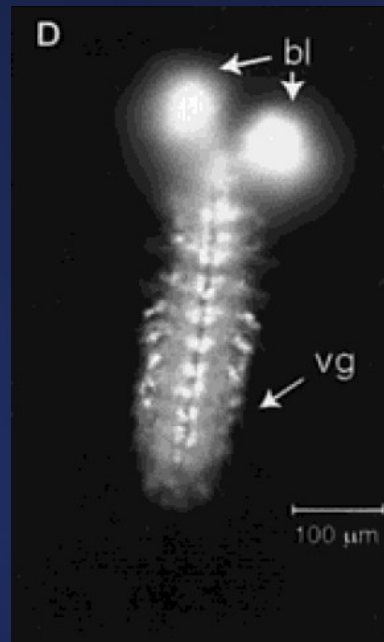


Visualization of Neuropeptide Expression, Transport, and Exocytosis in *Drosophila melanogaster*

Sujata Rao, Cynthia Lang, Edwin S. Levitan, David L. Deitcher



Gliederung

- 1) Was sind Neuropeptide?
 - Neuropeptide in *Drosophila melanogaster*
- 2) proANF-EMD-Expression
- 3) proANF-EMD-Bewegung im Axon
- 4) Prozessierung von proANF-EMD
- 5) Targeting von proANF-EMD
- 6) Freisetzung von proANF-EMD

1) Was sind Neuropeptide?

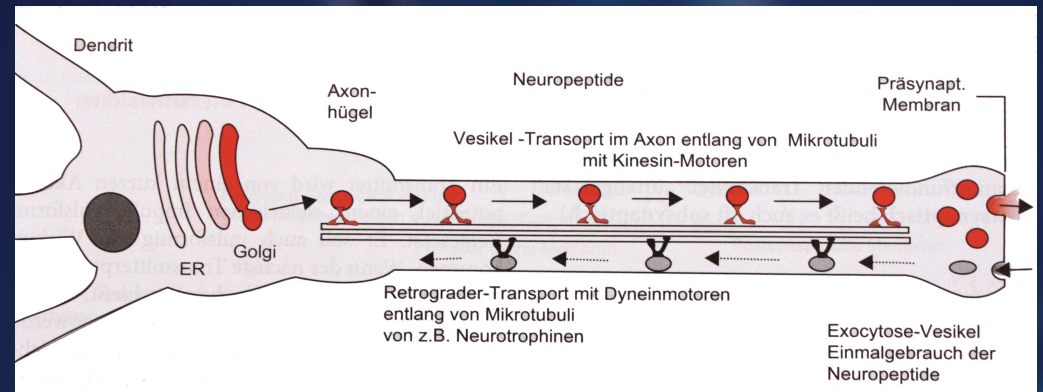
- Regulation von physiologischen Prozessen

- Entwicklung der Neuropeptide

→ Zellkörper, Prepropeptid

→ ER, Propeptid

→ Trans Golgi Network



- Messung von Neuropeptid-Freisetzung

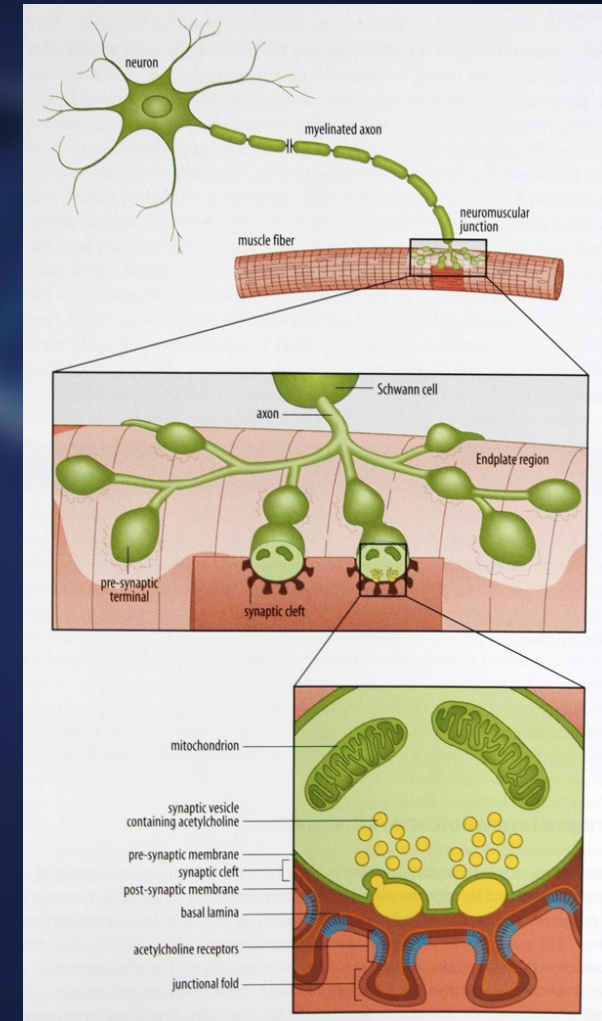
→ Radioimmunassay

→ Zellkulturen mit GFP markierten Neuropeptiden

Müller, Frings – Tier- und Humanphys.,
4.Auflage S.359, Springer-Verlag

Neuropeptide in *Drosophila m.*

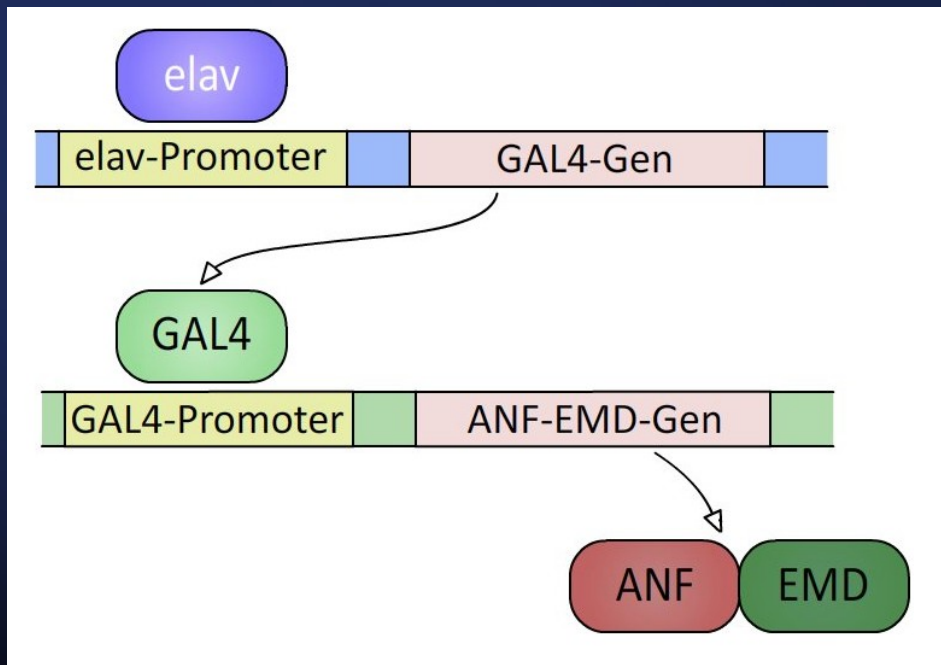
- Modellorganismus *Drosophila melanogaster*
- Vergleichsweise leichter Aufbau der Muskeln
 - Ventrale longitudinalmuskeln 6/7 und 12
- Neuromuscular junction (NMJ) gut charakterisiert
 - PACAP, Proctolin und Insulin-like Neuropeptide



Wolpert – Princ. of development.,
3.Auflage S.410, Spektrum-Verlag

Neuropeptide in *Drosophila m.*

- Sujata Rao et al.
- Exprimiert ein Neuropeptid der Ratte (atrial natriuretic factor)
- Fusioniert mit Emerald-version von GFP (ANF-EMD)
- Unter Kontrolle von GAL4



Stämme von *Drosophila m.*

- ProANF-EMD / GAL4
- GFP / GAL4

2) proANF-EMD-Expression

- Fluoreszenz im ZNS, PNS, Garlandzellen und Speicheldrüse
- Besonders starke Fluoreszenz bei Sinneszellen und motorische Endplatten

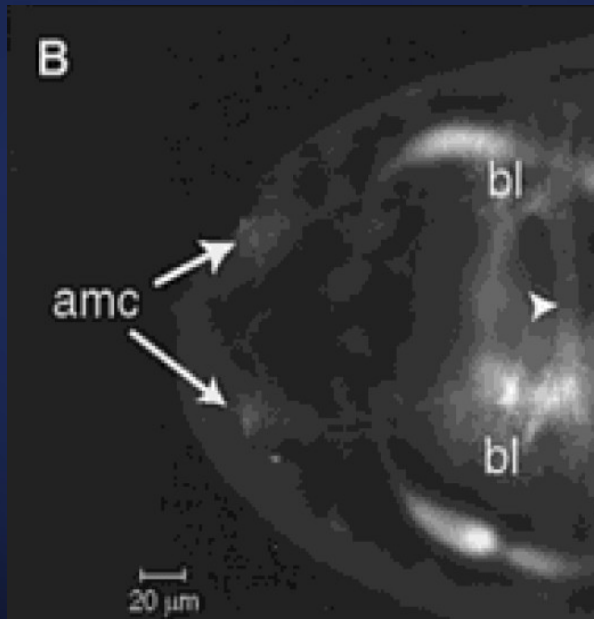


Figure 1 B
Anterior, Larve
amc: antennal maxillary complex
bl: brain lobes

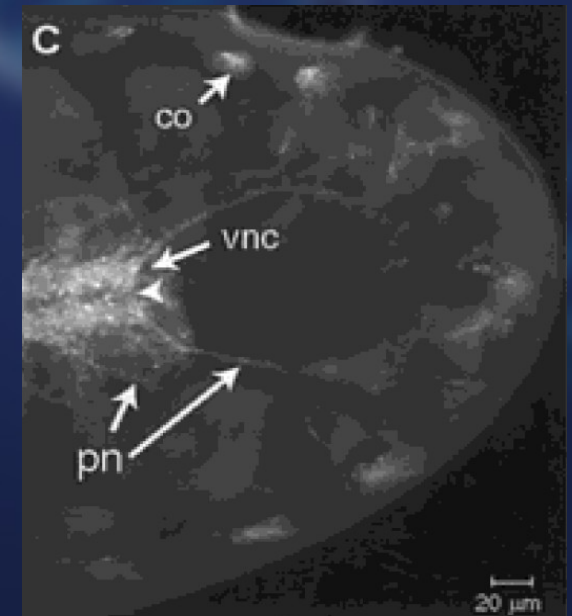


Figure 1 C
Posterior, Larve
co: chordotonal organs
vnc: ventral nerve cord
pn: peripheral nerves

2) proANF-EMD-Expression

- Garlandzellen
 - „Reinigung“ der Hämolymphe mittels Endocytose
 - Kontrollstamm mit Cytosol-Exprmierten GFP, keine Floureszenz
- Floureszenz in Speicheldrüsen wahrscheinlich durch GAL4

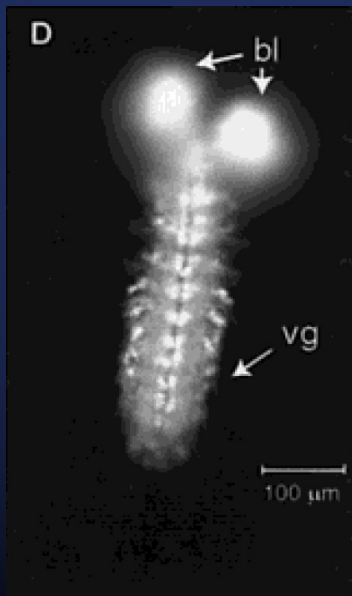


Figure 1 D
Ventral, Larve
bl: brain lobes
vg: ventral ganglion

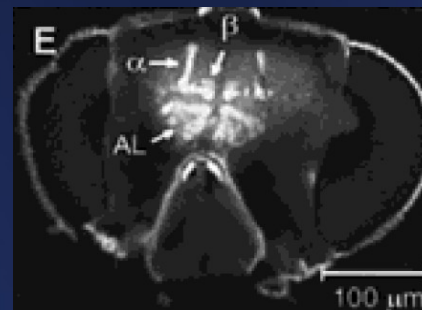


Figure 1 E
Head, adult

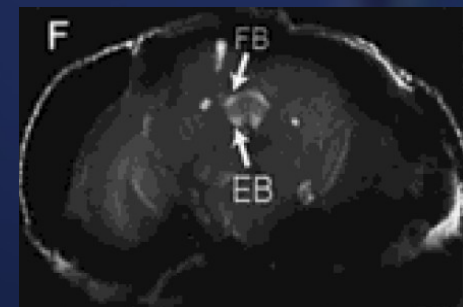


Figure 1 F
Head, adult

3) proANF-EMD-Bewegung im Axon

- Fluoreszenz tritt punktuell auf

Figure 2 A
Axonbündel, Larve
Kontrollstamm, der
Zytosol-GFP exprimiert

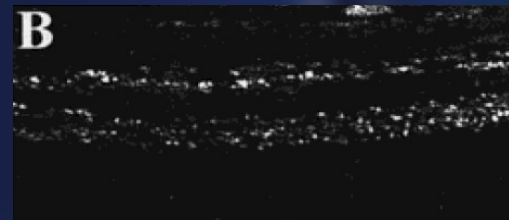
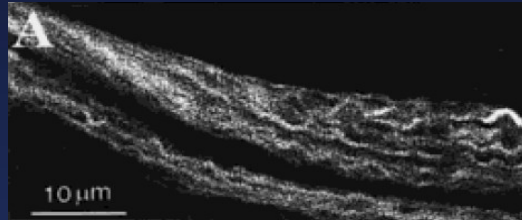


Figure 2 B
Axonbündel, Larve
Stamm, der ANF-EMD
exprimiert

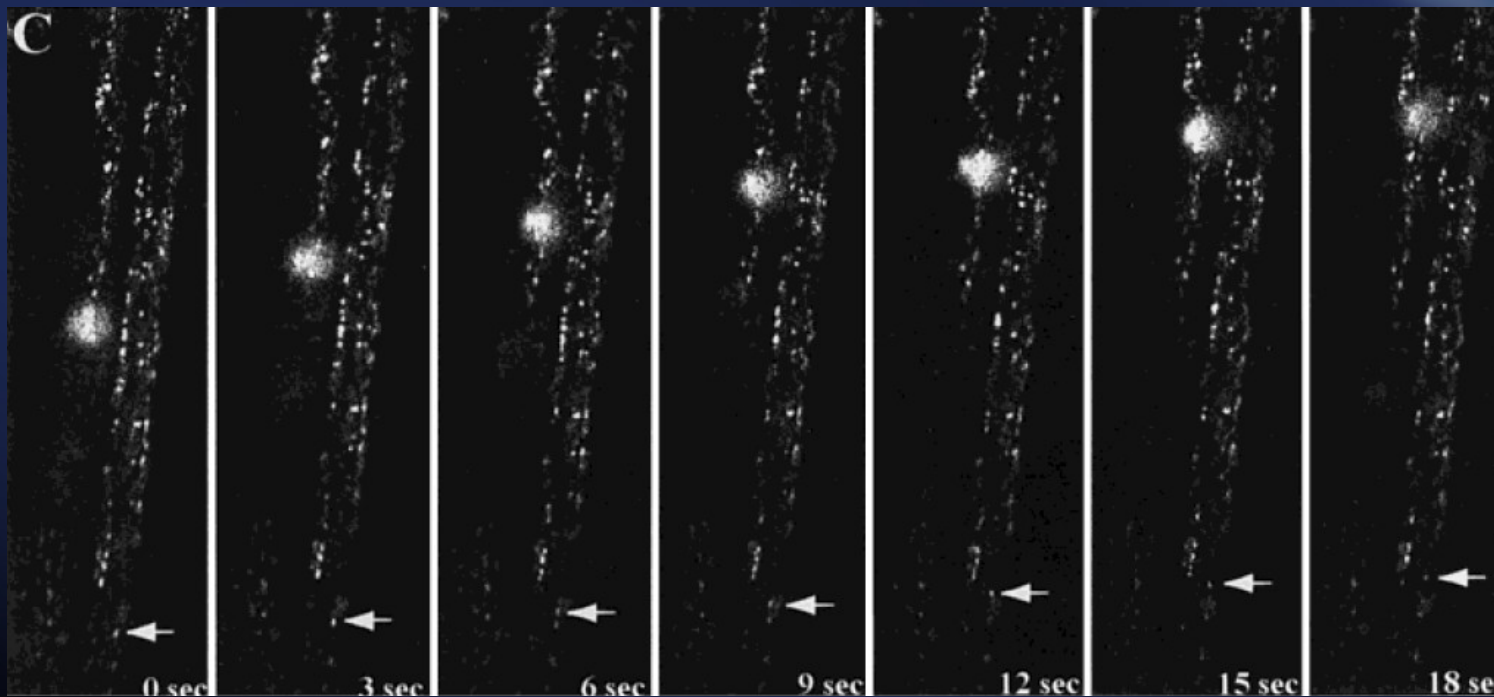


Figure 3 B
Axon, Larve
Stamm, der ANF-EMD
exprimiert

3) proANF-EMD-Bewegung im Axon

- Die Fluoreszenz-Punkte können in Klassen eingeteilt werden

Particles	Speed (μ/s)
A ($n = 5$)	$\sim 0.3-0.4$
B ($n = 7$)	$\sim 0.6-0.7$
C ($n = 3$)	$\sim 0.9-1.6$
*D ($n = 3$)	$0.5-0.55$

Tabelle 1

A – C bewegen sich in eine Richtung
D* bewegt sich entgegengesetzt zu A – C

- Quantifizierung an der motorischen Endplatte schwer möglich

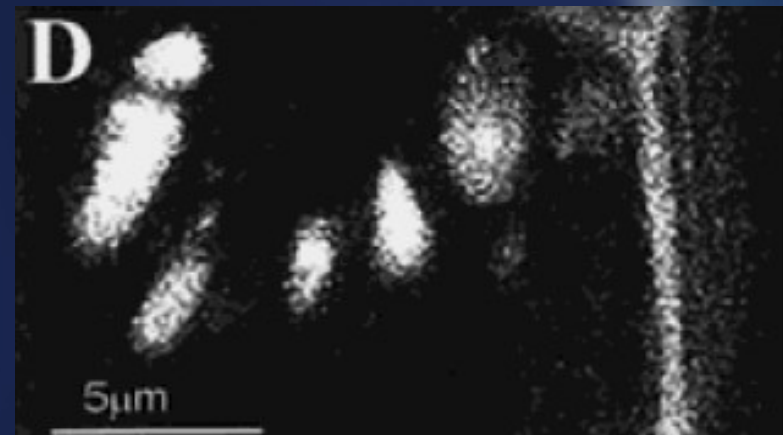
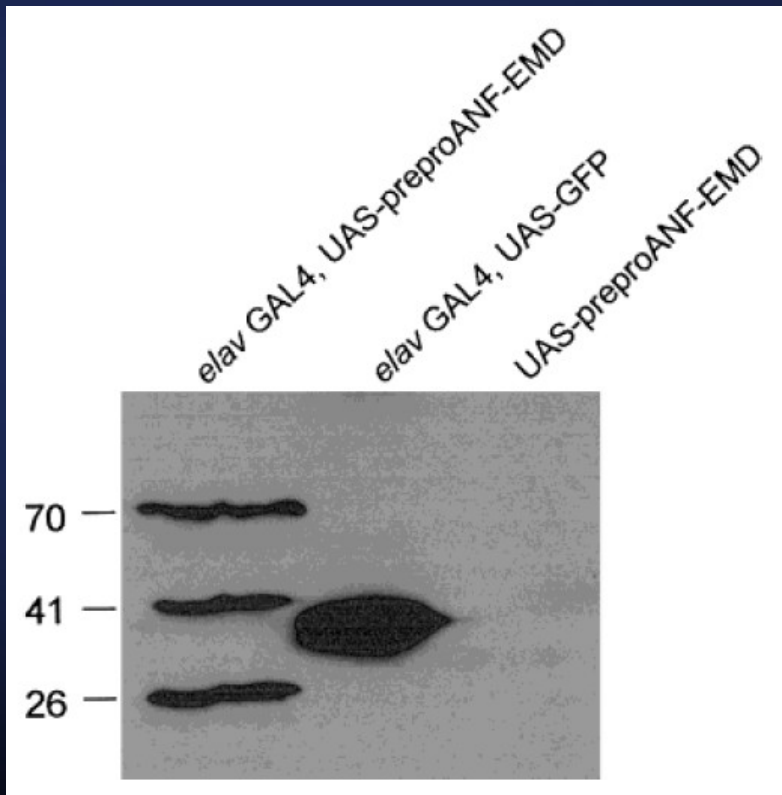


Figure 2 D
Synaptische Endknöpfchen, Larve

4) Prozessierung von proANF-EMD

- Kein sequenzähnliches Protein im Genom von *Drosophila*
- Neuropeptidspezifische Sequenz



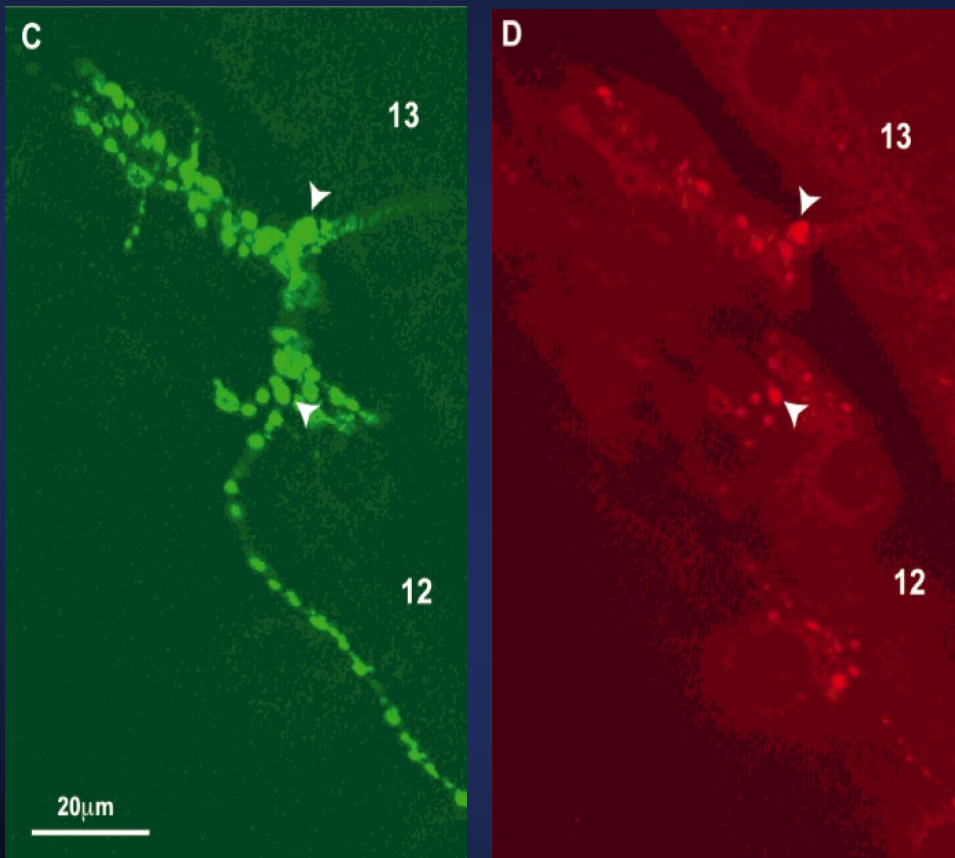
proANF-EMD Linie:

- 70kDa:
 - schwerer als erwartet
 - wahrscheinlich N-Glykosyliert (Asn87)
- 41kDa:
 - schwerer als EMD alleine, leichter als ANF-EMD
 - wahrscheinlich prozessiert
 - Insektentypische Neuropeptidsequenz mit zentralem Arg-Arg als Schnittstelle.
- 26kDa:
 - wahrscheinlich einzelnes EMD

Figure 3
Western blot von ZNS-Extrakt, Larve

4) Prozessierung von proANF-EMD

- Nachweis von ANF durch markierte Antikörper



Motorische Endplatte 12 (NMJ 12)

C) ANF-EMD

D) ANF-ir

Figure 4 C, D
NMJ 12, Larve (EMD-ANF-Stamm)

5) Targeting von proANF-EMD

- NMJ 6 / 7: Typ I Endknöpfchen
→ klare Vesikel, Neurotransmitter
- NMJ 12: Typ III Endknöpfchen
→ primär Neuropeptide (z.B. Insulin-like-Protein)

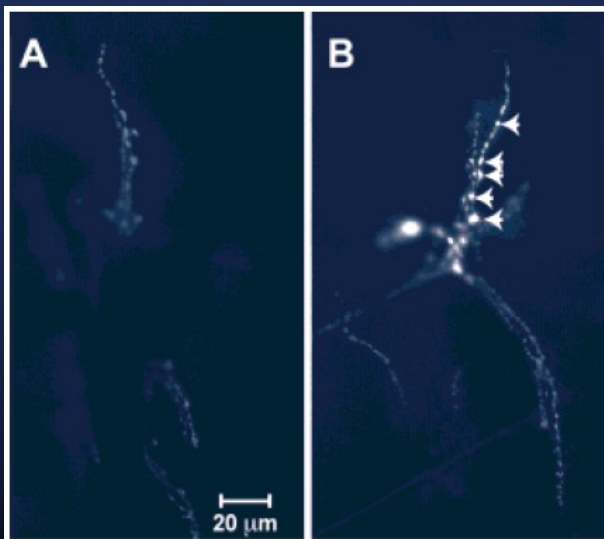


Figure 5 A, B
NMJ, Larve (ANF-EMD)

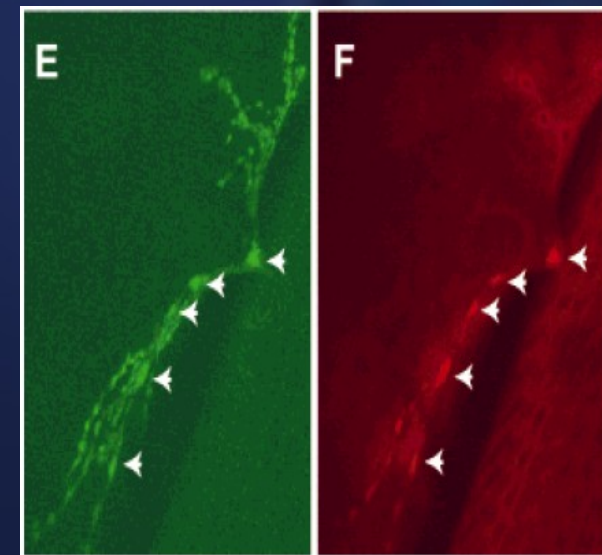
A) NMJ 6 / 7

B) NMJ 12

Figure 5 E, F
NMJ 12, Larve

E) NMJ 12 (ANF-EMD)

F) NMJ 12 (Insulin-like-Protein-ir)



6) Freisetzung von proANF-EMD

- Bei Zugabe von Ba^{2+} ist eine Fluoreszenzerniedrigung zu erkennen
- Quantitative Messung möglich

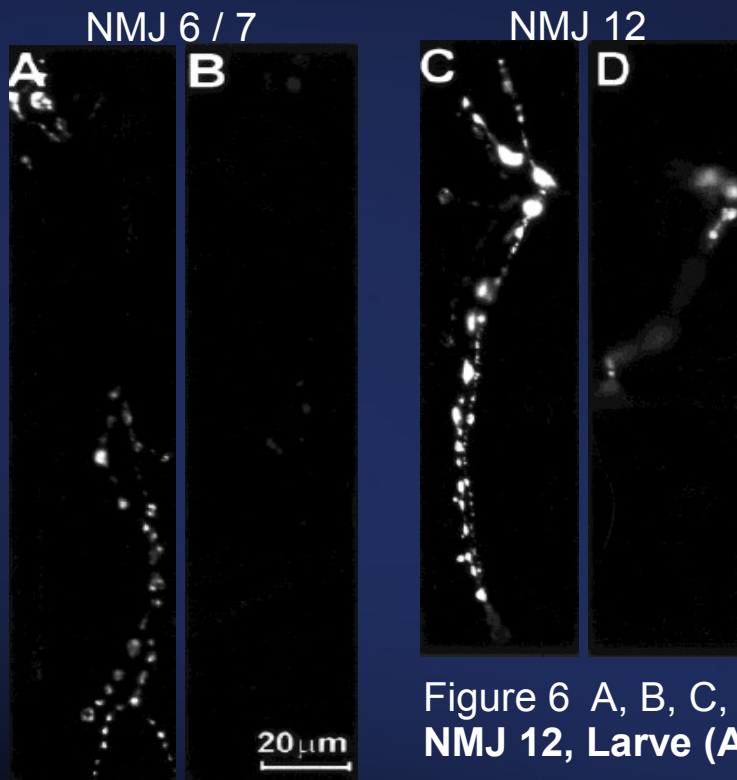
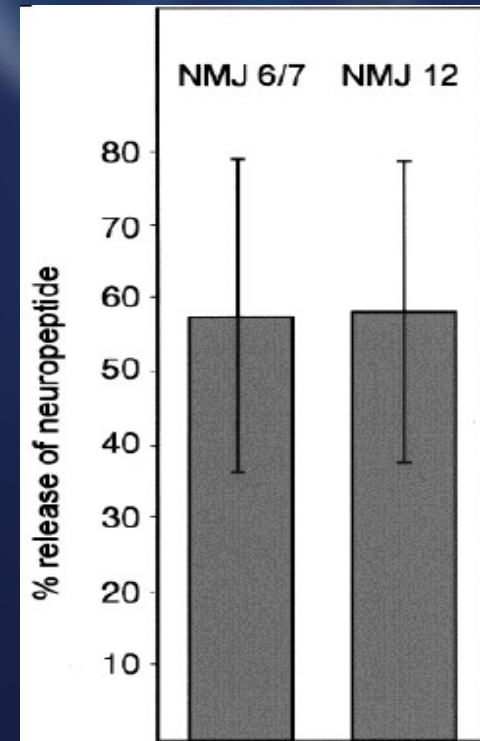


Figure 6 A, B, C, D
NMJ 12, Larve (ANF-EMD)

Figure 6 E
Erniedrigung der
Fluoreszenz nach
Zugabe von Ba^{2+}



Quellen

- Visualization of Neuropeptide Expression, Transport, and Exocytosis in *Drosophila melanogaster* – Rao et al., 2001 Neurobiol. 49 p.159 – 172
- Principles of Development – L. Wolpert, 3. Auflage, Spektrum Verlag
- Cell Biology – T. Pollard, W. Earnshaw, 2. Auflage, Spektrum Verlag
- Molecular Biology – D. Clark, 1. Auflage, Spektrum Verlag
- Tier- und Humanphysiologie – Müller, Frings, 4. Auflage, Springer Verlag

