

Diss. Nr. 6694

BIOCHEMISCHE, IMMUNCYTOLOGISCHE UND GENETISCHE  
UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER MUSKELTYPEN VON  
DROSOPHILA MELANOGASTER

ABHANDLUNG  
zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der  
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von  
LANG, ALOIS BERNHARD  
dipl.Natw. ETH  
geboren am 21. Juni 1951  
von Sursee (Kt. Luzern)

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. H.M. Eppenberger, Referent  
Prof. Dr. H. Moor, Korreferent

1980

## ZUSAMMENFASSUNG

Durch Immunfluoreszenzmarkierung konnte gezeigt werden, dass ein wesentliches Enzym des Muskelmetabolismus, die Argininkinase, in grossen Mengen im intermyofibrillären Raum in larvalen und adulten Skelettmuskeln vorkommt und dass aber auch ein Teil der Argininkinase in der Z-Linien-Region von larvalen und adulten fibrillären Muskeln und in der A-Banden-Region von adulten tubulären Muskeln lokalisiert ist. Isoenzyme der Argininkinase wurden keine gefunden. Die Untersuchungen der Zell- und Stadienspezifität der Argininkinase in Kultur zeigten, dass die Argininkinase ein charakteristisches Enzym terminaldifferenzierter myogener und neuraler Zellen darstellt. Argininkinase-Akkumulation konnte weiter in einem unbekanntem Zelltyp gefunden werden, der ein Vorläufer von adultem Gewebe sein könnte. Keine der untersuchten Mutationen mit Störungen in der Flugmuskulatur beeinflusste die Produktion von Argininkinase. Aber die Lokalisation der Argininkinase zeigte bei einigen Mutanten keine Z-Linien-Spezifität in den Flugmuskelfibrillen. Bei diesen zeigten sich auch Störungen in der intrazellulären Verteilung verschiedener durch Antiseren gegen Hühnermuskelproteine lokalisierten Muskelkomponenten. Diese Mutanten (int, rsd, up<sup>2</sup>, 1121, hdp<sup>2</sup>, 13) weisen Defekte in der Z-Linien-Struktur auf. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese konnte festgestellt werden, dass nur bei diesen sechs Mutanten drei Proteine (MW ca. 55'000 und zweimal ca. 100'000) nicht akkumuliert werden. Weitere Unterschiede im Proteinmuster, auch der übrigen drei untersuchten Mutanten (vtw<sup>2</sup>, 794, 448), werden diskutiert.

Untersuchungen der Aktinheterogenität im Muskelgewebe von Wildtyp-Fliegen zeigten, dass in adulten tubulären Muskeln,

neben den zwei zytoplasmatischen Aktinformen II und III, Aktin I erscheint. Die Aktinform I, die auch in myogenen Primärkulturen, im Hautmuskelschlauch von Larven, in larvaler und adulter Visceral- und adulter Abdominalmuskulatur nachgewiesen wurde, wird hingegen in fibrillären Flugmuskeln weder synthetisiert noch akkumuliert. Das Protein-Synthesemuster zeigte dagegen in diesem Muskel eine stabile Aktinform III. Die Mutante *rsd* bildet sowohl in frisch geschlüpften, wie auch in 5 Tage alten Fliegen in fibrillären Muskeln kein Aktin III. Da *rsd* keine Aktinfilamente bildet, wird vermutet, dass die bei Wildtyp gefundene stabile Aktinform III, die muskelspezifische Aktinform der fibrillären Muskeln darstellt. Diese Befunde zeigen aber auch eine differentielle Regulation der Aktinformen in adulten tubulären und fibrillären Muskeln. Da die Mutante *rsd* nicht in der Gegend der sechs kartierten Strukturgene für Aktin liegt, muss angenommen werden, dass der primäre Defekt von *rsd* Regulationsmechanismen von Aktin beeinflusst. Bei einer weiteren Mutante (1121), die aber noch nicht eingehend untersucht wurde, zeigte sich eine Störung im Aktin-Akkumulationsmuster.

## ABSTRACT

Immunofluorescence localization of arginine kinase, an essential enzyme of muscle metabolism in larval and adult muscles, indicates that most of the enzyme is located in the cytoplasm. However, localization of the arginine kinase on washed myofibrils shows that at least a fraction of the arginine kinase is bound to the Z-line region of larval muscle and adult fibrillar muscle and to the A-band region of adult tubular muscle. Isoenzymic forms of arginine kinase are not detectable. In embryonic cell cultures arginine kinase accumulates during terminal differentiation of myogenic and neurogenic cells. The expression of arginine kinase is also observed in an unidentified cell type which may be a precursor of adult tissue. Studies on mutations that affect the development and morphology of the flight muscles indicate no effect on the production of arginine kinase. But in several mutations, the localization of arginine kinase shows no Z-line specific fluorescence in fibrillar muscle myofibrils. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis of these mutations (*int*, *rsd*, *up*<sup>2</sup>, *1121*, *hdp*<sup>2</sup>, *13*) with aberrant Z-bands reveals that all of them exhibit reduced or no accumulation of three proteins (one of 55'000 and two of about 100'000 mol. wt.) in fibrillar muscles. Further differences in the protein patterns of these mutations and of the mutations *vtw*<sup>2</sup>, *794* and *448* are discussed.

The actin heterogeneity in muscle tissue of wild type flies is investigated. Actin II and an unstable actin III are cytoplasmic actins found in all *Drosophila* cell types studied to date. Actin I has previously been demonstrated in larval body wall muscles as well as in larval and adult visceral and adult abdominal muscles. It is shown here that actin I is also synthesized and accumulated in tubular muscles. In fibrillar

muscles, however, no actin I synthesis or accumulation is found, whereas there is accumulation of a stable actin form III. Analysis of the actin patterns of the mutation *rsd* reveals no synthesis of actin III in fibrillar muscles of 1 and 5 d old flies. As this mutation lacks thin filaments, it is assumed that the stable actin form III found in the wild type represents a form of muscle-specific actin unique to fibrillar muscles. These results suggest a differential regulation of the actin species in adult tubular and fibrillar muscles. As the location of the *rsd* gene does not correspond to the sites for the six localized actin structural genes, it is assumed that the regulation of actin III is affected.