

**Die Bedeutung von Kinesin-1 und Kinesin-3
basiertem Transport für die Entwicklung und
Stabilisierung von Synapsen in *Drosophila
melanogaster***

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Jeannine Viola Kern

aus Mühlacker

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

07.12.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

PD Dr. Bernard Moussian

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rolf Reuter

Ich danke,

PD Dr. Bernard Moussian und Prof. Dr. Rolf Reuter für die Betreuung meiner Dissertation;

Herrn Dr. Tobias Rasse für die Vergabe des Themas, die sehr gute Betreuung dieser Arbeit und die hervorragende Zusammenarbeit;

Dr. Heinz Schwarz, Jürgen Berger und Dr. Matthias Flötenmeyer für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung am Elektronenmikroskop;

allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Synaptische Plastizität, insbesondere Katharina J. Daub, Carola D. Schneider und Raphael S. Zinser für das tolle Arbeitsklima und stete Hilfsbereitschaft;

Florian Mayer fürs Korrekturlesen;

meiner Familie für die großartige Unterstützung und für ihre Geduld, besonders Sandra und Philip.



Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Die Bedeutung von Kinesin-1 und Kinesin-3 basierendem Transport für die Entwicklung und Stabilisierung von Synapsen in *Drosophila melanogaster*“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen (alternativ: Zitate) als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, im September 2012

Jeannine Viola Kern

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
TABELLENVERZEICHNIS.....	XI
ZUSAMMENFASSUNG ENGLISCH	XIII
ZUSAMMENFASSUNG DEUTSCH	XV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Synapsen.....	1
1.1.1 Die präsynaptische Membran und ihre Komponenten	2
1.1.2 Die postsynaptische Membran und ihre Komponenten.....	4
1.2 Axonaler Transport.....	4
1.3 Kinesine	5
1.3.1 Kinesin-1/KIF5.....	6
1.3.2 Kinesin-3/KIF1.....	8
1.4 <i>Drosophila</i> als Modellorganismus neurodegenerativer Erkrankungen	11
1.4.1 Hereditäre spastische Spinalparalyse.....	13
1.5 Fragestellung	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien	17
2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	18
2.1.3 Antikörper.....	18
2.1.4 Versuchstiere	19
2.1.5 Soft- und Hardware, spezielle Geräte.....	20
2.2 Methoden.....	21

2.2.1 Sequenzierung genomischer DNA	21
2.2.2 Klonierungen	24
2.2.3 Fliegenhaltung	31
2.2.4 Immunhistochemie	31
2.2.5 Analyse der sensorischen Neurone	32
2.2.6 Bildaufnahme und Analyse	32
2.2.7 Verhaltens-Assay	33
2.2.8 Probenvorbereitung für Elektronenmikroskopie am Axon	34
2.2.9 Probenvorbereitung für Elektronenmikroskopie an der NMJ	35
2.2.10 Analyse von synaptischen Vesikeln in elektronenmikroskopischen Aufnahmen	35
2.2.11 Statistische Analysen	36
3 ERGEBNISSE	37
3.1 Brisly Mutation	37
3.1.1 <i>Brisly</i> Mutanten haben Defekte in der Dendritenentwicklung und Synapsenmorphologie	37
3.1.2 <i>Brisly</i> Mutanten zeigen keine Retraktion an NMJs	40
3.1.3 <i>Brisly</i> ist ein Allel von <i>unc-104</i> , einem Mitglied der neuronalen Kinesin-3 Familie	41
3.1.4 <i>unc-104^{bris}</i> Larven sind charakterisiert durch Störungen in der Initiierung von Frachttransporten	45
3.1.5 <i>unc-104^{bris}</i> Larven sind durch larvale Bewegungsstörungen gekennzeichnet ..	48
3.1.6 Intakter <i>unc-104</i> basierter Transport ist essentiell um NMJ Wachstum zu begrenzen, unabhängig von der Synapsenfunktion	51
3.1.7 Veränderungen in der NMJ- und Bouton-Morphologie werden nicht indirekt durch den Verlust von Brp verursacht	54
3.2 Postsynaptische Veränderungen in <i>unc-104^{bris}</i> mutanten Larven	56
3.2.1 Reduzierte DLG Konzentration in <i>unc-104^{bris}/-</i> mutanten Larven	56
3.2.2 Veränderungen im SSR von <i>unc-104^{bris}/-</i> mutanten Larven	58
3.2.3 Veränderte Verteilung von Fas II und DLG in <i>unc-104^{bris}/-</i> mutanten Larven ...	59

3.3 Untersuchungen an der Kinesin-1 Mutante <i>khc</i> ^{N262S}	62
3.3.1 Auftreten von axonalen Akkumulationen in <i>khc</i> ^{N262S} mutanten Larven	62
3.3.2 Frachten in axonalen Akkumulationen	65
3.3.3 Neurodegeneration der NMJ in <i>khc</i> mutanten Larven	66
3.3.4 Degenerierte NMJs werden nicht vom Muskeln phagozytiert	73
3.3.5 Analyse von synaptischer Ultrastruktur	76
4 DISKUSSION	79
4.1 Eine neue Mutation in der FHA-Domäne von Unc-104 offenbart neue Aufgaben in der neuronalen Entwicklung	79
4.1.1 Dendritenreifung	80
4.1.2 Synapsenreifung	81
4.1.2 Strukturelle Defekte an der NMJ	81
4.2 Postsynaptische Veränderungen von Fas II, DLG und SSR	82
4.3 <i>Khc</i>	84
4.3.1 Axonale Schwellungen und Neurodegeneration an der NMJ	84
4.3.2 Möglicher Abbau der Neurodegeneration	86
4.4 Vergleich der Transportstörungen von Kinesin-1 und Kinesin-3	88
5 AUSBLICK	90
LITERATUR	93
ANHANG	101
VERÖFFENTLICHUNGEN	114
LEBENS LAUF	116

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
Abb	Abbildung
bris	brisly
Brp	Bruchpilot
CamKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein Kinases II
CAZ	Cytomatrix der aktiven Zone
CC	Coiled-Coil
CSP	Cystein String Protein
DLG	Discs Large
E	Glutamat
EM	Elektronenmikroskopie
Fas II	Fasciclin II
FHA	fork head-associated
GFP	Green Fluorescent Protein
GluR	Glutamatrezeptor
h	Stunde
H	Histidin
HL3	Hämolymp-ähnliche Salzlösung
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP	Hereditäre Spastische Spinalparalyse
kDa	Kilodalton
KHC	Kinesin heavy chain
KLC	Kinesin light chain
L	Leucin
LBD	Liprin-Binde-Domäne
M	Methionin
MAGUK	Membran-assoziierte Guanylyl-Kinasen
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MVK	Multivesikularen Körpern
N	Asparagin
NGS	Normal Goat Serum
NMJ	Neuromuskuläre Junktion
PFA	Paraformaldehyd

PH	Pleckstrin-Homologie Domäne
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate
PSD	Postynaptische Dichte
R	Arginin
rpm	round per minute
S	Serin
SPG	spatic paraplegia gene
SSR	Subsynaptisches Retikulum
SVV	synaptischen Vorläufervesikel
V	Valin
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau einer Synapse.....	2
Abbildung 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Synapse von <i>Drosophila</i> an einer neuromuskulären Verbindung	3
Abbildung 3 Struktur von Kinesin-1	6
Abbildung 4 Monomerer und dimerer Zustand von Kinesin-3.....	9
Abbildung 5 Struktur von Kinesin-3.....	10
Abbildung 6 Aufbau einer NMJ von <i>Drosophila</i>	13
Abbildung 7 <i>Brisly</i> Mutanten sind durch Defekte bei der Bildung von dendritischen Filopodien charakterisiert	38
Abbildung 8 <i>Brisly</i> Mutanten sind durch Defekte an der Synapse charakterisiert	39
Abbildung 9 Keine Retraktion an Synapsen von <i>bris</i> mutanten Larven erkennbar	40
Abbildung 10 <i>Brisly</i> enthält eine Punktmutation in der FHA-Domäne von <i>unc-104</i> , einem Mitglied der Kinesin-3 Familie	42
Abbildung 11 Verteilung von Unc-104 in <i>unc-104^{bris}</i> Larven	43
Abbildung 12 Pan-neuronale Expression von <i>unc-104^{mCherry}</i> rettet die beobachteten Defekte in <i>unc-104^{bris}</i> Larven	44
Abbildung 13 Ektopische Expression von <i>unc-104^{mCherry}</i> rettet die auftretenden Defekte an Dendriten.....	45
Abbildung 14 Verteilung von neuronalen Proteinen im Ventralganglion von <i>unc-104^{bris}/-</i> Larven	46
Abbildung 15 Keine axonalen Schwellungen wurden in <i>unc-104^{bris}</i> mutant Larven beobachtet.....	48
Abbildung 16 Beeinträchtigte larvale Bewegungsaktivität bei <i>unc-104^{bris}</i> mutanten Larven	49
Abbildung 17 Körperhaltungsdefekt bei <i>unc104^{bris}/-</i> Larven	50
Abbildung 18 Veränderte Morphologie an der NMJ von <i>unc-104^{bris}/-</i> Larven.....	52
Abbildung 19 Rescue der morphologischen Veränderungen durch pan-neuronale Expression von <i>unc-104^{mCherry}</i>	54
Abbildung 20 Veränderte Mengen von Brp ändern nicht die NMJ-Morphologie von <i>unc-104^{bris}/-</i> Mutanten	56
Abbildung 21 Reduzierte DLG Expression in <i>unc-104^{bris}/-</i> mutanten Larven	57
Abbildung 22 Veränderungen im SSR von <i>unc-104^{bris}/-</i> mutanten Larven sind im Elektronenmikroskop erkennbar	59

Abbildung 23 Veränderte Fas II und DLG-GFP Verteilung in <i>unc-104^{bris}/-</i> mutanten Larven	61
Abbildung 24 Nerv mit leeren Axonen	63
Abbildung 25 Nerv mit neuer Methode	64
Abbildung 26 Charakterisierung von axonalen Schwellungen	65
Abbildung 27 NMJ Degeneration in <i>Khc</i> mutanten Larven.	67
Abbildung 28 Fortschreitende Degeneration an der NMJ von <i>khc</i> Mutanten	69
Abbildung 29 Detailübersicht von Abbildung 28B	70
Abbildung 30 Detailübersicht von Abbildung 28D	71
Abbildung 31 Detailübersicht von Abbildung 28J,K,L	72
Abbildung 32 Keine erhöhte Phagozytose an der NMJ durch den Muskel	75
Abbildung 33 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Synapse	76
Abbildung 34 Verteilung von synaptischen Vesikeln	77
Abbildung 35 Vergleich der Transportstörungen in Kinesin-1 und Kinesin-3	89
Abbildung 36 Vektorkarte von pEGFP-C1 von Clontech	101
Abbildung 37 Vektorkarte von pC1 MCS	101
Abbildung 38 Vektorkarte von pC1 <i>unc-104-A</i>	102
Abbildung 39 Vektorkarte von Order 1 von Mr.Gene	102
Abbildung 40 Vektorkarte von pC1 <i>unc-104-AB</i>	103
Abbildung 41 Vektorkarte von pC1 <i>unc-104</i>	103
Abbildung 42 Vektorkarte von pUAST attB	104
Abbildung 43 Vektorkarte von pUAST attB <i>unc-104</i>	105
Abbildung 44 Vektorkarte von pC1 <i>venus unc-104</i>	106
Abbildung 45 Vektorkarte von pUAST attB <i>venus unc-104</i>	107
Abbildung 46 Vektorkarte von pC1 <i>unc-104^{bris}</i>	108
Abbildung 47 Vektorkarte von pC1 <i>turquoise unc-104^{bris}</i>	109
Abbildung 48 Vektorkarte von pUAST attB <i>turquoise unc-104^{bris}</i>	110
Abbildung 49 Vektorkarte von pUAST attB <i>venus unc-104^{HSP}</i>	111
Abbildung 50 Vektorkarte von pC1 <i>unc-104^{HSP}</i>	112
Abbildung 51 Vektorkarte von pUAST attB <i>unc-104^{HSP}</i>	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete primäre Antikörper	18
Tabelle 2 Verwendete sekundäre Antikörper	19
Tabelle 3 Verwendete Versuchstiere	19
Tabelle 4 Verwendete Primer zur Sequenzierung	24

Verwendete Hilfen

Der erste Teil dieser Arbeit über Unc-104 wurde teilweise aus dem folgenden Manuskript ins Deutsche übernommen:

A new mutation in Unc-104 reveals novel roles in regulating dendrite and axon maturation

Jeannine V. Kern, Yao V. Zhang, Stella Kramer, Jay E. Brenman, Tobias M. Rasse

Der zweite Teils dieser Arbeit über *khc*-Mutanten wurde teilweise aus dem folgenden akzeptierten Manuskript ins Deutsche übernommen:

Spastic Paraplegia Mutation N256S in the Neuronal Microtubule Motor KIF5A Disrupts Axonal Transport in a *Drosophila* HSP Model

Petra Füger*, Vrinda Sreekumar*, Rebecca Schüle*, Jeannine V. Kern*, Doychin T. Stanchev, Carola D. Schneider, Kathrin N. Karle, Katharina J. Daub, Vera K. Siegert, Matthias Flötenmeyer, Heinz Schwarz, Ludger Schöls, Tobias M. Rasse

* contributed equally

Die ursprüngliche Sequenzierung zur Identifizierung von *bristly* wurde von Stella Kramer durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierungen in Abb. 10 wurden von mir durchgeführt.

Die für Abbildung 20 ausgewerteten Larven wurden von Yao V. Zhang präpariert und von mir erneut an einem anderen Muskel aufgenommen und ausgewertet.

Die für Abbildung 32 verwendeten Aufnahmen stammen von Vrinda Sreekumar.

Alle elektronenmikroskopischen Ultradünnschnitte wurden entweder von Jutta Bloschies oder Raphael S. Zinser angefertigt.

Zusammenfassung englisch

Intact fast anterograde transport is imperative both for proper neurodevelopment as well as to protect synapses against degeneration. In this study I investigate the diverse effects of mutations in the two major anterograde motors: The kinesin-3 family member Unc-104 and the kinesin-1 family member KIF5A. Interestingly mutations in both motors have been associated with hereditary spastic paraplegia (HSP).

HSPs comprise a group of inherited motorneuron diseases. The main feature of HSP is the progressive stiffness of the lower limbs due to a dysfunction of nerve cells. Hereby, the kinesin-3 family member *unc-104* is the *Drosophila* homolog of *kif1a*, the *spastic paraplegia gene 30 (SPG30)*, the kinesin-1 family member *khc* is the homolog of *kif5a*, the *SPG10* gene.

In an anatomical screen of neurodevelopmental mutants, I identified *unc-104^{bris}* as a novel mutation in *unc-104*. *unc-104* has been shown to be important for fast axonal transport of synaptic components and maturation of embryonic synaptic boutons. *Unc-104^{bris}* is a point mutation in a conserved residue (R561H) in the FHA domain of Unc-104. This mutation does not decrease protein abundance but does lead to functional impairment in the *unc-104* loss of function mutant, most likely by affecting the regulation of kinesin activity, which is important for energy coupled cargo loading. Using this subtle mutation I was able to uncover novel cellular functions of Unc-104 in *Drosophila*. I show that Unc-104 coordinates presynaptic maturation of neighboring active zones at the neuromuscular junction, possibly by controlling site specific delivery of its cargoes. Next, I identified a role for Unc-104 in restricting NMJ growth and dendrite branch stability, suggesting the involvement of Unc-104 in dendritic transport. Additionally, changes in the subsynaptic reticulum were observed. These novel functions together with the previously described roles highlight that kinesin-3 function is critically important for the maturation of neuronal structures, both during embryonic development and later during larval neuromuscular junction formation and dendrite branch stability. Although the investigated mutations in the kinesin-3 did cause severe neurodevelopmental defects, no

neurodegeneration was observed. Future work will have to show whether HSP associated mutations recently identified in *unc-104* lead to a similar neurodevelopmental defects as observed by me, or whether they trigger neurodegeneration.

I next investigated axonal transport defects caused by the ectopic expression of disease associated mutations in *khc*. To this aim the mutation N256S in the *SPG10* gene *kif5a* was selected, which has previously been shown to affect transport velocity but not microtubule binding affinity. Ectopic expression of *Drosophila khc* carrying this human mutation is sufficient to disturb axonal transport and to induce motoneuron disease in *Drosophila*. Impairments in the transport of kinesin-1 cargos lead to axonal swellings and neurodegeneration of synapses. Focus of this study was hereby, to investigate ultrastructural alterations that occur in this SPG10 HSP model. Axonal swellings are an important cellular hallmark of the human disease. In *Drosophila khc* null mutants axons have increased diameter up to ten-fold within a micron. Indeed I was able to confirm that ectopic expression of *khc*^{N256S} is sufficient to cause the formation of axonal swellings. Interestingly cargo of both anterograde and retrograde transport accumulate inside swellings. The presence of large autolysosomes organelles is indicative of ongoing degeneration. Indeed examination of synaptic terminals revealed that while no major developmental disturbances of synapse morphology were observed, dystrophic boutons were frequently detected.

Zusammenfassung deutsch

Schneller anterograde Transport ist sowohl für die richtige Entwicklung des Nervensystems als auch für den Schutz der Synapsen vor Degeneration unerlässlich. In dieser Arbeit untersuche ich die vielfältigen Effekte von Mutationen in den beiden wichtigsten anterograden Motoren: Dem Kinesin-3 Mitglied Unc-104 und dem Kinesin-1 Mitglied Khc. Interessanterweise sind Mutationen in beiden Motoren mit hereditärer spastischer Spinalparalyse (HSP) in Verbindung gebracht worden.

HSP umfasst eine Gruppe von erblichen neurologischen Krankheiten. Das Hauptmerkmal der HSP ist die progressive Spastik der unteren Gliedmaßen aufgrund von Funktionsstörungen in Nervenzellen. Dabei ist das Kinesin-3 Mitglied *unc-104* das *Drosophila* Homolog von *kif1a*, dem *Spastischen Paraplegie Gen 30 (SPG30)*. Das Kinesin-1 Mitglied *khc* ist das Homolog von *kif5a*, dem *SPG10* Gen.

In einem anatomischen Screen von neurologischen Mutanten konnte *unc-104^{bris}* als neue Mutation in *unc-104* identifiziert werden. Von *unc-104* wurde gezeigt, dass es für den schnellen axonalen Transport der synaptischen Komponenten und Reifung von embryonalen synaptischen Boutons wichtig ist. *Unc-104^{bris}* ist eine Punktmutation (R561H) in einem vollständig konservierten Bereich der FHA-Domäne von *unc-104*. Diese Mutation führt nicht zu einer Reduzierung der Proteinmenge, jedoch kommt es zu Beeinträchtigungen der Proteinfunktionen in *unc-104* Loss-of-Function Mutanten. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch eine Beeinträchtigung der Regulation der Kinesinaktivität, welche für das energiegekoppelte Beladen von Frachten wichtig ist. Es konnten neue zelluläre Funktionen von Unc-104 in *Drosophila* beschrieben werden. Zudem konnte beobachtet werden, dass Unc-104 die präsynaptische Reifung von benachbarten einzelnen Synapsen an der neuromuskulären Verbindung koordiniert, möglicherweise durch die ortsspezifische Auslieferung seiner Ladung an definierte Synapsen. Desweiteren wurde eine Rolle für Unc-104 bei der Regulation des Wachstums der NMJ und der Stabilität der dendritischen Äste identifiziert, was auf eine Beteiligung von Unc-104 am dendritischen Transport hindeutet. Zusätzlich konnte eine Veränderung des subsynaptischen

Retikulums beobachtet werden. Diese neuen Funktionen zusammen mit der zuvor beschriebenen Rollen hebt die bedeutende Funktion von Kinesin-3 bei der Reifung neuronaler Netzwerke hervor, sowohl während der Embryonalentwicklung als auch später während der Bildung larvaler neuromuskulärer Verbindungen und bei der Stabilität der dendritischen Äste. Obwohl die untersuchten Mutationen im Kinesin-3 zu schweren neurologischen Defekten führten, wurde keine Neurodegeneration beobachtet. Zukünftige Arbeiten werden zeigen müssen, ob HSP-assoziierte Mutationen, die erst kürzlich in *unc-104* identifiziert wurden, zu ähnlichen neurologischen Defekten wie den von mir beobachteten führen oder ob sie Neurodegeneration auslösen.

Desweiteren wurden axonale Transportdefekte untersucht, die durch die ektopische Expression von einer Krankheits-assoziierten Mutation in *khc* hervorgerufen wurden. Zu diesem Zweck wurde die Mutation N256S im *SPG10* Gen *kif5a* gewählt, von der gezeigt wurde, dass sie die Transportgeschwindigkeit des Kinesins beeinflusst, aber nicht die Mikrotubulaffinität. Ektopische Expression von *Drosophila khc*, welche diese humane Mutation trägt, ist ausreichend um axonalen Transport zu stören und motoneuronale Erkrankungen in *Drosophila* hervorzurufen. Beeinträchtigungen im Transport von Kinesin-1 Frachten führen zu axonalen Schwellungen und Degeneration von Synapsen. Schwerpunkt dieser Studie war es, die ultrastrukturellen Veränderungen, die in diesem SPG10 Modell auftreten zu untersuchen. Axonale Schwellungen sind ein wichtiges zelluläres Kennzeichen der menschlichen Krankheit. In *Drosophila khc* Nullmutanten können Axone einen bis zu 10-fach größeren Durchmesser aufweisen. Tatsächlich konnte bestätigt werden, dass die ektopische Expression von *khc*^{N256S} ausreichend ist um axonale Schwellungen hervorzurufen. Interessanterweise reichern sich in den Schwellungen sowohl Frachten des anterograden als auch des retrograden Transports an. Das Vorhandensein großer, autolysosomaler Organellen weist auf eine anhaltende Degeneration hin.

1 Einleitung

1.1 Synapsen

Synapsen sind spezialisierte, interzelluläre Kontaktstellen, welche für die schnelle Transmission von Signalen zwischen Neuronen und ihren Zielzellen benötigt werden (Kittel et al., 2006). Es gibt zwei verschiedenen Arten von Synapsen: elektrische und chemische Synapsen.

Elektrische Synapsen ermöglichen den direkten Übergang von elektrischen Signalen, da die beteiligten Zellen über Kanäle in der Zellmembran (Gap Junctions) verbunden sind. In Wirbeltieren und den meisten Wirbellosen sind chemische Synapsen jedoch häufiger vertreten (Campbell Biologie 2000).

Bei den chemischen Synapsen werden ankommende elektrische Signale schnell und effizient in chemische Signale umgewandelt. Strukturell sind Synapsen unterteilt in einen vom Neuron gebildeten präsynaptischen Bereich, in dem sich synaptische Vesikel befinden und einen postsynaptischen Teil der von der Zielzelle z.B. Neuron oder Muskelzellen erzeugt wird. Dazwischen befindet sich der synaptische Spalt. Durch die unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften des prä- und postsynaptischen Bereichs erfolgt die Weiterleitung der Signale in der Regel unidirektional.

Chemische Kommunikation findet über die Fusion von neurotransmittergefüllten synaptischen Vesikeln statt, die mit der präsynaptischen Membran verschmelzen und Rezeptoren an der postsynaptischen Membran aktivieren. Die Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran findet nur an einem spezialisierten Bereich der Plasmamembran, der sogenannten aktiven Zone statt (Schoch and Gundelfinger, 2006). Gegenüber der aktiven Zone befindet sich die postsynaptische Dichte (PSD). In ihr sind Ionenkanäle und Neurotransmitterrezeptoren lokalisiert (Abb.1).

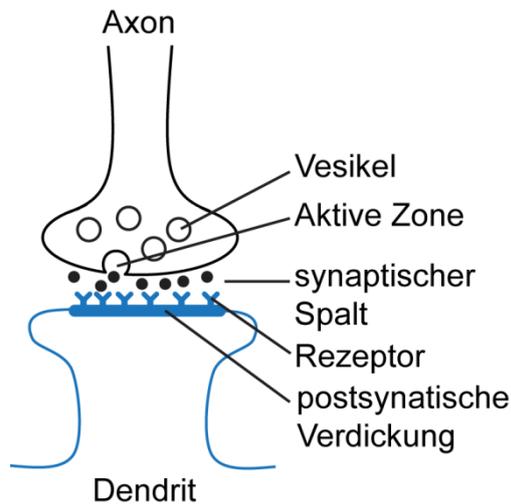


Abbildung 1 Schematischer Aufbau einer Synapse

Der obere schwarze Teil stellt die präsynaptische Seite dar, der untere blaue Bereich ist die postsynaptische Seite. Durch die Verschmelzung der Vesikel an der präsynaptischen Membran werden die Vesikel in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und können an der postsynaptischen Membran an die Rezeptoren anlagern.

1.1.1 Die präsynaptische Membran und ihre Komponenten

Die aktive Zone wird von einem Proteinnetzwerk gebildet, der sogenannten Cytomatrix aktiver Zonen (CAZ). Die CAZ ist eine besonders elektronendichte Struktur und hat in verschiedenen Organismen eine unterschiedliche Form. So bildet sie in *Drosophila* eine charakteristische T-Form (Abb. 2), in sacculären Haarzellen von Fröschen ist sie kreisförmig und bei Menschen bildet sie im Hippocampus z.B. eine pyramidale Form (Zhai and Bellen, 2004). Die CAZ koordiniert die Freisetzung der Neurotransmitter an der Membran der aktiven Zonen. Hierbei wird durch sie der Transport und die Verankerung synaptischer Vesikel, das Heranschaffen synaptischer Moleküle zur aktiven Zone und die Organisation der präsynaptischen Struktur erreicht.

In Säugetieren konnten die Proteine Piccolo und Bassoon bereits in einer sehr frühen Phase der Synapsenbildung an der CAZ identifiziert werden. Da es sich bei diesen beiden Proteinen um sehr große (530 und 420 kDa) Proteine handelt und beide viele Interaktionsdomänen enthalten, wird davon ausgegangen, dass es sich um Gerüstproteine handelt (Garner et al., 2000). Ähnliche Funktionen werden RIM1 (Rab3 interagierendes Protein) und CAST/ERC zugeschrieben

(Ziv and Garner, 2004, Schoch and Gundelfinger, 2006). Das CAST-Protein (CAZ-assoziiertes Strukturprotein) ist angereichert in aktiven Zonen und interagiert wiederum mit vielen anderen CAZ-Proteinen (Ohtsuka et al., 2002, Takao-Rikitsu et al., 2004), wie z.B. Bassoon (Khimich et al., 2005, tom Dieck et al., 2005) und Piccolo (Fenster et al., 2000). In *Drosophila* konnte als CAST-Homolog Bruchpilot (Brp) identifiziert werden (Wagh et al., 2006). Desweiteren sind in der CAZ spannungsabhängige Kalziumkanäle und Zelladhäsionsmoleküle lokalisiert (Schoch and Gundelfinger, 2006).

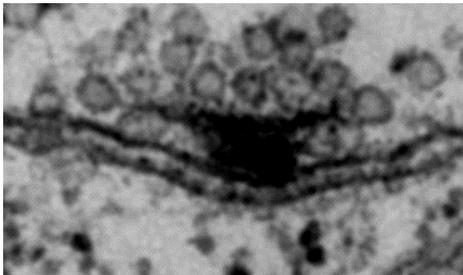


Abbildung 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Synapse von *Drosophila* an einer neuromuskulären Verbindung

Auf der präsynaptischen Seite ist deutlich die T-förmige CAZ zu erkennen, sie ist umgeben von Vesikeln.

Liprin- α ist ein weiteres wichtiges Protein, welches für die Synapsenbildung von Bedeutung ist. Liprin- α interagiert z.B. direkt mit CAST (Dai et al., 2006). In *C.elegans* wurde gezeigt, dass das Liprin Homolog Syd-2 genetisch mit Syd-1 interagiert und mehrere synaptische Proteine zur aktiven Zone rekrutiert (Dai et al., 2006, Patel et al., 2006). Desweiteren clustert und aktiviert Syd-2 in *C.elegans* Kinesin-3 (unc-104) (Wagner et al., 2009).

Weitere wichtige Proteine für die Signaltransduktion sind Proteine, die mit der synaptischen Vesikelfreisetzung assoziiert sind, wie v- und t-SNAREs. Kommt es durch Depolarisation der präsynaptischen Membran zum Einstrom von Kalzium erfolgt die Freisetzung des Vesikelinhalts. Es wird ein sogenannter SNARE-Komplex aus Vesikel- (Synaptobrevin) und Zellmembranproteine (SNAP-25 und Syntaxin) gebildet, welcher Vesikel an Zellmembranen bindet. Das einströmende Kalzium bindet an das Vesikelprotein Synaptotagmin. Durch Interaktion mit dem SNARE-Komplex wird die Vesikelfusion mit der Membran ausgelöst (Jahn et al., 2003, Sudhof, 2004, Lang and Jahn, 2008).

1.1.2 Die postsynaptische Membran und ihre Komponenten

In der PSD sind die Ionenkanäle und Neurotransmitterrezeptoren lokalisiert. Bei den exzitatorischen Synapsen des zentralen Nervensystems handelt es sich meist um glutamaterge Synapsen. Nach der Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat bindet dieser auf der postsynaptischen Membran an metatrophe und ionotrope Glutamatrezeptoren. Zu den ionotropen Rezeptoren zählen AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren. In *Drosophila* sind die Glutamatrezeptoren den NMDA-Rezeptoren sehr ähnlich (Heckmann und Dudel, 1997). Es konnten in *Drosophila* fünf verschiedene Glutamatuntereinheiten identifiziert werden. Der tetramere Rezeptor besteht immer aus den Untereinheiten GluR IIC, IID und IIE sowie entweder IIA oder IIB (Qin et al., 2005).

Die PSD ist am Vernetzen und Verankern der postsynaptischen Rezeptoren und Ionenkanäle beteiligt. Innerhalb der PSD sind Gerüstproteine, welche eine PDZ-Domäne enthalten, zahlreich vertreten (Walikonis et al., 2000). Zu ihnen zählen PSD-95 (Post synaptisches Dichteprotein 95) und SAP97 (Synapsen assoziiertes Protein 97), welches beide Membran-assoziierte Guanylyl-Kinasen (MAGUK) sind.

1.2 Axonaler Transport

Ein typisches Neuron besteht aus Zellkörper, mehreren kurzen, dickeren Dendriten und einem langen, dünnen Axon. Die meisten Proteine, die im Axon und an den Synapsen benötigt werden, werden im Zellkörper synthetisiert und entlang des Axons in Membranorganellen oder Proteinkomplexen transportiert (Grafstein and Forman, 1980).

In Axonen und Dendriten verlaufen Mikrotubuli in longitudinaler Orientierung und dienen als Schienen, auf denen Membranorganellen und molekulare Komplexe transportiert werden können (Hirokawa, 1998). Mikrotubuli sind röhrenförmige Strukturen, welche aus alternierenden α - und β -Tubulin-

Untereinheiten aufgebaut sind. Durch die bestimmte Anordnung der α - und β -Untereinheiten besitzen die Mikrotubuli eine Polarität mit einem Plus- und einem Minusende. Diese Polarität ist für die Wachstums- und Bewegungsrichtung von Bedeutung (Wehner et al., 2007). Im Axon weist das Plusende der Mikrotubuli immer zur Zellperipherie, in Dendriten kommt es zu einer gemischten Orientierung der Mikrotubuli.

Molekulare Motoren der Kinesin- und Dynein-Superfamilie bewegen sich entlang der Mikrotubuli. Viele Kinesine bewegen sich in Richtung Plusende und stellen so den anterograden Transport dar. Sie transportieren selektiv Moleküle vom Zellkörper zum Axon oder Dendrit. Der retrograde Transport vom Axon oder Dendrit zum Zellkörper wird hauptsächlich durch zytoplasmatisches Dynein ausgeführt, welches sich in Richtung Minusende der Mikrotubuli bewegt (Hirokawa and Takemura, 2005).

Axonaler Transport kann in schnellen und langsamen Transport klassifiziert werden. Schneller axonaler Transport tritt in anterograder und retrograder Richtung auf und beinhaltet den Transport von membrangebundenen Organellen, Mitochondrien, Neurotransmitter, Kanalproteine, multivesikulären Körpern (MVK) und Endosomen. Im Gegensatz dazu werden Zytoskelett-Komponenten wie Neurofilamente, Tubulin oder Aktin und auch Proteine wie Clathrin und zytosolische Enzyme mit langsamen Transportgeschwindigkeiten befördert (Shah and Cleveland, 2002).

1.3 Kinesine

Die Kinesin-Superfamilie besteht aus 45 humanen *kif* Genen, welche in 14 Unterfamilien eingeteilt sind. Alle KIFs haben eine hoch konservierte globuläre Motordomäne mit einer Mikrotubuli-Bindestelle und einer ATPase-Funktion. Außerhalb der Motordomäne besitzen die einzelnen Kinesinfamilien eine einzigartige Sequenz. Aufgrund dieser in jeder Kinesinunterfamilie unterschiedlichen Sequenz können Kinesine viele verschiedene Frachten

binden und transportieren (Hirokawa and Takemura, 2005). Mit Hilfe der ATPase-Funktion können die Kinesine durch Spaltung von ATP chemische Energie in mechanische Energie umwandeln und so an den Mikrotubuli entlang wandern (Verhey and Hammond, 2009).

Kinesine sind beim axonalen Transport von Frachten wie synaptischen Vorläufervesikeln (SVV) (KIF1A/KIF1B β), präsynaptischen Membranen oder aktive Zonen Vesikel (KIF5A), Mitochondrien (KIF1B α /KIF5), APP-enthaltende Vesikel (KIF5), APOER2 Vesikel (KIF5) und Plasmamembran Vorläufer (KIF3) (Hirokawa, 2011) beteiligt.

1.3.1 Kinesin-1/KIF5

Kinesin-1 oder das sogenannte konventionelle Kinesin wurde als erstes Mitglied der Kinesin-Superfamilie entdeckt. Kinesin-1 setzt sich aus zwei schweren und zwei leichten Ketten (Kinesin heavy chain (KHC) bzw. Kinesin light chain (KLC)) zusammen und bildet so ein Heterotetramer (Diefenbach et al., 2002). Die schwere Kette enthält die Motordomäne und ist für die Motorfunktion verantwortlich. Die leichten KLC-Untereinheiten interagieren mit den Endbereichen der schweren Ketten und dienen der Regulation der Aktivität der Kinesine (Abb.3). Zusätzlich können sowohl über die schweren als auch über die leichten Untereinheit Frachten an das Kinesin gebunden werden (Gindhart et al., 1998).

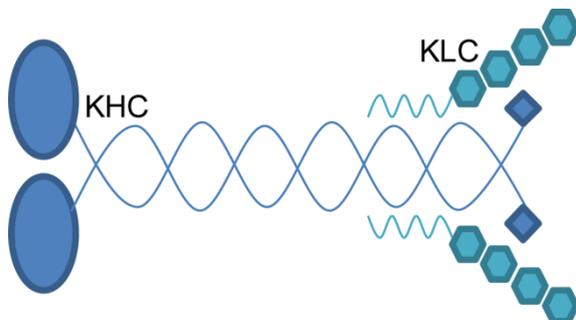


Abbildung 3 Struktur von Kinesin-1

Aufbau des Kinesin-1 als Tetramer aus den Untereinheiten KHC und KLC.

Für die schwere und die leichte Kette des konventionellen Kinesin gibt es im humanen Genom je drei Gene (*kif5a*, *kif5b* und *kif5c* bzw. *klc1*, *klc2* und *klc3*), in *Drosophila* dagegen codiert jeweils nur ein Gen für die schwere (*khc*) und die leichte Kette (*klc*).

Genau wie KIF1A kann KIF5A über 1 µm entlang am Mikrotubulus laufen ohne sich zu lösen. Khc läuft durchschnittlich 2 µm pro Transportereignis (Pilling et al., 2006). Die hohe Prozessivität erreichen sie durch einen „hand-over-hand“ Mechanismus. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von KIF5 konnte gezeigt werden, dass zwei Kinesin-Köpfe nahe am Ende einer Coiled-Coil-Struktur positioniert sind. Aus diesem Grund können Kinesin-Dimere zwei Köpfe benutzen um an den Mikrotubulus zu binden. Das hand-over-hand-Modell geht davon aus, dass diese zwei Köpfe alternieren und somit das Kinesin während dem Fortbewegen immer mit einem Kopf an den Mikrotubulus gebunden ist (Hirokawa et al., 2009).

KIF5A ist für den Mitochondrien-Transport wichtig (Karle et al., 2012). Außerdem transportieren sie Membranorganellen wie Syntaxin 1 oder SNAP25 und auch Vorläufervesikel, welche Synaptotagmin und Synaptobrevin enthalten (Pilling et al., 2006, Hirokawa et al., 2009).

Loss-of-function Mutationen in den schweren Ketten von *Drosophila* führen zu axonalen Schwellungen um das mehr als 10-Fache des normalen Axondurchmessers. Die Schwellungen sind sowohl mit Frachten des schnellen anterograden Transports als auch des retrograden Transports gefüllt. Bei der Fracht handelt es sich unter anderem um Mitochondrien, kleine Vesikel, membrangebundene Organellen und synaptische Membranproteine (Saxton et al., 1991, Hurd and Saxton, 1996). Zusätzlich verursacht diese Mutation Störungen im Wachstums und der Funktion der neuromuskulären Endplatte. Bei einem Funktionsverlust des Kinesins scheint es zu einer generellen Unterbrechung des schnellen, axonalen Transports zu kommen. Diese wiederum führt zu Dystrophie des Neurons, längenabhängigen Störungen der Neurotransmission und fortschreitender distaler Parese. Diese beobachteten Effekte ähneln denen, die bei Motoneuron-assoziierten Krankheiten bei Menschen beschrieben sind (Hurd and Saxton, 1996, Salinas et al., 2008).

In *Drosophila*-Larven führt die Mutation zu einem „Tail-Flip“ Phänotyp. Der frühe Verlust der Motoneuronenaktivität in den ventral-posterioren Segmenten verursacht ein Ungleichgewicht bei der Muskelkontraktion, was dazu führt, dass die Larve bei Bewegung rhythmisch ihren Schwanz nach oben bewegt (Hurd and Saxton, 1996).

Bei Mutationen in den leichten Ketten des Kinesin kommt es zu einem ähnlichen Phänotyp. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die schweren als auch die leichten Ketten für die Funktion des Kinesins verantwortlich sind. Die leichten Ketten dienen als positive Unterstützung bei der Frachtbindung und spielen zusätzlich eine Rolle bei der negativen Regulierung der Kinesinaktivität (Gindhart et al., 1998).

1.3.2 Kinesin-3/KIF1

KIF1A und das Homolog in *Caenorhabditis elegans* Unc-104 waren die ersten Mitglieder der Kinesin-3 Familie, die identifiziert wurden. Charakteristisch für die Kinesin-3 Familie ist eine Schleife positiv geladener Lysine (K-Loop) in der Motordomäne, sowie eine fork head-associated (FHA-)-Domäne C-terminal der Motordomäne (Westerholm-Parvinen et al., 2000). FHA-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen in Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren (Hofmann and Bucher, 1995). Desweiteren besitzt Unc-104 eine Pleckstrin-Homologie (PH-)-Domäne, die am C-terminalen Ende gelegen ist. Diese PH-Domäne ist nicht in allen Mitgliedern der Kinesin-3 Familie enthalten. Das *Drosophila*-Homolog Imac/Unc-104, das *C. elegans* Homolog Unc-104 und die humanen Kinesine KIF1A und KIF1B β besitzen diese Domäne (Pack-Chung et al., 2007). Die in Kinesinen enthaltenen PH-Domänen vermitteln die spezifische Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PI(4,5)P₂), bei PI(4,5)P₂ handelt es sich um Phospholipide der Membran (Klopfenstein et al., 2002). Ferner besitzt das *Drosophila*-Homolog und auch KIF1A zwischen der FHA- und PH-Domäne eine Liprin-Binde-Domäne (LBD) (Abb.4). Mit Hilfe von Liprin-

α kann KIF1A an verschiedene Liprin- α -assoziierte Proteine binden und somit für ihren Transport ins Neuron sorgen (Shin et al., 2003).

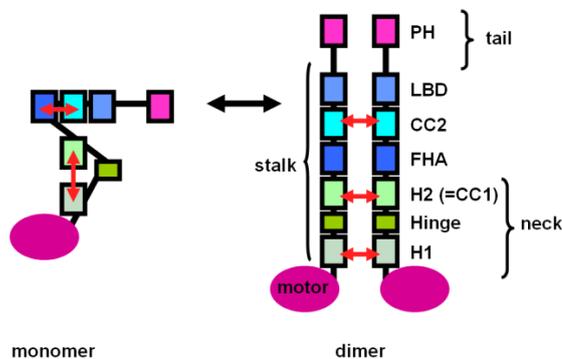


Abbildung 4 Monomerer und dimerer Zustand von Kinesin-3

Die roten Pfeile deuten Interaktionen zwischen den verschiedenen Domänen an. PH, Pleckstrin-Homologie Domäne; LBD, Liprin-Binde-Domäne; CC, Coiled-Coil-Domäne

In KIF1A und KIF1B β können RAB3 Proteine über ein Adaptorprotein (Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activating death Domäne MADD) binden (Hirokawa et al., 2009).

Studien über KIF1A zeigen, dass ein einzelnes KIF1A Monomer sich am Mikrotubulus entlang bewegen kann. Die Bewegung erfolgt mit Hilfe einer elektrostatischen Interaktion zwischen dem K-Loop in der Motordomäne und dem C-terminalen E-Hook von Mikrotubuli. Diese Interaktion erlaubt es, dass sich KIF1A über eindimensionale Diffusion zur nächsten Bindestelle bewegt, ohne sich vom Mikrotubulus zu lösen (Hirokawa et al., 2009). Diese monomere Bewegungsweise konnte auch bei monomeren KIF5 beobachtet werden (Hirokawa et al., 2009).

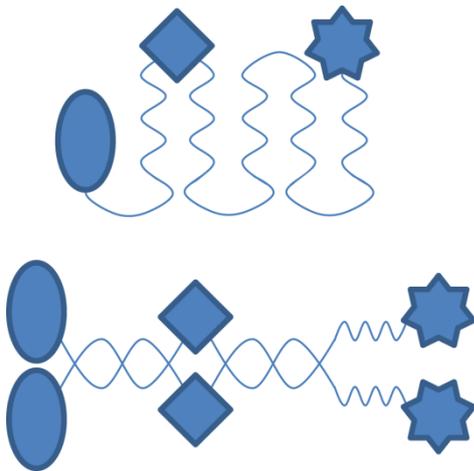


Abbildung 5 Struktur von Kinesin-3

Struktur des Kinesin-3 Monomers und Dimers.

Des Weiteren ist es möglich, dass sich Dimere von KIF1A bilden und diese wie KIF5 durch den hand-over-hand-Mechanismus am Mikrotubulus entlang bewegen. Diese Dimere werden durch mehrere Coiled-Coil-Motive in den Kinesinen stabilisiert (Tomishige et al., 2002). Außerdem kann durch das Coiled-Coil-Motiv im Halsbereich eine Konformitätsänderung durchgeführt werden (Abb. 5). Bei der Dimerisierung kommt es zu einer Reorganisation der gefalteten Domänen, was dazu führt, dass das monomere, selbst-gefaltete Kinesin in eine aktive dimere Konformation wechselt (Abb. 4 und 5). Diese dimere Konformation erlaubt eine schnelle, prozessive Beweglichkeit von Kinesin-3 (Al-Bassam et al., 2003).

Die am besten untersuchten Mitglieder der Kinesin-3 Familie sind Unc-104 (*Drosophila melanogaster/C. elegans*) und KIF1A (Säugetiere). Amorphe Mutationen in *Drosophila unc-104* führen zu einer Letalität im späten Embryonalstadium. Hypomorphe (partielle Loss-of-Function) mutante Larven von *unc-104* zeigen keine distale Paralyse oder axonale Schwellungen, wie es charakteristisch für Kinesin-1 Mutanten ist (Barkus et al., 2008). Pack-Chung und Kollegen fanden heraus, dass homozygote amorphe Mutationen im *unc-104* Allel zu einer frühen Letalität in der Entwicklung von *Drosophila* führt. Die Mutanten waren paralysiert und die koordinierende Muskelperistaltik zum Schlüpfen des Embryonen fehlte. Die Embryonen der Nullmutanten zeigen normal entwickelte Axone, welche an ihren entsprechenden Muskelfasern lokalisiert sind, jedoch werden keine Synapsen geformt (Pack-Chung et al.,

2007). In *unc-104* Nullmutanten sind die Proteine der aktiven Zone stark reduziert, synaptische Vesikel sind abwesend und die Nervenendungen entwickeln sich nicht zu runden Boutons (Pack-Chung et al., 2007). Ferner kommt es an der neuromuskulären Endplatte (neuromuscular junction NMJ) von *unc-104* Nullmutanten zusätzlich zum Verlust von synaptischen Vesikeln auch zu einer starken Reduktion des aktiven Zonen Proteins Bruchpilot (Brp). Außerdem ist die Größe der NMJ reduziert (Pack-Chung et al., 2007). Die Abwesenheit von synaptischen Boutons in Nullmutanten deutet darauf hin, dass Unc-104 für den Transport von einer Klasse nicht identifizierter synaptischer Moleküle verantwortlich ist, welche notwendig sind für die morphologische Transformation der axonalen Enden in runde Boutons.

Analysen von hypomorphen *unc-104* mutanten Larven zeigen, dass das *unc-104* von *Drosophila melanogaster* ein wesentlicher Faktor im Transport von sowohl neuropeptidgefüllten Vesikeln, als auch von Synaptotagmin-tragenden Vesikeln ist. Mitochondrien werden dagegen hauptsächlich vom Kinesin-1-Komplex transportiert (Hall and Hedgecock, 1991, Barkus et al., 2008). Zusätzlich ist bei hypomorphen *unc-104* mutanten Larven die NMJ verkleinert.

Bei Mutanten in *C.elegans* kommt es ebenfalls zu einer verminderten Synapsenanzahl, mehrere aktive Zonen Komponenten lokalisieren aber unabhängig von Unc-104 (Patel et al., 2006).

1.4 *Drosophila* als Modellorganismus neurodegenerativer Erkrankungen

Drosophila melanogaster (die Fruchtfliege) besitzt ein zentrales Nervensystem, welches in vielen Aspekten den höherer Organismen ähnelt. Nicht nur deshalb ist sie als Modellorganismus zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen geeignet. Ebenfalls teilt *Drosophila* sich mit den Vertebraten die gleichen Neurotransmitter-Systeme wie z.B. GABA oder Glutamat. Desweiteren können mit Hilfe der Fliege komplexe Verhaltensmuster wie Lernen und Gedächtnis für Untersuchungen herangezogen werden (Botella et al., 2004).

Von den etwa 1000 Genen, die bereits mit humanen Erbkrankheiten assoziiert sind, weisen mehr als 70 Prozent homologe Gene in *Drosophila* auf (Botella and Schneuwly, 2004). Außerdem sind zwischen Mensch und Fliegen nicht nur viele Gene, sondern auch Signaltransduktionskaskaden konserviert (Botella et al., 2004, Celotto and Palladino, 2005, Sang and Jackson, 2005).

Dieses hohe Maß an Übereinstimmung, das komplexe Nervensystem in einem intakten Organismus, die einfache genetische Manipulation und die relativ kurze Generationszeit macht *Drosophila* zu einem idealen Modellorganismus für progressive neuronale Erkrankungen (Celotto and Palladino, 2005).

Durch Jahrzehnte lange Forschung mit *Drosophila* stehen viele tausende Mutanten zur Verfügung (Botella and Schneuwly, 2004). Das etablierte UAS/Gal4 System erlaubt eine gewebespezifisch und zeitlich definierte Expression des gewünschten Gens (Brand and Perrimon, 1993). Des Weiteren sind die meisten Entwicklungsstadien von *Drosophila* für physiologische, histologische und mikroskopische Methoden leicht zugänglich. So kann z.B. die Entwicklung der Synapsen in *Drosophila in vivo* untersucht werden (Rasse et al., 2005, Fuger et al., 2007, Zhang et al., 2010).

Ein sich wiederholendes Muster aus Muskeln in jedem Segment der *Drosophila*-Larven erlaubt eine eindeutige Zuordnung von Synapsen und Muskeln. Die Axonenden der Motoneurone sind im Muskel eingebettet und formen typische runde Boutons. In jedem Bouton lokalisieren typischerweise 5 bis 20 Synapsen (Abb. 6).

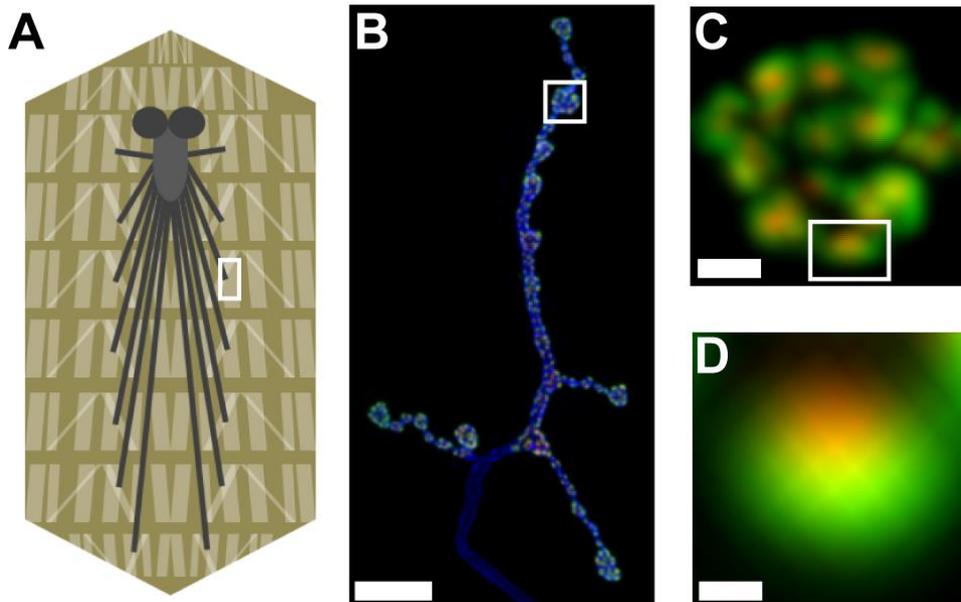


Abbildung 6 Aufbau einer NMJ von *Drosophila*

(A) Schematische Zeichnung einer dorsal geöffneten *Drosophila* Larve. Die in grau gezeichneten Nerven kommen aus dem Ventralganglion (helleres grau) und innervieren definierte Muskeln. (B) zeigt ein Beispiel einer NMJ. In (C) ist ein einzelner synaptischer Bouton zu erkennen. (D) zeigt die Vergrößerung einer einzelnen glutamatergen Synapse. Die weißen Boxen geben die jeweilige Stelle der Vergrößerung an. (B-D) Die NMJ wurde in blau mit dem Membranmarker HRP, in rot mit dem aktiven Zonen Protein Brp und in grün mit dem Glutamaterezeptor GluRIII angefärbt. Maßstabsbalken B: 10 μ m; C: 1 μ m; D: 250 nm. (Modifiziert von (Zhang, 2012)).

1.4.1 Hereditäre spastische Spinalparalyse

Die hereditäre spastische Spinalparalyse (HSP) ist eine klinisch und genetisch heterogene, neurologische Erkrankung, für die autosomal-dominante, autosomal-rezessive und X-chromosomal rezessive Erbgänge beschrieben sind (Fink, 2003).

HSP ist charakterisiert durch eine progressive Lähmung der unteren Extremitäten, welche aus der axonalen Degeneration von motorischen und sensorischen Neuronen hervorgeht. Die längsten Axone des Nervensystems sind an ihrem distalen Ende am stärksten betroffen (Reid et al., 1999).

Klinisch wird HSP in eine reine und eine komplizierte Form eingeteilt. Bei der reinen Form steht die Parese im Zentrum, bei der komplizierteren Form

kommen zudem noch weitere Symptome wie Optikusatrophy, Epilepsie, cerebelläre Ataxie und kognitive Defizite hinzu (Züchner et al., 2006).

Es wurden mehr als 40 verschiedene Loci für HSP beschrieben und 23 verantwortliche Gene, genannt SPG (spastic paraplegia gene) identifiziert (Klebe et al., 2012).

Mehr als 50 Prozent aller HSP Fälle gehen auf Mutationen in *spastin* (SPG4) und *atlastin* (SPG3A) zurück. Unter den identifizierten Genen befinden sich aber auch Kinesine. So wurde in *kif1a* (Kinesin-3) (Erlich et al., 2011, Klebe et al., 2012) und in *kif5a* (Kinesin-1) (Blair et al., 2006, Schule et al., 2008) HSP auslösende Mutationen entdeckt.

SPG10/KIF5A codiert für die schweren Ketten des neuronalen Kinesins, einem Motor des anterograden axonalen Transports. Bis heute wurden 21 verschiedene Mutationen für SPG10 beschrieben (Reid et al., 2002, Crimella et al., 2012), 19 davon befinden sich in der Motordomäne von KIF5A. Weder genomische Deletionen noch „trunkierte“ Mutationen wurden als Ursache für das autosomal-dominantes SPG10 identifiziert.

In SPG30/KIF1A konnten bisher nur zwei homozygote Mutationen (p.R350G und p.A255V) identifiziert werden, die sich beide in der Motordomäne von KIF1A befinden (Erlich et al., 2011, Klebe et al., 2012). Beide Mutationen sind autosomal rezessiv.

1.5 Fragestellung

Kinesinmotoren vermitteln den anterograden Transport von synaptischen Frachten entlang der Mikrotubuli. Die Synapsenbildung und Reifung ist abhängig von Kinesin-basiertem Transport (Puthanveetil et al., 2008). Die Spezifität der Frachten wird durch die koordinierenden Aktionen von Kinesinmotoren, Adaptorproteinen und regulatorischen Molekülen vermittelt. Bis heute ist nur ein begrenztes Verständnis der molekularen Komposition und der dynamischen Regulation von Motor-Fracht-Komplexen bekannt. An Faktoren, die das Binden und Lösen von Frachten an Motorproteine beeinflussen besteht weitere Aufklärung (Verhey and Hammond, 2009, Verhey et al., 2011).

Schneller axonaler Transport von Frachten beinhaltet synaptische Vorläufervesikel (SVV) (Hall and Hedgecock, 1991, Barkus et al., 2008), Mitochondrien (Horiuchi et al., 2005, Glater et al., 2006), piccolo-bassoon Transportvesikel (PTV) (Cai et al., 2007) und RNA-Protein Komplexe (RNP) (Baines, 2004). Dieser anterograde Transport wird hauptsächlich durch Kinesin-1 (Gindhart et al., 1998) und Kinesin-3 (Pack-Chung et al., 2007, Barkus et al., 2008) Mitglieder ausgeführt.

Hierbei scheint eine beträchtliche Überlappung von Kinesin-1 und Kinesin-3 Motoren zu bestehen. So ist z.B. für CSP als Kinesin-1 Motor Khc beschrieben (Hurd and Saxton, 1996), aber auch in Kinesin-3 Mutanten treten Störungen im CSP Transport auf, was z.B. auf eine Zusammenarbeit beider Motoren oder entwicklungsabhängigen Transport hinweisen könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von gestörtem Kinesin-1 und Kinesin-3 basiertem Transport vergleichend zu untersuchen. Mutationen sowohl in Kinesin-1 als auch in Kinesin-3 lösen im Menschen hereditäre spastische Spinalparalyse aus. Dies legt nahe, dass in beide Fällen degenerative Prozesse auftreten. Wenn gleich die Lokomotion von Fruchtfliegenlarven sowohl durch Beeinträchtigung des Kinesin-1 als auch des Kinesin-3 basierten Transportes in ihrer Bewegungsfähigkeit eingeschränkt sind, so ist der Verlauf dieser Störung grundlegend unterschiedlich:

Störungen des Kinesin-3 basierten Transports führen zu einer Verlangsamung der larvalen Bewegung in allen Stadien, es folgt eine anschließende Paralyse, dann der Tod. Störungen des Kinesin-1 basierten Transports betreffen junge Larven kaum, ältere Larven stärker. Es geht der Paralyse - im Gegensatz zu den Kinesin-3 Mutanten - eine posteriore Paralyse voraus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die zellbiologischen Ursachen und molekularen Signalwege, die diese Unterschiede begründen, näher zu beleuchten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Die verwendeten Chemikalien waren von höchster Reinheit und wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim) oder AppliChem (Darmstadt) bezogen. Sonstige Labormaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

GoTaq® DNA Polymerase und Colorless Reaction Buffer, Promega GmbH, (Mannheim)

Deoxynucleoside Triphosphate Set, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

5x BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer, Applied Biosystems, (Foster City, CA, USA)

BigDye® Terminator v1.1/3.1 Ready Reaction Premix, Applied Biosystems, (Foster City, CA, USA)

Primer und Oligos wurden bei der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg bestellt.

2.1.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Lösung A	0,1 M TrisHCl pH 9,0; EDTA 0,1 M; SDS 1%
Ca ²⁺ freies HL3	70 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM MgCl ₂ , 10 mM NaHCO ₃ , 5 mM Trehalose, 115 mM Saccharose, 5 mM HEPES, pH 7,2
PBS	8 g NaCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O, 0,2 g KH ₂ PO ₄ × H ₂ O auf 1 Liter
PBST	PBS mit 0,05% Triton TX100

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1 Verwendete primäre Antikörper

Antigen	Tier	Verdünnung	Donor	Referenz
Bruchpilot (NC82)	Maus	1:100	DSHB*	(Wagh et al., 2006)
CSP (DSCP-2)	Maus	1:50	DSHB	(Zinsmaier et al., 1994)
Dlg (4F3)	Maus	1:50	DSHB	(Parnas et al., 2001)
DV-Glut	Kaninchen	1:1000	H. Aberle	(Mahr and Aberle, 2006)
Fas II (1D4)	Maus	1:50	DSHB	(Hummel et al., 2000)
GluRIIC	Kaninchen	1:1000		selbst erzeugt
Unc-104	Kaninchen	1:1000	T. Schwarz	(Pack-Chung et al., 2007)

*DSHB Developmental Studies Hybridoma Bank

Das Peptid PRRSLDKSLDRTPKS wurde benutzt, um einen GluRIII Antikörper in Kaninchen herzustellen und aufzureinigen.

2.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2 Verwendete sekundäre Antikörper

Antigen	Tier	Verdünnung	Vertrieb
HRP-Cy3	Ziege	1:500	Dianova
HRP-Cy5	Ziege	1:500	Dianova
HRP-FITC	Ziege	1.500	Dianova
Maus-Alexa-405	Ziege	1:500	Invitrogen
Maus-Alexa-488	Ziege	1:500	Molecular Probes
Maus-Atto-647N	Ziege	1.500	Fluka/Sigma
Kaninchen-Alexa-488	Ziege	1:500	Molecular Probes
Kaninchen-Alexa-568	Ziege	1:500	Molecular Probes
Kaninchen-Alexa-700	Ziege	1:500	Invitrogen

2.1.4 Versuchstiere

Tabelle 3 Verwendete Versuchstiere

Allele	Chromosom	Donor/ BDSC Nummer	Referenz
Unc-104 ^{bris}	II	J. Brenman	(Medina et al., 2006)
Unc-104 ^{d11204}	II	BL 19346	(Thibault et al., 2004)
Defizienzen			
Df(2R)Exel 7145	II	BL 7887	(O'Farrell et al., 2008)
Df(2R)Exel 6064	II	BL 7546	(Parks et al., 2004)
Df(2R)ED 3181	II	BL 9213	
w ¹¹¹⁸	X	BL3605	(Castiglioni, 1951)
Gal4-Treiber			
elav ^{C155} -Gal4	X	BL 458	(Lin and Goodman, 1994)
ppk-Gal4	III	BL 32079	
D42-Gal4	III	BL 8816	(Gustafson and Boulianne, 1996)
24B-Gal4	III	H. Aberle	(Brand and Perrimon, 1993)

UAS-Konstrukte	Chromosom	Donor/ BDSC Nummer	Referenz
UAS-unc ^{mCherry}	III	W. Saxton	
UAS-Aktin-GFP	III	BL 7311	
UAS-BRP	III	S. Sigrist	(Rasse et al., 2005, Wagh et al., 2006)
UAS-BRP-RNAi	III	S. Sigrist	(Rasse et al., 2005, Wagh et al., 2006)
UAS-khc ^{wt}	III	intern	
UAS-khc ^{N262S}	III	intern	

2.1.5 Soft- und Hardware, spezielle Geräte

Align X von Vector NTI®	Invitrogen
Animaltracker	Hertie Institut, Tübingen
Hochdruckgefriergerät Bal-Tec HPM 010,	Balzers, Liechtenstein
Chromas	LITE Version 2.01
Digitalkamera für Mikroskop	DCM 510 ScopeTek®, China
DNA-Sequenziersystem	ABI PRISM 3100 Genetic Analyser Applied Biosystems (Darmstadt)
Elektronenmikroskopie Philips CM10	MPI, Tübingen
FEI-Tecnaï Spirt, 120 kV	MPI, Tübingen
EM-Film Maco ES 208,	Hans O. Mahn GmbH & Co KG, Stapelfeld
Gatan USC 4000	MPI, Tübingen
Free Video Dub 2.0.5.221	DVDVideoSoft
ImageJ Version 1.40g	NIH
LSM 710 Mikroskop	Zeiss Jena

Prism Video Converter, v 1.61	NCH Software Inc., Australien
Scope Photo 3.1.386	ScopeTek®
Virtual Dub 19.11	Avery Lee.
Zen 2009	Zeiss, Jena

2.2 Methoden

2.2.1 Sequenzierung genomischer DNA

Für die Sequenzierung der genomischen DNA wurden homozygote *unc-104^{bris}* Larven und des Ursprungsstamms, aus welchem die Mutation erzeugt wurde, benutzt. Zur Überprüfung der mutmaßlichen Mutationen in *unc-104^{bris}* wurde mit den angegebenen Primerpaaren zuerst eine Vor-PCR durchgeführt. Das amplifizierte Fragment wurde nach Fällung und Aufreinigung mit den Primern einzeln sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden zwischen *unc-104^{bris}* und dem Elternstamm verglichen (Vector NTI Align X).

2.2.1.1 Isolation genomischer DNA

Für die Isolation genomischer DNA wurden 50 Larven bei -80°C in 1,5 ml Eppendorfgefäßen für mindesten 5 Minuten eingefroren. Nach Zugabe von 200 µl Lösung A erfolgte die Homogenisierung mittels eines Pistills. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 30 Minuten. Nach Zugabe von 28 µl 8 M KAc wurde das Eppendorfgefäß kurz geschüttelt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C konnten die festen Bestandteile abgetrennt werden. Der Überstand wurde abgenommen und mit 100 µl Isopropanol versetzt. Nach kurzem Schütteln wurde nochmals 5 Minuten bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen

und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut 15 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet anschließend bei Raumtemperatur ca. 30 Minuten getrocknet. Danach erfolgte die Resuspension des Pellets in 20 µl dH₂O. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20°C.

Mittels eines Photometers wurde der DNA-Gehalt ermittelt und Verdünnungen von 10 ng/µl mit dH₂O hergestellt.

2.2.1.2 Reaktionsansatz für Vor-PCR und PCR-Programm

Reaktionsansatz:

1 µl	DNA 10 ng/µl
2 µl	dNTPs (2 mM)
4 µl	5x Puffer
1 µl	Primer s (2 pmol)
1 µl	Primer as (2 pmol)
10,9 µl	dH ₂ O
0,1 µl	GoTaq
<hr/>	
20 µl	Gesamtvolumen

Vor-PCR-Programm:

95 °C	10 min	Denaturierung	} 35 Zyklen
95 °C	25 s	Denaturierung	
55 °C	45 s	Annealing	
72 °C	2 min	Elongation	
72 °C	7 min	Elongation	
4 °C	∞		

2.2.1.3 Reaktionsansatz für Sequenzier-PCR und PCR-Programm

Reaktionsansatz:

6 µl	Aufgereinigte PCR
1 µl	Big Dye Buffer
1 µl	Primer (10 pmol)
2 µl	Big Dye
<hr/>	
10 µl	Gesamtvolumen

Sequenzier-PCR-Programm:

94 °C	1 min	Denaturierung	} 30 Zyklen
94 °C	10 s	Denaturierung	
55 °C	5 s	Annealing	
60 °C	4 min	Elongation	
4 °C	∞		

2.2.1.4 DNA Fällung nach Vor-PCR und Sequenzier-PCR

Zum Fällern der DNA wurden nach der PCR zum PCR-Reaktionansatz 40 µl (Vor-PCR) bzw. 30 µl (Sequenzier-PCR) NaAc pH 4,8 in Ethanol (1:25) gegeben und anschließend 45 Minuten bei 3220 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 20 Minuten bei 3220 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Überstand wieder verworfen und erneut für 1 Minute bei 600 rpm mit dem Gefäß über Kopf zentrifugiert um alle Reste des

Ethanol zu entfernen. Das Pellet wurde in 15 µl dH₂O resuspendiert und für 30 Minuten geschüttelt.

2.2.1.5 Verwendete Primer für die Sequenzierungen

Tabelle 4 Verwendete Primer zur Sequenzierung

Position	Primer	Primersequenz (5'→3')
R561H	unc_s_11	GTCTTCGCCGAAATGGGTGT
	unc_as_11	CATGGATTGCTCCTCAACCTGTTT
V772L	unc_s_13a	CTCTGGGGCAATGCTATATTCCTT
	unc_as_13a	GTGATCTTCGCTTTGTTTACAGCC
D1073E	unc_s_16	GGAGGGTGAGTTTCCACGGACTATA
	unc_as_16n	CACATATTCTCCATTGGGAGCCA
V1170M	unc_s_17n	CAAGATATTTGGGCACTACCAGACG
	unc_as_17	TTGAGCAGTGCCGAGTTGTGCA
A1405V	unc_s_19	TACAAAGGCGTCAACGTCGAGTGC
	unc_as_19	GCCGAATGGATGCAAGCTAACT

2.2.2 Klonierungen

Bei allen erzeugten Vektoren wurde nach einer Mutagenese oder einer Amplifizierung durch PCR eine Sequenzierung durchgeführt um die Richtigkeit der amplifizierten Bereiche in den Konstrukten zu bestätigen. Zusätzlich wurden alle fertigen Konstrukte vollständig sequenziert.

2.2.2.1 Methoden Klonierung

Alle verwendeten Methoden für molekulare Klonierungen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Die verwendeten

Restriktionsenzyme wurden alle von New England Biolabs, Frankfurt am Main, bezogen, mit einer Ausnahme SanD I welche von Fermentas, St. Leon-Rot stammt. Shrimp Alkaline Phosphatase und T4 Ligase wurden von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, bezogen. Für Amplifizierungen mittels PCR wurde ein High Fidelity PCR Enzyme Mix von Fermentas, St. Leon-Rot, mit einer Korrekturlesefunktion verwendet. Von QIAGEN GmbH, Hilden wurden folgende Kits benutzt: QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit und QIAfilter Plasmid Maxi Kit.

2.2.2.2 Hybridisierung von Oligonukleotid

Für die Hybridisierung von Oligonukleotiden wurden jeweils 20 µl der Oligonukleotide (100 pmol/µl), 5 µl Wasser und 5 µl Hybridisierungspuffer (100 mM MgCl₂, 250 mM Tris pH=8,0) in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß gemischt. Das mit Parafilm versehene Gefäß wurde in 1 Liter kochendes Wasser gegeben und bis zum Erreichen der Raumtemperatur (über Nacht) darin belassen. Danach wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung des Oligonukleotid-Gemisches in einer Ligation verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide waren bereits mit einer Phosphatgruppe am 5` Ende bestellt worden.

2.2.2.3 Primer Mutagenese

Für die Mutagenese mit Primer wurden vier verschiedene Primer bestellt. Primer 1 enthielt die Mutation in Sense-Richtung, Primer 2 in Antisense-Richtung. Primer 3 und Primer 4 beinhalten jeweils eine in der Nähe der gewünschten Mutation vorhandene Restriktionsschnittstelle. Primer 3 dabei in Sense Richtung, Primer 4 in Antisense-Richtung. Alle verwendeten Primer wiesen eine ähnliche Schmelztemperatur auf. Zuerst wurden zwei verschiedene

PCRs durchgeführt: einmal mit den Primerpaaren Primer 1 (Mutation) und Primer 4 (Restriktionsschnittstelle), die zweite mit den Primerpaaren Primer 3 (Restriktionsschnittstelle) und Primer 2 (Mutation). Die erhaltenen PCRs wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert. Die extrahierten Banden wurden mittels eines weiteren Agarosegels überprüft und in einer neuen PCR zusammengemischt. Die Banden aus den beiden PCRs wurden dabei je nach ihrer Größe in einem bestimmten Verhältnis gemischt. Der Reaktionsansatz wurde zuerst für sieben Zyklen ohne die Primer amplifiziert, dadurch wurden die extrahierten Banden als Primer benutzt und es entsteht ein einziges PCR-Produkt. Nach Zugabe der Primer 3 und 4 erfolgt eine normale PCR zur Amplifizierung.

Es wurde folgender Ansatz verwendet:

Reaktionsansatz:

x µl	Bande aus PCR 1
x µl	Bande aus PCR 2
5 µl	dNTPs (2 mM)
5 µl	10x Puffer
1 µl	Primer 3 (10 pmol)
1 µl	Primer 4 (10 pmol)
x µl	dH ₂ O
1 µl	HiFi PCR Mix
<hr/>	
50 µl	Gesamtvolumen

Das erhaltene PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel überprüft und anschließend mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Danach wurde ein Restriktionsverdau und eine anschließende Ligation in den gewünschten Vektor durchgeführt.

2.2.2.4 Klonierung von pUAST attB unc-104

Um pC1 MCS zu erzeugen, wurde ein Oligonukleotid mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen (Sal-Not-Sca-Fse-Xba-Spe 5´Strang: CTA GGG TCG ACG CGG CCG CAG TAC TGG CCG GCC TCT AGA ACT AGT G und 3´Strang: CTA GCA CTA GTT CTA GAG GCC GGC CAG TAC TGC GGC CGC GTC GAC C) in peGFP-C1 (Clontech) mit Hilfe der Restriktionsenzyme Nhe I und Xba I ligiert.

Um pC1 unc-104-A zu erzeugen, wurde Teil A von unc-104 aus pUAST unc-104-mCherry (William Saxton) mit Hilfe von Not I und Sca I herausgeschnitten und in den Vektor pC1 MCS ligiert.

Der Vektor pC1 unc-104-AB wurde durch den Restriktionsverdau von Order 1 (synthetisiert von Mr. Gene) mit Hilfe von Sca I und Fse I und anschließender Ligation in pC1 unc-104-A erhalten.

Um das vollständige unc-104 zu erzeugen, wurde mittels der beiden Primer 5´ Fse I GTC AGG CCG GCC TGG CTG CCT GGG CTTT CC und 3´ Stopp Xba GTC ATC TAG ATT ATC ATT TGC TCG CAC TAT TGG CAT TCG der letzte Teil von unc-104 in einer PCR amplifiziert, mit Fse I und Xba I geschnitten und in pC1 unc-104-AB ligiert. Damit wurde pC1 unc-104 erzeugt.

Um pUAST attB unc-104 zu erhalten, wurde pC1 unc-104 mit Sal I und Spe I geschnitten und in den mit Xho I und Xba I geschnittenen pUAST attB ligiert.

2.2.2.5 Klonierung von pUAST attB venus unc-104

Um pC1 venus unc-104 zu erzeugen, wurde Venus mittels der Primer 5´Sal GTC AGT CGA CAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA und 3´ Not GTC AGC GGC CGC CGG CCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC C amplifiziert, mit Sal I und Not I verdaut und in pC1 unc-104 ligiert.

Um pUAST attB venus unc-104 zu erhalten, wurde pC1 venus unc-104 mit Sal I und Spe I geschnitten und in den mit Xho I und Xba I geschnittenen pUAST attB ligiert.

2.2.2.6 Klonierung von pUAST attB turquoise unc-104^{bris}

Durch eine Mutagenese mit Hilfe von Primern wurde in Order 1 die Mutation brisly erzeugt. Die verwendeten Primer waren P1Mut_bris_s AA G GTT CTC ACG TGA TCC TCG GAA AGA AC, P2Mut_bris_as GAG GAT CAC GTG AGA ACC GTT CTT AAG AAC C, P3unc-104_Kpn_s GTT GGG TAC CCA TGA AGC A und P4unc-104_Xho_as GCT TCT CGA GCA ATT CGC A. Um pC1 unc-104^{bris} zu erhalten, wurde die Mutation nach bestätigter Sequenzierung aus Order 1 mit Sca I und Fse I herausgeschnitten und in pC1 unc-104 ligiert.

Um pC1 turquoise unc-104^{bris} zu erzeugen, wurde Turquoise mit denselben Primern wie für Venus 5' Sal GTC AGT CGA CAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA und 3' Not GTC AGC GGC CGC CGG CCT TGT ACA GCT CGT CCA TGC C amplifiziert, mit Sal I und Not I verdaut und in pC1 unc-104^{bris} ligiert.

Um pUAST attB turquoise unc-104^{bris} zu erhalten, pC1 turquoise unc-104^{bris} mit Sal I und Spe I geschnitten und in den mit Xho I und Xba I verdauten pUAST attB ligiert.

2.2.2.7 Klonierung von pUAST attB venus unc-104^{HSP}

Durch eine Mutagenese mit Hilfe von Primern wurde aus pUAST attB venus unc-104 die Mutation HSP erzeugt. Die für die Mutagenese verwendeten Primern waren: P1_Mut_HSP_s GTA GAC TTG GTG GGG TCG GAA CGA GCG GAT T P2_Mut_HSP_as Mut TTC CGA CCC CAC CAA GTC TAC CAA GCT GAT CTT G P3unc-104_SanDI_s CCC CTT TTG GGT CCC TAT GTG

und P4unc-104_Kpn_as CAT GGG TACC CAA CCG AGT TAG. Die erzeugte Mutation wurde mit SanD I und Kpn I verdaut und in pUAST attB venus unc-104 ligiert. Somit entstand pUAST attB venus unc-104^{HSP}. Danach wurde die Mutation mit Hilfe einer Sequenzierung bestätigt.

2.2.2.8 Klonierung von pUAST attB unc-104^{HSP}

Um pC1 unc-104^{HSP} zu erzeugen, wurde pUAST attB venus unc-104^{HSP} mit SanD I und Kpn I verdaut und in pC1 unc-104 ligiert.

Um pUAST attB unc-104^{HSP} zu erzeugen, wurde pC1 unc-104^{HSP} mit Sal I und Spe I verdaut und in den mit Xho I und Xba I geschnittenen pUAST attB ligiert.

2.2.2.9 Injektion von *Drosophila*-Embryonen

Es wurden verschiedene Khc Konstrukte erzeugt. So wurde pUAST Khc^{wt} und pUAST Khc^{N256S} kloniert und diese nach folgendem Vorgehen in white¹¹¹⁸ Fliegen injiziert. Nach erfolgreicher Injektion und Mapping der Konstrukte wurden erste Versuche in den Larven durchgeführt. Da sich die Konstrukte auf verschiedenen Chromosomen integriert hatten und somit unterschiedlich stark exprimiert werden konnten, wurde entschieden die Konstrukte in ein pUAST attB Vektor umzuklonieren und sie dann an derselben Stelle des Genom zu integrieren. Dies führt dazu, dass eine vergleichbare Menge von mutantern und wildtypischem Protein vorhanden ist. Diese seitenspezifische Injektion wurde von der Firma Best Gene durchgeführt.

Für die Sammlung von Embryonen für die Injektion wurden die Fliegen bei Raumtemperatur und einem natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Zur Eiablage wurden den Fliegen alle 30min eine neu behaftete Apfelagarplatte (3%

(w/v) Agar, 1,67% (w/v) Saccharose, 1,33% (v/v) Nipagin (10% in Ethanol) und 33,3% Apfelsaft in *A. bidesi*) angeboten. Die abgelegten Eier wurden mit einem Pinsel von der Apfelagarplatte in eine Filtereinheit (abgeschnittenes 50ml Falcon-Tube, mit im Deckel eingearbeitetem Nylon-Netz) überführt und ca. 90 Sekunden mit Natriumhypochlorid-Lösung (1 Teil Natriumhypochlorid, 1 Teil H₂O) dechloriniert. Nach Abspülen der Natriumhypochlorid-Lösung mit Leitungswasser wurden die Embryonen auf ein kleines ca. 5 × 1 cm großes Apfelagarblöckchen überführt. Mit Hilfe von Pinsel und Präpariernadel wurden die Embryonen auf dem Blöckchen der Reihe nach aufgereiht. Dabei wurden sie so positioniert, dass der posteriore Bereich (anhand der Mikropyle erkennbar) vom Rand des Blöckchens abgewandt war. Danach wurden die Embryonen auf Deckgläser transferiert, die mit Klebstoff (in n-Heptan gelöstes Scotch-Klebeband) beschichtet waren. Die so auf dem Deckglas fixierten Embryonen wurden für ca. 8 Minuten in einem mit Kieselgel gefüllten Gefäß angetrocknet. Dabei wurde versucht, jeden direkten Kontakt der Embryonen mit dem Kieselgel zu vermeiden. Die angetrockneten Embryonen wurden anschließend sofort mit Voltalef-10S-Öl überschichtet und in einem auf 18°C temperierten Raum injiziert. Dazu wurde die DNA, das Helferplasmid und der Injektionspuffer (0,1 mM Phosphatpuffer pH 7,2; 5 mM KCl) in die Injektionsnadel (selbstgezogene Borsilicat Glaskapillare) gegeben und diese in den Mikroinjektor montiert. Zum Öffnen der verschlossenen Nadelspitze wurde die Spitze mehrmals in einen überalterten Embryo gestochen, bis eine feine Öffnung entstanden war. Die Injektion der Embryonen erfolgte an einem Mikroskop in den posterioren Pol der Embryonen. Die verwendeten Parameter des Mikroinjektors betragen: P1 (Reinigungsdruck) 4000hPa; P2 (Injektionsdruck) ca. 450hPa, P3 (Haltedruck) 80hPa. Der Injektionsdruck wurde dem Öffnungsdurchmesser der Nadel angepasst, so dass das injizierte Volumen ca. 2% des Embryovolumens betrug. Wurden beim Injizieren zu alte Embryonen entdeckt, wurden diese mit Hilfe der Injektionsnadel durchstoßen um sie zu zerstören. Nach dem Injizieren wurden die Embryonen auf den Deckgläsern in eine feuchte Kammer (Apfelagarplatte mit Aussparungen in dem sich Wasser befindet) gelegt und bei 18° bis zum Schlüpfen der Larven aufbewahrt. Die geschlüpften Larven wurden abgesammelt und in ein Zuchtgefäß überführt.

2.2.3 Fliegenhaltung

Die Fliegen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Standardmedium bei 25°C in dunklen Inkubatoren gehalten.

2.2.4 Immunhistochemie

Für die Präparation von Larvenfilets wurden Larven im dritten Stadium verwendet. Die Larven wurden auf einer Präparationsmatte mit Hilfe von Insektennadeln immobilisiert. Dabei wurde die Larve mit der dorsalen Seite nach oben mit je einer Nadel am anterioren und posterioren Ende fixiert. Nach der Zugabe eines Tropfens eiskalter Hämolymp-ähnlicher Salzlösung (HL3) wurde die Larve entlang der Mittellinie aufgeschnitten. Die Epidermis wurde gedehnt und mittels Insektennadeln fixiert. Die inneren Organe wurden mit Pinzetten vorsichtig entfernt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, die Muskeln und das zentrale Nervensystem der Larve nicht zu beschädigen. Anschließend wurden die Filets mit Hilfe von 4% PFA für 10 Minuten fixiert. Für eine native GFP Detektion wurde die Larve nur 3 Minuten fixiert und innerhalb von 72 Stunden aufgenommen. Nach der Fixierung erfolgte ein dreimaliges kurzes Waschen mit PBST. Zur Blockierung und anschließender Färbung wurden die Filets in ein Eppendorfgefäß mit PBST überführt. Die Blockierung der Filets erfolgte in 5% NGS in 0,05% PBST für 30 Minuten. Für die Inkubation des primären Antikörpers wurde das NGS erneuert und Antikörper über Nacht bei 4°C im Rotator inkubiert. Die Filets wurden anschließend drei Mal kurz mit PBST gewaschen und dann für je drei Mal 20 Minuten im Rotator bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers in 5% NGS für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Rotator. Nach erneutem Waschen mit PBST, wie vorher beschrieben, wurden die Filets in Vectashield überführt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Filets auf einen Objektträger mit Vectashield aufgezogen und das Deckglas mit Nagellack fixiert.

2.2.5 Analyse der sensorischen Neurone

Um die dendritischen Äste in den sensorischen Neuronen zu untersuchen, wurden die Larven für 2-3 Sekunden in 65°C heißes Wasser gegeben. Anschließend wurden die Larven in eine Kammer, welche normalerweise für *in vivo* Imaging benutzt wird, überführt und innerhalb von 15 Minuten an einem Zeiss LSM 710 Konfokalen Mikroskop aufgenommen. Details für die Konstruktion der Kammer wurden beschrieben (Fuger et al., 2007, Zhang et al., 2010). Die Larve wurde so in die Kammer eingebettet, dass sie mit der dorsalen Seite nach unten zeigte.

2.2.6 Bildaufnahme und Analyse

Ganze Larven oder Larvenfilets wurden an einem Zeiss LSM 710 Konfokalen Mikroskop aufgenommen, welches ausgestattet ist mit 405, 445, 488, 514, 561 und 633 Laserlinien und einem ConfoCor 3 Scankopf. Es wurde entweder das 40x Plan-Apochromat 1.3 Objektiv oder das 63x Plan-Apochromat 1.4 N.A. Objektiv benutzt. Die aufgenommenen Bilder wurden mittels der PMT Detektion erhalten. Falls die Fluoreszenzintensität sehr schwach war, wurde die ADP Detektion benutzt. Die Voxel Dimension (x/y/z) für NMJ waren 100 nm × 100 nm × 500 nm, für CNS 300 nm × 300 nm × 1000 nm und für sensorische Neurone 520 nm × 520 nm × 750 nm. Die ausgeschnittenen Bilder wurden um den Faktor 2 skaliert und ein Gaussian blur Filter (Filterradius = 2) angewendet. Gammawerte wurden entweder nicht verändert oder mit dem Wert 0,75 für alle Illustrationen benutzt.

Für qualitative Vergleiche der Morphologie verschiedener Genotypen wurden die Bilder mit einem Maximum an Helligkeit aufgenommen, wobei eine Übersättigung vermieden wurde. Für quantitative Vergleiche der Intensitäten wurde ein gemeinsames Setting gewählt, bei welchem es bei keinem der

untersuchten Genotypen zu einer Überbelichtung kam. Die Bildbearbeitung wurde mittels NIH ImageJ Version 1.40g durchgeführt.

2.2.7 Verhaltens-Assay

Für qualitative Verhaltensanalysen von einzelnen Larven wurden diese auf einem dünnen Stück Apfelagar platziert. Das Tail-Flip Verhalten wurde visuell gewertet. Die Larven wurden mit einer DCM510 (ScopeTek, P.R. China) Mikroskopkamera aufgenommen, die in ein dafür speziell angefertigtem Stereomikroskop integriert wurde. Die sich bewegenden Larven wurden für 5 Minuten bei einer Frame Rate von 30 fps gefilmt um Beispiele für die Körperhaltung der Larven während der Fortbewegung zu erhalten. Die Videos wurden mit Prism Video Converter, v 1.61 (NCH Software Inc., Australia) umgewandelt. Für weitere Bearbeitungen wurde VirtualDub 1.9.10 und ImageJ Version 1.40g verwendet.

Für quantitative Analysen von Larven wurden diese vom Futter befreit, indem sie kurz in 15%ige Saccharose getaucht wurden und anschließend kurz mit Leitungswasser gewaschen wurden. Die Larven wurden dann für 45 Minuten bei 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 70% auf einer Agarplatte zur Akklimatisierung gehalten. Diese Bedingungen wurden auch bei dem Verhaltensversuch eingehalten. Um die Laufgeschwindigkeit zu messen wurden bis zu 200 Larven auf einer 15 × 15 cm großen Agarplatte für 10 Minuten gefilmt. Die Geschwindigkeit und Größe der Larven wurde durch eine speziell hergestellte Software (Animaltracer, T.M. Rasse) ermittelt. Larven, welche sich berühren, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Larven, deren Geschwindigkeit weniger als 10% der Durchschnittsgeschwindigkeit ihres entsprechenden Genotyps und Größengruppe betrug. Dieses Selektionskriterium erlaubt es, tote Larven oder Schmutz auszuschließen, die sonst als Larve angerechnet würden. Durchschnittliche Laufgeschwindigkeiten wurden für jede Größengruppe in

jedem Film kalkuliert. Ein Minimum von 6 Filmen pro Genotyp wurde analysiert. Für alle weiteren statistischen Analysen wurde „n“ als Zahl der Videos definiert.

2.2.8 Probenvorbereitung für Elektronenmikroskopie am Axon

Lebende L2 Larven wurden auf eine Aluminiumplatte mit einer Aussparung von 150 µm überführt, welche 1-Hexadecan als externen, nicht durchdringenden Füllstoff enthält. Die Plättchen wurden mit Plättchen ohne Aussparung zusammengebracht und mit einem Hochdruck-Gefriergerät (Bal-Tec HPM 010, Balzers, Liechtenstein) kryofixiert. Die Larven wurden vom externen Hexadecan unter flüssigem Stickstoff befreit und in 2 ml Mikroröhrchen überführt. Als Gefriersubstitutionsmedium wurde 2% Osmiumtetroxid Lösung in wasserfreiem Aceton verwendet, ergänzt mit 25 µl einer 20%igen methanolischen Uranylacetat Lösung, welches einer finalen Konzentration von 0,5% entspricht. Die Gefriersubstitution wurde an einem Leica AFS-2 ausgeführt, wobei die Proben folgendermaßen behandelt wurden: -90°C für 27 h, -60°C für 6 h und -40°C für 6 h. Die Temperaturerhöhung erfolgte in 10°C Schritten je Stunde. Bei -40°C wurde Glutaraldehyd von einer 25% Lösung in Wasser zugegeben bis zu einer finalen Konzentration von 0,6% Glutaraldehyd und 2% Wasser. Nach 6 Stunden bei -40°C wurden die Mikroröhrchen für 1 Stunde auf Eis gestellt. Die Proben wurden dann drei Mal mit Aceton gewaschen und mit Epon bei Raumtemperatur infiltriert. Dazu wurde die Konzentration an Epon mit jedem Schritt erhöht (30%, 60%, 90%, 2x 100% Epon je für 1 h, der zweite 100% Epon Schritt über Nacht am Rotator). Nach dem Einbetten wurden die Proben bei 60°C für 48 Stunden polymerisiert. Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und in einem Philips CM10 Elektronenmikroskop dokumentiert. Bilder wurden auf EM-Film (Maco ES 208, Hans O. Mahn GmbH & Co KG, Stapelfeld, Germany) aufgenommen. Alternativ wurden die Ultradünnschnitte am FEI-Tecnai Spirit, 120 kV Elektronenmikroskop untersucht und mit einer Gatan USC 4000 aufgenommen.

2.2.9 Probenvorbereitung für Elektronenmikroskopie an der NMJ

Larvenfilets wurden wie beschrieben aufgespannt und dann in 4% PFA für 10 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte eine weitere Fixierung mit 2,5% Glutaraldehyd über Nacht. Eine Nachfixierung wurde mit 1% Osmiumtetroxid in 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2 für 1 Stunde auf Eis durchgeführt. Die Larvenfilets wurden mit Wasser gewaschen und mit 1% wässrigem Uranylacetat für 1 Stunde bei 4°C behandelt. Anschließend erfolgte die Dehydrierung durch eine Ethanolserie und Aufbewahrung in flüssigem Epon über Nacht. Die Larvenfilets wurden am nächsten Tag auf einer Präparationsplatte fixiert und Muskel 4 aus Segment 4 wurde mit Hilfe von scharfen Insektennadeln heraus präpariert. Die einzelnen Muskeln wurden in Epon eingebettet und für 48 Stunden bei 60°C polymerisiert. Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Blei kontrastiert und in einem Philips CM10 Elektronenmikroskop auf EM-Film (Maco ES 208, Hans O. Mahn GmbH & Co KG, Stapelfeld, Germany) aufgenommen.

2.2.10 Analyse von synaptischen Vesikeln in elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Um die Vesikelabstände an der Synapse zu messen, wurden die aufgenommenen Bilder mit Hilfe von NIH ImageJ Version 1.40g ausgewertet. Auf alle zu quantifizierenden Bilder wurde ein Gaussian blur Filter (Filterradius = 2) angewendet. Die auf dem Bild aufgenommene Synapse wurde ausgeschnitten und so gedreht, dass sich die Vesikel im oberen Teil des Bildes befanden und die PSD im unteren Teil. Es wurde entweder ein 300 nm langer Bereich in der Mitte der PSD markiert oder je 150 nm links und rechts der T-Bar (siehe Abb. 34A gelbe Linien). Nur in diesem Bereich wurde der Abstand der Vesikel zur Membran gemessen (siehe Abb. 34A rote Linien). Es wurden dabei nur Vesikel gemessen, die kleiner als 50 nm waren und sich nicht weiter als 250 nm von der Membran entfernt befanden.

2.2.11 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden, wie in den folgenden Verfahren beschrieben, ausgeführt. Die Datensätze wurden als erstes auf Normalität überprüft. Bei normalverteilten Datensätzen wurden die Daten über eine ANOVA analysiert, gefolgt von einem Tukey-Test. Bei Datensätzen in denen nicht alle Gruppen normalverteilt waren, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet und anschließend ein Dunn-Test. Die verwendeten α -Level sind * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Stichprobenfehler sind als Standardabweichung (s.d.) und Standardfehler des Mittelwerts (s.e.m.) angegeben. Der Standardfehler des Mittelwertes ist als Box in die Diagramme eingezeichnet, die Standardabweichung als schwarze Striche über und unter der Box.

3 Ergebnisse

3.1 Brisly Mutation

3.1.1 *Brisly* Mutanten haben Defekte in der Dendritenentwicklung und Synapsenmorphologie

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, einen erweiterten Einblick in die Synaptogenese zu erlangen. Hierbei sollte der genetisch ideal zugängliche Modellorganismus *Drosophila melanogaster* genutzt werden. Die larvale neuromuskuläre Verbindung ist hierbei ein gut etabliertes System zur Untersuchung von Synaptogenese und Synaptopathie.

Um neue Gene zu entdecken, die für den Aufbau beziehungsweise die Stabilisierung von Synapsen wichtig sind, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Jay Brenman an der Universität von North Carolina School of Medicine ein EMS Mutagenese-Screen durchgeführt.

Während das Labor von Jay Brenman Störungen in der Morphologie von Dendriten untersucht hat, lag der Fokus dieser Arbeit darin, Gene zu untersuchen, die für Synaptogenese und Synaptopathie von Bedeutung sind.

Eine Synapse zeichnet sich ultrastrukturell durch die Gegenüberstellung einer präsynaptischen aktiven Zone mit einem postsynaptischen Rezeptorfeld aus. An der aktiven Zone fusionieren Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Der Neurotransmitter wird in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet postsynaptisch an die Neurotransmitterrezeptoren. Jegliche Abweichung von diesem Aufbau deutet auf Störungen entweder in der Synaptogenese oder auf eine degenerative Veränderung hin.

Ultrastrukturelle Veränderungen mit Hilfe von Elektronenmikroskopie im Kontext eines Screens zu untersuchen ist nicht realistisch. Stattdessen wurde entschieden, die korrekte Gegenüberstellung von aktiver Zone und PSD immunhistochemisch zu untersuchen. Präsynaptisch ist Bruchpilot (Brp) von zentraler Bedeutung um an der aktiven Zone Vesikel in der Nähe von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen anzuhäufen. Postsynaptisch sind an der

NMJ Glutamatrezeptoren von zentraler Bedeutung um den Neurotransmitter Glutamat zu detektieren. Daher verwundert es nicht, dass an Kontroll-NMJs mehr als 97 % aller Synapsen positiv für sowohl Brp als auch der Glutamatrezeptoruntereinheit III (GluRIII oder GluRIIC) sind.

Jede Abweichung hiervon wurde weiteruntersucht. Hierbei wurde die Mutante *brisly* (*bris*) isoliert und für weitere Charakterisierungen ausgewählt. In Dendriten zeichnet sich *Bris* durch verstärktes Filopodienwachstum an der Spitze von Neuron *ddaA* (Abb. 7) aus. (Medina et al., 2006).

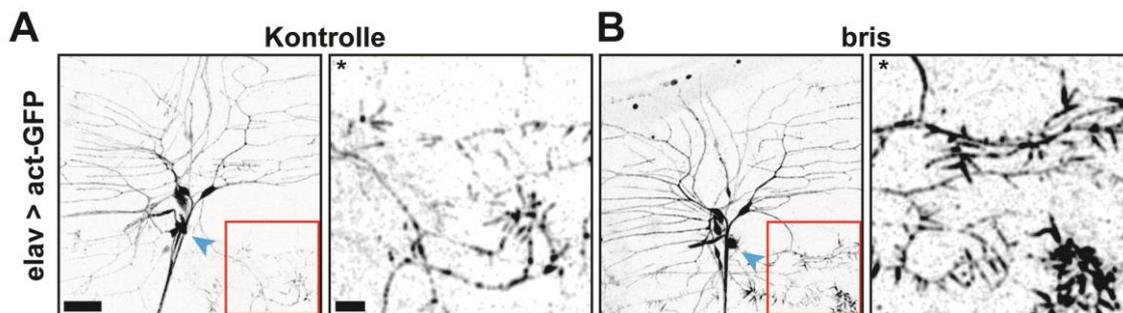


Abbildung 7 *Brisly* Mutanten sind durch Defekte bei der Bildung von dendritischen Filopodien charakterisiert

(A) Während die dendritischen Verzweigungen des Neurons *ddaA* (Zellkörper: blaue Pfeilspitze) in Kontrolltieren (*elavX-Gal4/+;UAS-actin-GFP/+*) nicht beeinträchtigt ist, ist bei *brisly* (*bris*, *elavX-Gal4/+;unc-104^{bris}/unc-104^{bris};UAS-actin-GFP/+*) L3 Mutanten (B) eine deutlich verstärkte Verzweigung der Filopodien der distalen sekundären Äste zu beobachten. Maßstabsbalken 20 μm . * Für eine bessere Visualisierung wurden die sekundären Äste in Helligkeit und Kontrast bei beiden Vergrößerungen angepasst. Maßstabsbalken 10 μm .

In homozygoten *bris* mutanten Larven wurde an der NMJ ein prozentualer Anstieg von Glutamatrezeptoren ohne präsynaptisches Brp beobachtet (Abb. 8). Dieser Effekt trat nicht in heterozygoten *bris* Larven auf (wt: $1,7 \pm 0,3\%$, n=8; *bris/+*: $1,8 \pm 0,3\%$, n=10; *bris/bris*: $17 \pm 1,3\%$, n=10). Deswegen wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem beobachteten NMJ Phänotyp am wahrscheinlichsten um eine partielle Loss-of-Function anstatt um einen dominant-negativen Effekt oder einen Gain-of-Function Phänotyp handelt. Die molekulare Ursache der *bris* Mutation war bisher nicht untersucht worden.

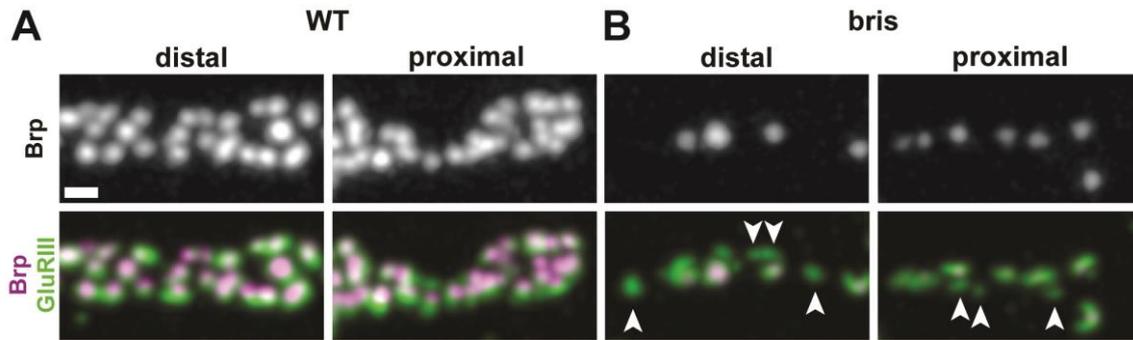


Abbildung 8 *Brisly* Mutanten sind durch Defekte an der Synapse charakterisiert

(A-B) Konfokale Aufnahmen von Fluoreszenzfärbungen zeigen verschiedene synaptische Boutons der NMJ 4 von L3 *Drosophila* Larven. (A) Wildtyp (w^{1118}) und (B) *Bris* Mutanten ($unc-104^{brisy}/unc-104^{brisy}$) wurden für Glutamatrezeptor III (GluRIII, grün) und für Bruchpilot (Brp, magenta) gefärbt. Boutons sind in *brisy* Mutanten im Vergleich zur Kontrolle kleiner. Im Vergleich zum Wildtyp sind viele GluRIII Felder ohne präsynaptisches Brp (Pfeilspitzen). Maßstabsbalken 1 μm .

Als nächstes wurde überprüft, ob die veränderte synaptische Zusammensetzung das Resultat von Entwicklungsdefekten (Viquez et al., 2009) oder von Degenerationsprozessen war. Distale Regionen von NMJs sind eher von Degenerationsprozessen betroffen als proximale Regionen. In *brisy* mutanten Larven treten Glutamatrezeptorfelder ohne gegenüberliegendes Brp sowohl in distalen als auch in proximalen Regionen der NMJ auf (Abb. 8B, Pfeilspitzen). Dieser Phänotyp deutet darauf hin, dass die beobachteten synaptischen Defekte in *brisy* mutanten Larven wahrscheinlich durch eine Störung der Synapsenentwicklung verursacht werden. Diese Hypothese wird weiterhin durch die Verteilung der betroffenen Synapsen entlang der NMJ unterstützt. Im Kontext von degenerativen Prozessen werden in der Regel ganze Cluster von Synapsen auf einmal abgebaut. In *brisy* mutanten Larven sind betroffene und nicht betroffene Synapsen oft benachbart.

3.1.2 *Brisly* Mutanten zeigen keine Retraktion an NMJs

Synaptische Retraktion wird in *Drosophila* mit dem synaptischen Fußabdruck-Assay untersucht (Eaton et al., 2002). Dieser Ansatz basiert auf der Tatsache, dass die postsynaptische Membran der *Drosophila* NMJ eine komplexe Serie von Membraneinfaltungen (Subsynaptisches Retikulum, SSR) ist, die sich nur langsam nach präsynaptischer Innervierung entwickelt und nach Retraktion der präsynaptischen Innervierung für mehrere Stunden stabil bleibt. Um synaptische Retraktion zu untersuchen, wurde das SSR mit einem Antikörper gegen das postsynaptische Gerüstprotein Discs-Large (DLG) gefärbt und die neuronalen Membranen mit HRP-Antikörper sichtbar gemacht. In *bris* mutanten Larven konnten keine Anzeichen von synaptischer Retraktion beobachtet werden (Abb. 9). Alle terminalen Boutons, an welchen die Retraktion typischerweise auftritt (Abb. 9A-B; Pfeilspitzen), waren positiv für den neuronalen Marker HRP.

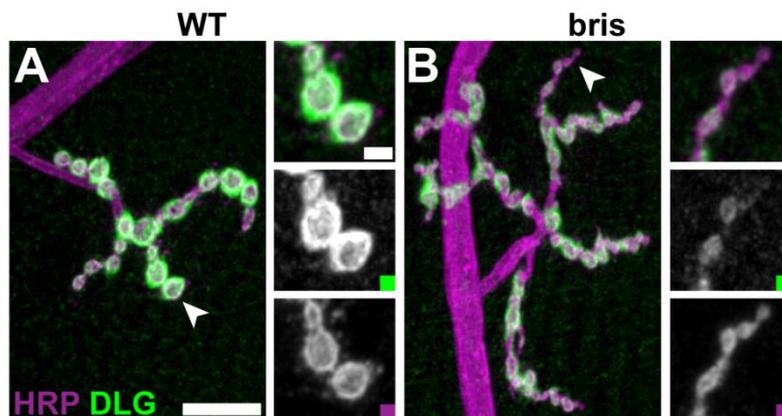


Abbildung 9 Keine Retraktion an Synapsen von *bris* mutanten Larven erkennbar

(A,B) NMJ 4 aus Segment A2 von *Drosophila* (A) Wildtyp (w^{118}) und (B) *Bris* ($unc-104^{bris}/unc-104^{bris}$) mutanten L3 Larven wurden mit dem Membranmarker HRP (magenta) und den postsynaptischen Gerüstprotein Discs-Large (DLG, grün) gefärbt. Die Anwesenheit von postsynaptischem DLG ohne präsynaptische Struktur deutet auf eine Retraktion der Synapse hin. Retraktion tritt normalerweise an distalen Boutons auf (Pfeilspitzen). In *bris* mutanten Larven konnte keine Retraktion beobachtet werden. Maßstabsbalken 10 μm . Vergrößerungen rechts Maßstabsbalken 2 μm .

3.1.3 *Brisly* ist ein Allel von *unc-104*, einem Mitglied der neuronalen Kinesin-3 Familie

Um die molekulare Läsion im betroffenen Gen von *bris* zu identifizieren, wurde der original *bris* Fliegenstock gegen Kontrollfliegen (*white*¹¹¹⁸) über drei Generationen ausgekreuzt. Als nächstes wurde die Mutante mit Hilfe eines Sets von Defizienzen klassisch gemappt. Hierbei wurden drei überlappende Defizienzen (Thibault et al., 2004, Ryder et al., 2007) (Df(2R): Exel 7145, Exel 6064, ED 3181) identifiziert, welche den *bris* Lokus nicht komplementieren. Diese drei Defizienzen überlappen an der Region (2R) 12.618.999-12.714.156 des *Drosophila*-Genoms (Abb. 10A). Der gleiche Bereich wurde auch durch rekombinationsbasiertes Mapping mit molekular definierten P-Elementen identifiziert (Zhai et al., 2003, Kramer, 2008). Als nächstes wurden Mutationen der betroffenen Kandidatengenene der identifizierten Region untersucht. Die XP Insertion *unc-104*^{d11204} konnte die *bris* Mutation nicht komplementieren (Abb. 10A). Das Gen *unc-104* gehört zur Kinesin-3 Familie und ist für den Transport von synaptischen Vorläufervesikeln, großen Neuropeptid-gefüllten Vesikeln und kleinen Transportvesikeln von Bedeutung (Pack-Chung et al., 2007, Barkus et al., 2008). *unc-104* Nullmutanten sind homozygot letal und sterben im Embryonalstadium. In *unc-104* Nullmutanten kommt es zudem zu einer Reduzierung von Brp in den Boutons (Barkus et al., 2008). Daraufhin wurde das *brisly/unc-104* Allel sequenziert. Hierbei wurden fünf Abweichungen relativ zum Genom der Referenz (Entrez GenelD: 36876, FBgn0034155) identifiziert: R561H, V722L, D1073E, V1170M und A1450V (Abb. 10B) (Kramer, 2008). Als nächstes wurden diese fünf Positionen im Ursprungsstamm, der für die EMS Mutagenese eingesetzt worden war, sequenziert. Die Mutation R561H ist, im Gegensatz zu den vier anderen gefundenen Mutationen, die einzige Mutation welche im Ursprungsstamm nicht vorhanden ist. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei vier der möglichen Aminosäureaustausche im Vergleich mit der Datenbanksequenz (V722L, D1073E, V1170M, A1450V) um natürliche Polymorphismen handelt. Die Mutation R561H ist dagegen wahrscheinlich für den beobachteten Phänotyp verantwortlich (Abb. 10B). Die *brisly/unc-104* R561H Mutation befindet sich in einem konservierten Bereich der FHA-Domäne von Unc-104/KIF1A (Abb. 10C,D).

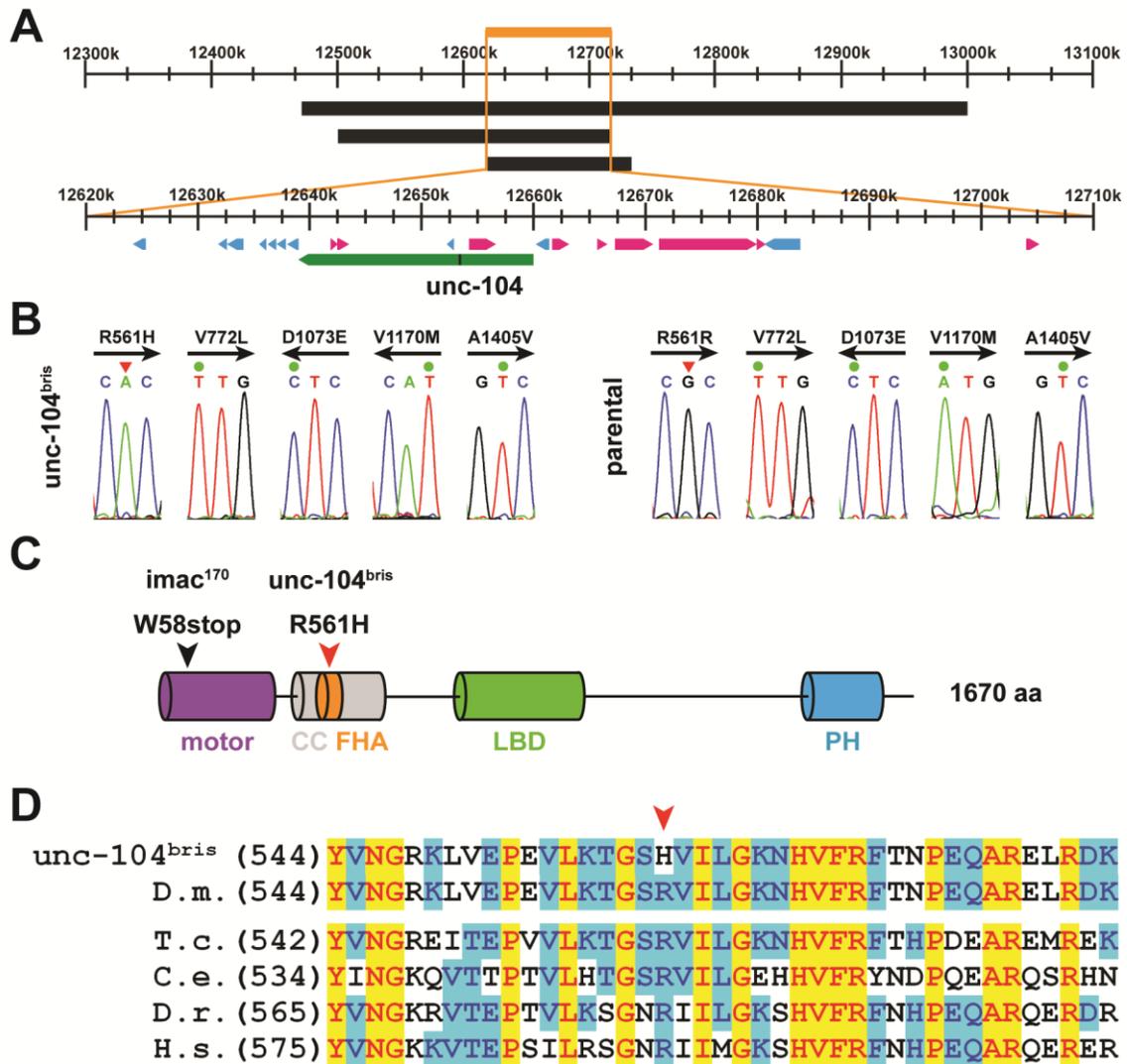


Abbildung 10 *Brisly* enthält eine Punktmutation in der FHA-Domäne von *unc-104*, einem Mitglied der Kinesin-3 Familie

(A) Schematische Zeichnung des *unc-104* Lokus. Drei überlappende Defizienzen sind als schwarze Boxen dargestellt (von oben nach unten: Df(2R): Exel7145, Exel 6064, ED 3181). Alle drei konnten den *bris* Lokus nicht komplementieren. Die drei Defizienzen überlappen an der Position (2R) 12.618.999-12.714.156 (angegeben in orange) des *Drosophila*-Genoms. Die XP Insertion *unc-104^{d11204}* kann *bris/unc-104* ebenfalls nicht komplementieren. *unc-104* ist als grüne Box eingezeichnet, weitere Gene in dieser Region in Blau oder Pink. (B) Fünf Veränderungen der *unc-104* Sequenz im Vergleich zu der auf Flybase (Entrez GeneID: 36876, FBgn0034155) hinterlegten konnten identifiziert werden. Vier dieser Mutationen (V722L, D1073E, V1170M und A1450V) repräsentieren wahrscheinlich Polymorphismen und wurden auch im Parentalstock, welcher für die Mutagenese verwendet wurde, gefunden (links *unc-104^{bris}*, rechts Parental). Die Originalsequenzen sind abgebildet. Pfeile zeigen, welcher DNA-Strang sequenziert wurde. (C) Vorhergesagte Domänenstruktur von Unc-104 und ausgewählte Mutationen. R561H befindet sich an einem konservierten Bereich der FHA-Domäne von Unc-104. Motordomäne: violett, Coiled-Coil Region: grau, FHA-Domäne: orange; Liprin-Binde-Domäne (LBD): grün, PH-Domäne: blau. (D) Alignment von Unc-104 mit verschiedenen Arten (*Drosophila melanogaster* (D.m.), *Tribolium castaneum* (T.c.), *Caenorhabditis elegans* (C.e.), *Danio rerio* (D.r.), *Homo sapiens* (H.s.)). Die mutierte Aminosäure (R561H, roter Pfeilkopf) ist in allen begutachteten Arten konserviert.

unc-104 Nullmutanten (*unc-104¹⁷⁰/Df(2R)DAIk21*) sind embryonal letal (Pack-Chung et al., 2007). Im Gegensatz dazu sterben homozygote *unc-104^{bris}* Larven oder transheterozygote (*unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}* und *unc-104^{bris}/unc-104¹⁷⁰*) Larven erst im dritten Larvenstadium. Diese neue hypomorphe Mutation erlaubt es, spätere Prozesse während der Entwicklung zu untersuchen. Immunhistologische Analysen zeigen ein gut zu detektierendes, stabiles Protein (Abb. 11). Homozygote *unc-104^{bris}* Larven weisen keinen reduzierten Proteinlevel von Unc-104 (Abb. 11) auf. Sowohl im Ventralganglion (Abb. 11A-B^l), an der NMJ (Abb. 11G,G^l) und im Axon (Abb. 11C-F^l) sind Anreicherungen von Unc-104 zu erkennen. In den Anreicherungen im Axon kommt es jedoch nicht zu einer weiteren Ansammlung von Brp (Abb. 11E-F^l, Pfeilspitzen) oder neuronaler Membranen (Abb. 11C-D, HRP).

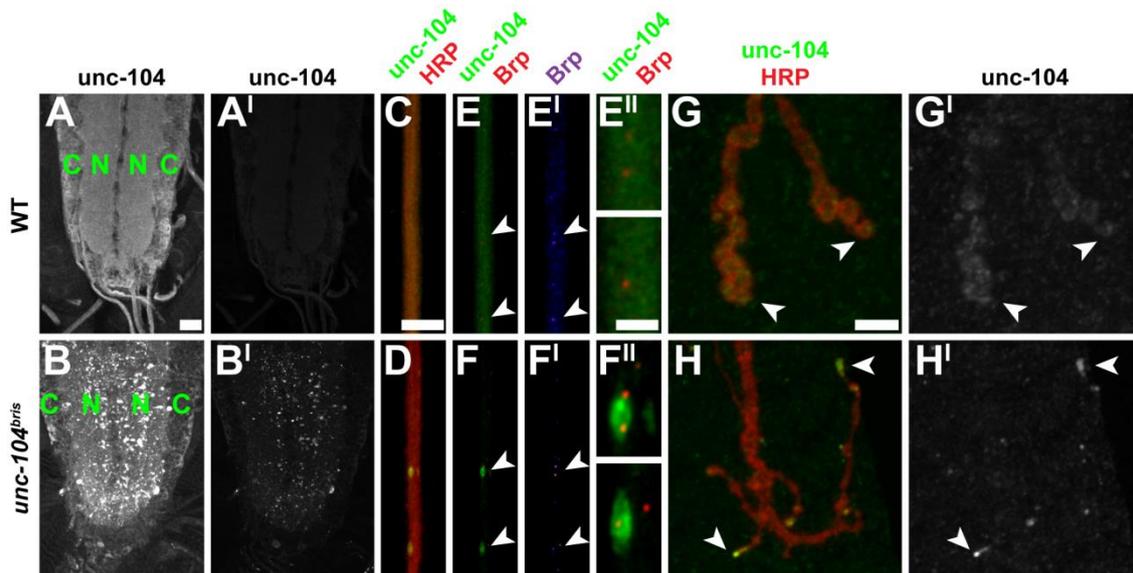


Abbildung 11 Verteilung von Unc-104 in *unc-104^{bris}* Larven

Konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenz-gefärbten L3 *Drosophila* Larven. (A, A^l, B, B^l) Ventralganglien von Wildtyp (*w¹¹¹⁸*, oben) und *unc-104^{bris}* (*unc-104^{bris}/unc-104^{bris}*, unten) Larven wurden Unc-104 gefärbt. (A) und (B) mit stärkerer Laserleistung, (A^l) und (B^l) mit niedrigerer Laserleistung. Aggregate von Unc-104 sind nur in *unc-104^{bris}* erkennbar. Maßstabsbalken 20 µm. (D-F) Axone von Wildtyp (oben) und *unc-104^{bris}* (unten) Larven wurden mit verschiedenen Antikörpern markiert. Der Membranmarker HRP wurde verwendet um die Nerven sichtbar zu machen (C,D). Aggregate von Unc-104 erscheinen nur in *unc-104^{bris}* Axonen (D, F, F^l grün), während eine mehr diffuse Verteilung in Wildtyp-Axonen vorhanden ist. Einzelne Partikel von Brp (E, F, E^l, F^l rot; E^l, F^l intensitätsabhängig) sind im Wildtyp (E) und in *unc-104^{bris}* (F) Larven sichtbar. Die entsprechenden Bereiche, welche mit Pfeilspitzen markiert wurden, sind vergrößert abgebildet (E^{ll}, F^{ll}). Die leicht vermehrte Anwesenheit von Brp ist weder nicht signifikant, noch kolokalisieren die Brp Partikel mit Unc-104 Aggregaten. (G, H, G^l, H^l) Immunfluoreszenzfärbungen zeigen Teile von NMJ 4. (G, H) Der Membranmarker HRP (rot) veranschaulicht die NMJ und Unc-104 zeigt die Verteilung von Kinesin-3 (G, H grün; G^l, H^l weiß). Aggregate von Unc-104 sind nur an den distalen Regionen (Pfeilspitzen) der NMJ von

unc-104^{bris} (unten) erkennbar und nicht im Wildtyp (oben). Maßstabsbalken C: 5 μm E^{II}: 1 μm . G: 10 μm .

Pan-neuronale Expression (elav-Gal4) eines mCherry-getaggten *unc-104* cDNA Konstrukts (*unc-104^{mCherry}*) ist ausreichend, um transheterozygote *unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}* Larven (von nun an bezeichnet als: *unc-104^{bris}/-*) zur vollen Lebensfähigkeit zu bringen.

Die pan-neuronale Expression von *Unc-104^{mCherry}* ist auch ausreichend, um die auftretenden Defekte in der Synapsenentwicklung zu retten (Abb. 12A-C). Beim Rescue (Abb. 12C) sind keine Glutamaterezeptorfelder ohne gegenüberliegendes Brp wie in *unc104^{bris}/-* mutanten Larven (Abb. 12B) zu erkennen.

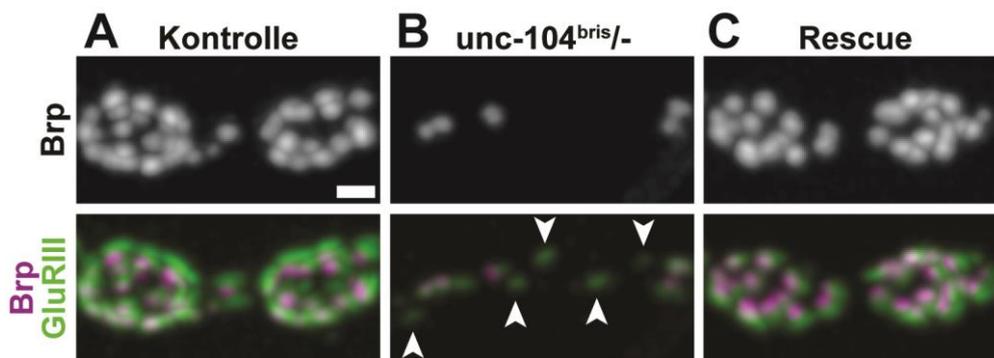


Abbildung 12 Pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* rettet die beobachteten Defekte in *unc-104^{bris}* Larven

(A-C) Konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen zeigen mehrere synaptische Boutons von NMJ 4 von L3 *Drosophila* Larven. Larven wurden mit GluRIII (grün) und Brp (magenta) gefärbt. Die pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* (C) rettet den Phänotyp der Glutamaterezeptorfelder ohne Brp (Pfeilspitzen), welcher in *unc-104^{bris}/-* Larven (B) beobachtet wird. Genotypen Kontrolle: *elavX-Gal4/+;UAS-unc-104^{mCherry}/+* *unc-104^{bris}/-*: *unc-104^{bris}/unc-104^{d11204};UAS-unc-104^{mCherry}/+* Rescue: *elavX-Gal4/+;unc-104^{bris}/unc-104^{d11204};UAS-unc-104^{mCherry}/+* Maßstabsbalken 1 μm .

Expression von *unc-104^{mCherry}* in Typ IV verzweigten dendritischen Neuronen (ppk-GAL4) ist ebenfalls ausreichend, um die beobachteten Defekte im dendritischen Filopodienwachstum in einer zellautonomen Weise zu retten (Abb. 13). Beide Resultate beweisen, dass der beobachtete Phänotyp durch einen Funktionsverlust von Unc-104 ausgelöst wurde und dass das mutierte Unc-104 keine neue toxische Funktion erlangt hat (toxic-gain-of-Function). Da der durch die R561H Mutation hervorgerufene Phänotyp im Vergleich zu

Nullmutanten (Pack-Chung et al., 2007, Barkus et al., 2008) abgemildert ist, handelt es sich bei der *brisly* Mutation um eine hypomorphe Mutante.

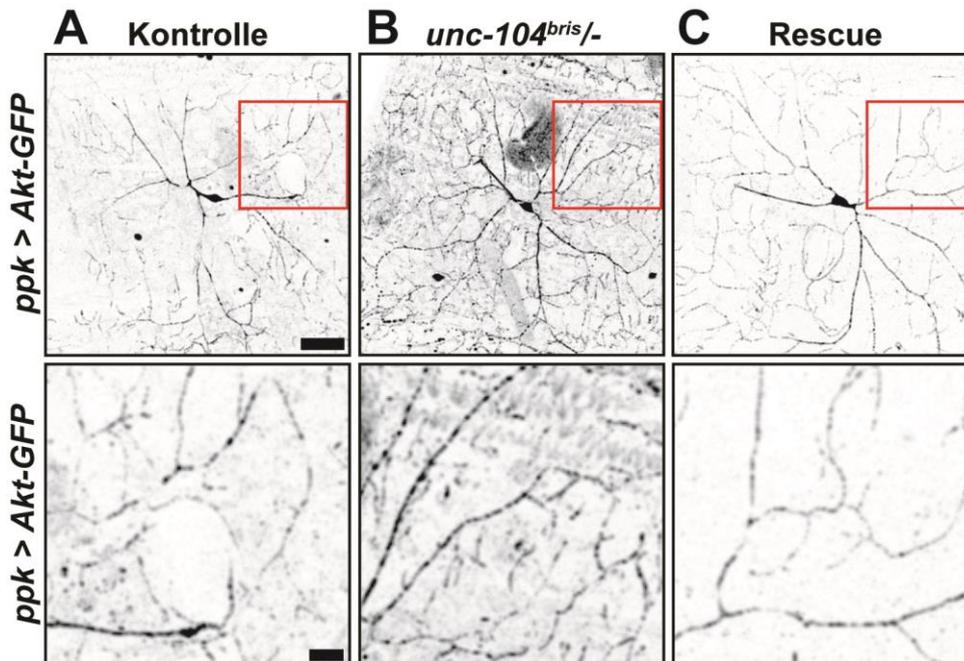


Abbildung 13 Ektopische Expression von *unc-104^{mCherry}* rettet die auftretenden Defekte an Dendriten

(A-C) Konfokale Aufnahmen von dendritischen Neuronen. Ektopische Expression von *unc-104^{mCherry}* (C) in Typ IV dendritisch verzweigten Neuronen mittels *ppk-Gal4* ist ausreichend, um die massive Zunahme an Filopodienwachstum in *unc-104^{bris}* mutanten Larven (B) zu retten. Filopodien wurden mit Hilfe von ektopisch exprimiertem Aktin-GFP sichtbar gemacht. Der untere Teil zeigt eine Vergrößerung. Genotypen Kontrolle: *;;ppk-Gal4/UAS-Aktin-GFP,UAS-unc-104^{mCherry}* *unc-104^{bris}/-*: *unc-104^{bris}/unc-104^{d11204},ppk-Gal4/UAS-Aktin-GFP*; Rescue: *unc-104^{bris}/unc-104^{d11204},ppk-Gal4/UAS-Aktin-GFP, UAS-unc-104^{mCherry}* Maßstabsbalken 20 μm ; Vergrößerung 10 μm .

3.1.4 *unc-104^{bris}* Larven sind charakterisiert durch Störungen in der Initiierung von Frachttransporten

Die FHA-Domäne vermittelt Protein-Protein-Interaktionen (Hofmann and Bucher, 1995). Zusätzlich ist die FHA-Domäne in *unc-104* an intramolekularen Interaktionen beteiligt. Strukturelle Veränderungen in der FHA-Domäne können zu Beeinträchtigungen im Frachttransport oder in der Freisetzung von Frachten am Zielort führen. Um diese zwei Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Initiierung des Transports im Soma und der Transports entlang der Axone

untersucht. Beeinträchtigungen bei der Initiierung von Transporten können im Ventralganglion beobachtet werden. Hierbei reichern sich Frachten im Zellkörper an und werden nicht zu den Synapsen transportiert. Daher kommt es zu einer verstärkten Färbung in Gebieten, in denen Zellkörper lokalisiert sind und einer dazu korrespondierenden abgeschwächten Färbung im synapsenreichen Neuropil. *unc-104^{bris}/-* mutante Larven sind durch verstärkte Brp Färbungen in Bereichen gekennzeichnet, in denen die Zellkörper lokalisiert sind (Vergleich Abb. 14A und 14B). Das in Kontrollarven normal lokalisierte synaptische Vesikelprotein Cystein String Protein (CSP) sammelt sich in *unc-104^{bris}/-* mutanten Larven ebenfalls in Regionen, in denen die Zellkörper lokalisiert sind (Abb. 14C,D). Transmembranproteine, darunter das Zelladhäsionsprotein Fasciclin II (Fas II) (Abb. 14E,F) und das Antigen, welches vom HRP-Antikörper erkannt wird (Abb. 14G,H) zeigen keine veränderte Verteilung im Ventralganglion von *unc-104^{bris}/-* Larven. Diese Daten deuten darauf hin, dass Synapsen in *unc-104^{bris}* Mutanten unter einer verminderten Versorgung mit Vesikeln und Komponenten der aktiven Zonen leiden könnten. Pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* ist ausreichend, um die Beeinträchtigungen bei der Initiierung des Transports von Brp zu retten (Abb. 14I,J).

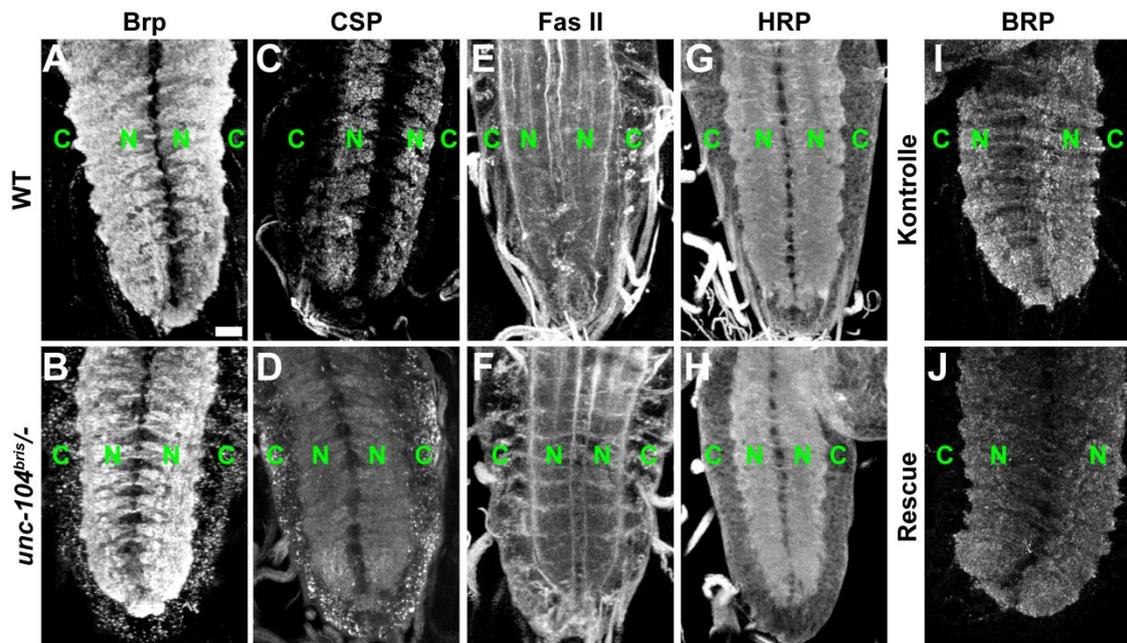


Abbildung 14 Verteilung von neuronalen Proteinen im Ventralganglion von *unc-104^{bris}/-* Larven

(A-H) Das Ventralganglion von Wildtyp (w^{1118} , oben) und *unc-104^{bris}/-* (*unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}*, unten) L3 *Drosophila* Larven wurde mit verschiedenen Antikörpern markiert um die Verteilung

von Frachten in den Zellkörpern zu beurteilen. Dabei wurden Probleme bei der Initiierung des Transports von synaptischen Vesikeln und Brp entdeckt. (A,B) Immunfluoreszenzfärbung des präsynaptischen aktiven Zonen Proteins Brp ist in der Neuropil-Region (grünes N) von Wildtyp Larven (A) konzentriert. In *unc-104^{bris}*- Larven (B) kommt es zu einer Zunahme im zellkörperreichen Bereich (grünes C). (C, D) Das synaptische Vesikelprotein CSP war ebenfalls verhältnismäßig erhöht in Zellkörpern von *unc-104^{bris}*- Larven. (E, F) Andere Proteine zeigen eine unveränderte Verteilung in *unc-104^{bris}*- Larven, darunter das Zelladhäsionsmolekül Fasciclin II (Fas II) (E, F) und der neuronale Marker HRP (G, H). (I, J) Pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* rettet die in *unc-104^{bris}* mutanten Larven beobachteten Defekte. Das Ventralganglion von L3 *Drosophila* Larven wurde mit dem aktiven Zonen Protein Brp markiert. Maßstabsbalken 20 µm.

Als nächstes sollte der Transport entlang des Axons untersucht werden. Sollten axonale Transportprobleme auftreten, z.B. spontaner Abbau des Motor-Fracht-Komplexes, würde erwartet werden, dass axonale Schwellungen und/oder Anhäufungen von Frachten im Axon auftreten, wie für Kinesin-1 Mutanten beschrieben (Hurd and Saxton, 1996). Es konnten weder Anhäufungen von Frachten in Axonen von *unc-104^{bris}* Larven beobachtet werden, noch traten Fracht-Cluster oder axonale Schwellungen auf (Abb. 15A-N). Dies legt nahe, dass *unc-104^{bris}* Mutanten wahrscheinlich eher unter beeinträchtigter Initiierung von Frachten leiden als an Transportproblemen im Axon.

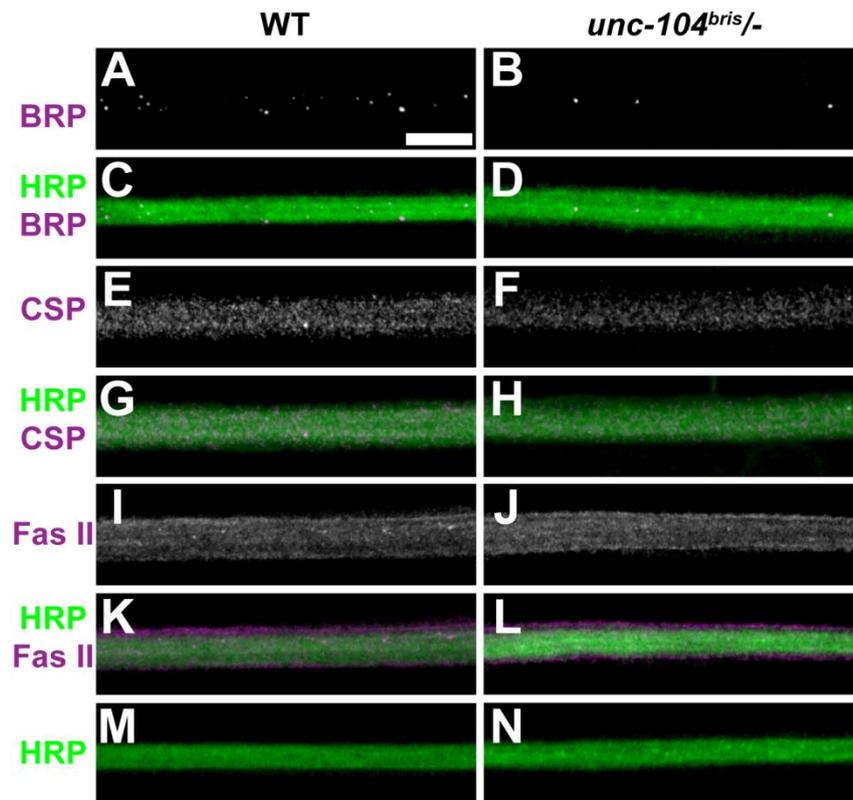


Abbildung 15 Keine axonalen Schwellungen wurden in *unc-104^{bris}* mutant Larven beobachtet

Axone von Wildtyp (*w¹¹¹⁸*, links) und *unc-104^{bris}/-* (*unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}*, rechts) von L3 *Drosophila* Larven wurden mit verschiedenen neuronalen Markern gefärbt. Visualisierung des präsynaptischen aktiven Zonen Proteins Brp (A-D; grau/magenta), des synaptischen Vesikelproteins CSP (E-H; grau/magenta) und des Zelladhäsionsmoleküls Fasciclin II (Fas II) (I-L; grau/magenta) zeigt, dass keines der Proteine in den Axonen von *unc-104^{bris}* Larven angereichert ist. Neuronale Membranen wurden durch Färbung mit HRP kenntlich gemacht (C, D, G, H, K - N, grün). Es konnten keine axonalen Schwellungen erkannt werden. Maßstabsbalken 5 μ m.

3.1.5 *unc-104^{bris}* Larven sind durch larvale Bewegungsstörungen gekennzeichnet

Desweiteren wurde untersucht, ob Störungen im Unc-104 basierten Transport und der gleichzeitige Verlust von Brp an einigen Synapsen zu funktionalen Störungen in der NMJ Funktion führen. Da die NMJ für die Bewegung der Larve essentiell ist, können Störungen der NMJ Funktion anhand eines veränderten Larven-Bewegungsmusters nachgewiesen werden. Tatsächlich zeigen Analysen der larvalen Fortbewegung, dass homozygote *unc-104^{bris}* Larven

gravierende Beeinträchtigungen aufweisen. Transheterozygote *unc-104^{bris}/-* Larven sind nahezu paralytisch (Abb. 16) und die Larven weisen zusätzlich einen Körperhaltungsdefekt auf (Abb. 17). Durch die pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* kann sowohl die gravierende Beeinträchtigung in der Fortbewegung als auch der Körperhaltungsdefekt gerettet werden.

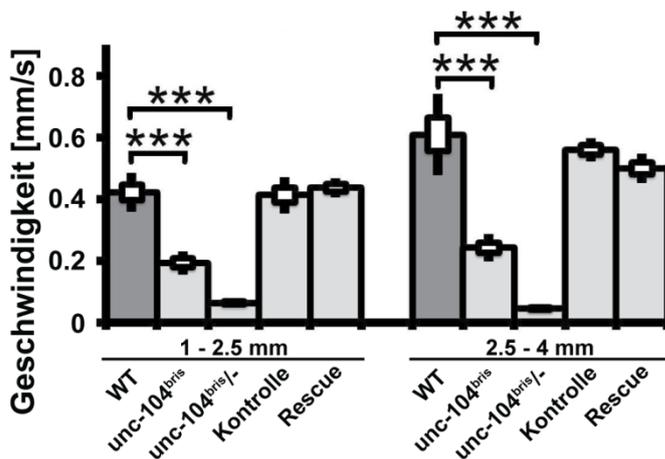


Abbildung 16 Beeinträchtigte larvale Bewegungsaktivität bei *unc-104^{bris}* mutanten Larven
 Wildtyp Larven sind signifikant schneller als homozygote *unc-104^{bris}* Larven. *unc-104^{bris}/-* Larven sind nahezu bewegungslos und sterben im späten L3 Stadium. Pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* rettet die beobachteten Defekte. Genotypen WT.: *w¹¹¹⁸ unc^{bris}: unc-104^{bris}/unc-104^{bris}* *unc-104^{bris}/-*: *unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}*, Kontrolle: *elavX-Gal4/+;;UAS-unc-104^{mCherry}/+* Rescue : *elavX-Gal4/+;unc-104^{bris}/unc-104^{d11204};UAS-unc-104^{mCherry}/+*

Störungen in Kinesin-1 basiertem Transport lösen Defizite in der Bewegung von Larven aus. Diese Defizite sind in jungen Larven eher schwach und werden mit dem Alter stärker (Hurd and Saxton, 1996, Füger et al., 2012). Desweiteren konnte beobachtet werden, dass Transportdefizite in *khc* mutanten Larven zu einem charakteristischen Tail-Flip Phänotyp führen. Dieser wird durch einen anterior-posterioren Gradienten in der NMJ Funktion verursacht. Das zeigt, dass lange Axone bei Transportdefiziten am meisten gefährdet sind (Hurd and Saxton, 1996). Im Gegensatz dazu ist in homozygoten *unc-104^{bris}* Larven der Anteil von larvalen Bewegungsstörungen über die gesamte Entwicklung konstant (1-2,5 mm/s: wt: 0,42 +/- 0,03 mm/s, n=6; *unc-104^{bris}/unc-104^{bris}*: 0,19 ± 0,01 mm/s, n=7; 2,5-4 mm/s: wt: 0,61 +/- 0,05 mm/s, n=6; *unc-104^{bris}/unc-104^{bris}*: 0,24 ± 0,02 mm/s, n=8). Dies deutet daraufhin, dass die zugrundeliegenden Defekte wahrscheinlich auf eine gestörte Entwicklung und

nicht auf einen degenerativen Defekt zurückzuführen sind. Eine mögliche Ursache könnte die gestörte Reifung einer Untergruppe von Synapsen sein.

Um die längenabhängige Störung im axonalen Transport zu testen, wurde das Auftreten von phänotypisch charakterisiertem Tail-Flip von Kinesin-1 Transportstörungen bewertet (Hurd and Saxton, 1996). Weder homozygote *unc-104^{bris}* Larven noch transheterozygote *unc-104^{bris}/-* Larven zeigten einen Tail-Flip Phänotyp (Abb. 17). Zusammen mit der Häufung von synaptischen Frachten in den Zellkörpern und der Abwesenheit von axonalen Schwellungen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass in *unc-104^{bris}* Larven die Initiierung des Transports limitierend ist und dass daher alle Segmente zu einem ähnlichen Grad betroffen sind.

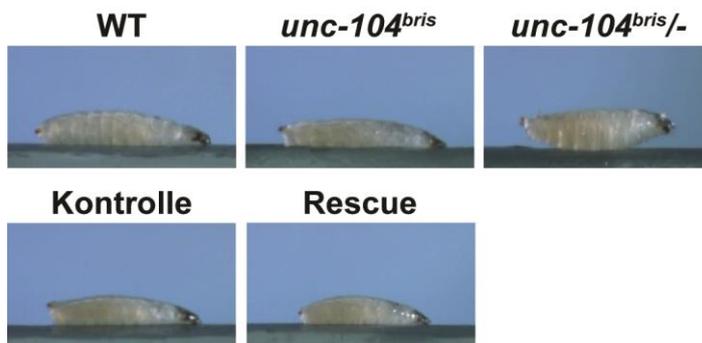


Abbildung 17 Körperhaltungsdefekt bei *unc104^{bris}/-* Larven

Larven sind während dem Fortbewegen gezeigt. Kein Tail-Flip Phänotyp wurde beobachtet. Nahezu paralysierte *unc-104^{bris}/-* Larven zeigen einen Körperhaltungsdefekt. Dieser Haltungsdefekt kann durch die pan-neuronale Expression von *Unc-104^{mCherry}* gerettet werden. Genotypen WT: *w¹¹¹⁸ unc^{bris}: unc-104^{bris}/unc-104^{bris}* *unc-104^{bris}/-*: *unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}* Kontrolle: *elavX-Gal4/+;;UAS-unc-104^{mCherry}/+*; Rescue : *elavX-Gal4/+;unc-104^{bris}/unc-104^{d11204};UAS-unc-104^{mCherry}/+*.

3.1.6 Intakter *unc-104* basierter Transport ist essentiell um NMJ Wachstum zu begrenzen, unabhängig von der Synapsenfunktion

Störungen von Kinesin-1 und Kinesin-3 basierten anterograden Transporten führen zu einer Reduzierung der NMJ Größe und einer Verringerung der Anzahl von synaptischen Boutons (Hurd and Saxton, 1996, Pack-Chung et al., 2007, Barkus et al., 2008). Die Reduzierung von synaptischem Brp durch transgene RNAi ist jedoch nicht ausreichend um die Größe der NMJ zu verändern (Wagh et al., 2006).

Um zu testen, ob Unc-104 basierte Transportstörungen zu morphologischen Veränderungen aufgrund des Brp Verlustes an individuellen Synapsen führen, wurde die Größe der NMJ und der Boutons, die Anzahl der Synapsen pro Bouton und der Prozentanteil an Glutamatrezeptorfelder ohne Brp in Muskel 4 im Segment A2 quantifiziert (Abb. 18A-C). Überraschenderweise sind die NMJs von *unc-104^{bris}/unc-104^{bris}* und *unc-104^{bris}/-* Larven signifikant länger (Abb. 18D), während sich die Fläche der NMJs nicht verändert (Abb. 18A,E). NMJs von mutanten Larven enthalten, verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 18F) auch mehr synaptische Boutons. Desweiteren scheint die Ausdehnung und Reifung dieser synaptischen Boutons gestört zu sein, was sich durch eine reduzierte Größe bemerkbar macht (Abb. 18B,G). Die Boutons von *unc-104^{bris}/-* Larven enthalten ebenfalls weniger Synapsen, was durch die Anzahl an Glutamatrezeptorfelder quantifiziert wurde (Abb. 18B,H).

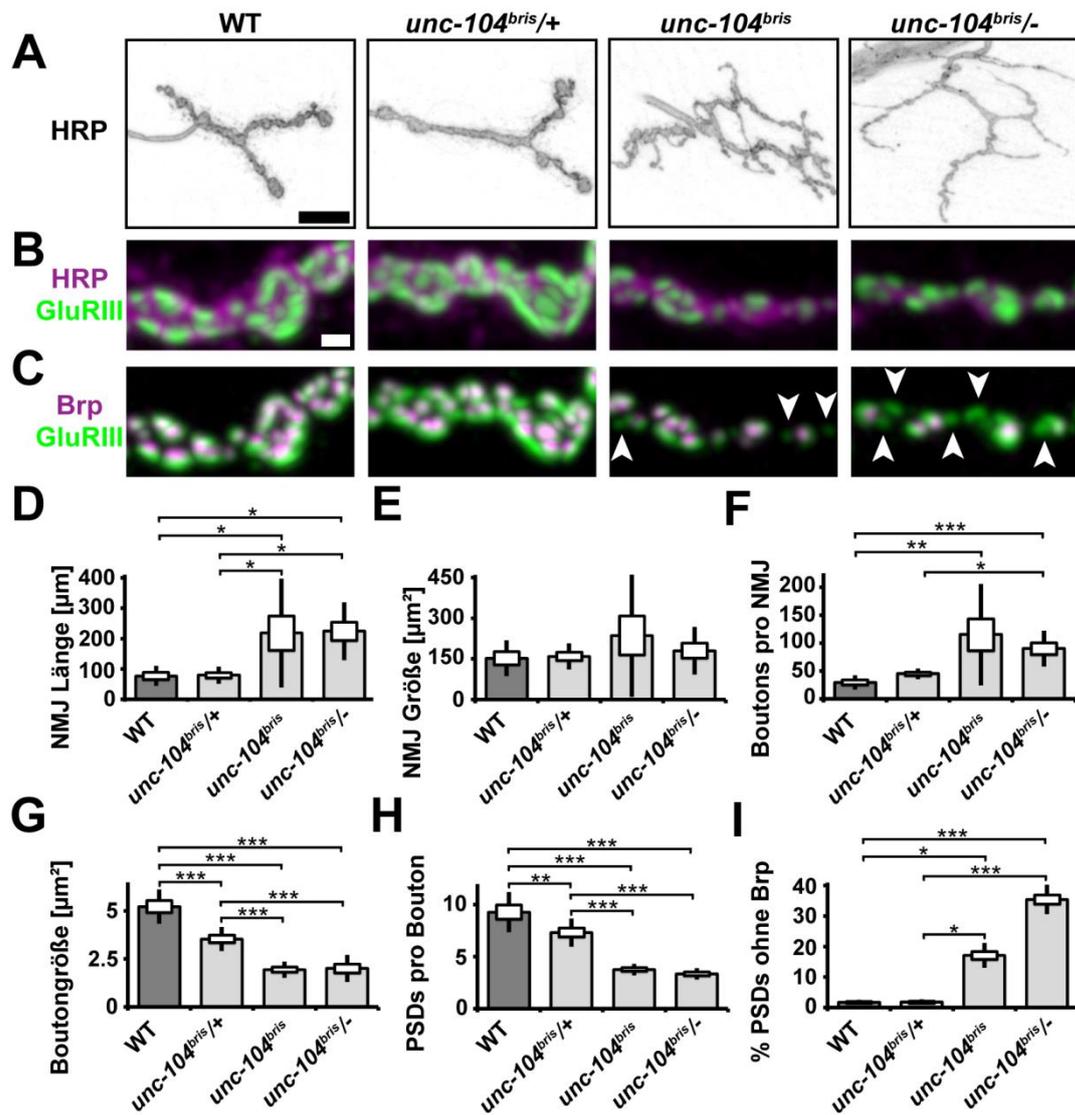


Abbildung 18 Veränderte Morphologie an der NMJ von *unc-104^{bris}/-* Larven

(A-C) NMJ 4, Segment A2 von L3 *Drosophila* Larven mit den Genotypen Wildtyp (white¹¹¹⁸), *unc-104^{bris/+}*, *unc-104^{bris}* (*unc-104^{bris}/unc-104^{bris}*) und *unc-104^{bris/-}* (*unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}*) wurden mit dem Membranmarker HRP (A-B), GluRIII (B-C) und Brp (C) gefärbt. Maßstabsbalken A: 10 µm; B: 1 µm. Die folgenden Charakteristiken der NMJ wurden bestimmt: NMJ Länge (D), NMJ Größe (E), Boutons pro NMJ (F), Boutongröße (G), PSD pro Bouton (H) und Prozent an PSD ohne Brp (I).

Warum führt ein gestörter Unc-104 basierter Transport zur Bildung von längeren NMJs und zu Defekten in der Ausdehnung der Boutons? Die NMJ von *unc-104^{bris/-}* Larven sind charakterisiert durch einen großen Anteil an Glutamatrezeptoren ohne Brp (Abb.18C,I und Abb. 8B). Diese Synapsen sind wahrscheinlich nur partiell funktional. Es ist möglich, dass die Vergrößerung der NMJs und die Defekte in der Reifung der Boutons unabhängig von der Störung der Synapsenreifung sind. Durch die Punktmutation in der FHA-Domäne von

*brisl*y Mutanten könnte es zu Störungen in der Regulation des NMJ Wachstums kommen. Desweiteren könnte durch die Punktmutation eine Störung in der Boutonvergrößerung vorliegen. Durch die erhöhte Lebensdauer der *brisl*y mutanten Larven konnten diese neuen Funktionen vielleicht erst erkannt werden.

Pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* im *unc-104* mutanten Hintergrund ist ausreichend um alle beobachteten Defekte in *unc-104^{brisl}/unc-104^{d11204}* Larven (Abb. 19) zu retten. Dies hebt hervor, dass sowohl die Vergrößerung der NMJ (Abb. 19D,F) als auch die Defekte in der Boutonvergrößerung (Abb. 19G,H) in einer Loss-of-Function der *brisl* R561H Mutation begründet sind. Neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* im *brisl* mutanten Hintergrund unterdrückt die Vergrößerung, die in *brisl* mutanten Larven auftritt. Hierbei ändert sich die Form der NMJ. Die Anzahl an Boutons per NMJ verringert sich, die Größe der Boutons steigt hingegen. Die Größe der NMJ, die in *brisl* mutanten Larven reduziert ist, wird durch Expression von *unc-104^{mCherry}* im *brisl* mutanten Hintergrund nicht beeinflusst (Abb. 19A,E). Die Expression von *unc-104^{mCherry}* rettet auch die Defekte in der Synapsenentwicklung (Abb. 19B-H). Hierbei rettet die *unc-104^{mCherry}* Expression die Defizite in der Synapsenreifung, wie durch Messung des Prozentanteils von Glutamaterezeptorfelder ohne Brp quantifiziert wurde (Abb. 19I).

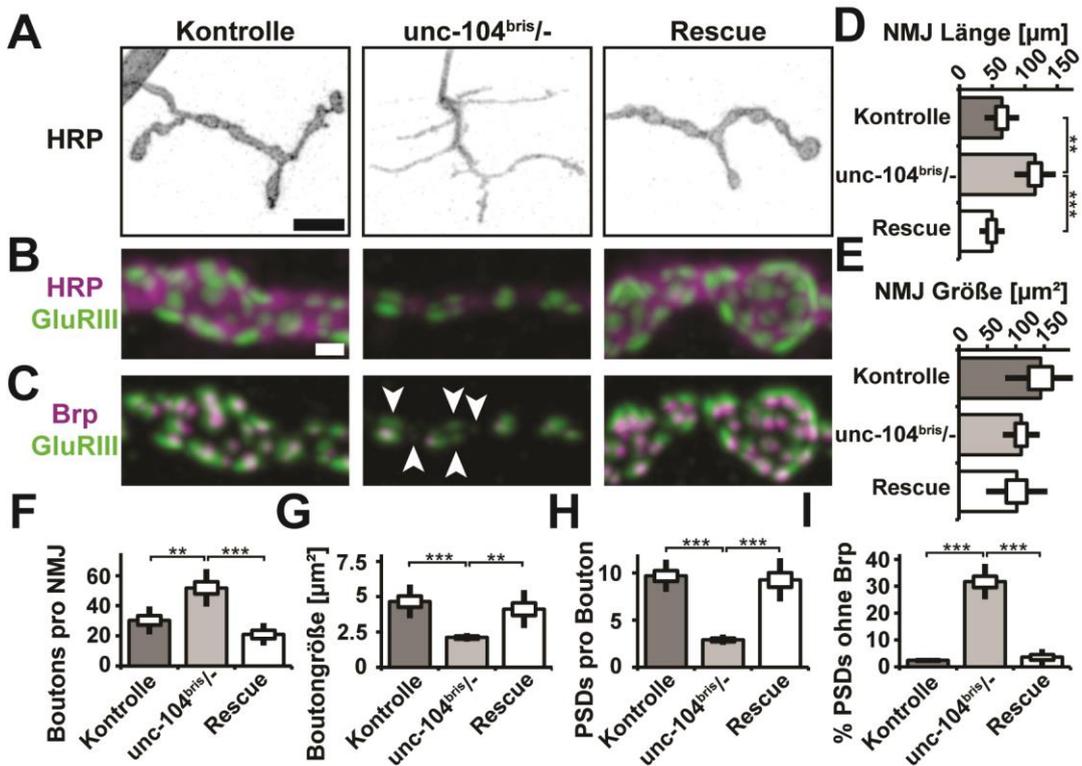


Abbildung 19 Rescue der morphologischen Veränderungen durch pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}*

(A-C) NMJ 4, Segment A2 von L3 *Drosophila* Larven mit den Genotypen *elavX-Gal4*;UAS-*unc-104^{mCherry}* (Kontrolle), *unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}*;UAS-*unc-104^{mCherry}* (*unc-104^{bris/-}*) und *elavX-Gal4*; *unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}*;UAS-*unc-104^{mCherry}* (Rescue) wurden mit dem Membranmarker HRP (A-B), GluRIII (B-C) und Brp (C) gefärbt. Maßstabsbalken A: 10 μm ; B: 1 μm . Die folgenden Charakteristiken der NMJ wurden bestimmt: NMJ Länge (D), NMJ Größe (E), Boutons pro NMJ (F), Boutongröße (G), PSD pro Bouton (H) und Prozent an PSD ohne Brp (I).

3.1.7 Veränderungen in der NMJ- und Bouton-Morphologie werden nicht indirekt durch den Verlust von Brp verursacht

An NMJs von *bris* mutanten Larven wurden drei Klassen von Defekten festgestellt.

- (1) Defekte in der Ausbildung von funktionellen Synapsen. Oft fehlt ein präsynaptisches Brp Signal.
- (2) Eine veränderte Morphologie der NMJs. NMJs sind bei gleicher Fläche viel länger.
- (3) Boutons sind kleiner und enthalten weniger Synapsen.

Bisher ist unklar, ob alle drei Defekte voneinander unabhängig sind, oder ob z.B. der Verlust von Brp zu synaptischer Fehlfunktion führt. Diese Fehlfunktion kann auf Ebene der NMJ kompensatorisch zu vermehrtem Auswachsen der NMJ führen. Das starke Längenwachstum kann wiederum das Ausreifen und Wachsen von Boutons erschweren.

Der beobachtete Verlust von Brp an aktiven Zonen löst eine synaptische Fehlfunktion aus. Wenn die Defekte des zu starken Wachstums der NMJ und die Defekte in der Ausreifung sekundär zum Verlust von Brp an der aktiven Zone ist, sollte die Reexpression von Brp ausreichen um die NMJ- und Bouton-Defekte zu heilen. Die weitere Reduktion von Brp sollte diese Defekte hingegen weiter verstärken.

Die Vergrößerung der NMJ wurde weder durch die Überexpression von Brp unterdrückt, noch hat die weitere Reduzierung von Brp bestehende Defekte verschlimmert (Abb. 20A-D). Ebenso bestehen die Defekte in der Vergrößerung und in der Reifung der Boutons bei Erhöhung oder Reduzierung von Brp weiter und werden durch Brp RNAi nicht verschlimmert (Abb. 20E-G). Daher kann davon ausgegangen werden, dass weder die Vergrößerung von Wildtyp NMJs, noch die Defekte in der Boutonreifung auf den Verlust von Brp an aktiven Zonen zurückzuführen sind (Rasse et al., 2005, Kittel et al., 2006, Wagh et al., 2006).

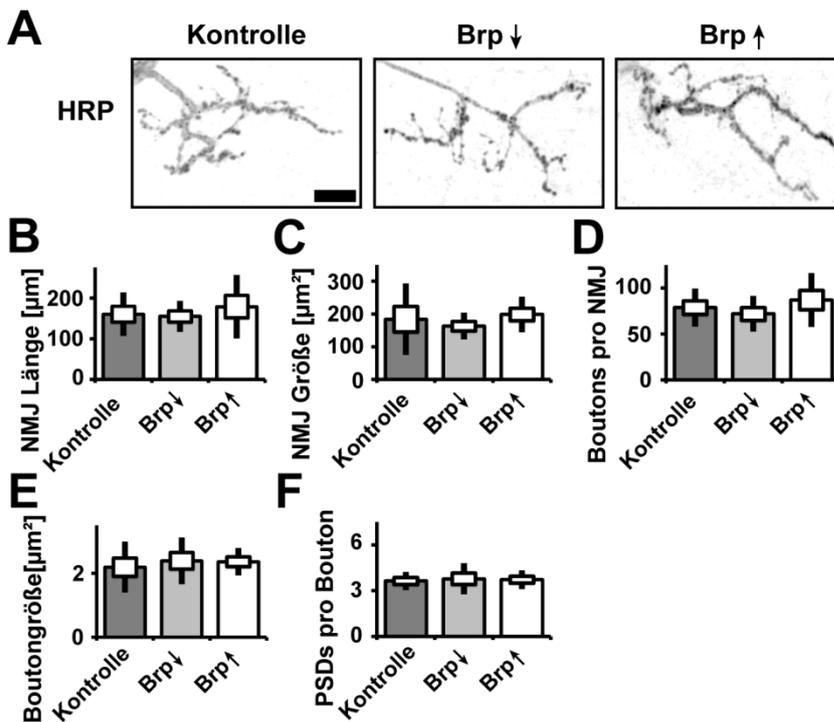


Abbildung 20 Veränderte Mengen von Brp ändern nicht die NMJ-Morphologie von *unc-104^{bris/-}* Mutanten

(A-F) Um zu testen, ob die beobachteten morphologischen Veränderungen in *unc^{bris/-}* Larven auf den Verlust von Brp zurückzuführen sind, wurden L3 *Drosophila* Larven folgenden Genotyps mit dem Membranmarker HRP (A) gefärbt: *elavX-Gal4;unc-104^{bris}/unc-104^{d11204}* (Kontrolle), *elavX-Gal4;unc-104^{bris}/unc-104^{d11204};UAS-Brp-RNAi* (Brp↓) und *elavX-Gal4;unc-104^{bris}/unc-104^{d11204};UAS-Brp* (Brp↑). Die folgenden Charakteristiken der NMJ 4 aus Segment A2 wurden bestimmt: NMJ Länge (B), NMJ Größe (C), Boutons pro NMJ (D), Boutongröße (E), PSD pro Bouton (F). Maßstabsbalken 10 µm.

3.2 Postsynaptische Veränderungen in *unc-104^{bris}* mutanten Larven

3.2.1 Reduzierte DLG Konzentration in *unc-104^{bris/-}* mutanten Larven

In homozygoten *unc-104^{bris}* mutanten Larven ist keine Retraktion zu erkennen (Abb. 9). Es ist eher zu beobachten, dass an den terminalen Enden HRP ohne DLG vorhanden ist. Es ist bekannt, dass DLG die Glutamatuntereinheit GluRIIB an der Synapse stabilisiert (Chen and Featherstone, 2005). Zusätzlich beeinflusst sowohl die prä- als auch die postsynaptische Expression von DLG das Wachstum des SSR (Budnik et al., 1996). DLG dient somit als wichtiger Marker für das SSR. Die postsynaptische Membran der NMJ entwickelt sich

erst langsam nach präsynaptischer Innervierung. Da in der *bristly* Mutante an terminalen Boutons kein DLG und somit vermutlich kein SSR vorhanden ist, könnte es in der Mutante zu einer verlangsamten Synaptogenese kommen. Aus diesem Grund wurde die Menge an DLG in verschiedenen Larven untersucht. Um die Konzentration von nativem DLG zu messen, wurden L3 *Drosophila* Larven mit anti-DLG immungefärbt und unter gleichen Bedingungen am konfokalen Mikroskop aufgenommen. In *unc-104^{bristly}/-* Larven kommt es zu einer deutlichen Reduzierung von nativem DLG (Abb. 21C). Hieraus ergibt sich die Frage, ob die verminderte Menge an DLG auf (1) Einschränkungen der präsynaptische Funktion zurückzuführen ist, ob sie (2) eventuell auf den Verlust von präsynaptisch trophischen Wachstumsfaktoren an den Muskel basiert oder ob (3) sie direkt auf gestörten postsynaptischen Transport zurückzuführen ist.

Um dies näher zu untersuchen, wurde *unc-104^{mCherry}* entweder prä- oder postsynaptisch exprimiert. Die Reduktion von DLG wird durch die pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* vollständig gerettet (Abb. 21D). Ektopische postsynaptische Expression (24B-Gal4) von *unc-104^{mCherry}* hat hingegen keinen Einfluss auf den DLG-Level.

Hieraus lässt sich folgern, dass die verminderten Level an DLG nicht auf gestörten postsynaptischen Transport zurückzuführen sind. Ob der postsynaptische Defekt auf Einschränkungen der präsynaptische Funktion zurückzuführen ist, oder ob er eventuell auf den Verlust von präsynaptischen trophischen Wachstumsfaktoren an den Muskel zurückzuführen ist, wurde nicht abschließend geklärt.

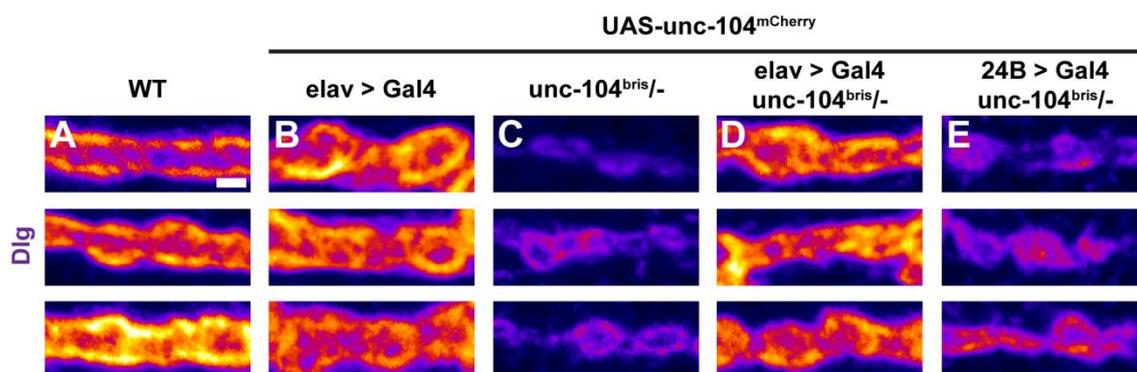


Abbildung 21 Reduzierte DLG Expression in *unc-104^{bristly}/-* mutanten Larven

(A-E) Konfokale Ausschnitte von NMJ 4 in Segment A2 immunfluoreszenzgefärbt mit dem Gerüstprotein DLG. Alle Genotypen wurden mit der gleichen Laserintensität aufgenommen. Die reduzierte Expression von DLG in *unc-104^{bristly}/-* mutanten Larven (C), kann durch die pan-

neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* (D) gerettet werden kann. Ektopische Expression von *unc-104^{mCherry}* mit 24B-Gal4 (E) führt zu keiner Veränderung der Expression von DLG im Vergleich zu *unc-104^{bris}*-Larven. Maßstabsbalken 1 μ m

3.2.2 Veränderungen im SSR von *unc-104^{bris}*-mutanten Larven

In *unc-104^{bris}*-Mutanten treten Defekte in der Struktur des SSR auf (Kramer, 2008). In Kontrolltieren bildet sich eine dichte SSR Struktur. Das SSR ist deutlich komprimiert (Abb. 22A), im Gegensatz zur *unc-104^{bris}*-Mutante (Abb. 22B). In der *bris* Mutante wirkt das SSR weit aufgefächert und nicht kompakt.

Defekte in der Faltung des SSR und die Reduzierung des DLG-Levels an der NMJ von *unc-104^{bris}*-Larven könnten durch Störungen des prä- oder postsynaptischen Transports verursacht worden sein.

Durch prä- oder postsynaptische Expression von *unc-104^{mCherry}* und anschließender Anfertigung von Ultradünnschnitten der NMJs sollte geklärt werden, ob prä- oder postsynaptische Expression ausreichend ist, Defekte in der Faltung des SSR zu retten.

Pan-neuronale Expression von *unc-104^{mCherry}* ist ausreichend um Defekte in der SSR Faltung zu retten (Abb. 22C). Jedoch gelingt es nicht, durch die ektopische Expression von *unc-104^{mCherry}* mit 24B-Gal4 das SSR wieder zu komprimieren (Abb. 22D).

Es konnte gezeigt werden, dass es im SSR von *unc-104^{bris}*-mutanten Larven zu strukturellen Defekten kommt. Somit mag die verringerte Menge von DLG im direkten Zusammenhang mit einer gestörten SSR Struktur stehen.

Desweiteren sollte neben den auftretenden SSR Defekten in den Ultradünnschnitten auch die Größe der Boutons untersucht werden. Wie bereits aus den Immunfärbungen zu erkennen war, sind die einzelnen Boutons in der *unc-104^{bris}*-Mutante deutlich kleiner als in den Kontrollen. Die Ultradünnschnitte bestätigten dies. Wie zu erwarten war, waren die Boutons in *unc-104^{bris}*-Larven deutlich kleiner als in der Kontrolle (Abb. 22A,B). Dieser Effekt konnte durch die pan-neuronale Expression (elav-Gal4) von *unc-*

$104^{mCherry}$ gerettet werden (Abb. 22C), nicht jedoch durch die postsynaptische Expression (24B-Gal4) von $unc-104^{mCherry}$ (Abb. 22D).

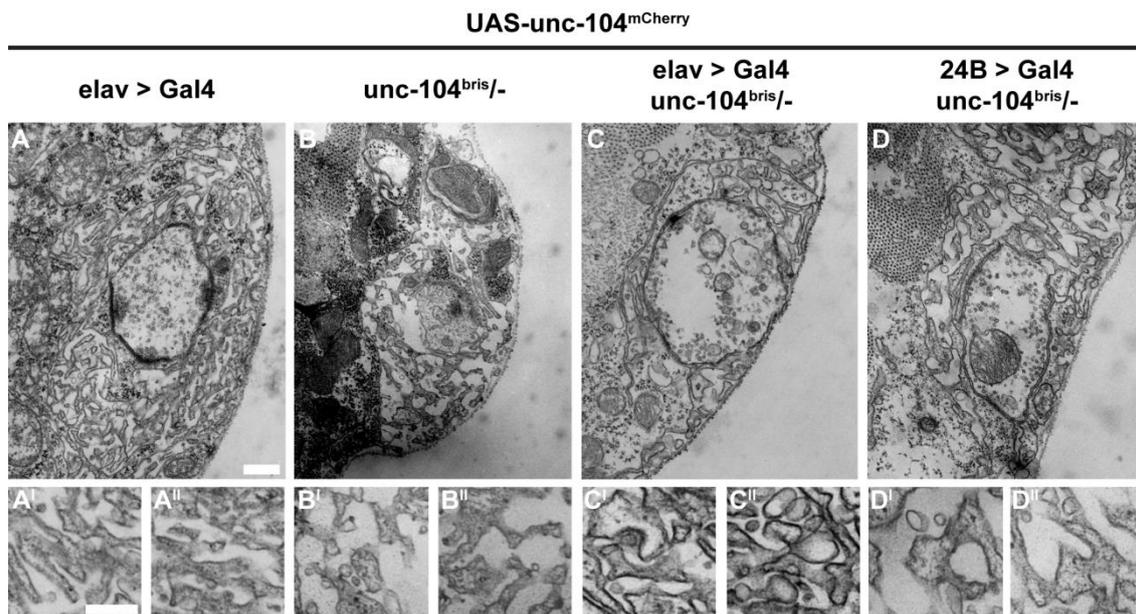


Abbildung 22 Veränderungen im SSR von $unc-104^{bris}/-$ mutanten Larven sind im Elektronenmikroskop erkennbar

(A-D) Elektronenmikroskopische Aufnahmen der NMJ 4 in Segment A2. (A) In der Kontrolle sind deutlich T-Bars zu erkennen und das SSR weist eine kompakte Form auf. (B) Der Bouton der $unc-104^{bris}/-$ mutanten Larve ist deutlich kleiner und das SSR wirkt auseinandergezogen. (C) Pan-neuronale Expression mit $unc-104^{mCherry}$ führt zu einem Rescue. Der Bouton, wie auch die T-Bar ist mit der Kontrolle vergleichbar. Ebenfalls hat das SSR eine kompakte Form. (D) Durch die ektopische Expression mit 24B-Gal4 von $unc-104^{mCherry}$ kommt es zu keiner Verbesserung. Der Bouton und auch das SSR weisen die gleichen Defekte wie in der $unc-104^{bris}/-$ Mutanten Larve auf. Maßstabsbalken A: 500 nm A¹: 250 nm

3.2.3 Veränderte Verteilung von Fas II und DLG in $unc-104^{bris}/-$ mutanten Larven

Bei Untersuchungen an DLG Mutanten wurde festgestellt, dass der präsynaptische Verlust von DLG ähnliche SSR Defekte auslöst wie in $unc-104^{bris}/-$ mutanten Larven beobachtet wurden (Abb. 22B) (Budnik et al., 1996). Die Komprimierung des SSR ist ebenfalls beeinträchtigt. Die Defekte des SSR könnten somit durch ein präsynaptisches Problem im DLG Transport oder Verteilung verursacht worden sein.

Der Anteil an präsynaptischem DLG ist in Immunfärbungen nicht erkennbar, da er durch die postsynaptische Expression überdeckt wird. Um DLG visuell auf der präsynaptischen Seite zu erkennen, wurde ein fluoreszenzmarkiertes DLG präsynaptisch exprimiert.

DLG bindet und clustert normalerweise das Protein Fas II, welches dann in den Membranen lokalisiert ist (Thomas et al., 1997). Das Zelladhäsionsmolekül Fas II lokalisiert sowohl prä- als auch postsynaptisch und kontrolliert die Stabilität der Synapse. Zusätzlich ist Fas II für das Auswachsen der NMJ und die strukturelle Plastizität wichtig (Schuster et al., 1996). Fas II kontrolliert über seine Menge an synaptischen Fas II das synaptische Wachstum. Kommt es zu einem vollständigen Verlust der Fas II Menge an der Synapse, wird das Wachstum der NMJ verhindert (Schuster et al., 1996). Ein moderater Verlust an Fas II führt hingegen zu einem zu starken Auswachsen der NMJ, was eine weitere Parallele zu *unc-104^{bris}* mutanten Larven darstellt (Schuster et al., 1996). Durch die Immunfärbung der Ventralganglien von *Drosophila* Larven konnte gezeigt werden, dass Fas II unabhängig von Kinesin-3 transportiert wird. Es kommt zu keiner Anhäufung von Fas II in den zellkörperreichen Regionen des Ventralganglions (Abb. 14E,F). Um zu überprüfen, ob es zu Störungen von Fas II und präsynaptischem DLG an der NMJ von *bris* mutanten Larven kommt, wurde DLG präsynaptisch exprimiert und für Fas II eine Immunfärbung durchgeführt.

Im Wildtyp ist deutlich zu erkennen, dass DLG und Fas II an der gesamten NMJ perisynaptisch exprimiert werden. Hierbei ist die gesamte Kontaktfläche zwischen Nerv und Muskel, bis auf die Synapsen, die ringförmig ausgespart werden, positiv für DLG und Fas II (Abb. 23A, Pfeilspitzen). In den *unc-104^{bris}/-* mutanten Larven ist hingegen die Kolo-kalisierung beider Proteine gestört. An einigen Stellen ist DLG an anderen Fas II allein exprimiert. Es treten viele perisynaptische Bereiche auf, die negativ für DLG sind (Abb. 23B; Pfeilspitzen).

Durch die hieraus bedingten Beeinträchtigungen von Fas II kommt es vermutlich in der *unc-104^{bris}/-* Mutante zu Störungen in der für die Koordination des Boutonwachstums wichtigen Modulation der Zelladhäsion.

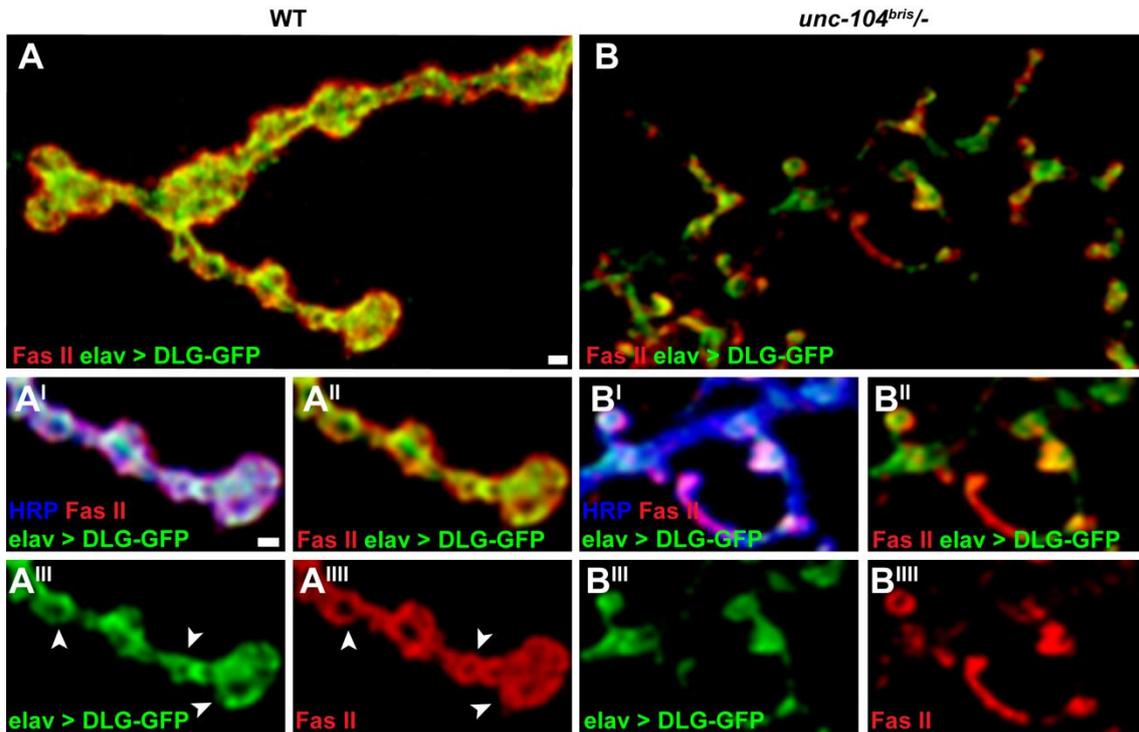


Abbildung 23 Veränderte Fas II und DLG-GFP Verteilung in *unc-104^{bris/-}*-mutanten Larven (A-B) Konfokale Aufnahmen von NMJ 4 in Segment A2 in Wildtyp (*elav3rd-Gal4,UAS-DLG-GFP*, links) und *unc-104^{bris/-}* (*unc-104^{bris}/unc-104^{d11204},elav3rd-Gal4,UAS-DLG-GFP*, rechts) mutanten Larven mit pan-neuronaler Expression von *dlg-GFP* (grün) und Immunfluoreszenzfärbung vom Zelladhäsionsmolekül Fasciclin II (Fas II, rot) und Membranmarker HRP (A',B' blau). Im Wildtyp sind Fas II und DLG in einer Ringstruktur lokalisiert (Pfeile). Normalerweise kolokalisiert DLG mit Fas II, wie im Wildtyp zu erkennen. In *unc-104^{bris}* mutanten Larven ist Fas II außerhalb der Synapse zu erkennen und DLG innerhalb. Maßstabsbalken 1 μ m.

3.3 Untersuchungen an der Kinesin-1 Mutante *khc*^{N262S}

Hereditäre spastische Spinalparalyse (HSP) fasst eine Gruppe von genetisch heterogenen, neurodegenerativen Erkrankungen zusammen. HSP ist charakterisiert durch eine spastische Schwächung der unteren Extremitäten. Es wurde ein *Drosophila*-Modell für HSP Typ 10 (SPG10) entwickelt, hervorgerufen durch eine Mutation in *kif5a*. Die entsprechende Position der humanen Mutation N256S ist in *Drosophila* an der Position N262S. Ektopische Expression von *Drosophila khc*, welche eine humane Mutation (N256S) trägt, genügt um axonalen Transport zu stören und motoneuronale Erkrankungen in *Drosophila* hervorzurufen.

3.3.1 Auftreten von axonalen Akkumulationen in *khc*^{N262S} mutanten Larven

In Immunfärbungen wurde in Larven nach Überexpression von *khc*^{N262S} sowohl Akkumulation von synaptischen Frachten als auch Veränderung an der neuronalen Membran festgestellt (Füger et al., 2012). Dies sind zwei von drei Voraussetzungen um axonale Schwellungen eindeutig nachzuweisen.

Ein *Drosophila* Axon hat einen typischen Durchmesser von unter 300 nm. Aus diesem Grund ist es sehr schwer, einzelne Axone, die im Nerv gebündelt auftreten, lichtmikroskopisch aufzulösen.

Hurd und Saxton (Hurd and Saxton, 1996) zeigten, dass einzelne Axone beim Auftreten von axonalen Schwellungen einen bis zu 10-fachen größeren Durchmesser aufweisen. Um zu überprüfen, ob Überexpression (D42-Gal4; 29°C) von *khc*^{N262S} ausreichend ist um das Anschwellen von Axonen auszulösen, wurden Ultradünnschnitte angefertigt und analysiert.

In Immunfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass in L3 Larven häufig große Schwellungen und Akkumulationen von Frachten auftreten. Aus diesem Grund wurden einzelne Nerven von L3 Larven verwendet (Füger et al., 2012).

Es wurde die Technik der chemischen Fixierung angewendet mit der auch die Synapsen präpariert wurden (siehe 2.2.9). Das Ventralganglion und die aus ihm kommenden Nerven wurden in der Larve belassen. Nach Auswertung der ersten Aufnahmen wurde festgestellt, dass es mit dieser Methode zu einem Entleeren der Axone im Nerv kommt. In der Abbildung 24 ist ein Beispiel zu sehen. Deutlich zu erkennen sind große „leere“ Axone (Abb. 24B, grün). Bei ihnen handelt es sich vermutlich um Axone mit axonalen Schwellungen, die dadurch einen größeren Durchmesser aufweisen und deren Struktur selektiv während der Fixierung und der darauf folgenden Waschschriffe zerstört wurde.

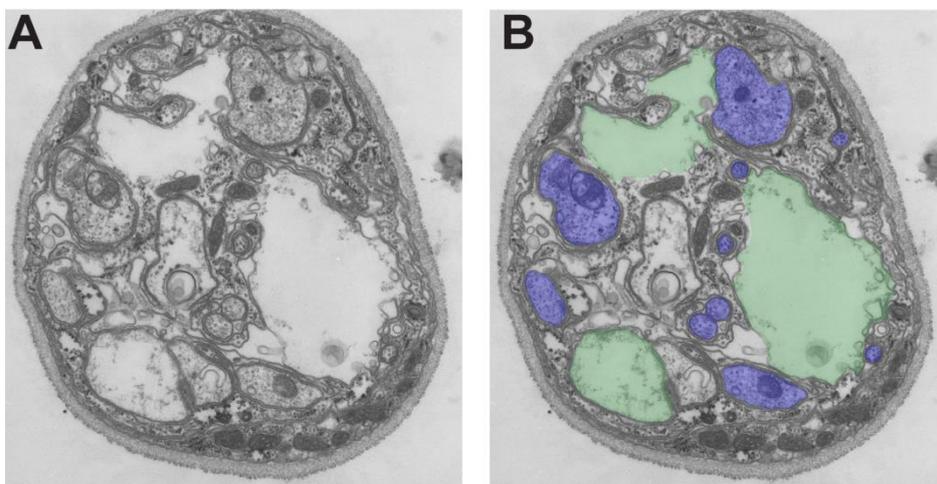


Abbildung 24 Nerv mit leeren Axonen

(A,B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nervs mit beschädigten Axonen. Durch die verwendete Präparationstechnik scheint es zu einem Auslaufen der Axone zu kommen. Es sind große Axone ohne Inhalt zu erkennen. In (B) sind einzelne intakte Axone in blau hinterlegt, in grün sind die leeren Axone gekennzeichnet.

Diese auftretenden Probleme konnten durch Verwendung von L2 Larven und einer neu etablierten Präparationstechnik (siehe 2.2.8) gelöst werden. Die kleineren Larven konnten mit Hilfe eines Hochdruckgefriergeräts ohne Präparation und Vorfixierung mittels PFA oder Glutaraldehyd kryofixiert werden. Nach einer anschließenden Gefriersubstitution konnten sie in Epon überführt und Ultradünnschnitte angefertigt werden. In Abbildung 25 ist ein Beispiel eines Nervs dieser neuen Methode zu sehen. Der Nerv weist keine „leeren“ Axone mehr auf. Die vorhandenen Axone (Abb. 25B, blau) sind im inneren des Nervs gebündelt und werden von einer Gliaschicht umgeben (Abb. 25B, rot). Auch der

Zwischenraum zwischen den Axonen ist mit Gliazellen gefüllt. Von außen ist der Nerv von einer Neurallamelle umgeben.

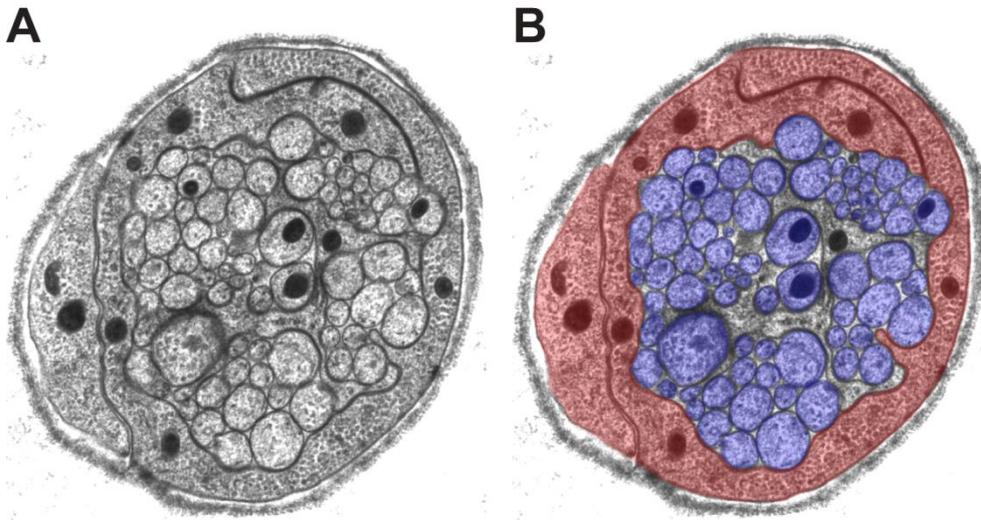


Abbildung 25 Nerv mit neuer Methode

(A,B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Nerven mit der neu etablierten Methode. Es sind keine leeren Axone mehr zu erkennen. In (B) wurden die einzelnen Axone blau hinterlegt, die umgebende Gliazellenstruktur wurde in rot hinterlegt. Die einzelnen Axone im Inneren werden zusätzlich von Gliazellen umgeben. Zur Abgrenzung nach außen ist der Nerv von einer Neurallamelle eingeschlossen.

Nach Etablierung der neuen Methode wurde das Auftreten von axonalen Schwellungen in der *khc* Mutante untersucht. Ein Beispiel eines typischen Querschnitts eines Nerven von Kontrolllarven ($D42 > w^{118}$; 29°C) und Larven mit überexprimiertem *khc^{N262S}* ($D42 > Khc^{N262S}$; 29°C) ist auf der rechten Seite von Abbildung 26 zu sehen. Der mittlere, axonale Durchmesser von *Khc^{N262}* exprimierenden Larven ist deutlich erhöht (w^{118} : 0,25 µm, n=320; *khc^{N262S}*: 0,36 µm, n=301; $p < 0,001$) (Abb. 26B).

Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression von *khc^{N262S}* ausreichend ist um axonale Schwellungen auszulösen

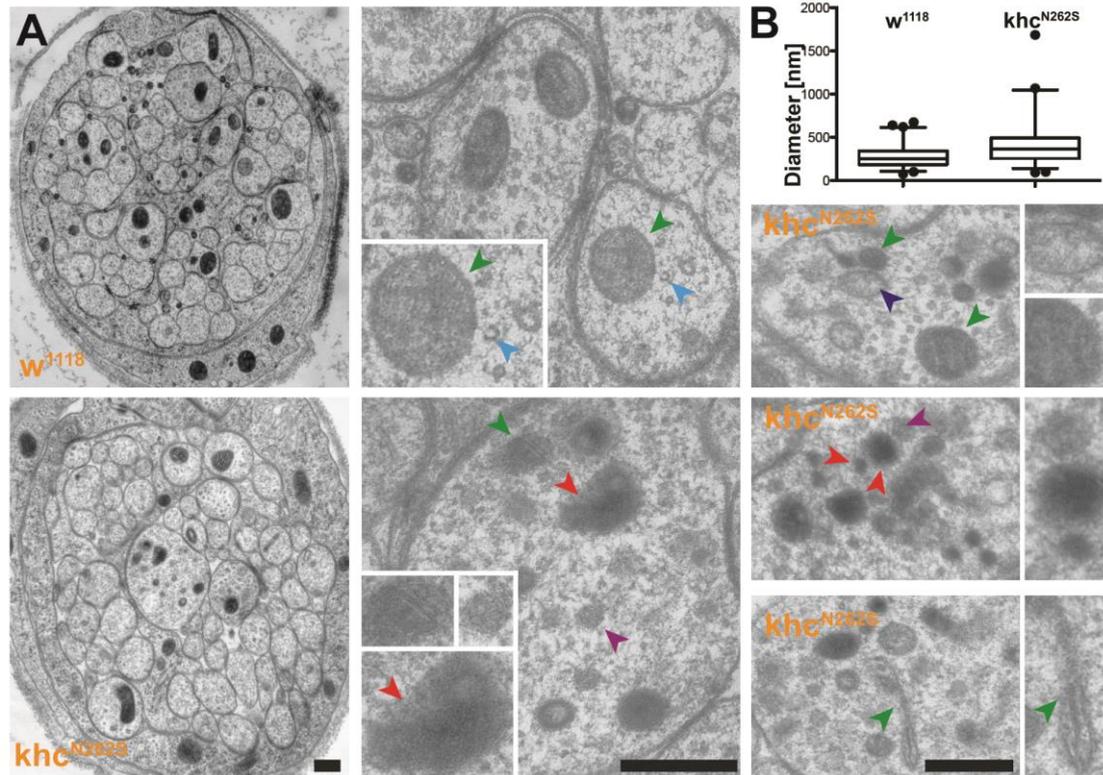


Abbildung 26 Charakterisierung von axonalen Schwellungen

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von segmentalen Nerven aus Mitte-L2 wildtyp (D42>w¹¹¹⁸) und mutanten (D42>Khc^{N262S}) Larven. Die Larven wurden für eine stärkere Expression auf 29°C gehalten. Nerven von wildtyp Larven enthalten Mitochondrien (grüner Pfeilkopf) und Mikrotubuli (hellblauer Pfeilkopf). Nerven von Larven, welche Khc^{N262S} exprimieren, sind häufig geschwollen. Diese geschwollenen Axone sind mit Mitochondrien (grüner Pfeilkopf), prälysosomalen Vakuolen (roter Pfeilkopf), Autophagosomen (dunkelblauer Pfeilkopf) und multivesikulären Körpern (violetter Pfeilkopf) gefüllt. Maßstabsbalken 100 nm. (B) Boxplot vom Axondurchmesser von Mitte-L2 wildtyp (D42>w¹¹¹⁸) und mutanten (D42>Khc^{N262S}) Larven anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Box zeigt Median, oberes und unteres Quartil. Die „Whiskers“ repräsentieren 1-99 Prozent der Durchschnittswerte. Ausreißer wurden durch Punkte gekennzeichnet.

3.3.2 Frachten in axonalen Akkumulationen

Die genaue Untersuchung des Inhaltes von axonalen Schwellungen ist eine gute Möglichkeit um mehr über die Entstehung von axonalen Schwellungen zu erfahren. Hierbei ist es von Interesse, ob nur Frachten des anterograden Transportes in Schwellungen akkumulieren. Primär anterograd transportierte Organellen sind synaptische Vesikel. Mitochondrien und große elektronendichte

Vesikel (dense core vesicle) werden bidirektional transportiert. Autophagosome und Lysosome werden primär retrograd transportiert.

Axone von Kontrolllarven enthalten Mikrotubuli (Abb. 26A, blaue Pfeilspitze), Transportfrachten wie Mitochondrien (Abb. 26A, grüne Pfeilspitze) und klare Vesikel. Die Axone von *Khc*^{N262S} enthalten zusätzlich dunkel gefärbte Organellen wie multivesikuläre Körper (Abb. 26A, violette Pfeilspitze), dunkle prälysosomale Vakuolen (PLV) (Abb. 26A, rote Pfeilspitze) und Autophagosomen (Abb. 26A, dunkelblaue Pfeilspitze).

Hierbei ist das Auftreten von Autophagosomen und Lysosomen von besonderem Interesse, da es nahe liegt, dass Störungen sowohl des anterograden als auch des retrograden Transportes auftreten.

3.3.3 Neurodegeneration der NMJ in *khc* mutanten Larven

HSP ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche durch eine distale Axonopathie charakterisiert ist. Anhand durchgeführter Experimente konnte gezeigt werden, dass distal gelegene NMJs stärker betroffen sind. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe von Immunfärbungen durchgeführt. Um ein genaueres Bild in den Synapsen zu erhalten, wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Mit diesen Schnitten ist es möglich, ohne Färbung verschiedene Organellen in der NMJ zu identifizieren und auch auftretende Neurodegenerationen an der Synapse zu untersuchen. Die Ultradünnschnitte wurden von der NMJ 4 aus dem Segment A4 angefertigt.

Bei HSP handelt es sich um eine autosomal dominante Krankheit. Um ähnliche Voraussetzungen wie im Menschen zu schaffen ist, es wichtig, dass mutantes und wildtyp Protein in vergleichbarer Abundanz vorhanden ist. Hierzu wurden Konstrukte verwendet, die spezifisch an derselben Stelle im Genom integriert wurden. Dies stellt sicher, dass beide Konstrukte im selben Verhältnis exprimiert werden. Im Folgenden wurde *khc*^{wt} und *khc*^{N262S} gleichzeitig

ektopisch exprimiert. Dies stellt sicher, dass jederzeit mehr als 50% des Wildtyp-Proteins vorhanden ist.

Die Überexpression (D42-Gal4; 29°C) von $khc^{wt+N262S}$ führt in NMJs zur Akkumulation von PLV (Abb. 27B, rote Pfeilspitze), Autophagosomen (Abb. 27B, dunkelblaue Pfeilspitze) und zu multivesikulären Körpern (Abb. 27B, violette Pfeilspitze), diese werden nicht in Kontrolllarven gefunden (Abb. 27A).

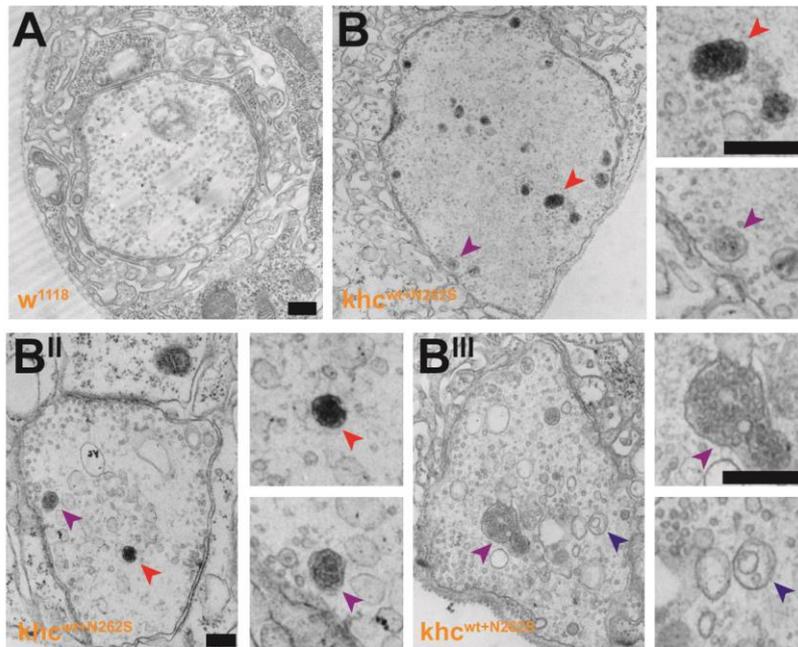


Abbildung 27 NMJ Degeneration in Khc mutanten Larven.

(A-B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von NMJ 4 aus Segment A4 von L3 *Drosophila* D42> w^{1118} und D42> $Khc^{wt+N262S}$ Larven. Die Larven wurden für eine stärkere Expression auf 29°C gehalten. Präsynaptische Boutons von D42> $Khc^{wt+N262S}$ Larven enthalten multivesikuläre Körper (violetter Pfeilkopf), prälysosomalen Vakuolen (roter Pfeilkopf) und entstehende Autophagosomen (dunkelblauer Pfeilkopf). Maßstabsbalken 100 nm.

Dies deutet darauf hin, dass Teile der NMJ sich im Abbau befinden könnten. Hierfür gibt es auch lichtmikroskopische Evidenz (Füger et al., 2012).

Diese Degeneration ist an terminalen Boutons besonders ausgeprägt. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe von Serienschritten, die von proximal nach distal ausgeführt wurden, untersucht werden, ob distal verstärkt Defekte auftreten.

In Abbildung 28 ist die Degeneration einer NMJ in Larven mit einer Überexpression (D42-Gal4; 29°C) von $khc^{wt+N262S}$ zu sehen. Die Serienbilder der NMJ zeigen das fortschreitende Auflösen eines Boutons (Abb. 28B-L). Am

Anfang ist die NMJ stark mit verschiedenen Organellen gefüllt (MVK, Mitochondrien, Autophagosomen und klare Vesikel) (Abb. 28B-C, Abb. 29), danach kommt es zur Anhäufung großer klarer Organellen, die nur in der Mutante (Abb. 28D-L, Abb. 30 und Abb. 31) und nicht in der Kontrolle (Abb. 28A) zu beobachten sind. Im weiteren Verlauf der NMJ ist vermutlich ein Autophagosom zu erkennen (Abb.28I-L und Abb. 31A-C, rote Pfeilspitzen). Die in ihm enthaltenen großen, klaren Vesikel sind phagozytierte Organellen.

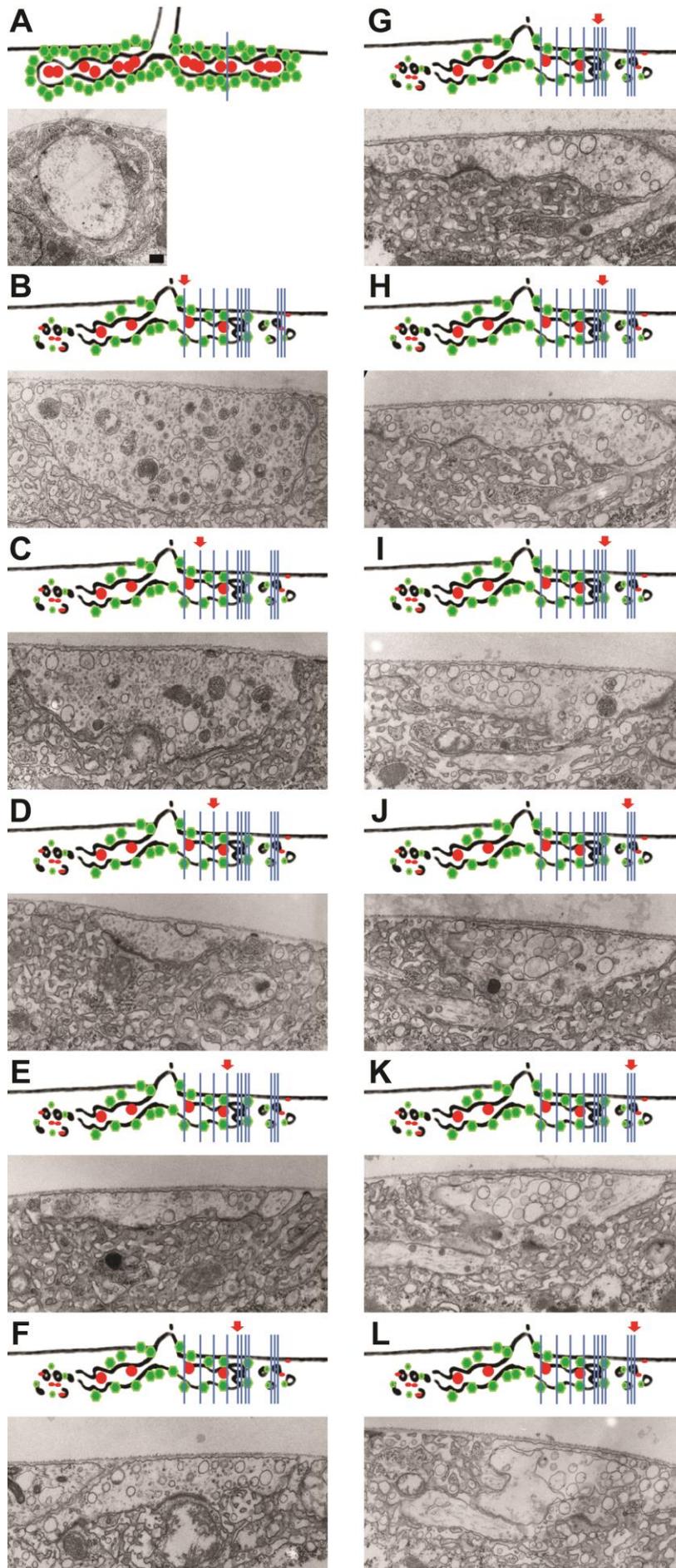


Abbildung 28 Fortschreitende Degeneration an der NMJ von *khc* Mutanten

(A - L) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von D42>w¹¹¹⁸ (A) und D42>Khc^{wt+N262S} (B - L) L3 *Drosophila* Larven. Die Larven wurden für eine stärkere Expression auf 29°C gehalten. (B - L) Serienbilder eines D42>Khc^{wt+N262S} Boutons, bei dem fortschreitende Neurodegeneration zu erkennen ist. Jeweils über den Aufnahmen befindet sich ein Schema eines Boutons. Die GluRIII Rezeptoren sind in grün dargestellt, Brp in rot. Die blauen Linien markieren die unterschiedlichen Stellen, an denen Aufnahmen gemacht wurden. Der rote Pfeil gibt an, an welcher Stelle sich die Aufnahme befindet. Maßstabsbalken 100 nm.

Um die auftretenden Organellen besser zu erkennen, wurden einzelne Schnitte der Abbildung 28 nochmals vergrößert dargestellt. Abbildung 29 zeigt eine Vergrößerung von Abbildung 28B. Deutlich zu erkennen ist das vermehrte Auftreten von MVK (Abb. 29; violette Pfeilspitzen), das Vorhandensein von Autophagosomen (Abb. 29; dunkelblaue Pfeilspitzen) und klaren Vesikeln (Abb. 29; gelbe Pfeilspitze). Bei dem mit einer grünen Pfeilspitze markierten Objekt handelt es sich vermutlich um ein dysfunktionales Mitochondrium. Ein eindeutiger Nachweis für Mitophagie ist die Anzahl der vorhandenen äußeren Membranen. Wenn es sich um zwei Membranen handelt stammt, die Äußere und Innere vom Mitochondrium. Handelt es sich um drei Membranen, stammt die Äußere von einem Autophagosom und die beiden Inneren vom Mitochondrium. Leider ist es nicht möglich, die genaue Anzahl der Membranen zu erkennen und so das genaue Stadium des zerstörten Mitochondriums zu bestimmen.

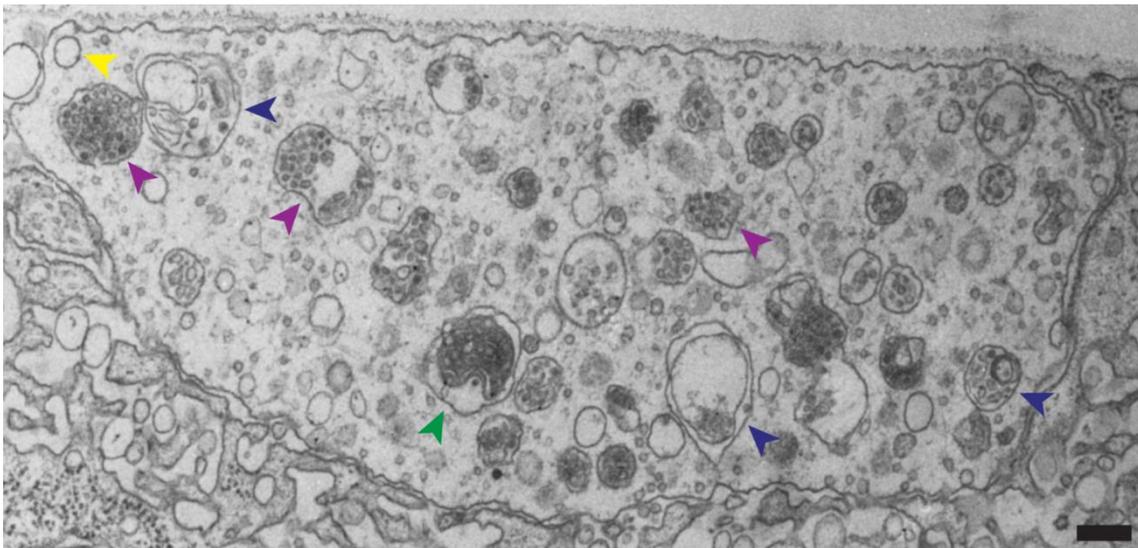
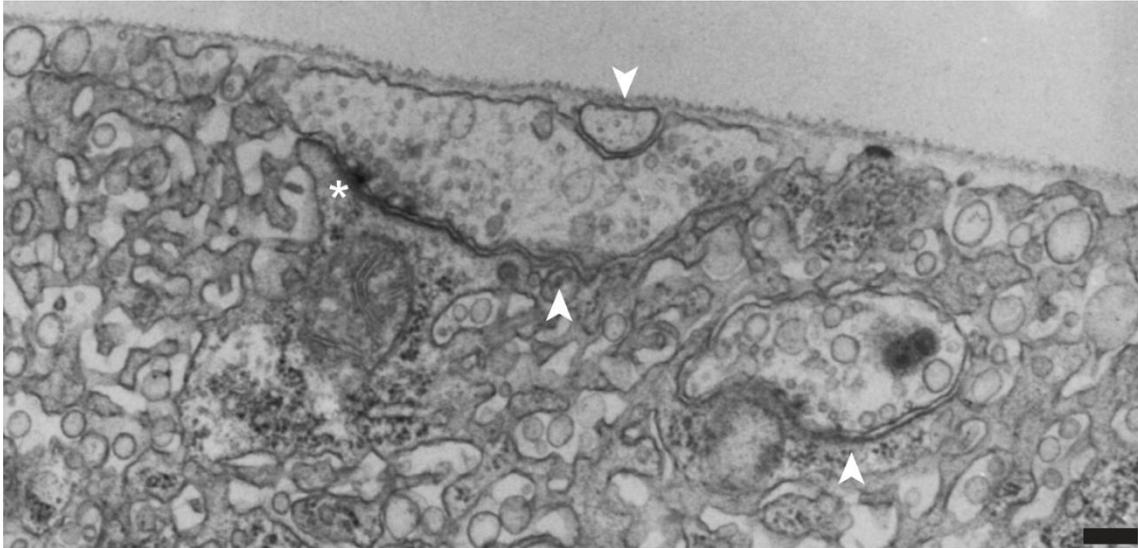


Abbildung 29 Detailübersicht von Abbildung 28B

In dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Boutons von $D42>Khc^{wt+N262S}$ mutanten Larven sind unterschiedliche Organellen zu erkennen. Dunkelblaue Pfeilspitze Autophagosom; gelbe Pfeilspitze klarer Vesikel; grüne Pfeilspitze zerstörtes Mitochondrium; violette Pfeilspitze MVK. Maßstabsbalken 100 nm.

In Abbildung 30 ist eine Vergrößerung von Abbildung 28D dargestellt. Eindeutig zu erkennen sind drei verschiedene Boutons (Abb. 30, weiße Pfeilspitzen) In einem Bouton ist zusätzlich eine Synapse zu sehen (Abb. 30; weißer Stern).

**Abbildung 30 Detailübersicht von Abbildung 28D**

In dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Boutons von $D42>Khc^{wt+N262S}$ mutanten Larven sind drei verschiedene Boutons (weiße Pfeilspitzen) und eine Synapse (Stern) zu erkennen. Maßstabsbalken 100 nm.

In Abbildung 31A-C sind die Vergrößerungen von 28J,K,L zu sehen. In den degenerierenden Boutons befindet sich ein MVK (Abb. 31A, dunkelblaue Pfeilspitze) und ein kleines Autophagosom (Abb. 31A, violette Pfeilspitze). Die roten Pfeilspitzen markieren die äußeren Grenzen eines großen Organells. Es handelt sich vermutlich um eine Autophagosom, da keine Verbindung zur äußeren Membran besteht.

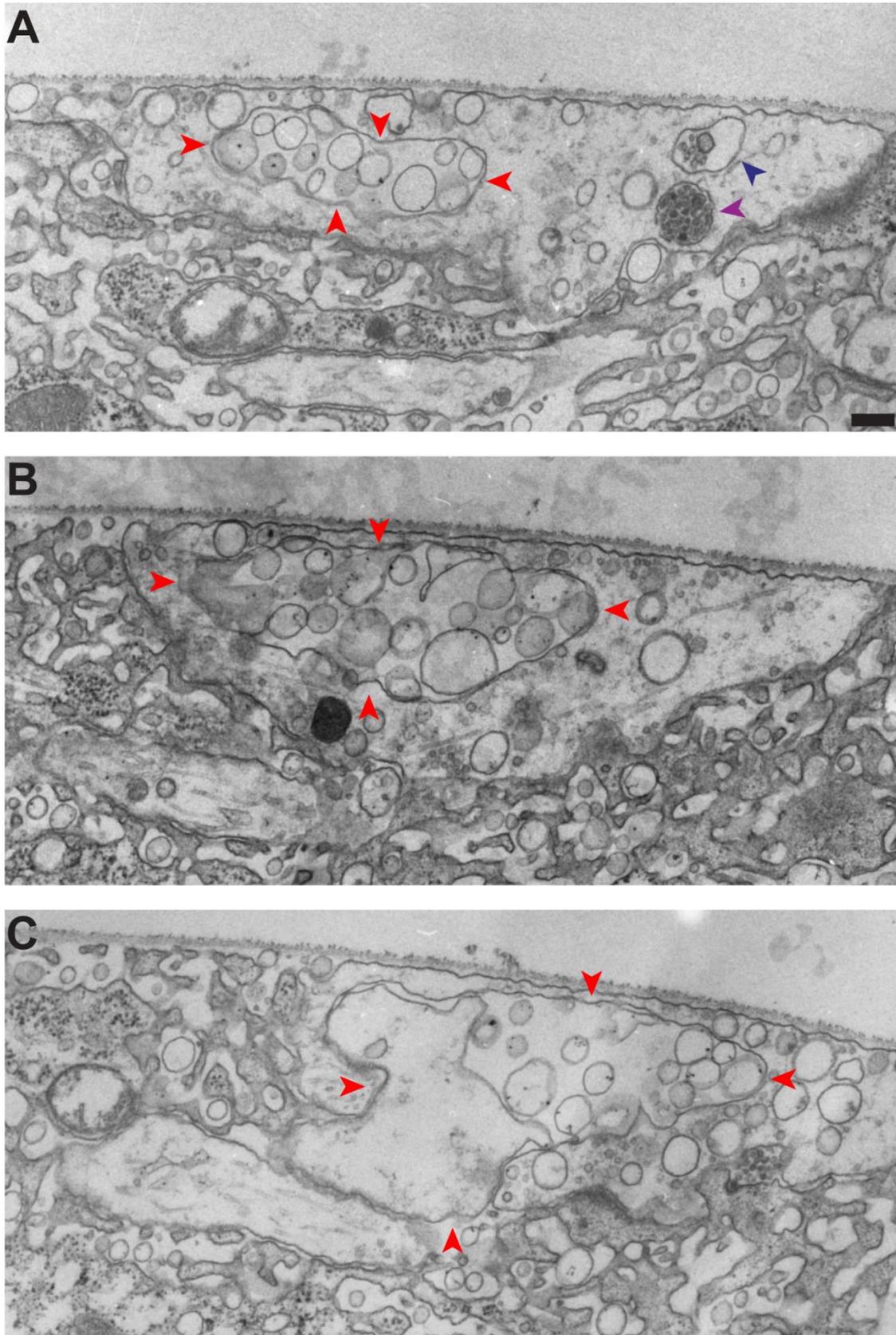


Abbildung 31 Detailübersicht von Abbildung 28J,K,L

(A) In dieser elektronenmikroskopischen Aufnahmen von $D42>Khc^{wt+N262S}$ mutanten Larven sind ein Autophagosom (dunkelblaue Pfeilspitze) und MVK (violette Pfeilspitze) zu sehen. (A-C) Die roten Pfeilspitzen weisen auf die Grenzen eines vermutlichen Autophagosoms hin. Maßstabsbalken 100 nm.

Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte bestätigt werden, dass es in den Synapsen von *khc*^{wt+N262S} mutanten Larven zu Degeneration kommt.

3.3.4 Degenerierte NMJs werden nicht vom Muskeln phagozytiert

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung an Synapsen konnte gezeigt werden, dass Neurodegeneration in *khc*^{N262S} mutanten Larven stattfindet. Dies wirft eine weitere Frage auf: Wie werden die durch Neurodegeneration gebildeten phagozytierten Organellen abtransportiert?

Es ist bekannt, dass präsynaptische Bruchstücke und Geisterboutons, undifferenzierte synaptische Boutons, von neuronaler Aktivität moduliert werden. Fuentes-Mendel und Kollegen haben berichtet, dass präsynaptische Bruchstücke und Geisterboutons aktiv von der NMJ entfernt werden. Dabei dringen Gliazellen dynamisch in die NMJ ein und phagozytieren die präsynaptischen Bruchstücke, die Geisterboutons werden umschlungen oder von Muskelzellen abgebaut (Fuentes-Medel et al., 2009).

Um zu überprüfen, ob es in der *khc* Mutante zu einem Abbau der phagozytierten Organellen mit Hilfe der Muskeln kommt, wurde eine Immunfärbung gegen CSP, ein synaptischer Vesikelmarker, durchgeführt. Mit Hilfe dieser Färbung können postsynaptische Bruchstücke, die CSP und HRP aufweisen, klar einem präsynaptischen Ursprung zugeordnet werden. Sollte der Muskel die phagozytierten Organellen entfernen, sollte es zu einer Erhöhung der CSP Färbung im Muskel kommen.

In *white*¹¹¹⁸ Larven (D42>*white*¹¹¹⁸; 25°C) konnten nur wenige Bruchstücke im HRP-Kanal detektiert werden (Abb. 32A–A^{II}). Im CSP-Kanal dagegen kam es zu einem stärkeren Auftreten von Bruchstücken (Abb. 32B–B^{II}). Die in HRP vorkommenden Bruchstücke weisen ebenfalls ein CSP Signal auf (Abb. 32A^{II}, B^{II}, weiße Pfeilspitze). Sie sind somit präsynaptischen Ursprungs. Einige CSP positive Bruchstücke dagegen zeigen keine HRP Färbung (Abb. 32A^{II}, B^{II},

grüne Pfeilspitze). In der *khc* Mutante (D42>*khc*^{N262S}; 25°C) kommt es zu weniger Bruchstücken im CSP-Kanal als in *white*¹¹¹⁸ Larven. Zudem kommt es zu drei unterschiedlichen Arten von Bruchstücken. Es treten ebenfalls HRP und CSP positive Bruchstücke auf (Abb. 32C^{II},D^{II}, weiße Pfeilspitze) und auch CSP positive und HRP negative Bruchstücke (Abb. 32C^{II},D^{II}, grüne Pfeilspitze). In der *khc* Mutante sind zusätzlich Bruchstücke die HRP enthalten, aber kein CSP aufweisen (Abb. 32C^{II},D^{II}, gelbe Pfeilspitze).

Durch diese Färbung konnte gezeigt werden, dass es sowohl in Kontrollen als auch in der *khc* Mutante nur zu einem geringen Anteil an postsynaptischen Bruchstücken mit präsynaptischen Ursprung kommt. Zudem findet keine Verstärkung der CSP oder HRP Färbung im Muskel statt. Es findet daher keine Erhöhung der Vesikelanzahl im Muskel statt. Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass die durch Neurodegeneration entstandenen Organellen in der *khc* Mutante durch den Muskel abgebaut werden. Der Abtransport der phagozytierten Organellen erfolgt vermutlich über das Axon.

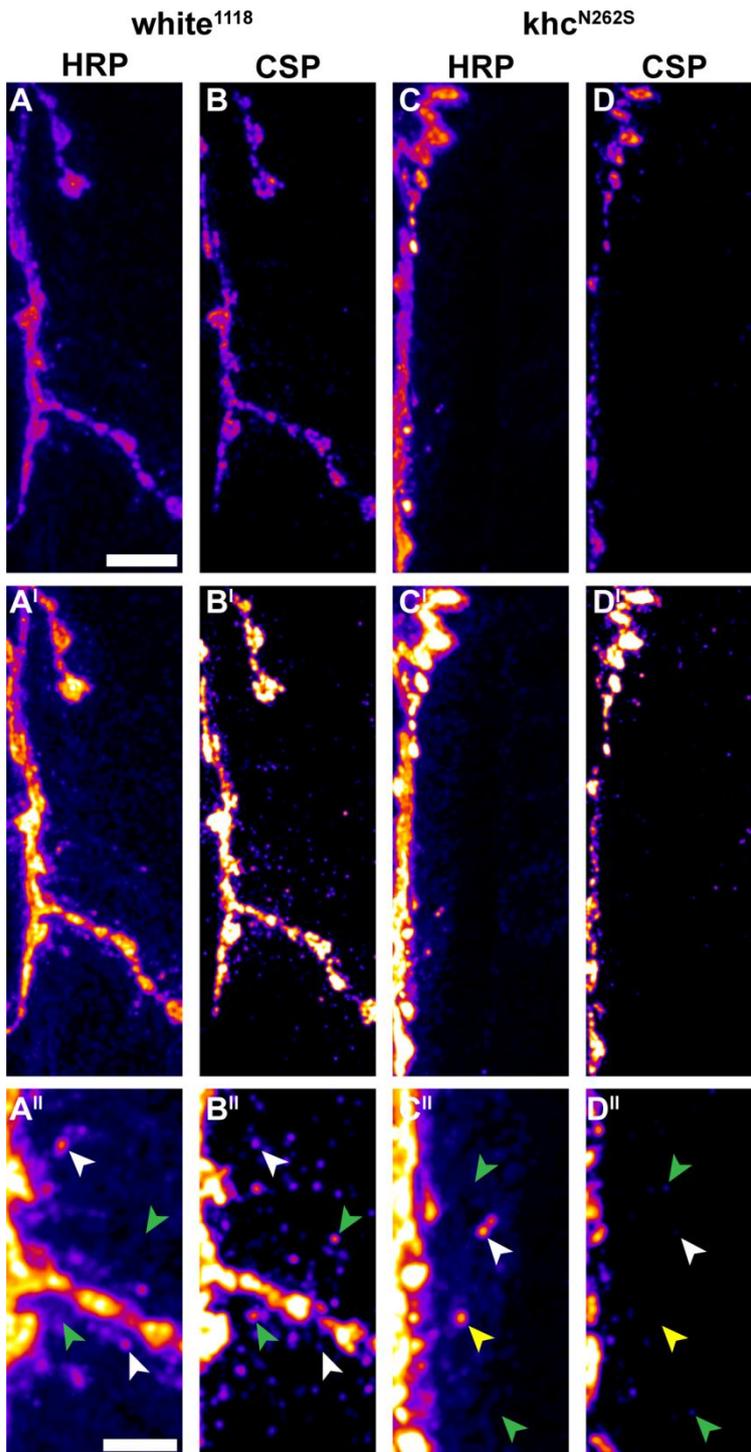


Abbildung 32 Keine erhöhte Phagozytose an der NMJ durch den Muskel

(A-D) Konfokale Aufnahmen von Fluoreszenzfärbungen von D42>white¹¹¹⁸ (links) und D42>khc^{N262S} (rechts) L3-*Drosophila* Larven. Die Aufnahmen zeigen Teile der NMJ 6/7 mit angrenzenden Muskelbereichen. Die neuronale Membran wurde mit HRP sichtbar gemacht, zusätzlich wurden synaptische Vesikel mit CSP angefärbt. Alle Abbildungen sind intensitätsabhängig dargestellt. In A^I-D^I wurde der Kontrast für eine bessere Beurteilung von vorhandenen Bruchstücken erhöht. A^{II}-D^{II} zeigen jeweils einen vergrößerten Ausschnitt von A^I-D^I. Die Pfeilspitzen in A^{II}-D^{II} weisen auf Bruchstücke an der NMJ. Die mit einer weißen Pfeilspitze markierten Bruchstücke enthalten sowohl HRP als auch CSP, die grünen Pfeilspitzen zeigen auf Bruchstücke, die CSP aber keine HRP enthalten. Bruchstücke mit einer

gelben Pfeilspitze weisen HRP aber kein CSP auf. Maßstabsbalken A: 10µm A^{II}: 5µm. Bilder von V. Sreekumar, Auswertung J.V. Kern

3.3.5 Analyse von synaptischer Ultrastruktur

In elektrophysiologischen Untersuchungen konnten Defekte in *khc*^{N262S} mutanten Larven beobachtet werden. Sogar unter basaler Stimulation ist die Mutante (D42> *khc*^{N262S}) im Vergleich zur Kontrolle (D42>*khc*^{wt}) beeinträchtigt (Füger et al., 2012). Unter Hochfrequenz-Stimulation ist die Mutante (D42> *khc*^{wt+N262S}) im Vergleich zur Kontrolle (D42>*khc*^{wt}) (Füger et al., 2012) beeinträchtigt. Aus diesem Grund sollte die Vesikelverteilung in den *khc* Mutanten untersucht werden. In Abbildung 33 ist eine Übersicht einer Synapse gezeigt. Die mit Neurotransmittern gefüllten Vesikel umgeben die aktive Zone mit der T-Bar. Durch die Verschmelzung eines Vesikels mit der präsynaptischen Membran kommt es zur Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt und zu deren Anlagerung an den Rezeptoren der PSD.

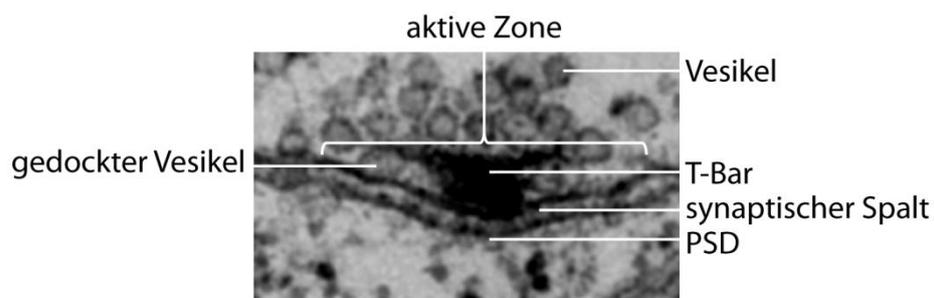


Abbildung 33 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Synapse
Übersicht der vorhandenen Komponenten an der Synapse.

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Abstände der synaptischen Vesikel zur Membran ausgewertet. In Abbildung 34A ist jeweils ein Beispiel jedes Genotyps zu sehen. Es wurde davon ausgegangen, dass es sich um gedockte Vesikel handelt, wenn die Vesikel sich nicht weiter als 25 nm von der Membran entfernt befanden. Bei den gedockten Vesikeln handelt es sich um mit Neurotransmittern gefüllte Vesikel, die durch ein ankommendes Aktionspotential in der Nervenendigung zur Fusion mit der präsynaptischen

Membran gebracht werden. Durch das Aktionspotential werden spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet, dadurch steigt die Kalziumionenkonzentration, was wiederum zum Verschmelzen der gedockten Vesikel mit der Membran und zur Freisetzung des Transmitters führt. Im Vergleich zur Kontrolle (D42>*khc*^{N262S}) kommt es zu einer prozentualen Zunahme an gedockten Vesikeln in der *khc*^{N262S} Mutante und bei der gleichzeitig *khc*^{wt} und *khc*^{N262S} exprimierenden Larven (D42>*white*¹¹¹⁸: 3,2%; D42> *khc*^{N262S}: 8,2%; D42> *khc*^{wt+N262S}: 3,9%) (Abb. 34B,C).

Durch diese Analyse konnte bestätigt werden, dass es bei der *khc*^{N262S} Mutante zu synaptischen Problemen kommt. Der höhere Anteil von gedockten Vesikeln in der *khc*^{N262S} Mutante könnte ein Hinweis sein, dass wenn es zum Ca²⁺-Einstrom kommen sollte, genügend Vesikel vorhanden sind um mit der Membran zu verschmelzen. Die Mutante könnte so versuchen, ihre Defizite auszugleichen. Bei der *khc*^{wt+N262S} Mutante kommt es wie bei den elektrophysiologischen Untersuchungen kaum zu Beeinträchtigungen.

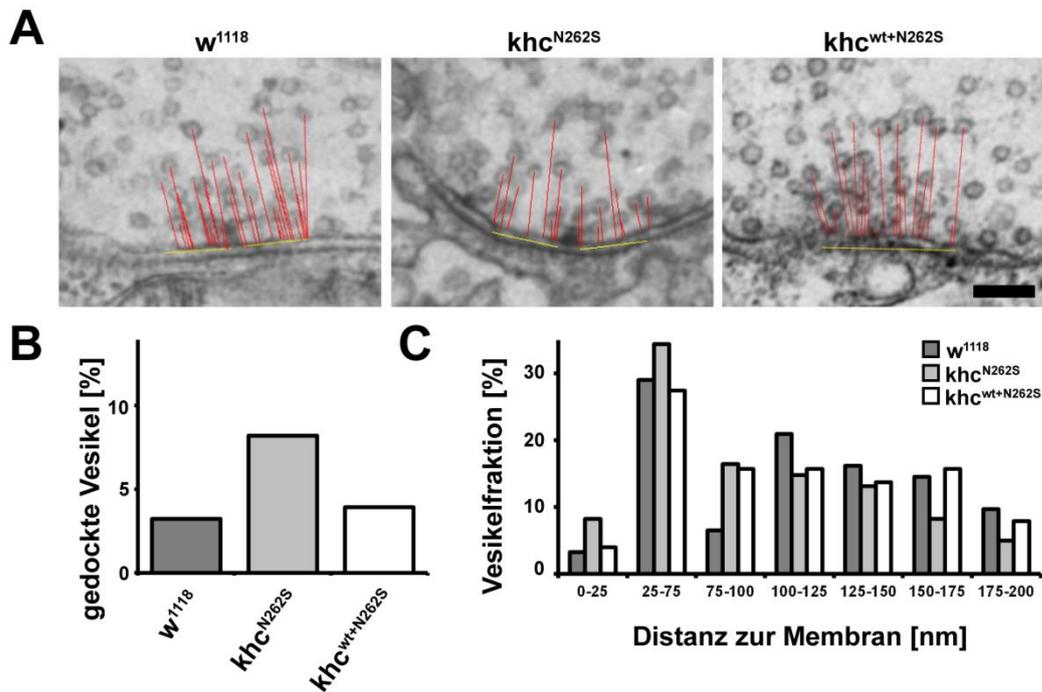


Abbildung 34 Verteilung von synaptischen Vesikeln

(A) Beispielbilder der Auswertungen von synaptischen Vesikeln. In gelb ist entweder ein 300 nm langer Bereich in der Mitte der PSD eingezeichnet oder jeweils 150 nm links und rechts der T-Bar. Nur in diesem Bereich wurden die Vesikel ausgewertet. In rot sind die Abstände der Vesikel zur Membran markiert. Maßstabsbalken 150 nm. (B) Prozentualer Anteil an gedockten Vesikeln in den angegebenen Genotypen. Als gedockter Vesikel wurde ein Vesikel definiert, des sich nicht weiter als 25 nm von der Membran befand. (C) Prozentuale Verteilung der

Vesikel in unterschiedlichen Distanzen zur Membran. w^{1118} : D42>white¹¹¹⁸; khc^{N262S}:
D42>khc^{N262S}; khc^{wt+N262S}: D42>khc^{wt+N262S}.

4 Diskussion

4.1 Eine neue Mutation in der FHA-Domäne von Unc-104 offenbart neue Aufgaben in der neuronalen Entwicklung

Einer der größten Vorteile der *Drosophila*-Genetik ist die Fähigkeit, tausende neue Mutationen in einem multizellulären Modellorganismus durch Screens zu untersuchen. Diese erzeugt oft neue, unvorhergesehene molekulare Läsionen. Die Generierung von *unc-104^{bris}*, einem neuen Allel von *unc-104* zeigt die Bedeutung der Regulation der Kinesinaktivität in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Durch die Mutation in der FHA-Domäne kommt es zu Problemen bei der Initiierung des Transports. Zukünftige direkte *in vivo* Untersuchungen der Motorbewegung werden notwendig sein um dieses These vollständig zu validieren. Die erhaltenen Daten unterstützen die vorgeschlagene These des Initiierungsproblems. Zum einen führt die Mutation nicht zur Degradierung von Unc-104, da das Protein in Immunfärbungen von homozygoten *unc-104^{bris}* Larven deutlich detektiert werden kann (Abb. 11). Daher ist eine beeinträchtigte Stabilität des Proteins als Grund für den beobachteten Phänotyp unwahrscheinlich. Desweiteren wurde kein anterior-posteriorer Gradient in der NMJ Funktion durch die Verhaltensexperimente entdeckt, welche typischerweise bei limitierenden Proteinkomponenten beobachtet werden (Abb. 17). In Fällen, bei denen der axonale Transport limitierend ist, sollten NMJs, welche durch ein längeres Axon innerviert werden, stärker betroffen sein als solche mit kürzeren Axonen (Abb. 35). Die Verhaltensexperimente decken jedoch kein solchen Unterschied auf, was nahe legt, dass möglicherweise nur die Initiierung des Transports gestört ist. Die erhöhte Menge an Frachten in der Zellkörperregion der Ventralganglien und die reduzierte Menge dieser Frachten an den peripheren Synapsen, sowohl im Ventralganglion als auch an der NMJ, unterstützen das Modell durch Anzeigen einer Störung beim Initiieren des Transports. Zur gleichen Zeit ist die Anwesenheit von Brp an der NMJ zu beobachten. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass wenn *Unc-104^{bris}*-Motor-Fracht-Komplexe das Soma verlassen, die Frachten zuverlässig transportiert werden (Abb. 35). Die Beobachtung, dass Frachten im Zellkörper angereichert werden (Abb. 14A-D),

während Unc-104 nicht im Zellkörper angereichert ist (Abb. 11A-B) kann durch ein Modell erklärt werden, in dem Unc-104 die Zellkörper verlassen könnte ohne die Fracht am Motor-Fracht-Komplexen beladen zu haben.

Alternativ kann Unc-104 auch vorrangig für den Transport von Frachten aus dem Soma ins Axon verantwortlich sein, wo andere Motoren, wie etwa Kinesin-1, ausreichen um den Transport über lange Strecken zu vermitteln (Goldstein et al., 2008).

4.1.1 Dendritenreifung

Die vorhandenen sensorischen Neurone in *unc-104^{bris}*, welche normale Filopodien aufweisen, zeigen eine erhöhte Dichte der Filopodien ohne dabei Defekte in der Dendritenverzweigung aufzuweisen (hier und (Medina et al., 2006)). Es konnte gezeigt werden, dass die dendritischen Defekte, durch die Expression von *unc-104^{mCherry}* in sensorischen Neuronen selektiv gerettet werden konnten. Das hebt hervor, dass die in *brislly* auftretenden dendritischen Änderungen zellautonom sind. Interessanterweise waren Änderungen in der Struktur von dendritischen Dornen unter den ersten neuroanatomischen Veränderungen, welche mit mentaler Retardation in Verbindung gebracht wurden (Marin-Padilla, 1972). Heute wird angenommen, dass Defekte in der Entwicklung und/oder der Aufrechterhaltung der Dendriten zu einer großen Anzahl sowohl neurologischer als auch entwicklungsgestörter neurologischer Krankheiten wie Angelman-Syndrom, Autismus, Down Syndrom, fragiles X-Syndrom, Rett-Syndrom und Schizophrenie führt (Jan and Jan, 2010). Es konnten mehr als 100 Gene identifiziert werden, welche die Verzweigungen der Dendriten koordinieren. Unter diesen Genen befinden sich zwei molekulare Motoren: KIF5 (Hoogenraad et al., 2005) und Dynein. Die erhaltenen Resultate legen nahe, dass Unc-104 basierter Transport auch für die Aufrechterhaltung der korrekten Dendritenmorphologie wichtig ist. Unsere Resultate legen nahe, dass auch Kinesin-3 basierter Transport eine Bedeutung im Kontext von neurodegenerativen Erkrankungen hat.

4.1.2 Synapsenreifung

Brp clustert Kalziumkanäle an der aktiven Zone und ist Teil der T-Bars. T-Bars sind elektronendichte, präsynaptische Strukturen von denen gezeigt wurde, dass sie die synaptische Vesikelfreisetzung unterstützen (Kittel et al., 2006). Synapsen, welche negativ für Brp sind, sind nicht vollständig inaktiv, haben aber eine dramatisch reduzierte Vesikelfreisetzungswahrscheinlichkeit (Kittel et al., 2006, Wagh et al., 2006). Daher scheint Brp während der Reifung der Synapse eine wichtige Rolle zu spielen (Rasse et al., 2005, Schmid et al., 2008). Auffällig ist, dass in Wildtyp-Larven vorrangig sehr junge (<3h), unfertige Synapsen Brp negativ sind (Rasse et al., 2005). Die Abwesenheit von Brp erlaubt eine hohe Freisetzungswahrscheinlichkeit der Transmitter dieser speziellen Synapsen und kann als Marker für unreife Synapsen verwendet werden (Kittel et al., 2006). Der hohe Prozentsatz an solchen Synapsen in *bris* Mutanten legt nahe, dass die Synapsenreifung entweder durch begrenzten Brp-Transport, -Auslieferung oder -Stabilität gestört ist. Jedoch sind nicht alle Synapsen vom Fehlen von Brp auf dieselbe Weise betroffen. Dies deutet auf eine neue Rolle von *bris* bei der Koordination von Brp-Mengen an benachbarten aktiven Zonen hin. Die Kontrolle der aktiven Zonen spezifischen Auslieferung von synaptischer Fracht ist wichtig um diese zu stärken (Vitureira et al., 2011, Clarke et al., 2012). Intakter Unc-104 basierter Transport könnte, wie der Kinesin-1 basierte Transport (Puthanveetil et al., 2008), von Bedeutung für die Proteinsynthese-abhängige Langzeitpotenzierung sein, ein wichtiger relevanter Prozess im Zusammenhang von Lernen und Gedächtnis.

4.1.2 Strukturelle Defekte an der NMJ

In *unc-104^{bris}* mutanten Larven wurden Defekte in der Boutonreifung und dem NMJ Wachstum beobachtet. Die Vergrößerung der NMJ war überraschend, da berichtet wurde, dass sowohl Störungen in Kinesin-1 als auch in Kinesin-3 basierendem anterogradem Transport zu reduzierter NMJ Größe und synaptischer

Boutonanzahl führen (Hurd and Saxton, 1996, Pack-Chung et al., 2007, Barkus et al., 2008). Eine mögliche Erklärung ist die Natur des *bristly* Allels. Verschiedene hypomorphe Allele von Fasciclin II führen zum Beispiel zu einer Reduzierung (*fas^{e76}*) (Mathew et al., 2003) oder zu einer Erhöhung (*fas^{e86}*) (Schuster et al., 1996) in der Anzahl an synaptischen Boutons. Überexpression von *unc-104^{mCherry}* rettet die beobachteten Defekte im NMJ Wachstum und in der Boutonreifung in *unc-104^{brist}* mutanten Larven. Desweiteren wurden keine Defekte in heterozygoten mutanten Larven beobachtet. Diese zwei Experimente heben hervor, dass die *brist* Mutation hypomorph ist und nicht in einen dominant-negativen Effekt oder einen Gain-of-Function Mechanismus involviert ist.

Interessanterweise scheinen die Defekte in der Vergrößerung und Reifung der Boutons und in der Vergrößerung der NMJ unabhängig von der Unc-104 Transportfunktion der aktiven Zonenkomponente Brp zu sein (Rasse et al., 2005, Kittel et al., 2006, Wagh et al., 2006).

4.2 Postsynaptische Veränderungen von Fas II, DLG und SSR

Bei den Untersuchungen der Ultrastruktur von betroffenen Synapsen konnten weder Abweichungen an der aktiven Zone (wie schwebende T-Bars, ungünstig anliegende prä- und postsynaptische Membran (Kittel et al., 2006)), noch die typischen Anzeichen von Synapsendegeneration/Synapsenretraktion, wie große präsynaptische Vesikel (Eaton et al., 2002), Ablösen der präsynaptischen Membran (Eaton et al., 2002) oder MVK (Ashley et al., 2005) beobachtet werden. Die einzelnen Synapsen hatten, wie durch die Immunfärbungen erwartet, kleinere Boutons und wiesen zusätzlich einen SSR Faltungsdefekt auf. Beide Defekte weisen auf eine gestörte Entwicklung, aber nicht auf Neurodegeneration oder Synapsenretraktion hin. Hierbei mag der SSR-Faltungsdefekt theoretisch durch einen Abfall der synaptischen Aktivität bedingt sein. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da keine vergleichbaren Defekte nach Expression von Tetanus-Toxin, welche Neurotransmission blockiert bzw.

behindert beschrieben wurden. Auch bei Brp mutanten Larven kommt es zu keiner Veränderung des SSR, obwohl die Transmission reduziert wurde (Kittel et al., 2006, Wagh et al., 2006). Ferner wurde das Auswachen von Boutons nicht durch die Expression von Tetanus-Toxin beeinträchtigt (Zhang, 2012), weshalb auch Defekte im Auswuchs synaptischer Boutons höchstwahrscheinlich nicht sekundär zu einem Verlust von Neurotransmitter ist.

Aufgrund der Homologie zu präsynaptischen DLG Mutanten liegt hingegen der Schluss nahe, dass die Defekte in der Faltung des SSR auf ein Ungleichgewicht im Niveau der perisynaptischen Zelladhäsionsproteine zurückzuführen sind.

Die NMJ von *Drosophila* Larven sind dynamische Strukturen, welche sich ständig verändern. Sowohl die Anzahl an aktiven Zonen an der präsynaptischen Seite, als auch die Größe und Komplexität des SSR wächst mit Zunahme des Muskels in der Larvenentwicklung (Gorczyca et al., 1993, Jia et al., 1993, Guan et al., 1996). Die Interaktion zwischen der prä- und postsynaptischen Membran wird durch Adhäsionsmoleküle, der Freisetzung antero- und retrograder Signale, synaptische Aktivität und durch Kombinationen dieser Prozesse beeinflusst (Budnik et al., 1996).

Im SSR sind mehrere Gerüstproteine, das Aktin-Bindeprotein Spectrin, das Zelladhäsionsmolekül Fas II, Shaker-K⁺-Kanäle und Glutamatrezeptoren lokalisiert (Budnik, 2006).

DLG zählt zu den Gerüstproteinen die im SSR von *Drosophila* zu finden ist. DLG ist eine Membran-assoziierte Guanylyl-Kinase (MAGUK) und das Homolog von PSD-95/SAP-90. Die PSD-95/SAP90 Familie der MAGUKs binden direkt an einige Ionenkanäle (Thomas et al., 1997). Diese Interaktion scheint die Ansammlung und die Lokalisation der interagierenden Ionenkanäle und Rezeptoren an der spezifischen Synapsenseite zu vermitteln (Kim et al., 1995, Kornau et al., 1995, Kim et al., 1996, Muller et al., 1996, Niethammer et al., 1996, Tejedor et al., 1997). Sowohl die prä- als auch die postsynaptische Expression von DLG beeinflusst das Wachstum des SSR (Budnik et al., 1996). Mit Hilfe seiner PDZ-Domäne kann DLG in den Membraneinfaltungen des SSR Shaker-K⁺-Kanäle und Fas II binden (Tejedor et al., 1997, Thomas et al., 1997,

Zito et al., 1997). Desweiteren ist bekannt, dass DLG die Glutamatuntereinheit GluRIIB an der Synapse stabilisiert (Chen and Featherstone, 2005).

Von KIF1A ist bekannt, dass es sich um Neuronen-spezifische Kinesine handelt (Hall and Hedgecock, 1991, Okada et al., 1995). Durch die Überexpression von *unc-104^{mCherry}* auf der postsynaptischen Seite in *unc-104^{bris}* mutanten Larven, konnte gezeigt werden, dass es zu keinen Änderungen im SSR Phänotyp kommt. Trotz der postsynaptischen Expression kommt es zu den gleichen Defekten im SSR, wie bei der *unc-104^{bris}* Mutante. Daraus lässt sich schließen, dass der vorhandene SSR Phänotyp durch einen präsynaptischen Defekt von Kinesin-3 hervorgerufen wird. Ein weiteres Anzeichen dafür ist der Rescue der SSR Defekte durch die präsynaptische Expression von *unc-104^{mCherry}* (Abb. 22C).

Die Defekte in der SSR Faltung werden vermutlich durch präsynaptische Defekte verursacht. Bei Untersuchungen an der NMJ wurde festgestellt, dass es bei einem präsynaptischen Verlust von DLG es zu einem ähnlichen Phänotyp des SSR kommt, wie in der *unc-104^{bris}/-* Mutante (Abb. 22B) (Budnik et al., 1996). Die Membraneinfaltungen sind ebenfalls weniger kompakt um den Bouton gelagert. Zusätzlich kommt es in der *bristly* Mutante zu einer Abnahme des DLG Levels an den Boutons der NMJ (Abb. 21C). Durch den verminderten Transport von DLG an die Synapse kommt es vermutlich auch zu einer fehlerhaften Lokalisation von Fas II (Abb. 23B) in der präsynaptischen Membran. Dadurch kommt es vermutlich zu einer fehlerhaften Entwicklung des SSR.

4.3 Khc

4.3.1 Axonale Schwellungen und Neurodegeneration an der NMJ

Neurofilamente akkumulieren in Schwellungen von SPG4 Patienten und in Mausmodellen von SPG4 (Kasher et al., 2009). Im hier gezeigten HSP Modell akkumulieren in den Schwellungen sowohl Frachten von Kinesin-1 als auch von

Kinesin-3 (Pack-Chung et al., 2007) und zusätzlich lysosomale Organellen und Autophagosomen. Dies legt nahe, dass axonale Schwellungen eine generelle Barriere für Frachten des schnellen axonalen Transports darstellt und sich diese unabhängig vom relevanten Motorprotein in axonalen Schwellungen ansammeln können. Schwellungen in SPG4 Patienten und im SPG4 Mausmodell, die positiv für Neurofilamente waren, enthalten verschieden Frachten, wie Mitochondrien, das Amyloid-Vorläufer-Protein, Tubulin und Tau (Kasher et al., 2009). Weitere Untersuchungen mit Hilfe von *in vivo* Modellorganismen wie Maus- und *Drosophila* sollten Aufschluss über die Entstehung der Schwellungen geben. Dabei ist es wichtig herauszufinden, welche Frachten als erstes in den Schwellungen akkumulieren. Diese Fracht, die die Ursache für die Schwellung ist, sollte vor den anderen Frachten akkumulieren.

In der Pathologie von SPG10 ist ein gestörter Neurofilamenttransport beteiligt (Wang and Brown, 2010). Das menschliche Genom enthält drei Gene, die die schweren Ketten des konventionellen Kinesin codieren. Die neuronal exprimierten Gene *kif5a* und *kif5c*, sowie das ubiquitär exprimierte Gen *kif5b*. Neurofilamente werden von KIF5A und KIF5C transportiert (Uchida et al., 2009, Wang and Brown, 2010). Durch gestörte KIF5A Funktion ausgelöste Störungen im Neurofilamenttransport könnten erklären, warum nur Mutationen in KIF5A, nicht aber in KIF5B als genetische Ursache von HSP identifiziert worden sind. Alternativ könnte der Verlust von ubiquitär exprimiertem KIF5B zu einer frühen Letalität führen. HSP relevante Mutationen in *kif5c*, dem anderen wichtigem *khc* Transport-Gen von Neurofilamenten, wurden nicht identifiziert. Diese Daten legen ein Modell nahe, in dem KIF5A den Verlust von KIF5C ersetzen kann, aber nicht umgekehrt. Das *Drosophila*-Genom enthält allerdings kein Gen für Neurofilamente und im Gegensatz zum Mensch nur ein einziges *khc*-Gen (Rubin et al., 2000). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass Arthropoden keine Neurofilamente besitzen (Lasek et al., 1983) und dennoch ektopische Expression von mutierten *khc* zur Bildung von axonalen Schwellungen und HSP-ähnlichen pathologische Veränderungen in *Drosophila* führt. Zusätzlich treten in den Schwellungen keine Veränderungen des Zytoskeletts auf. Die erhaltenen Daten unterstützen daher ein Modell, in welchem SPG10 in erster Linie durch Störungen im Transport von Kinesin-1 Frachten verursacht wird als durch Störungen im Neurofilamenttransport.

Ferner legt die Tatsache nahe, dass die Expression von *khc*^{N262S} ausreichend ist um eine HSP Pathologie in der Fruchtfliege recht detailgetreu nachzubilden. Deshalb sollte die Vermutung, dass der Transport von Neurofilamenten für die Entstehung von HSP wichtig ist, erneut geprüft werden.

4.3.2 Möglicher Abbau der Neurodegeneration

Es konnte gezeigt werden, dass dystrophe Boutons in *khc* Mutanten Larven nicht durch die Muskeln abgebaut werden. Für den Abtransport der degenerierten Synapse müssen daher andere Abbauewege zur Verfügung stehen.

Mögliche Mechanismen wären z.B., dass sich Boutons selbst verdauen und Bruchstücke zum Zellkörper abtransportiert werden (1), die vorhandenen Gliazellen die degenerierte Synapse abbauen (2) oder die vorhandene Gliazelle redifferenziert sich zum Makrophagen und beseitigt die degenerierte Synapse (Kurant, 2011).

Bei Synapsenumformungen, werden einzelne synaptische Kontakte hinzugefügt oder entfernt um den synaptischen Beitrag der Zielzelle zu stärken oder zu schwächen. Zum Beispiel haben *Drosophila* Motoneurone synaptische Kontakte mit spezifischen embryonalen Muskelzellen bis zum Ende der Embryogenese geschaffen (Johansen et al., 1989). In den nachfolgenden Larvenstadien wachsen einzelne synaptische Kontakte mit der Muskelzelle um ein 100-faches. Andere wiederum werden abgebaut (Gorczyca et al., 1993, Schuster et al., 1996). Ähnliche Teilbereiche des Mechanismus kommen in Säugetieren beim Einstellen des Gleichgewichts von neuralem Input und Größe der Zielzelle vor. In adulten Säugern führt der Anteil an Testosteron im *Musculus bulbocavernosus* zur Zu- oder Abnahme der Muskelgröße, mit einer entsprechenden Ausdehnung oder Schrumpfung des postsynaptischen NMJ Bereichs (Balice-Gordon et al., 1990).

Es konnte gezeigt werden, dass in *Drosophila* Gliaprozesse am Synapsenwachstum beteiligt sind. Subperineurale Gliazellen bilden eine Blut-Nerven-Schranke um das Axon, proximal zum ersten Bouton der NMJ. Die Prozesse der perineuralen Gliazellen dehnen sich über die Blut-Nerven-Barriere in die NMJ aus. Dabei bedecken sie aber nicht die komplette NMJ. Ein Wachstum der Gliazellen führt zu einem Wachstum der NMJ und zu einer Zunahme der synaptischen Aktivität (Brink et al., 2012).

Es ist bekannt, dass beim Rückzug beziehungsweise einer Degeneration von Axonen in Säugetieren und bei *Drosophila* ganze Axonäste destabilisiert, degeneriert und vom zentralen Nervensystem durch Umhüllen entfernt werden (Luo and O'Leary, 2005). Ähnliches wurde bei NMJs von Säugetieren beobachtet, die NMJ wurde destabilisiert, löste sich von der Endplatte und die Bestandteile wurden vom Axon entfernt (Bishop et al., 2004).

Während des normalen synaptischen Wachstums kommt es zur Anhäufung von präsynaptischen Membranen in Form kleiner Bruchstücke und zu undifferenzierten Boutons (Geisterboutons). Diese präsynaptischen Bruchstücke und Geisterboutons werden aktiv von der NMJ entfernt. Dazu dringen die Glia dynamisch in die NMJ vor und phagozytiert die vorhandenen präsynaptischen Bruchstücke. Die Geisterboutons werden von Muskelzellen umschlossen oder degradiert (Fuentes-Medel et al., 2009).

Keller und Kollegen konnten zeigen, dass ein aktiver prodegenerativer Signalweg innerhalb des Motoneurons durch die periphere Gliazellen in *Drosophila* existiert. Sie gehen davon aus, dass neuronaler Stress, wie eine Unterbrechung der Spectrin/Ankyrin Skeletts, durch umgebende periphere Gliazellen erkannt wird. Die periphere Gliazelle reagiert darauf mit der Freisetzung von *Drosophila* TNF- α (Eiger). Eiger wird durch Wengen, einen TNF- α Rezeptor, in Motoneuronen erkannt. Dadurch wird die Caspase-Kaskade aktiviert und es kommt zum Abbau des Axon und/oder der Synapse (Keller et al., 2011).

Mutationen in *ank2* führen zu Neurodegeneration an NMJs. Es kommt zu einem kompletten Verlust der präsynaptischen Nervenenden an vielen NMJs. Durch den Knockdown von *eiger* in *ank2* Mutanten konnte ein Rückgang der

Neurodegeneration beobachtet werden (Keller et al., 2011). Auch die Expression von *wengen* RNAi in *ank2* Mutanten führte zu einer Reduzierung der Neurodegeneration (Keller et al., 2011).

Der Abbau der degenerierten Synapsen in *khc* Mutanten wird vermutlich über Gliaprozesse gesteuert. Einen Abbau der vorhandenen Bruchstücke durch Muskelzellen konnte nicht betätigt werden. Es liegt jedoch nahe, dass durch die axonalen Schwellungen und die Neurodegeneration ein ähnlicher neuronaler Stress wie in Ankyrin-Mutanten ausgelöst wird. Dies könnte ebenfalls zur Freisetzung von Eiger führen und dies wiederum zum Aktiveren der Caspase-Kaskade. In dieser Hinsicht bedarf es weiterer Untersuchungen. Ein Knockdown von *eiger* oder die Expression von *wengen* RNAi sollte klären, ob diese prodegenerative Signalkaskade auch in HSP Mutanten ausgelöst wird.

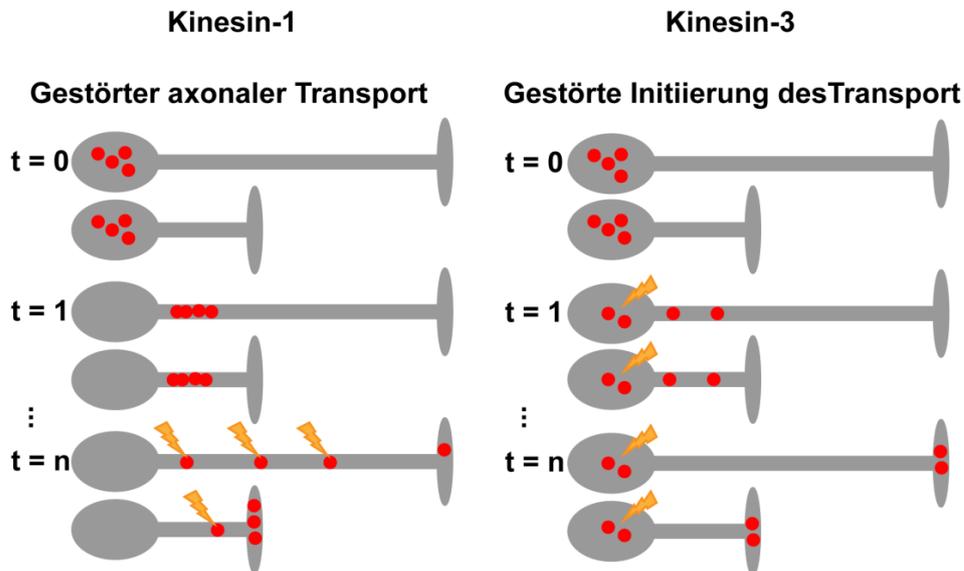
4.4 Vergleich der Transportstörungen von Kinesin-1 und Kinesin-3

Ziel dieser Arbeit war es zellbiologische Ursachen und molekulare Signalwege von Störungen in Kinesin-1 und Kinesin-3 basiertem Transport näher zu betrachten.

Störungen im axonalen Transport führen oft zu axonalen Schwellungen und einer gestörter Funktion der NMJ, abhängig von einem anterioren-posterioren Gradienten. Dabei nimmt die Intensität der Störung mit der größeren Distanz zwischen Zellkörper und NMJ zu. Dies ist bei Störungen von Kinesin-1 zu beobachten (Abb. 35 links). Es wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Transports aus dem Zellkörper zur Synapse umgekehrt proportional zur Länge des innervierten Axons ist. Das bedeutet, je länger das innervierende Axon ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für einen Transportdefekt.

Wird die Störung aber durch einen Defekt in der Bindung der Frachten und/oder der Initiierung des Transports, wie bei Kinesin-3 (Abb. 35 rechts), ausgelöst, kommt es zu keiner Störung während des Transports entlang des Axons. In

diesem Fall sind die Menge an gelieferten Frachten an der NMJ und die beobachteten Defekte unabhängig von der Länge des innervierten Axons.



Konsequenzen

- Axonale Schwellungen
- Akkumulation von Fracht in den Zellkörpern
- längenabhängige strukturelle und funktionale Defekte an der NMJ
- weder axonale Schwellungen noch längenabhängige Defekte an der NMJ
- Tail-Flip Phänotyp
- langsame bzw. paralysierte Larven

Abbildung 35 Vergleich der Transportstörungen in Kinesin-1 und Kinesin-3

Dargestellt sind in grau die Zellkörper mit Axon und NMJ und in rot die zu liefernden Frachten. Mit einem Blitz ist der Bereich der Störung gekennzeichnet. Bei Kinesin-1 kommt es zu einer Störung im Axon, bei Kinesin-3 liegt eine fehlerhafte Beladung oder ein Fehler bei der Initiierung des Transports vor. Mit t sind die unterschiedlichen Zeitpunkte angegeben.

5 Ausblick

Veränderungen in der Reifung der dendritischen und synaptischen Enden wurden unabhängig voneinander mit mentaler Retardation und Neurodegeneration assoziiert. Der Umstand, dass ein einziger Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin in der FHA-Domäne von Unc-104 ausreichend ist um all diese Prozesse zu stören, ist ein ideales biochemisches Werkzeug um die neurobiologischen Grundlagen der Regulation von Kinesin-3 basiertem Transport näher zu untersuchen. Dies wird hoffentlich dazu beitragen entwicklungsgestörte, neurologische Krankheiten zu entschlüsseln. Es bleibt zu klären, ob die Defekte des NMJ Wachstums und der Boutonvergrößerung wirklich unabhängig voneinander sind oder direkt durch die Veränderungen in der Funktion von Unc-104 verursacht werden. Frühe Entwicklung wird generell durch eine Vergrößerung sowohl der prä- als auch der postsynaptischen Strukturen charakterisiert. Durch die Reifung individueller Kontakte nehmen neuronale Netzwerke ihre Arbeit auf. Während diese Kontakte reifen, stärker werden und andere Kontakte stabilisieren, werden andere Kontakte schwächer und letztendlich eliminiert. Dieser Prozess wird als eine zentrale zelluläre Korrelation zwischen Lernen und Erinnern angesehen. Beide Defekte, die Stabilisierung als auch die Eliminierung von Kontakten, führen zu neurologischen oder neurodegenerativen Defekten.

Studien über den Austausch von Arginin zu Histidin in der FHA-Domäne könnten als Werkzeug dienen um die Rolle von Unc-104 in der Synapsenentwicklung und der synaptischen Plastizität zu entschlüsseln. Eine mögliche Erweiterung des Verständnisses von neurologischen Erkrankungen, bei denen Synapsen sich möglicherweise nicht richtig entwickeln, könnten zur Entwicklung von Behandlungsstrategien beitragen.

Um die Rolle der FHA-Domäne genauer zu untersuchen, könnte die sogenannte molekulare Kraftmikroskopie angewandt werden. Dabei kann die intramolekulare Kraft zwischen der FHA-Domäne und der mit ihr interagierenden CC-Domäne untersucht werden. Mit Hilfe eines Atomkraftmikroskops (Atomic Force Mikroskop, AFM) werden die

intramolekulare Kräfte gemessen. Dazu wird das zu untersuchende Protein durch Bindungspartner (z.B. Ig aus *Dictyostelium discoideum* Filamin) an der Atomkraftmikroskopspitze und einer Glasoberfläche befestigt. Durch langsames Wegziehen der Spitze entfalten sich die untersuchten Proteine. Dabei können die intramolekulare Kräfte gemessen werden. Ein Vergleich von *unc-104* mit *unc-104^{bris}* kann zeigen, ob es durch die Mutation in der FHA-Domäne zu einer verminderten intramolekularen Interaktion der FHA-Domäne und der CC-Domäne kommt. Diese verminderte Interaktion könnte auch Einfluss auf die Autoregulation von Unc-104 haben.

Desweiteren könnten die mit verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen erzeugten Konstrukte (siehe 2.2.2.5 und 2.2.2.6) verwendet werden um die Möglichkeit zu überprüfen, dass sich Dimere aus Unc-104 und Unc-104^{bris} bilden. Die fluoreszenzmarkierten Konstrukte könnten auch dazu verwendet werden, den Transport von Frachten zu beobachten. So könnten markierte Frachten wie z.B. Brp-GFP und das fluoreszierende *unc-104^{bris}* koexprimiert werden um das genaue Verhalten beim Initiieren des Transports zu untersuchen. Diese Experimente könnten sowohl *in vivo* (Transportverhalten) als auch mit Präparationen (Dimerbildung) durchgeführt werden.

Bei dem *Drosophila*-Modell von HSP konnte gezeigt werden, dass es in den Axonen zu Schwellungen und in den NMJ zu Neurodegeneration kommt. Um die axonalen Schwellungen genauer zu untersuchen, sollten fluoreszenzmarkierte Konstrukte der Mutation und des Wildtyps entwickelt werden. Durch Koexpression einer markierten Fracht (z.B. Mito-GFP) könnte das Verhalten an den Schwellungen charakterisiert werden. Kommt es zum Beispiel in der Schwellung zur Ablösung der Fracht vom Motor-Fracht-Komplex, oder bleibt dieser Komplex auch in den Schwellungen bestehen? Desweiteren könnte durch Koexpression des Wildtyp und des mutanten Konstruktes die Bildung von Dimeren beobachtet werden. Dadurch könnte untersucht werden, ob es bei einem homogenen Dimer aus Khc^{N256S} früher zu axonalen Schwellungen und Akkumulationen von Frachten kommt als bei heterogenen Dimeren aus Khc^{wt} und Khc^{N256S}.

Da bekannt wurde, dass HSP nicht nur durch Kinesin-1 ausgelöst wird, sondern auch durch Mutationen in Kinesin-3 (Erlich et al., 2011, Klebe et al., 2012),

wurde ein weiteres Modellsystem mit diesen Mutationen entwickelt (siehe 2.2.2.4, 2.2.2.7 und 2.2.2.8). An diesem Modellsystem können nun dieselben Untersuchungen wie im *khc^{N256S}* Modell durchgeführt werden. Kommt es auch hier zur Akkumulation und zu Schwellungen im Axon? Sind an den Akkumulationen die gleichen Frachten beteiligt oder nur die des Kinesin-3 Transports? Kommt es ebenfalls zur Neurodegeneration der Synapsen an der NMJ?

Durch Identifizieren der Signalwege von Khc und Unc-104 könnten neue Ansätze für Behandlungsstrategien von HSP angestrebt werden. Bestätigt sich z.B. die Annahme, dass der prodegenerative Signalweg auch im Abbau der Neurodegeneration von HSP beteiligt ist, kann in dieser Richtung nach Verbesserungen für Patienten gesucht werden.

Literatur

- Al-Bassam J, Cui Y, Klopfenstein D, Carragher BO, Vale RD, Milligan RA (2003) Distinct conformations of the kinesin Unc104 neck regulate a monomer to dimer motor transition. *J Cell Biol* 163:743-753.
- Ashley J, Packard M, Ataman B, Budnik V (2005) Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J Neurosci* 25:5943-5955.
- Baines RA (2004) Synaptic strengthening mediated by bone morphogenetic protein-dependent retrograde signaling in the *Drosophila* CNS. *J Neurosci* 24:6904-6911.
- Balice-Gordon RJ, Breedlove SM, Bernstein S, Lichtman JW (1990) Neuromuscular junctions shrink and expand as muscle fiber size is manipulated: in vivo observations in the androgen-sensitive bulbocavernosus muscle of mice. *J Neurosci* 10:2660-2671.
- Barkus RV, Klyachko O, Horiuchi D, Dickson BJ, Saxton WM (2008) Identification of an axonal kinesin-3 motor for fast anterograde vesicle transport that facilitates retrograde transport of neuropeptides. *Mol Biol Cell* 19:274-283.
- Bishop DL, Misgeld T, Walsh MK, Gan WB, Lichtman JW (2004) Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron* 44:651-661.
- Blair M, Ma S, Hedera P (2006) Mutation in KIF5A can also cause adult-onset hereditary spastic paraplegia. *J Neurogenet* 7:47-50.
- Botella JA, Schneuwly S (2004) *Drosophila melanogaster*: Ein Modellsystem zur Analyse neurodegenerativer Erkrankungen. *Biospektrum* 5:626-629.
- Botella JA, Ulschmid JK, Gruenewald C, Moehle C, Kretzschmar D, Becker K, Schneuwly S (2004) The *Drosophila* carbonyl reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr Biol* 14:782-786.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brink DL, Gilbert M, Xie X, Petley-Ragan L, Auld VJ (2012) Glial processes at the *Drosophila* larval neuromuscular junction match synaptic growth. *PloS one* 7:e37876.
- Budnik V (2006) *Fly Neuromuscular Junction: Structure and Function*: Elsevier.
- Budnik V, Koh YH, Guan B, Hartmann B, Hough C, Woods D, Gorczyca M (1996) Regulation of synapse structure and function by the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg*. *Neuron* 17:627-640.
- Cai Q, Pan PY, Sheng ZH (2007) Syntabulin-kinesin-1 family member 5B-mediated axonal transport contributes to activity-dependent presynaptic assembly. *J Neurosci* 27:7284-7296.
- Castiglioni MC (1951) [Distribution of pigments in the eye of alleles of white and their compounds in *Drosophila melanogaster*]. *Scientia genetica; periodico di genetica per i paesi latini* 4:57-60.
- Celotto AM, Palladino MJ (2005) *Drosophila*: a "model" model system to study neurodegeneration. *Mol Interv* 5:292-303.

- Chen K, Featherstone DE (2005) Discs-large (DLG) is clustered by presynaptic innervation and regulates postsynaptic glutamate receptor subunit composition in *Drosophila*. *BMC Biol* 3:1.
- Clarke GL, Chen J, Nishimune H (2012) Presynaptic Active Zone Density during Development and Synaptic Plasticity. *Frontiers in molecular neuroscience* 5:12.
- Crimella C, Baschiroto C, Arnoldi A, Tonelli A, Tenderini E, Airoidi G, Martinuzzi A, Trabacca A, Losito L, Scarlato M, Benedetti S, Scarpini E, Spinicci G, Bresolin N, Bassi MT (2012) Mutations in the motor and stalk domains of KIF5A in spastic paraplegia type 10 and in axonal Charcot-Marie-Tooth type 2. *Clinical genetics* 82:157-164.
- Dai Y, Taru H, Deken SL, Grill B, Ackley B, Nonet ML, Jin Y (2006) SYD-2 Liprin-alpha organizes presynaptic active zone formation through ELKS. *Nat Neurosci* 9:1479-1487.
- Diefenbach RJ, Diefenbach E, Douglas MW, Cunningham AL (2002) The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23. *Biochemistry* 41:14906-14915.
- Eaton BA, Fetter RD, Davis GW (2002) Dynactin is necessary for synapse stabilization. *Neuron* 34:729-741.
- Erlich Y, Edvardson S, Hodges E, Zenvirt S, Thekkat P, Shaag A, Dor T, Hannon GJ, Elpeleg O (2011) Exome sequencing and disease-network analysis of a single family implicate a mutation in KIF1A in hereditary spastic paraparesis. *Genome Res* 21:658-664.
- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC (2000) Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* 25:203-214.
- Fink JK (2003) Advances in the hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol* 184:106-110.
- Fuentes-Medel Y, Logan MA, Ashley J, Ataman B, Budnik V, Freeman MR (2009) Glia and muscle sculpt neuromuscular arbors by engulfing destabilized synaptic boutons and shed presynaptic debris. *PLoS biology* 7:e1000184.
- Fuger P, Behrends LB, Mertel S, Sigrist SJ, Rasse TM (2007) Live imaging of synapse development and measuring protein dynamics using two-color fluorescence recovery after photo-bleaching at *Drosophila* synapses. *Nat Protoc* 2:3285-3298.
- Füger P, Sreekumar V, Schüle R, Kern JV, Stanchev DT, Schneider CD, Kathrin N. Karle, Daub KJ, Siegert VK, Flötenmeyer M, Schwarz H, Schöls L, Rasse TM (2012) Spastic Paraplegia Mutation N256S in the Neuronal Microtubule Motor KIF5A Disrupts Axonal Transport in a *Drosophila* HSP Model. *PLoS Genetics* in press.
- Garner CC, Nash J, Haganir RL (2000) PDZ domains in synapse assembly and signalling. *Trends Cell Biol* 10:274-280.
- Gindhart JG, Jr., Desai CJ, Beushausen S, Zinn K, Goldstein LS (1998) Kinesin light chains are essential for axonal transport in *Drosophila*. *J Cell Biol* 141:443-454.
- Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, Schwarz TL (2006) Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 173:545-557.

- Goldstein AY, Wang X, Schwarz TL (2008) Axonal transport and the delivery of pre-synaptic components. *Curr Opin Neurobiol* 18:495-503.
- Gorczyca M, Augart C, Budnik V (1993) Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. *J Neurosci* 13:3692-3704.
- Grafstein B, Forman DS (1980) Intracellular transport in neurons. *Physiol Rev* 60:1167-1283.
- Guan B, Hartmann B, Kho YH, Gorczyca M, Budnik V (1996) The *Drosophila* tumor suppressor gene, *dlg*, is involved in structural plasticity at a glutamatergic synapse. *Curr Biol* 6:695-706.
- Gustafson K, Boulianne GL (1996) Distinct expression patterns detected within individual tissues by the GAL4 enhancer trap technique. *Genome* 39:174-182.
- Hall DH, Hedgecock EM (1991) Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* 65:837-847.
- Hirokawa N (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279:519-526.
- Hirokawa N (2011) From electron microscopy to molecular cell biology, molecular genetics and structural biology: intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: genes, structure, dynamics and functions. *J Electron Microscop* 60:S63-92.
- Hirokawa N, Nitta R, Okada Y (2009) The mechanisms of kinesin motor motility: lessons from the monomeric motor KIF1A. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:877-884.
- Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:201-214.
- Hofmann K, Bucher P (1995) The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors: *Trends Biochem Sci.* 1995 Sep;20(9):347-9.
- Hoogenraad CC, Milstein AD, Ethell IM, Henkemeyer M, Sheng M (2005) GRIP1 controls dendrite morphogenesis by regulating EphB receptor trafficking. *Nat Neurosci* 8:906-915.
- Horiuchi D, Barkus RV, Pilling AD, Gassman A, Saxton WM (2005) APLIP1, a Kinesin Binding JIP-1/JNK Scaffold Protein, Influences the Axonal Transport of Both Vesicles and Mitochondria in *Drosophila*. *Curr Biol* 15:2137-2141.
- Hummel T, Krukkert K, Roos J, Davis G, Klämbt C (2000) *Drosophila* Futsch/22C10 Is a MAP1B-like Protein Required for Dendritic and Axonal Development. *Neuron* 26:357-370.
- Hurd DD, Saxton WM (1996) Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*. *Genetics* 144:1075-1085.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
- Jan YN, Jan LY (2010) Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci* 11:316-328.
- Jia XX, Gorczyca M, Budnik V (1993) Ultrastructure of neuromuscular junctions in *Drosophila*: comparison of wild type and mutants with increased excitability. *Journal of neurobiology* 24:1025-1044.
- Johansen J, Halpern ME, Keshishian H (1989) Axonal guidance and the development of muscle fiber-specific innervation in *Drosophila* embryos. *J Neurosci* 9:4318-4332.

- Karle KN, Mockel D, Reid E, Schols L (2012) Axonal transport deficit in a KIF5A(-/-) mouse model. *Neurogenetics* 13:169-179.
- Kasher PR, De Vos KJ, Wharton SB, Manser C, Bennett EJ, Bingley M, Wood JD, Milner R, McDermott CJ, Miller CC, Shaw PJ, Grierson AJ (2009) Direct evidence for axonal transport defects in a novel mouse model of mutant spastin-induced hereditary spastic paraplegia (HSP) and human HSP patients. *Journal of neurochemistry* 110:34-44.
- Keller LC, Cheng L, Locke CJ, Muller M, Fetter RD, Davis GW (2011) Glial-derived prodegenerative signaling in the *Drosophila* neuromuscular system. *Neuron* 72:760-775.
- Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger ED, Moser T (2005) Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434:889-894.
- Kim E, Cho KO, Rothschild A, Sheng M (1996) Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* 17:103-113.
- Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M (1995) Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 378:85-88.
- Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* 312:1051-1054.
- Klebe S, Lossos A, Azzedine H, Mundwiller E, Sheffer R, Gaussen M, Marelli C, Nawara M, Carpentier W, Meyer V, Rastetter A, Martin E, Bouteiller D, Orlando L, Gyapay G, El-Hachimi KH, Zimmerman B, Gamliel M, Misk A, Lerer I, Brice A, Durr A, Stevanin G (2012) KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: distinct phenotypes according to the nature of the mutations. *Eur J Hum Genet* 20:645-649.
- Klopfenstein DR, Tomishige M, Stuurman N, Vale RD (2002) Role of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate organization in membrane transport by the Unc104 kinesin motor. *Cell* 109:347-358.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Kramer S (2008) Kartierung und Charakterisierung der fluglotse-Mutante. Diplomarbeit: Universität Tübingen.
- Kurant E (2011) Keeping the CNS clear: glial phagocytic functions in *Drosophila*. *Glia* 59:1304-1311.
- Lang T, Jahn R (2008) Core proteins of the secretory machinery. *Handb Exp Pharmacol* 184:107-127.
- Lasek RJ, Oblinger MM, Drake PF (1983) Molecular biology of neuronal geometry: expression of neurofilament genes influences axonal diameter. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 48 Pt 2:731-744.
- Lin DM, Goodman CS (1994) Ectopic and increased expression of Fasciclin II alters motoneuron growth cone guidance. *Neuron* 13:507-523.
- Luo L, O'Leary DD (2005) Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 28:127-156.
- Mahr A, Aberle H (2006) The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and

- glutamatergic centers in the brain. Gene expression patterns : GEP 6:299-309.
- Marin-Padilla M (1972) Structural abnormalities of the cerebral cortex in human chromosomal aberrations: a Golgi study. *Brain Res* 44:625-629.
- Mathew D, Popescu A, Budnik V (2003) Drosophila amphiphysin functions during synaptic Fasciclin II membrane cycling. *J Neurosci* 23:10710-10716.
- Medina PM, Swick LL, Andersen R, Blalock Z, Brenman JE (2006) A novel forward genetic screen to identify mutations affecting larval neuronal dendrite development in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*.
- Muller BM, Kistner U, Kindler S, Chung WJ, Kuhlendahl S, Fenster SD, Lau LF, Veh RW, Haganir RL, Gundelfinger ED, Garner CC (1996) SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* 17:255-265.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- O'Farrell F, Esfahani SS, Engstrom Y, Kylsten P (2008) Regulation of the *Drosophila* lin-41 homologue dappled by let-7 reveals conservation of a regulatory mechanism within the LIN-41 subclade. *Dev Dyn* 237:196-208.
- Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai Y (2002) Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol* 158:577-590.
- Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, Hirokawa N (1995) The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* 81:769-780.
- Pack-Chung E, Kurshan PT, Dickman DK, Schwarz TL (2007) A *Drosophila* kinesin required for synaptic bouton formation and synaptic vesicle transport. *Nat Neurosci* 10:980-989.
- Parks AL, Cook KR, Belvin M, Dompe NA, Fawcett R, Huppert K, Tan LR, Winter CG, Bogart KP, Deal JE, Deal-Herr ME, Grant D, Marcinko M, Miyazaki WY, Robertson S, Shaw KJ, Tabios M, Vysotskaia V, Zhao L, Andrade RS, Edgar KA, Howie E, Killpack K, Milash B, Norton A, Thao D, Whittaker K, Winner MA, Friedman L, Margolis J, Singer MA, Kopczynski C, Curtis D, Kaufman TC, Plowman GD, Duyk G, Francis-Lang HL (2004) Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet* 36:288-292.
- Parnas D, Haghighi AP, Fetter RD, Kim SW, Goodman CS (2001) Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix. *Neuron* 32:415-424.
- Patel MR, Lehrman EK, Poon VY, Crump JG, Zhen M, Bargmann CI, Shen K (2006) Hierarchical assembly of presynaptic components in defined *C. elegans* synapses. *Nat Neurosci* 9:1488-1498.
- Pilling AD, Horiuchi D, Lively CM, Saxton WM (2006) Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol Biol Cell* 17:2057-2068.

- Puthanveettil SV, Monje FJ, Miniaci MC, Choi YB, Karl KA, Khandros E, Gawinowicz MA, Sheetz MP, Kandel ER (2008) A new component in synaptic plasticity: upregulation of kinesin in the neurons of the gill-withdrawal reflex. *Cell* 135:960-973.
- Qin G, Schwarz T, Kittel RJ, Schmid A, Rasse TM, Kappei D, Ponimaskin E, Heckmann M, Sigrist SJ (2005) Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *J Neurosci* 25:3209-3218.
- Rasse TM, Fouquet W, Schmid A, Kittel RJ, Mertel S, Sigrist CB, Schmidt M, Guzman A, Merino C, Qin G, Quentin C, Madeo FF, Heckmann M, Sigrist SJ (2005) Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat Neurosci* 8:898-905.
- Reid E, Dearlove AM, Rhodes M, Rubinsztein DC (1999) A New Locus for Autosomal Dominant "Pure" Hereditary Spastic Paraplegia Mapping to Chromosome 12q13, and Evidence for Further Genetic Heterogeneity. *The American Journal of Human Genetics* 65:757-763.
- Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, Graham FL, Gaskell PC, Dearlove A, Pericak-Vance MA, Rubinsztein DC, Marchuk DA (2002) A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *American journal of human genetics* 71:1189-1194.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LS, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJ, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Voshall LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Lewis S (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287:2204-2215.
- Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Drummond J, Webster J, Johnson G, Morley T, Chan YS, Blows F, Coulson D, Reuter G, Baisch H, Apelt C, Kauk A, Rudolph T, Kube M, Klimm M, Nickel C, Szidonya J, Maroy P, Pal M, Rasmuson-Lestander A, Ekstrom K, Stocker H, Hugentobler C, Hafen E, Gubb D, Pflugfelder G, Dorner C, Mechler B, Schenkel H, Marhold J, Serras F, Corominas M, Punset A, Roote J, Russell S (2007) The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* 177:615-629.
- Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT (2008) Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet neurology* 7:1127-1138.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual I-III*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Press.
- Sang TK, Jackson GR (2005) *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *NeuroRx* 2:438-446.
- Saxton WM, Hicks J, Goldstein LS, Raff EC (1991) Kinesin heavy chain is essential for viability and neuromuscular functions in *Drosophila*, but mutants show no defects in mitosis. *Cell* 64:1093-1102.
- Schmid A, Hallermann S, Kittel RJ, Khorrasmshahi O, Frolich AM, Quentin C, Rasse TM, Mertel S, Heckmann M, Sigrist SJ (2008) Activity-dependent

- site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo. *Nat Neurosci* 11:659-666.
- Schoch S, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 326:379-391.
- Schule R, Kremer BPH, Kassubek J, Auer-Grumbach M, Kostic V, Klopstock T, Klimpe S, Otto S, Boesch S, van de Warrenburg BP, Schols L (2008) SPG10 is a rare cause of spastic paraplegia in European families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:584-587.
- Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS (1996) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* 17:641-654.
- Shah JV, Cleveland DW (2002) Slow axonal transport: fast motors in the slow lane. *Curr Opin Cell Biol* 14:58-62.
- Shin H, Wyszynski M, Huh KH, Valtschanoff JG, Lee JR, Ko J, Streuli M, Weinberg RJ, Sheng M, Kim E (2003) Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha. *J Biol Chem* 278:11393-11401.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Takao-Rikitsu E, Mochida S, Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Inoue M, Ohtsuka T, Takai Y (2004) Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *J Cell Biol* 164:301-311.
- Tejedor FJ, Bokhari A, Rogero O, Gorczyca M, Zhang J, Kim E, Sheng M, Budnik V (1997) Essential role for dlg in synaptic clustering of Shaker K⁺ channels in vivo. *J Neurosci* 17:152-159.
- Thibault ST, Singer MA, Miyazaki WY, Milash B, Dompe NA, Singh CM, Buchholz R, Demsky M, Fawcett R, Francis-Lang HL, Ryner L, Cheung LM, Chong A, Erickson C, Fisher WW, Greer K, Hartouni SR, Howie E, Jakkula L, Joo D, Killpack K, Laufer A, Mazzotta J, Smith RD, Stevens LM, Stuber C, Tan LR, Ventura R, Woo A, Zakrajsek I, Zhao L, Chen F, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Winberg ML, Margolis J (2004) A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* 36:283-287.
- Thomas U, Kim E, Kuhlendahl S, Koh YH, Gundelfinger ED, Sheng M, Garner CC, Budnik V (1997) Synaptic clustering of the cell adhesion molecule fasciclin II by discs-large and its role in the regulation of presynaptic structure. *Neuron* 19:787-799.
- tom Dieck S, Altmann WD, Kessels MM, Qualmann B, Regus H, Brauner D, Fejtova A, Bracko O, Gundelfinger ED, Brandstatter JH (2005) Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J Cell Biol* 168:825-836.
- Tomishige M, Klopfenstein DR, Vale RD (2002) Conversion of Unc104/KIF1A kinesin into a processive motor after dimerization. *Science* 297:2263-2267.
- Uchida A, Alami NH, Brown A (2009) Tight functional coupling of kinesin-1A and dynein motors in the bidirectional transport of neurofilaments. *Mol Biol Cell* 20:4997-5006.
- Verhey KJ, Hammond JW (2009) Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:765-777.

- Verhey KJ, Kaul N, Soppina V (2011) Kinesin assembly and movement in cells. *Annual review of biophysics* 40:267-288.
- Viquez NM, Fuger P, Valakh V, Daniels RW, Rasse TM, DiAntonio A (2009) PP2A and GSK-3beta act antagonistically to regulate active zone development. *J Neurosci* 29:11484-11494.
- Vitureira N, Letellier M, Goda Y (2011) Homeostatic synaptic plasticity: from single synapses to neural circuits. *Curr Opin Neurobiol*.
- Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Durrbeck H, Buchner S, Dabauvalle MC, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E (2006) Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* 49:833-844.
- Wagner OI, Esposito A, Kohler B, Chen CW, Shen CP, Wu GH, Butkevich E, Mandalapu S, Wenzel D, Wouters FS, Klopfenstein DR (2009) Synaptic scaffolding protein SYD-2 clusters and activates kinesin-3 UNC-104 in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:19605-19610.
- Walikonis RS, Jensen ON, Mann M, Provance DW, Jr., Mercer JA, Kennedy MB (2000) Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci* 20:4069-4080.
- Wang L, Brown A (2010) A hereditary spastic paraplegia mutation in kinesin-1A/KIF5A disrupts neurofilament transport. *Molecular neurodegeneration* 5:52.
- Wehner R, Gehring W, Kühn A (2007) *Zoologie*: Georg Thieme Verlag KG.
- Westerholm-Parvinen A, Vernos I, Serrano L (2000) Kinesin subfamily UNC104 contains a FHA domain: boundaries and physicochemical characterization. *FEBS Lett* 486:285-290.
- Zhai RG, Bellen HJ (2004) The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda, Md)* 19:262-270.
- Zhai RG, Hiesinger PR, Koh TW, Verstreken P, Schulze KL, Cao Y, Jafar-Nejad H, Norga KK, Pan H, Bayat V, Greenbaum MP, Bellen HJ (2003) Mapping *Drosophila* mutations with molecularly defined P element insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10860-10865.
- Zhang Y (2012) The role of Kinesin-3 in regulating synaptic development in *Drosophila*. Dissertation Universität Tübingen.
- Zhang Y, Fuger P, Hannan SB, Kern JV, Lasky B, Rasse TM (2010) In vivo imaging of intact *Drosophila* larvae at sub-cellular resolution. *J Vis Exp* 10.
- Zinsmaier KE, Eberle KK, Buchner E, Walter N, Benzer S (1994) Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*. *Science* 263:977-980.
- Zito K, Fetter RD, Goodman CS, Isacoff EY (1997) Synaptic clustering of Fascilin II and Shaker: essential targeting sequences and role of Dlg. *Neuron* 19:1007-1016.
- Ziv NE, Garner CC (2004) Cellular and molecular mechanisms of presynaptic assembly. *Nat Rev Neurosci* 5:385-399.
- Züchner S, Wang G, Tran-Viet KN, Nance MA, Gaskell PC, Vance JM, Ashley-Koch AE, MA. P-V (2006) Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *The American Journal of Human Genetics* 79(2):365-369.

Anhang

Vektorkarten von Unc-104

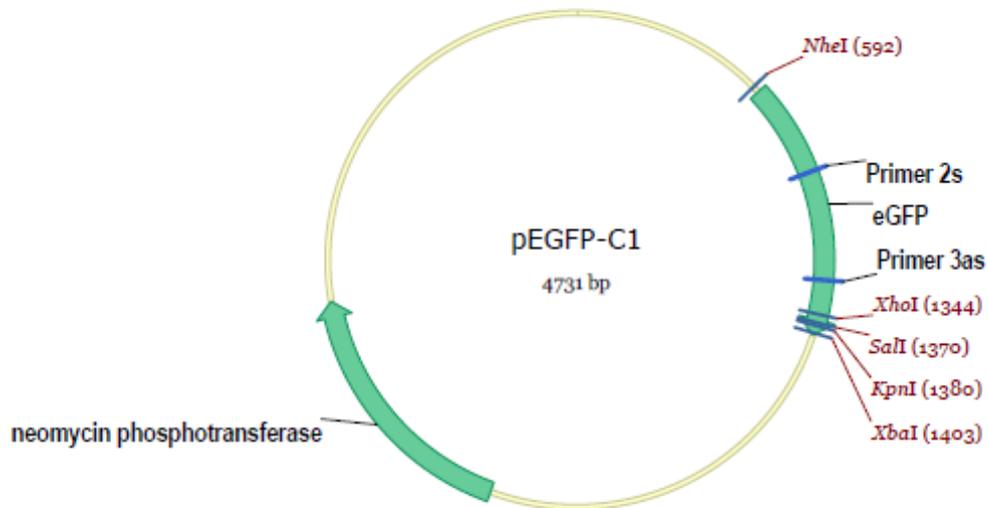


Abbildung 36 Vektorkarte von pEGFP-C1 von Clontech

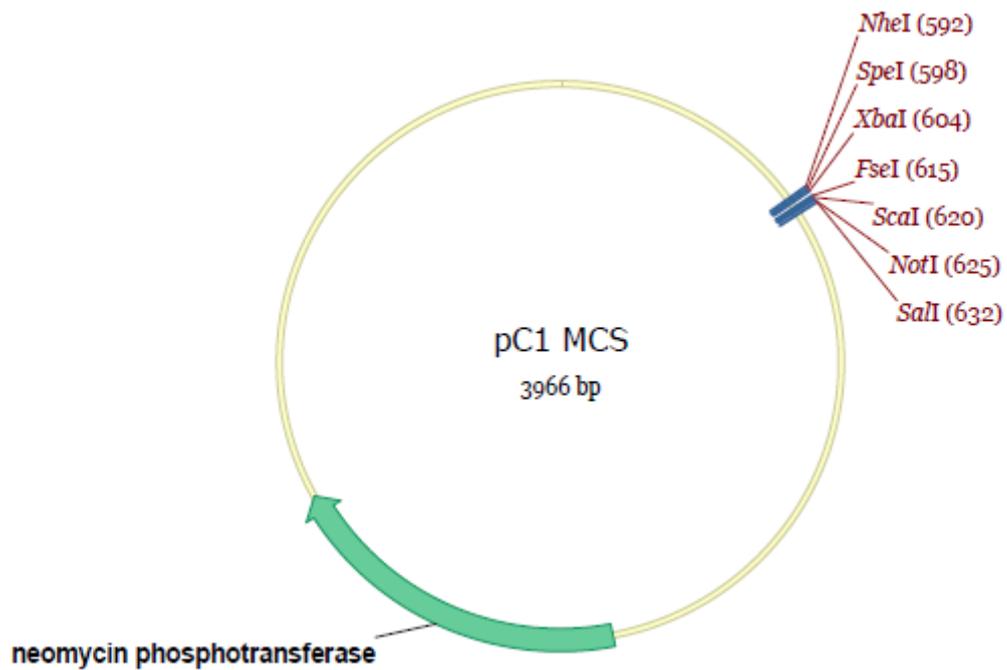


Abbildung 37 Vektorkarte von pC1 MCS

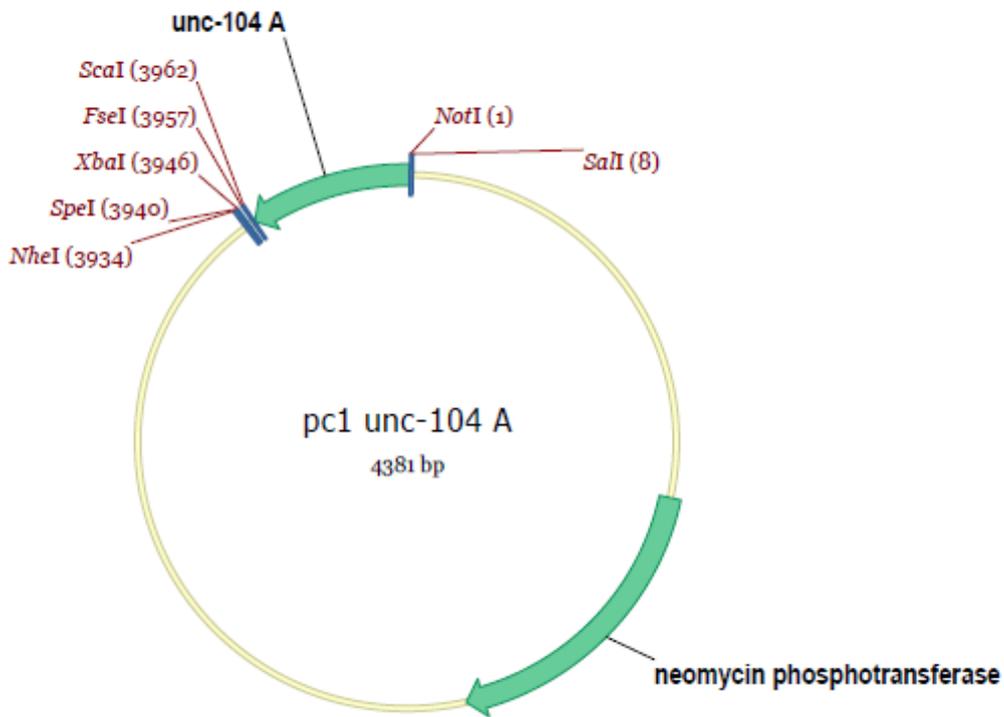


Abbildung 38 Vektorkarte von pC1 unc-104-A

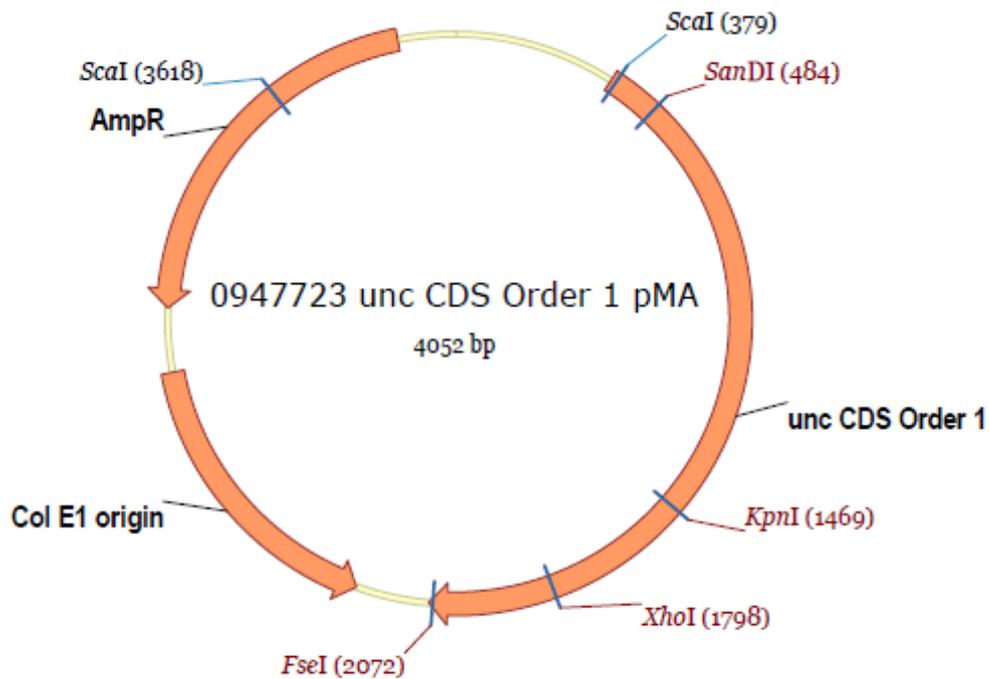


Abbildung 39 Vektorkarte von Order 1 von Mr.Gene

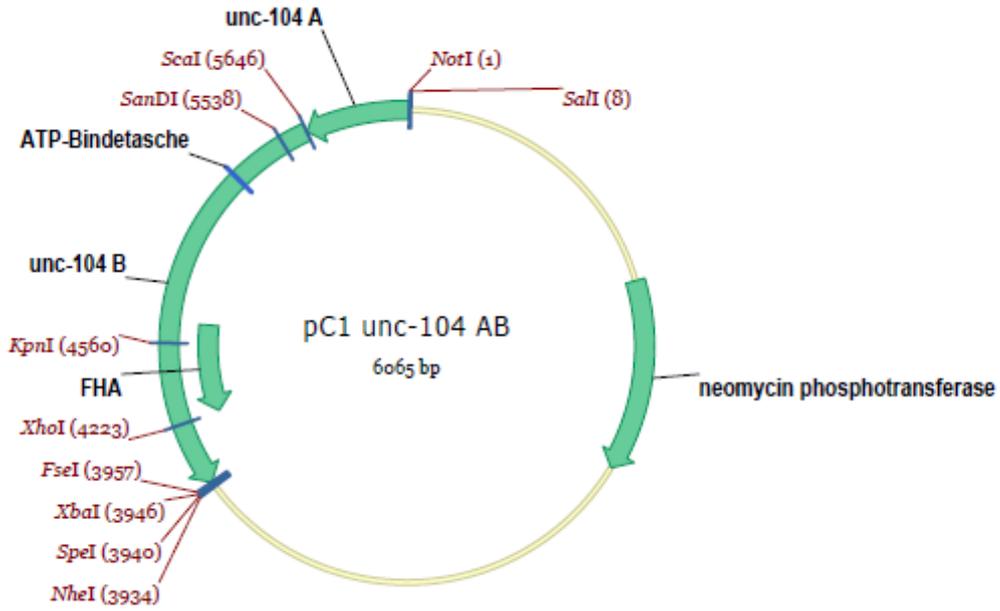


Abbildung 40 Vektorkarte von pC1 unc-104-AB

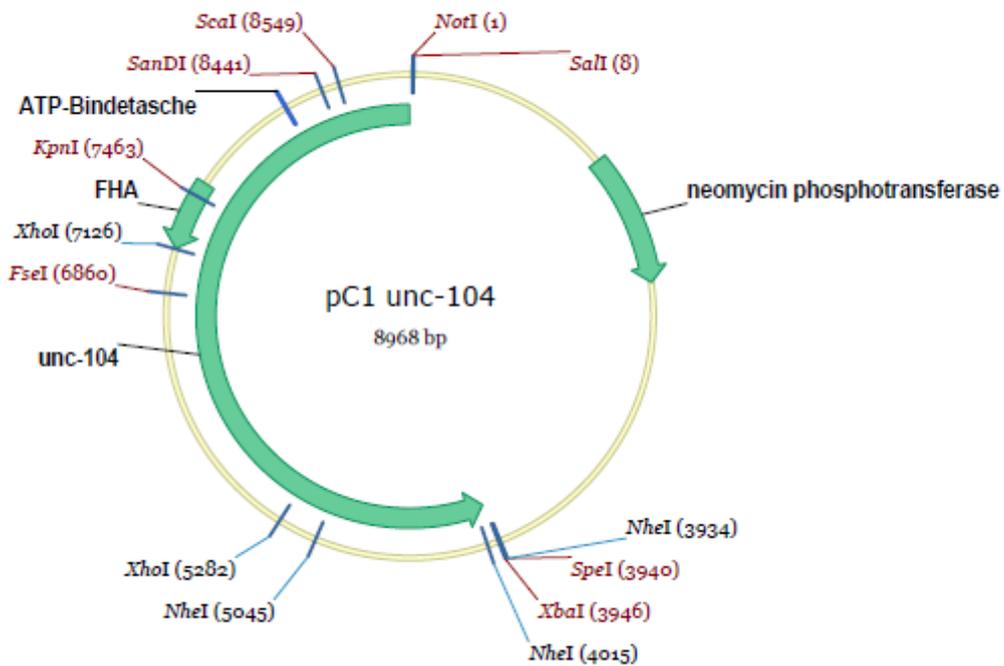


Abbildung 41 Vektorkarte von pC1 unc-104

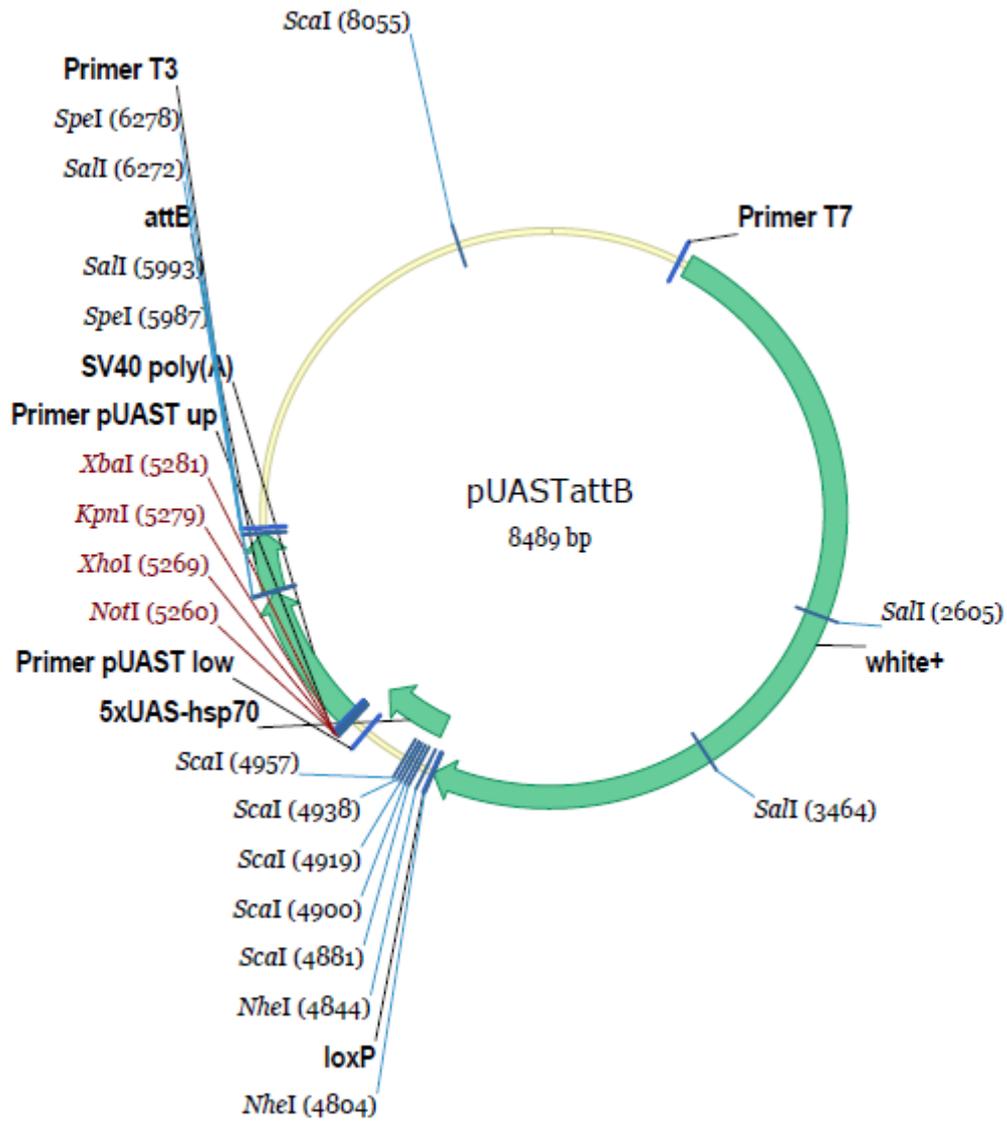


Abbildung 42 Vektorkarte von pUAST attB

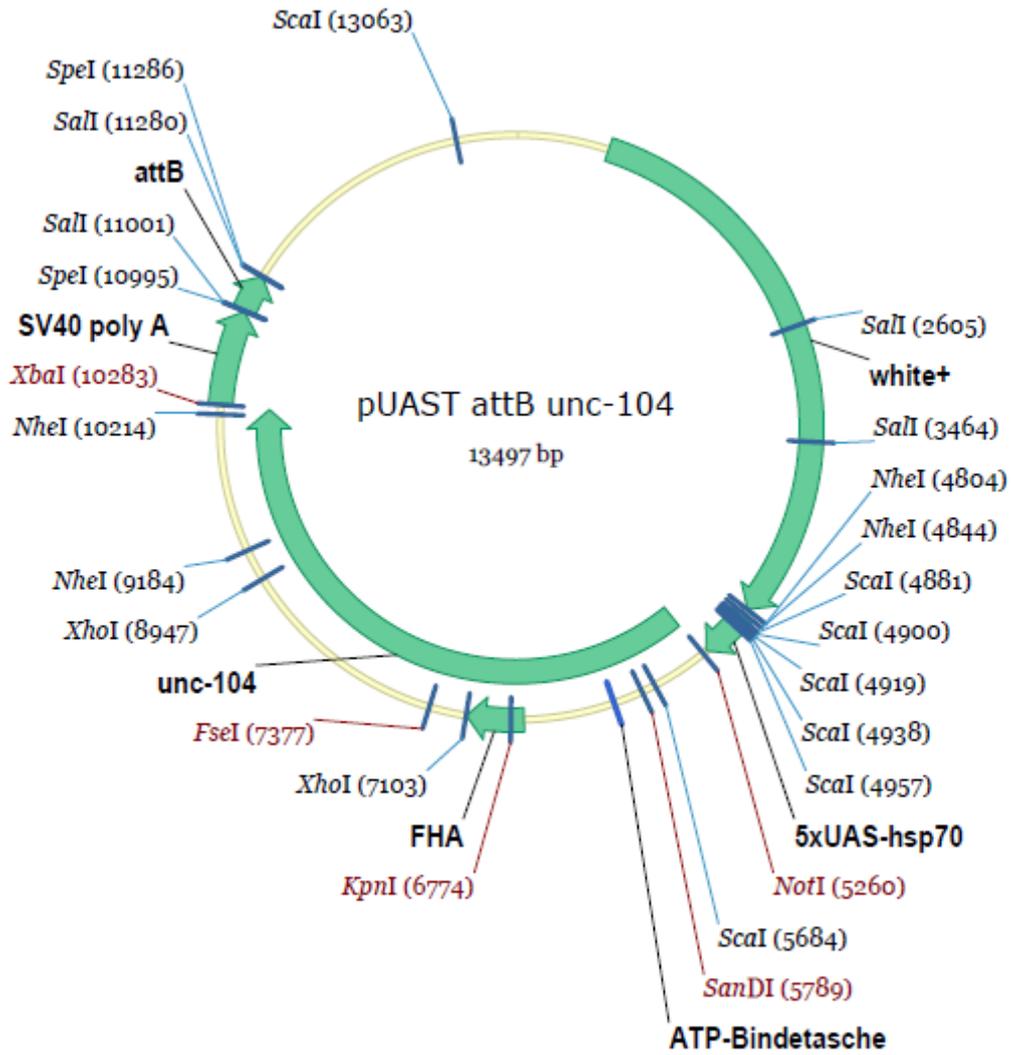


Abbildung 43 Vektorkarte von pUAST attB unc-104

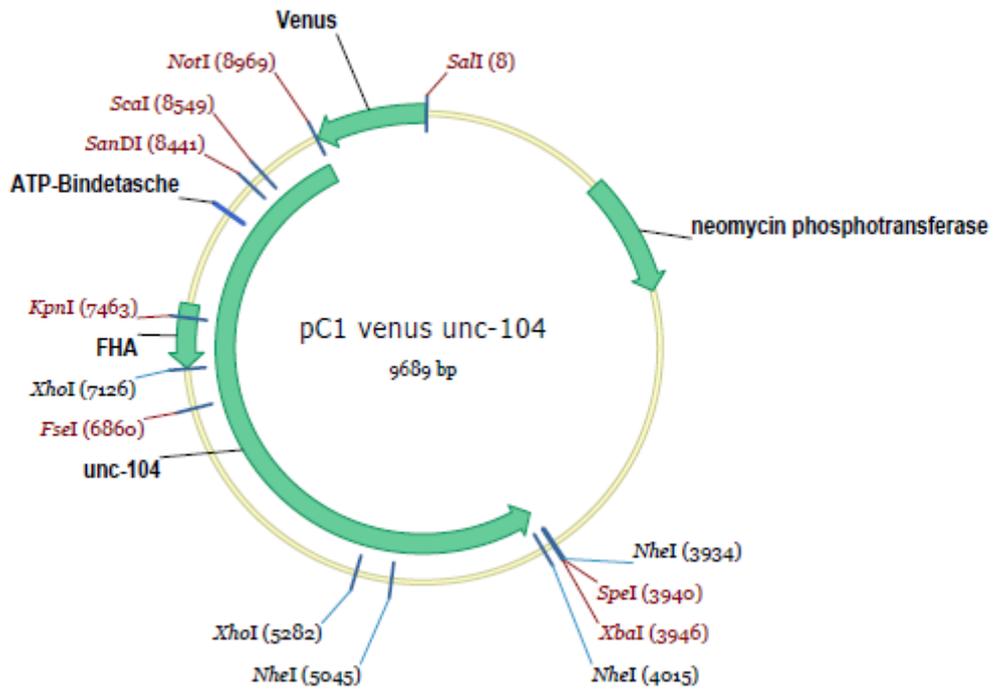


Abbildung 44 Vektorkarte von pC1 venus unc-104

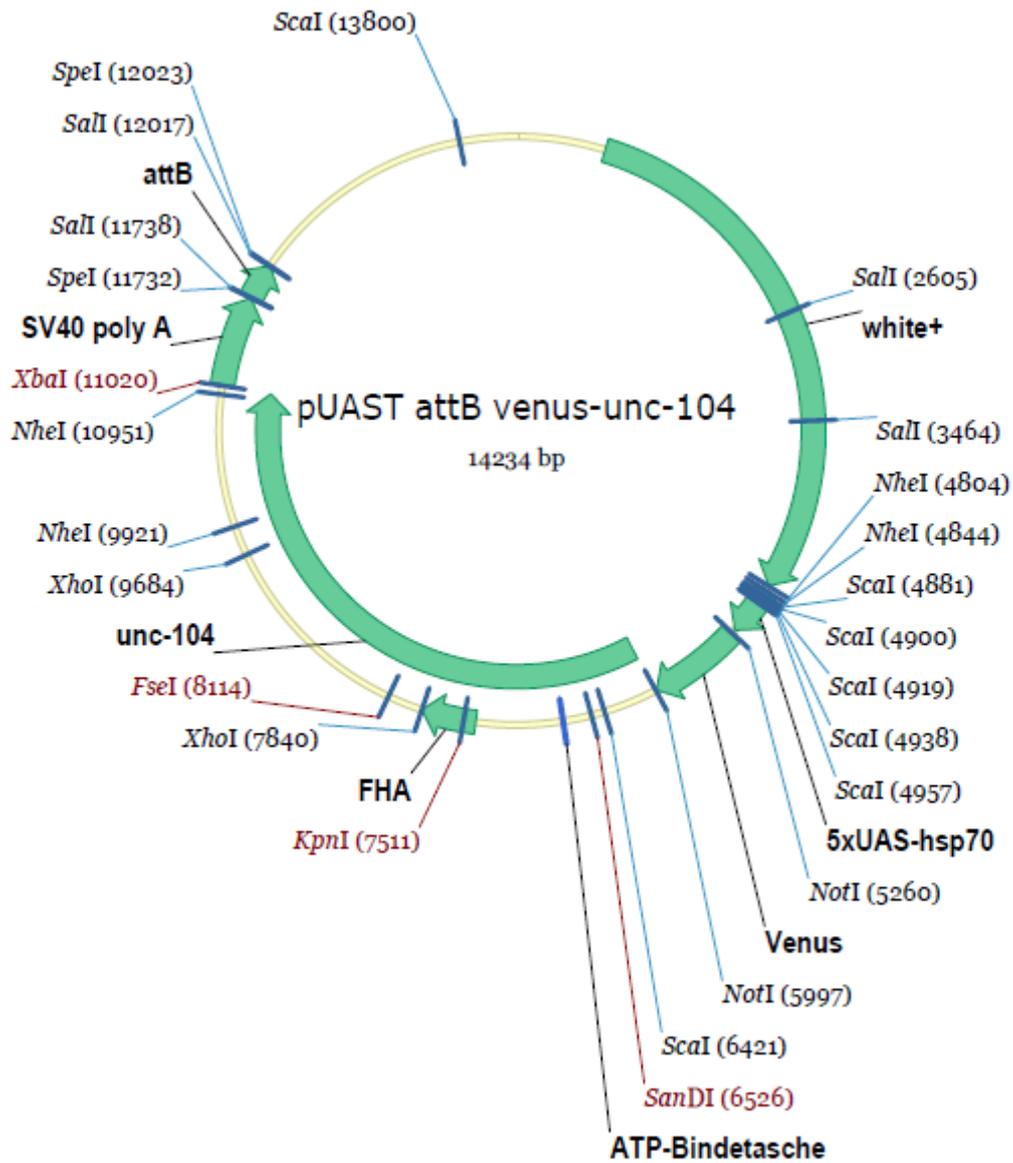


Abbildung 45 Vektorkarte von pUAST attB venus unc-104

Vektorkarten von *Unc-104^{bris}*

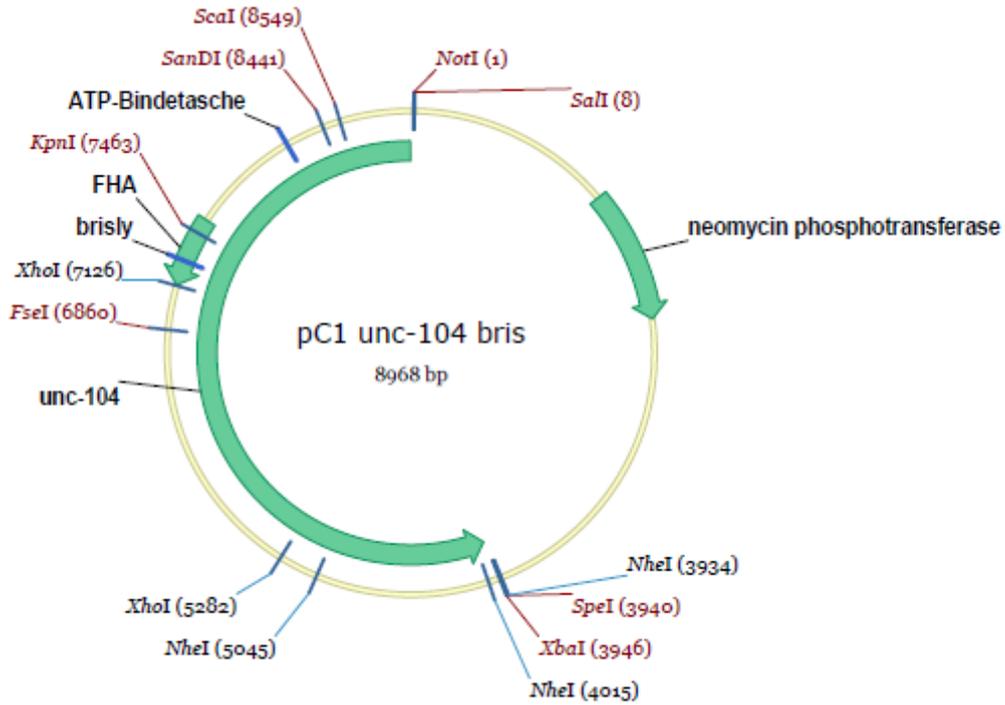


Abbildung 46 Vektorkarte von pC1 *unc-104^{bris}*

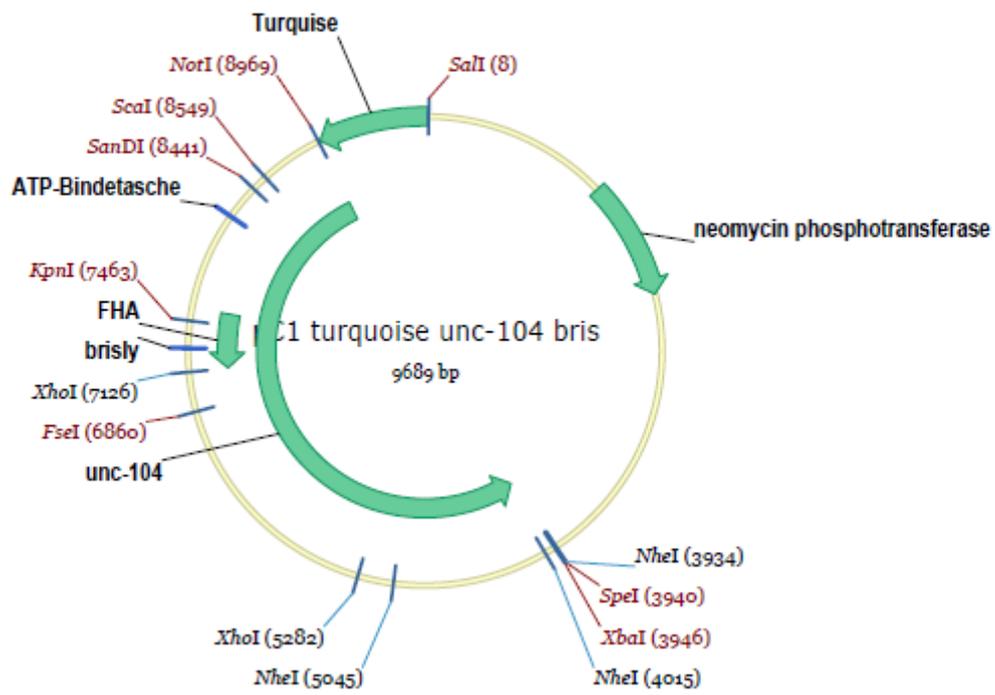


Abbildung 47 Vektorkarte von pC1 turquoise unc-104^{bris}

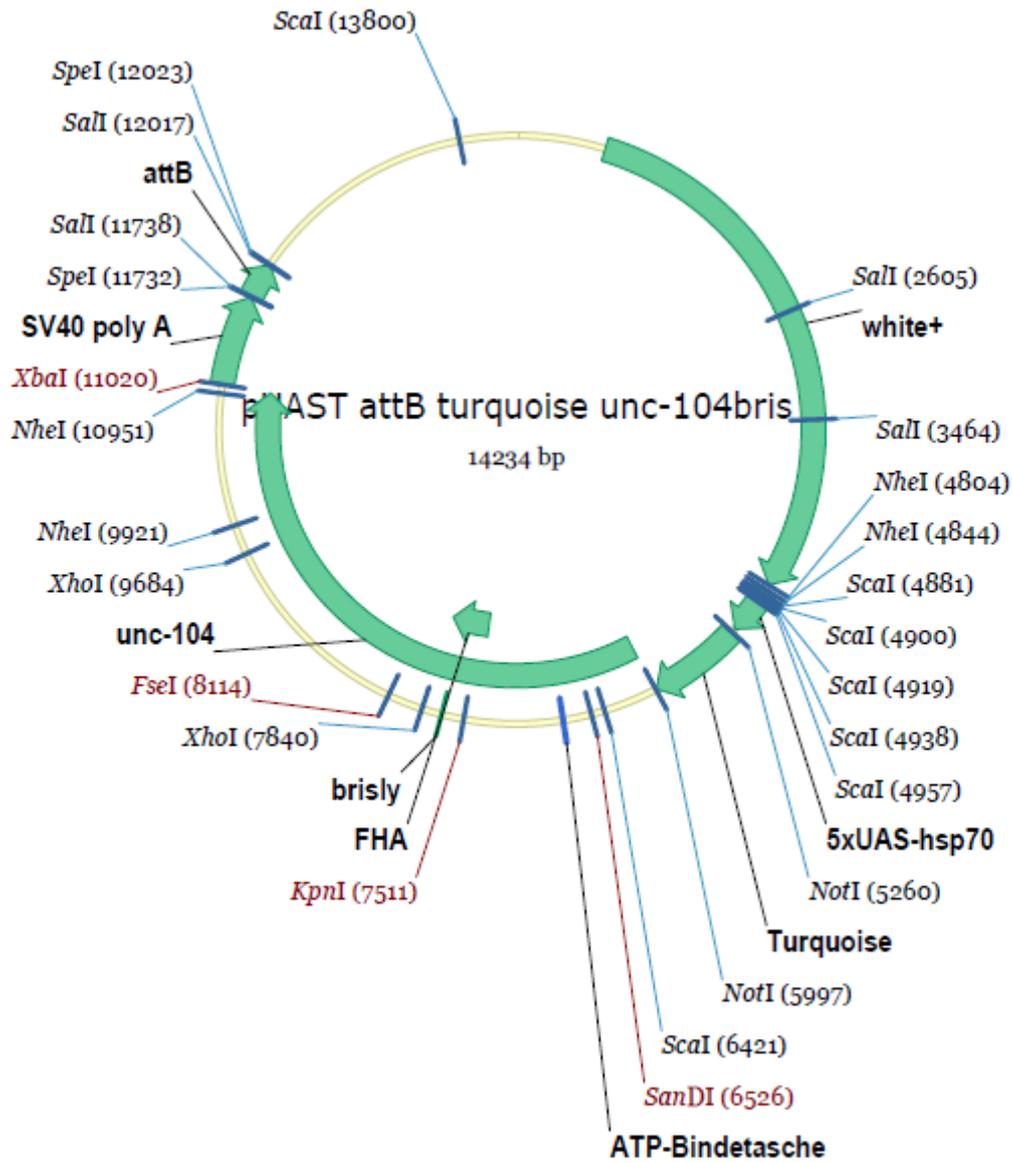


Abbildung 48 Vektorkarte von pUAST attB turquoise unc-104^{bris}

Vektorkarten von Unc-104^{HSP}

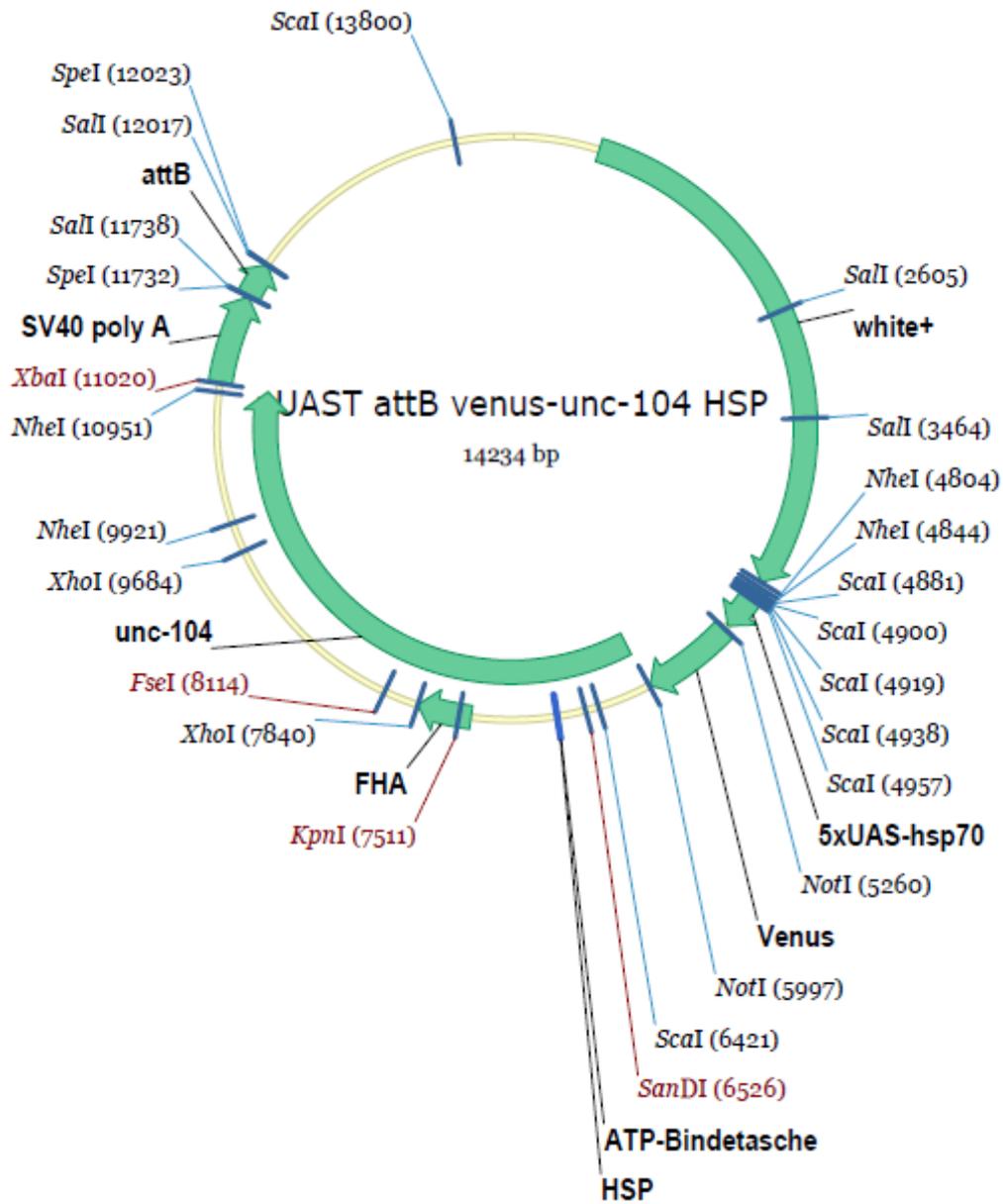


Abbildung 49 Vektorkarte von pUAST attB venus unc-104^{HSP}

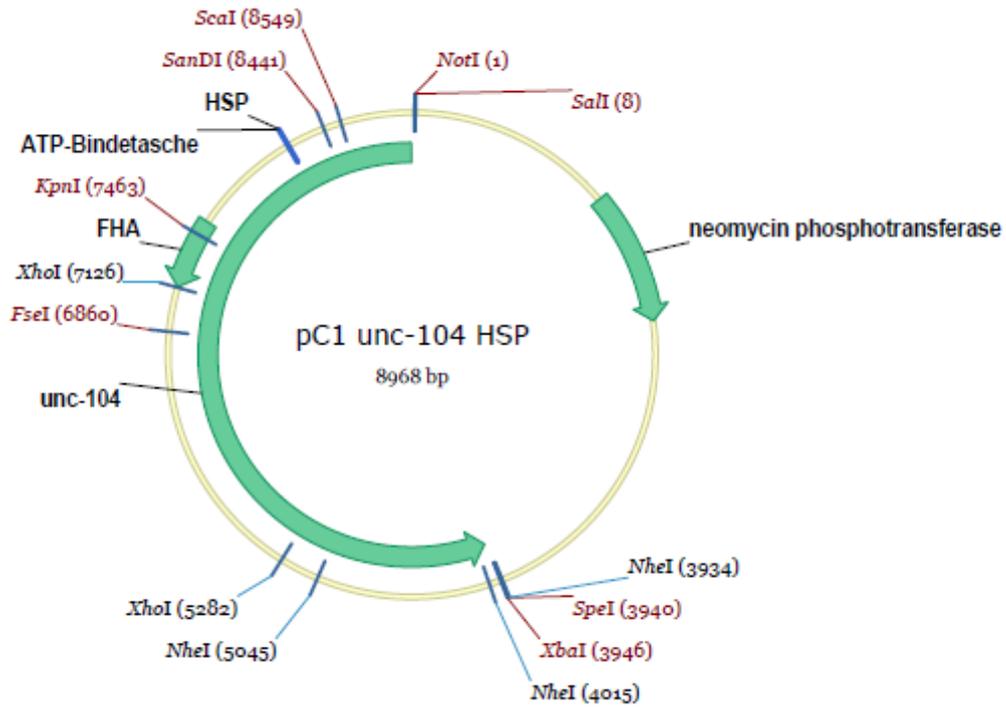


Abbildung 50 Vektorkarte von pC1 unc-104^{HSP}

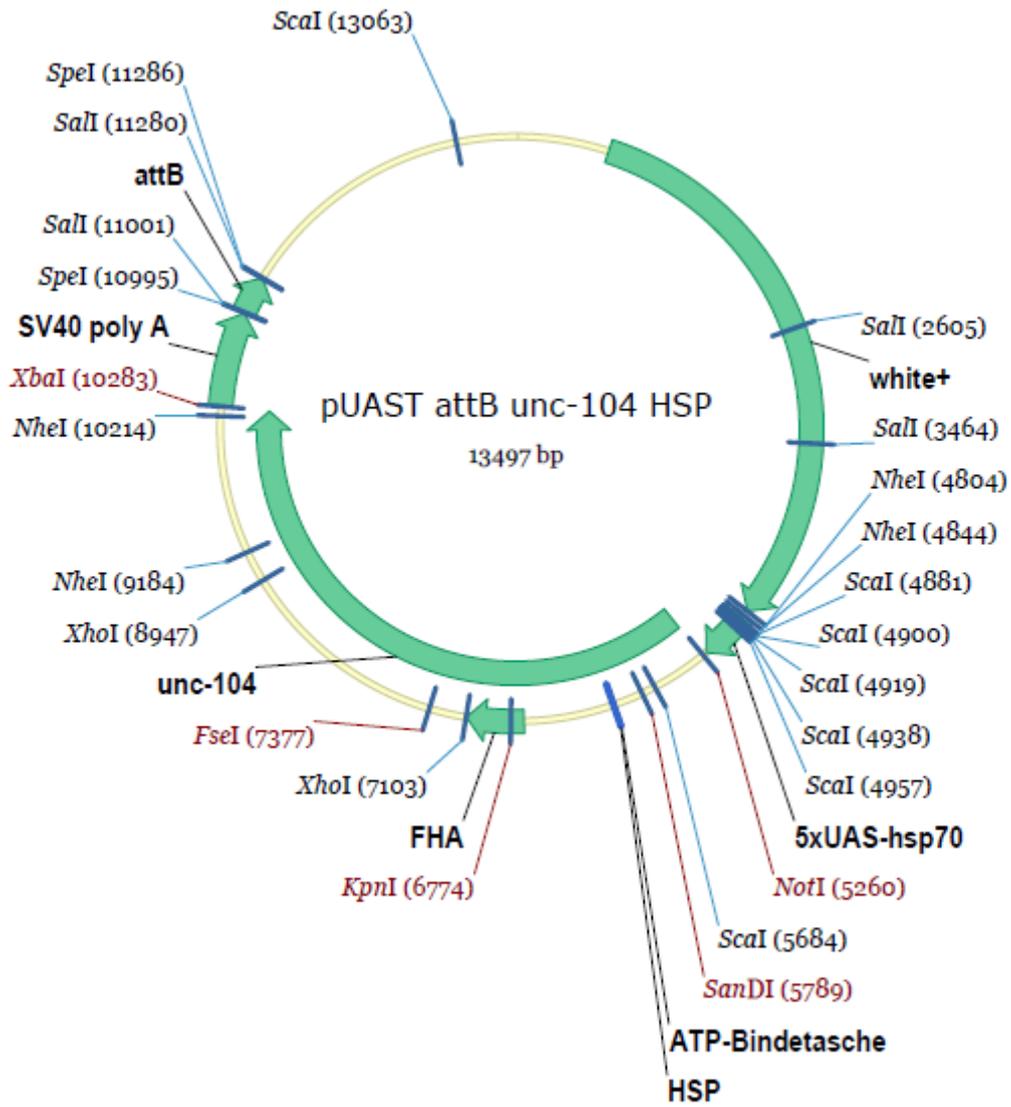


Abbildung 51 Vektorkarte von pUAST attB unc-104^{HSP}

Veröffentlichungen

Angenommen

In vivo imaging of intact *Drosophila* larvae at sub-cellular resolution. J Vis Exp. 2010 Sep 10;(43).

Yao Zhang, Petra Füger, Shabab B Hannan, **Jeannine V. Kern**, Bronwen Lasky, Tobias M. Rasse

Knockdown of transactive response DNA-binding protein (TDP-43) downregulates histone deacetylase 6. EMBO J. 2010 Jan 6;29(1):209-21. Epub 2009 Nov 12.

Fabienne C. Fiesel, Aaron Voigt, Stephanie S Weber, Chris Van den Haute, Andrea Waldenmaier, Karin Görner, Michael Walter, Marlene L. Anderson, **Jeannine V. Kern**, Tobias M. Rasse, Thorsten Schmidt, Wolfdieter Springer, Roland Kirchner, Michael Bonin, Manuela Neumann, Veerle Baekelandt, Marianna Alunni-Fabroni, Jörg B. Schulz, Philipp J. Kahle

Akzeptiert

Spastic Paraplegia Mutation N256S in the Neuronal Microtubule Motor KIF5A Disrupts Axonal Transport in a *Drosophila* HSP Model

Petra Füger*, Vrinda Sreekumar*, Rebecca Schüle*, **Jeannine V. Kern***, Doychin T. Stanchev, Carola D. Schneider, Kathrin N. Karle, Katharina J. Daub, Vera K. Siegert, Matthias Flötenmeyer, Heinz Schwarz, Ludger Schöls, Tobias M. Rasse

* contributed equally

In Vorbereitung

A new mutation in Unc-104 reveals novel roles in regulating dendrite and axon maturation

Jeannine V. Kern, Yao V. Zhang, Stella Kramer, Jay E. Brenman, Tobias M. Rasse

Unc-104 is important for synaptic development and homeostatic plasticity in *Drosophila*

Yao V. Zhang, Doychin T. Stanchev, **Jeannine V. Kern**, Baran Koc, Tobias Rasse

