifizierter Interneurone. Diplomarbeit; Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Hänold, R., H.-J. Agricola (2000) Neurogenesis and axogenesis of embryonic and ventral cord injured identified cockroach interneurons. *Zoology*, **103**, Suppl.III, 6.

Hänold, R. H.-J. Agricola (2001) Neurogenesis and axogenesis of protocerebral descending sulfakinin immunoreactive interneurons (PDS-interneurons) of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Abstract Book*, Central European Conference of Neurobiology, 11th-15th August 2001, Kraków, Poland.

Hänold, R., Schönherr, R., Hansel, A., Heinemann, S.H., H.-J. Agricola (2003) Immunocytochemical localization of IGL, a new GAP-43 like gene product in different developmental stages of the American cockroach. In: *The Neurosciences from Basic Research to Therapy*. Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference and the 5th Meeting of the German Neuroscience Society 2003. Eds.: Elsner, N., H. Zimmermann, Thieme Verlag, Stuttgart, 931.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Betreuung von PD Dr. habil. Hans-Jürgen Agricola und Prof. Dr. Stefan H. Heinemann am *Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie/Zellbiologie* sowie in der Arbeitsgruppe *Molekulare und zelluläre Biophysik* an der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Agricola für die Überlassung des Themas sowie das ständige Interesse an meiner Arbeit. Von besonderem Wert waren die vielen anregenden Diskussionen, denen ich oft neue Denkansätze für meine Arbeit entnehmen konnte.

Nicht weniger Dank gilt Prof. Dr. Heinemann für die großzügige Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe. Dabei gilt mein besonderer Dank Dr. Roland Schönherr und Dr. Alfred Hansel für ihre wertvollen Ratschläge zu molekularbiologischen Arbeitstechniken sowie die konstruktiven Gespräche zum bearbeiteten Thema. Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das angenehme und anregende Arbeitsklima.

Für die Unterstützung bei der Anfertigung der Genbank möchte ich mich bei Prof. Dr. Oelmüller, Dr. Thomas Pfannschmiedt und Vidal Fey vom *Institut für Pflanzenphysiologie* bedanken.

Für ihre hilfsbereite und freundliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Angela Roßner, Steffi Arend und Angelika Schmidt bedanken. Ihrem unkomplizierten Engagement verdanke ich die Einarbeitung und Durchführung der verschiedensten Arbeitstechniken.

Für ihre kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei Uta Kirschnik, Konny Kamprath und Stephan Jung bedanken.

A handwritten signature in black ink, consisting of a horizontal line with a small circle at the end, followed by a vertical line and several horizontal strokes.

Ermöglicht wurde diese Arbeit durch die Unterstützung der *Konrad-Adenauer-Stiftung e.V.* Die finanzielle Förderung und ideelle Begleitung waren von unschätzbarem Wert für meine berufliche und persönliche Entwicklung. Namentlich bedanke ich mich für ihr Engagement bei Dr. Renate Kremer sowie Dr. Daniela Tandecki.

Für seine nahezu unendliche Geduld, die uneingeschränkte Unterstützung sowie die vielen aufmunternden Worte danke ich meinem lieben Freund Michael.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner persönlichen Entwicklung uneingeschränkt begleiteten. Auf ihre Unterstützung war jederzeit Verlass. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

A handwritten signature in black ink, consisting of a horizontal line with a small circle at the end, followed by a series of vertical strokes and a final horizontal stroke.

Bildnachweis

S. III, 51 (Logos): Bell, W.J. (1981) *The Laboratory Cockroach. Experiments in cockroach anatomy, physiology and behaviour.*, Chapman and Hall Ltd., London.

S. 44: *Periplaneta australasiae*, *Blatta orientalis*, *Blattella germanica*: Chinery, M. (1993) *Pareys Buch der Insekten: Ein Feldführer der europäischen Insekten.*, 2. Auflage, Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin.

Leucophaea maderae: http://www.bio.umass.edu/biology/kunkel/pegs/m_f1.jpg

S. 44 (Logo), 69: http://www.bio.umass.edu/biology/kunkel/gif/ss_dicty.gif