2. Material und Methoden

2.1. Methoden

2.1.1. Tierzucht

Manduca sexta (Abb. 1) aus einer Laborkultur in der Abteilung Neurobiologie der Freien Universität Berlin wurden wurden bei 26 °C und ca. 60 % Luftfeuchtigkeit bei einem Tag/ Nacht-Rhythmus von 17 Stunden Licht und 7 Stunden Dunkelheit auf künstlich hergestelltem Futter (Bell und Joachim, 1976) gezüchtet. Für die Bestimmung des Entwicklungsstadiums wurden sowohl morphologische als auch chronologische Kriterien herangezogen (Bell und Joachim, 1976; Consoulas *et al.*, 1996; Nijhout und Williams, 1974; Tolbert et al, 1983). Für das Verständnis der in dieser Arbeit gebrauchten Stadien-Bezeichnungen mag diese kurze Zusammenfassung ausreichen: Jedes Entwicklungsstadium dauert annähernd einen Tag. L5 ist das fünfte und damit das letzte Larvenstadium. An die Larvalentwicklung schließen sich fünf Wandererstadien (W0 bis W4) an, die durch eine besondere motorische Aktivität ("Umherwandern") gekennzeichnet sind und an deren Ende sich das Tier in seiner natürlichen Umgebung eingräbt um sich zu verpuppen. Der Tag der Verpuppung wird mit P0 bezeichnet. Die weitere Puppenentwicklung dauert 18 Tage (P1 bis P18) und endet mit dem Schlüpfen des adulten Insekts.

2.1.2. Agaroseschnitte

Die Ganglien wurden nach der Entnahme eine Stunde in PBS mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, 3 mal 15 min in PBS gewaschen und in mit einer Konzentration von 7 % auf dem Wasserbad in PBS gelöster niedrig schmelzender Agarose (Sigma A-0701) eingebettet. Nach dem Erkalten auf Eis wurden dann mit einem Vibrations-Mikrotom unter PBS und auf Eis Schnitte von 100 µm Dicke angefertigt, die bis zur weiteren Verwendung in PBS bei 4 °C gelagert wurden.

2.1.3. Retrograde Färbungen ("backfills")

Die Tiere wurden durch Kühlen auf Eis betäubt, entlang der dorsalen Mittellinie aufgeschnitten, mit Nadeln in einer mit Sylgard ausgegossenen Petrischale fixiert und mit *Manduca*-Ringer übergossen. Die Thorakalganglien wurden entfernt, wobei der zu füllende Nerv besonders lang abgeschnitten wurde und auf keinen Fall gedehnt werden durfte, und mit feinen Nadeln in ebenfalls mit Sylgard ausgegossenen und mit *Manduca*-Ringer gefüllten Petrischalen fixiert. Das Ende des zu füllenden Nervs wurde dann mit Vaseline umwundet. Das so entstandene Gefäß wurde mit Neurobiotin-Lösung gefüllt (Duch und Mentel, 2003) und das Präparat bei 4 °C über Nacht stehengelassen damit die Neurobiotin-Lösung in den Nerv diffundieren konnte. Am nächsten Tag wurden die Ganglien 1 bis 2 Stunden in 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und mindestens 3 mal 15 min in PBS gewaschen. Die Präparate wurden dann wie im Abschnitt "Immunhistochemie" beschrieben weiterbehandelt. Zusammen mit dem sekundären Antikörper wurde Cy3-markiertes Streptavidin mit einer Konzentration von 1:700 eingesetzt um das in den Nerv diffundierte Neurobiotin sichtbar zu machen.

2.1.4. Intrazelluläre Färbungen

Thorakalganglien wurden wie unter 2.1.3. beschrieben entnommen, die Ganglienhülle wurde mit zwei feinen Pinzetten entfernt. Das Ganglion wurde mit feinen Nadeln in einer mit *Manduca*-Ringer gefüllten und mit Sylgard beschichteten Petrischale fixiert. Eine Glas-Mikroelektrode mit einem Widerstand von 20 bis 25 M Ω wurde mit einer Lösung von 7 % Neurobiotin und 2 M Kaliumacetat in aqua dest gefüllt. Die Lösung wurde iontophoretisch mit einem depolarisierenden Strom von 3 nA 30 bis 45 Minuten lang injiziert. Nach dem Entfernen der Elektrode wurde das Ganglion weitere 20 bis 30 min in der Ringerlösung belassen, damit das Neurobiotin möglichst weit in das gefärbte Neuron diffundieren konnte. Unmittelbar danach wurde das Ganglion für 1½ bis 2 h in 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert. Intrazelluläre Färbungen wurden von Dr. C. Duch durchgeführt.

2.1.5. Immunhistochemie

Nach der Entnahme wurden die Ganglien für 1 bis 2 Stunden in 4 % iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und 3 mal 15 min in PBS gewaschen. Um Fett zu entfernen wurden sie zunächst in einer aufsteigende Ethanolreihe entwässert (50 %, 70 %, 90 %, 2 mal 100 %, jeweils 10 min) und danach 10 min in Methylsalicylat, 7 min in Xylol und nochmals 10 min in Methylsalicylat entfettet. Danach wurden sie in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (100 %, 90 %, 70 %, 50 %, jeweils 10 min) und 3 h in PBS mit 0,3 % Triton-X (PBS-Tx 0,3 %) gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen wurden die Präparate zunächst 1 h PBS-Tx (0,05 %) mit 10 % Ziegenserum ("normal goat serum", NGS) vorinkubiert. Die Behandlung mit dem primären Antikörper erfolgte in der Präinkubationslösung (Blocklösung) auf einem Schwenktisch bei 4 °C für 2 Tage. Anti-CaM Kinase II α wurde mit einer Konzentration von 1:100 eingesetzt, anti-Synaptotagmin mit 1:4000. Nach der Behandlung mit dem primären Antikörper wurden die Ganglien 8 mal 20 min in PBS gewaschen und wiederum in Blocklösung über Nacht der floureszenzmarkierte sekundäre Antikörper appliziert. Um anti-CaM Kinase II α zu detektieren wurde Cy3-goat anti-mouse verwendet, für anti-Synaptotagmin Cy5-goat anti-rabbit; beide Antikörper mit einer Konzentration von 1:400. Schließlich wurden die Ganglien 3 mal 20 min in PBS gewaschen, in aufsteigendem Ethanol dehydriert und in Methylsalicylat eingebettet. Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser Scan Mikroskop angefertigt.

2.1.6. Konfokale Mikroskopie

Alle Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop der Firma Leica, Typ DM RXE, angefertigt. Die Präparate wurden nach dem Dehydrieren auf spezielle Objektträger überführt. Es handelt sich hier um 200 µm dicke und 75 mm · 25 mm große Stahlbleche mit einem zentrischen Loch von 10 mm Durchmesser. Eine Seite des Loches ist zuvor mit einem Deckglas von 24 mm · 24 mm, das mit Sekundenkleber befestigt wurde, verschlossen worden. Die Ganglien wurden dann in einen Tropfen Methylsalycilat in der Öffnung des Objektträgers überführt und die Öffnung mit einem Deckglas von 18 mm · 18 mm verschlossen. Um Verdunstung des Methylsalicylats zu verhindern wurden die Ränder des Deckglases mit farblosem Nagellack abgedichtet, was auch seiner Befestigung diente. Um die notwendige mechanische Festigkeit zu gewährleisten wurde der Stahlobjektträger beim Mikroskopieren auf einen normalen Glas-Objektträger gleicher Größe gelegt. Die Präparate wurden mit einem 10 fach Objektiv (Numerische Apertur: 0,7) oder einem 40 fach Ölimmersions-Objektiv (Numerische Apertur: 1,3) bei einer Auflösung von 1024 · 1024 Pixel aufgenommen. Cy2 wurde mit einem Argon-Laser ($\lambda = 468$ nm) angeregt und zwischen 495 nm und 530 nm detektiert. Cy3 wurde mit einem grünen Neon Laser ($\lambda = 543$ nm) angeregt und zwischen 555 nm und 600 nm detektiert. Cy5 wurde mit einem roten Helium-Neon Laser ($\lambda = 633$ nm) angeregt und zwischen 650 nm und 720 nm detektiert. Da bei Doppelmarkierungen und den hier verwendeten Laserintensitäten und Detektorspannungen kein Übersprechen zwischen den Kanälen beobachtet wurde, wurden die beiden Kanäle simultan aufgenommen. Bei Dreifach-Markierungen wurde sequentiell gescannt, wobei Cy2 und Cy5 simultan und Cy3 zeitversetzt aufgenommen wurden. Die Analyse und weitere Bearbeitung der konfokalen Aufnahmen erfolgte mit der Software AmiraDev 3.1. und CorelDraw 10. Amira ermöglicht das Betrachten der Bilderstapel und das Erstellen von einzelnen optischen Schnitten ("ortho slice") sowie von

Projektionsansichten ("projection view"). Die Algorithmen zur Erstellung dreidimensionaler Rekonstruktionen von Nervenzellen sowie zur Projektion von Immunofärbungen auf die Oberfläche rekonstruierter Nervenzellen sind in dieses Programm eingearbeitet worden (Evers *et al.*, 2004). Solche Projektionen sind in Zusammenarbeit mit Dr. Carsten Duch erstellt worden. Mit CorelDraw wurden dann Abbildungen erstellt.

2.1.7. Isolation von CaM Kinase II aus Nervengewebe

CaM Kinase aus *Manduca* Thorakalganglien wurde mit Calmodulin-beschichteten "beeds" (Calmodulin-Agarose, Sigma) aufgereinigt. Da die "beeds" mechanisch sehr empfindlich sind und aufgrund ihrer hohen Dichte durch die Schwerkraft nach unten sinken, wurde auf Sedimentations-Zentrifugation verzichtet. Die "beeds" wurden mit 2 mM CaCl₂, gelöst in DEAE, äquilibriert. Thorakalganglien aus einem Tier des Stadiums P12 wurden mit einem Glas-Glas Homogenisator in 400 µl DEAE homogenisiert, 2 mal 1 min bei 6000 rpm ("rounds per minute", Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert um Gewebereste zu entfernen. Der Überstand wurde nach Entfernen der Äquilibrierungslösung zu den "beeds" gegeben. Damit die CaM Kinase mit dem Calmodulin auf den "beeds" komplexiert wurde bis zu einer Endkonzentration von 2 mM CaCl₂ zugegeben und der Ansatz 20 min bei 4 °C geschüttelt. Danach wurde das Gewebehomogenat entfernt und die "beeds" wurden 2 mal 10 min mit DEAE/ 2 mM CaCl₂ gewaschen. Die CaM Kinase wurde dann in 4 Fraktionen zu je 40 µl mit DEAE/ 2 mM EGTA eluiert.

2.1.8. Messung der CaM Kinase II-Aktivität

Die Aktivität von Proteinkinasen wurde in dieser Arbeit durch Phosphorylierungs-Assays bestimmt. Bei dieser Methode wird ein für die zu messende Kinase spezifisches Substrat durch die Kinase-Aktivität in Gegenwart von am γ -Phosphoratom radioaktiv markiertem Adenosintriphosphat (γ^{32} P-ATP) phosphoryliert und die ³²P-Inkorporation gemessen. Ich habe die von Müller (1997) beschriebene Methode benutzt und in einigen Punkten abgewandelt. Auf diese Weise kann man Kinaseaktivitäten in verschiedenen Proben vergleichen aber keine absoluten Stoffumsätze messen. Für die hier behandelte Fragestellung ist dies ausreichend. Um die Kinase-Aktivität zu messen, die im ZNS in dem jeweiligen Stadium vorhanden ist, muß die Kinase-Aktivität fixiert werden bevor sie sich infolge der Entnahme signifikant ändern kann. Hierzu wurden die Ganglien unmittelbar nach der Entnahme auf einem in flüssigem Stickstoff gekühlten Metallstift angefroren und in einer Glaskapillare auf 20 µl gefrorenem DEAE mit 2 mM EGTA homogenisiert. Die von der Firma Blaubrand bezogenen Glaskapillaren sind zuvor in je drei gleich lange Teile geteilt worden. Bis zur Phosphorylierung wurden die Proben unter flüssigem Stickstoff gehalten.



mit Kalzium
mit Kazium und Calmodulin
ohne Kalzium und Calmodulin



ohne Kalzium, ohne Substrat
mit Kalzium, ohne Substrat
ohne Kalzium, mit Substrat
mit Kalzium, mit Substrat

Abb. 5 Vorversuche für Messungen der CaM Kinase II Aktivität. **A:** Substratphosphorylierung mit aus Nervengewebe isolierter CaM Kinase. Mit 2 mM zusätzlichem Ca²⁺ im Reaktionsansatz wird eine Substratbande sichtbar (linke Gelspur), die sich mit zusätzlichem Calmodulin weiter verstärkt (mittlere Spur) und ohne freies Kalzium, mit 1 mM des Kalzium-Chelators EGTA im Reaktionsansatz, vollständig verschwindet (rechts). **B:** Test, ob Substratbanden von intrinsischen Proteinbanden überlagert werden. Die Gelspuren, bei denen das spezifische CaM Kinase II Substrat im Reaktionsansatz enthalten war (3. und 4. von links), zeigen deutlich eine zusätzliche Bande im Vergleich zu den Spuren ohne Substratzugabe (1. und 2. von links). Damit ist nachgewiesen, daß die Intensität der Substratbande nur durch ³²P-Inkorporation durch das Substrat bestimmt wird und damit die Aktivität der CaM Kinase II repräsentiert.

Die CaM Kinase Aktivität wurde durch Phosphorylierung eines spezifischen Substrates (bezogen von Calbiochem) mit radioaktiv markiertem Adenosin-Triphosphat (γ^{32} P-ATP, Hartmann Analytic) gemessen. Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM MgCl₂, 10 µM ATP, 2 µg Substrat und 1 µCi γ^{32} P-ATP pro Probe (alles Endkonzentrationen). Das Endvolumen eines Reaktionsansatzes betrug 20 µl. Die Spezifität des Substrates für CaM Kinase II in Insekten-Nervengewebe ist bereits nachgewiesen worden (Müller, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem die Spezifität des Substrates für neuronale CaM Kinase II aus *Manduca sexta* durch Substrat-Phosphorylierung mit aufgereinigter CaM Kinase II getestet (Abb. 5A). In Gegenwart von Kalzium wurde das Substrat durch aufgereinigte CaM Kinase II phosphoryliert (Abb. 5A, linke Gelspur). Die Phosphorylierung wurde stärker mit zusätzlichem Calmodulin im Reaktionsansatz (Abb. 5A, mittlere Gelspur). In Abwesenheit von Kalzium wurde keine erkennbare Phosphorylierung des Substrates beobachtet (Abb. 5A, rechte Gelspur). Das Substrat wird also von *Manduca* CaM Kinase II phosphoryliert. Um zu testen, ob irgendwelche Banden, die durch Phosphorylierung intrinsischer Proteine entstehen, die gleiche Größe haben wie die Substratbande wurden Phosphorylierungsansätze mit und ohne Substrat auf dem selben Gel aufgetrennt (Abb. 5B). Die Gelspur mit Substrat zeigt deutlich eine zusätzliche Bande im Vergleich zu der Spur ohne Substrat. Dies war sowohl der Fall in Gegenwart von zusätzlichem Kalzium (Spuren 2 und 4) als auch in Abwesenheit von zusätzlichem Kalzium (intrinsische Aktivität, Spuren 1 und 3). Das hier getestete Substrat ist somit gut geeignet um CaM Kinase II Aktivität in *Manduca* Nervengewebe zu untersuchen.

♦ intrinsische Aktivität





Abb. 6 Zeitreihe. Gewebehomogenate aus Thorakalganglien von Tieren des gleichen Stadiums wurden unter aktivierenden und nicht aktivierenden Bedingungen verschieden lange phosphoryliert um die optimale Reaktionszeit zu ermitteln. Unter nicht aktivierenden Bedingungen kommt es erst zwischen 120 s und 240 s zu einer signifikanten Änderung (*, $p \le 0,05$) der Aktivität, während unter aktivierenden Bedingungen der Aktivitäts-Anstieg in den ersten 120 s hochsignifikant ist (**, $p \le 0,01$) und sich danach nicht mehr signifikant ändert. Auch der Unterschied zwischen den beiden Meßreihen ist bei 120 s hochsignifikant. Aufgrund dieser Daten wurde 120 s als Reaktionszeit für alle weiteren Messungen gewählt (Statistik: ANOVA mit Newman-Keuls posthoc test, p = 0,05).

In den meisten Experimenten sollte sowohl die Aktivität, die der natürlichen Aktivierung in dem jeweiligen Stadium entspricht (intrinsische Aktivität) als auch die durch Zugabe von Kalzium maximal erreichbare Aktivität, die der Aktivierung der gesamten exprimierten CaM Kinase II in dem jeweiligen Stadium entspricht (Kalzium-stimulierte Aktivität) gemessen werden. Um beide Messungen mit dem selben Ganglion durchzuführen, wurde das Homogenat (20 μ l) zu dem Reaktionsansatz (20 μ l) gegeben, durchmischt, und sofort die Hälfte des Volumens (20 μ l) in ein anderes Reaktionsgefäß pipettiert, das 2 μ l einer 20 mM CaCl₂-Lösung enhielt, was zu einer Endkonzentration von 2 mM CaCl₂ führte.

In Zeitreihen mit verschiedenen Phosphorylierungszeiten wurde die optimale Phosphorylierungszeit ermittelt um zwischen intrinsischer und Kalzium-stimulierter Aktivität zu unterscheiden (Abb. 6); dies ist die Zeit, nach der die intrinsische Aktivität noch keine signifikante Änderung erfahren hat aber Kalzium-Aktivierung die CaM Kinase Aktivität bereits signifikant erhöht. Die intrinsische Aktivität erhöhte sich zwischen der ersten Messung nach 15 s und der Messung nach 120 s nicht signifikant, während die Steigerung zwischen 120 s und 240 s signifikant war. Demnach darf die intrinsische Aktivität nicht später als 120 s nach dem Auftauen und Start der Reaktion gemessen werden. Im Gegensatz dazu war der Anstieg der Kalzium-aktivierten Aktivität zwischen 15 s und 120 s hoch signifikant (Abb. 6). Aufgrund dieser Daten wurde 120 s als Phosphorylierungszeit gewählt, um in dem selben Ganglion zwischen intrinsischer und Kalzium-stimulierter Aktivität zu unterscheiden. Die Phosphorylierungs-Reaktion wurde durch Hinzufügen von 1/5 des Volumens SDS-Ladepuffer gestoppt. Die Proben wurden einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem 15 %-Gel unterzogen. Die Stromstärke pro Gel lag bei 25 mA. Nach der Elektrophorese wurden die Gele fixiert, in Wasser gewaschen, auf "Whatman-Papier" gezogen und 30 min im Vakuum und unter Erhitzen getrocknet (LKB Slab Gel Dryer). Phosphorylierte Proteinbanden wurden durch Autoradiographie mit Kodak Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Die Autoradiogramme wurden in einen Personalcomputer eingescannt und die ³²P-Inkorporation in Substratbande und intrinsische Proteinbanden durch Messung der Graustufe und der Fläche, die die Bande einnimmt (Anzahl Pixel) quantitativ erfaßt. Hierzu wurde die Software Scion Image verwendet. Die gesamte CaM Kinase II Aktivität in einer Substratbande wird definiert als mittlere Graustufe multipliziert mit der Anzahl der Pixel, wobei die Anzahl der Pixel der Fläche entspricht, die die Bande bedeckt (Abb. 5B). Die Graustufe des Hintergrundes wurde jedesmal substrahiert nach (mittlere Graustufe Bande - mittlere Graustufe Hintergrund) · Anzahl der Pixel Bande. Um die Unterschiede in der Gangliengröße zu berücksichtigen wurde die CaM Kinase Aktivität jeweils als relative Aktivität gemessen, indem sie durch die Gesamtphosphorylierung, entsprechend sämtlichen Banden in der jeweiligen Spur, dividiert wurde (siehe Müller,

1997). Die Gesamtphosphorylierung wurde definiert als (mittlere Graustufe intrinsische Banden - mittlere Graustufe _{Hintergrund}) · Anzahl der Pixel _{intrinsische Banden}. Die Fläche der intrinsischen Banden entspricht dem weiß gepunkteten Rechteck in Abb. 5B. Die Werte der Substratbanden wurden durch die Werte der intrinsischen Banden in der selben Gelspur dividiert um relative Aktivitäten zu erhalten. Die Messungen wurden gesammelt und mit der Software Excel von Microsoft sowie Statistica von StatSoft, Inc. statistisch ausgewertet. Um auf statistische Signifikanz zu testen wurden bei zwei zu vergleichenden Wertegruppen "Students T-Test" und bei mindestens drei Gruppen Varianzanalyse ("analysis of variance", ANOVA) mit anschließendem "Newman-Keuls post hoc test" angewendet. Ein Signifikanzniveau von $p \le 0,05$ wird mit * gekennzeichnet, $p \le 0,01$ mit **.

2.1.9. Messung der Proteinkinase A-Aktivität

Die Phosphorylierungsansätze zur Messung der Proteinkinase A- (PKA-) Aktivität waren bis auf das Substrat und die Konzentration von nicht-radioaktivem ATP identisch mit den Ansätzen zur Messung der CaM Kinase II Aktivität. Zur Messung der maximalen Aktivität mußte hier mit zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert werden. Als spezifisches PKA-Substrat wurde Phosphatase-Inhibitor 1 (I-1), isoliert aus Rinderhirn, verwendet (Hildebrandt und Müller, 1995; Müller, 2000). Der Reaktionsansatz enthielt 10 mM MgCl₂, 20 μ M ATP, 1 μ g Substrat (I-1) und 1 μ Ci γ^{32} P-ATP pro Probe (alles Endkonzentrationen). In Abbildung 7 wird gezeigt, daß das Messergebnis nicht durch die Phosphorylierung intrinsischer Proteine, die auf gleicher Höhe wie die Substratbande laufen, verfälscht werden kann. Die Substratbanden sind auch hier durch Umrandung mit einer weißen gepunkteten Linie markiert. In den Gelspuren ohne Substrat (erste und zweite Gelspur von links) ist auf Höhe der Substratbande keine intrinsische Proteinbande zu sehen. Befand sich das Substrat (I-1) im Reaktionsansatz und wurde die PKA mit 2 μ M cAMP aktiviert (dritte von links), ist auf dem Autoradiogramm eine deutliche Bande zu sehen (weiß umrandet), die sich erheblich abschwächt, wenn nicht mit cAMP aktiviert wird (vierte von links).

Um die optimale Phosphorylierungszeit zu ermitteln, wurde auch hier verschieden lange phosphoryliert und die PKA-Aktivität in Abhängigkeit von der Phosphorylierungszeit aufgetragen (Abb. 8). Bei der Messung der intrinsischen Aktivität muß die Reaktion gestoppt werden, bevor sich die Aktivität signifikant ändert. Zwischen 20 und 30 Sekunden erhöht sich die Kinase-Aktivität nicht signifikant. Die Erhöhung zwischen 20 und 40 Sekunden ist dagegen bereits signifikant (*, $p \le 0.05$). Daher muß die Phosphorylierung nach spätestens 30 s beendet werden um tatsächlich die intrinsische Aktivität zu messen. Als Reaktionszeit für die weiteren intrinsischen PKA-Messungen wurde daher 30 s gewählt. Bei der Messung der maximalen, durch cAMP-Stimulierung erreichbaren Aktivität darf dagegen erst dann gemessen werden, wenn die Aktivität nicht mehr signifikant steigt. Dies ist bei der cAMP-stimulierten Aktivität erst im Zeitintervall zwischen 180 und 210 Sekunden der Fall. Der Anstieg zwischen 20 und 180 Sekunden ist dagegen hoch signifikant (**, $p \le 0.01$). Deshalb darf bei der Messung der maximalen Aktivität die Reaktion frühestens nach 180 Sekunden beendet werden. Als Reaktionszeit für die maximale Aktivität wurde 180 s festgelegt. Die Messung der Graustufen und die statistische Auswertung erfolgten wie bei den CaM Kinase II Messungen.



Abb. 7 Vorversuch für Messungen der Proteinkinase A (PKA) Aktivität: Phosphorylierungs-Assay mit und ohne Substrat I-1. In den Gelspuren ohne Substrat (erste und zweite von links) ist auf Höhe der weiß umrandeten Substratbande keine weitere Bande zu sehen. Befinden sich 1 μ g Substrat I-1 pro Gelspur und 10 μ M cAMP im Reaktionsansatz (dritte Spur von links), erscheint eine sehr intensive zusätzliche Bande (weiß umrandet). Ohne zusätzliches cAMP wird diese Bande deutlich schwächer (vierte Spur von links).

mit cAMP, ohne Substrat
ohne cAMP, ohne Substrat
mit cAMP, mit Substrat
ohne cAMP, ohne Substrat

Nach dieser Methode erzielte Ergebnisse können nur dann verglichen werden, wenn sämtliche Werte der Gruppe aus einem Versuchsansatz kommen und damit auch die Autoradiographie für alle Proben auf dem selben Röntgenfilm durchgeführt wurde. Da die Schwärzung des Röntgenfilms nur innerhalb eines begrenzten Intensitäts-Intervalls die Enzymaktivität repräsentiert, führt die große Differenz zwischen den Reaktionszeiten bei intrinsischer und maximaler Aktivität zu Problemen hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Meßergebnissen unter aktivierenden und nicht aktivierenden Bedingungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die intrinsische und die maximale PKA-Aktivität in verschiedenen Ansätzen gemessen, was

quantitative Vergleiche zwischen intrinsischer und maximaler Aktivität natürlich ausschließt. Man kann jedoch trotzdem die Entwicklung der intrinsischen und der maximalen Aktivität separat betrachten.



Abb. 8 Vorversuch für Messungen der Proteinkinase A (PKA) Aktivität: Zeitreihe zur Ermittlung der optimalen Phosphorylierungszeiten. Der Anstieg der intrinsischen Aktivität zwischen 20 s und 30 s Phosphorylierungszeit ist nicht signifikant. Die Zunahme zwischen 20 s und 40 s ist dagegen signifikant (*, $p \le 0,05$). Die intrinsische PKA-Aktivität wurde daher nach 30 s Phosphorylierungszeit gemessen. Die durch Stimulation mit zucAMP generierte sätzlichem maximale Aktivität steigt bis 180 s hochsignifikant an (**, $p \le 0.01$) und erhöht sich danach nicht mehr signifikant. Für die Messung der maximalen Aktivität wurde daher eine Phosphorylierungszeit von 180 s gewählt (ANOVA mit Newman-Keuls posthoc test, p = 0.05).

2.1.10. In vivo Injektionen von Pharmaka während der normalen Entwicklung

Die Injektionen wurden 1 mal am Tag durch die Flügeldecke mit einer 1 ml-Spritze und einer 0,4 mm \cdot 20 mm Nadel durchgeführt. Die Öffnung wurde danach mit Wachs verschlossen um Auslaufen der Hämolymphe zu vermeiden. Der CaM Kinase II Blocker KN-93 war mit einer Konzentration von 500 μ M in aqua dest. gelöst. Das Injektionsvolumen war 100 μ l, was zu einer Konzentration von KN-93 in der Hämolymphe von ca. 10 μ M führte. Zur Negativkontrolle wurden Tiere mit dem gleichen Volumen aqua dest injiziert. Der Kalzium Kanal-Blokker Verapamil wurde mit einer Konzentration von 20 mM in aqua dest. injiziert, was zu einer Konzentration in der Hämolymphe von ca. 0,5 mM führte. Um eine gleichmäßige Entwicklung zu gewährleisten wurden die Tiere vom Stadium P0 an in dem selben Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 25 °C gehalten, unabhängig davon, welche Stadien injiziert wurden.

2.1.11. "Western Blot"

Frisch präpariertes Nervengewebe wurde mit einem Glas-Glas Homogenisator in DEAE homogenisiert, mit 1/5 des Volumens Probenpuffer vermischt und einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem 10 % Gel mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel unterzogen. Nach kurzem Schwenken in Blotpuffer wurden die Proteinbanden auf eine Nitrozellulose-Membran in einer "semi-dry" Transferzelle bei 20 V für 45 min geblottet. Die Membran und drei Lagen Whatman-Papier auf jeder Seite wurden ebenfalls mit Blotpuffer getränkt bzw. benetzt. Nach dem Blotten wurde die Membran 10 min in PBS gewaschen und 1 h in Blocklösung präinkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Der primäre Antikörper wurde in Blocklösung verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4 °C auf einem Schwenktisch inkubiert. Anti-CaM Kinase II α wurde bei Western Blots in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 mal 10 min in PBS gewaschen und 45 min in dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert, der 1:10.000 in Blocklösung verdünnt war. Nach dem Entfernen des sekundären Antikörpers wurde die Membran 3 mal 10 min in PBS gewaschen. Um die Banden sichtbar zu machen wurde ein Chemiluminiszenz-Kit verwendet (Western LightningTM Chemiluminescenc Reagent Plus).

2.2. Material

2.2.1. Puffer und Lösungen

Paraformaldehydlösung (4%)	4 80	g ml	Paraformaldehyd PBS unter Erwärmen auf Rührwerk lösen (max. 60°C) pH = 7,2 (mit 1M NaOH einstellen) ad 100 ml PBS
PBS	137	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	10,1	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8	mМ	KH ₂ PO ₄
Blockpuffer (Western)	0,5	%	BSA
	0,05	%	Tween-20
			in PBS
DEAE-Puffer	50	mМ	Tris, pH 7,8
	1	mM	EDTA
	1	mM	EGTA
	10	mМ	Mercaptoethanol
Manduca-Ringer	140	mМ	NaCl (8,2g/l)
	5	mM	KCl (0,37g/l)
	28	mM	D-Glucose (5,5g/l)
	5	mM	Hepes (1,19g/l)
	4	mM	CaCl ₂ (4ml 1M-Stammlösung/l)
			einstellen auf pH 7,4
Probenpuffer	0,5	М	Tris, pH 6,8
	5	%	SDS

	5	%	Mercaptoethanol
	20	%	Glycerin
	4	%	Bromphenolblau
Laufpuffer für SDS-Gele	2,5	mM	Tris
	19,2	mM	Glycin
	0,1	%	SDS
Fixierlösung für SDS-Gele	30	%	Methanol
	10	%	Essigsäure
Trenngel	10	%	Acrylamid
	0,3	%	Bisacrylamid
	0,375	М	Tris, pH 8,3
	0,1	%	SDS
	0,05	%	Ammoniumpersulfat
	0,25	%	TEMED
Sammelgel	4	%	Acrylamid
	0,12	%	Bisacrylamid
	0,166	М	Tris, pH 6,8
	0,1	%	SDS
	0,05	%	Ammoniumpersulfat
	0,25	%	TEMED
Blotpuffer	20	%	Methanol
	50	mМ	Tris
	40	mМ	Glycin
	0,14	М	SDS
Prestained Marker	0,5	mg	Myosin
	0,5	mg	β-Galaktosidase
	0,5	mg	Phosphorylase B

	25	mg	BSA
	25	mg	Albumin
	5	mg	Carboxy Anhydrase
Probenpuffer	0,5	М	Tris, pH 6,8
	5	%	SDS
	5	%	Mercaptoethanol
	20	%	Glycerin
	4	%	Bromphenolblau
Laufpuffer für SDS-Gele	2,5	mМ	Tris
	19,2	mМ	Glycin
	0,1	%	SDS
Fixierlösung für SDS-Gele	30	%	Methanol
	10	%	Essigsäure
Trenngel	10	%	Acrylamid
	0,3	%	Bisacrylamid
	0,375	Μ	Tris, pH 8,3
	0,1	%	SDS
	0,05	%	Ammoniumpersulfat
	0,25	%	TEMED
Sammelgel	4	%	Acrylamid
	0,12	%	Bisacrylamid
	0,166	Μ	Tris, pH 6,8
	0,1	%	SDS
	0,05	%	Ammoniumpersulfat
	0,25	%	TEMED

2.2.2. Chemikalien

Acrylamid	BioRad
Agarose, Kat. Nr. A-0701	Sigma [®]
Albumin	Roth
Ammonium Persulfat (APS)	Serva®
β-Galaktosidase	Sigma [®]
Bisacrylamid	AppliChem®
Bromphenolblau	Serva®
BSA (Bovine Serum Albumin)	AppliChem®
Kalziumchlorid	Merck
CaM K II Substrate (281-291), KatNr. 208708	Calbiochem®
Calmodulin-Agarose, KatNr. P4385	Sigma [®]
D-Glucose	Merck
Dimethyl-Sulfoxid (DMSO)	Sigma [®]
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Essigsäure	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem®
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	AppliChem®
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
γ^{32} P-ATP	Hartmann Analytic
Hepes	Serva®
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma [®]

KN-93, Kat. No. 422711	Calbiochem
Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid	AppliChem [®]
NP 40 (Igepal CA-630)	Sigma [®]
Natrium Dodecylsulfat (SDS)	AppliChem [®]
Paraformaldehyd	Merck
Phosphatase-Inhibitor 1 (I-1)	Prof. Dr. Uli Müller, Universität des
	Saarlandes
Phosphorylase B	Sigma [®]
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma [®]
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan	AppliChem [®]
Triton-X	Sigma [®]
Tween-20	AppliChem [®]
Verapamil hydrochloride, Kat. No. ALX-550-306	Alexis Biochemicals
Western Lightning TM Chemiluminescens Reagent	Perkin Elmer TM life science
Plus, Kat. Nr. NEL104	

2.2.3. Antikörper und Enzyme

anti CaM Kinase II, Kat. Nr. MAB8699	Chemikon International
anti Synaptotagmin	Dr. Leslie Tolbert, Universität von Arizona
Cy2-Streptavidin	Jackson ImmunoResearch
Cy2-anti mouse	Jackson ImmunoResearch
Cy2-anti rabbit	Jackson ImmunoResearch
Cy3-Streptavidin	Jackson ImmunoResearch

Cy3-anti mouse	Jackson ImmunoResearch
Cy3-anti rabbit	Jackson ImmunoResearch
Cy5-Streptavidin	Jackson ImmunoResearch
Cy5-anti mouse	Jackson ImmunoResearch
Cy5-anti rabbit	Jackson ImmunoResearch
anti-mouse IgG Peroxidase	Sigma [®]
anti-rabbit IgG Peroxidase	Sigma [®]

2.2.4 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Roth
Gel-Blotting Paper GB 002	Schleicher & Schuell [®]
Glaskapillaren, KatNr. 708744	BLAUBRAND®
Nitrocellulosemembran, OPTITRAN BA-S 85	Schleicher & Schuell [®]
Objektträger	Roth
Pipettenspitzen	Gilson
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme, X-Omat scientific imaging film	Kodak
Röntgenfilm-Entwickler, G150	AGFA
Röntgenfilm-Fixierer, G354	AGFA
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell [®]

2.2.5. Geräte

Binokular	Mikroskop-Technik Rathenow
Glas-Glas Homogenisator	Roth
Konfokales Laserscan-Mikroskop	Leica DM RXE

Lichtquelle	Zeiss
Präparierbesteck	Fine Science Tools
Scanner	Epson Perfection 1260
Slab Gel Dryer	LKB
Vibrations-Mikrotom	Leica VT 1000S
Western-Blot Transferzelle	Bio-Rad TransBlot SD
2.2.6. Software	
AmiraDev 3.1	Konrad Zuse Zentrum Berlin
Corel Draw 10	Microsoft
Excel 2002	Microsoft
Origin 4.1	Microcal
Scion Image 2000	Scion Corporation
Statistica '99 Edition	StatSoft, Inc.