

Struktur und Dynamik der neuromuskulären Synapse von  
*Drosophila melanogaster*: Untersuchungen am Dlg-  
Gerüstkomplex mittels hochauflösender Lichtmikroskopie und  
3D/4D-Bildanalysen

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg

von Diplom-Biologe Oliver Kobler  
geb. am 10. Oktober 1971 in Eltville am Rhein

Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. Eckart Gundelfinger

Gutachter: Herr Prof. Dr. phil. Johann Helmut Brandstätter

eingereicht am: 23.06.2020

verteidigt am: 24.11.2020

## Summary

Brain functions, in particular learning and memory, are based on neuronal networks, which, once established are subject to experience-dependent adjustments. Neuronal networks in turn consist of neurons, which are connected with each other via synapses. The latter display plasticity, thereby being challenged by the need for both structural stability and adaptiveness in equal measure. In this regard, membrane-associated guanylate kinases (MAGuKs) are likely to play a pivotal role, as they act as scaffold proteins that determine the molecular architecture of synapses. The functional characterisation of these evolutionarily well-conserved proteins will thus add to a better understanding of brain functions at the cellular and molecular levels and of pathology- and age-related dysfunctions thereof. The larval neuromuscular junction (NMJ) of *Drosophila* as a widely used, genetically amenable model system for glutamatergic synapses is particularly useful to study the function of the prototypic MAGuK Dlg (Discs large). However, the number of known synaptic interacting partners of Dlg is limited. This work focusses on the interaction of Dlg with the scaffold and adaptor proteins Metro (Ménage à trois) and *DLin-7*, which are also conserved between vertebrates and invertebrates. Based on mutants and transgenic lines, it is shown that the three proteins are disproportionately interdependent regarding their localisation to NMJs. Postsynaptically, they localise peripheral to rather than within glutamate receptor fields. It is further shown that the complex restricts the size of these receptor fields. To determine the size of the receptor fields in 3D based on light microscopy, a protocol was established, which allows for measuring a large number of receptor fields in a reliable way. Moreover, it is documented that in the absence of Dlg, Metro or *DLin-7*, synaptic boutons are enlarged, irregularly shaped and often display features of incomplete differentiation, yet with no impact on the overall number of synaptic contacts. An elaborated *live-imaging* analysis revealed that the dynamics of Dlg at the NMJ is regulated by its binding to Metro and *DLin-7*. The turnover rate of Dlg was found to be much lower than previously suggested and hence is likely comparable to the dynamics of glutamate receptors. Of note, it turned out that the expression level of fluorescently labelled Dlg is a critical analysis parameter. Finally, it is shown with unprecedented clarity that Dlg, Metro and *DLin-7* are also enriched at the presynaptic membrane, thereby localising close to but not within synaptic release sites. In light of inconsistent findings in the literature, this result supports the assumption for the Dlg complex to play a presynaptic role in addition to the well-documented postsynaptic function.

## Zusammenfassung

Hirnfunktionen, insbesondere Lernen und Gedächtnis, beruhen auf neuronalen Netzwerken, die nach ihrer Etablierung bedarfsgerechten Veränderungen unterliegen. Neuronale Netzwerke bestehen aus Neuronen, die über Synapsen untereinander verbunden sind. Letztere zeichnen sich durch eine Plastizität aus, die den Anforderungen an strukturelle Stabilität und funktionelle Anpassungsfähigkeit gleichermaßen genügen muss. Eine wichtige Rolle können hierbei sogenannte Membran-assoziierte Guanylatkinasen (MAGuKs) spielen, die als Gerüstproteine die molekulare Architektur von Synapsen maßgeblich mitbestimmen. Die funktionelle Charakterisierung dieser evolutionär gut konservierten Proteine trägt daher zu einem besseren Verständnis zellulärer Hirnfunktionen sowie deren krankheits- und altersbedingten Störungen bei. Die larvale neuromuskuläre Verbindung (NMJ) von *Drosophila*, als weithin genutztes, genetisch gut zugängliches Modellsystem für glutamaterge Synapsen, eignet sich gut dafür, da sich an ihr das prototypische MAGuK Dlg (Discs large) anreichert. Allerdings ist die Zahl der bekannten synaptischen Interaktionspartner von Dlg bisher gering. Im Fokus dieser Arbeit steht die Interaktion von Dlg mit den ebenfalls gut konservierten Gerüst- bzw. Adapterproteinen Metro (Ménage à trois) und *DLin-7*. Anhand von mutanten- und transgenen Tieren wird gezeigt, dass die drei Proteine in einem disproportionalen, wechselseitigen Abhängigkeitsverhältnis an der NMJ lokalisieren. Postsynaptisch lokalisiert der trimere Komplex peripher zu den Glutamaterezeptorfeldern. Es wird weiterhin gezeigt, dass der Komplex die Rezeptorfelder in ihrer Ausdehnung begrenzt. Dafür wurde in dieser Arbeit ein Protokoll ausgearbeitet, mit dem die Rezeptorfelder zuverlässig und in großer Anzahl lichtmikroskopisch in 3D vermessen wurden. Dokumentiert wird ferner, dass die Abwesenheit von Dlg, Metro oder *DLin-7* zu strukturellen Abnormitäten und Differenzierungsdefiziten der synaptischen Boutons führt ohne die Zahl synaptischer Kontakte zu beeinträchtigen. Eine differenzierte *live-Imaging*-Analyse ergab, dass die Dynamik von Dlg an der NMJ durch die Bindung von Metro und *DLin-7* reguliert wird. Ferner zeigte sich, dass der Umsatz des Dlg-Komplexes an der NMJ niedriger ausfällt als bislang angenommen und somit wohl der Dynamik von Glutamaterezeptoren vergleichbar ist. Das Expressionslevel des Fluoreszenzmarkierten Dlg erwies sich dabei als kritischer Analyseparameter. Schließlich wird in dieser Arbeit erstmals deutlich gezeigt, dass Dlg, aber auch Metro und *DLin-7*, präsynaptisch angereichert sind und dabei peripher zu den synaptischen Zonen der Neurotransmitterfreisetzung lokalisiert sind. Mit Blick auf teils widersprüchliche Befunde in der Literatur, unterstützt dieser Ergebnisteil die Annahme, dass der Dlg-Komplex neben seiner Funktion in der Postsynapse auch in der Präsynapse eine Rolle spielt.

# Inhaltsverzeichnis

Summary.....	I
Zusammenfassung.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung .....	8
1.1 Prolog .....	8
1.2 Strukturelle Merkmale von Dlg .....	8
1.3 Dlg an der NMJ .....	12
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Chemikalien und Biochemikalien .....	20
2.2 Antikörper .....	20
2.3 Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	21
2.4 Überexpression transgener <i>Drosophila</i> -Linien .....	21
2.5 In dieser Arbeit verwendete <i>Drosophila</i> -Genotypen bzw.-Stämme.....	21
2.6 Erzeugung rekombinanter <i>Drosophila</i> -Stämme.....	22
2.7 Erzeugung einer Defizienz für <i>metro</i> .....	22
2.8 Selektion von Genotypen .....	23
2.9 Präparation und Immunzytochemie von <i>Drosophila</i> -Larven .....	23
2.10 Präparation von <i>Drosophila</i> -Larven für FRAP-Experimente .....	24
2.11 Mikroskopische Techniken bzw. Geräte .....	25
2.12 Bildbearbeitungs- und Analysesoftware .....	25
2.13 Präsynaptische Lokalisation des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes .....	26
2.14 Durchführung der FRAP-Experimente.....	27
2.15 Auswertung der FRAP-Experimente .....	29
2.16 Bestimmung des Expressionslevels in den FRAP-Experimenten .....	31
2.17 Bestimmung der Boutonanzahlen .....	32
2.18 Bestimmung der Boutongrößen .....	32

2.19 Bestimmung der Anzahl Aktiver Zonen .....	33
2.20 Intensitätsmessungen .....	34
2.21 Größenbestimmung der GluR-Felder .....	35
3 Ergebnisse .....	38
3.1 Ménage à trois: Erweiterte Charakterisierung der wechselseitigen Abhängigkeit von Dlg, Metro und <i>DLin-7</i> an larvalen NMJs durch quantitative Immunfluoreszenzanalyse ....	38
3.2 Morphologische Charakterisierung der NMJs von Mutanten des DlgS97-Metro- <i>DLin-7</i> -Komplexes .....	42
3.2.1. NMJs von <i>metro</i> -Mutanten besitzen weniger, aber vergrößerte und unregelmäßig geformte Boutons .....	42
3.2.2. <i>dLin-7</i> -Mutanten phänokopieren <i>metro</i> -Mutanten bezüglich der NMJ-Morphologie .....	45
3.2.3. Das vermehrte Auftreten undifferenzierter Boutons ist ein weiteres Merkmal von Mutanten des DlgS97-Metro- <i>DLin-7</i> -Komplexes .....	47
3.3 Quantitative Analyse von Glutamatrezeptorfeldern von wildtypischen und mutanten NMJs anhand 3D-rekonstruierter Konfokalaufnahmen.....	49
3.3.1. Einrichtung eines Analyseverfahrens zur Bestimmung der Rezeptorfeld-größen an den NMJs .....	50
3.3.2 Der Verlust der Proteine des DlgS97-Metro- <i>DLin-7</i> -Komplexes führt zu vergrößerten GluR-Feldern .....	53
3.4 Dynamischer Austausch des Dlg-Komplexes im postsynaptischen NMJ-Kompartiment .....	57
3.5 Darstellung von Dlg, Metro und <i>DLin-7</i> in präsynaptischen Terminalien an NMJs .....	65
3.5.1 Metro und <i>DLin-7</i> sind an der Membran der Nervendigungen angereichert .....	66
3.5.2 Metro-Spleißvarianten zeigen keine auffallenden präsynaptischen Lokalisationsunterschiede zu MetroB .....	69
3.5.3 Motoneuronal exprimiertes EGFP-DlgS97 ist an der Membran der Nervendigungen angereichert .....	70
4 Diskussion .....	73
4.1 Die Rolle des Dlg-Gerüstkomplexes als Determinante von Glutamat-Rezeptorfeldern	73
4.2. Das dynamische Austauschverhalten des DlgS97-Metro- <i>DLin-7</i> -Komplexes an der NMJ .....	78

4.3 Überlegungen zur Durchführung der FRAP-Experimente.....	80
4.4 Die Existenz des präsynaptischen DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes.....	81
4.5 Fazit/Ausblick.....	83
Referenzen.....	85
Anhang.....	99
Ehrenerklärung.....	101

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschrieben
A(2-4)	Abdominalsegment (2 bis 4)
aa	Engl.: <i>amino acid</i>
AK	Antikörper
AZ	Aktive Zone
BGCR	engl.: <i>background control region</i>
BR	engl.: <i>bleached region</i>
BRP	Bruchpilot
CAZ	engl.: <i>Cytomatrix at the active zone</i>
CLSM	engl.: <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
CSP	engl.: <i>cystein string protein</i>
EGFP	engl.: <i>enhanced GFP</i>
EJC	engl.: <i>excitatory postsynaptic (junctional) current</i>
eEJC	evoziertes; engl: <i>evoked EJC</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FLP	Flipase
FRAP	engl.: <i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i>
FRT	engl.: <i>FLP recombinase target site</i>
GFP	engl.: <i>Green Fluorescence Protein</i>
GlüR	Glutamatrezeptor
GRF	Glutamat-Rezeptorfeld
GuK	Guanylatkinase
HL3	engl.: <i>hemolymph-like three</i>
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
imF	immobile Fraktion
L3	Larvenstadium 3
MAGuK	Membran-assoziierte Guanylatkinase
mEJC	engl.: <i>miniature EJC</i>
mF	mobile Fraktion
MIP	engl.: <i>Maximum Intensity Projektion</i>
NA	Numerische Apertur
NBCR	engl.: <i>not bleached control region</i>
NMJ	engl.: <i>Neuromuscular Junction</i>
NRF	Normalisierte relative Fluoreszenz
n <sub>23°C</sub> (RI)	Brechungsindex bei 23°C RT
PB	Phosphatpuffer (engl.: phosphate buffer)
PB-T	PB-Triton
PD-MAGuK	PSD-95/Dlg-ähnliche MAGuK
PDZ-(Domäne)	PSD-95/Dlg/ZO-1-(Domäne)
PFA	Paraformaldehyd
PM	Plasmamembran
POI	engl.: <i>Protein of Interest</i>
PSD	Postsynaptische Dichte
PSF	engl.: <i>Point Spread Function</i>
RF	Rezeptorfeld
RNAi	RNA-Interferenz
ROI	engl.: <i>Region of Interest</i>

<b>Abkürzung</b>	<b>Ausgeschrieben</b>
RT	Raumtemperatur
S/N	engl.: <i>Signal to Noise Ratio</i>
SSR	subsynaptisches Retikulum
STED	engl.: <i>Stimulated Emission Depletion</i>
SV	Synaptische Vesikel
SVI	<i>Scientific Volume Imaging</i> (Firma)
TEM	Transmissionelektronenmikroskopie
TM-(Proteine)	Transmembran-(Proteine)
$t_{1/2}$	Halbmaximaler Wert der mobile Fraktion
UE	Untereinheit
ü.N.	über Nacht
ZNS	Zentralnervensystem

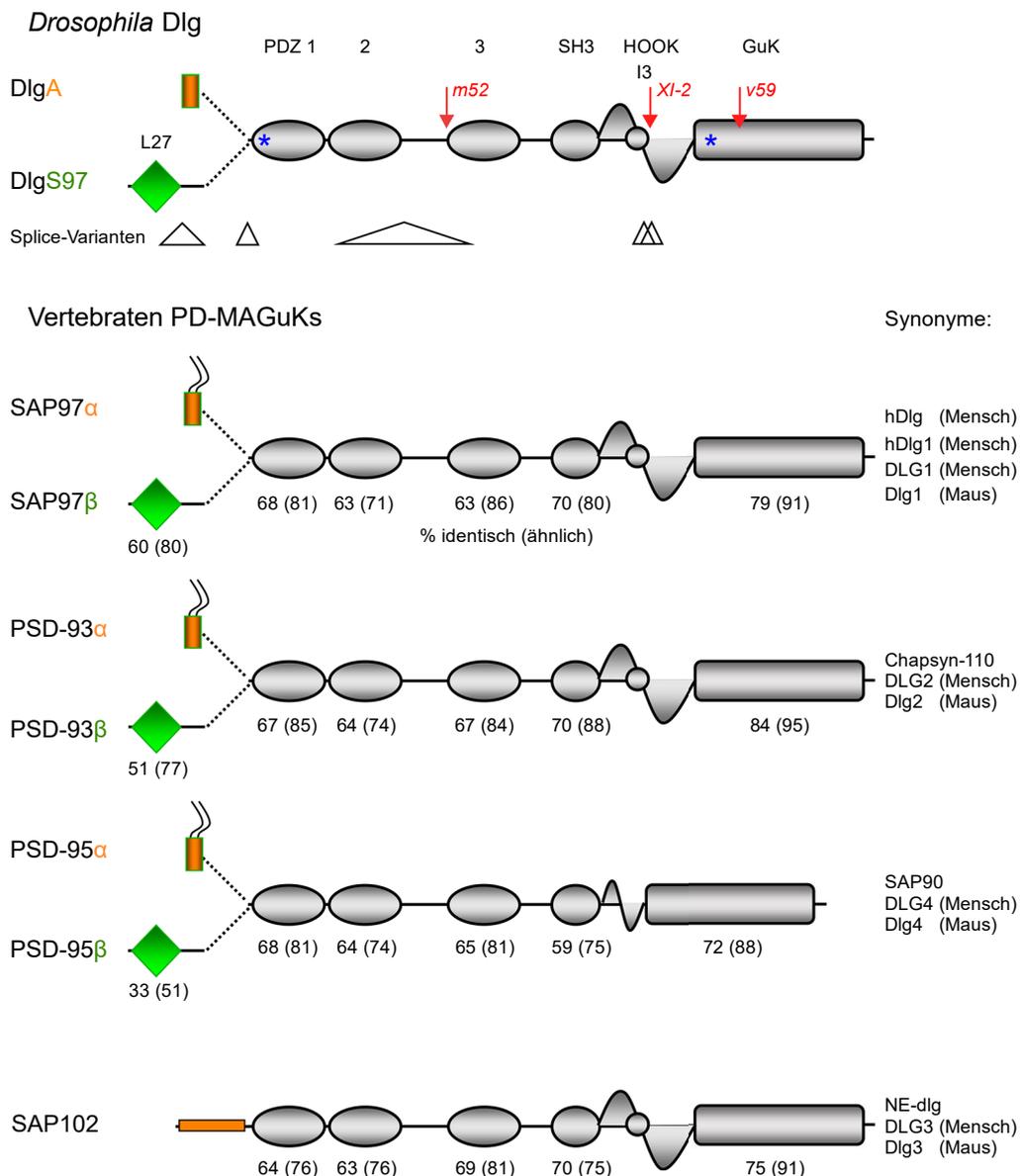
# 1 Einleitung

## 1.1 Prolog

1972 beschrieben Stewart und Kollegen (Stewart et al., 1972) die Identifizierung einer *Drosophila*-Mutante, die massive Tumoren in den Epithelien der larvalen Imaginalscheiben zeigt. Das betreffende, auf dem X-Chromosom gelegene, Tumorsuppressor-Gen wurde als *discs large (dlg1)* bezeichnet. Woods und Bryant veröffentlichten 1991 (Woods und Bryant, 1991) die Sequenz des zugehörigen Proteins (Dlg) und konnten zeigen, dass es an der Plasmamembran (PM), insbesondere an epithelialen *Septate Junctions*, lokalisiert, aber auch im Neuropil des larvalen ZNS exprimiert ist. Kurz darauf wurden die vier Säugerhomologen von Dlg als prominente Gerüstproteine zentralnervöser Synapsen beschrieben (Cho et al., 1992; Kistner et al., 1993; Muller et al., 1995; Brenman et al., 1996b; Brenman et al., 1996a; Muller et al., 1996), während für Dlg selbst eine Anreicherung an larvalen neuromuskulären Verbindungen (engl.: *neuromuscular junctions*, NMJs) dokumentiert wurde (Lahey et al., 1994). Neben den damals bereits bekannten Tatsachen, dass die larvalen NMJs als synaptisches System mit Glutamat den gleichen Transmitter wie das Gros exzitatorischer Synapsen im Säugerhirn nutzen (Jan und Jan, 1976a; Bate und Broadie, 1995) und auch funktionelle Plastizität aufweisen (Zhong und Wu, 1991), dürften auch die frühen Arbeiten zu Dlg an larvalen NMJs, deren Etablierung als weithin genutztes Modellsystem befördert haben (McDonald, 1975). Obwohl Dlg häufig als Referenzprotein für das postsynaptische Kompartiment der NMJ herangezogen wird, sind viele Fragen zu seiner Rolle an NMJs ganz oder teilweise ungeklärt. Die vorliegende Arbeit widmet sich strukturellen sowie dynamischen Eigenschaften von Dlg und assoziierten Gerüstproteinen und kann weitergefasst dem Thema "strukturelle synaptische Plastizität" zugeordnet werden. Hierunter fallen Mechanismen, die der bedarfsgerechten Neubildung, Stabilisierung, Umstrukturierung oder auch Eliminierung von Synapsen dienen (Goda und Davis, 2003; Van Vactor und Sigrist, 2017) und insofern auch für Lernen und Gedächtnis relevant sind.

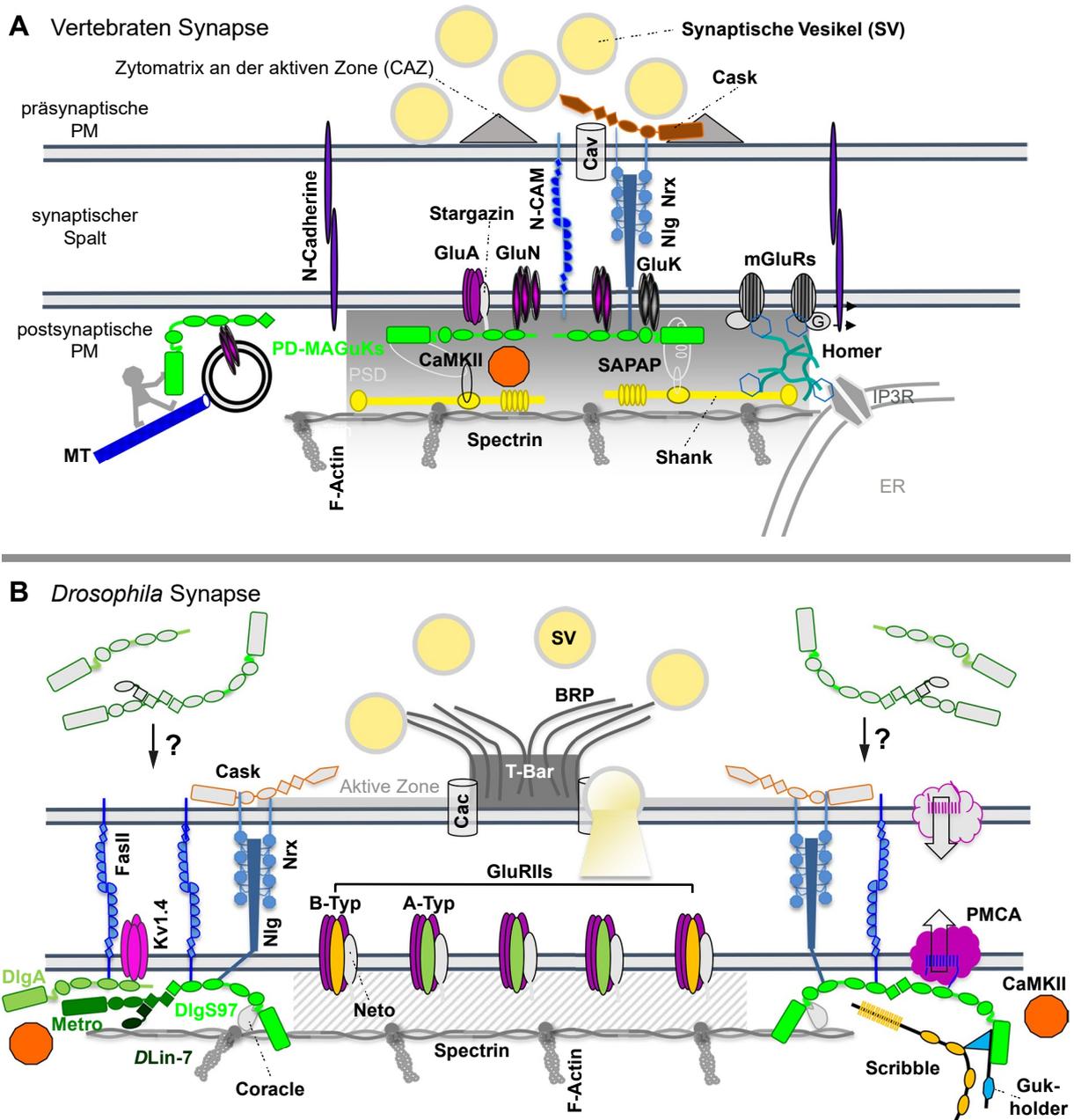
## 1.2 Strukturelle Merkmale von Dlg

Dlg ist prototypischer Vertreter der im gesamten Tierreich hoch konservierten Proteinfamilie der sogenannten PSD-95/Dlg-ähnlichen Membran-assoziierten Guanylatkinasen (PD-MAGuKs; Thomas et al., 2010). Dazu zählen die paralogen Säugerproteine, SAP97 (Dlg1), PSD-93 (Dlg2), SAP102 (Dlg3) und PSD-95/SAP90 (Dlg4). Kennzeichnend für diese Familie ist die Abfolge von drei Typ-I-PDZ-Domänen (benannt nach den Proteinen PSD-95, Dlg und



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Dlg, SAP97, PSD-93, PSD-95 und SAP102.** Die gezeigten MAGuKs besitzen drei Typ-I PDZ-, eine SH3 und eine GuK-Domäne. Kennzeichnend für die Varianten DlgS97, SAP97 $\beta$ , PSD-93 $\beta$  bzw. PSD-95 $\beta$  ist eine TypA L27-Domäne am N-Terminus, während SAP97 $\alpha$ , PSD-93 $\alpha$  und PSD-95 $\alpha$  eine N-terminale Palmitoylierungsstelle besitzen. DlgA fehlt hingegen das dafür notwendige Cystein-Tandem. Die sogenannte HOOK-Region beinhaltet Spleißvariationen, insbesondere das zwischen Dlg, SAP97, PSD-93 und SAP102 gut konservierte, 33aa lange I3-Segment, welches in PSD-95 fehlt. Blaue Sterne in Dlg markieren Phosphorylierungsstellen für CaMKII (PDZ1) sowie Par1/MARK (GuK), die in den Säuger-Homologen ebenfalls konserviert sind. Für die PD-MAGuKs sind, nach Domänen getrennt, der prozentuale Grad der Sequenzidentität bzw. der Sequenzähnlichkeit bei Berücksichtigung konservativer Aminosäureaustausche (Angabe in Klammern) im Vergleich zu Dlg angegeben. Synonyme für SAP97, PSD-93, PSD-95 und SAP102 sind rechts gelistet. Rote Pfeile markieren die Stellen, an denen Dlg aufgrund von Punktmutationen in den betreffenden *dlg*-Allelen trunkiert ist und die gleichzeitig zu verminderter Dlg-Expression führen; Dreiecke symbolisieren alternative Spleißinsertionen, die, wie alle sonstigen Proteinabschnitte, zueinander annähernd maßstabsgetreu gezeigt sind. Schema mit Modifikationen aus Thomas, Kobler, Gundelfinger (2010) übernommen.

ZO-1), einer *Src homology 3-* (SH3) und einer Guanylatkinase-ähnlichen Domäne (GuK; Cho et al., 1992; Ponting und Phillips, 1995; McGee und Bredt, 1999; McGee et al., 2001; Kim und Sheng, 2004). Daneben gibt es weitere Abschnitte, die zwischen einigen aber nicht allen Familienmitgliedern bzw. Spleißvarianten konserviert sind. Hierzu zählen insbesondere eine am N-Terminus gelegene L27-Domäne (benannt nach den Proteinen Lin-2/ CASK und Lin-7/ Veli/ Mals; s.u.) und die zwischen der SH3- und GuK-Domäne liegende HOOK-Region (Abb.1.1; Thomas et al., 2010; Zhu et al., 2016a). Sämtliche dieser Domänen können als Protein-Interaktionsdomänen fungieren, sodass über Dlg verschiedene Bindungspartner (Abb.1.2) in enge räumliche und funktionelle Beziehung gebracht werden können. Dieses Konzept liegt der Einordnung als Gerüstprotein zugrunde. An die PDZ-Domänen vom Typ-I binden präferenziell Proteine, deren C-Termini dem Aminosäure-Konsensusmotiv (E/ D) S/ T X V/ L/ I –COOH entsprechen. Hierzu zählen an der NMJ der Kaliumkanal Shaker ( $K_v1.4$ ) und das Adhäsionsmolekül Fasciclin II (FasII; Tejedor et al., 1997; Thomas et al., 1997; Zito et al., 1997; Abb.1.2B). In Säugern zählen neben verschiedenen Kaliumkanälen auch die NMDA-Typ Glutamatrezeptoren (GluN) und Stargazin (Chen et al., 2000; Vandenberghe et al., 2005), eine akzessorische Untereinheit der AMPA-Typ Glutamatrezeptoren (GluA) zu den prominenten PDZ-Bindungspartnern (Chen et al., 2015; Abb.1.2A). Daneben wurden auch synaptische Zelladhäsionsmoleküle und enzymatische Komponenten von *second messenger* Kaskaden, wie Syngap, als Bindungspartner identifiziert (Kim et al., 1998; Kim et al., 2005; Araki et al., 2015). SH3-Domänen sind eigentlich bekannt dafür, an Prolin-reiche Motive (PXXP) zu binden. Für Dlg und seine Verwandten wurde jedoch herausgearbeitet, dass die SH3-Domäne unabhängig von PXXP-Motiven vorrangig mit der GuK-Domäne intramolekular interagiert und auf diese Weise die Bindung an andere Proteine beeinflusst (Wu et al., 2000; Qian und Prehoda, 2006). Die HOOK-Region ist für die Anbindung an die Plasmamembran wichtig (Hough et al., 1997; Thomas et al., 2000). Sie beinhaltet ein gut konserviertes, 33 Aminosäurereste umfassendes Segment (I3), das in Analogie zu Dlg1 in Säugern über das Band 4.1-Protein Coracle eine Verbindung zum Spectrin-Zytoskelett herstellen könnte (Lue et al., 1994; Abb.1.2B). Als Bindungspartner für die enzymatisch inaktive GuK-Domäne wurden in *Drosophila* das Syntaxin-18 Homolog Gtaxin sowie Guk-holder, ein mutmaßlicher Regulator des Actin-Zytoskeletts, beschrieben (Mathew et al., 2002; Gorczyca et al., 2007; Caria et al., 2018). Ähnlich wie Guk-holder Dlg mit dem Gerüstprotein Scribble verknüpft (Abb.1.2B), werden die Dlg-Säugerhomologe durch sogenannte SAPAP/GKAP-Proteine an Gerüstproteine der Shank-Familie gekoppelt (Sheng und Kim, 2000; Boeckers et al., 2002; Kindler et al., 2004; Caria et al., 2018; Abb.1.2A). Auf diese Weise kann die GuK-Domäne zur Bildung höhergradiger Gerüstkomplexe beitragen. Mehrere Arbeiten deuten zudem auf eine wichtige Rolle der GuK-Domäne beim intrazellulären Transport von PD-MAGuKs entlang von Mikrotubuli, vermittelt über die Bindung an das Kinesin-Motorprotein KIF13-B/Gakin/KHC73,



**Abb.1.2:** Schematische Darstellung von PSD-95/Dlg-ähnlichen MAGuKs und anderen Proteinen an einer glutamatergen Säugersynapse (A) und an einer glutamatergen Kontaktstelle einer larvalen NMJ von *Drosophila* (B). Die Auswahl skizzierter Komponenten beschränkt sich weitgehend auf die in der Einleitung genannten Proteine mit Bezug zu PD-MAGuKs. (A) Die PD-MAGuKs lokalisieren prominent in der postsynaptischen Dichte (PSD, graue Verlaufsfläche) und interagieren dort direkt oder indirekt mit Glutamaterezeptoren (GluRs: GluA, GluN und GluK). Diese Interaktionen spielen auch beim vesikulären Transport der GluRs entlang von Mikrotubuli (MT) eine Rolle. Über verschiedene Proteine (z.B. SAPAPs) sind die PD-MAGuKs an Shank-Proteine als weitere Hauptkomponenten der PSD gekoppelt. Diese sind mit dem Spectrin-Zytoskelett und mit Homer-Oligomeren verbunden, wobei letztere wiederum metabotrope GluRs (mGluRs) mit Inositol-1,4,5-Phosphatrezeptoren (IP3R) im endoplasmatischen Retikulum (ER) vernetzen können. Zelladhäsionsmoleküle wie NCAM, Neurexin (Nrj) und Neuroligin (Nlg) sind hier ebenfalls im Kernbereich der Synapse angesiedelt, während N-Cadherin transsynaptische Adhäsion an der Peripherie vermittelt. (B) Dlg ist außerhalb der Rezeptorfelder lokalisiert und hat keinerlei physische Interaktion mit den GluRs (vgl. auch Abb.1.3 C-D). Die grau schraffierte Fläche steht für das molekular kaum charakterisierte intrazelluläre Kompartiment der Rezeptorfelder. Peripher dazu interagiert Dlg über Metro mit DLin-7. Über Gukholder kann zudem das Gerüstprotein Scribble rekrutiert werden. Als membranständige Bindungspartner

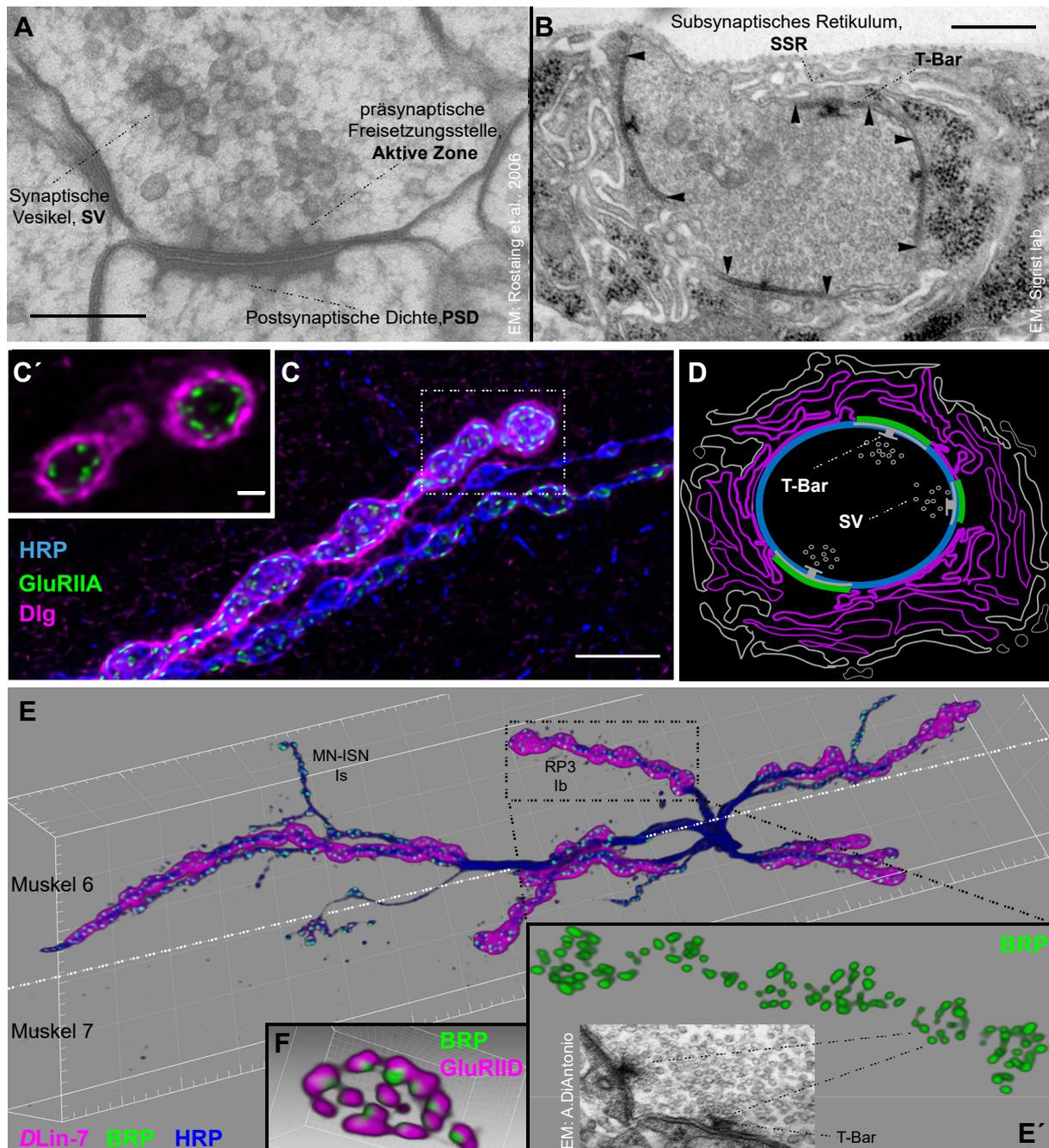
**Abb.1.2 (Fortsetzung):** sind das NCAM Homolog Fasciclin II (FasII), der Kaliumkanal Kv1.4/Shaker sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe PMCA gezeigt. Neben FasII sind auch NrX und Nlg perisynaptisch lokalisiert, die Interaktion zwischen Dlg und Nlg ist hypothetisch. Sowohl in (A) als auch in (B) wurde auf Darstellung präsynaptischer Proteine weitgehend verzichtet. Lediglich die spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle (Cav bzw. Cac), Zelladhäsionsmoleküle, CASK als NrX-bindendes MAGuK und BRP als Hauptkomponente der T-Bars sind gezeigt. Zudem ist als Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit die mögliche präsynaptische Anwesenheit des Dlg-Gerüstkomplexes angedeutet. (PM: Plasmamembran; Cac: Cacophony; CaMKII: Calcium/ Calmodulinkinase II; SV: synaptische Vesikel). Schemata abgewandelt übernommen mit freundlicher Genehmigung von U.Thomas.

hin (Yamada et al., 2007; Zhu et al., 2016b; Mills et al., 2019). Konsistent mit diesen Befunden, wird die postsynaptische NMJ-Lokalisierung von Dlg durch entfernen der GuK-Domäne stark beeinträchtigt (Thomas et al., 2000).

Bedingt durch die Nutzung alternativer Transkriptionsstartpunkte entstehen zwei Dlg-Varianten mit unterschiedlichen N-Termini, die als DlgA bzw. DlgS97 bezeichnet werden. Im Gegensatz zum kurzen DlgA spezifischen N-Terminus beinhaltet der N-Terminus von DlgS97 die oben erwähnte L27-Domäne (Mendoza et al., 2003). Dieser Dualismus tritt auch bei drei der vier Säugerhomologen auf, wo die entsprechenden Varianten als  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Form bezeichnet werden (Abb.1.1). DlgA fehlen jedoch im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Varianten der Säugerformen die Cysteinreste, die für eine der Membranverankerung dienenden Palmitoylierung notwendig sind (Woods und Bryant, 1991; Topinka und Bredt, 1998). L27-Domänen vom TypA (wie in Dlg oder *DLin-7*) sind potentiell befähigt, homotypische Interaktionen mit L27-Domänen vom TypB (wie in *Lin-2/CASK*) einzugehen (Doerks et al., 2000; Feng et al., 2004; Li et al., 2004; Petrosky et al., 2005). Die L27-Domäne von DlgS97 stellt insofern eine Besonderheit dar, als sie zusätzlich eine homophile Interaktion ermöglicht, die zu DlgS97-Dimeren oder sogar -Oligomeren führen kann (Marfatia et al., 2000; Ghosh et al., 2018).

### 1.3 Dlg an der NMJ

Als Zellkontakte sind chemische Synapsen durch ihre auffällige Asymmetrie gekennzeichnet. Auf der präsynaptischen Seite finden sich die hochspezialisierten Freisetzungstellen (Aktive Zonen, AZs) für die synaptischen Vesikel. Ihnen gegenüber, getrennt durch den synaptischen Spalt, liegen auf postsynaptischer Seite die Rezeptorfelder (RFs). Das ultrastrukturelle Erscheinungsbild variiert je nach Synapsentyp. So finden sich elektronendichte Strukturen in der AZ, die unterschiedlich ausgeprägt sein können (Zhai und Bellen, 2004), während beispielsweise exzitatorische Säugersynapsen eine postsynaptische Dichte (PSD) aufweisen (Cohen et al., 1977; Boeckers, 2006; Suzuki et al., 2018; Abb.1.2A u. 1.3A). Unter der Vielzahl



**Abb.1.3: Dlg ist im Subsynchronen Retikulum (SSR) der larvalen *Drosophila*-NMJ perisynaptisch lokalisiert. (A-B) EM-Aufnahmen einer exzitatorischen Synapse im Rattenhirn (A) (Rostaing et al., 2006) und (B) eines synaptischen Boutons an der NMJ einer *Drosophila* L3-Larve (mit freundlicher Genehmigung von S. Sigrist, FU-Berlin); Scale bars: 200nm in A, 500nm in B. Beide Synapsentypen enthalten zahlreiche synaptische Vesikel. In A sind elektronendichte Strukturen, die von der Aktiven Zone (AZ) ins Zytoplasma hineinreichen (CAZ: engl.: *Cytomatrix at the active zone*) sowie die postsynaptische Dichte (PSD), erkennbar. Die AZs an der larvalen NMJ (B) sind elektronendichte Abschnitte der Plasmamembran, in deren Zentrum sich i.d.R. die sogenannten T-Bars finden. Pfeilspitzen markieren deren Ausdehnung. Eine PSD im eigentlichen Wortsinne finden sich hier nicht. Gut erkennbar ist dagegen das SSR als konvoliertes Membrankompartiment (B). (C-D) Perisynaptische Lokalisierung von Dlg im SSR, gezeigt an einem NMJ-Abschnitt mit mehreren Boutons im Abdominalsegment 2 an den Muskeln 6 und 7 (A2 m6/7; MIP, engl.: *Maximum Intensity projection*). Deutlich ist an einem einzelnen optischen Schnitt (C'; Ausschnitt aus C) zu sehen, dass Dlg (magenta) außerhalb der Glutamatorezeptorfelder (GRFs, grün) lokalisiert. In Blau ist die Plasmamembran (PM) der**

**Abb.1.3 (Fortsetzung):** Nervendigung zu sehen. Die schematische Darstellung in (D) gibt diesen Sachverhalt wieder (SSR: weiß; Dlg-Lokalisierung im SSR: magenta; GRFs: grün; PM: blau). *Scale Bars* in C: 5µm; C': 1µm. **(E)** 3D-perspektivische Darstellung einer typischen NMJ (A2 m6/7). Das SSR ist hier durch Markierung von *DLin-7* (magenta) zu sehen. In Blau sind die Nervendigungen, die zwischen Muskel 6 und 7 emporsteigen und sie dorsolateral innervieren, zu sehen. Die gestrichelte weiße Linie markiert die Grenze zwischen beiden Muskeln. Die T-Bars der AZs sind durch Markierung des Proteins Bruchpilot (BRP) zu sehen und in E' vergrößert dargestellt. Durch virtuelle Zuordnung zu einer EM-Aufnahme (A. DiAntonio) wird symbolisiert, dass BRP Hauptbestandteil der T-Bars ist. **(F)** 3D-perspektivische Darstellung synaptischer Kontakte mit den sich gegenüberliegenden AZs (BRP; grün) und GRFs (magenta) in einem Bouton. Box in E: 10µm und in F: 500nm.

der Proteine der PSD nehmen die Dlg-Homologen eine prominente Rolle ein. Zwei unabhängige Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass ungefähr 200-300 Kopien von PSD-95 innerhalb einer PSD lokalisiert sind (Chen et al., 2005; Sugiyama et al., 2005; Sheng und Hoogenraad, 2007). Auch an der larvalen NMJ sind die beiden Dlg-Varianten DlgA und DlgS97 auf postsynaptischer Seite angereichert (Kobler, 2007; Mendoza-Topaz et al., 2008; Abb.1.2B). Allerdings finden sie sich dort nicht in einer elektronendichten PSD, sondern in einer hochgradig gefalteten Membranstruktur wieder, die als subsynaptisches Retikulum (SSR) bezeichnet wird und die sich im Laufe der larvalen Entwicklung als Teil der postsynaptischen Muskelfibrille um die präsynaptischen Boutons herum ausbildet (Budnik et al., 1990; Guan et al., 1996). Überraschenderweise findet sich Dlg jedoch nicht innerhalb der Glutamaterezeptorfelder (GRFs), die zu Hunderten entlang der NMJ den AZs gegenüberliegen und vom SSR umgeben sind (Abb.1.3C, D). Sofern man jede aus AZ und GRF bestehende Einheit als eine synaptische Verbindung auffasst, kann die Lokalisierung von Dlg im SSR als perisynaptisch bezeichnet werden (Abb.1.3D). Dies entspricht einer tatsächlichen Anreicherung, da SSR-ähnliche Membranstapel, die an der NMJ durch Überexpression des Proteins Syndapin zusätzlich induziert werden, weder durch endogenes noch durch überexprimiertes Dlg besiedelt werden (Kumar et al., 2009; U.Thomas, pers. Kommunikation). Eine komplette NMJ mit Markierung der Axonterminalen, des SSR und der synaptischen Kontakte ist exemplarisch in Abbildung 1.3E gezeigt.

Phänotypische Analysen anhand von stark hypomorphen *dlg*-Allelen (Abb.1.1) zeigten, dass Dlg selbst an der Ausbildung eines komplexen SSR beteiligt ist (Lahey et al., 1994; Budnik et al., 1996; Guan et al., 1996), möglicherweise indem es durch Rekrutierung von Gtaxin die lokale Fusionierung von Membrankompartimenten befördert (Gorczyca et al., 2007). Daneben wurde in mehreren Studien übereinstimmend gefunden, dass der Ausfall von Dlg mit z.T. deutlich vergrößerten AZs einhergeht (Karunanithi et al., 2002; Mendoza-Topaz et al., 2008). Deutlich vergrößerte AZs wurden auch in Mutanten für FasII, das verwandt ist mit dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM in Vertebraten, gefunden (Stewart et al., 1996). Es kann angenommen werden, dass die Ähnlichkeit der Phänotypen die molekulare Interaktion

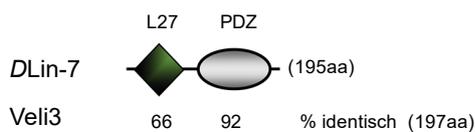
zwischen Dlg und FasII widerspiegelt, insbesondere, weil FasII an der NMJ von starken *dlg*-Mutanten drastisch reduziert ist (Thomas et al., 1997; Zito et al., 1997).

Weniger konsistent als die Ergebnisse zu den strukturellen Phänotypen zeigen sich die elektrophysiologischen Untersuchungen zur Rolle von Dlg an der NMJ. Für das stark hypomorphe Allel *dlg<sup>XI-2</sup>* (Abb.1.1) wurde eine deutliche Reduzierung der evozierten exzitatorischen Ströme (EJCs, engl.: *excitatory (postsynaptic) junctional currents*) beschrieben (Zhang et al., 2007; Mendoza-Topaz et al., 2008; Astorga et al., 2016). Hingegen zeigten zwei andere, ebenfalls starke Allele (*dlg<sup>m52</sup>* und *dlg<sup>v59</sup>*; Abb.1.1), den gegenteiligen Effekt (Budnik et al., 1996). Uneinheitlich sind auch die Befunde zu den Antworten auf die Freisetzung einzelner Vesikel (engl.: *miniature (m)EJCs*), die in den meisten Fällen als ein Maß für das Ansprechen individueller GRFs gelten. Erhöhte mEJC-Amplituden wurden für *dlg<sup>XI-2</sup>*-Mutanten beschrieben (Mendoza-Topaz et al., 2008; Astorga et al., 2016). Während Budnik et al. (1996) die mEJCs unverändert in *dlg<sup>m52</sup>* und *dlg<sup>v59</sup>* Allelen fanden, wurden von Karunanithi et al. (2002) erhöhte mEJCs an *dlg<sup>m52</sup>*-NMJs gemessen. Allerdings wurde dieser Befund der Vergrößerung synaptischer Vesikel zugeschrieben. Zwar könnten die Diskrepanzen in der Elektrophysiologie z.T. auf unterschiedlichen Randbedingungen und auf der Verwendung unterschiedlicher Allele beruhen (Abb.1.1), trotzdem bleibt festzuhalten, dass die betreffenden Allele allesamt die erwähnten strukturellen Phänotypen, insbesondere vergrößerte AZs und GRFs, teilen.

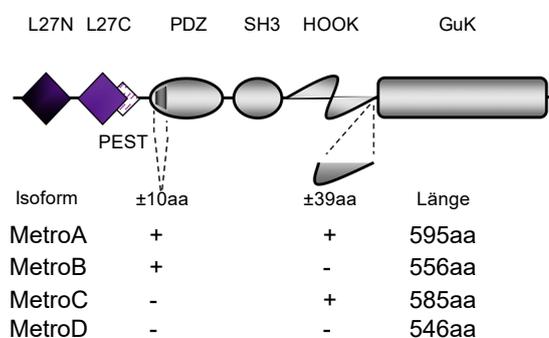
Zur Validierung der Spezifität von Phänotypen bezüglich einer zugrundeliegenden Mutation eignen sich generell Transgen-basierte Rettungsexperimente. In *Drosophila* ermöglicht das sogenannte Gal4/UAS-System zudem die Zelltyp-spezifische Expression eines Transgens, so dass z.B. in Bezug auf die NMJ der funktionelle Beitrag eines Proteins getrennt nach Motoneuron und Muskel untersucht werden kann (Brand und Perrimon, 1993). Für Dlg führte dieser Ansatz zu der interessanten Erkenntnis, dass das Protein gerade auch auf motoneuronaler Seite eine wichtige Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass die präsynaptische Expression von DlgA elektrophysiologische als auch strukturelle Abnormitäten wie die Lokalisierung von FasII ganz oder teilweise in den verschiedenen *dlg*-Mutanten rettet (Budnik et al., 1996; Thomas et al., 1997). Jedoch konnte bis dato eine präsynaptische Lokalisierung von Dlg an reifen NMJs nicht überzeugend dargestellt werden. Hinweise darauf ergaben sich allein durch Peroxidase-basierter Immuno-Elektronenmikroskopie (EM) mit allerdings unzureichender subzellulärer Auflösung (Lahey et al., 1994). Außerdem ließ sich Dlg in spätembryonalen Wachstumskegeln von Motoneuronen beim Erreichen der Muskeln immunzytochemisch nachweisen (Guan et al., 1996). Aus Untersuchungen an Säugersynapsen ergeben sich ebenfalls Hinweise auf eine präsynaptische Lokalisierung und Funktion von PD-MAGuKs, sowie von mit ihnen potentiell oder tatsächlich assoziierten Gerüstproteinen aus anderen MAGuK-Subfamilien. Zu letzteren gehören CASK/mLin-2 (engl.: *calcium/ calmodulin-dependent serine protein kinase*) sowie die Proteine MPP1-7 (engl.:

*membrane palmitoylated proteins*). Insbesondere für CASK wurde die Bindung an den zytoplasmatischen C-Terminus des präsynaptischen Zelladhensionsmoleküls Neurexin beschrieben (Hata et al., 1996; siehe auch Abb.1.2A). Ein anderes Mitglied, MPP4, interagiert mit PSD-95 $\beta$ , dem Adapterprotein Veli3/mLin-3 und mit der Plasmamembran-ständigen Ca<sup>2+</sup>-ATPase (engl.: *plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase*, PMCA) in einem Komplex an der präsynaptischen Membran von Photorezeptoren (Aartsen et al., 2006; Yang et al., 2007; Aartsen et al., 2009).

### A *Drosophila* Lin-7



### B *Drosophila* Metro



### C Vertebraten MPPs

	29(50)	40(62)	58(76)	59(73)	37(61)	(585aa)
MPP3	29(50)	40(62)	58(76)	59(73)	37(61)	(585aa)
MPP4	21(54)	40(56)	54(74)	52(68)	40(64)	(637aa)
MPP7	22(53)	34(81)	62(79)	59(82)	41(64)	(576aa)
	% identisch (ähnlich) zu MetroB					Länge

(C) Die zu Metro am nächsten verwandten Säugerhomologe MPP3, MPP4 und MPP7 mit prozentualen Angaben der Sequenzidentität bzw. Sequenzähnlichkeit (in Klammern) im Vergleich zu MetroB für die benannten Domänen. Die mutmaßlich destabilisierend wirkende PEST-Sequenz von Metro ist in MPP3 und 7 konserviert. Schema leicht verändert entnommen aus Bachmann et al. (2010).

Als MAGuKs besitzen CASK und die MPPs ein Grundgerüst aus einer PDZ-Domäne (Typ-II), einer SH3-Domäne und einer GuK-Domäne. Zusätzlich enthalten alle Mitglieder außer MPP1 vor der PDZ-Domäne ein Tandem aus TypB L27-Domänen (Gosens et al., 2007; Zhu et al., 2016a; Abb.1.4B, C).

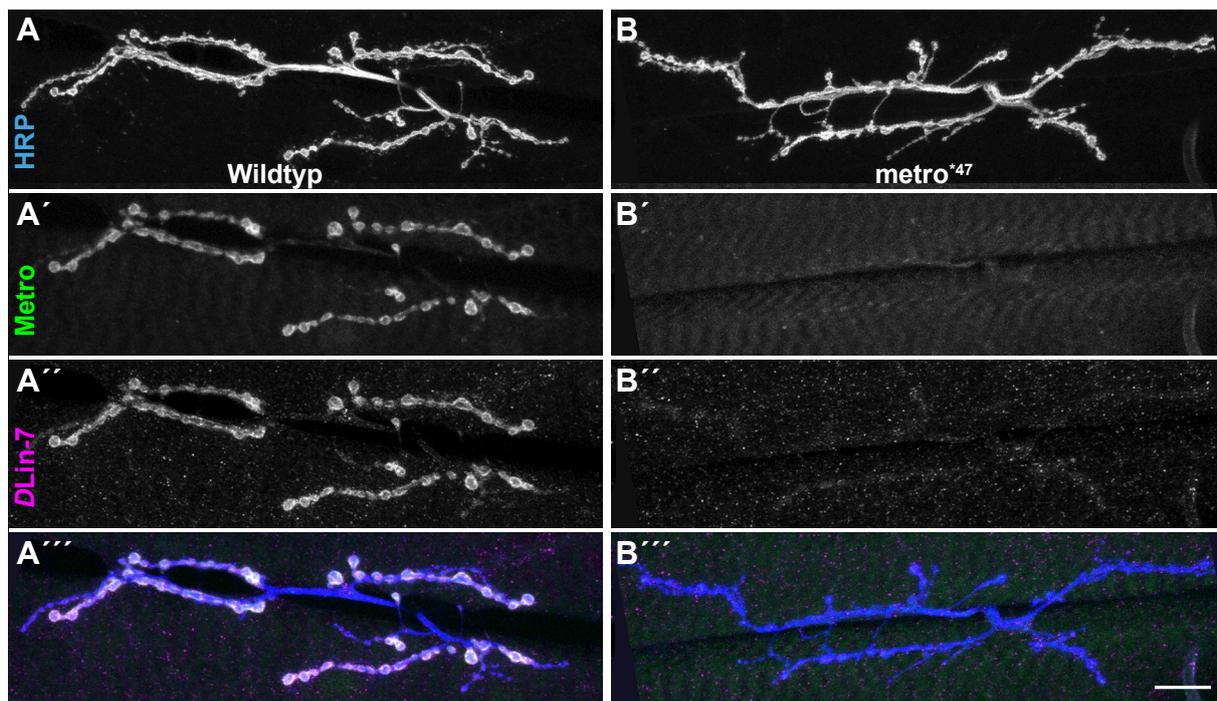
Die Bildung eines durch homotypische L27-Interaktionen vermittelten, trimeren Gerüstkomplexes aus SAP97/Dlg1, CASK und Veli wurde zuerst in Zusammenhang mit Untersuchungen an epithelialen Zellkontakten beschrieben (Lee et al., 2002). In dieser Arbeit wurde auch bereits eine *in vitro*-Interaktion zwischen *Drosophila* CASK (CamGuk/Caki) und dem N-Terminus von DlgS97 dargestellt. Tatsächlich wurde CASK auch an der NMJ gefunden

### Abb.1.4:

#### Schematische Darstellung der Domänenstruktur von DLin-7 und Metro.

(A) DLin-7 besitzt eine N-terminale TypA L27- und eine Typ-I PDZ-Domäne. Es werden zwei Spleißvarianten vorhergesagt (<http://flybase.org/reports/FBgn0039269>), mittels RT-PCR wurde jedoch von Bachmann et al. (2004) nur die hier gezeigte 195aa Variante nachgewiesen. Die prozentuale Identität zu Veli3, einem von drei Säugerhomologen, ist angegeben. (B) Metro besitzt wie alle MPP/p55-MAGuK (Ausnahme: MPP1) zwei TypB-L27- (L27N, L27C), eine Typ-II PDZ-, eine SH3-, und eine GuK-Domäne. Zwischen SH3- und GuK-Domäne befindet sich eine HOOK-Region. Es sind vier Spleißvarianten, MetroA bis D, vorhergesagt (<http://flybase.org/reports/FBgn0050021>), die durch alternatives Spleißen in der PDZ und HOOK Region, wie eingezeichnet und aufgelistet, entstehen können.

und gezeigt, dass sein Ausfall zu einer moderaten Verringerung der evozierten Antwort, möglicherweise aufgrund reduzierter Mengen an Glutamatrezeptoren (GluRs) führt. Übereinstimmend wurde ebenfalls eine Reduktion des Recyclings synaptischer Vesikel, also ein präsynaptischer Effekt beobachtet (Sun et al., 2009; Chen und Featherstone, 2011). Auch das *Drosophila*-Homolog von Veli, *DLin-7* (Abb.1.4A), findet sich angereichert im SSR an der NMJ (Abb.1.3E) und ist in *dlg*-Mutanten dort stark reduziert. Dieser Phänotyp wird durch *DlgS97*, aber nicht durch *DlgA* gerettet (Bachmann et al., 2004). Die Vermutung, dass *DLin-7* über *CASK* zu *DlgS97* rekrutiert wird, bestätigte sich jedoch nicht, da *DLin-7* in *cask*-Mutanten unverändert im SSR angereichert ist (Bachmann et al., 2004). Vielmehr erwies sich das Protein *Metro* als der *Drosophila*-Vertreter von MPP3, 4 und 7, als tatsächlicher Vermittler der Interaktion zwischen *DlgS97* und *DLin-7* (Bachmann et al., 2010; Abb.1.4B). Insbesondere ist in Nullmutanten für *Metro*, *DLin-7* an der NMJ nicht mehr detektierbar (Abb.1.5B). Ungeklärt blieb jedoch, ob und in welcher genauen molekularen Zusammensetzung ein solcher trimere Komplex auf präsynaptischer Seite existiert und funktionell bedeutsam ist.



**Abb.1.5: Metro ist für die Expression von *DLin-7* an NMJs essentiell. (A-B''')** Immunfluoreszenzmarkierungen von NMJs eines Kontrolltieres (*w1118*; A-A''') und einer *metro*-mutanten- (*metro*<sup>47</sup>/*metro*<sup>47</sup>) L3-Larve (B-B''') mittels Antikörpern (AKs) gegen HRP, Metro und *DLin-7*. Die anti-HRP Markierung zeigt die verzweigten Motornervendigungen (A, B). In A' und B' ist die NMJ-Lokalisierung von Metro in der Kontrolle und deren Abwesenheit in den *metro*-Mutanten dokumentiert. Die Markierung mittels anti-*DLin-7*-AK offenbart die Anreicherung des *DLin-7*-Proteins an der Kontroll-NMJ und seinen vollständigen Verlust an der NMJ der *metro*-Mutante (A'', B''). A'' und B'' zeigen die Überlagerung beider Markierungen. (A2 m6/7, MIP) Scale Bar: 20µm.

In der Interaktion bzw. Nicht-Interaktion mit Metro und *DLin-7* manifestiert sich ein klarer Unterschied zwischen *DlgS97* und *DlgA*. Zum einen könnten über die PDZ-Domäne von Metro

und DLin-7 zusätzliche Bindungspartner in den Komplex eingebunden werden. Zum anderen könnte sich das dynamische Verhalten von Dlg – und damit auch das seiner funktionellen Bindungspartner - durch die Einbindung in einen übergeordneten Gerüstkomplex ändern. Das könnte wiederum Auswirkungen auf die molekulare Plastizität der NMJs haben. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die L27-Domäne von SAP97/Dlg1 dessen Mobilität in dendritischen *Spines* von hippocampalen Neuronen begrenzt (Nakagawa et al., 2004). Für eine aktivitätsabhängige Regulation von Dlg an der NMJ spricht, dass die SSR-Lokalisierung von Dlg durch die Expression einer konstitutiv aktiven Form der CaMKII (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II*) im Muskel verringert werden kann (Koh et al., 1999). Für transgen exprimiertes DlgS97 wurde in unabhängigen Untersuchungen mittels FRAP (engl.: *Fluorescence Recovery after Photobleaching*) eine hohe Dynamik festgestellt. Konkret wurde eine *Recovery* von DlgS97 von über 50% innerhalb von 20-30min beobachtet (Rasse et al., 2005; Kobler, 2007; Zhang et al., 2007). Demgegenüber zeigen endogen exprimierte Untereinheiten von GluRs einen wesentlich langsameren *Turnover*, der eher im Bereich von mehreren Stunden liegt (Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008). Dieser Unterschied ist unerwartet, wenn man annimmt, dass die Neuentstehung und Veränderung von GluRs eng an die Dynamik von Dlg als begrenzendem Faktor gekoppelt ist.

Eine funktionelle Differenz zwischen DlgA und DlgS97 könnte auch in ihrem Einfluss auf die Größe und Subtyp-spezifische Zusammensetzung der GRFs bestehen. So wurde gefunden, dass die mit dem starken, beide Formen gleichermaßen betreffende Allel *dlg<sup>XI-2</sup>* einhergehende Erhöhung der mEJC-Amplituden durch den spezifischen Ausfall von DlgS97, nicht jedoch durch den Ausfall von DlgA rekapituliert wird (Mendoza-Topaz et al., 2008), obwohl beide Formen ansonsten abundant im SSR vorliegen. Die Erhöhung der mEJC-Amplituden deutet auch darauf hin, dass vermehrt Rezeptoren, die die Untereinheit (UE) GluRIIA enthalten, vorhanden sind, da der alternative Subtyp, der anstelle der UE IIA die UE IIB enthält, infolge rascher Desensibilisierung einen eher geringfügigen Beitrag zu den mEJCs leistet (Petersen et al., 1997; Thomas und Sigrist, 2012). Während Chen und Featherstone (2005) die Menge an GluRIIA als unverändert in *dlg<sup>XI-2</sup>* beschrieben, wurde von Mendoza-Topaz et al. (2008) eine spezifische Erhöhung von GluRIIA in einem DlgS97-spezifischen Allel gefunden. Wie genau Dlg, speziell DlgS97, die Größe von GRFs begrenzt ist nicht geklärt.

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Zentrum dieser Arbeit steht die Rolle von DlgS97 an der larvalen NMJ von *Drosophila melanogaster*. Zwar sind für Dlg eine Reihe von Phänotypen an der NMJ beschrieben worden, dabei beruhen die Ergebnisse allerdings auf der Verwendung hypomorpher Allele, die sowohl

DlgA als auch DlgS97 betreffen. Im Vergleich zu den PD-MAGuKs in Säugern, für die zahlreiche synaptische Bindungspartner identifiziert sind, ist die Zahl der verifizierten Bindungspartner für Dlg an der NMJ sehr begrenzt. Mit Metro war bei Beginn der Arbeit ein neuer, für DlgS97 spezifischer Bindungspartner verlässlich identifiziert, seine Funktion allerdings noch weitgehend uncharakterisiert. Konzeptionell ergab sich daraus, dass DlgS97-spezifische Funktionen von Dlg ganz oder teilweise durch Untersuchungen an Metro und *DLin-7* bestimmt werden können. Zu diesem Zweck waren durch André Bachmann Nullallele für Metro und *DLin-7*, sowie von Ulrich Thomas Varianten-spezifische Nullmutanten für DlgA und DlgS97 erzeugt worden. Auf dieser Basis sollten zunächst die Abhängigkeitsverhältnisse zwischen DlgS97, Metro und *DLin-7* quantitativ und auf Wechselseitigkeit überprüft werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit die Interaktion mit Metro und *DLin-7* die strukturellen Effekte von DlgS97 auf die NMJ, insbesondere auch auf die Größe der GRFs, begründet. Dabei sollte angesichts widersprüchlicher Befunde vorausgegangener Arbeiten besonderes Augenmerk auf die Etablierung und Umsetzung von Kriterien für die Bestimmung von GRF-Größen gelegt werden. Wie erwähnt und wie durch Befunde an Säuger PD-MAGuKs gestützt, könnte sich der Unterschied zwischen DlgS97 und DlgA auch in unterschiedlicher Dynamik der Varianten niederschlagen. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten vergleichende Untersuchungen mittels FRAP für die Dlg-Varianten als auch für die Bindungspartner Metro und *DLin-7* unter Berücksichtigung von Expressionsstärken durchgeführt werden. Schließlich sollte in dieser Arbeit auch der lang vermuteten jedoch unbewiesenen präsynaptischen Lokalisierung von Dlg, ggf. auch von Metro und *DLin-7*, durch Kombination genetischer und hoch- bzw. höchstauflösender Fluoreszenzmikroskopie nachgegangen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Biochemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in der Qualitätsstufe pro Analysis (p.A.) verwendet und bezogen von: Boehringer/Roche, Clontech, Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Roth und Sigma-Aldrich (Merck). Abweichende Chemikalien werden bei den jeweiligen Methodenbeschreibungen angegeben. Sämtliche Lösungen wurden mit deionisiertem und autoklavierten Wasser (H<sub>2</sub>O) (Seralpur ProCN®, Seral), (Varioklav®, H+P Labortechnik) hergestellt.

### 2.2 Antikörper

Tabelle 2.1: Zur Immunzytochemie verwendete Erst-Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Lieferant
anti-Dlg <sub>PDZ</sub> (4F3)*	Maus	1:500 (1:300)	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-Dlg <sub>S97N</sub>	Kaninchen	1:1000	Mendoza et al., 2003
anti-DLin-7	Kaninchen	1:1000	Bachmann et al., 2004
anti-Veli 1/2/3 (DLin-7)	Kaninchen	1:500 (1:300)	Synaptic Systems
anti-Metro	Ratte	1:150	Bachmann et al., 2010
anti-BRP (NC82)	Maus	1:100 (1:50)	Wagh et al., 2006
anti-GluRIID	Kaninchen	1:500 (1:300)	Qin et al., 2005
anti-GluRIIA (8B4)	Maus	1:10	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-PMCA	Kaninchen	1:1000	U. Thomas, unpubliziert
anti-DCsp (3) (1G12)	Maus	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank
anti-HRP-Cy3**	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories
anti-HRP-Cy5**	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories
anti-HRP-Alexa Fluor®594**	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories
anti-EGFP	Kaninchen	1:1000	Thermo Fischer Scientific (A-6455)
anti-EGFP (3E6)	Maus	1:200	Thermo Fischer Scientific (A-11120)
anti-GFP-FluoTag-X4 Atto 488-verknüpft	Kamelid	1:200	Synaptic Systems GmbH (NanoTec Biotechnologies GmbH)

\* Der Dlg<sub>PDZ</sub>-Antikörper erkennt beide Dlg-Isoformen, DlgA und DlgS97.

\*\* Der HRP- (*horseradish peroxidase*) Antikörper erkennt in Insekten zuverlässig ein Oberflächen-Glykoepitop in der PM von Neuronalen Zellen und wird daher hier zur Sichtbarmachung der motoneuronalen Nervendigung benutzt.

Tabelle 2.2: Zur Immunzytochemie verwendete Zweit-Antikörper

Antikörper	Konjugat	Spezies	Verdünnung	Hersteller/Lieferant
anti-Maus	Alexa Fluor®488	Ziege	1:200	Invitrogen
anti-Kaninchen	Alexa Fluor®488	Ziege	1:200	Invitrogen
anti-Maus	Alexa Fluor®568	Ziege	1:200	Invitrogen
anti-Kaninchen	Alexa Fluor®568	Ziege	1:200	Invitrogen
anti-Kaninchen	Alexa Fluor®647	Ziege	1:200	Invitrogen
anti-Kaninchen	Atto 647N	Ziege	1:200	Sigma-Aldrich (Atto-TEC GmbH)
anti-Maus	Cy3	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch Lab.
anti-Kaninchen	Cy3	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch Lab
anti-Kaninchen	Cy3	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch Lab
anti-Ratte	Cy3	Ziege	1:200	Jackson ImmunoResearch Lab

### 2.3 Haltung von *Drosophila melanogaster*

Alle *Drosophila*-Stämme wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 18°C in Röhren, die mit einem luftdurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen waren, mit Nährboden (Tabelle 2.3) gehalten. Lediglich zu Analysezwecken der Larven wurden die Kreuzungen bei einer Temperatur von 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden an *Drosophila*-Larven des 3. Larvenstadiums (L3) durchgeführt.

Tabelle 2.3: *Drosophila*-Nährboden

Nährboden	25g Agar-Agar, 120g Rosinen, 180g Bäckerhefe, 150g Grieß, 80g Rübensirup, 20ml Nipagin, ad 3 Liter H <sub>2</sub> O
-----------	---

### 2.4 Überexpression transgener *Drosophila*-Linien

Das Gal4-UAS-System (Brand und Perrimon, 1993) erlaubt es, je nach Aktivatorstamm (Träger des Transkriptionsaktivators Gal-4), das in das Genom inserierte UAS-Konstrukt des Effektorstamms gewebespezifisch und entwicklungspezifisch zu exprimieren. Dazu wurden die Stämme (Tabelle 2.4), Aktivator und Effektor, gekreuzt. Das Effektor-Gen wird in der darauffolgenden Nachkommenschaft, dem Expressionsmuster des Aktivator-Gens folgend, exprimiert.

### 2.5 In dieser Arbeit verwendete *Drosophila*-Genotypen bzw.-Stämme

Tabelle 2.4: verwendete *Drosophila*-Stämme

Stamm	Chr.	Herkunft
<i>dLin-7<sup>#66</sup></i>	3	Bachmann et al., 2008
<i>dLin-7<sup>Df</sup> (Df(3R)dLin-7<sup>20l</sup>)</i>	3	Bachmann et al., 2010
<i>UAS-Flag-dLin-7</i>	2	Bachmann et al., 2004
<i>UAS-dLin-7-EGFP</i>	3	A. Bachmann (nicht publiziert)
<i>metro<sup>*47</sup></i>	2	Bachmann et al., 2010
<i>metro<sup>Df</sup> (Df(2R)E3363)</i>	2	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center [520]

Tabelle 2.4 verwendete *Drosophila*-Stämme (Fortsetzung)

Stamm	Chr.	Herkunft
<i>metro</i> <sup>miniDf</sup>	2	Diese Arbeit, Kapitel 2.7
<i>metro</i> <sup>SH0636</sup>	2	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center [29483]
<i>UAS-metro</i> <sup>RNAi</sup>	2	Bachmann et al., 2010
<i>UAS-metro</i> <sup>RNAi</sup>	3	Bachmann et al., 2010
<i>UAS-metroA</i>	3	U. Thomas (nicht publiziert)
<i>UAS-metroB</i>	1	Bachmann et al., 2010
<i>UAS-metroB-EGFP</i>	3	U. Thomas (nicht publiziert)
<i>UAS-metroC</i>	3	U. Thomas (nicht publiziert)
<i>dlg</i> <sup>S97-flpV</sup>	1	Bachmann et al., 2010
<i>dlg</i> <sup>A-51.1/FM7<sup>GFP</sup></sup>	1	Bachmann et al., 2010
<i>UAS-EGFP-dlgS97</i>	2	Bachmann et al., 2004
<i>UAS-EGFP-dlgA (ES50)</i>	2	Koh et al., 1999
<i>UAS-mCherry-dlgS97</i>	3	Kobler, 2007
<i>dlg</i> <sup>YC0005LE</sup>	1	Buszczak et al., 2007 [CG1725]
<i>UAS-GFP</i> <sup>RNAi</sup>	3	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center [9330]
<i>BG487-Gal4</i>	2	Budnik et al., 1996
<i>C57-Gal4</i>	3	Budnik et al., 1996
<i>OK6-Gal4</i>	2	Aberle et al., 2002
<i>OK371-Gal4</i>	2	Mahr und Aberle, 2006
<i>D42-Gal4</i>	3	Sanyal, 2009
<i>tubP-Gal4</i>	3	Lee und Luo, 1999
<i>Canton-S (CS, Wildtyp)</i>		Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center [64349]
<i>FM7</i> <sup>act-GFP</sup>	1	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>w;;TM3/TM6</i>	3	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>w;Tf/CyO</i>	2	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>CyO</i> <sup>act-GFP</sup>	2	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>w;B11/CyO; TM2/TM6</i>	2 u. 3	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center
<i>w1118 (Kontrolle)</i>		Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center

## 2.6 Erzeugung rekombinanter *Drosophila*-Stämme

Rekombinante *Drosophila*-Genotypen wurden nach Standardverfahren der *Drosophila*-Genetik erzeugt (Roote und Prokop, 2013).

## 2.7 Erzeugung einer Defizienz für *metro*

Für die genetische Charakterisierung von *metro*-Mutanten standen zu Beginn der Arbeit neben dem Nullallel *metro*<sup>\*47</sup> keine weiteren, unabhängig erzeugten Nullallele zur Verfügung. Um heteroallelische *knockout*-Situationen für *metro* zu generieren, bot es sich an, Defizienzen zu benutzen. Alle verfügbaren Defizienzen wie z.B. die hier auch verwendete *Df(2R)E3363* umfassen allerdings einen chromosomalen Bereich, der sich über mehrere 100kbp erstreckt. Um die Möglichkeit von Haploinsuffizienzen zu reduzieren wurde daher eine kleinere Defizienz von ca. 40kbp durch sogenannte transchromosomale FRT-vermittelte Rekombination erzeugt (Parks et al., 2004). Konkret wurden hierfür die FRT-Insertionslinien P{XP}*shn*<sup>d0506</sup> und PBac{WH}f04570 benutzt, welche in Nachbargenen links und rechts von *metro* residieren. In

Gegenwart einer unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors exprimierbaren Flippase (als Transgen auf dem X-Chromosom kodiert) wurden Fliegen mit der transheterozygoten Kombination beider Insertionslinien in frühlarvalen Stadien täglich für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die Rekombination zu induzieren, bei der der Abschnitt zwischen den beiden FRT-Elementen deletiert wird. Dieser enthält u.a. die als Augenfarbenmarker eingesetzten *mini-white*-Gene, so dass die Kandidaten für die gewünschte Deletion anhand ihrer Weißäugigkeit identifiziert werden konnten. Zur Überprüfung wurden *single fly*-PCR durchgeführt mit Primern, die in den verbliebenen nicht-deletierten Bereichen der Ursprunginsertionen ansetzen. Die erzeugte Defizienz wurde als *metro<sup>miniDf</sup>* im Verlauf dieser Arbeit verwendet.

## 2.8 Selektion von Genotypen

Die zu den Experimenten verwendeten larvalen Nachkommen aus den jeweiligen Kreuzungen, wurden, wenn nicht homozygot eingesetzt, anhand von larval erkennbaren dominanten Markern von *Balancer*-Chromosomen (z.B. *TM6*, *CyO<sup>act-GFP</sup>*, *FM7<sup>act-GFP</sup>*) identifiziert, um so z.B. heterozygote- von homozygoten Mutanten zu unterscheiden.

## 2.9 Präparation und Immunzytochemie von *Drosophila*-Larven

Tabelle 2.5: verwendete Lösungen

Calcium freie Saline (Jan und Jan, 1976b)	128mM NaCl, 2mM KCl, 4mM MgCl <sub>2</sub> , 35,5mM Sucrose, 5mM HEPES, 1mM EGTA; pH=7,2
PB	0,073M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,027M Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,2
PB-T	0,2 Vol.% Triton X-100 in PB
Fixierlösung	4 Vol.% Paraformaldehyd in PBS
Einbettmedium	Vectashield® H-1000 (Vector Laboratories, USA)
Objektträger	76x26mm (Roth)
Deckgläser	#1.5 18x18 bzw. 20x20mm (Roth), HP (±5µm) #1.5 18x18mm (Marienfeld)
Nagellack	Long Lasting Nail Color (Rival de Loop, Berlin)
Schere	Vannas Spring Scissors #15002-08, Fine Science Tools (Heidelberg)

Die Präparation der L3-*Drosophila*-Larven erfolgte nach der Magnet-Kammer-Methode (Budnik et al., 2006). Mit Hilfe von Magnetclips, einer Pinzette und einer Schere wurden die Larven unter Verwendung eines Leica Stereomikroskop M80 oder MZ16 (Tabelle 2.7) mit Durchlichtbasis entlang der dorsalen Mittellinie auf- und an den Enden eingeschnitten. Hierbei wurde eine 4°C kalte Ca<sup>2+</sup>-freie Saline verwendet, die mehrmals ausgetauscht wurde. Die so aufgeklappte, nach Entfernung der Eingeweide, gewonnene Körperwandmuskulatur, bestehend aus Kutikula, Epidermis, Muskulatur und Nervensystem, wurde mit einer 4°C kalten 4-prozentigen Paraformaldehydlösung (PFA) 20 Minuten lang fixiert und anschließend dreimal für 20 Minuten mit PB-T bei RT gewaschen. Je nach Zielsetzung (z.B. Intensitätsmessungen,

Kapitel 2.20), wurde vor Inkubation mit den Erstantikörpern (Tabelle 2.1) in PB-T, das Zentralnervensystem (ZNS) entfernt. Die Inkubation erfolgte wahlweise für 2 Stunden bei RT oder bei 4°C ü.N. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit PB-T wurden die Präparate mit Fluoreszenzmolekülen markierten Zweitantikörpern (Tabelle 2.2) in PB-T für eine Stunde bei RT inkubiert. Zuletzt wurden die Körperwandpräparate 3 mal 10 Minuten mit PB-T bei RT gewaschen, auf einen Objektträger überführt und mittels *Vectashield* eingebettet. Die fertigen Präparate wurden durch Verkleben des Deckglases mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Die so gewonnenen Präparate wurden, wenn nicht sofort zur Immunfluoreszenz gebraucht, bei -20°C eingelagert. Für die STED-Mikroskopie ergaben sich keine Änderungen der Präparation, bis auf, dass das ZNS zwingend entfernt wurde, sodass, das Präparat möglichst dicht am Deckglas zu liegen kam. Auch wurden hierfür sogenannte *High-Präzisionsdeckgläser* der Firma Marienfeld verwendet, die eine garantierte Glasdicke von 170±5µm aufwiesen.

## 2.10 Präparation von *Drosophila*-Larven für FRAP-Experimente

Tabelle 2.6: verwendete Lösungen

HL-3 Saline (Stewart et al., 1994)	70mM NaCl, 5mM KCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> , 10mM NaHCO <sub>3</sub> , 115mM, Sucrose, 5mM Trehalose, 5mM HEPES ad NaOH bis pH=7,2
---------------------------------------	--

Durch die Verwendung eines aufrechten Leica Konfokalsystems SP5 und eines 20x1.0NA Wasserobjektivs, welches einen Arbeitsabstand von 2mm besitzt, konnte die Präparation der Larven für die Lebendbeobachtung analog zur Präparation der fixierten L3-Larven in der Magnetkammer (Kapitel 2.9) durchgeführt werden. Dabei war zu berücksichtigen, dass die zur Befestigung der Körperwandmuskulatur benötigten Magnetklips (Budnik et al., 2006) das Fokussieren des Objektivs nicht räumlich beeinflussten. Unterschiede ergaben sich in der Verwendung der Lösung. Um die Präparate über die Zeit der Präparation physiologisch aktiv zu halten, wurden diese bei RT mit einer mit 0,1mM CaCl<sub>2</sub>-versetzten HL3-Lösung (engl.: *hemolymph like*) präpariert. Durch die Verwendung der HL3-Lösung mit hohem Magnesiumgehalt (20mM) wurde verhindert, dass die Muskeln während der Präparation kontrahieren. Wichtig während der Präparation war es, die Larven nicht zu überstrecken, die Nerv-Muskelverbindungen nicht zu beschädigen und die Tracheen weitestgehend zu entfernen. Weiterhin war darauf zu achten, dass das ZNS nicht die aufzunehmenden Muskeln 6 und 7 in den vorderen Abdominalsegmenten überdeckte.

## 2.11 Mikroskopische Techniken bzw. Geräte

Tabelle 2.7: In dieser Arbeit verwendete Mikroskope, sowie deren Anwendung

Mikroskop	Typ und Anwendung
Zeiss Imager.A2	Epifluoreszenzmikroskop zur Vorbeobachtung der Immunfluoreszenz
Wild Leica M3Z	Lichtmikroskop zu den Fliegenarbeiten
Leica M 80 mit Durchlichtbasis und 1,0 Plan Objektiv	Licht-Stereomikroskop zur Präparation der L3- <i>Drosophila</i> -Larven
Leica MZ 16 mit Durchlichtbasis und 1,0 Plan Objektiv	Licht-Stereomikroskop zur Präparation der L3- <i>Drosophila</i> -Larven
Leica MZ 10F	Fluoreszenz-Stereomikroskop zur Larvenselektion anhand der GFP- und RFP-Fluoreszenz

Die in Tabelle 2.7 aufgelisteten Mikroskope dienen zur täglichen Fliegenarbeit, inkl. den Kreuzungen, zur Präparation der Larven, zur Selektion der Genotypen und zur Vorbetrachtung der fertiggestellten mikroskopischen Präparate.

Zur Analyse wurden in dieser Arbeit drei Generationen von konfokalen Laser-Abtast-Mikroskopen (CLSM, engl.: *Confocal Laser Scanning Microscope*) der Firma Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland) verwendet. Zum einen ein TCS SP2 AOBS, ausgestattet mit einem inversen Mikroskopstativ DM IRE2, ein TCS-SP5 AOBS ebenfalls mit einem inversen Mikroskopstativ DMI 6000, ein TCS-SP5 AOBS mit einem aufrechtem Mikroskopstativ CFS 6000 sowie einem TCS SP8-STED-3X-System mit inversem Mikroskopstativ DMI 6000 AF. Bis auf das SP8-STED-3X, welches mit einem Weißlichtlaser ausgestattet ist, besitzen alle Mikroskope selektive Anregungslaser, die in den Methodenteilen aufgelistet sind.

Die in dieser Arbeit angewandten Aufnahmeparameter sowie die Post-Aufnahme-Verfahren, wie Dekonvolution, sind in den einzelnen methodischen Kapiteln aufgeführt und liegen den entsprechenden Abbildungen und Analysen im Ergebnissteil zugrunde. Weiterhin sind im Anhang (Tabelle A3) diese ausführlich für Ergebnisteil 3.5 aufgelistet. Zu betonen bleibt, dass Intensitätsmessungen ausschließlich auf nicht-dekonvoluierten Bildstapeln durchgeführt wurden.

Als Immersionsmedium wurde, wenn nicht anders im Methodenteil beschrieben, das Immersionsöl™ 518F mit einem Brechungsindex (RI) von 1,518 bei 23°C von Carl Zeiss Jena GmbH benutzt.

## 2.12 Bildbearbeitungs- und Analysesoftware

Post-Aufnahme-Verfahren und Bildanalyse, inklusive Erstellung von Statistiken wurden mit den in Tabelle 2.8 aufgelisteten Softwarepaketen durchgeführt. Zur Erstellung dieser Arbeit wurden Adobe Photoshop CC, Adobe Illustrator sowie Microsoft Word (Microsoft Cooperation) benutzt.

Tabelle 2.8: verwendete Softwarepakete

Software	Version	Zweck	Firma (Herkunft)
AutoDeblur	2.01-X3	Dekonvolution	Media Cybernetics (Rockville, USA)
Huygens Prof.	16.10-19.10	Dekonvolution	SVI b.v. (Hilversum, Niederlande)
Fiji/ ImageJ	fortlaufend	2D-Analyse	Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012
Imaris	5.5-9.5	3D-Analyse	Bitplane (Zürich, Schweiz)
Exel	2010, 2016	Statistik	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Prism	4 - 8	Statistik	Graph Pad Software (San Diego, USA)

## 2.13 Präsynaptische Lokalisation des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes

Tabelle 2.9: Mikroskopische Parameter zu Lokalisationsuntersuchungen

Mikroskop	Leica TCS SP5 AOBS
Objektiv	HCX PL APO 63x/1.4NA Öl CS
Optischer Zoom	3
Bildformat	1024x512 Pixel
Z-Abstand	250nm
Resultierende Pixelgrößen (x,y,z)	80x80x250nm
Abtastgeschwindigkeit unidirektional	400 Hz (Zeilen pro Sekunde)
Bild-Mittelung ( <i>frame average</i> )	3
Verwendete Anregungslaser	Argon Laser: 488nm DPPS-laser: 561nm Helium-Neon: 633nm
Detektion PMT1/HyD (488nm exc.)	500-530nm
Detektion PMT2/HyD(561nm exc.)	570-600nm
Detektion PMT2/HyD (633nm exc.)	650-710nm

Zur Untersuchung der präsynaptischen Lokalisation des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes wurden konfokale Bildstapel an Muskel 4 in den Abdominalsegmenten 2 bis 4 mit den, bis auf wenige Ausnahmen (Tabelle A3 im Anhang), in der Tabelle 2.9 angegebenen Aufnahmeparameter erhoben und anschließend je nach Anforderung dekonvoluiert (Parameter in Tabelle A3 im Anhang). Wenn in den Legenden der Abbildungen angegeben, wurde die Anregungsleistung sowie die Verstärkung des detektierten Signals zwischen Kontrollpräparat und Vergleichspräparat konstant gehalten, um einen realistischen Vergleich der Lokalisation qualitativ zu ermöglichen.

Die STED (*Stimulated Emission Depletion*)-Aufnahme in Abb. 3.24C-C'' wurde am TCS-SP8-STED-3X (Kapitel 2.11) mit einem HC PL APO CS2 93x/1,30NA Glyzerin Objektiv und einem optischen Zoom von 4 bei einem Format von 1368x1368 Pixeln (x/y/z in nm: 23/23/160) erhoben. Als Immersionsmedium kam das Typ G Glyzerin der Firma Leica Microsystems mit einem RI von 1,451 bei RT zum Einsatz. Zur Anregung wurden die Wellenlängen 561nm (Alexa Fluor®594) und 650nm (Atto 647N) des gepulsten Weißlichtlasers benutzt. Die Emissionen wurden zwischen 580-620nm bzw. 660-710nm detektiert. Die Depletion erfolgte mit gepulsten 775nm-Laser, bei 50 bzw. 75 Prozent. Die ersten 500ps des detektierten Signals wurden jeweils über die *Gating*-Funktion herausgefiltert. Die Abtastrate erfolgte bei 600

Linien/s und es wurde eine achtfache Mittelung angewendet. Der Bildstapel wurde anschließend in Huygens Professional (Scientific Volume Imaging (SVI b.v.) mit einem S/N von 15 sowie einen QT von 0,01 dekonvoluiert.

## 2.14 Durchführung der FRAP-Experimente

Die FRAP-Experimente (FRAP, engl.: *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) wurden an einem aufrechten Leica Konfokalsystem TCS SP5 (Kapitel 2.11) durchgeführt. Zum Einsatz kam ein 20er Wasserobjektiv mit einer Numerischen Apertur von 1.0. Durch den großen Arbeitsabstand des Objektivs, 2 mm, konnte die zur Präparation verwendete Magnetkammer inkl. Präparat (Kapitel 2.10) gleichzeitig als Aufnahmekammer benutzt werden. Das Stativ war mit einer undurchsichtigen Inkubationskammer (PeCon GmbH, Erbach, Deutschland) umgeben, um Lichteinfall und evtl. auftretende Luftzirkulation zu vermeiden. Alle Experimente wurden an, bei 25°C entwickelten L3-Larven, gleichen Alters, durchgeführt ( $\pm 4$  Stunden). Direkt vor der mikroskopischen Untersuchung wurde die zur Präparation benutzte 0,1mM CaCl<sub>2</sub>-enthaltende HL3-Lösung gegen 1,25ml einer mit 0,2mM CaCl<sub>2</sub>-enthaltende HL3-Lösung ersetzt.

Um eine Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten wurde in jeder Larve die NMJ an Muskel 6 (m6) im Abdominalsegment 2 (A2) untersucht. Die anschließende quantitative Auswertung der FRAP-Experimente (Fuger et al., 2007) setzt voraus, dass der erfasste Bildausschnitt den zu quantifizierenden NMJ-Ausschnitt, also die gebleichte Region (BR, engl.: *bleached region*), den bleichunabhängigen NMJ-Ausschnitt, also die nicht gebleichte Kontrollregion (NBCR, engl. *not bleached control region*) an Muskel 7 zur Normalisierung, als auch den Muskelspalt, also die Hintergrundkontrollregion (BGCR, engl.: *background control region*) zwischen Muskel 6 und 7 zur Hintergrundkorrektur beinhaltet (Abb.2.1B).

Die zeitliche Abfolge der Bildstapelerhebung aller FRAP-Experimente wurde auf Basis der *Recovery*-Zeiten von C57-Gal4 getriebenen EGFP-DlgS97 gewählt und stellte sich für alle Experimente wie folgt dar:

- *prebleach*: Erhebung des prä-Bildstapels
- *bleach*: Bleichvorgang
- *post1-post10*: Erhebung der post-Bildstapel in 5 Minuten-Intervallen
- *post11-post13*: Erhebung der post-Bildstapel in 15 Minuten-Intervallen

Es wurde je Zeitserie nur ein prä-Bildstapel erhoben, da sich herausstellte, dass wiederholende Abtastungen keine signifikanten Unterschiede in den Grauwerten ergaben. Um

zu gewährleisten, dass zu jedem Zeitpunkt der NMJ-Ausschnitt im Bildstapel erfasst wurde, musste der Abtastvorgang immer manuell gestartet werden. Dazu wurde 45 Sekunden vor jedem Start des Abtastvorgangs die obere, mittlere und untere Ebene des Bildstapels überprüft. Die durch Muskelkontraktionen der Larve evtl. ausgelöste Verschiebung der NMJ konnte dadurch rechtzeitig, durch Anpassung der Bildstapelposition, ausgeglichen werden. Weiterhin wurde dadurch erreicht, dass die Anzahl der Ebenen pro Zeitpunkt gleich blieb. Um eine spätere quantitative Analyse der Bildstapel durchzuführen, wurden die mikroskopischen Parameter (Tabelle 2.10) des prä-Bildstapels, wie Laserleistung und Verstärkung des Signals, auch auf die post-Bildstapel angewendet.

Das Bleichen wurde mit Hilfe der Argon-Laserlinien 476nm, 488nm, 496nm, 514nm unter Verwendung der *Zoom In*-Funktion in der mittleren Ebene des Bildstapels realisiert. Hierzu wurde eine beliebig kleine quadratische ROI (engl.: *Region of Interest*) in die Mitte des zu bleichenden Boutons gezeichnet, so dass der größtmögliche Zoom von 64x angewandt wurde. Dadurch wurde garantiert, dass die Bleichregion über alle FRAP-Experimente konstant groß gehalten wurde. Vergleichende Versuche haben ergeben (hier nicht gezeigt), dass das Wechseln der Lösung während der 90-minütigen Aufnahmezeit nicht zu unterschiedlichen Analyseergebnissen führt und somit nicht nötig wurde. Alle weiteren angewandten mikroskopischen Parameter sind in Tabelle 2.10 aufgeführt. Mutanten wurden anschließend mit 4%iger Paraformaldehydlösung für 20min fixiert und entsprechend Kapitel 2.9 zur Immunfluoreszenzanalyse vorbereitet und auf die Abwesenheit des Proteins überprüft.

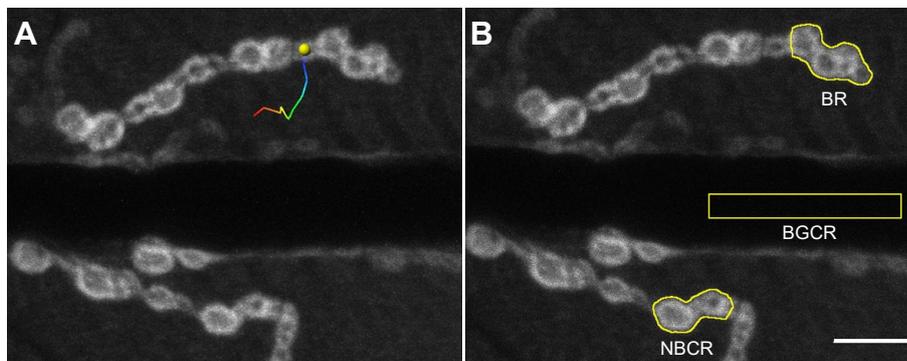
Tabelle 2.10: Mikroskopische Parameter aller FRAP-Experimente

Objektiv	HCX APO L 20x/1.0NA H <sub>2</sub> O
Optischer Zoom ( <i>pre</i> - und <i>postbleach-scans</i> )	8
Bildformat	1024x768 Pixel
Z-Abstand	760nm
Resultierende Pixelgrößen (x,y,z)	94,7x94,7x760nm
Optischer Zoom (Bleichen)	64
Laserleistung (Argon: 476,488,496,514nm) Bleichen	100% bei 35%Voreinstellung
Laserleistung (Argon), prä- und post-Bleichen	Zwischen 6 und 10%
Detektorverstärkung (engl.: <i>Gain</i> )	Zwischen 700 und 900V
Detektion EGFP-Signal	500-600nm
Detektion <i>mCherry</i> -Signal	600-700nm
Detektion <i>EGFP</i> - und <i>mCherry</i> -Signal gleichzeitig	500-530nm bzw. 600-700nm
Abtastgeschwindigkeit bidirektional	700 Hz (Zeilen pro Sekunde)
Linien-Mittelung (engl.: <i>line average</i> )	2
Anzahl der Ebenen im Bildstapel	26 bis 37 (~18,88-27,19µm)
Abtastdauer eines Bildstapels	28,0-40,4 Sekunden
Raumtemperatur	21-24°C

## 2.15 Auswertung der FRAP-Experimente

Zur Auswertung der FRAP-Experimente wurden die, wie in Kapitel 2.14 beschrieben, manuell erhobenen Zeitpunkte einer FRAP-Serie mit Hilfe des *LOCI*-Plugins (Bioformats, (Linkert et al., 2010)) in ImageJ geladen, zu einer Zeitserie zusammengefügt und als MIP (engl.: *Maximum Intensity projection*) anschließend mit dem *Imaris Bridge-Interface* in Imaris (Bitplane AG) importiert. Aus den Bildstapeln wurden Ebenen, die Immunfluoreszenzsignal unterhalbbliegender Muskeln beinhalteten, vor Bildung der MIP entfernt.

Mit Imaris wurden die zwischen den Zeitpunkten auftretenden horizontalen Verschiebungen der NMJ weitestgehend manuell mit Hilfe des *Spot Wizzard* verfolgt und anschließend unter Verwendung der *Correct Drift*-Funktion (*Translational Drift*) ausgeglichen (Abb.2.1A). Unter Verwendung derselben Funktion, konnten Verschiebungen innerhalb eines Bildstapels (eines Zeitpunktes) korrigiert werden.



**Abb.2.1:** Illustration der Drift-Korrektur sowie der Erzeugung segmentierter ROIs für die FRAP-Analyse (A) NMJ-Endigung vor dem Bleichen (*prebleach*-Zeitpunkt) einer FRAP-Serie mit Darstellung der in Imaris durchgeführten

*Drift*-Korrektur. Der gelbe *Spot* zeigt die vor Korrektur manuell gesetzte Position an, welche der anschließenden Verschiebung zugrunde liegt. Der farbige Polygonzug zeigt die zur Korrektur angewendete Verschiebung der einzelnen Zeitpunkte an. (B) Darstellung der mittels ImageJ/Fiji im selben Bildstapel wie in A erhobenen und zu messenden drei ROIs: gebleichte Region (BR, engl.: *bleached region*), nicht gebleichte Kontrollregion (NBCR, engl.: *not bleached control region*), Kontrollregion für den Hintergrund (BGCR, engl.: *background control region*). Genotyp: *UAS-EGFP-dlgS97/+; C57-Gal4/+* (A2 m6/7, MIP). Scale Bar: 5µm.

Die Segmentierung und die Intensitätswertmessung (Mittelwert der Grauwerte) für die Zeitpunkte der FRAP-Serien wurde anschließend wiederum in ImageJ durchgeführt. Hierzu wurde anhand der MIP des Prä-Bildstapels mit Hilfe eines Makros (run("Gaussian Blur...", "sigma=2"); setAutoThreshold("Otsu"); run("Create Selection")) sowohl die BR, als auch die NBCR vorsegmentiert. Unter Benutzung des *Selection brush*-Werkzeugs wurden die ROIs weiter angepasst und alle nicht spezifischen segmentierten Regionen entfernt. Die so an den prä-Bildstapel angepassten ROIs wurden unter evtl. notwendiger manueller Pixelverschiebung auf alle Zeitpunkte der FRAP-Serie übertragen und im *ROI-Manager* gespeichert. Die *BGCR* wurde durch einfaches Einzeichnen eines Rechteckes erzeugt und ebenfalls an die einzelnen

Zeitpunkte durch Verschiebung angepasst. Abbildung 2.1B zeigt ein Beispiel eines segmentierten Zeitpunktes.

Aus den erhobenen Grauwerten wurde mit Hilfe der Formel (Fuger et al., 2007)

$$RF[t] = \frac{(BR[t] - BGC[t])}{(NBC[t] - BGC[t])}$$

die relative Fluoreszenz (RF) der einzelnen Zeitpunkte ( $t$ ) einer FRAP-Serie berechnet. Innerhalb der Formel kann auf Bleichkorrektur verzichtet werden, da die NBCR-Werte kein erkennbares Bleichen aufwiesen.

Die einzelnen *postbleach*-Zeitpunkte wurden im Anschluss in Prism 8.3 (GraphPad Software) auf den *prebleach*-Zeitpunkt, der 100% entspricht, normalisiert und prozentual dargestellt:

$$NRF[t] = \frac{RF[t]}{RF[t = prebleach]} \times 100$$

Zur Bestimmung der mobilen Fraktion (mF) des *Protein of Interest* (POI) und der Zeit bis zu ihrer halbmaximalen Wiederherstellung ( $t_{1/2}$ -Wert) wurden die Messwerte ( $NRF[t]$ ) einer jeweiligen Zeitserie mit Hilfe der folgenden Formel (Nichtlineare Regression mit einphasiger exponentieller Assoziation) zunächst in Prism 8.3 approximiert:

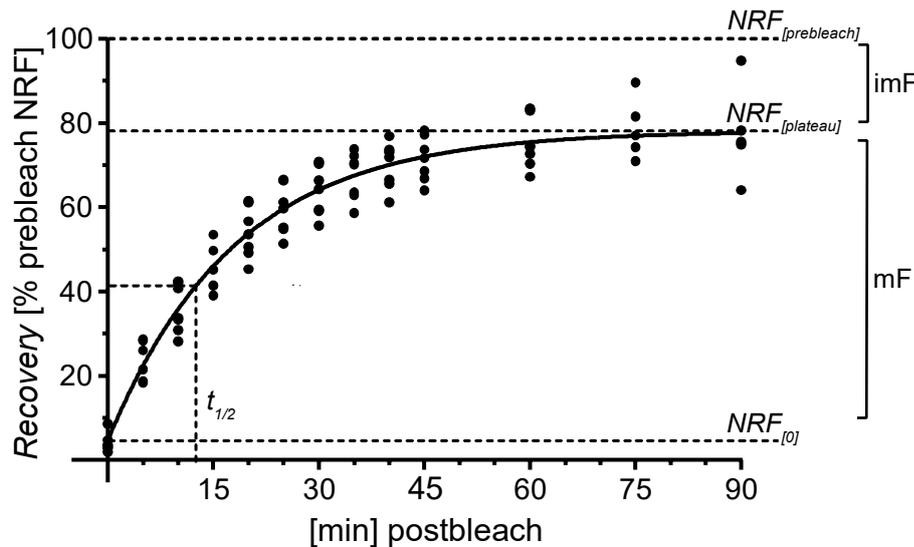
$$NRF[t] = NRF[0] + (Plateau - NRF[0]) * (1 - e^{-Kt})$$

Dabei entspricht das *Plateau* der *Recovery* im Unendlichen und  $K$  der Ratenkonstante, die als 1/min ausgedrückt wird. Die mF ist die Differenz aus *Plateau* und  $NRF[0]$ . Der  $t_{1/2}$ -Wert ergibt sich als  $\ln(2)/K$  in Minuten.

Es wurden keine Bedingungen bzw. Annahmen in der Berechnung, wie  $NRF[0]=0$  einbezogen, da während der Zeit des Bleichens als auch der Zeit bis zur Abtastung des ersten *postbleach* Bildstapels schon *Recovery* stattfinden kann. Es kann auch, bedingt durch die manuelle Durchführung der Experimente nicht bestimmt werden, ob tatsächlich ein vollständiges Bleichen der Region stattgefunden hat. Bei der gewählten Abtastrate von 700 Zeilen im bidirektionalen Modus, mit zweimaliger Zeilenmittelung vergingen für den ersten *postbleach*-Zeitpunkt  $NRF[0]$  unter Berücksichtigung des Bildstapels bei 768 Zeilen-Modus ca. 15 bis 30 Sekunden.

Aus den ermittelten mF- und  $t_{1/2}$ -Werten wurden in Prism 8.3 (GraphPad Software) genotypweise die Mittelwerte sowie deren Standardabweichung berechnet und mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal–Wallis-Test plus Dunn's *multiple comparison* auf signifikante Unterschiede untersucht.

Auf die Darstellung der Kurvenverläufe einzelner FRAP-Messungen wurde verzichtet. Anstelle dessen, wurden in Prism 8.3 (GraphPad Software) die einzelnen Zeitserien gruppiert berechnet und dargestellt. Zusätzlich wurden sämtliche Messwerte der einzelnen Zeitserien  $NRF[t]$  als *Dot Plot* in den Grafen der Ergebnisse dargestellt. Auf die Darstellung des *prebleach*-Zeitpunktes ( $NRF[prebleach]$ ) wurde übersichtshalber in den Graphen verzichtet. Abbildung 2.2 zeigt ein Beispiel einer ermittelten FRAP-Kurve mit den dazugehörigen Parametern.



**Abb.2.2:** Illustration der Parameter einer FRAP-Kurve.

Eingezeichnet sind die erhobenen Werte für die Zeit bis zum Erreichen der halb-maximalen Recovery ( $t_{1/2}$ ), die mobile Fraktion (mF) sowie die immobile Fraktion (imF) für ein untersuchtes Fluoreszenzmarkiertes Protein (POI, engl.: *protein of interest*). Die mobile Fraktion wird aus

der Differenz der normalisierten relativen Fluoreszenz (NRF) am Plateau, also der asymptotischen Annäherung des Maximalwertes der Recovery, und der NRF zum ersten *postbleach*-Zeitpunkt ( $NRF_0$ ) berechnet. Zu diesem Zeitpunkt kann, bedingt durch die zwangsläufige Aufnahmeverzögerung, schon ein gewisses Maß an Recovery erfolgt sein (Kapitel 2.15). Das gezeigte Beispiel ist Abb.3.15A entnommen.

In den statistischen Auswertungen wurden nur FRAP-Serien berücksichtigt, in denen in der NBCR keine Intensitätsschwankungen größer 20 Prozent vorkamen. Dieses Kriterium wurde notwendig, da es vorkommen konnte, dass während der Abtastzeit abgeschnittene Tracheenäste sich über die Region legen konnten. Die dadurch absorbierte Emission führt zur Intensitätsminderung, die das Ergebnis verfälschen. Weiterhin wurden diejenigen Serien ausgeschlossen, die weniger als 11 *post bleach*-Zeitpunkte besaßen, da die Muskeln durch gegebenenfalls Überstreckung abrissen.

## 2.16 Bestimmung des Expressionslevels in den FRAP-Experimenten

Zur Analyse der Expressionslevel wurden die jeweiligen *prä*-Bildstapel der verschiedenen Genotypen in Imaris (Bitplane AG) ausgewertet (Aufnahmeparameter der FRAP-Serien siehe Tabelle 2.10). Das Expressionslevel wurde mit zwei Quader-ROIs mit Hilfe des *Surface Wizard* abseits des SSRs im Muskel 6 bestimmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass weder

Grauwerte des SSR, noch Kernregionen mitgemessen wurden. Durch alle prä-Bildstapel der Genotypen hindurch wurden immer gleich große ROIs zur Messung benutzt. Die Ausrichtung in der Tiefe wurde anhand des SSR-Signals der NMJs unter Zuhilfenahme des *Ortho Slicers* ausgerichtet, sodass die Verteilung des EGFP-Signals im Muskel räumlich berücksichtigt wurde. Eine vergleichende Analyse des Expressionslevels anhand der mittleren Grauwerte der prä-Bildstapel war möglich, weil das Signal im SSR der geblichenen NMJ bei der Aufnahme als Sättigungsgrenze definiert wurde. Daher erübrigte sich eine nachträgliche Normierung der gemessenen Grauwerte.

Die gemessenen Mittelwerte wurden anschließend in Prism 4, 5 oder 8 (GraphPad Software; statistische Methode siehe Legende in 3.14 und 3.16) statistisch ausgewertet.

## 2.17 Bestimmung der Boutonanzahlen

Tabelle 2.11: Mikroskopische Parameter zur Analyse der Boutonanzahlen

Mikroskop	Leica TCS SP2 AOBS
Objektiv	25x0,75NA, Öl
Optischer Zoom	1
Bildformat	512x512 Pixel
Z-Abstand	1µm
Resultierende Pixelgrößen (x,y,z)	1,17x1,17x1µm
Abtastgeschwindigkeit unidirektional	400 Hz (Zeilen pro Sekunde)
Bild-Mittelung ( <i>frame average</i> )	2
Verwendete Anregungslaser	Argon Laser: 488nm DPPS-laser: 561nm
Detektion PMT1 (488nm exc.)	500-530nm
Detektion PMT2 (561nm exc.)	570-600nm

Zur Bestimmung der Boutonanzahlen wurden konfokale Übersichtsaufnahmen (Parameter siehe Tabelle 2.11) der NMJs an Muskel 6/7, A2 erzeugt und katalogisiert.

Folgend wurden die Boutons an ein und denselben vorher gescrambelten Präparaten blind unter Verwendung eines manuellen Handzählers mit einem 63x Öbobjektiv am Fluoreszenzmikroskop Zeiss Imager A2 mit Hilfe der HRP- und der Dlg-Markierung gezählt. Im Anschluss wurden die gezählten Werte den katalogisierten Bildstapeln zugeordnet. Anhand der vorhandenen Übersichtsaufnahmen wurde die Muskelgröße mit dem *Segmented Line Selection* Werkzeug in ImageJ/Fiji bestimmt und die Anzahl der Boutons auf eine Muskelfläche von 100000µm<sup>2</sup> normalisiert (Excel, Microsoft Cooperation). Die statistische Auswertung erfolgte in Prism 4 und 5 (GraphPad Software; statistische Methode siehe Legende in Abb.3.4).

## 2.18 Bestimmung der Boutongrößen

Zur Quantifizierung wurden dieselben aufgenommenen Bildstapel wie zur GluR-Flächenanalyse benutzt. (Aufnahmeparameter siehe Tabelle 2.14) Die ROIs der

Boutonflächen an NMJs von Muskel 6/7, A2 wurden anhand der MIP der Original-Bildstapel semiautomatisch in ImageJ/Fiji anhand der HRP-Immunfluoreszenz (IF) mit Hilfe eines Makros (`run("Median...", "radius=2 slice"); setOption("BlackBackground", false); run("Convert to Mask", "method=Default background=Default calculate");; run("Create Selection")`) und anschließender manueller Separierung der ROIs (*Selection*) mit Hilfe des *Selection Brush* - Werkzeugs (Radius 2) gebildet. Der Medianfilter im Makro bewirkt, dass der Hintergrund weitestgehend geglättet ist, um so anschließend ein zusammenhängendes, binäres Abbild der NMJ (*Mask*) mit dem Schwellenwertverfahren zu bekommen. Die Beurteilung der Boutongrenzen wurde zusätzlich mit Hilfe der BRP- und GluR-IF vorgenommen. In unschlüssigen Fällen wurden die vorhandenen dekonvoluierten Bildstapel (Kapitel 2.21) in Imaris (Bitplane AG) in 3D-Ansicht beurteilt. Alle Genotypen wurden blind ausgewertet. Beispiele des Segmentierungsergebnisses sind in Abbildung 3.4 und 3.6 des Ergebnisteils zu sehen. Die Mittelwerte der Flächen pro NMJ, bestehend aus 1-2 Bildstapeln wurden in Excel (Microsoft Corporation) gebildet und anschließend in Prism 4 und 5 (GraphPad Software) statistisch ausgewertet (statistische Methode siehe Legende in Abb.3.4 und 3.6 im Ergebnisteil). Die Anzahl bzw. Prozent der Boutons mit einer Fläche größer als  $10\mu\text{m}^2$  wurde in Excel (Microsoft Cooperation) bestimmt und in Prism 8 (GraphPad Software) dargestellt. Die Anzahl der ausgewerteten NMJs sowie die der Boutons sind in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt.

## 2.19 Bestimmung der Anzahl Aktiver Zonen

Tabelle 2.12: Mikroskopische Parameter zur Analyse der Anzahl Aktiver Zonen

Mikroskop	inv. Leica TCS SP2 AOBS
Objektiv	HCX PL APO 40x/1.25NA ÖI CS
Optischer Zoom	1,4
Bildformat	2048x1024 bzw.512 Pixel
Z-Abstand	285nm
Resultierende Pixelgrößen (x,y,z)	130x130x285nm
Abtastgeschwindigkeit unidirektional	400 Hz (Zeilen pro Sekunde)
Bild-Mittelung (engl.: <i>frame average</i> )	2
Verwendete Anregungslaser	Helium-Neon: 633nm DPSS-laser: 561nm Argon Laser: 488nm
Detektion PMT1 (633nm exc.)	650-700nm
Detektion PMT2 (561nm exc.)	570-600nm
Detektion PMT3 (488nm exc.)	500-530nm

Zur Bestimmung der Anzahl Aktiver Zonen (AZs) der NMJs an Muskel 6/7, A2 wurden konfokale Bildstapel ausgewertet, die zum einen die ganze NMJ an Muskel 6/7 umfassen, eine ausreichend hohe Auflösung besaßen (siehe Aufnahmeparameter Tabelle 2.12) und zum anderen mit HRP als auch BRP markiert waren. Die Bildstapel wurden mit Auto Deblur

(Version 2.01, Media Cybernetics, Inc.) dekonvoluiert (Kapitel 2.21). Dazu wurde der *blind deconvolution*-Algorithmus mit *high background*-Einstellung und 10 Iterationen angewendet. Anschließend wurde in Imaris (Bitplane AG) die Grauwerte auf den gemeinsam höchsten Grauwert linear gestreckt (Normalisierung) und anschließend in 8Bit umgewandelt. Folgend wurden dann mit Hilfe des *Spot Detection Wizard* unter der Funktion der *Background Subtraction* und einem Detektionsradius von  $0,2\mu\text{m}$  die BRP-Spots detektiert (Abb.3.5). Durch die Normalisierung der Grauwerte konnte ein Schwellenwert von 15 für alle Bildstapel bei der Detektion der BRP-Spots verwendet werden. Anschließend wurden die Anzahl der detektierten Spots auf eine Muskelfläche von  $100000\mu\text{m}^2$  normalisiert (Excel, Microsoft Cooperation) und in Prozent vom Wildtyp angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte in Prism 4 und 5 (GraphPad Software; statistische Methode siehe Legende in Abb.3.5).

## 2.20 Intensitätsmessungen

Tabelle 2.13: Mikroskopische Parameter zur Analyse der Intensitätswerte der *dIg<sup>S97-flpV</sup>*-Larven

Mikroskop	inv. Leica TCS SP2 AOBS
Objektiv	HCX PL APO CS 63.0x/1.32NA OIL CS
Optischer Zoom	3
Bildformat	512x12 Pixel
Z-Abstand	730nm
Resultierende Pixelgrößen (x,y,z)	155x155x730nm
Abtastgeschwindigkeit unidirektional	400 Hz (Zeilen pro Sekunde)
Bild-Mittelung ( <i>frame average</i> )	3
Verwendete Anregungslaser	Helium-Neon: 633nm DPSS-laser: 561nm Argon Laser: 488nm
Detektion PMT1 (633nm exc.)	500-530nm
Detektion PMT2 (561nm exc.)	570-600nm
Detektion PMT3 (488nm exc.)	650-700nm

Die Bestimmung der Grauwerte wurde nach der Methode durchgeführt, wie in Kobler (2007) beschrieben. Zusammengefasst dargestellt:

Um die verschiedenen Genotypen vergleichen zu können, wurden nicht nur die Präparate parallel markiert, es wurden auch die zu vergleichenden Präparate jeweils auf einem Objektträger eingebettet. Bei der Präparation wurde das ZNS entfernt. Die Aufnahmeparameter (Tabelle 2.13) wurden so gewählt, dass kein Bleichen auftrat. Dem Einfluss von Laserschwankungen wurde entgegengewirkt, indem die präparierten Genotypen in alternierender Abfolge aufgenommen wurden. Dabei wurde der Wildtyp als Maß der Laserfluktuationen gewertet. Es wurden zwei Bildstapel, je zu quantifizierende NMJ, an Muskel 6/7, A2, aufgenommen.

Die Segmentierung der NMJs wurde anhand der Dlg-Immunfluoreszenz mit Hilfe des angepassten (Kobler, 2007) ImageJ-PlugIns *Nucleus Counter* (MBF-ImageJ, Collins, 2007)

durchgeführt. Zuerst wurde eine Hintergrundkorrektur mittels *rolling-ball*-Algorithmus auf die MIP des Bildstapels mit einem Radius von 100 vorgenommen. Bevor mittels Otsu-Schwellenwertbestimmung (Otsu, 1979) die ROIs gebildet wurden, wurde noch ein Mittelwertfilter von 5x5 Pixel angewendet. Mit den so gewonnen ROIs, wurde auf den MIPs der Original-Bildstapel sowohl die Fläche als auch der mittlere Grauwert gemessen. Die Grauwerte der zwei Bildstapel per NMJ wurden zusammengefasst und nach Fläche gewichtet. Anschließend wurden die Werte auf den Wildtyp normiert. Die statistische Auswertung erfolgte in Prism 4 und 5 (GraphPad Software; statistische Methode siehe Legende in Abb.3.2).

## 2.21 Größenbestimmung der GluR-Felder

Tabelle 2.14: Mikroskopische Parameter GluR-Analyse sowie Boutonflächen

Mikroskop	inv. Leica TCS SP2 AOBS
Objektiv	HCX PL APO CS 63.0x/1.32NA OIL CS
Optischer Zoom	6
Bildformat	512x512 Pixel
Z-Abstand	163nm
Resultierende Pixelgrößen (x,y,z)	78x78x163nm
Abtastgeschwindigkeit unidirektional	400 Hz (Zeilen pro Sekunde)
Bild-Mittelung ( <i>frame average</i> )	3
Verwendete Anregungslaser	Helium-Neon: 633nm DPSS-laser: 561nm Argon Laser: 488nm
Detektion PMT1 (633nm exc.)	500-530nm
Detektion PMT2 (561nm exc.)	570-600nm
Detektion PMT3 (488nm exc.)	650-700nm

Zur 3D-Vermessung der glutamatergen Rezeptorfelder (GRFs) anhand der GluRIID-Immunfluoreszenz (IF) wurden mindestens zwei konfokale Bildstapel je NMJ an Muskel 6/7, A2 mit ausreichend hoher Abtastfrequenz erhoben (Aufnahmeparameter siehe Tabelle 2.14; Anzahl der aufgenommenen NMJs in Tabelle A2 im Anhang), um eine Nyquist-konforme Pixelgröße zu erhalten (Biggs, 2010). Bei der Aufnahme wurde darauf geachtet, dass der jeweilige Teil der NMJ in Gänze aufgenommen wurde, d.h. in z-Ausdehnung darauf geachtet, dass keine Grauwerte des GluRIID-Signals abgeschnitten wurden. Dies, um im ersten *post-Imaging*-Schritt die konfokalen Bildstapel mittels AutoDeblur 2.0.1 (Media Cybernetics) zu dekonvolvieren. Der Algorithmus der Dekonvolution berücksichtigt die schwachen, streuenden Intensitäten, die am oberen bzw. unteren Ende der *Point Spread Function* (engl., PSF) auftreten und ein charakteristisches Merkmal der konfokalen PSF sind (Biggs, 2010). Neben den Angaben für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (Emission: 520nm für Alexa Fluor®488, 570nm für Cy3 und 670nm für Cy5), Einbettmedium (Vectashield,  $n_{23^{\circ}\text{C}}=1,44$ ), den Voxelgrößen (78x78x163nm), Immersionsmedium (Öl,  $n_{23^{\circ}\text{C}}=1,51$ ) und der Numerischen Apertur des Objektivs (NA=1,32) wurden für den Hintergrund die Einstellung *high* und die

Iterationsschritte auf 20 gesetzt. Die so mit dem *blind deconvolution*-Algorithmus (AutoDeblur), der zusammen mit den erwähnten Angaben die PSF theoretisch aus dem Bildstapel berechnet, dekonvoluierten 32Bit-Bildstapel, wurden als ics/ids-Datei in Imaris (Bitplane AG) geladen und dort mit Hilfe der *change Data-Type- (32 bit to 8 bit, Data Range to Target Range)* Funktion in den 8Bit-Intensitätsraum überführt. Um im späteren Segmentierungsalgorithmus stets den gleichen globalen Intensitätsschwellenwert benutzen zu können, wurden anschließend die Bildstapel über das Imaris XT-Modul in ImageJ importiert und anhand der GluRIID-IF Intensitätswertnormalisiert. Dazu wurde eine lineare Kontrastspreizung mit Hilfe der Auto-Funktion des *Contrast and Brightness*-Dialogs in einer Region mit den höchsten Graustufenwerten der GluRIID-IF angewendet und anschließend auf den Bildstapel angewendet. Die so prozessierten Bildstapel wurden zur Segmentierung wieder in Imaris exportiert. Bevor schlussendlich die GRFs segmentiert werden konnten, wurden extrasynaptische GluRIID-Rezeptoruntereinheiten (Abb.3.10C, Sterne) durch Maskierung (*mask Chanel*; Abb.3.10E, Sterne) der GluRIID-IF mit einer mit Hilfe des *surface creation wizard* generierten übergroßen Oberfläche (Abb.3.10C), die anhand der HRP-IF erzeugt wurde, entfernt. Die zur Bildung der Oberfläche benutzten Parameter (*Resampling*-Faktor, Gausisian-Filter und Schwellenwert) wurden so gewählt und gleich beibehalten, dass die Oberfläche die gesamte Teil-NMJ, einschließlich der mit ihr assoziierten GRFs, einschließt (Abb.3.10C, Pfeilspitze zeigt äußere Grenze der Oberfläche (grau) an).

Die Segmentierung der GRFs erfolgte ebenfalls mit Hilfe des *surface creation wizards*. Im Gegensatz zur vorher beschriebenen Oberflächengenerierung wurde es jedoch hier notwendig, bedingt durch die lichtmikroskopisch beugungsbedingten Überlappungen der GRFs, zusätzlich die *split touching objects*-Funktion anzuwenden, um die GRFs zu separieren. Die Trennung der GRFs basiert auf dem Detektieren eines lokalen Maximums nach gebildeter Oberfläche, dessen Position als Keimursprung dient (eng.: *seed point detection*; Abb.3.10D). Um diesen zu definieren muss ein Minimumdurchmesser der zu detektierenden Struktur angegeben werden. Von diesem Keim aus wird nun solange radial die Umgebungsfläche in die segmentierte Struktur mit einbezogen, bis ein eingegebener Intensitätsschwellenwert erreicht wird (*region growing algorithm*; Abb.3.10D, orange binärisierte Fläche). Treffen zwei Flächen von unterschiedlichen Keimpunkten ausgehend aufeinander, separiert der Algorithmus, basierend auf der *Watershed Transformation* (Wasserscheidentransformation), diese automatisch (*split touching objects*; Abb.3.10E', Pfeilspitze zeigt Beispiel hierfür). Der Durchmesser des Keimpunktes, sowie alle in den Methoden angegebene Schwellenwerte, wurden empirisch anhand des *Wildtyps*, siehe Beispiel Abbildung 3.10, unter Berücksichtigung des Eins zu Eins Verhältnis von AZs und GRFs festgelegt (Intensitätsschwellenwert der Oberfläche: 25, Minimumdurchmesser des Keims: 0,4µm und der Schwellenwert für die

Separierung, ein sogenannter *Quality*-Wert, wurde auf 5 gesetzt). Für den Keimdurchmesser wurden 0,3, 0,4, 0,5 und 0,6 $\mu\text{m}$  getestet.

Gelegentlich traten innerhalb der Maskierungsoberfläche vereinzelt nichtassoziierte Rezeptoruntereinheiten auf. Diese wurden entweder mit Hilfe eines Oberflächenfilters, der alle Strukturen unterhalb 0,3 $\mu\text{m}^2$  ausschloss, oder durch manuelles Editieren des dreidimensionalen Raumes, entfernt. Abbildungen 3.10E und 3.10E' zeigen das typische Segmentierungsergebnis einer wildtypischen NMJ-Endigung. Zur Auswertung kamen nur GRFs, die zu Typ Ib-Nervendigungen (Abb.1.3) gehören. Sich an Typ 1s-befindende GRFs wurden mit Hilfe eines interaktiven Positionsfilters, als auch durch manuelles Editieren des dreidimensionalen Raumes entfernt. Alle gemessenen Oberflächen wurden in Imaris als xls-Datei exportiert und in Excel (Microsoft Corporation) weiterverarbeitet. Hier wurde der Mittelwert pro NMJ berechnet. Anschließend wurden die Daten in Prism 4 bzw. 5 (GraphPad Software) statistisch ausgewertet (statistische Methode siehe Legende in Abb.3.12 und 3.13).

Um das Eins zu Eins Verhältnis zwischen AZs und GluRs zu bestätigen war es nötig, die mit dem NC82-Antikörper markierten AZs (BRP) zu detektieren. Hierzu wurde die *spot detection*-Funktion von Imaris (Bitplane AG) benutzt. Wie die GluRIID-IF, wurde auch die BRP-IF Intensitätswertnormalisiert. Im zugehörigen Wizard wurde der minimale Durchmesser der BRP-Spots auf 0,2 $\mu\text{m}$  eingestellt und ein *Quality*-Schwellenwert von 5 gewählt. Im Wizard wurde eine Imaris interne automatische Hintergrundkorrektur verwendet. Ein vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 3.10E'' zeigt ein Ergebnis der AZ-Detektion. Die numerischen Verhältnisse zwischen GRFs und AZs wurden in Excel gebildet und anschließend in Prism 4 und 5 statistisch ausgewertet. Alle statistischen Graphen wurden in Prism 8 erstellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ménage à trois: Erweiterte Charakterisierung der wechselseitigen Abhängigkeit von Dlg, Metro und *DLin-7* an larvalen NMJs durch quantitative Immunfluoreszenzanalyse

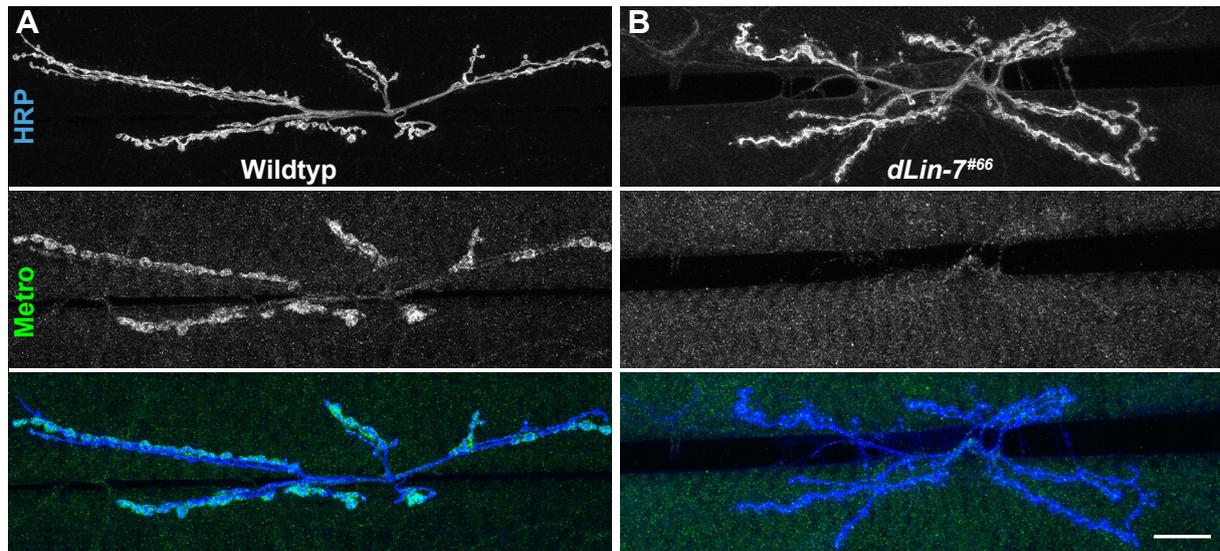
Zu Beginn dieser Arbeit sollte die Analyse der Abhängigkeitsverhältnisse zwischen Dlg, Metro und *DLin-7* bezüglich ihrer Lokalisierung an der NMJ vervollständigt werden.

Wie in der Einleitung dargelegt (Abb.1.5), ist die NMJ-Lokalisierung von *DLin-7* absolut von Metro abhängig. Um zu überprüfen, ob eine Abhängigkeit auch in der anderen Richtung besteht, wurden immunzytochemische Markierungen mit Metro-spezifischem Antikörper (AK) an *dLin7*-Nullmutanten (*dLin-7<sup>#66</sup>*) Körperwandpräparaten durchgeführt (Bachmann et al., 2010). Es zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp (Abb.3.1A), dass die Metro-Immunfluoreszenz in diesen Nullmutanten auf Hintergrundniveau reduziert wurde (Abb.3.1B). Angesichts von Western Blot-Daten (Bachmann et al., 2010), bei denen in *DLin-7*-mutanten Körperwandextrakten ebenfalls kein Signal für Metro detektiert werden konnte, wurde auf eine Quantifizierung der Immunfluoreszenz verzichtet. Damit war erwiesen, dass zwischen *DLin-7* und Metro eine 100%ige wechselseitige Abhängigkeit besteht. Diese Abhängigkeit ist so stark, dass selbst eine im Western Blot nachgewiesene Überexpression von MetroB (Spleißvariante B; Abb.1.4B) in *dLin-7<sup>#66</sup>*-Larven keine Lokalisierung bzw. Rekrutierung von Metro an NMJs bedingt (Bachmann et al., 2010; Abb.3.3A, A').

In klassischen, hypomorphen *dlg*-Allelen (*dlg<sup>XI-2</sup>*) war eine Reduzierung von *DLin-7* beobachtet worden, die durch Muskelexpression von DlgS97, nicht jedoch von DlgA aufgehoben werden konnte (Bachmann et al., 2004). Diese Rettungsexperimente sowie biochemische *in vitro*-Interaktionsstudien wiesen darauf hin, dass primär DlgS97 für die Rekrutierung von *DLin-7* und Metro verantwortlich ist. Allerdings sind beide Dlg-Varianten an der NMJ in *dlg<sup>XI-2</sup>*-Mutanten nicht komplett eliminiert. Daher ergab sich die Frage, ob die detektierbare Restfluoreszenz von *DLin-7* und Metro an der NMJ auf das verbliebene Dlg zurückzuführen ist, oder aber eine nur begrenzte Abhängigkeit reflektiert. Um diese Frage zu klären, wurden zwischenzeitlich von U. Thomas generierte DlgS97- als auch DlgA-spezifische Nullallele, *dlg<sup>S97-flpV</sup>* bzw. *dlg<sup>A-51.1</sup>* (Bachmann et al., 2010) für weitere Analysen benutzt.

Erste Untersuchungen am *dlg<sup>A-51.1</sup>*-Allel zeigten, dass die Gesamtmenge an Dlg an der NMJ unverändert bleibt. Gleichzeitig war zu beobachten, dass die Metro-Immunfluoreszenz gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht ist (Abb.3.2A, B). Diese Beobachtungen sind konsistent

mit der Annahme, dass DlgS97 einen Verlust von DlgA an der NMJ vollständig kompensieren kann (Bachmann et al., 2010) und dabei vermehrt Metro an die NMJ rekrutiert.

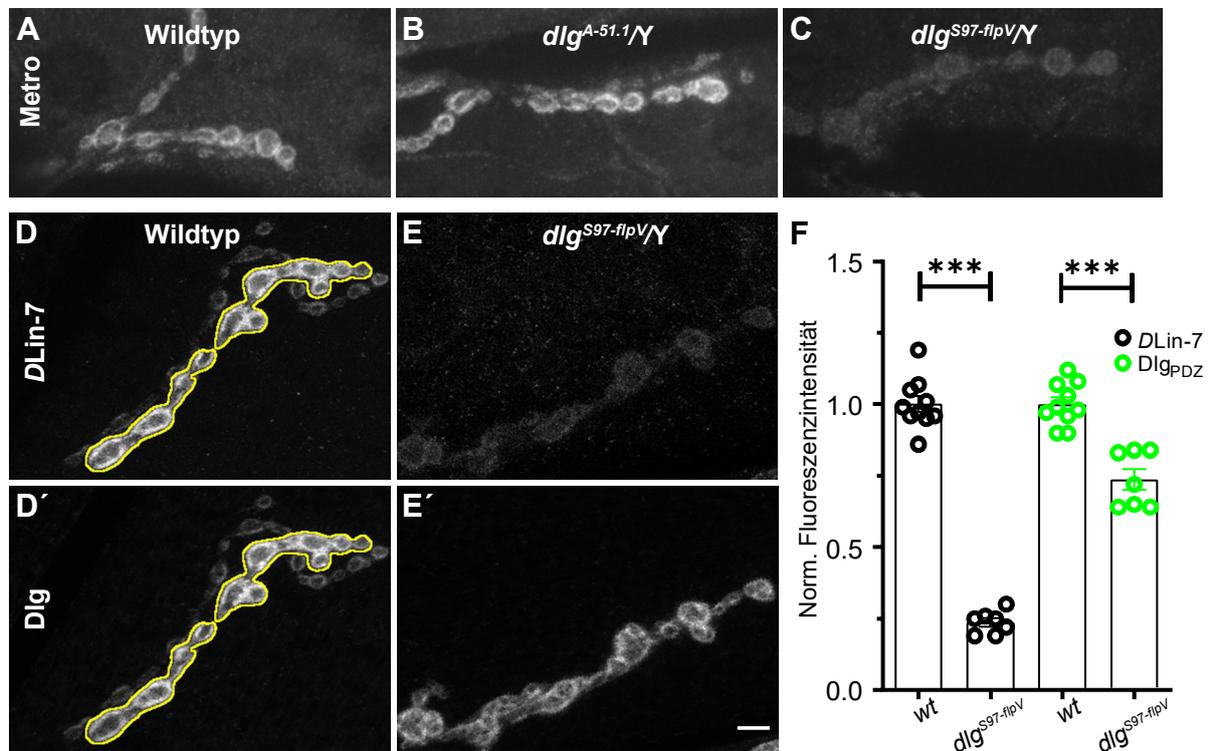


**Abb.3.1: DLin-7 ist für die Expression von Metro an NMJs essentiell.** Immunfluoreszenzmarkierung (IF-Markierung) von NMJs im Abdominalsegment 2 an den Muskeln 6 und 7 (A2 m6/7) (A) einer wildtypischen (*Canton-S*) und (B) einer *dLin-7*-mutanten- (*dLin-7<sup>#66</sup>/dLin-7<sup>#66</sup>*) L3-Larve mittels Antikörpern (AK) gegen HRP und Metro. Die anti-HRP-Markierung zeigt die verzweigten Motornervendigungen (obere Reihe). Die Markierung mittels anti-Metro-AK offenbart die Anreicherung des Metro-Proteins an der wildtypischen NMJ und seinen vollständigen Verlust an der NMJ der *dLin-7*-Mutante (mittlere Reihe). Die untere Reihe zeigt die Überlagerung beider Markierungen. (MIP) Scale Bar: 20µm

Nachdem diese Beobachtungen die These, dass die Metro- und *DLin-7*-Lokalisierung ausschließlich von DlgS97 abhängig ist, unterstützen, wurde die NMJ-Lokalisierung der beiden Proteine nun in *dlg<sup>S97-flpV</sup>*-Mutanten untersucht. Wie in Abbildung 3.2C zu sehen, ist die Immunfluoreszenz von Metro und damit auch die von *DLin7* in den *dlg<sup>S97-flpV</sup>*-Mutanten stark an der NMJ reduziert. Diese Beobachtung zeigt die starke Abhängigkeit der beiden Proteine von DlgS97. Interessanterweise stellt sich die Abhängigkeit Metros bzw. *DLin-7*s von DlgS97 allerdings keineswegs zu 100% dar. Es konnte in beiden Fällen stets ein diskretes, wenn auch deutlich geringes Verbleiben des Signals an der NMJ beobachtet werden (Abb.3.2C, E). Daher wurde eine Quantifizierung notwendig. Im Vergleich zur Markierung mit dem anti-Metro-AK zeigt der anti-*DLin-7*-AK eine bessere Markierung. Da die Lokalisierung von Metro und *DLin-7* sich gegenseitig zu 100 Prozent bedingen, s.o., wurde die Quantifizierung mittels der *DLin-7*-Immunfluoreszenz an den NMJ anhand konfokalmikroskopischer Aufnahmen durchgeführt (Kobler, 2007; Kapitel 2.20, diese Arbeit).

Wie in Abbildung 3.2D-F zu sehen, zeigte sich eine Reduzierung des *DLin-7*-Signals in den *dlg<sup>S97-flpV</sup>*-Mutanten ( $23,71 \pm 3,99\%$ ;  $n=7$ ) im Vergleich zum *Wildtyp* ( $100,10 \pm 8,81\%$ ;  $n=10$ ), um 76,3%, wobei das gleichzeitig gemessene Dlg-Signal, also DlgA ( $73,71 \pm 9,71\%$ ;  $n=7$ ), lediglich

um 26,3% reduziert ist. Dieses Ergebnis belegt eindrucksvoll, dass trotz der prominenten Anwesenheit von DlgA, die Lokalisierung von *DLin-7* an der NMJ weitestgehend von *DlgS97* abhängig ist, also einen Isoform-spezifischen Effekt darstellt.

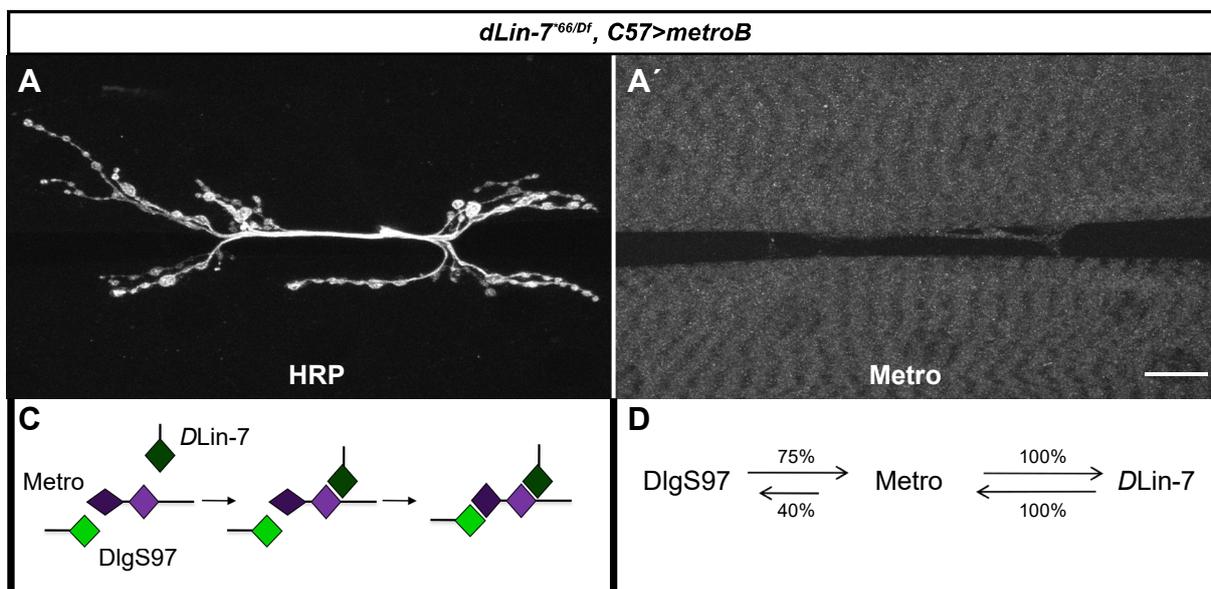


**Abb.3.2: Die Lokalisation von Metro und *DLin-7* an der NMJ wird maßgeblich durch *DlgS97* bestimmt.** (A-C) Metro-spezifische Immunfluoreszenz (IF; anti-Metro-AK) an Boutons von (A) Wildtyp (*Canton-S*), (B) *dlgA-51.1/Y* und (C) *dlgS97-flpV/Y*. Die Abhängigkeit der Metro-Lokalisation von *DlgS97* ist deutlich (C), während die *dlgA*-spezifische Mutante keine Reduzierung von Metro zeigt (B). Hingegen scheint Metro bei letzterer sogar leicht erhöht zu sein. (D-F) Gegenüber dem Wildtyp zeigen *dlgS97-flpV*-Mutanten eine starke Reduzierung von *DLin-7* (anti-*DLin-7*-AK) (D, E) und eine weniger drastische, aber statistisch hoch-signifikante Reduzierung von Dlg (anti-Dlg<sub>PDZ</sub>-AK) an derselben NMJ (D', E'). In D und D' ist zudem beispielhaft eine ROI (gelb) für die Quantifizierung von Immunfluoreszenzintensitäten dargestellt. Die zugehörige statistische Auswertung ist in (F) gezeigt. *DLin-7* ist danach in den *dlgS97*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (100,10±8,81%, n=10) auf 23,71±3,99% (n=7) reduziert (p<0,001 (\*\*\*)). Gesamt-Dlg ist im Vergleich zum Wildtyp (100,00±7,42%) auf 73,71±9,71% reduziert (p<0,001 (\*\*\*)). Alle statistischen Tests sind nichtparametrische Mann-Whitney U Tests. Alle Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken im Säulendiagramm: SEM; (A2 m6/7, MIP) Scale Bar: 5µm.

Der Verbleib von 23,7% des *DLin7*-Signals an der NMJ in den *dlgS97-flpV*-Mutanten spricht dafür, dass es zumindest eine partielle Rekrutierung von Metro unabhängig von *DlgS97* an die NMJ geben muss. Frühere Studien an Erythrozyten haben gezeigt, dass das mit Metro verwandte Protein p55/MPP1 an das Spectrin-Zytoskelett bindet (Delaunay, 1995). Daher könnte ein Link zwischen Metro/*DLin-7*, *Drosophila* Band 4.1 Protein Coracle und Spectrin bestehen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde postsynaptisch in heterozygoten *dlgS97-flpV/+* und hemizygoten männlichen Geschwistern (*dlgS97-flpV/Y*)  $\beta$ -Spectrin durch RNAi (Pielage et al., 2005) stark reduziert. Dabei zeigte sich, dass in den Weibchen die Menge an *DLin-7* trotz

offensichtlicher Boutondefekte augenscheinlich nicht reduziert ist. Hingegen ist in den Männchen, die Immunreaktivität von *DLin-7* auf Hintergrundniveau verringert (Bachmann et al., 2010). Dies zeigt, dass in Abwesenheit von DlgS97 Spectrin essentiell für die Rekrutierung von Metro/*DLin-7* ist.

Zusammen mit der Quantifizierung von DlgS97 an *metro*<sup>\*47/</sup>*metro*<sup>Df E3363</sup> NMJs, wonach DlgS97 dort um 43,3% gegenüber dem *Wildtyp*-Level reduziert ist (Kobler, 2007), sowie der Beobachtung, dass dies ebenso in homozygoten *DLin-7*<sup>\*66</sup>- Mutanten der Fall ist (Bachmann et al., 2010), wird deutlich, dass DlgS97 und Metro/*DLin-7* in einem disproportionalen Verhältnis sich gegenseitig an der NMJ verankern (Abb.3.3C, D).



**Abb.3.3: *DLin-7* induziert vermutlich allosterisch die Bindung von Metro an DlgS97. (A, A')** Immunfluoreszenzmarkierungen von NMJs mit AK gegen HRP und Metro (A2 m6/7, MIP) in *dLin-7*-mutanten-Larven bei gleichzeitiger Überexpression von MetroB im Muskel (*UAS-metroB*; *dLin-7*<sup>\*66</sup>/*C57-Gal4*, *Df(3R)dLin-7*<sup>120</sup>). Selbst bei starker Überexpression verbleibt MetroB im Muskel diffus verteilt und lokalisiert nicht im SSR (A'). Dies legt nahe, dass Metro die Bindung an *DLin-7* benötigt, um an DlgS97 zu binden und damit am SSR zu lokalisieren. **(C)** Schematische Darstellung eines allosterischen Effekts der Bindung von *DLin-7* an die L27C-Domäne von Metro, der mutmaßlich zu einer Konformationsänderung der L27N-Domäne führt, die wiederum die Bindung an die L27-Domäne von DlgS97 ermöglicht. **(D)** Abhängigkeitsverhältnisse zwischen DlgS97, Metro und *DLin-7* bezüglich der NMJ-Lokalisierung wie sie sich u.a. aus den Immunfluoreszenzanalysen dieser Arbeit ergeben. Demnach stehen Metro und *DLin-7* in einem absoluten Abhängigkeitsverhältnis zueinander. Hingegen ist die Lokalisation von DlgS97 nur zu ~40% von Metro und/oder *DLin-7* abhängig. D.h. es verbleiben noch ~60% von DlgS97 im SSR bei einem Ausfall eines der beiden Proteine. Drastischer sieht es für Metro/*DLin-7* aus. Bei Abwesenheit von DlgS97 verringert sich deren Anteil im SSR um ~75%. Scale Bar für A, A': 20µm.

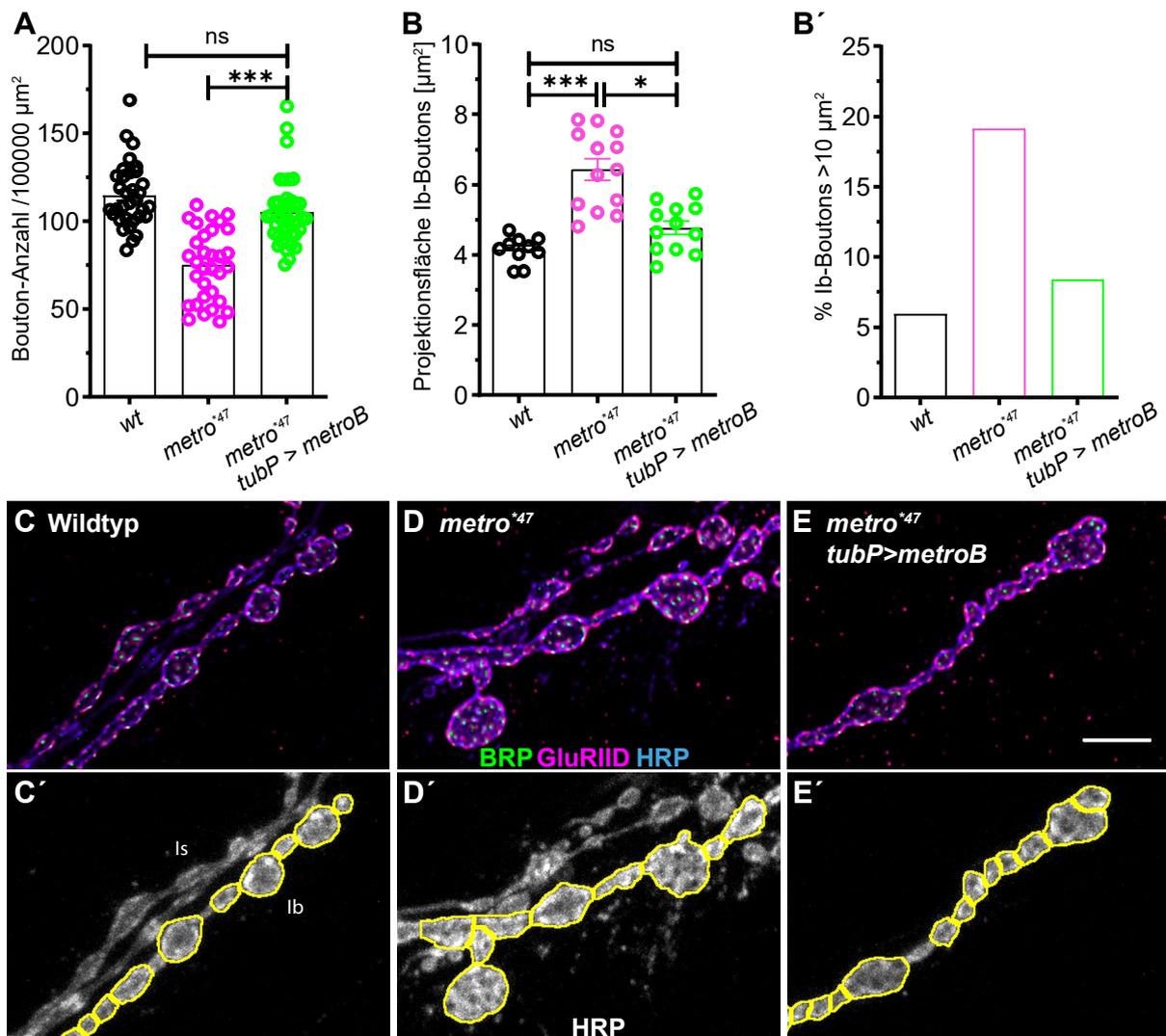
## 3.2 Morphologische Charakterisierung der NMJs von Mutanten des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes

### 3.2.1. NMJs von *metro*-Mutanten besitzen weniger, aber vergrößerte und unregelmäßig geformte Boutons

Das Wachstum der NMJ korreliert im Laufe der larvalen Entwicklung mit dem Wachstum der innervierten Muskeln. Tatsächlich wird durch die fortlaufende Bildung neuer Boutons und damit neuer synaptischer Kontakte sichergestellt, dass der wachsende Muskel ausreichend angesteuert werden kann (Lnenicka und Keshishian, 2000). Eine verringerte Anzahl von Boutons per Muskelfläche geht oftmals mit einer ungenügenden Innervierung des Muskels einher (Aberle et al., 2002; Marqués et al., 2002).

An starken *dlg*-Allelen, wie *dlg<sup>XI-2</sup>* waren strukturelle NMJ-Abnormalitäten, insbesondere größere und irregulär geformte Boutons sowie erweiterte AZs (Thomas et al., 1997; Karunanithi et al., 2002) beobachtet worden. Vergrößerte AZs und Boutongrößen wurden in der Tat auch für zwei *dlgS97*-spezifische Allele (*dlgS97<sup>5</sup>* u. *dlgS97<sup>138</sup>*) auf Basis elektronenmikroskopischer Aufnahmen bestimmt (Mendoza-Topaz et al., 2008). Eine Quantifizierung in dieser Arbeit ergab zudem, dass die Zahl der Typ-Ib-Boutons (m6/7 A2) in *dlg<sup>S97-flpV</sup>* gegenüber Wildtyp-Kontrollen signifikant verringert ist (*dlg<sup>S97-flpV</sup>*:  $76,84 \pm 13,65$ ;  $n=10$  versus Wildtyp:  $114,63 \pm 18,29$ ;  $n=33$ ; jeweils pro  $100000 \mu\text{m}^2$  Muskelfläche;  $p \leq 0,001$ ). Ungeklärt blieb jedoch, ob angesichts der wechselseitigen Abhängigkeit innerhalb des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes, ähnliche strukturelle Defekte auch durch den Verlust von Metro und DLin-7 verursacht werden.

Erste Untersuchungen an hemizygoten *metro*-Mutanten (*metro<sup>\*47</sup> / metro<sup>DfE3363</sup>*, m6/7 A2; Kobler, 2007) deuteten auf eine verminderte Zahl synaptischer Boutons bei gleichzeitig vergrößerter Boutongröße hin. Allerdings ist die verwendete Defizienz so groß, dass Effekte infolge von Haploinsuffizienzen nicht auszuschließen waren, zumal *Rescue*-Experimente mit einem Muskel-spezifisch getriebenem MetroB eine nicht ganz vollständige Rettung erbrachten. Um die Wahrscheinlichkeit von *second site* Effekten bei homozygoten *metro<sup>\*47</sup>*-Mutanten bzw. von Haploinsuffizienzen zu minimieren, wurde eine auf *metro* und wenige Nachbargene begrenzte Defizienz durch trans-chromosomale FRT-Rekombination (Parks et al., 2004) erzeugt (*metro<sup>miniDf</sup>*; Kapitel 2.7). In einer begleitenden Arbeit (Dinka, 2011) wurde diese verwendet und gezeigt, dass *metro<sup>\*47</sup> / metro<sup>miniDf</sup>*-mutante NMJs sowohl an Muskel 4 als auch an Muskel 6/7 signifikant verringerte Boutonzahlen aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der Boutons im Verhältnis zur innervierten Muskelfläche sowie deren Größe in homozygoten *metro<sup>\*47</sup>*-Mutanten und entsprechenden *Rescue*-Genotypen quantifiziert.



**Abb.3.4: Metro bestimmt Zahl und Größe synaptischer Boutons.** (A) Anzahl der Boutons an m6/7 in A2, bezogen auf 100000 $\mu\text{m}^2$  Muskelfläche. Gegenüber der Boutonzahl im Wildtyp (*Canton-S*;  $114,6 \pm 18,29$ ,  $n=33$  NMJs) ist die Anzahl der Boutons in homozygoten *metro*-Mutanten (*metro*<sup>47</sup>/*metro*<sup>47</sup>:  $75,30 \pm 20,12$ ,  $n=32$  NMJs) signifikant reduziert. Dieser Phänotyp wird durch ubiquitäre Expression von MetroB gerettet (*UAS-metroB*; *metro*<sup>47</sup>/*metro*<sup>47</sup>; *tubP-Gal4/+*:  $105,05 \pm 19,01$ ,  $n=39$  NMJs). (B) Die Projektionsflächen der Typ Ib-Boutons sind in den *metro*-Mutanten ( $6,43 \pm 1,1 \mu\text{m}^2$ ,  $n=13$ ) gegenüber denen im Wildtyp ( $4,14 \pm 0,38 \mu\text{m}^2$ ,  $n=10$ ) stark erhöht. Auch hier führt ubiquitäre Expression von MetroB zu einer Rettung ( $4,77 \pm 0,67 \mu\text{m}^2$ ,  $n=12$ ). Jeder Wert stellt den Mittelwert der Boutonflächen einer NMJ dar. Im Anhang (Tabelle A1) ist die Anzahl der Larven, der NMJs, der aufgenommenen Bildstapel und der vermessenen Boutons aufgelistet. (B') Zur Verdeutlichung des Größenzuwachses der Boutonflächen in den *metro*-Mutanten (B), ist der prozentuale Anteil der Boutons mit einer Fläche von mehr als  $10 \mu\text{m}^2$  gezeigt. Statistischer Test in (A): One-Way ANOVA mit Bonferroni's *multiple comparisons* Test, in (B): Nichtparametrischer Kruskal-Wallis Test plus Dunn's *multiple comparison*. Alle Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben, Fehlerbalken repräsentieren SEM. (C, D und E) Repräsentative Aufnahmen von Nervendigungen aller drei Genotypen. Überlagerung der anti-BRP-, anti-GluRIID- und anti-HRP-AK-Markierungen. (C', D' und E') Anhand der HRP-IF mit ImageJ/Fiji segmentierte ROIs (gelb) mit Beschränkung auf Typ Ib-Boutons. (A2 m6/7, MIP) Scale Bar: 5 $\mu\text{m}$ .

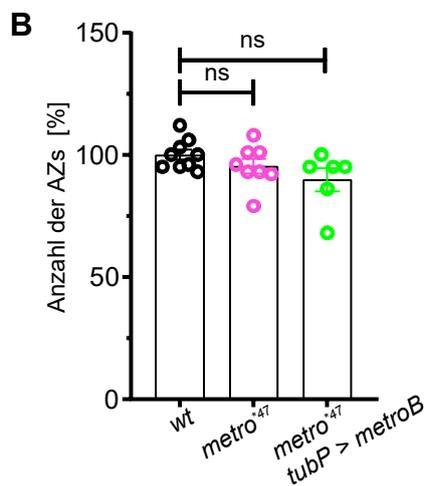
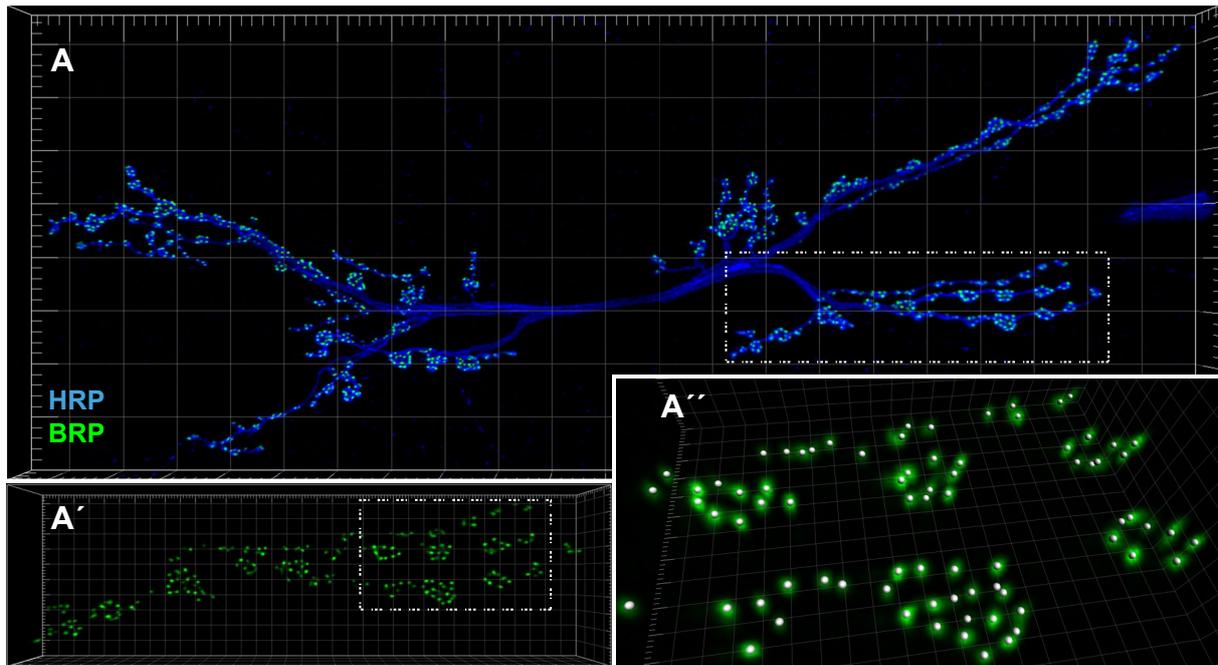
Abbildung 3.4A zeigt, dass in homozygoten *metro*<sup>47</sup>-Mutanten ebenfalls eine signifikante Verminderung der Boutonzahlen um ~35% im Vergleich zum Wildtyp ( $75,30 \pm 20,12$ ;  $n=32$

versus  $114,63 \pm 18,29$ ;  $n=33$ ; jeweils pro  $100000 \mu\text{m}^2$  Muskelfläche;  $p \leq 0,001$ ) gefunden werden konnte. Abbildung 3.4A zeigt weiterhin, dass eine Expression von *UAS-metroB* mit Hilfe des ubiquitären *tubP-Gal4*-Treibers im homozygoten *metro*<sup>\*47</sup>-mutanten Hintergrund die Boutonzahlen weitestgehend auf Wildtypniveau bringt ( $105,05 \pm 19,01$ ;  $n=39$ ;  $p > 0,05$ ). Damit ist gezeigt, dass die Ursache für die Reduzierung der Boutonanzahl in der Abwesenheit Metros begründet ist.

Bei der Quantifizierung der Boutonanzahl fiel auf, dass in den *metro*<sup>\*47</sup>-mutanten NMJs die Boutons in der Regel vergrößert und irregulär geformt erschienen. Flächenmessungen an MIPs von konfokalmikroskopischen Bildstapeln (Abb.3.4C-E) ergaben eine im Vergleich zum Wildtyp ( $4,14 \pm 0,38 \mu\text{m}^2$ ;  $n=10$ ) ~55%ige Vergrößerung der durchschnittlichen Boutonprojektionsflächen in den homozygoten *metro*<sup>\*47</sup>-Mutanten ( $6,43 \pm 1,1 \mu\text{m}^2$ ;  $n=13$ ;  $p \leq 0,001$ ; Abb.3.4B). Dabei streuen die gemessenen Boutonflächen der *metro*<sup>\*47</sup>-Mutanten über einen breiten Bereich. Tatsächlich waren in der Mutante, 19,1% der Boutons größer als  $10 \mu\text{m}^2$ , hingegen im Wildtyp nur 5,9% (Abb.3.4B').

Die Abbildungen 3.4B, B' zeigen weiterhin, dass auch hier der wildtypische Zustand bis auf nicht-signifikante Unterschiede durch ubiquitäre Expression (*tub-Gal4*) von *UAS-metroB* wiederhergestellt werden kann, und damit, dass der Verlust von Metro für diesen Phänotyp verantwortlich ist (durchschnittliche Boutonfläche  $4,77 \pm 0,67 \mu\text{m}^2$ ;  $n=12$ ;  $p > 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp; Abb.3.4B': % Boutons größer  $10 \mu\text{m}^2 = 8,4$ ).

Es stellte sich die Frage, ob die geringere Anzahl von Boutons bei Ausfall von Metro mit einer zahlenmäßigen Reduzierung der synaptischen Überträgerstellen einhergeht, oder ob die gleichzeitige Vergrößerung der Boutons dem entgegenwirkt. Für eine entsprechende Quantifizierung wurden die Aktiven Zonen (AZs) der NMJs mit Hilfe des Antikörpers NC82 markiert. Dieser AK ist gegen das Protein Bruchpilot (BRP) gerichtet, welches ein Hauptbestandteil der sogenannten T-Bars ist (Wagh et al., 2006), eine elektronendichte Struktur, die in wildtypischen *Drosophila*-Larven fester Bestandteil der AZ ist. Mittels dreidimensionaler Detektion der Bruchpilot-Spots (Abb.3.5A-A''), siehe auch Kapitel 2.19), wurden die AZs sowohl im Wildtyp, als auch in den homozygoten *metro*<sup>\*47</sup>-Mutanten quantifiziert. Es ergaben sich hier jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl der auf die Muskelfläche normalisierten Zahl synaptischer Kontakte der NMJs von Muskel 6 und 7 im Abdominalsegment 2 (Wildtyp:  $1548 \pm 96$  AZs pro  $100000 \mu\text{m}^2$ , Anzahl der NMJs analysiert:  $n=9$  versus *metro*<sup>\*47</sup>/*metro*<sup>\*47</sup>:  $1472 \pm 132$ ;  $n=8$ ;  $p > 0,05$ ). Auch bei *tubP-Gal4* getriebenen *UAS-metroB* in *metro*-Mutanten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $1389 \pm 166$ ,  $n=6$ ;  $p > 0,05$ ; Abb.3.5B). Unter Berücksichtigung der vergrößerten Boutonprojektionsflächen bei gleichzeitig weniger Boutons zeigt dieses Ergebnis, dass die Anzahl der AZs pro Bouton in den *metro*-Mutanten erhöht ist.



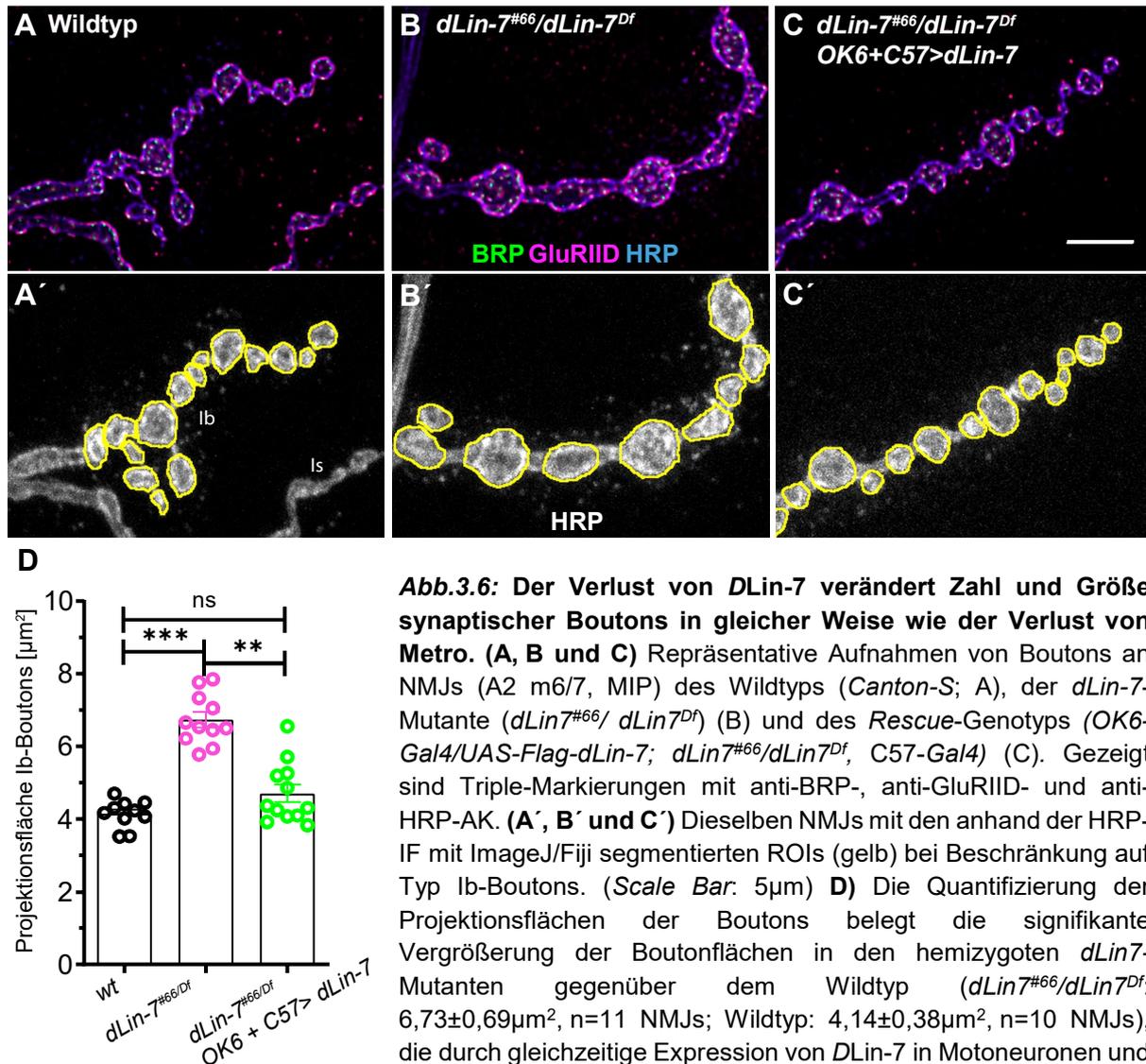
**Abb.3.5: Die Anzahl der AZs ist von Metro unabhängig.** (A) In Imaris 3D-dargestellte Wildtyp-NMJ (A2 m6/7, MIP), markiert mittels anti-HRP- und anti-BRP-AK. (A') Vergrößerte Region der BRP-IF aus A (gestricheltes Rechteck). (A'') Vergrößerung aus A' (gestricheltes Rechteck) zur Verdeutlichung der zuverlässig erfolgten Spot-Detektion (hellgraue Punkte auf BRP-IFs). Die 3D-Ansicht beinhaltet eine moderate Drehung, so dass die Gittergröße als Maßstab dient: 10µm in (A), 2µm in (A') und 1µm in (A''). (B) Anzahl der AZs nach Normalisierung auf die Muskelfläche, prozentual bezogen auf den Wildtyp (*Canton-S*). Es ergaben sich pro 100000µm<sup>2</sup> Muskelfläche für den Wildtyp 1548±96 AZs (100±6,16%, n=9 NMJs); für *metro*<sup>47</sup>/*metro*<sup>47</sup>: 1472±132 AZs (95,38±8,57%, n=8 NMJs); für *UAS-metroB*; *metro*<sup>47</sup>/*metro*<sup>47</sup>; *tubP-Gal4/+*: 1389±166 AZs (89,83±11,62%,

n=6 NMJs). Der nichtparametrische Kruskal-Wallis Test plus Dunn's *multiple comparison* ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Alle Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben, die Fehlerbalken entsprechen SEM.

### 3.2.2. *dLin-7*-Mutanten phänotypieren *metro*-Mutanten bezüglich der NMJ-Morphologie

Konsequenterweise sollten *dLin-7*-Mutanten sehr ähnliche strukturelle NMJ-Phänotypen aufzeigen wie *metro*-Mutanten. Wie erwartet, ergab die Zählung an sowohl homozygoten *dlin7*<sup>#66</sup> als auch hemizygoten *dLin-7*<sup>#66</sup>/*dLin-7*<sup>Df</sup> NMJs eine ähnlich signifikante Verminderung ( $p < 0,001$ ) der Boutonanzahl wie bei den *metro*-Mutanten, nämlich um ~30 Prozent im Vergleich zum Wildtyp (*dlin7*<sup>#66</sup>/*dlin7*<sup>#66</sup>: 77,68±9,88; NMJs analysiert: n=12; *dlin7*<sup>#66</sup>/*dlin7*<sup>Df</sup>: 81,91±16,23; n=30; Wildtyp: 114,63±18,29; n=33; jeweils pro 100000µm<sup>2</sup> Muskelfläche).

Auch für die Boutongrößen ergaben sich ähnliche Flächenwerte wie in den *metro*-Mutanten. Es konnte eine signifikante Vergrößerung ( $p < 0,001$ ) in den *dlin7<sup>#66</sup>/dlin7<sup>Df</sup>*-Allelen von ~63 Prozent ( $6,73 \pm 0,69 \mu\text{m}^2$ ;  $n=11$ ) gegenüber dem Wildtyp ( $4,14 \pm 0,38 \mu\text{m}^2$ ;  $n=10$ ) festgestellt werden (Abb.3.6A-B' und D). *Rescue*-Experimente mit gleichzeitig prä- und postsynaptischer Expression (*OK6-Gal4+C57-Gal4*) eines *UAS-dLin-7*-Transgens war erfolgreich ( $4,70 \pm 0,83 \mu\text{m}^2$ ;  $n=12$ ;  $p > 0,05$ ; Abb.3.6C-D) und belegt dabei die Spezifität der *dLin-7*-mutanten Phänotypen.



Jeder Wert stellt den Mittelwert der Boutonflächen einer NMJ dar. Statistischer Test: Nichtparametrischer Kruskal-Wallis Test plus Dunn's *multiple comparison*. Alle Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken im Säulendiagramm: SEM

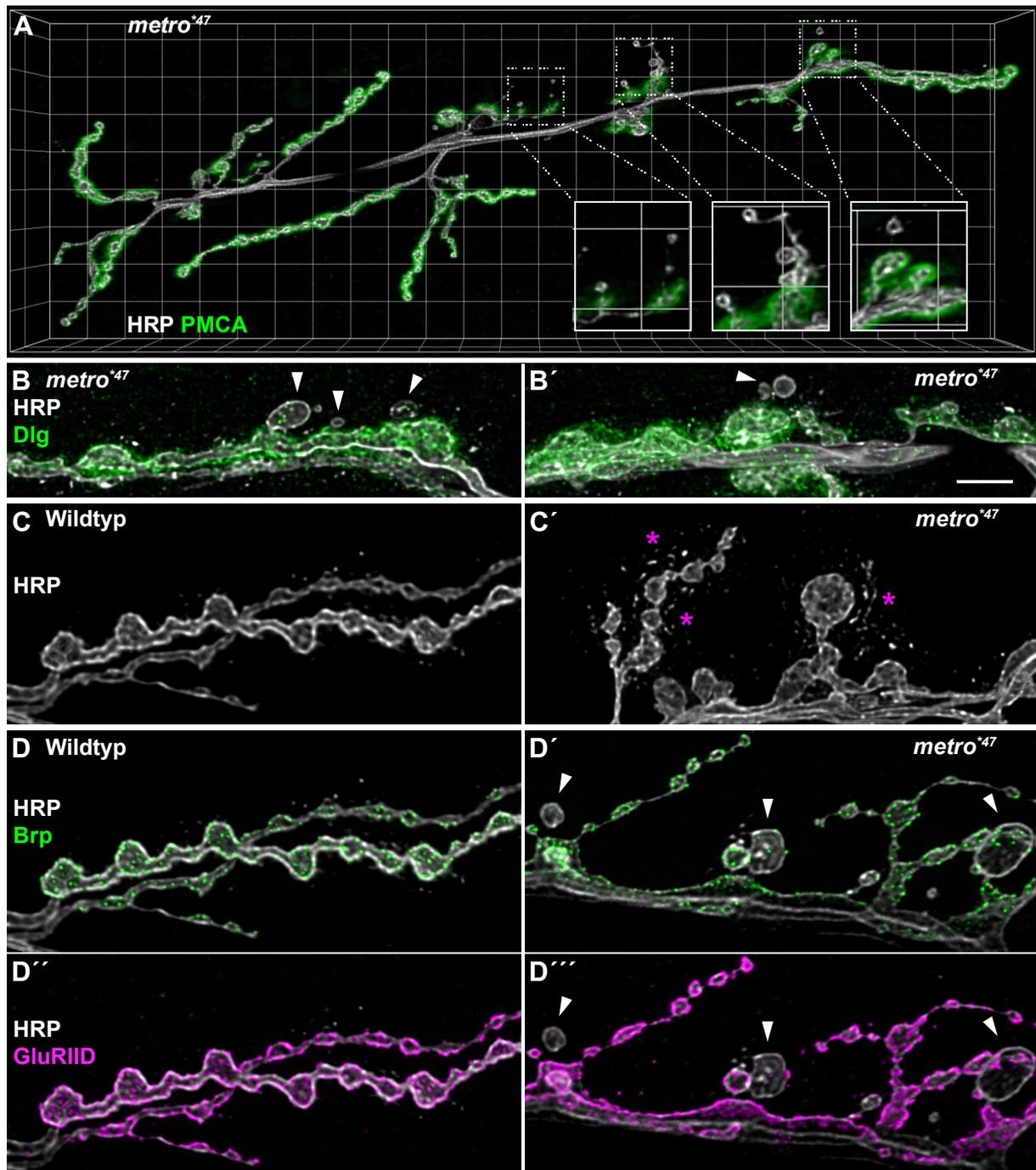
### 3.2.3. Das vermehrte Auftreten undifferenzierter Boutons ist ein weiteres Merkmal von Mutanten des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes

Die Markierung der Nervendigungen mit dem HRP- (*horse radish peroxidase*) AK gibt bei genauerer Untersuchung ein fein granuliertes Muster preis, das sich auf postsynaptischer Seite im Bereich des SSR befindet. Durchgeführte Untersuchungen von Fuentes-Medel et al. (2009) weisen darauf hin, dass es sich hierbei um Reste präsynaptischer Membranauswüchse, sogenannter Synaptopodien, handelt. Weiterhin wurde in der Literatur das Aufkommen von *Ghost*-Boutons beschrieben (Ataman et al., 2008). Diese Boutons zeichnen sich, wie bisher untersucht, durch eine Abwesenheit von postsynaptischen Proteinen, wie Dlg, aus. Sie stellen Boutons dar, deren synaptische Differenzierung weitgehend ausgeblieben ist und die im Regelfall durch Glia- und/oder Muskelzellen beseitigt werden (Ataman et al., 2008).

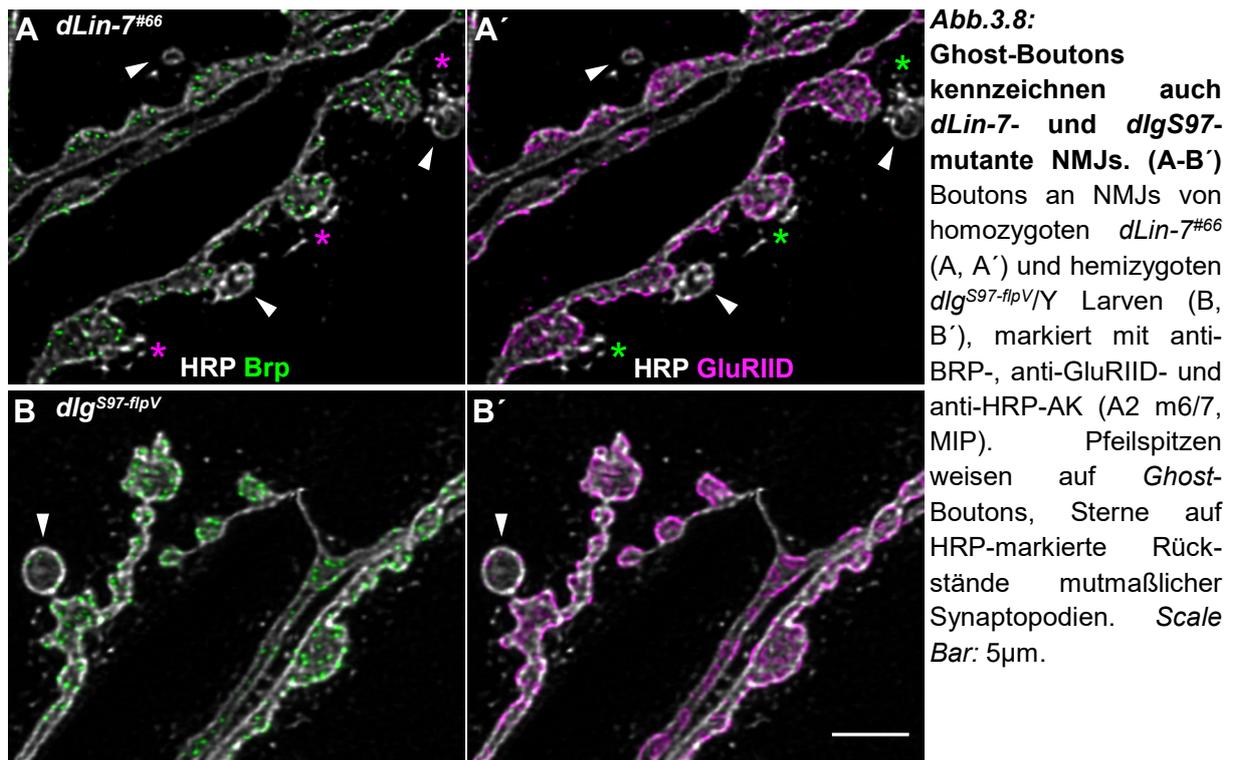
Die konfokalmikroskopische Charakterisierung von NMJs homozygoter *metro*<sup>\*47</sup>-Mutanten zeigte, dass dort Synaptopodien (Abb.3.7A), ihre Reste (Abb.3.7C') als auch *Ghost*-Boutons (Abb.3.7B, B', D') deutlich häufiger auftreten als an wildtypischen NMJs (Abb.3.7C, D, D''), wo diese phänotypischen Elemente Ausnahmeerscheinungen darstellen. Zum Teil weisen die *Ghost*-Boutons positive Signale für präsynaptisches Bruchpilot und/oder postsynaptische GluR-Felder auf (Abb.3.7D', D''').

Da sich die Ausbildung synaptischer Kontakte über Stunden erstreckt (Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008) ist davon auszugehen, dass derartige *Ghost*-Boutons bereits längere Zeit existieren. Somit bleibt offen, ob sie einen unvollständigen Differenzierungsprozess oder einen Abbauzustand repräsentieren.

Das Auftreten von *Ghost*-Boutons war auch in homozygoten *dlin-7*<sup>#66</sup>- und hemizygoten *dlg*<sup>S97-*flpsV*</sup>-Mutanten auffällig (Abb.3.8).

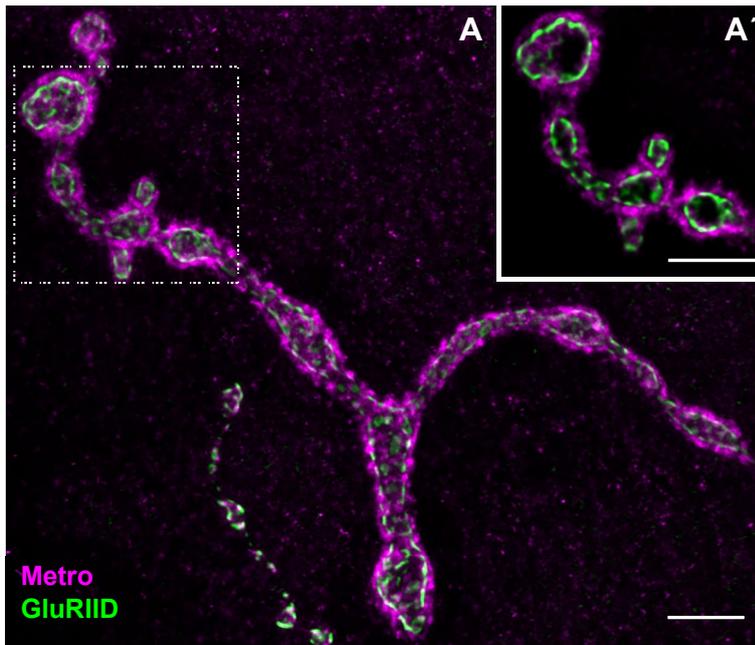


**Abb.3.7: Boutons mit Differenzierungsdefiziten sind ein Kennzeichen *metro*-mutanter NMJs.** (A) 3D-Darstellung einer *metro*<sup>47</sup>-mutanten NMJ (A2 m6/7, MIP), markiert mittels anti-*d*PMCA- und anti-HRP-AK. Beispiele für das vermehrte Auftreten sogenannter *Ghost*-Boutons, bei denen u.a. das Fehlen postsynaptischer Proteine (hier PMCA) auffällt, sind durch die eingerahmten Ausschnittsvergrößerungen hervorgehoben; Gittergröße: 10µm. (B, B') Beispiele für *Ghost*-Boutons ohne postsynaptisches Dlg (Pfeilspitzen) an *metro*<sup>47</sup>-NMJs (A2 m6/7) markiert mittels anti-Dlg<sub>PDZ</sub>- und anti-HRP-AK. (C-D''') Vergleich von mittels anti-HRP-, anti-BRP und anti-GluRIID-AK markierten wildtypischen (C, D, D'') und *metro*<sup>47</sup>-mutanten Terminalen (C', D', D'''). Granuläre, HRP-IF-positive Rückstände verbleiben vor allem an *metro*<sup>47</sup>-NMJs (C', Sternchen). Die an mutanten NMJs häufig auftretenden *Ghost*-Boutons weisen noch vereinzelte Marker für synaptische Kontakte, wie an der BRP- bzw. GluRIID-IF zu sehen ist, auf. Scale Bar für B-D''': 5µm.



### 3.3 Quantitative Analyse von Glutamatrezeptorfeldern von wildtypischen und mutanten NMJs anhand 3D-rekonstruierter Konfokalaufnahmen

Der an *dlg<sup>S97</sup>*-spezifischen Mutanten erhobene EM-Befund, wonach die AZs der NMJs vergrößert sind (Mendoza-Topaz et al., 2008), führte zu der Frage, ob der DlgS97-Komplex auch die Größe der Glutamat-Rezeptorfelder (GRFs) bestimmt. Zuvor wurde geprüft, ob Metro, wie Dlg (Abb.1.3C, C'), außerhalb der GRFs lokalisiert. Wie in Abbildung 3.9 gezeigt ist dies erwartungsgemäß der Fall. Um die GRF-Größen objektiv lichtmikroskopisch auf immunzytochemischer Basis quantifizieren zu können, wurde in dieser Arbeit zunächst die Etablierung eines geeigneten Analyseverfahrens angestrebt. Neben der ausführlichen Darstellung im Methodenteil (Kapitel 2.21) werden im Folgenden die grundlegenden Überlegungen dazu dargelegt.



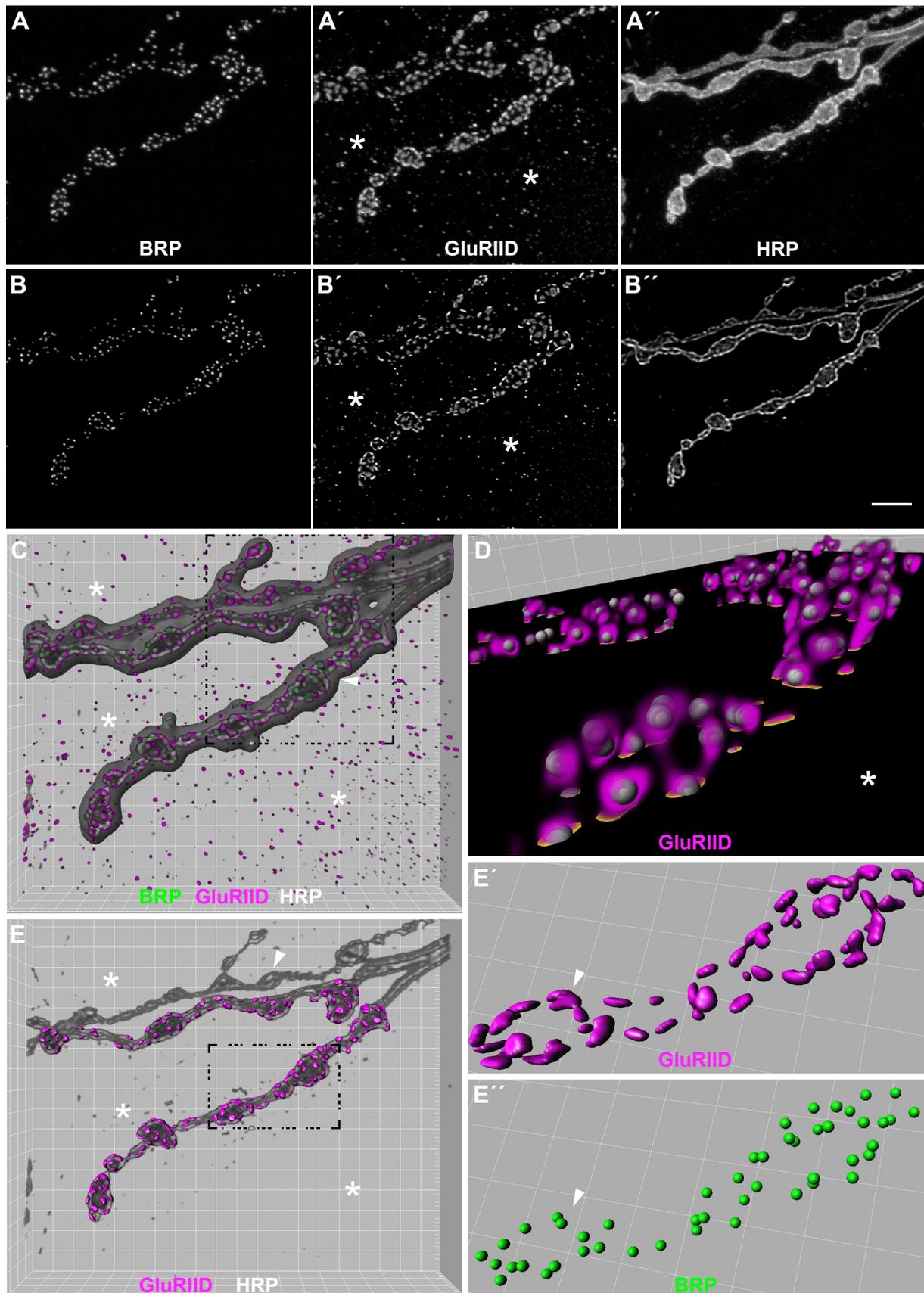
**Abb.3.9: Wie Dlg ist auch Metro im SSR perisynaptisch lokalisiert. (A-A')** Immunfluoreszenzmarkierungen einer wildtypischen NMJ mittels anti-Metro- und anti-GluRIID-AK, (A3 m4, MIP, dekonvoluiert) zeigen die Lokalisierung von Metro relativ zu den GRFs. Der aus A stammende und als einzelner optischer Schnitt dargestellte Ausschnitt (A') zeigt die klare Trennung zwischen Metro (magenta) und GluRIID (grün) und damit die strikt perisynaptische Lokalisierung, wie sie auch für DlgS97 gegeben ist (vgl. auch Abb. 1.3C'). Scale Bar für A und A': 5  $\mu$ m.

### 3.3.1. Einrichtung eines Analyseverfahrens zur Bestimmung der Rezeptorfeldgrößen an den NMJs

Die Analysemethode sollte eine unvoreingenommene Detektion der GRFs, d.h. eine weitestgehend automatische Segmentierung basierend auf Bildanalysealgorithmen, ermöglichen und dabei in der Lage sein, die dreidimensionale Lage der Rezeptorfelder zu berücksichtigen. Sie sollte ferner extrasynaptische Rezeptoren ausschließen und eine große Anzahl der Rezeptorfelder pro NMJ vermessen können. Dies wäre ein enormer Vorteil gegenüber TEM-Aufnahmen, die bedingt durch die Methode i.d.R. nur eine geringe Anzahl von Messungen erlauben.

Um die GluR-Subtypen der NMJ (A-Typ- und B-Typ-Rezeptoren) in ihrer Gesamtheit zu erfassen, wurde die GluRIID-Untereinheit, die in allen Rezeptoren vertreten ist (Qin et al., 2005), als Basis für die Vermessung mit einem entsprechenden AK (anti-GluRIID) detektiert. In allen Präparaten wurden zusätzlich die AZs sowie die neuronale Membran mit AK gegen BRP (anti-BRP) respektive anti-HRP, markiert (Abb.3.10A-B'').

Es ist bekannt, dass in den synaptischen Kontakten wildtypischer NMJs i.d.R. jeweils eine mit anti-BRP-markierte AZ präsynaptisch dem postsynaptischen Rezeptorfeld gegenübersteht (Pielage et al., 2006; Wagh et al., 2006). Dies wurde als Kriterium zur Überprüfung der Analysemethode herangezogen. Der anti-HRP-AK unter anderen zur *Maskierung* der NMJs, um extrasynaptisch markierte Rezeptorfelder zu separieren.



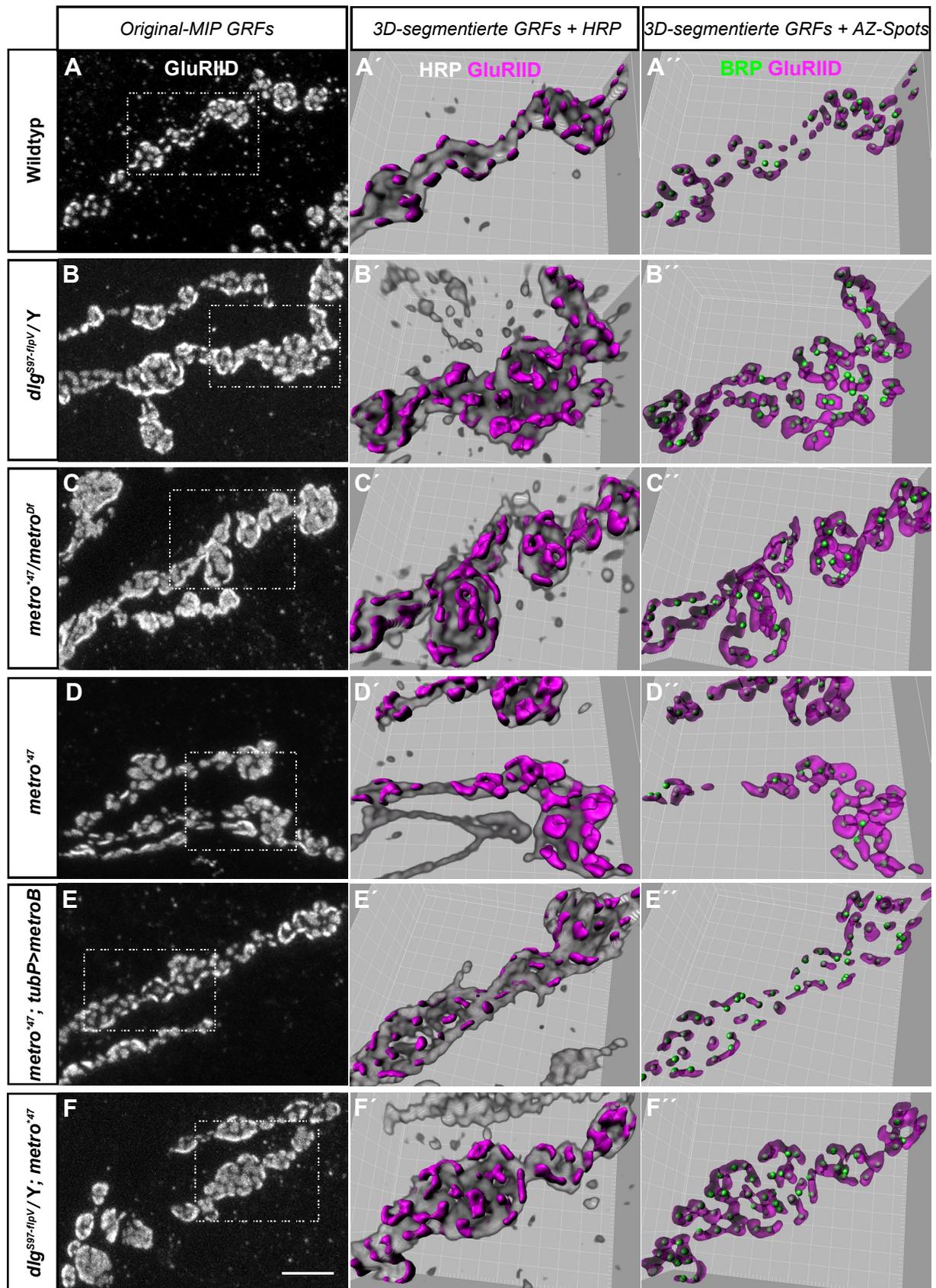
**Abb.3.10: Verfahren zur Segmentierung der GRFs in 3D.** (A-A'') Projektionen konfokaler Bildstapel zeigen Boutons einer wildtypischen NMJ nach Markierung mittels anti-BRP-, anti-GluRIID- und anti-HRP-AK (A2 m6/7, MIP). (B-B'') zeigt die 3 Kanäle ebenfalls als MIP nach Dekonvolution mit *AutoDeblur*, die zu einer deutlichen Schärfung der Konturen geführt hat. Auch der Hintergrund ist

**Abb.3.10 (Fortsetzung):** stark reduziert. Sterne in der GluRIID-Immunfluoreszenz (IF) deuten auf die Muskeloberfläche, über die zahlreiche extrasynaptische GluRs verteilt sind. **(C)** Dieselbe NMJ in Imaris 3D-Darstellung (*Blend*-Modus) bei Überlagerung aller 3 Markierungen. Zusätzlich ist eine aufgeschnittene, übergroße Oberfläche (grau) gezeigt, die die markierten Strukturen vollumfassend einschließt. Die Pfeilspitze deutet auf die Grenze der Oberfläche hin. Die Sterne deuten wiederum auf die extrasynaptischen GluRs hin, die mit Hilfe der erzeugten Oberfläche später eliminiert werden (Kapitel 2.21). Die gestrichelte Box entspricht der in **(D)** aus seitlicher Perspektive gezeigten Fläche der GluRIID-IF. An dieser sind die detektierten Keime (*seed points*; graue Kugeln), sowie die auf Schwellenwert basierende, binärisierte Fläche (orange) im *ortho slicer* Modus (Stern) dargestellt. Anhand der binärisierten Fläche wird die Oberflächenausdehnung der GRFs bestimmt. **(E)** zeigt dieselbe Ansicht aus (C), jedoch ohne zusätzliche Oberfläche, dafür aber mit segmentierten GRFs. Die IF-Markierung extrasynaptischer GluRs im Muskelbereich (Sterne) ist eliminiert (Kapitel 2.21) und die Pfeilspitze deutet auf ausgeschlossene GRFs an Nervendigungen vom Typ Is. **(E', E'')** Vergrößerte Darstellung des gerahmten Bereichs in (E) mit segmentierten GRFs (E') und zugehörigen AZs (E''). Die Pfeilspitze deutet beispielhaft auf eine erfolgreiche Separierung eng benachbarter GRFs (E') bzw. auf die entsprechend eng benachbarten AZs (E''). *Scale Bar* für A-B'': 5µm, Gittermaßstab in C-E'': 2µm.

Um konfokalmikroskopische Bildstapel dreidimensional auszuwerten, bedarf es eines Bildanalyseprogramms, welches es nicht nur erlaubt die aufgenommene Struktur räumlich darzustellen, sondern diese auch in 3D zu segmentieren und zu vermessen. Hierfür wurde das von der Firma Bitplane AG entwickelte Programm Imaris verwendet. Die Bearbeitung in 3D zeigt Grenzen der lichtmikroskopischen Darstellung auf. Beugungsbedingte Abbildungsfehler, vor allem in der Tiefenausdehnung von punktförmigen Strukturen, lassen eine Struktur verzerrt erscheinen. Um diesen Abbildungsfehler, der durch die *optical transfer function* (OTF) des Mikroskops bedingt ist und mit der sogenannten *Point Spread Function* (PSF; Biggs, 2010) beschrieben wird, weitestgehend auszugleichen, wurden die Bildstapel zuerst dekonvoluiert (AutoDeblur, MediaCybernetics; Abb.3.10B-B''), bevor sie in Imaris der eigentlichen Segmentierung unterzogen wurden. Die Segmentierung der GRFs basiert auf der Bildung von synaptischen GluR-Oberflächen, auf die eine anschließende Detektion des lokalen Maximums innerhalb jeder Oberfläche als Keim (*seed point*) folgt. Von diesem Keim ausgehend, werden die Grenzen der jeweiligen Oberflächen anhand eines Graustufen-Schwellwertes automatisch bestimmt (Abb.3.10C-E').

Aus dieser Analyse ergaben sich Werte, die annäherungsweise eine flache zylinderähnliche Oberfläche der Rezeptorfelder repräsentieren. Die Rezeptorfelder in der Membran stellen jedoch planare Strukturen dar. Nimmt man eine Zylinderhöhe von 100-150nm an, so entspräche eine Fläche von 1,3µm<sup>2</sup>, wie sie für Rezeptorfelder im Wildtyp gemessen wurde (Kapitel 3.3.2), einem Durchmesser von ca. 800nm. Dies stimmt in der Größenordnung gut mit publizierten Daten für die Größe von AZs überein (Stewart et al., 1996; Mendoza-Topaz et al., 2008).

### 3.3.2 Der Verlust der Proteine des Dlg97-Metro-DLin-7-Komplexes führt zu vergrößerten GluR-Feldern



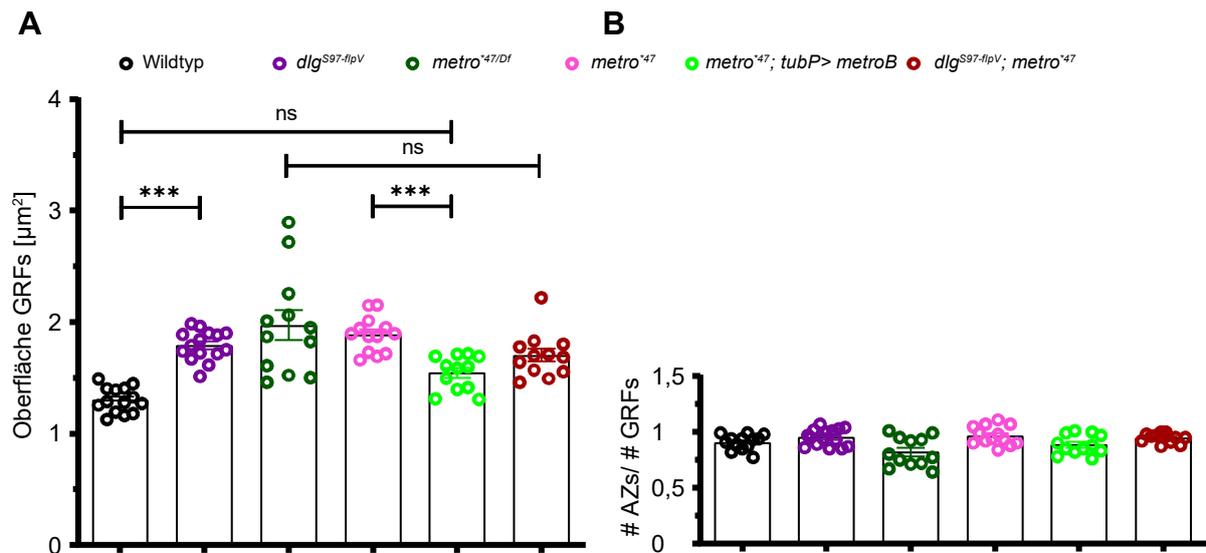
**Abb.3.11: Die 3D-Segmentierung offenbart eng benachbarte GRFs an *metro*- und *dlgS97*-mutanten NMJs.** Gezeigt sind Boutons an A2 m6/7 von verschiedenen Genotypen, markiert mit anti-BRP-, anti-GluRIID- und anti-HRP-AK. (A-F) MIP von konfokal-mikroskopisch aufgenommenen Bildstapeln der GluRIID-IF. (A'-F'') Vergrößerte Ausschnitte der eingerahmten Bereiche aus (A-F) in 3D *blend mode*-Darstellung mit segmentierten GRFs und HRP-IF (grau) (A'-F') bzw. segmentierten GRFs und BRP-definierten AZs (A''-F''). Auffällig sind im Vergleich zum Wildtyp mit seinen recht gleichmäßig verteilten GRFs (A-A'') die häufig aneinandergrenzenden GRFs in den Mutanten für *dlgS97* (B-B'') und *metro* (C-C'', D-D'') sowie in der Doppelmutante (F-F''). In *metro*<sup>\*47</sup>-Mutanten wird dieser Phänotyp durch ubiquitäre Expression von *MetroB* deutlich abgeschwächt (E-E''). Die 1:1 Zuordnung der GRFs zu den AZs bleibt in den mutanten Genotypen weitestgehend erhalten (siehe auch Statistik in Abb.3.12A'). *Scale Bar* für A-F: 5µm, Gittermaßstab für A'-F'': 1µm.

Das Analyseverfahren wurde zunächst zur GRF-Größenbestimmung an NMJs von *dlg*<sup>S97-flp5</sup>-Mutanten (Abb.3.11B-B'') angewandt. Dabei ergab sich eine im Mittel ~40-prozentige signifikante ( $p \leq 0,001$ ) Vergrößerung der Rezeptorfelder ( $1,79 \pm 0,13 \mu\text{m}^2$ ; NMJs analysiert:  $n=15$ ) gegenüber dem Wildtyp ( $1,30 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$ ;  $n=14$ ; Abb.3.11A-A'' und 3.12A). Dieser Befund zeigt, dass bei Verlust von *DlgS97* nicht nur die AZs (Mendoza-Topaz et al., 2008), sondern auch die GRFs vergrößert sind.

Im nächsten Schritt wurden dann die GRFs an hemi- und homozygoten *metro*<sup>\*47</sup>-Mutanten vermessen. Wie in Abbildung 3.11 C und D zu sehen, erscheinen viele Rezeptorfelder der Mutanten in der MIP extrem vergrößert bzw. miteinander verschmolzen. Tatsächlich zeigen EM-Aufnahmen, dass die Rezeptorfelder in den *metro*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wesentlich näher beieinanderliegen (Bachmann et al., 2010). Die 3D-Darstellung und Segmentierung (Abb.3.11A'-F') ermöglichte jedoch eine Separierung von aneinandergrenzenden GRFs, denen wiederum einzelne BRP-*Spots* zugeordnet werden konnten (Abb.3.11A''-F''). Trotz dieser Trennung ergaben sich, ähnlich wie für *dlg*<sup>S97-flpV</sup>, deutlich erhöhte Werte für die *metro*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (*metro*<sup>\*47</sup>/*metro*<sup>Df(2R)E3363</sup>:  $1,97 \pm 0,46 \mu\text{m}^2$ ;  $n=12$ ; *metro*<sup>\*47</sup>/*metro*<sup>\*47</sup>:  $1,89 \pm 0,16 \mu\text{m}^2$ ;  $n=13$ ;  $p \leq 0,001$ ; Abb.3.12A).

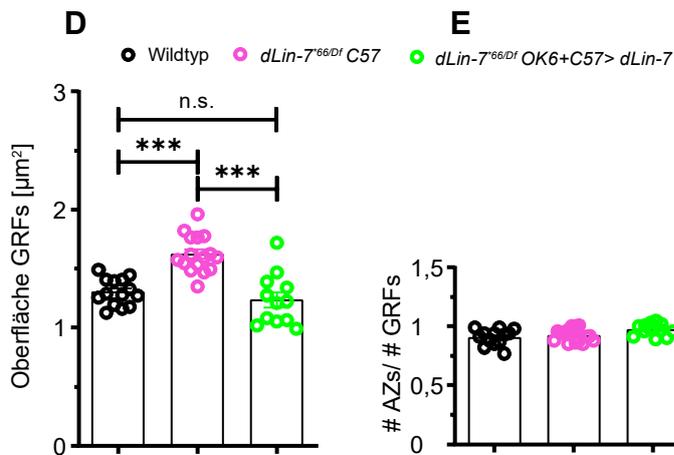
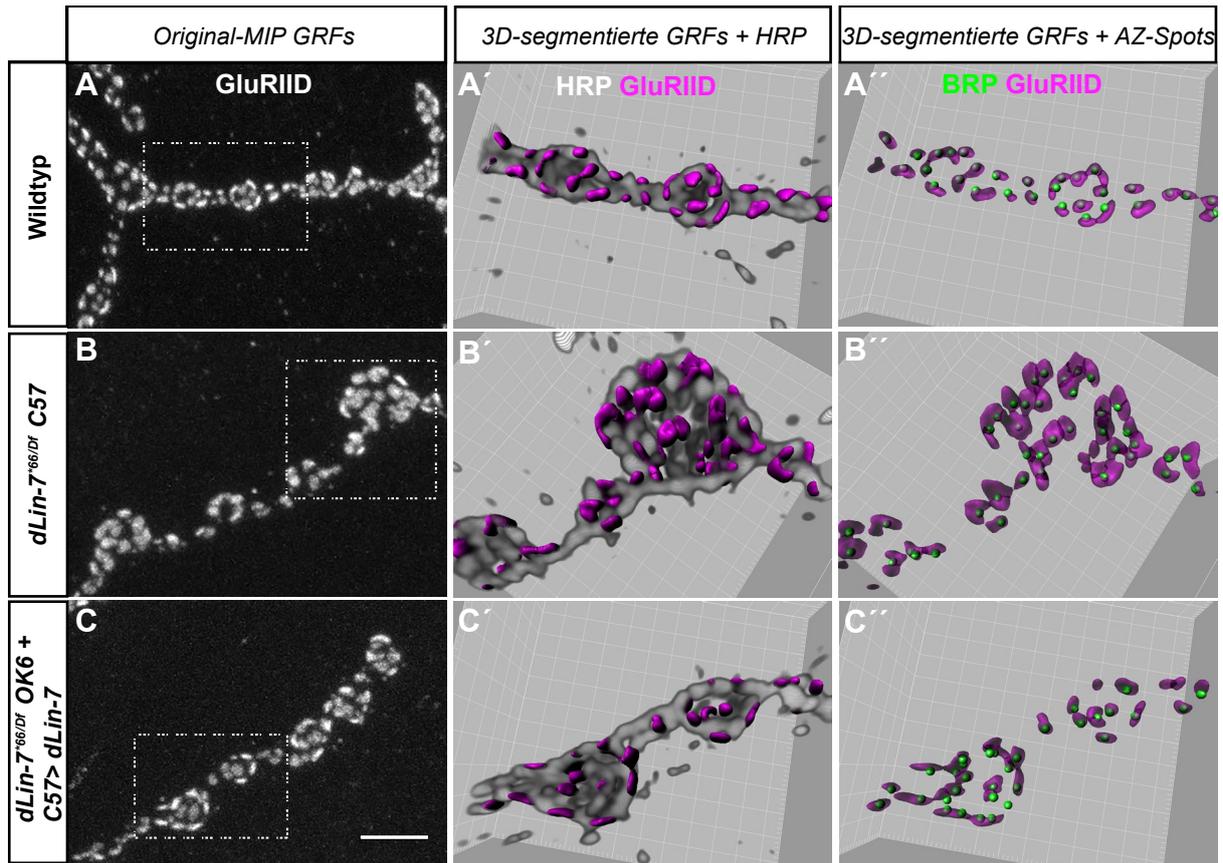
Um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp tatsächlich durch den Verlust von *Metro* verursacht ist, wurde ein Rettungsexperiment durchgeführt. Hierbei wurde *UAS-metroB* mit Hilfe des *tubP-Gal4*-Treibers ubiquitär in homozygoten *metro*<sup>\*47</sup>-Mutanten exprimiert. Wie in Abb.3.11E zu sehen und in der Statistik Abb.3.12A zu entnehmen, führte dies zu einer signifikanten Verkleinerung der GRFs ( $1,55 \pm 0,15 \mu\text{m}^2$ ;  $n=12$ ;  $p > 0,05$ ), deutlich in Richtung Wildtyp. Abbildung 3.11E bis E'' illustriert ferner die reguläre und gut getrennte Anordnung der synaptischen Kontakte, die der wildtypischen Situation sehr nahekommt (Abb. 3.11A- A'').

*DlgS97* und *Metro* stehen zwar im wechselseitigen Abhängigkeitsverhältnis, das aber in beiden Richtungen nicht hundertprozentig ausgeprägt ist (Kapitel 3.1). Denkbar wäre, dass die Proteine auch getrennt voneinander Aufgaben in der strukturellen Stabilisierung der Synapse



**Abb.3.12: Der Ausfall von DlgS97 und/oder Metro führt zu vergrößerten GRFs. (A)** Quantitative Analyse von GRFs nach deren 3D-Segmentierung gemäß Abb.3.10. und wie für die betreffenden Genotypen in Abb.3.11 illustriert. Gegenüber dem Wildtyp (*Canton-S*) sind die GRFs der *dlg<sup>S97-flpV</sup>*-Mutanten signifikant vergrößert ( $1,30 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$ ,  $n=14$  NMJs versus  $1,79 \pm 0,13 \mu\text{m}^2$ ,  $n=15$  NMJs;  $p \leq 0,001$ ). Gleiches gilt für hemi- und homozygote *metro*-Mutanten (*metro<sup>47</sup>/metro<sup>Df(2R)E3363</sup>*:  $1,97 \pm 0,46 \mu\text{m}^2$ ,  $n=12$  NMJs; *metro<sup>47</sup>/metro<sup>47</sup>*:  $1,89 \pm 0,16 \mu\text{m}^2$ ,  $n=13$  NMJs;  $p \leq 0,001$  jeweils gegenüber *Canton-S*). Die Rettung der *metro*-Mutante mittels *tubP-Gal4* getriebenem *UAS-metroB* war effektiv ( $1,55 \pm 0,15 \mu\text{m}^2$ ,  $n=12$  NMJs;  $p \leq 0,001$  gegenüber *metro<sup>47</sup>/metro<sup>47</sup>* bzw.  $p > 0,05$  gegenüber *CantonS*). Die Doppelmutante *dlg<sup>S97-flpV</sup>/Y; metro<sup>47</sup>/metro<sup>47</sup>* zeigt mit  $1,70 \pm 0,20 \mu\text{m}^2$  ( $n=12$  NMJs) keine signifikanten Unterschiede der GRF-Größen gegenüber den betreffenden Einzelmutanten ( $p > 0,05$ ). Im Anhang (Tabelle A2) ist die Anzahl der Larven, der NMJs, der aufgenommenen Bildstapel und der vermessenen GRFs aufgelistet. **(B)** Das Verhältnis der Anzahl der AZs zur Anzahl der GRFs zeigt keine signifikanten Unterschiede und liegt knapp unter 1 für alle Genotypen. Zur Analyse wurden dieselben Bildstapel wie für (A) benutzt und die Anzahl der AZs mittels *spot detection* in Imaris bestimmt. Wildtyp:  $0,91 \pm 0,07$ , *dlg<sup>S97-flpV</sup>*:  $0,95 \pm 0,08$ , hemizygoter *metro*-Mutante:  $0,82 \pm 0,13$ , homozygoter *metro*-Mutante:  $0,97 \pm 0,09$ , *Rescue* der *metro*-Mutante:  $0,89 \pm 0,07$  und *dlgS97-metro* Doppelmutante:  $0,95 \pm 0,07$ . Jeder Wert in (A) und (B) stellt den Mittelwert einer NMJ dar. Es wurden mindestens 200 GRFs je NMJ vermessen. Statistischer Test: Nichtparametrischer Kruskal-Wallis Test plus Dunn's *multiple comparison*. Alle Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken im Diagramm: SEM.

übernehmen. Es sollte daher getestet werden, ob im Falle einer Doppelmutation für beide Gene ein gegenüber den Einzelmutationen veränderter oder gleichbleibender Phänotyp eintritt. Wie in Abbildung 3.11F-F'' und 3.12A gezeigt, weisen die NMJs der Doppelmutanten, *dlg<sup>S97-flpV</sup>/Y; metro<sup>47</sup>/metro<sup>47</sup>*, keine signifikant unterschiedlichen Rezeptorfeldgrößen ( $1,70 \pm 0,20 \mu\text{m}^2$ ;  $n=12$ ;  $p > 0,05$  versus *metro<sup>47</sup>/metro<sup>Df(2R)E3363</sup>*) gegenüber den Einzelmutanten auf. Insofern sind keine additiven oder sogar synergistischen Effekte zu beobachten. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass DlgS97 und Metro in einem Signalweg miteinander interagieren, beide Proteine gemeinsam die Begrenzung der Rezeptorfelder bestimmen und an der regulären Verteilung der synaptischen Kontakte an den NMJs von *Drosophila* beteiligt sind. Die Analyse des Zahlenverhältnisses zwischen AZs und GRFs (Abb.3.12B) über alle



**Abb.3.13: Vergrößerte GRFs an *dLin-7*-mutanten NMJs bestätigen die kooperative Interaktion von DlgS97, Metro und *DLin-7*.** (A-C'') Bei Verwendung der gleichen Darstellungsoptionen wie in Abb.3.11 ist illustriert, dass *dLin-7*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp vergrößerte und oft eng benachbarte GRFs aufweisen (A2 m6/7). Dieser Phänotyp wird durch gleichzeitig prä- und postsynaptische Expression eines *UAS-dLin-7*-Transgens gerettet.

(D) Die statistische Analyse belegt einen signifikanten Größenzuwachs der GRFs in den heteroallelischen *dLin-7*-Mutanten (*dLin7<sup>#66</sup>/ C57-Gal4, dLin7<sup>Df</sup>*) im Vergleich zum Wildtyp ( $1,62 \pm 0,16 \mu\text{m}^2$ ,  $n=16$  NMJs versus  $1,30 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$ ,  $n=14$  NMJs;  $p \leq 0,001$ ). Beim *Rescue*-Genotyp (*dLin7<sup>#66</sup>/ dLin7<sup>Df</sup> + OK6-Gal4+C57-Gal4 > UAS-dLin-7*) verringert sich die Größe der GRFs auf  $1,24 \pm 0,22 \mu\text{m}^2$  ( $n=12$  NMJs) und ist damit nicht signifikant verschieden vom Wildtyp ( $p > 0,05$ ), wohl aber von der Mutante ( $p \leq 0,001$ ). (E) Das Verhältnis der Anzahl der AZs zur Anzahl der GRFs zeigt wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Wildtyp:  $0,91 \pm 0,07$ , *dLin-7*-Mutante:  $0,93 \pm 0,06$ , *Rescue*:  $0,97 \pm 0,05$ . Zur Analyse wurden dieselben Bildstapel wie in (D) benutzt. Jeder Wert in (D) und (E) stellt den Mittelwert einer NMJ dar. Es wurden mindestens 200 GRFs je NMJ gemessen. Im Anhang (Tabelle A2) ist die Anzahl der Larven, der NMJs, der aufgenommenen Bildstapel und der vermessenen GRFs aufgelistet. Statistischer Test: Nichtparametrischer Kruskal-Wallis Test plus Dunn's *multiple comparison*. Alle Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken in Diagrammen: SEM. Scale Bar für A-C:  $5 \mu\text{m}$ , Gittermaßstab in A'-C'':  $1 \mu\text{m}$ .

vermessenen Genotypen ergab keine auffälligen Unterschiede, die darauf hindeuten würden, dass DlgS97 oder Metro an der Ausrichtung beider Kompartimente wesentlich beteiligt sind.

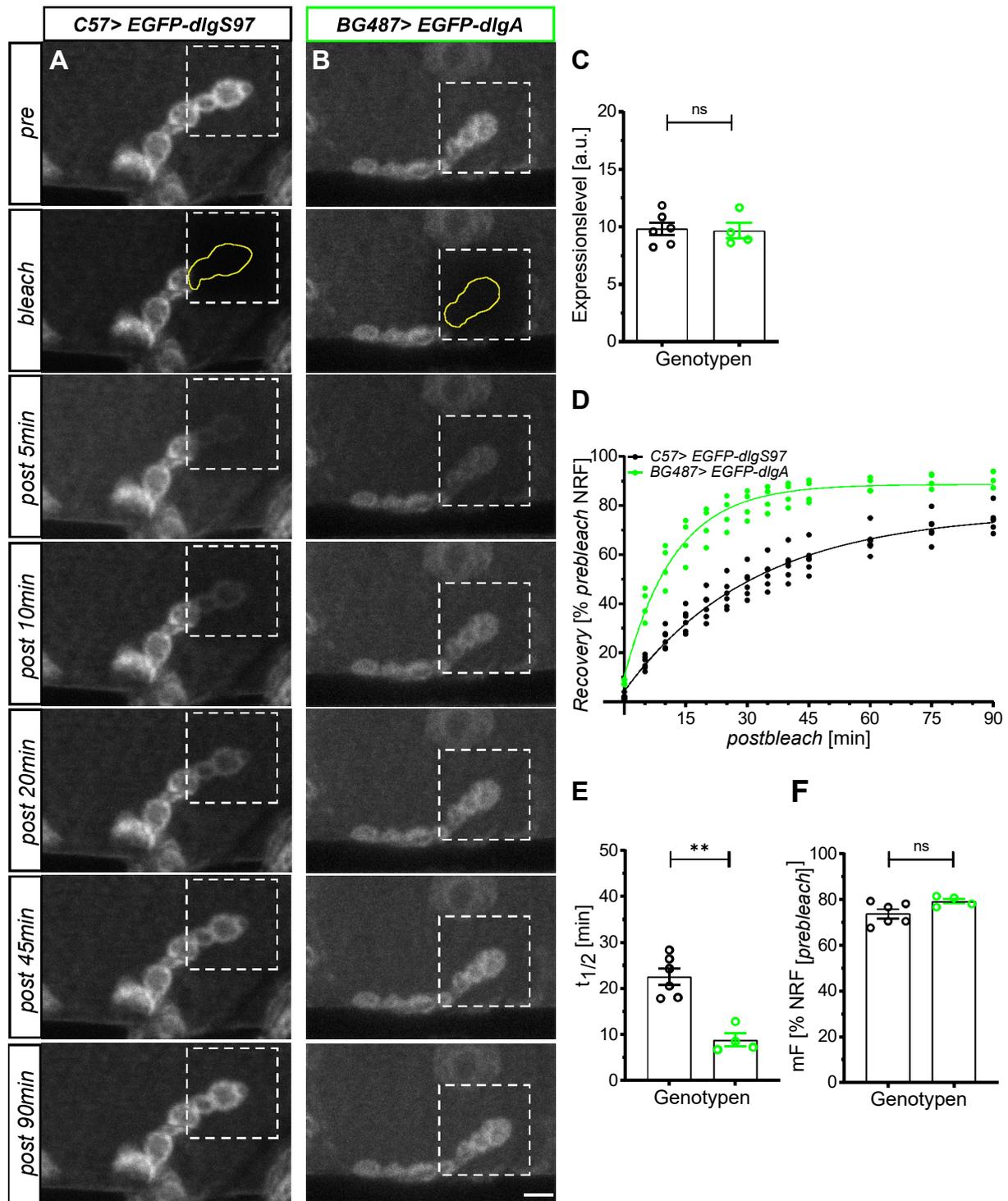
Entsprechend dem absoluten Abhängigkeitsverhältnis zwischen Metro und *DLin-7* zeigte auch die heteroallelische *dLin-7*-Mutante, *dLin-7<sup>#66</sup>/dLin-7<sup>Df</sup>* ( $1,62 \pm 0,16 \mu\text{m}^2$ ;  $n=16$ ; Abb.3.13B-B'' sowie 3.13D), vergrößerte GRFs gegenüber dem Wildtyp ( $1,30 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$ ;  $n=14$ ; Abb.3.13A-A'', D;  $p \leq 0,001$ ). Bei gleichzeitiger Expression von *DLin-7* in Motoneuronen und Muskeln unter Verwendung der *OK6-Gal4*- und *C57-Gal4*-Treiber in den *dLin-7*-Mutanten konnte eine Verkleinerung der Rezeptorfelder auf Wildtypniveau erzielt werden ( $1,24 \pm 0,22 \mu\text{m}^2$ ;  $n=12$ ;  $p > 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp; Abb.3.13C-C'', D). Damit konnte auch hier gezeigt werden, dass *DLin-7* für den Phänotyp verantwortlich ist.

### 3.4 Dynamischer Austausch des Dlg-Komplexes im postsynaptischen NMJ-Kompartiment

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Dlg-Komplex die Begrenzung der Glutamat-Rezeptorfelder bedingt, stellte sich die Frage, ob dieser einer Dynamik unterliegt, die möglicherweise auch der plastischen Umgestaltung von Rezeptorfeldern dient.

In diesem Zusammenhang und nach den Befunden, dass die L27-Domäne von SAP97 in Säugern dessen dynamisches Verhalten beeinflusst (Nakagawa et al., 2004), sollte die Frage geklärt werden, ob DlgS97 im Verbund mit Metro und *DLin-7* auch eine andere Dynamik entfaltet als DlgA. Hierzu wurde in dieser Arbeit die Methode des *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) angewendet (Fuger et al., 2007; Kobler, 2007). Bei dieser Methode wird die Fluoreszenz des zu untersuchenden Proteins in einer Region gebleicht und anschließend die *Recovery* der Fluoreszenz in dieser Region über die Zeit erfasst. Dabei kommt es zu einem Austausch der fluoreszenzmarkierten Proteine zwischen der gebleichten und ungebleichten Region. Dieser fällt in Abhängigkeit von der Verankerung des zu untersuchenden Proteins mehr oder weniger stark aus. Dieser Vorgang wird in dieser Arbeit auch als Dynamik bezeichnet. Zur Beschreibung der *Recovery* werden hier zwei Werte bestimmt: 1. Die mobile Fraktion in Prozent (mF-Wert) als der Anteil der tatsächlich einem Austausch unterliegt und 2. die *Recovery*-Rate als der Zeitwert für das Erreichen der halbmaximalen *Recovery* ( $t_{1/2}$ -Wert, siehe auch Kapitel 2.15).

In zwei vorangegangenen Untersuchungen (Rasse et al., 2005; Zhang et al., 2007) war gezeigt worden, dass EGFP-DlgS97 im FRAP-Experiment an anästhetisierten Larven zum einen eine hohe *Recovery*-Rate und zum anderen einen großen mobilen Anteil im SSR aufweist, der durch Par-1-abhängige Phosphorylierung noch erhöht werden konnte (Zhang et al., 2007). Unter Verwendung derselben Effektorlinie (Bachmann et al., 2004) und desselben Gal4-Treibers (*C57-Gal4*) wurden diese Befunde zunächst in unserem Versuchsaufbau an



**Abb.3.14: DlgA zeigt einen deutlich schnelleren Austausch als DlgS97.** (A, B) FRAP-Experiment über 90 min mit *C57-Gal4* getriebenem *UAS-EGFP-dlgS97* (A) versus *BG487-Gal4* getriebenem *UAS-EGFP-dlgA* (B) an NMJ-Endigungen (A2 m6, MIP). Gestrichelte Rahmen entsprechen den gebleichten Arealen, innerhalb derer der tatsächlich gemessene Bereich der NMJ gelb umrandet gezeigt ist. (Scale Bar: 5µm; Kantenlänge der Bleichregion: 15µm). (C) Vergleich der mittleren EGFP-Intensitäten in Muskel 6 (A2) abseits der NMJ. Das Expressionslevel der beiden Genotypen unterscheidet sich nicht:  $9,82 \pm 1,38$  für EGFP-DlgS97 (n=4) versus  $9,67 \pm 1,39$  für EGFP-DlgA (n=6);  $p = 0,9143$  (ns). (D) FRAP-Kurven. Messwerte zeigen gegen die Intensität zum *prebleach*-Zeitpunkt normalisierte relative Fluoreszenzintensitäten (NRF) in Prozent der jeweiligen FRAP-Serien an. Anhand des niedrigeren  $t_{1/2}$ -Wertes, siehe E, wird deutlich, dass EGFP-DlgA eine höhere Dynamik als EGFP-DlgS97 aufweist, wohingegen der Anteil der mF (siehe F) nicht signifikant unterschiedlich ist.

**Abb.3.14 (Fortsetzung): (E)**  $t_{1/2}$ -Werte der beiden Genotypen:  $8,78 \pm 2,78$  Minuten für EGFP-DlgA ( $n=4$ ) versus  $22,55 \pm 4,44$  Minuten für EGFP-DlgS97 ( $n=6$ );  $p = 0,0095$  (\*\*). **(F)** Mobile Fraktionen (mF-Werte):  $79,19 \pm 2,21\%$  für EGFP-DlgA,  $n=4$  versus  $73,74 \pm 4,81\%$  für EGFP-DlgS97,  $n=6$ ;  $p = 0,1143$  (ns). Alle statistischen Tests sind nichtparametrische Mann-Whitney U Tests. Alle Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken in Säulendiagrammen: SEM.

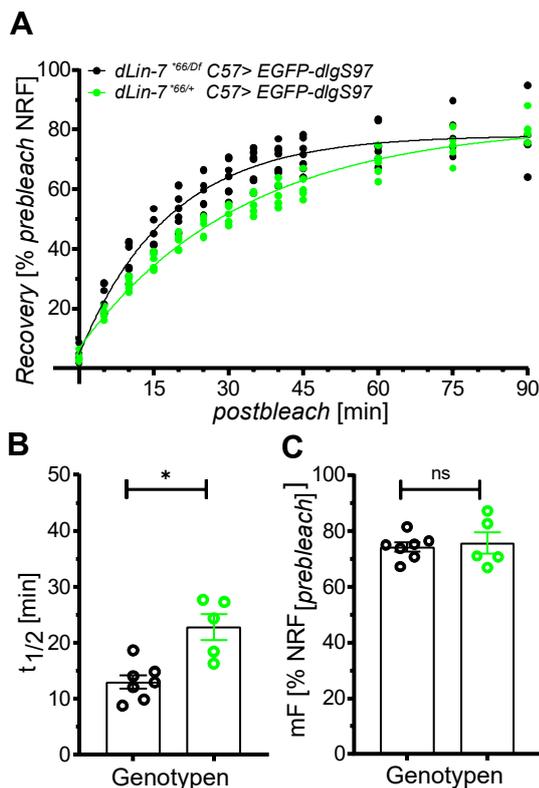
physiologisch aktiven Larvenpräparaten (Kapitel 2.10, 2.14, 2.15) evaluiert. Tatsächlich zeigt die aus sechs 90-minütigen Live-Aufnahmen ermittelte FRAP-Kurve bei einem mF-Wert von  $73,74 \pm 4,81\%$  und einem  $t_{1/2}$ -Wert von  $22,55 \pm 4,44$  Minuten eine ähnlich hohe Dynamik (Abb.3.14A, D-F) wie in den o.g. Untersuchungen. Um vergleichend hierzu auch EGFP-DlgA zu testen, wurde dessen Expression zunächst auch mit *C57-Gal4* getrieben. Allerdings erwies sich die *Recovery* hier als so schnell, dass eine zeitlich gut auflösende Aufnahmeserie kaum möglich war (siehe hierzu Kapitel 4.3). Es wurde daher der Treiber *BG487-Gal4* (Budnik et al., 1996) verwendet (Abb.3.14B), mit dem im Muskel 6 (A2) für EGFP-DlgA ein Expressionslevel erzeugt wurde, das dem von *C57-Gal4* getriebenen EGFP-DlgS97 entspricht ( $9,67 \pm 1,39$  für EGFP-DlgA;  $n=4$  versus  $9,82 \pm 1,38$  für EGFP-DlgS97;  $n=6$ ;  $p > 0,05$ ; Abb.3.14C). Eine Bestimmung der Expression über Western Blot-Analyse wurde ausgeschlossen, da *BG487-Gal4* im Wesentlichen nur in den Muskeln 6 und 7 treibt (Budnik et al., 1996), während mit *C57-Gal4* alle Muskeln adressiert werden. Daher wurden die EGFP-Intensitäten in Muskel 6 (A2) abseits der NMJ als ein Maß für die Expression bestimmt (Kapitel 2.16).

In der entsprechenden FRAP-Serie ergab sich für EGFP-DlgA eine deutlich höhere Dynamik als für EGFP-DlgS97 (Abb.3.14A, B, D), die sich insbesondere in einem deutlich kleineren  $t_{1/2}$ -Wert niederschlägt ( $8,78 \pm 2,78$  Minuten für EGFP-DlgA,  $n=4$  versus  $22,55 \pm 4,44$  Minuten für EGFP-DlgS97,  $n=6$ ;  $p \leq 0,01$ ; Abb.3.14E). Hingegen war die mobile Fraktion für beide Dlg-Varianten ausgesprochen hoch und dabei für EGFP-DlgA mit  $mF=79,19 \pm 2,21\%$  gegenüber derjenigen für EGFP-DlgS97 mit  $73,74 \pm 4,81\%$  nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) erhöht (Abb.3.14F).

Die gegenüber EGFP-DlgA reduzierte Dynamik von DlgS97 könnte auf dessen Bindung an Metro/DLin-7 zurückzuführen sein. Daher wurde EGFP-DlgS97 im *dLin-7*-mutanten Hintergrund analysiert (Abb.3.15). Während sich die Dynamik von EGFP-DlgS97 in heterozygoten *dLin-7*-Larven kaum verändert zeigte, war in hemizygoten *dLin-7*-Mutanten in der Tat eine signifikante Zunahme der Mobilität zu beobachten ( $t_{1/2}$ -Wert:  $22,80 \pm 5,18$  min;  $n=5$  versus  $13,02 \pm 3,29$  min;  $n=6$ ;  $p \leq 0,05$ ; Abb.3.15A, B), ohne jedoch die Werte für EGFP-DlgA zu erreichen. Dies könnte auf die Fähigkeit von DlgS97 hinweisen, mit der L27-Domäne Homodimere auszubilden (Marfatia et al., 2000) und somit auch bei Abwesenheit von Metro/DLin-7 noch einen höheren Vernetzungsgrad als DlgA im SSR-Bereich aufzuweisen.

Um zu testen, ob die Expressionslevel einen maßgeblichen Einfluss auf die Dynamik und die relativen Anteile der mobilen und immobilen Fraktionen haben, wurden die Konstellationen

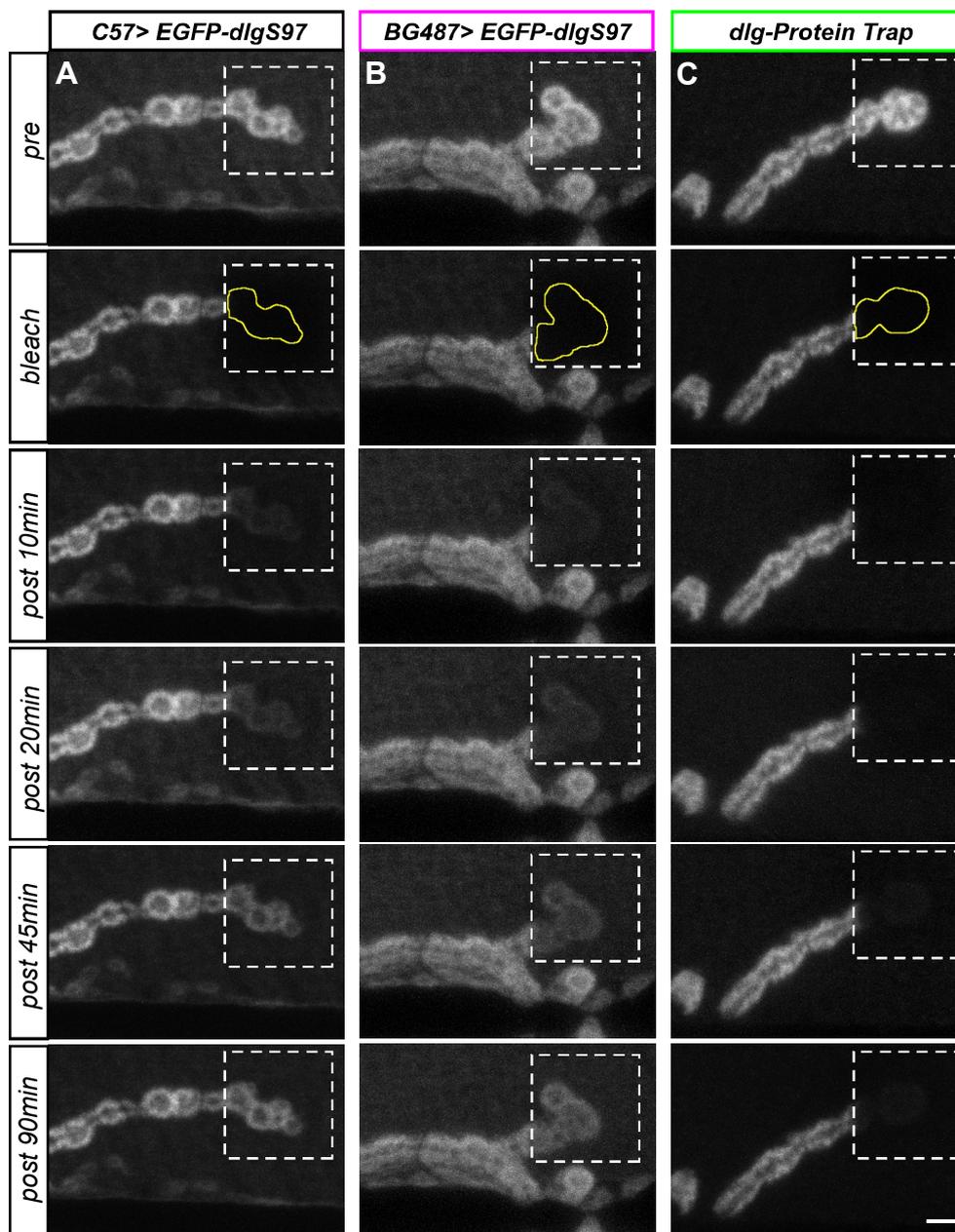
C57> EGFP-DlgS97 und BG487> EGFP-DlgS97 hinsichtlich Expressionslevel und FRAP verglichen (Abb.3.16A, B). Dabei ergaben sich bei der Bestimmung der Expression für BG487> EGFP-DlgS97 erwartungsgemäß niedrigere Werte ( $6,47 \pm 1,47$ ;  $n=8$ ;  $p \leq 0,001$ ; Abb.3.16D). Tatsächlich zeigten sich sowohl die durch den  $t_{1/2}$ -Wert beschriebene Dynamik als auch die mobile Fraktion mit BG487 signifikant reduziert ( $t_{1/2}$ -Wert= $44,84 \pm 9,54$  min und  $mF=46,04 \pm 10,44\%$ ;  $n=8$ ; jeweils  $p \leq 0,001$ ; Abb. 3.16E-G).



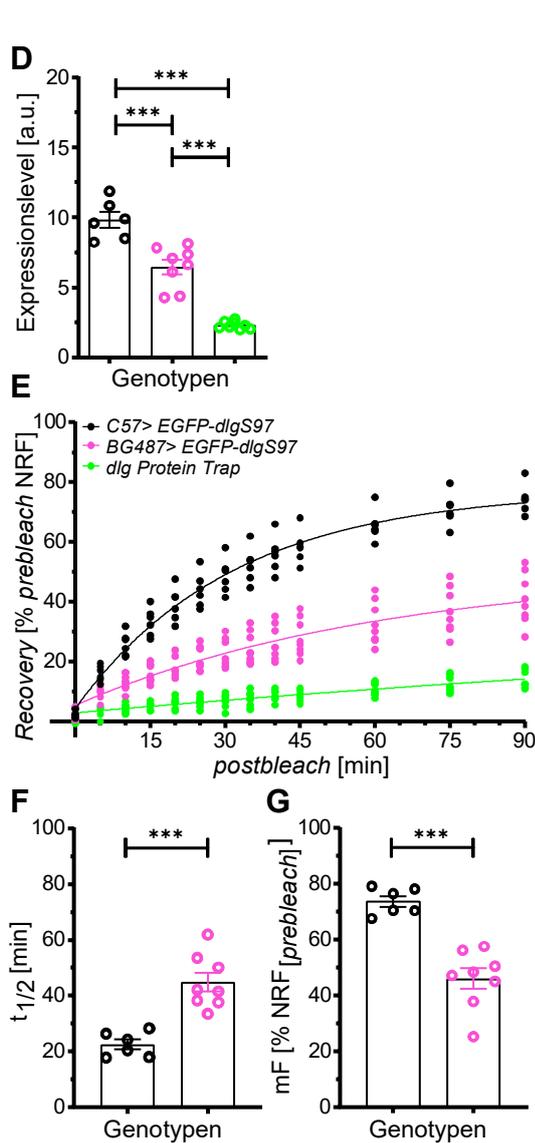
**Abb.3.15: DLin-7 beschränkt den Austausch von DlgS97. (A-C)** FRAP-Experiment mit C57-Gal4 getriebenem UAS-EGFP-dlgS97 in hetero- versus hemizygoten *dLin-7*-Mutanten (*dLin-7<sup>#66/+</sup>* bzw. *dLin-7<sup>#66/Df</sup>*). FRAP-Kurven der beiden Genotypen (A): Messwerte zeigen gegen die Intensität zum *prebleach*-Zeitpunkt normalisierte relative Fluoreszenzintensitäten (NRF) in Prozent der einzelnen FRAP-Serien. In Abwesenheit von *DLin-7* nimmt die Dynamik von EGFP-DlgS97 gegenüber den heterozygoten *dLin-7*-Larven zu, wie sich an signifikant verschiedenen  $t_{1/2}$ -Werten (B) zeigt:  $22,80 \pm 5,18$  min für *dLin-7<sup>#66/+</sup>* ( $n=5$ ) versus  $13,02 \pm 3,29$  min für *dLin-7<sup>#66/Df</sup>* ( $n=6$ );  $p = 0,0101$  (\*). Hingegen ist die mF (C) durch die Mutation nicht beeinflusst:  $75,71 \pm 8,75\%$  für *dLin-7<sup>#66/+</sup>* ( $n=5$ ) versus  $74,28 \pm 4,48\%$  für *dLin-7<sup>#66/Df</sup>* ( $n=6$ );  $p = 0,999$  (ns). Alle statistischen Tests sind nichtparametrische Mann-Whitney U Tests. Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken in Säulendiagrammen: SEM.

Dies warf die Frage auf, inwieweit die FRAP-Analysen mit überexprimierten Dlg-Proteinen die Dynamik von Dlg auf endogenem Expressionslevel widerspiegeln. Es wurde daher eine zwischenzeitlich verfügbare *Protein Trap*-Line von Dlg (*dlg<sup>YC0005LE</sup>*) im FRAP-Experiment getestet. In dieser Linie werden sowohl DlgA als auch DlgS97 als EGFP-getaggte Varianten vom endogenen *dlg*-Locus exprimiert (Morin et al., 2001; Buszczak et al., 2007). Die Insertion von EGFP liegt in einem Intron vor der ersten PDZ-Domäne. Wie in Abbildung 3.16D gezeigt, liegt das Expressionslevel in dieser Linie deutlich unter dem der Gal4-getriebenen Effektor-Dlg-Linien ( $2,30 \pm 0,27$ ;  $n=8$ ;  $p \leq 0,001$ ). Ferner, wie Abbildung 3.16C und 3.16E zu entnehmen, ist die mobile Fraktion des endogen exprimierten Dlg nicht annähernd so hoch, wie in den Überexpressionssituationen. Beim Versuch die FRAP-Serien quantitativ auszuwerten, zeigte sich, dass die zeitliche Aufnahmedauer von 120min (gezeigt 90min) bei weitem nicht ausreicht, um an eine asymptotische Annäherung an den Maximalwert des Proteinaustauschs heranzureichen, Daher ist auch keine verlässliche Bestimmung des  $t_{1/2}$ -Werts möglich.

Aufgrund obiger Befunde lag die Vermutung nahe, dass die beiden Bindungspartner, Metro/*DLin-7*, eine ähnlich hohe Dynamik wie EGFP-*DlgS97* aufweisen. Überraschenderweise konnten die durchgeführten FRAP-Experimente mit *DLin-7*-EGFP und MetroB-EGFP dies nicht bestätigen (Abb.3.17). Anders als bei den *Dlg*-Experimenten zeigte sich trotz starker Überexpression eine kleine mobile Fraktion für *DLin-7* und noch deutlicher für Metro (*DLin-7*-EGFP-mF=24,48±1,78%; n=7 und MetroB-EGFP-mF=17,37±3,11%; n=7; Abb.3.17E). Demgegenüber zeigten die  $t_{1/2}$ -Werte eine enorm hohe Dynamik an (*DLin-7*-EGFP- $t_{1/2}$ -Wert=2,06±0,35 min und MetroB-EGFP- $t_{1/2}$ -Wert=2,57±0,93 min; Abb.3.17D).



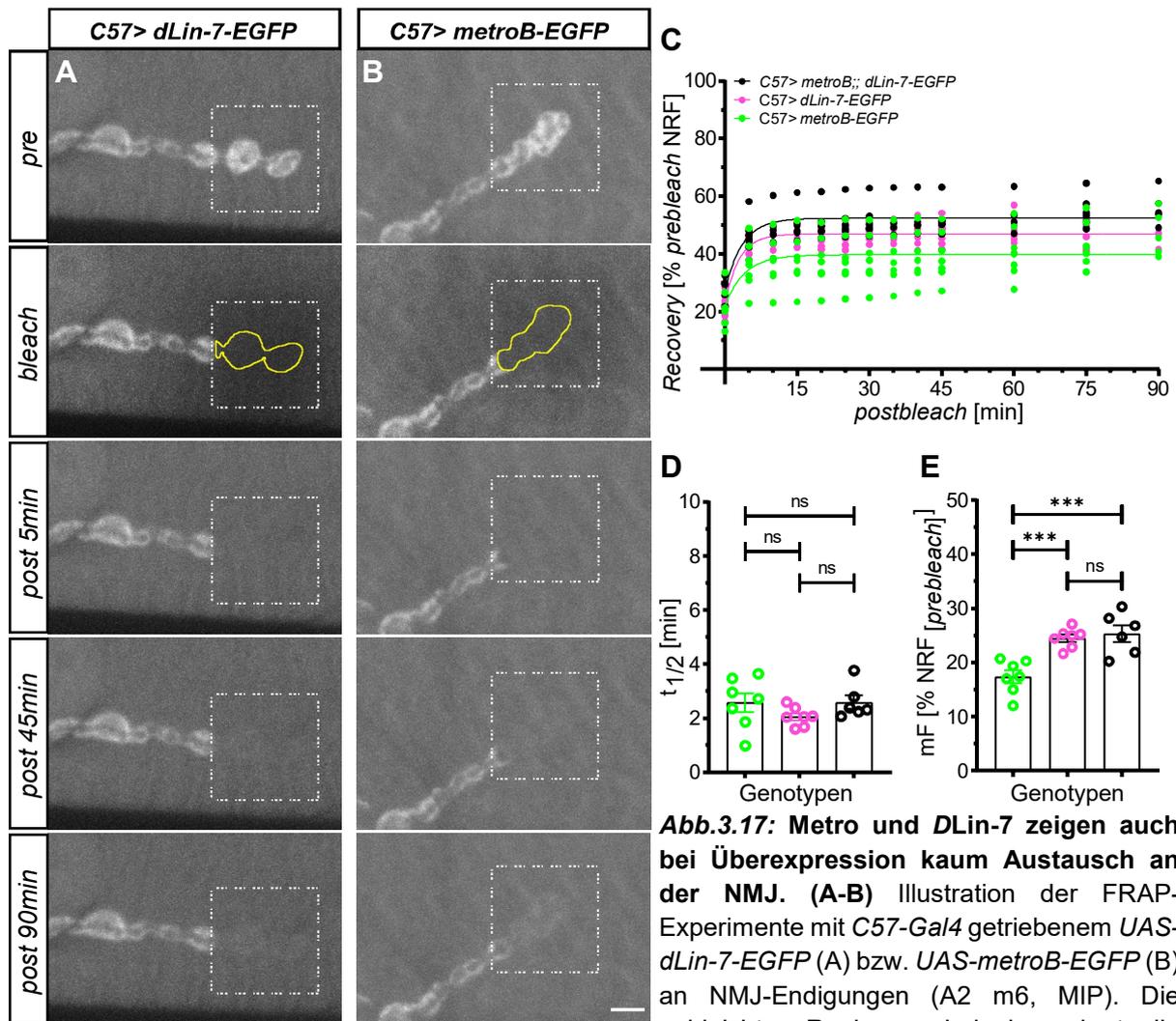
**Abb.3.16: Der Austausch von endogen exprimiertem *Dlg* ist vergleichsweise sehr niedrig. (A-C) FRAP-Experimente an NMJ-Endigungen (A2 m6) zum Vergleich der Dynamik von *C57-Gal4*- und *BG487-Gal4*-getriebenem *UAS-EGFP-dlgS97* (A bzw. B) sowie auf endogenem Niveau exprimiertem EGFP-*Dlg* in der *Protein Trap*-**



**Abb.3.16 (Fortsetzung):** Linie  $dlg^{YC005LE}$  (C). Qualitativ wird der Einfluss der Expressionsstärke auf die *Recovery* deutlich (vgl. *post bleach*-Zeitpunkte). Auffällig ist die kaum zu detektierende *Recovery* nach 90 min in  $dlg^{YC005LE}$ . Rahmen entsprechen den gebleichten Regionen, die tatsächlich gemessenen NMJ-Bereiche sind gelb umrandet. (Scale Bar: 5 $\mu$ m; Kantenlänge der Bleichregion: 15 $\mu$ m, MIP). (D-G) Quantitative Auswertung: Der Vergleich der mittleren EGFP-Intensitäten in Muskel 6 (A2) abseits der NMJ (D) belegt signifikant verschiedene Expressionslevel für die drei Genotypen:  $9,82 \pm 1,38$  für C57-Gal4 getriebenes EGFP-DlgS97 (n=6) versus  $6,47 \pm 1,47$  für BG487-Gal4 getriebenes EGFP-DlgS97 (n=8) versus  $2,30 \pm 0,27$  für  $dlg^{YC005LE}$  (n=8);  $p < 0,0001$  für alle statistischen Vergleiche (one-way ANOVA mit Holm-Sidak's *multiple comparisons* Test). (E) FRAP-Kurven mit den gegen die Intensität zum *prebleach*-Zeitpunkt normalisierten relativen Fluoreszenzintensitäten (NRF) der jeweiligen FRAP-Serien. Der gravierende Einfluss der Expressionslevel sowohl auf die  $t_{1/2}$ -Werte als auch auf die mF ist offensichtlich. Vergleich der  $t_{1/2}$ -Werte (F):  $22,55 \pm 4,44$  min für C57-Gal4> EGFP-DlgS97 (n=6) versus  $44,84 \pm 9,54$  min für BG487-Gal4> EGFP-DlgS97 (n=8);  $p = 0,0007$  (\*\*\*) und der mF-Werte (G)  $73,74 \pm 4,81\%$  versus  $46,04 \pm 10,44\%$ ;  $p = 0,0007$  (\*\*\*). Zu beachten ist, dass der 90-minütige Beobachtungszeitraum zu kurz ist, um  $t_{1/2}$  und mF für  $dlg^{YC005LE}$  zuverlässig zu bestimmen (Kapitel 3.4). Alle statistischen Tests sind nichtparametrische Mann-Whitney U Tests. Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken: SEM.

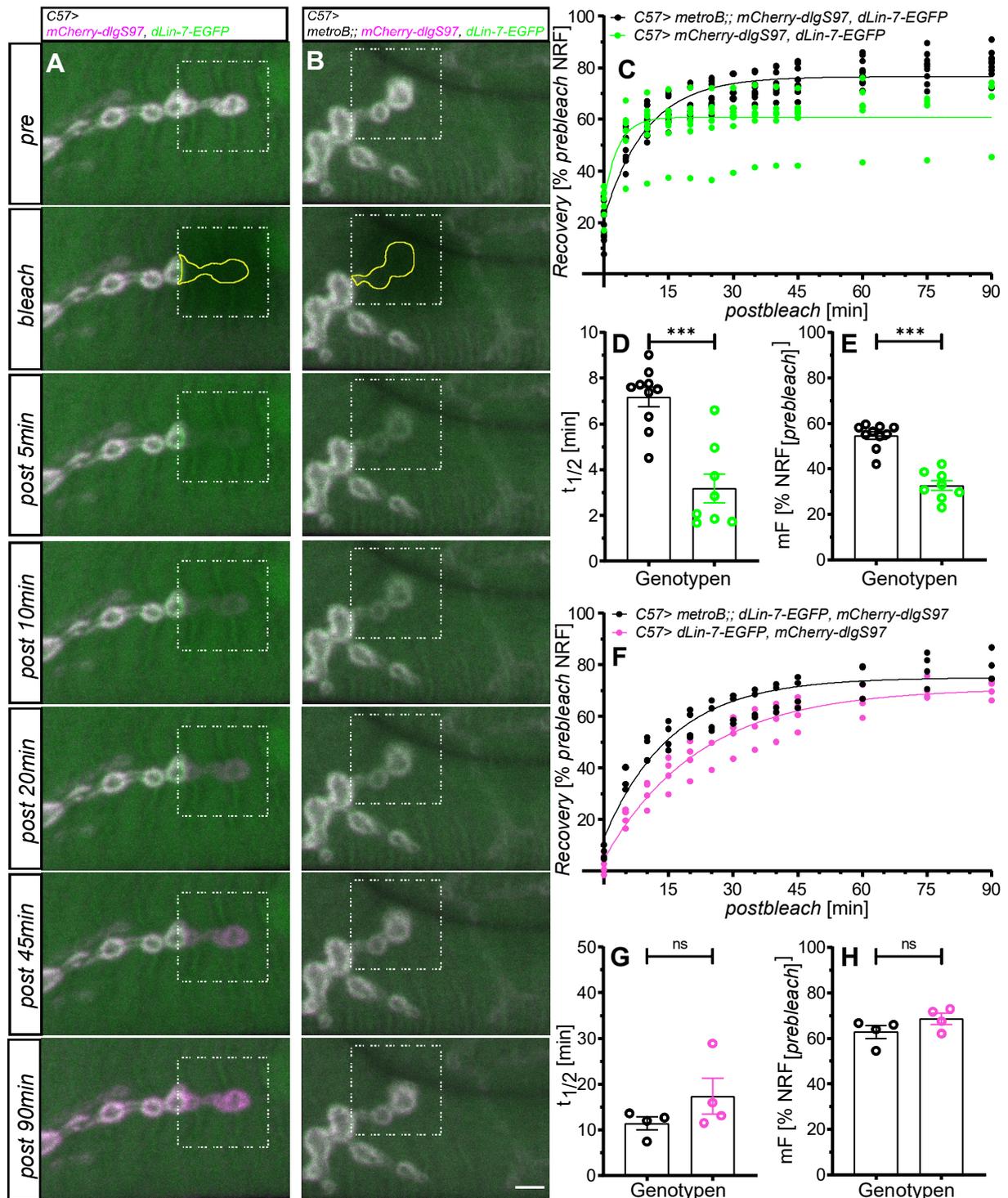
Bei Betrachtung der FRAP-Serien (Abb.3.17A, B) wird jedoch deutlich, dass zwar innerhalb der ersten 5 Minuten die GFP-Intensität im gesamten Bleichfeld wiederkehrt, sich jedoch im Verlauf der ersten 45 Minuten an den ausgebleichten Boutons gegenüber der Umgebung keinerlei Anreicherung der Proteine erkennen lässt. Die schnelle Anreicherung im Bleichfeld ist daher vermutlich auf Diffusion der stark überexprimierten Proteine zurückzuführen.

Der überraschend geringe Anteil an mobilen DLin-7 bzw. Metro wirft die Frage auf, ob die komplette wechselseitige Abhängigkeit der beiden Proteine (Kapitel 3.1) sowie deren stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 dafür verantwortlich ist. Daher wurde durch gleichzeitige Überexpression von DLin-7-EGFP und MetroB überprüft, ob sich die Mobilität von DLin-7 an DlgS97 annähert. Wie in Abbildung 3.17C bis E zu sehen, ändern sich die Mobilitätswerte für DLin7-EGFP nicht, wenn gleichzeitig MetroB überexprimiert wird ( $t_{1/2} = 2,59 \pm 0,62$  min und  $mF = 25,34 \pm 3,81\%$ ; n=6;  $p > 0,05$ ).



**Abb.3.17: Metro und DLin-7 zeigen auch bei Überexpression kaum Austausch an der NMJ.** (A-B) Illustration der FRAP-Experimente mit  $C57-Gal4$  getriebenem  $UAS-dLin-7-EGFP$  (A) bzw.  $UAS-metroB-EGFP$  (B) an NMJ-Endigungen (A2 m6, MIP). Die gebleichten Regionen sind eingerahmt, die gemessenen NMJ-Bereiche gelb umrandet. (Scale Bar: 5 $\mu$ m; Kantenlänge der Bleichregion: 15 $\mu$ m). (C-E) Quantitative Auswertung: FRAP-Kurven für die Expression von  $UAS-metroB-EGFP$ ,  $UAS-dLin-7-EGFP$  sowie für  $UAS-dLin-7-EGFP$  bei gleichzeitiger Expression von nicht-getaggetem MetroB (C). Messwerte entsprechen den gegen die Intensität zum *prebleach*-Zeitpunkt normalisierten, relativen Fluoreszenzintensitäten (NRF) der jeweiligen FRAP-Serien. Ohne signifikante Unterschiede werden die halbmaximalen mF-Werte schnell erreicht (D), mit  $t_{1/2} = 2,06 \pm 0,35$  min für  $DLin-7-EGFP$  (n=7),  $2,57 \pm 0,93$  min für  $MetroB-EGFP$  (n=7) und  $2,59 \pm 0,62$  min für  $DLin-7-EGFP+MetroB$  (n=6). Unter Berücksichtigung der  $NRF_{(t_0)}$ -Werte bleiben die mF klein (E), wobei diese für  $MetroB-EGFP$  nochmals niedriger ausfällt als für  $DLin-7-EGFP$ . Eine gleichzeitige Expression beider Proteine hat keinen Einfluss auf die mF von  $DLin-7-EGFP$ ; mF =  $24,48 \pm 1,78\%$  für  $DLin-7-EGFP$  (n=7) versus  $17,37 \pm 3,11\%$  für  $MetroB-EGFP$  (n=7);  $p=0,0007$  und  $25,34 \pm 3,81\%$  für  $DLin-7-EGFP+MetroB$  (n=6). Alle statistischen Tests sind one-way ANOVA mit Holm-Sidak's *multiple comparisons*. Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken in Diagrammen: SEM.

Die Co-Expression von MetroB reicht also nicht aus, um die Mobilität von  $DLin-7$  an der NMJ zu erhöhen. Da die NMJ-Lokalisation von  $DLin-7$  zu  $\sim 75\%$  von  $DlgS97$  abhängt (Kapitel 3.1), wurde eine gleichzeitige Überexpression von EGFP-markiertem  $DLin-7$  und mCherry-markiertem  $DlgS97$  in einem 2-Kanal-FRAP-Experiment untersucht (Abb.3.18). Aber auch in diesem Fall ließ sich keine auffällige Zunahme der Mobilität von  $DLin-7-EGFP$  feststellen ( $t_{1/2} = 3,18 \pm 1,80$  min und  $mF = 32,72 \pm 6,30\%$ ; n=8; Abb.3.18A, C-E).



**Abb.3.18: Dlg bestimmt den Austausch von Metro und DLin-7 an der NMJ.** (A-B) Illustration von 2-Kanal FRAP-Experimenten an NMJ-Endigungen (A2 m6) bei C57-Gal4-getriebener Überexpression von Komponenten des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes, nämlich UAS-dLin-7-EGFP und UAS-mCherry-dlgS97 (A) sowie zusätzlich UAS-MetroB (B). Die gebleichten Regionen sind eingerahmt, die ROI für die Intensitätsmessungen gelb umrandet. (Scale Bar: 5µm Kantenlänge der Bleichregion: 15µm). Während sich die Recovery von mCherry-DlgS97 in beiden Situationen weitgehend unverändert zeigt, nimmt diejenige von DLin-7-EGFP bei Co-Expression von MetroB (B) deutlich zu und nähert sich der von mCherry-DlgS97 an. (C-H) Quantitative Auswertung: FRAP-Kurven für DLin-7-EGFP bei Doppel- und Triple-Expression belegen die in A und B erkennbaren Unterschiede. Dabei entsprechen die Messwerte wiederum den gegen die Intensität zum prebleach-Zeitpunkt normalisierten, relativen Fluoreszenzintensitäten (NRF) der einzelnen FRAP-Serien. Gegenüber der Doppelexpression,

**Abb.3.18 (Fortsetzung):** resultiert die gleichzeitige Expression aller drei Proteine des Komplexes in einem signifikant höheren  $t_{1/2}$ -Wert für *DLin-7-EGFP* (D):  $7,18 \pm 1,32$  min ( $n=10$ ) versus  $3,18 \pm 1,80$  min ( $n=8$ );  $p=0,0005$  (\*\*\*). Gleichzeitig erhöht sich auch die mF von *DLin-7-EGFP* signifikant (E):  $54,69 \pm 5,38\%$  ( $n=10$ ) versus  $32,72 \pm 6,30\%$  ( $n=8$ );  $p=0,0001$  (\*\*\*). FRAP-Kurven für *mCherry-DlgS97* bei Doppel- bzw. Triple-Expression (F) zeigen scheinbar Unterschiede, die sich aber als statistisch nicht-signifikant erweisen (G, H). Der  $t_{1/2}$ -Wert für *mCherry-DlgS97* (G) bei Doppelexpression mit *DLin-7-EGFP* beträgt  $17,36 \pm 7,89$  min ( $n=4$ ) versus  $11,43 \pm 2,75$  min bei zusätzlicher Expression von *MetroB*;  $p=0,3429$  (ns). Auch die mF für *mCherry-DlgS97* unterscheiden sich nicht signifikant:  $68,53 \pm 4,90\%$  und  $62,78 \pm 5,62\%$  für Doppel- bzw. Triple-Expression;  $p=0,20$  (ns). Alle statistischen Tests sind nichtparametrische Mann-Whitney U Tests. Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Fehlerbalken in Diagrammen: SEM.

Es blieb daher zu testen, ob die mobile Fraktion von *DLin7-EGFP* bei gleichzeitiger Überexpression von *EGFP-DlgS97* und *MetroB* erhöht wird. In der Tat konnte genau dies beobachtet werden. Wie in Abbildung 3.18 B-E gezeigt, ist dies auch der Fall ( $t_{1/2}=7,18 \pm 1,32$  min,  $mF=54,69 \pm 5,38\%$ ;  $n=10$ ; jeweils  $p \leq 0,001$  im Vergleich ohne *MetroB*).

*mCherry-EGFP-DlgS97* zeigt in beiden Fällen (Abb.3.18A, B) eine weitestgehend ähnliche *Recovery* wie *EGFP-DlgS97* (*mCherry-DlgS97* ohne *MetroB*-  $mF=68,53 \pm 4,90\%$ ;  $n=4$  versus *DlgS97* mit *MetroB*- $mF=62,78 \pm 5,62\%$ ;  $n=4$ ;  $p > 0,05$ ; Abb.3.18F-H), wobei der  $t_{1/2}$ -Wert mit  $11,43 \pm 2,75$  min tendenziell niedriger in der Triplexexpression ausfällt als in der Situation ohne *MetroB*-Überexpression ( $t_{1/2}=17,36 \pm 7,89$ ;  $n=4$ ;  $p > 0,05$ ).

### 3.5 Darstellung von Dlg, Metro und *DLin-7* in präsynaptischen Terminalien an NMJs

Eine interessante Frage ist, ob der *Dlg*-Gerüstkomplex an larvalen NMJs nicht nur postsynaptisch zur Bildung der perisynaptischen Umgebung synaptischer Kontakte beiträgt, sondern auch auf präsynaptischer Seite Aufgaben erfüllt. Für letzteres ergeben sich Hinweise aus *Rescue*-Experimenten, bei denen strukturelle und funktionelle *dlg*-Phänotypen nur durch prä- oder beidseitige Expression des betreffenden *Rescue*-Genkonstrukts rückgängig gemacht werden konnten (Budnik et al., 1996; Thomas et al., 1997). Eine Lokalisierung von *Dlg* wurde in späten, zwei Stunden vor Schlüpfung, embryonalen Wachstumskegeln von Motoneuronen dokumentiert (Guan et al., 1996). Demgegenüber ist der Nachweis einer präsynaptischen Lokalisierung von *Dlg* an NMJs in späteren Stadien nie klar erbracht worden. Ein prinzipielles Problem besteht darin, dass die immunzytochemisch-mikroskopische Sichtbarmachung eines Proteins an der Nervendingung nahezu ausgeschlossen ist, wenn dasselbe Protein auch im postsynaptischen SSR der NMJ abundant angereichert ist, wie es für *Dlg*, *Metro* und *DLin-7* der Fall ist.

### 3.5.1 Metro und DLin-7 sind an der Membran der Nervendigungen angereichert

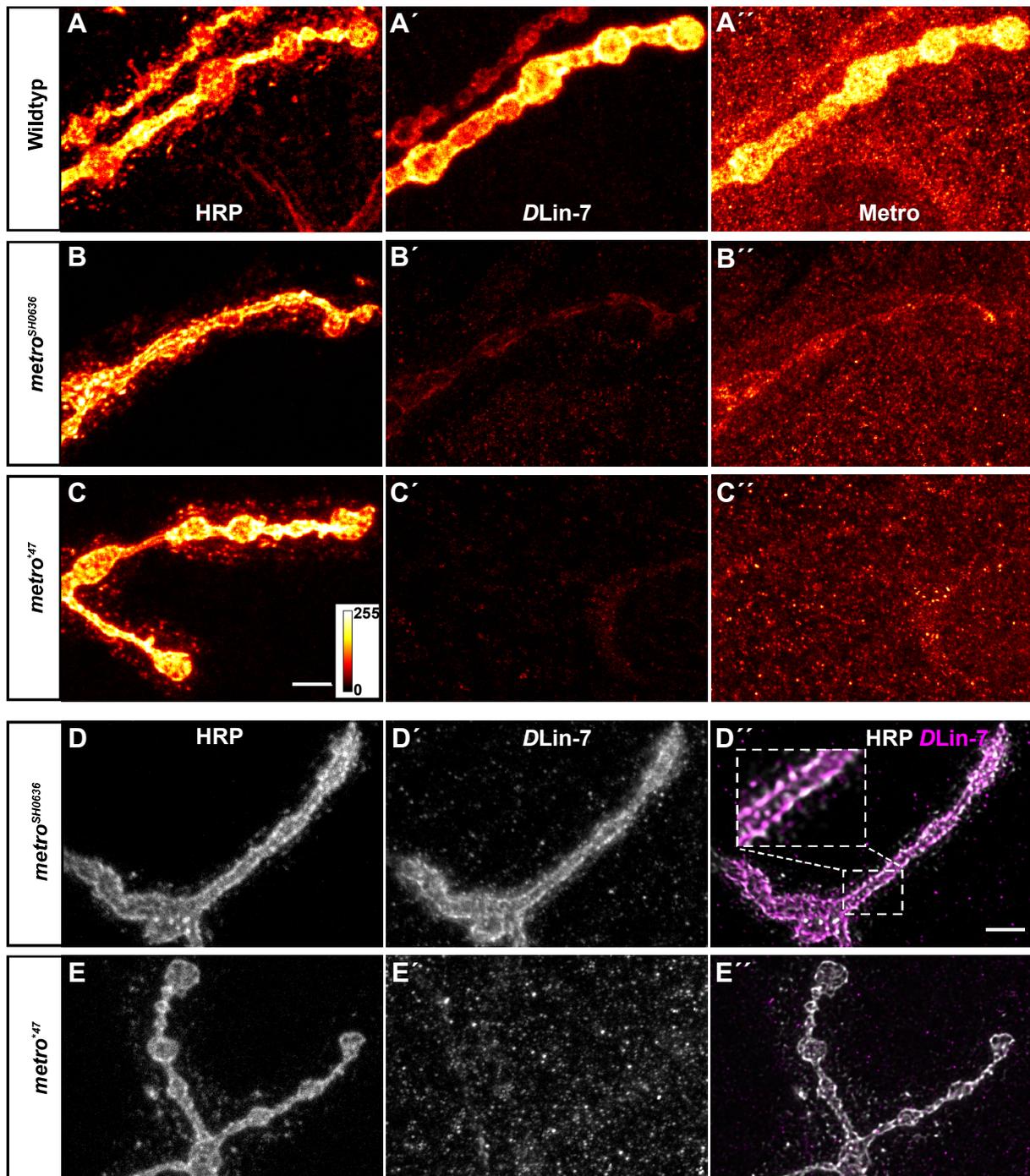
Die Untersuchungen an *metro*<sup>\*47</sup>-Mutanten ließen weder prä- noch postsynaptisches DLin-7 an der NMJ erkennen. Interessanterweise konnte durch neuronale Expression von *UAS-MetroB* mittels *C155-Gal4* im *metro*<sup>\*47</sup>/*metro*<sup>Df3063</sup>-Hintergrund eine DLin-7-Immunreaktivität dargestellt werden, die offensichtlich im Bereich der präsynaptischen Membran lokalisiert (Bachmann et al., 2010). Demnach kann zumindest eine induzierte Expression von MetroB die Rekrutierung von endogenem DLin-7 an die präsynaptische Nervenendigung bewirken.

Wie im Folgenden dargelegt, ergab sich durch die detaillierte Analyse eines hypomorphen *metro*-Allels, *metro*<sup>SH0636</sup>, dass DLin-7 auch durch endogenes Metro an die präsynaptische Membran rekrutiert wird. Dieses Allel basiert auf einem Intron-inserierten P-Element. Die mit diesem Allel ursprünglich verknüpfte homozygote Letalität wurde als *second site*-Effekt identifiziert und herausgekreuzt (Handschuh, 2009). Bei Analyse konfokalmikroskopischer Aufnahmen von *metro*<sup>SH0636</sup>-mutanten NMJs zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp (Abb.3.19A-B'') sowohl für Metro als auch für DLin-7 eine drastisch reduzierte Immunreaktivität, die sich allerdings im Vergleich zu *metro*<sup>\*47</sup> (Abb.3.19B-C'', D', E') als echtes Signal herausstellte. Bei erhöhter Anregung und gleichzeitiger Markierung der motoneuronalen Membran (anti-HRP) erschien es, als ob, dass in den *metro*<sup>SH0636</sup>-Mutanten endogen verbliebene DLin-7-Signal vornehmlich präsynaptisch lokalisiert ist (Abb.3.19D-D'').

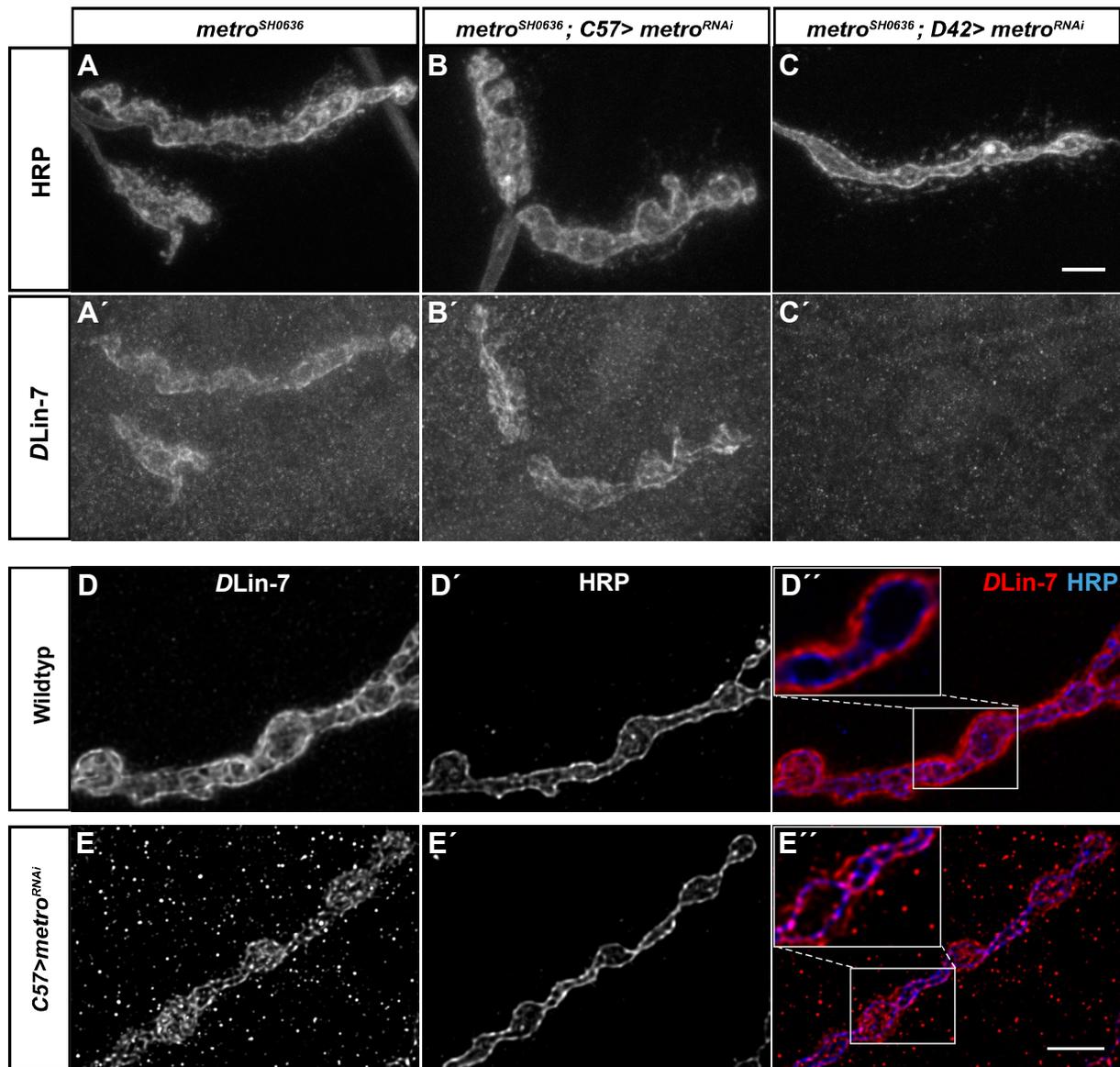
Um dieser Vermutung nachzugehen und um sicherzustellen, dass das detektierte endogene Signal von Metro bzw. DLin-7 spezifisch ist, wurden in der *metro*<sup>SH0636</sup>-Mutante zwei Kopien eines *metro*-spezifischen RNAi-Transgens (Bachmann et al., 2010) zum einen muskelspezifisch mit *C57-Gal4* und zum anderen präsynaptisch mit *D42-Gal4* getrieben. (Abb.3.20A-C'). Während im Fall der postsynaptischen Unterdrückung (Abb.3.20B, B') von Metro das DLin7-Signal unverändert blieb (Abb.3.20A', B'), war es bei präsynaptischer Unterdrückung nicht mehr zu detektieren (Abb.3.20C').

Um insbesondere veränderte Promotoreigenschaften (ektopische Expression) im *metro*<sup>SH0636</sup>-Allel als ursächlich für die beobachtete präsynaptische Lokalisierung auszuschließen, wurde postsynaptisches Metro im wildtypischen Hintergrund mittels *UAS-metroRNAi* unterdrückt. Auch unter diesen Bedingungen wurde eine präsynaptische Lokalisierung von DLin-7 beobachtet (Abb.3.20D-E''). Im Vergleich zum Wildtyp (Abb.3.20D'') zeigt die Überlagerung mit der HRP-Immunfluoreszenz eine punktuelle Kolo-kalisierung (Abb.3.20E'').

Mit Hilfe des *metro*<sup>SH0636</sup>-Allels wurde es möglich auch Untersuchungen der subzellulären Verteilung von DLin-7 relativ zu anderen, präsynaptischen Proteinen durchzuführen. Konkret wurde dies durch Doppelmarkierung mit AKs gegen BRP und CSP (Cystein-String-Protein; Zinsmaier et al., 1990) als Marker für das Zentrum von AZs bzw. für synaptische Vesikel



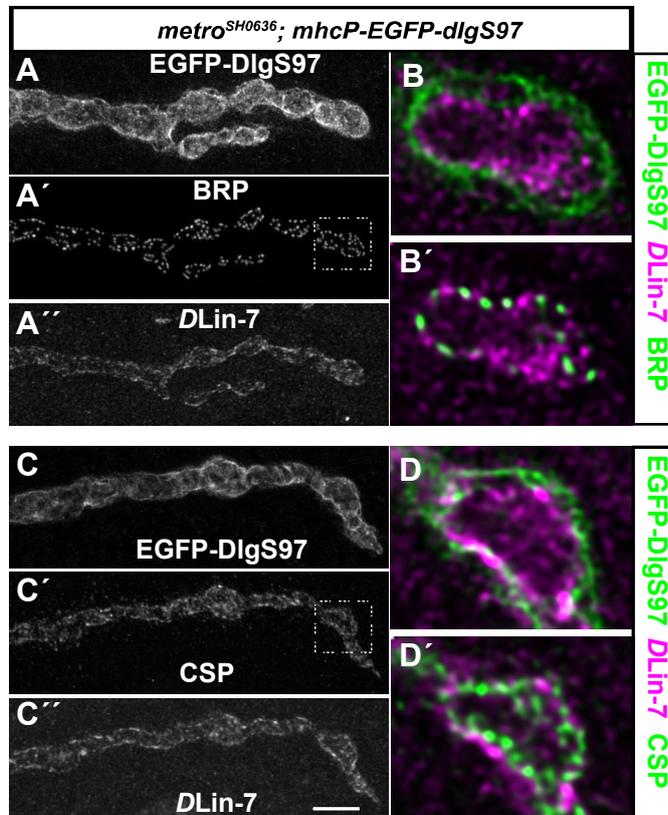
**Abb.3.19: Metro und DLin-7 sind an NMJs des Allels *metro*<sup>SH0636</sup> nicht vollständig eliminiert.** (A-C'') IF-Markierung von NMJs mittels anti-HRP-, anti-*Veli* 1/2/3- (*DLin-7*) und anti-Metro-AK (A3 m4, Ausschnitte, MIP). Gegenüber der starken Markierung von Wildtyp-NMJs (*Canton-S*) (A-A''), weisen NMJs des Allels *metro*<sup>SH0636</sup> (B-B'') bei gleichen Aufnahmeparametern (insbes. Laserleistung und *detector gain*) nur eine schwache IF für *DLin-7* und Metro auf, die sich aber bei Vergleich mit dem Nullallel *metro*<sup>\*47</sup> (C-C'') als spezifisch erweist. (D-E'') IF-Markierung von NMJs (A2 bzw. A4 m4, Ausschnitte, MIP) der *metro* Allele SH0636 (D-D'') und \*47 (E-E'') mittels anti-HRP- und anti-*Veli* 1/2/3- (*DLin-7*) AK. Im Unterschied zu den Aufnahmen in A-C' wurde hier der Dynamikbereich der Detektoren für die *DLin-7*-IF voll ausgenutzt. In der Überlagerung fällt bei *metro*<sup>SH0636</sup> die *DLin-7*-IF weitgehend auf den mit anti-HRP-markierten Bereich (D''); Insert: vergrößerte Darstellung der MIP, gestrichelte Box). Gleichzeitig wird nochmals deutlich, dass in dem *metro*<sup>\*47</sup>-Allel trotz erhöhter Anregung keine IF für *DLin-7* detektierbar ist (E'). Anm.: In D-E' sind MIP der originalen Bildstapel und in D'', E'' MIP der dekonvoluierten Bildstapel gezeigt. Farbskala in C aus ImageJ: *Red Hot*. Scale Bars in C, D'': 5µm.



**Abb.3.20:** (A-C') RNAi-Experimente belegen die Lokalisation von *DLin-7* (und *Metro*) an der präsynaptischen Membran. (A-C') Immunfluoreszenzmarkierung mittels anti-HRP- und anti-*DLin-7*-AK an NMJs (A2 bzw. A3 m4, MIP) von *metro*<sup>SH0636</sup> (A, A') sowie von *metro*<sup>SH0636</sup> bei gleichzeitiger Expression von drei Kopien eines *metro*-spezifischen *UAS-RNAi*-Konstrukts im Muskel mittels *C57-Gal4* (B, B') bzw. von zwei Kopien desselben Konstrukts in Motoneuronen mittels *D42-Gal4* (C, C'). Nur im letzten Fall kommt es zum Verlust der *DLin-7*-spezifischen Immunreaktivität. (D-E'') Im Vergleich zu Wildtyp-NMJ (*Canton-S*; D-D'') führt die Suppression von endogenem *Metro* im Muskel durch *Gal4-C57*-getriebene Expression von zwei Kopien von *UAS-metro-RNAi* bei 29°C (Temperaturoptimum für *Gal4*-Aktivität) zur Detektierbarkeit von *DLin-7* entlang der mit anti-HRP-AK-markierten PM (s. insbesondere vergrößerte Darstellung einer konfokalen Ebene in E''). An der Wildtyp-NMJ ist nur das postsynaptische *DLin-7* zu detektieren (s. insbesondere vergrößerte Darstellung einer konfokalen Ebene in D''). Aufnahmen in D-E'': A2 m4, MIP, dekonvoluiert. Scale bars: 5µm.

durchgeführt (Abb.3.21). Als postsynaptischer Marker wurde muskelspezifisch exprimiertes EGFP- *DlgS97* (*mhcP-EGFP-DlgS97*) mitgeführt. Wie erwartet hebt dies die präsynaptische Lokalisierung von *DLin-7* nochmals deutlich hervor (Abb.3.21B, D). Weiterhin ist zu sehen, dass *DLin-7* nicht mit *Bruchpilot* überlappt, eher dieses einkleidet und dabei einen gewissen

Abstand zu den BRP-Spots aufweist (Abb.3.21B'). Damit handelt sich also um eine perisynaptische Lokalisierung. Im Vergleich zum BRP fällt für CSP eine teilweise Überlappung mit *DLin-7* auf (Abb.3.21D').

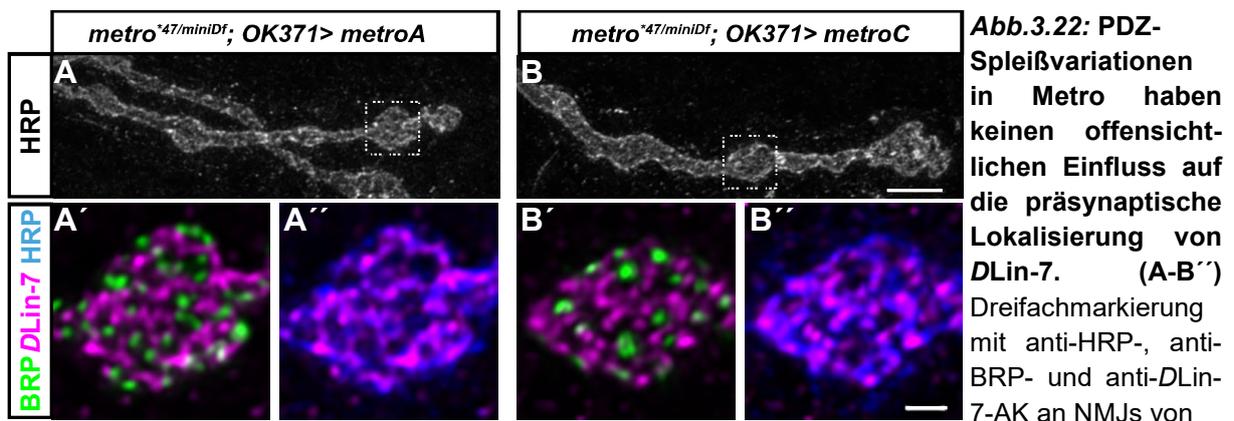


**Abb.3.21: Präsynaptisches *DLin-7* lokalisiert peripher zu den AZs aber teilweise in unmittelbarer Nähe zu den synaptischen Vesikeln (SV) an der PM. (A-D')** Fluoreszenzmarkierung von NMJ-Abschnitten in *metro<sup>SH0636</sup>*-Larven mit Muskel-spezifischer Expression von EGFP-dlgS97 mittels anti-*DLin-7*- und anti-BRP- (A-A') bzw. anti-*DCSP*- (C-C') AK. Präsynaptisches *DLin-7* ist anhand einzelner optischer Schnitte der eingerahmten Boutons im Vergleich zum SSR (B, D) sowie zum AZ-Protein BRP (B') und zum SV-assoziierten Protein CSP (D') vergrößert dargestellt. Während die *DLin-7*- und BRP-IF entlang der Boutonperipherie deutlich getrennt vorliegen (B') ergeben sich für *DLin-7* und CSP stellenweise Überlappungen an der Peripherie (D'). (A2 m4, MIP, dekonvoluiert). Scale bar: 5µm.

### 3.5.2 Metro-Spleißvarianten zeigen keine auffallenden präsynaptischen Lokalisationsunterschiede zu MetroB

Für Metro sind vier Spleißvarianten vorhergesagt (<https://flybase.org>; siehe auch Abb.1.4B). Diese unterscheiden sich durch An- oder Abwesenheit von 10 Aminosäuren (AS) in der PDZ-Domäne bzw. 39 AS in der HOOK-Region (vgl. Abb.1.4B). RT-PCR Analysen hatten gezeigt, dass MetroB (+10, Δ39) zumindest auf Transkriptebene die vorherrschende Form in larvalen *Body walls* ist. Jedoch konnte bei Verwendung MetroC/D-spezifischer Primer auch die Expression von Varianten, bei denen die 10 zusätzlichen AS in der PDZ-Domäne fehlen (Δ10, ±39), mit RT-PCR nachgewiesen werden (Handschuh, 2009). Wie gezeigt werden konnte, haben die Variationen in der PDZ-Domäne einen Einfluss auf das Bindungsverhalten. Z.B. konnte im Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren eine Bindung des C-Terminus von Neurexin an die PDZ-Domäne von MetroC/D, jedoch nicht an die von MetroA/B dargestellt werden (Handschuh, 2009). Die Bedeutung der Variation in der HOOK-Region, ±39AS, wurde bislang nicht weiter untersucht. Jedoch zeigen die vorangegangenen Untersuchungen an MetroB, dass sie für die prä- und postsynaptische Lokalisierung an der NMJ nicht prinzipiell notwendig

ist. Ein Einfluss der Spleißvariationen auf die präzise Lokalisierung von Metro konnte bislang nicht ausgeschlossen werden. Der zur Verfügung stehende AK gegen Metro unterscheidet nicht zwischen den Spleißvarianten. Um zu überprüfen, ob MetroA (+10, +39) und MetroC ( $\Delta$ 10, +39) wie MetroB (+10,  $\Delta$ 39) in den Nervterminalen perisynaptisch lokalisiert werden, wurden *UAS-metroA* und *UAS-metroC* (U. Thomas) durch *OK371-Gal4* in Motoneuronen in den *metro*-Mutanten exprimiert und auf Lokalisierung von *DLin-7* getestet. Genau wie MetroB rekrutieren beide Spleißvarianten *DLin-7* in das perisynaptische Kompartiment (Abb.3.22). Insbesondere sind auch hier wieder im Regelfall deutliche Abstände zwischen den BRP- und *DLin-7*-Markierungen festzustellen.

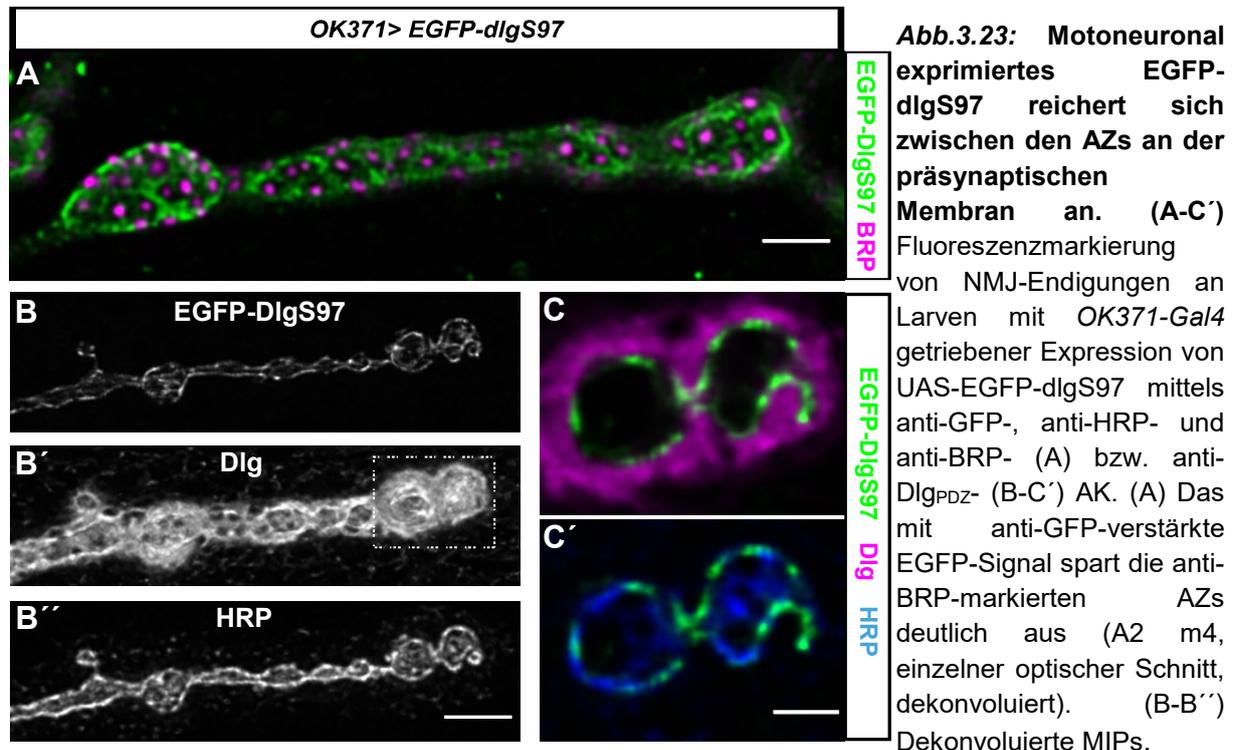


**Abb.3.22: PDZ-Spleißvariationen in Metro haben keinen offensichtlichen Einfluss auf die präsynaptische Lokalisierung von *DLin-7*.** (A-B'') Dreifachmarkierung mit anti-HRP-, anti-BRP- und anti-*DLin-7*-AK an NMJs von hemizygoten *metro*<sup>47</sup>/*metro*<sup>miniDf</sup>-Mutanten bei gleichzeitig motoneuronaler Expression von *UAS-metroA*- (A-A'') bzw. *UAS-metroC*- (B-B'') Konstrukten mittels *OK371-Gal4* (A3 m4, MIP, dekonvoluiert). Eingerahmte Boutons in A und B sind vergrößert in A', A'' und B', B'' als MIP von je 6 optischen Schnitten gezeigt. Die ansonsten in *metro*<sup>47</sup>-Mutanten fehlende NMJ-Expression von *DLin-7* wird durch beide Konstrukte präsynaptisch rekonstituiert. Sie bleibt dabei mit der potenziell Neurexinbindenden Variante MetroC ebenso auf die Bereiche abseits der AZ beschränkt (B') wie mit MetroA (A') oder MetroB (Bachmann et al., 2010). *Scale bar* in B: 5µm und in B'': 1µm.

### 3.5.3 Motoneuronal exprimiertes EGFP-DlgS97 ist an der Membran der Nervendigungen angereichert

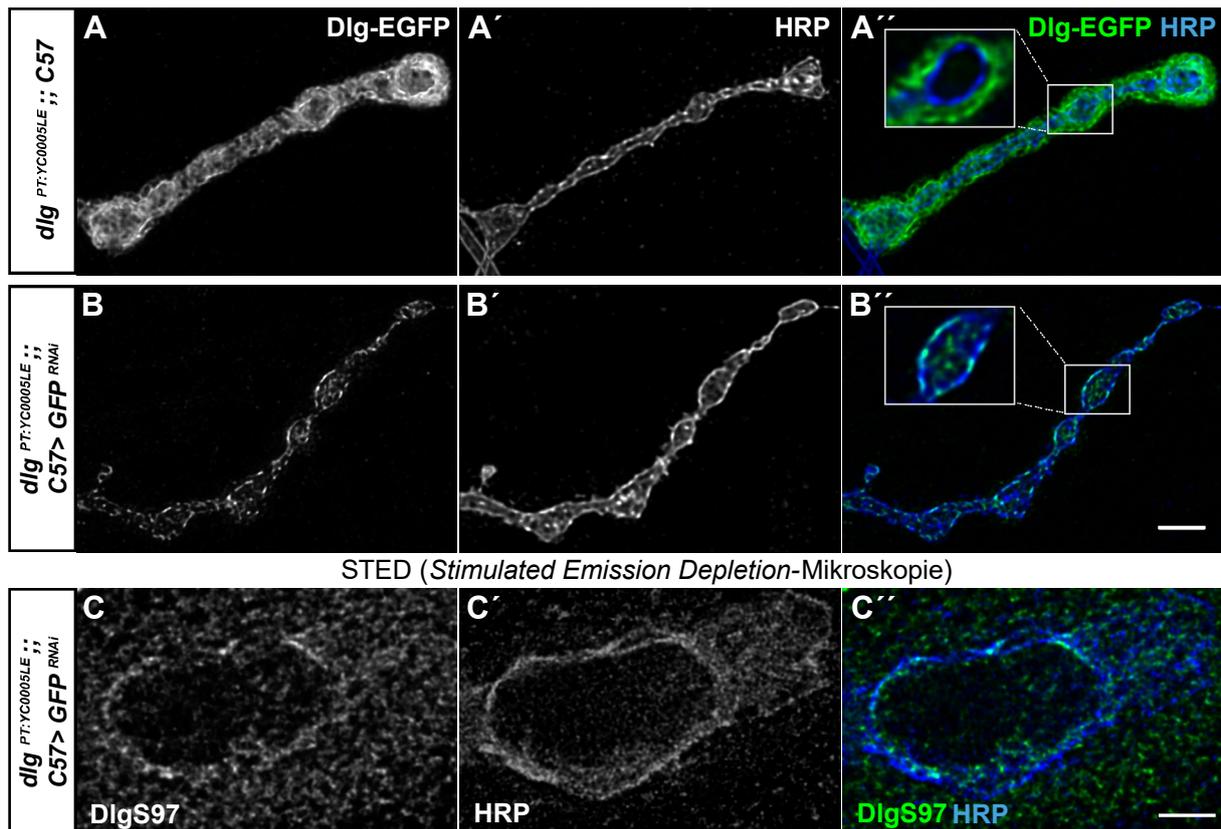
Nachdem eine perisynaptische Lokalisierung von Metro und *DLin-7* auf präsynaptischer Seite der NMJ zweifelsfrei festgestellt wurde, war zu vermuten, dass auch DlgS97 dort lokalisiert. Versuche, präsynaptisches Dlg nach muskelspezifischer, RNAi-basierter Depletion von endogenem Dlg zu detektieren, blieben zunächst erfolglos. Um zumindest die Möglichkeit einer kompartimentalisierten DlgS97-Lokalisierung in den Boutons von NMJs zu überprüfen, wurde *UAS-EGFP-DlgS97* in Motoneuronen exprimiert. Wie in Abbildung 3.23 zu sehen, lokalisiert das Fusionsprotein in ähnlicher Weise wie Metro und *DLin-7* in distinkten Abschnitten präsynaptisch an der Plasmamembran, die sich bei Einbezug von BRP als AZ-Marker als eindeutig perisynaptisch erwiesen (Abb.3.23A). Interessanterweise brachte beim gleichen Genotyp eine Markierung mit dem Dlg-AK zwar die typische postsynaptische

Lokalisation von Dlg zum Vorschein, jedoch konnte kein Überlappen mit dem präsynaptisch exprimierten EGFP-DlgS97 beobachtet werden (Abb.3.23C). Der verwendete monoklonale Dlg-AK ist gegen die in allen Varianten von Dlg vorkommende PDZ-Domäne gerichtet. Somit schließt sich eine Nichtdetektion auf Grund von spleißabhängigen Unterschieden aus. Dieser Befund legt daher eher nahe, dass Dlg präsynaptisch in einem Epitop-maskierenden Bindungsverhältnis vorliegt.



(C-C') Einzelne Ebene der in B' eingerahmten Boutons mit Überlagerungen von je zwei Markierungen (dekonvoluiert). Interessanterweise detektiert der monoklonale anti-Dlg<sub>PDZ</sub>-AK endogenes Dlg im SSR, nicht aber das präsynaptische EGFP-Dlg-S97 (C). Das in distinkten Abschnitten auftretende EGFP-Signal bleibt auf den HRP-markierten Bereich der Plasmamembran beschränkt (C'). *Scale bar* in A und C': 2µm, in B'': 5µm.

Eine alternative Vorgehensweise präsynaptisches Dlg nachzuweisen ergab sich durch die zwischenzeitliche Verfügbarkeit einer *Protein Trap*-Linie für Dlg (Kapitel 3.4). Damit bestand nun die Möglichkeit, unabhängig von dem PDZ-spezifischen AK, endogenes Dlg präsynaptisch anhand des EGFP-Anteils nachzuweisen. Tatsächlich konnte durch *C57-Gal4* getriebene Expression von zwei Kopien eines GFP-spezifischen RNAi-Transgens das EGFP-Signal postsynaptisch auf Hintergrundniveau gedrückt werden. Wie in Abbildung 3.24 deutlich wird, ist in dieser Konstellation endogenes Dlg präsynaptisch nachweisbar. In Präparaten des gleichen Genotyps wurde auch ein DlgS97-spezifischer AK angewandt und mittels STED-Mikroskopie (*Stimulated Emission Depletion Microscopy*) detektiert. Hierbei bestätigte sich die enge Assoziation des Proteins mit der Plasmamembran (Abb.3.24C-C').



STED (Stimulated Emission Depletion-Mikroskopie)

**Abb.3.24: Nachweis endogener Dlg-Expression an der präsynaptischen Membran. (A-B'')** Anti-HRP-markierte NMJ-Endigungen der *Protein Trap*-Linie  $dlg^{YC0005LE}$  (A2 m4, MIP, dekonvoluiert) *per se* (A-A') und bei gleichzeitiger Expression von zwei Kopien eines GFP-spezifischen UAS-RNAi Konstrukts im Muskel ( $dlg^{YC0005LE}/Y; +/UAS-GFP-RNAi; C57-Gal4/UAS-GFP-RNAi$ ) bei 29°C (B-B''). In A'' zeigt die Überlagerung beider Signale die typische postsynaptische Verteilung von Dlg, wobei der Ausschnitt eine einzelne optische Ebene vergrößert zeigt. In B'' bringt die RNAi-bedingte Depletion von EGFP-Dlg im Muskel die präsynaptische Membrankomponente von Dlg zum Vorschein, wiederum verdeutlicht anhand einer einzelnen, vergrößert dargestellten optischen Ebene. **(C-C'')** Die STED-mikroskopische Darstellung an einem einzelnen Bouton desselben Genotyps wie in B-B' mittels anti-HRP- und anti-DlgS97-AK markierten NMJ (A3 m4; einzelne konfokale Ebene) bestätigt die Lokalisierung von DlgS97 direkt an der Plasmamembran. *Scale Bar* in B'': 5µm. *Scale Bar* in C'': 1µm.

## 4 Diskussion

Hinsichtlich der vielfältigen und zellspezifischen Aufgaben als prototypisches Gerüstprotein der PD-MAGUK-Familie ist Dlg von großem Interesse. So hat es durch seine Funktion als Tumorsuppressor in Epithelien, bei seiner Rolle in der Aufrechterhaltung der apiko-basalen Zellpolarität, sowie seiner Aufgabe bei der asymmetrischen Zellteilung (Roberts et al., 2012; Carmena, 2020) große Aufmerksamkeit auf sich gezogen.

### 4.1 Die Rolle des Dlg-Gerüstkomplexes als Determinante von Glutamat-Rezeptorfeldern

In dieser Arbeit wurde Dlg als synaptisches Gerüstprotein an der larvalen glutamatergen NMJ von *Drosophila* untersucht. Zwar gehen erste Untersuchungen zu diesem Aspekt schon auf die frühen 1990er Jahre zurück, jedoch wurden diese oft unter der Annahme durchgeführt, dass Dlg an der NMJ eine ähnliche Rolle wie PSD-95 in der PSD von exzitatorischen Synapsen des Säugerhirns spielt (Lahey et al., 1994). Nach wie vor wird Dlg als häufig benutzter SSR-Marker mit Referenz zu PSD-95 genannt, wobei außeracht bleibt, dass PSD-95 weniger Sequenzhomologien zu Dlg aufweist, als die anderen Paralogen (Abb.1.1). Vor allem aber kolokalisiert Dlg an der NMJ nicht mit den GluRs (Abb.1.3C, C'), was auf funktionelle Unterschiede zwischen den beiden MAGuKs hindeutet. In Säuger PSDs decken sich wechselseitig die Befunde, dass PD-MAGUKs mit NMDA- und AMPA-Typ-Rezeptoren (GluN und GluA) kolokalisieren und physisch interagieren, sowie dass der gleichzeitige Ausfall von zwei oder drei PD-MAGUKs zu einer Reduzierung der GluRs führt (Chen et al., 2015). Für GluN erfolgt dabei die Bindung direkt über die PDZ-Bindungsmotive in den NR2-UE. Hingegen assoziieren GluA an PD-MAGUKs nicht vorrangig selbst, sondern über Stargazin als deren akzessorische UE (Chen et al., 2000; Bats et al., 2007; Opazo et al., 2012; Abb.1.2A). Diese Interaktionen dienen dabei nicht nur der synaptischen Verankerung der Rezeptoren, sondern auch ihrem Transport an die Zelloberfläche (Opazo et al., 2012). Keine der fünf GluR-Untereinheiten, aus denen sich die Rezeptoren der NMJ zusammensetzen (Marrus et al., 2004; DiAntonio, 2006; Thomas und Sigrist, 2012), weist ein kanonisches Typ-I-PDZ-Bindungsmotiv auf. Zwar wurde mit Neto eine akzessorische UE der GluRs identifiziert (Abb.1.2B), die für deren synaptische Expression essentiell ist, jedoch besitzt diese weder ein PDZ-Bindungsmotiv noch kolokalisiert sie mit Dlg (Kim et al., 2012; Ramos et al., 2015). Im Genom von *Drosophila* ist auch jeweils ein Ortholog für die NR1- und NR2-UE von GluN kodiert, wobei die NR2-UE ein PDZ-Bindungsmotiv besitzt. Während somit eine Interaktion zwischen Dlg und GluN prinzipiell möglich erscheint, konnten GluNs an der NMJ nicht nachgewiesen werden. Eine pharmakologische Wirkung von NMDA an der NMJ wurde

kürzlich einem präsynaptisch exprimierten GluR mit Homologie zu Kainat-Rezeptoren zugewiesen (Kiragasi et al., 2017). Unter den Untereinheiten der GluRs an der NMJ besitzt GluRIIC ein potentielles Typ-II-PDZ-Bindungsmotiv, sodass eine Bindung an Metro zunächst in Betracht kam. Dies konnte in Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten aber nicht bestätigt werden (Handschuh, 2009). Konsistent damit zeigte sich, dass Metro nicht mit den GRFs überlappt (Abb.3.9), so dass also auch eine mittelbare Assoziation von Dlg mit GluRs über Metro höchst unwahrscheinlich erscheint.

Angesichts dieser Betrachtungen ist es zumindest nicht überraschend, dass der Ausfall von Dlg nicht zu einer GRF-Reduzierung führt. Umgekehrt war aber auch nicht zwingend zu erwarten, dass es bei Verlust von Dlg zu einer Ausweitung der GRFs kommt. Bedeutet dies, dass die postsynaptische Rolle von Dlg an der NMJ bezüglich der GRFs keinerlei Implikationen für die Situation an Säugersynapsen hat? Interessanterweise wurde für PSD-95 auch eine begrenzende Funktion gegenüber der Inkorporation von GluA, die über die extrasynaptische Plasmamembran in PSDs gelangen können, postuliert. Allerdings wurde dieser Effekt nur im Zusammenhang mit der erhöhten Oberflächenpräsenz von GluA bei Überexpression von SAP97 offensichtlich (Schlüter et al., 2006). Dieses Beispiel illustriert, dass aufgrund von Redundanz, sowie isoformspezifischer Ausprägungen der PD-MAGUK-GluR-Interaktionen, zuweilen funktionelle Aspekte bei der experimentellen Analyse durch andere überlagert werden, und somit schwer aufzudecken sind.

Wie ist die Aufweitung der GRFs zu sehen und welche funktionellen Auswirkungen könnte sie haben? Es könnte sich um Vergrößerungen bei gleichbleibender oder gar erhöhter GluR-Dichte handeln, wobei sich auch die Subtyp-Komposition ändern könnte. Andererseits könnte es sich aber auch um eine Vergrößerung des betreffenden Subkompartiments handeln, ohne dass sich die Menge der GluRs ändert, was zu einer geringeren GluR-Dichte führen würde. In dieser Arbeit galt das Augenmerk vorrangig der Bestimmung der physikalischen Größe der GRFs, sodass diese Frage nicht quantitativ beantwortet werden kann. Bei der Durchführung der CLSM-Aufnahmen waren jedoch keine gravierenden Adjustierungen der Laser-Intensitäten erforderlich, um, jeweils bis an die Sättigung gehend, die GRFs zu erfassen. Insbesondere waren keine gerichteten Anpassungen in Bezug auf die Genotypen notwendig. Dies spricht also gegen eine relevante Veränderung der Dichte der GluRs. Für muskelspezifische Depletion von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Spectrin wurde gezeigt, dass bei drastisch vergrößerten Rezeptorfeldern die mEJC-Amplituden entsprechend vergrößert waren (Pielage et al., 2006). Für *metro*-Mutanten beträgt die Flächenzunahme der GRFs gegenüber dem Wildtyp immerhin ca. 50%. Begleitend zu der vorliegenden Arbeit wurden von Robert Kittel für die *metro*-Mutanten elektrophysiologische Messungen (Bachmann et al., 2010) durchgeführt. Diese ergaben für die Amplitude der EJCs keine Unterschiede zwischen Kontroll- und *metro*-mutanten NMJs, was mit der weitgehend unveränderten Zahl synaptischer Kontakte

(Abb.3.5B) zusammenpasst. Auch die Amplitude und die Frequenz der mEJCs zeigten keine Auffälligkeiten. Aufgrund dieses Befundes wurde in dieser Arbeit auf eine mögliche Unterscheidung zwischen den beiden GluR-Subtypen verzichtet. Eine einfache Erklärung für die trotz vergrößerter GRFs unveränderte basale synaptische Transmission ist, dass die expandierenden GRFs vornehmlich mit dem schnell desensitisierenden GluR-Subtyp IIB aufgefüllt werden, der im Normalfall nur unwesentlich zur postsynaptischen Antwort beiträgt (Petersen et al., 1997; Schmid et al., 2008). Trotzdem soll auch die Möglichkeit veränderter GluRIIA-Menge diskutiert werden, da dies auch im Vergleich zum *dlg<sup>S97</sup>*-Phänotyp von Interesse ist (s.u.). Bei einer generell erhöhten oder verringerten Menge an GluRs des Subtyps IIA wären elektrophysiologische Veränderungen zu erwarten gewesen. Eine moderate Überexpression von GluRIIA erhöht die Gesamtzahl synaptischer Kontakte und führt folgerichtig zu verstärkten evozierten (e)EJCs. Interessanterweise wurde jedoch kein nennenswerter Einfluss auf die Amplitude der mEJCs beobachtet (Sigrist et al., 2002). Hingegen wurde bei sehr starker Überexpression (>2-fach) sehr wohl eine erhöhte Amplitude der mEJCs gemessen, während gleichzeitig die eEJCs kaum verändert waren, was als Resultat homöostatischer Regulierung bei der Vesikelfreisetzung gewertet wurde (DiAntonio et al., 1999; Metwally et al., 2019). Zu berücksichtigen sind auch entwicklungsbedingte Veränderungen bezüglich der Menge an GluRIIA in einzelnen GRFs. Die mit deren Reifung einhergehende Zunahme von GluRIIA ist sehr wahrscheinlich ursächlich für ein relativ breites Amplitudenprofil der mEJCs, wie es beobachtet wurde, wenn nur GluRIIA exprimiert ist (Schmid et al., 2008). Da die GRFs einer NMJ nicht synchron entstehen und reifen, reflektieren die durchschnittlichen mEJC-Amplituden das Spektrum unterschiedlich gereifter GRFs. Im Normalfall wird mit zunehmender Reifung vermehrt GluRIIB inkorporiert und die Menge an GluRIIA, die in ein GRF eingebaut wird, begrenzt (Thomas und Sigrist, 2012). Wäre es bei den *metro*-Mutanten schon während der Reifung zu einem vermehrten Einbau von IIA gekommen, hätte sich dies in einer Verschiebung des mEJC-Profiles und konkret in einer erhöhten mittleren mEJC-Amplitude gezeigt. Dies wurde nicht beobachtet. Für den Fall, dass die finale Begrenzung der GluRIIA-Inkorporation nicht effizient erfolgt, könnte dies für die mEJC-Amplituden folgenlos bleiben, wenn man annimmt, dass der Glutamatgehalt eines einzelnen synaptischen Vesikels nicht ausreicht, um alle Rezeptoren eines reifen, wildtypischen GRF zu bedienen. Hierfür spricht, dass Mutanten mit erhöhtem vesikulären Transmittergehalt stärkere mEJCs auslösen können (Karunanithi et al., 2002). Vor dem Hintergrund derartiger Mutanten könnte der Verlust von Metro stärkere Effekte erzeugen.

Im Unterschied zu den *metro*-Mutanten wurden für ein *dlg<sup>S97</sup>*-spezifisches Allel gefunden, dass die Vergrößerung der GRFs mit einer erhöhten Menge an Rezeptoren präferenziell des Subtyps IIA einhergeht. Die mEJCs waren zugleich moderat erhöht (Astorga et al., 2016). Obwohl sich gemäß dieser Arbeit die GRF-Größen zwischen den *dlg<sup>S97</sup>*-, *metro*- und *dLin-7*-

Mutanten untereinander nicht wesentlich unterscheiden, also in etwa gleichem Maße gegenüber dem Wildtyp vergrößert sind, zeigen sich dennoch deutliche Unterschiede bezüglich der mEJC-Amplituden für *dlg*<sup>S97</sup>- und *metro*-Mutanten, die allerdings in jeweils unterschiedlichen Studien erhoben wurden (Mendoza-Topaz et al., 2008; Astorga et al., 2016 versus Bachmann et al., 2010). Daher ist zu vermuten, dass neben der physikalischen Begrenzung der GRFs ein weiterer, Dlg-spezifischer Aspekt die Antwort der Postsynapse bestimmt. Dies könnte insbesondere die Subtyp-Komposition der GRFs betreffen. Um die interessante Möglichkeit zu prüfen, dass die Größe der GRFs zwar durch DlgS97, Metro und *DLin-7* gemeinsam beschränkt wird, aber DlgS97 und Metro/*DLin-7* den Zugang der beiden GluR-Subtypen gegenläufig beeinflussen, wäre eine vergleichende Überprüfung der GluRII-Subtypen an *metro*-, *dLin-7* und *dlg*<sup>S97</sup>-Mutanten NMJs vonnöten. Die Verfügbarkeit von genomischen Konstrukten, die eine Detektierung von IIA- und IIB-Untereinheiten auf nativem Expressionslevel ermöglichen (Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008), bieten hierfür ebenso gute Voraussetzungen wie das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur quantitativen 3D-Erfassung von GluRs bzw. GRFs. Hierzu sei kritisch angemerkt, dass die Methoden zur Quantifizierung von GluR-Mengen und GRF-Größen in diversen Publikationen wenig transparent dargestellt sind (Pielage et al., 2006; Mendoza-Topaz et al., 2008; Astorga et al., 2016). Zwar wird von einer 3D-Segmentierung gesprochen, es wird aber keine Aussage darüber getroffen, wie die Daten schlussendlich prozessiert und analysiert wurden. Der in dieser Arbeit verwendete Algorithmus bedingt, dass wenn zwei GRFs aufeinandertreffen, diese automatisch getrennt werden. Dies bedeutet folgerichtig, dass der Größenzuwachs durch angrenzende GRFs begrenzt ist und dieser auch im Vergleich zu den o.g. Arbeiten in dieser Arbeit eher moderat ausfällt (Abb.3.11, 3.12, 3.13). Interessanterweise ergab sich in den untersuchten Mutanten kein Unterschied im aus dem Wildtyp bekannten eins-zu-eins-Verhältnis von BRP zu GluR (s.o.). Pielage et al. (2006) zeigten ein EM-Bild in dem eine sehr große AZ zu sehen ist. Inwieweit tatsächlich eine Begrenzung der GRFs real vorhanden ist kann in der beugungsbegrenzten Lichtmikroskopie nicht beantwortet werden. Eine Möglichkeit wäre die Anwendung der 3D-STED- oder wie in der Arbeit von Muhammad et al. (2015) angewendeten 3D-SIM-Mikroskopie (engl.: *three-dimensional structured illumination microscopy*). Die anschließende qualitative Analyse nach der in dieser Arbeit entwickelten Methode zeigt deutlich vergrößerte GRFs mit einem erhöhten BRP zu GluR-Verhältnis. Wiederum wurde aber nicht beschrieben, ob das wildtypische BRP zu GluR-Verhältnis als Basis des Separierungsalgorithmus berücksichtigt wurde.

Der Mechanismus, über den der trimere Komplex die GRF-Größe reguliert, bleibt vorerst ungeklärt. Vorstellbar ist, dass transsynaptische Zelladhäsionskomplexe, die mit den Gerüstproteinen verknüpft sind, eine Art Saum bilden, der die GRFs begrenzt. Insbesondere kann vermutet werden, dass die direkte Interaktion zwischen Dlg und FasII, dem Homolog von

NCAM (*neural cell adhesion molecule*; Abb.1.2A u. B), der Begrenzung der synaptischen Kontakte (inklusive GRFs) dient. Die trans-homophile Interaktion von FasII und dessen Bindung an Dlg könnte dazu beitragen, das Spectrin-Zytoskelett an die synaptische Membran anzudocken und hierrüber die Lage der GRFs in regelmäßigen Abständen zu definieren (Pielage et al., 2006). Sowohl in starken *dlg*-Allelen, in denen DlgA und DlgS97 betroffen sind und FasII stark reduziert ist, als auch in *fasII*-Mutanten finden sich stark vergrößerte synaptische Kontakte (Stewart et al., 1996; Thomas et al., 1997). In *dlgS97*-spezifischen-Allelen und auch in *metro*-Mutanten erscheint FasII jedoch wenig verändert (U.Thomas, pers. Kommunikation), sodass möglicherweise weitere, Metro- bzw. DLin-7-spezifische Interaktionen eine Rolle in der Begrenzung der GRFs spielen. Unter den 12 physischen Interaktionspartnern, die bislang für DLin-7 vorgeschlagen werden (<http://www.droidb.org/FBgn0039269>) befindet sich keiner, für den ein Bezug zu einer solchen Funktion naheliegt. Unter den 23 für Metro vorgeschlagenen Interaktionspartnern (<http://www.droidb.org/FBgn0050021>) befinden sich mit Neurexin IV und Tenascin-major (Ten-m) zwei Kandidaten, die als Zelladhäsionsmoleküle beschrieben sind. Während Neurexin IV an epithelialen und glialen *Septate Junctions* gefunden wird (Tepass und Tanentzapf et al., 2001), wurde Ten-m u.a. als Zelladhäsionsmolekül an der NMJ beschrieben, wo es im SSR angereichert ist (Mosca et al., 2012). Konkret wurde Metro in einem *high-throughput screen* basierend auf der Immunpräzipitation von Venus-markiertem Ten-m aus Embryonen einer *Protein Trap*-Linie mit anschließender Massenspektrometrie als potenzieller Interaktionspartner identifiziert (Lowe et al., 2014). Muskelspezifischer *knockdown* von Ten-m führt zur Verminderung von Spectrin und moderaten Störungen in der Ausrichtung von AZs und GRFs (Mosca et al., 2012). Die Ähnlichkeiten bezüglich Lokalisation und Phänotyp lassen es sinnvoll erscheinen, der potenziellen Interaktion zwischen Metro und Ten-m weiter nachzugehen.

Inwieweit lässt sich das Konzept, dass Zelladhäsionsmoleküle, die über den Dlg-Komplex an das Zytoskelett geknüpft sind und so die synaptischen Kontakte begrenzen, mit der Situation an glutamatergen Säugersynapsen vergleichen? Anders als FasII lokalisiert NCAM im zentralen Bereich von Synapsen (Fux et al., 2003) und ist dabei allenfalls mittelbar an Dlg-Homologe gebunden (vgl. auch Abb.1.2A u. B). Hingegen sind andere Zelladhäsionsmoleküle, insbesondere N-Cadherin und SynCAM peripher angereichert (Uchida et al., 1996, Kilinc, 2018; Abb.1.2A). Der Verlust von NCAM führt anders als der von FasII zu verkleinerten Synapsen und auch ein Ausfall von N-Cadherin bedingt eine Destabilisierung von Synapsen (Sytnyk et al., 2006; Kilinc, 2018). In jüngster Zeit wurde für Säugersynapsen die Existenz sogenannter Nanosäulen (*Nanocolumns*) vorgeschlagen, die sich über den synaptischen Spalt hinweg erstrecken und Freisetzungstellen sowie postsynaptische Rezeptoren beinhalten, sich also wie (austauschbare) Module verhalten (Tang et al., 2016; Biederer et al., 2017;

Suzuki et al., 2018; Heine und Holcman, 2020). Bislang ist unklar, ob diese Nanosäulen durch Zelladhäsionsmoleküle (z.B. NCAM, Neurexin-Neurologin) gegeneinander abgeschirmt sind und somit jede für sich genommen eine Kompartimentierung aufweist, die der eines einzelnen synaptischen Kontakts an der NMJ entspricht.

#### 4.2. Das dynamische Austauschverhalten des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes an der NMJ

Wie in dieser Arbeit gezeigt, begrenzt der DlgS97-Metro-DLin-7-Komplex die Ausdehnung der GRFs. In Anbetracht der Tatsache, dass GRFs an larvalen NMJ fortwährend neu entstehen (Rasse et al., 2005), wäre es vorstellbar, dass die Dynamik des DlgS97-Komplexes und die der GluRs in Beziehung stehen. Es konnte von Schmid et al. (2006) gezeigt werden, dass bei Verminderung von GluRIIA, Dlg (sowie sein Bindungspartner FasII) nicht mit der gleichen Stringenz aus den GRF-Bereichen ausgeschlossen wird wie an wildtypischen NMJs. Bei der Entstehung neuer GRFs an bereits existierenden Boutons könnte daher eine Verdrängung von Dlg vermutet werden, möglicherweise begünstigt durch  $Ca^{2+}$ -Einstrom über GluRIIA und nachgeschalteter CaMKII-abhängiger Phosphorylierung von Dlg (Koh et al., 1999; Haghghi et al., 2003). Andererseits könnte bei der Etablierung der GRFs an neu entstehenden Boutons eine Rekrutierung von Dlg an das sich entwickelnde SSR induziert werden (Schmid et al., 2006). Entgegen der Vorstellung einer dergestalt abgestimmten Dynamik von DlgS97 und GluR wiesen die früheren Untersuchungen mittels FRAP einen sehr hohen *Turnover* von DlgS97 im Minutenbereich aus, während sich der *Turnover* von GluRs über Stunden hinzieht (Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008). Tatsächlich ergaben FRAP-Untersuchungen von PD-MAGUKs an Säugersynapsen ebenfalls hohe Dynamiken. Beispielsweise erreichte YFP-SAP97 bereits nach 6 Minuten ein Plateau von 59% in *Spine*-Köpfen von hippocampalen Neuronen. PSD95-YFP erreichte unter den gleichen Bedingungen 35% (Nakagawa et al., 2004). In anderen Studien wurden für PSD-95 geringere *Turnover*-Raten gemessen (15% nach 30 Minuten bzw. ~15% nach 6 Minuten), wobei berücksichtigt werden muss, dass sowohl die Randbedingungen (Temperatur und  $Ca^{2+}$ -Konzentration) als auch der methodische Ansatz (Photokonversion und FRAP) variierten (Kuriu et al., 2006; Steiner et al., 2008). Auch SAP102/Dlg3 zeigte im direkten Vergleich zu PSD-95 eine besonders große und schnelle mobile Fraktion (80,5% *versus* 36,2%, jeweils nach 5 Minuten; Zheng et al., 2010).

Die in dieser Arbeit durchgeführten FRAP-Experimente bestätigten die recht hohe Dynamik von überexprimierten EGFP-DlgS97. Durch die Verwendung verschiedener Treiberlinien stellte sich jedoch heraus, dass sowohl die mobile Fraktion als auch die halbmaximale *Recovery* von DlgS97 sehr stark vom Expressionslevel des Proteins abhängt. Zwar ist Dlg an sich bereits stark exprimiert, jedoch zeigte sich, dass die Gal4-getriebene Expression von Dlg

im Muskel nochmals um das etwa Drei- bis Fünffache über der endogenen Expression liegt, wie sie in einer *Dlg-Protein Trap*-Linie angezeigt wird (Abb.3.16D). Letztere zeigte eine deutlich verringerte Dynamik, so dass über den Beobachtungszeitraum von 2 Stunden kein nennenswerter Austausch des Proteins detektiert wurde. Diese Aussage gilt für DlgA und DlgS97, da in der verwendeten und anderen verfügbaren *Protein Trap*-Linien stets beide Formen mit EGFP bzw. Venus markiert sind. Demzufolge könnte der *Turnover* von Dlg dem der GluRs doch ähnlicher sein als ursprünglich angenommen. Mögliche Unterschiede in der Dynamik zwischen endogenem DlgA und DlgS97 würden sich demnach erst nach einem längeren Zeitraum beobachten lassen. Bei vergleichbarer Überexpression erwies sich aber DlgS97 als die deutlich weniger dynamische Variante. Dies deutet darauf hin, dass die durch die L27-Domäne vermittelte Homodimerisierung und/oder die Bindung von MetroB/*DLin-7* eine Immobilisierung von DlgS97 im SSR begünstigen. Konsistent damit ist der Befund aus neuronalen Säugerkulturen, dass SAP97/Dlg1, welches eine mutierte L27-Domäne besitzt und dadurch die Fähigkeit zur homophilen Interaktion verloren hat, eine höhere Dynamik in synaptischen *Spines* aufweist (Nakagawa et al., 2004). In dieser Arbeit wurde selektiv der Einfluss der Heterodimerisierung adressiert. Die betreffenden FRAP-Experimente in *dLin-7*-Mutanten ergaben eine erhöhte Dynamik für DlgS97. Dass diese jedoch nicht ganz an die Dynamik von DlgA heranreicht, könnte an der verbleibenden Fähigkeit der Di- oder Oligomerisierung von DlgS97 liegen. Die Befunde deuten auf die Möglichkeit hin, dass die Dynamik von DlgS97 über die Verfügbarkeit bzw. die Bindung von MetroB/*DLin-7* reguliert werden kann. Eine Phosphorylierung der L27-Domäne durch CaMKII, wie für SAP97 der Ratte beschrieben (Mauceri et al., 2004), ist für DlgS97 (auch für die Homologen in Maus und Mensch) unwahrscheinlich, da der betreffende Serin-Rest nicht konserviert ist.

Während überexprimiertes DlgS97 eine hohe Dynamik zeigt, stellt sich die Situation für MetroB und *DLin-7*, obwohl ebenfalls stark überexprimiert, unerwarteter Weise anders dar. Über eine rasche, vermutlich diffusionsbedingte Auffüllung auf Hintergrundniveau hinaus, war über 45 Minuten keine weitere Anreicherung im SSR zu beobachten. So ergab sich zwar ein relativ niedriger  $t_{1/2}$ -Wert, der sich definitionsgemäß aber nur auf die in diesem Fall sehr kleine mobile Fraktion bezieht (Abb.3.17). Auch in allen Zweierkombinationen war kein nennenswerter Austausch für MetroB bzw. *DLin-7* feststellbar. Erst, wenn alle drei Proteine des Komplexes gemeinsam überexprimiert wurden, ergab sich für MetroB und *DLin-7* ein Austausch, der sich dem von DlgS97 annäherte. Wie kann dieses Verhalten, insbesondere die Diskrepanz zwischen an sich eng verknüpften Proteinen interpretiert werden? DlgS97 ist prinzipiell ein multivalentes Protein, kann daher potentiell über eine Reihe von Interaktionspartnern an das SSR binden. Bei Überexpression ist es zu vermuten, dass es zu einer Konkurrenz zwischen DlgS97-Molekülen um diese Bindungspartner kommt. Dies könnte zu einer verminderten Verankerung des Moleküls führen, und so den erhöhten Austausch bedingen. Per se treffen

diese Überlegungen auch auf Metro zu. Allerdings ist dessen Lokalisierung sowohl im hohen Maße von DlgS97 abhängig, was für die Spleißvariante MetroB im besonderen Maße zutrifft (Handschuh, 2009). Da, wie die Untersuchung an der Dlg-PT-Linie zeigt, DlgS97 wenig dynamisch ist, überträgt sich dies aufgrund der limitierenden Funktion von DlgS97 auf Metro. Ein Austausch von Metro wäre demnach nur zu erwarten, wenn die Bindung zwischen DlgS97 und Metro selbst unbeständig wäre. Bei gleichzeitiger Überexpression von DlgS97 und Metro wird *DLin-7* der limitierende Faktor, da es zur Stabilisierung von Metro gebraucht wird. Ansonsten gelten aufgrund der wechselseitigen Abhängigkeit für die Dynamik von *DLin-7* die gleichen Überlegungen wie für Metro. Im Falle der tripple-Expression hätte man erwarten können, dass DlgS97 durch Metro/*DLin-7* immobil wird. Hierfür ergaben sich jedoch keine Anhaltspunkte (Abb.3.18). Stattdessen wurde offenbar der Komplex als Ganzes mobil. Dies deutet daraufhin, dass andere Bindungspartner als Determinanten für die Verankerung des Komplexes am SSR fungieren und als solche limitierend sind. Die Identität dieser Bindungspartner ist ungeklärt, es sollte sich aber um TM-Proteine und/oder auch um Elemente des Zytoskeletts handeln (Bachmann et al., 2010). Insbesondere könnte über die HOOK-Region von DlgS97, die für die Lokalisierung an der NMJ bedeutsam ist, mittelbar eine Verbindung an das Spectrin Zytoskelett erfolgen (Thomas et al., 2000; Pielage et al., 2006).

#### 4.3 Überlegungen zur Durchführung der FRAP-Experimente

Neben der Überexpressionsproblematik, wie sie in dieser Arbeit offenkundig wurde, sollen nachfolgend einige methodische Aspekte der FRAP-Experimente diskutiert werden.

Die hier beschriebenen Experimente wurden unter niedrigen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - [0,2 mM] und hohen  $\text{Mg}^{2+}$ - [20 mM] Konzentrationen durchgeführt, um das larvale Präparat ruhig zu stellen, eine Maßnahme die der vergleichsweise geringen Aufnahmegeschwindigkeit des *CLSM* geschuldet wurde. Während es unwahrscheinlich erscheint, dass bei physiologischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [1-2 mM] sich grundsätzlich andere Befunde zur Dynamik von überexprimiertem Dlg ergeben würden, sind messbare Änderungen der Mobilität von Dlg auf endogenem Expressionslevel durchaus vorstellbar. Beispielsweise könnten anhand der *Protein Trap*-Linie in Kombination mit genetischen, pharmakologischen oder auch optogenetischen Manipulationen aktivitätsabhängige Dynamiken von Dlg innerhalb des zweistündigen Zeitraumes erfasst werden (Nagel et al., 2003; Ataman et al., 2008; Frank et al., 2020). Hierbei wäre die Möglichkeit, die Muskelkontraktion unabhängig von synaptischer Übertragung pharmakologisch zu inhibieren, besonders hilfreich. Alternativ, jedoch sich nicht gegenseitig ausschließend, könnten längere Beobachtungszeiträume realisiert werden, indem intakte Larven während der Aufnahmen anästhesiert werden. (Rasse et al., 2005; Zhang et al., 2007). Dabei sollte berücksichtigt werden, dass Anästhetika wie das verwendete Desfluran einen Einfluss auf PDZ-Domänen vermittelte Bindungen haben können (Fang et al., 2003;

Mandal und Pettegrew, 2008). Dass endogenes Dlg durchaus hohe Dynamiken entfalten kann, belegen FRAP-Untersuchungen an *Septate Junctions* in Epithelien, die eine sehr schnelle *Recovery* ergaben (mF:  $78.9 \pm 6.2\%$  nach 10-12 min mit  $t_{1/2}$  von  $1.67 \pm 0.46$  Minuten; Oshima und Fehon, 2011).

Wie im Methodenteil 2.14 beschrieben, wurde die zeitliche Abfolge der Bildstapel anhand der initialen Experimente mit EGFP-DlgS97 festgelegt. Für Experimente mit besonders schnellen *Recovery*-Zeiten ( $t_{1/2}$ ), wären kürzere Intervallzeiten notwendig, um exakte Messungen der Halbmaximalwerte zu erhalten. Ein Spinning-Disk-Setup, das wesentlich höhere Aufnahmezeiten und damit kürzere Intervalle erlauben würde, stand allerdings ebenso wenig zur Verfügung, wie jüngst entwickelte Mikroskopieverfahren, die unter Berücksichtigung der optischen Bedingungen, Computergestützte Berechnungen anwenden (Schumacher und Bertrand, 2019), um im Weitfeldmodus Stapel optischer Schnitte in nahezu Echtzeit zu erzeugen.

Grundsätzlich werfen die in dieser Arbeit dokumentierten FRAP-Experimente ein kritisches Licht auf FRAP-Befunde, die anhand überexprimierten Proteinen erhoben wurden. Für Dlg zeigte sich, dass die immobile Fraktion von überexprimierten EGFP-Dlg vermutlich sich so verhält wie endogenes Dlg, wie es mit der *Protein Trap*-Linie adressiert wurde. Wie zuvor diskutiert, könnte dabei die Verfügbarkeit von Interaktionspartnern von Belang sein. Entgegen intuitiver Annahme könnte z.B. mit Blick auf sich entwickelnde synaptische Strukturen, eine (temporär) erhöhte Expression eines multivalenten Gerüstproteins wie Dlg zu einer „Aufweichung“ multimerer Komplexe führen und so Raum für strukturelle Plastizität (z.B. Bildung neuer Boutons) geben.

#### 4.4 Die Existenz des präsynaptischen DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes

Während die Expression von Dlg, Metro und *DLin-7* im SSR der NMJ prominent ist und sich mit der Eingrenzung der GRFs dem trimeren Komplex eine Funktion zugeordnet werden konnte, ergab sich aus funktionellen Rettungsexperimenten (Lahey et al., 1994; Budnik et al., 1996; Thomas et al., 1997; Mendoza-Topaz et al., 2008; Astorga et al., 2016) die Frage nach der Existenz und Lokalisierung des Komplexes in präsynaptischen Terminalien. In dieser Arbeit ist erstmals explizit gezeigt, dass Dlg, Metro und *DLin-7* in präsynaptischen Boutons vorliegen, konkret an der präsynaptischen Membran, jedoch außerhalb der AZ lokalisieren.

Wesentlich waren hierfür zwei genetische Ansätze bei denen die stark dominierende SSR-Expression der Proteine herabgesetzt wurde. Für Metro und damit auch für *DLin-7* erfüllte das *metro*<sup>SH0636</sup>-Allel diesen Zweck, da, wie gezeigt (Abb.3.19, 3.20), in diesem Allel die Muskel-, aber nicht die präsynaptische Expression unterdrückt ist. Für Dlg wurde dies durch muskelspezifische Expression von RNAi erreicht. Aufgrund einer wahrscheinlichen

Epitopmaskierung für den weithin gebräuchlichen anti-Dlg-AK führte dieser prinzipielle Ansatz aber erst bei Benutzung der *Protein Trap*-Linie unter Einbezug eines GFP-RNAis zum Erfolg. Verantwortlich für die Epitopmaskierung könnte die Bindung von Dlg an den C-Terminus der PMCA sein (U. Thomas, pers. Kommunikation). In Analogie zur Rolle des perisynaptischen Dlg-Metro-*dLin-7*-Komplexes im SSR, könnte derselbe Komplex auf präsynaptischer Seite die Ausdehnung der AZs begrenzen (Karunanithi et al., 2002; Mendoza-Topaz et al., 2008). Stichprobenartige EM-Untersuchungen an *metro*-mutanten Boutons, die von Carolin Wichmann durchgeführt wurden (Bachmann et al., 2010), ergaben AZ-Durchmesser von 400 bis 800nm und damit keine auffällige Expansion gegenüber den wildtypischen AZs, jedoch oftmals eine enge Nachbarschaft derselben zueinander, was die Situation der GRFs auf postsynaptischer Seite widerspiegelt. Während die AK-Markierung der GluRs per Definition zur Bestimmung der GRF-Größen dient, erlaubt die Markierung von BRP keine unmittelbare Aussage über die planare Ausdehnung der AZs über den zentralen T-Bar hinaus. Im Prinzip könnte der Abstand des zentralen Ca<sup>2+</sup>-Kanals (Cacophony; Fouquet et al., 2009, Abb.1.2B) zu randständigen AZ-Markern durch eine quantitative, nicht beugungsbegrenzte Lichtmikroskopie, wie z.B. STED, bestimmt werden. Ob sich andere AZ-AKs, z.B. gegen Syd-1, Liprin oder UNC13 eignen, die Gesamtausdehnung der elektronendichten Struktur zuverlässig anzuzeigen, erscheint fraglich, da diese entweder einer entwicklungsabhängigen Dynamik unterliegen (Owald et al., 2010) oder selbst nur einen Teilbereich innerhalb der AZ anzeigen (Bohme et al., 2016). Eine Lokalisierung am Rand der AZ wurde für Neurexin gefunden (Li et al., 2007; Oswald et al., 2012; Abb.1.2B). Die Detektion mittels AK an der NMJ für quantitative Zwecke erscheint jedoch schwierig (Stephan Sigrist, pers. Kommunikation). Neurexin galt zudem als möglicher Bindungspartner für die PDZ-Domäne von Metro. In Hefe-Zwei-Hybrid Experimenten konnte eine C-terminale Interaktion mit der PDZ-Domäne der Metro-Spleißvariante C, nicht jedoch der für MetroB dargestellt werden (Handschuh, 2009; Abb.1.4B). Deutlich robuster war in diesen Experimenten jedoch die als Referenz dienende Interaktion mit der PDZ-Domäne von CASK, die zwischen Säugern und *Drosophila* konserviert ist (Hata et al., 1996; Sun et al., 2009). Bezeichnenderweise wurden aber als *in vivo* Interaktionspartner an der NMJ für den C-Terminus von Neurexin die PDZ-Proteine Syd-1 und Spinophilin identifiziert (Owald et al., 2012; Muhammad et al., 2015). Es bleibt ungeklärt ob MetroC oder CASK eine Rolle als weitere präsynaptische Interaktionspartner spielen.

Es ist naheliegend zu vermuten, dass sich die ungleichmäßige Verteilung der synaptischen Kontakte, die sich teilweise in beengter Nachbarschaft von AZs und GRFs ausdrückt, mit der Vergrößerung und unregelmäßigen Gestalt der Boutons von *dlg*<sup>S97-</sup>, *metro*- oder *dLin-7*-Mutanten mechanistisch verknüpft ist. Diese strukturelle Homöostase der *metro*-Mutanten geht mit gleichbleibender synaptischer Stärke einher. Ähnliche strukturelle NMJ-Defekte, bei denen die Boutons zwar zahlenmäßig vermindert, aber vergrößert sind und bei denen sich die

Gesamtzahl der AZs (Abb.3.5B) nicht verändert sind auch in anderen Mutanten beobachtet worden. Dabei wird offensichtlich, dass die Gesamtzahl der Boutons invers korreliert zu deren Größe ist (Pennetta et al., 2002; Besse et al., 2007; Miech et al., 2008; Pawson et al., 2008; Mosca et al., 2012; Goel et al., 2019b; Goel et al., 2019a). Vergrößerte und unregelmäßig geformte Boutons spiegeln häufig Störungen des Mikrotubuli-basierten Zytoskeletts in den Axonterminalen wieder, das ansonsten maßgeblich für die üblicherweise kugelförmige oder ellipsoide Ausformung der Boutons verantwortlich ist (Roos et al., 2000; Pennetta et al., 2002). Insofern ist zu vermuten, dass die Bouton-Phänotypen in den *metro*- und *dLin-7*-Mutanten präsynaptischer Natur sind, jedoch wurde dies nicht mittels präsynaptischer Expression von Metro bzw. *DLin-7* in Rettungsexperimenten verifiziert. Ein anderer morphologischer Aspekt, der sich in den untersuchten Mutanten herauskristallisierte, war das vermehrte Auftreten von sogenannten *Ghost*-Boutons und HRP-positiven Überbleibseln, die möglicherweise Rückstände sogenannter Synaptopodien darstellen (Abb.3.7, 3.8; Ataman et al., 2008; Fuentes-Medel et al., 2009). In *metro*<sup>SH0636</sup>-Larven, in denen Metro nur präsynaptisch exprimiert ist, sind ebenfalls Ghost und Ablagerungen zu beobachten. Dies spricht für einen postsynaptisch bedingten Phänotyp. Interessanterweise zeigt sich auch in Mutanten für den Phagozytose-Rezeptor Draper ein ähnlicher Phänotyp. Dieser ist sowohl an der NMJ im Muskel, als auch in Gliazellen für das Aufräumen der HRP-Ablagerungen und Beseitigung der *Ghosts* verantwortlich (Fuentes-Medel et al., 2009). Eine interessante Frage ist, ob Metro in diesem Signalweg eine Rolle spielt.

#### 4.5 Fazit/Ausblick

Durch Kombination genetischer Ansätze mit Mikroskopie-basierten Analysen wurden in dieser Arbeit verschiedene Aspekte des membran-assoziierten Dlg-Gerüstkomplexes an der weithin als Modellsystem für glutamaterge Synapsen genutzten larvalen NMJ bearbeitet. Demnach stabilisieren DlgS97, Metro und *DLin-7* einander an der NMJ und limitieren die Größe von Glutamaterezeptorfeldern. In deutlichem Gegensatz zu den Dlg-Homologen an glutamatergen Synapsen im Säugerhirn lokalisiert der Dlg-Komplex abseits der Rezeptoren. Insofern lassen sich Parallelen zur Rolle von Dlg-Homologen in Säuger-PSDs nur sehr begrenzt herstellen. Tatsächlich sind die Dlg-Homologen aber durchaus auch außerhalb von PSDs entlang neuronaler Membranen lokalisiert. Die NMJ kann hier also als ein Modell aufgefasst werden, an dem extrasynaptische Funktionen von PD-MAGuKs gesondert untersucht werden können. Nach den hier vorgestellten Befunden ist es wahrscheinlich, dass der molekular gut konservierte trimere Komplex der Kompartimentierung der prä- und postsynaptischen Membran dient, etwa so, wie sein Pendant in Bezug auf spezialisierte Abschnitte der Plasmamembran in epithelialen Säugerzellen. Wie eingehend diskutiert wurde, beinhaltet diese Vorstellung, dass der Dlg-Gerüstkomplex Zelladhäsionsmoleküle mit dem Zytoskelett

verknüpft. Die Einteilung der synaptischen Membran in aktive Zonen bzw. Rezeptorfelder einerseits und perisynaptische Bereiche andererseits, könnte z.B. gewährleisten, dass die Neurotransmission und die zum Wachstum der NMJ führende Entstehung neuer Boutons räumlich separiert erfolgen. Gleichmaßen könnten wachstumssteuernde auto- und parakrine Signalprozesse einer Kompartimentierung unterliegen. Ob und in welcher Weise die hier beschriebenen morphologischen Boutonphänotypen in Mutanten des Dlg-Komplexes Ausdruck von Störungen der an der NMJ aktiven, morphogenetischen Wingless/Wnt- oder BMP (*Bone Morphogenic Protein*)-Signalwege (Bayat et al., 2011; Koles und Budnik, 2012) sind, ließe sich z.B. durch genetisch-epistatische Untersuchungen adressieren. Interessant ist in diesem Kontext auch die Frage, ob die entgegen bisheriger Vorstellung geringe Dynamik des Dlg-Komplexes an der NMJ lokalen und temporären Veränderungen unterliegt, die u.U. für das NMJ-Wachstum relevant sind.

Bereits deutlich konkreter stellt sich der Bezug des Dlg-Gerüstkomplexes zur Plasmamembran-ständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) dar. Diese bindet an Dlg und kolokalisiert mit dem trimeren Dlg-Komplex an der NMJ. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von J. Sierralta (Universidad de Chile, Santiago) gehen wir der Bedeutung dieser Interaktion, die auch in Säugern beschrieben wurde, an der NMJ nach. Das Augenmerk ist hierbei vornehmlich auf die präsynaptische Seite gerichtet. In *dlg*<sup>S97</sup>-spezifischen Mutanten ist die post-stimulatorische  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in den Boutons gestört (Astorga et al., 2016) und STED-mikroskopische Analysen deuten auf ein verringertes Clustering der PMCA im perisynaptischen Bereich aktiver Zonen hin. Hier könnte die Fähigkeit von DlgS97, in Verbindung mit Metro und *D*Lin-7 Oligomere zu bilden, als Spezifikum gegenüber DlgA zum Tragen kommen. Daraus leitet sich die Hypothese ab, dass der Dlg-Komplex auch dazu beiträgt, Domänen mit unterschiedlichen räumlich-zeitlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Profilen entlang der präsynaptischen Membran zu etablieren. Ob hierbei in Analogie zur postulierten Interaktion zwischen Dlg, FasII und Shaker (Thomas et al., 1997) eine kooperative Bindung von FasII und PMCA an Dlg eine Rolle spielt bleibt ebenso zu klären, wie die möglichen Auswirkungen auf die Präzision der Neurotransmission und Plastizität an der NMJ.

## Referenzen

- Aartsen WM, Arsanto JP, Chauvin JP, Vos RM, Versteeg I, Cardozo BN, Bivic AL, Wijnholds J (2009) PSD95beta regulates plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump localization at the photoreceptor synapse. *Mol Cell Neurosci* 41:156-165.
- Aartsen WM, Kantardzhieva A, Klooster J, van Rossum AG, van de Pavert SA, Versteeg I, Cardozo BN, Tonagel F, Beck SC, Tanimoto N, Seeliger MW, Wijnholds J (2006) Mpp4 recruits Psd95 and Veli3 towards the photoreceptor synapse. *Hum Mol Genet* 15:1291-1302.
- Aberle H, Haghighi AP, Fetter RD, McCabe BD, Magalhães TR, Goodman CS (2002) Wishful thinking Encodes a BMP Type II Receptor that Regulates Synaptic Growth in *Drosophila*. *Neuron* 33:545-558.
- Teepass U, Tanentzapf G, Ward R, Fehon R (2001) Epithelial Cell Polarity and Cell Junctions in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics* 35:747-784.
- Araki Y, Zeng M, Zhang M, Huganir Richard L (2015) Rapid Dispersion of SynGAP from Synaptic Spines Triggers AMPA Receptor Insertion and Spine Enlargement during LTP. *Neuron* 85:173-189.
- Astorga C, Jorquera RA, Ramirez M, Kohler A, Lopez E, Delgado R, Cordova A, Olguin P, Sierralta J (2016) Presynaptic DLG regulates synaptic function through the localization of voltage-activated Ca(2+) Channels. *Sci Rep* 6:32132.
- Ataman B, Ashley J, Gorczyca M, Ramachandran P, Fouquet W, Sigrist SJ, Budnik V (2008) Rapid activity-dependent modifications in synaptic structure and function require bidirectional Wnt signaling. *Neuron* 57:705-718.
- Bachmann A, Grawe F, Johnson K, Knust E (2008) *Drosophila* Lin-7 is a component of the Crumbs complex in epithelia and photoreceptor cells and prevents light-induced retinal degeneration. *European Journal of Cell Biology* 87:123-136.
- Bachmann A, Timmer M, Sierralta J, Pietrini G, Gundelfinger ED, Knust E, Thomas U (2004) Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J Cell Sci* 117:1899-1909.
- Bachmann A, Kobler O, Kittel RJ, Wichmann C, Sierralta J, Sigrist SJ, Gundelfinger ED, Knust E, Thomas U (2010) A perisynaptic menage a trois between Dlg, Dlin-7, and Metro controls proper organization of *Drosophila* synaptic junctions. *J Neurosci* 30:5811-5824.
- Bate M, Broadie K (1995) Wiring by fly: The neuromuscular system of the *drosophila* embryo. *Neuron* 15:513-525.
- Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron* 53:719-734.

- Bayat V, Jaiswal M, Bellen HJ (2011) The BMP signaling pathway at the *Drosophila* neuromuscular junction and its links to neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurobiology* 21:182-188.
- Besse F, Mertel S, Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Sigrist SJ, Ephrussi A (2007) The Ig cell adhesion molecule Basigin controls compartmentalization and vesicle release at *Drosophila melanogaster* synapses. *J Cell Biol* 177:843-855.
- Biederer T, Kaeser PS, Blanpied TA (2017) Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. *Neuron* 96:680-696.
- Biggs DS (2010) 3D deconvolution microscopy. *Curr Protoc Cytom* Chapter 12:Unit 12 19 11-20.
- Boeckers TM (2006) The postsynaptic density. *Cell and Tissue Research* 326:409-422.
- Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED (2002) ProSAP/Shank proteins – a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *Journal of Neurochemistry* 81:903-910.
- Bohme MA, Beis C, Reddy-Alla S, Reynolds E, Mampell MM, Grasskamp AT, Lutzkendorf J, Bergeron DD, Driller JH, Babikir H, Gottfert F, Robinson IM, O'Kane CJ, Hell SW, Wahl MC, Stelzl U, Loll B, Walter AM, Sigrist SJ (2016) Active zone scaffolds differentially accumulate Unc13 isoforms to tune Ca(2+) channel-vesicle coupling. *Nat Neurosci* 19:1311-1320.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brenman JE, Christopherson KS, Craven SE, McGee AW, Bredt DS (1996a) Cloning and Characterization of Postsynaptic Density 93, a Nitric Oxide Synthase Interacting Protein. *The Journal of Neuroscience* 16:7407-7415.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS (1996b) Interaction of Nitric Oxide Synthase with the Postsynaptic Density Protein PSD-95 and  $\alpha$ 1-Syntrophin Mediated by PDZ Domains. *Cell* 84:757-767.
- Budnik V, Zhong Y, Wu CF (1990) Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J Neurosci* 10:3754-3768.
- Budnik V, Gorczyca M, Prokop A (2006) Selected methods for the anatomical study of *Drosophila* embryonic and larval neuromuscular junctions. *Int Rev Neurobiol* 75:323-365.
- 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.

- Buszczak M, Paterno S, Lighthouse D, Bachman J, Planck J, Owen S, Skora AD, Nystul TG, Ohlstein B, Allen A, Wilhelm JE, Murphy TD, Levis RW, Matunis E, Srivali N, Hoskins RA, Spradling AC (2007) The Carnegie Protein Trap Library: A Versatile Tool for *Drosophila* Developmental Studies. *Genetics* 175:1505-1531.
- Caria S, Magtoto CM, Samiei T, Portela M, Lim KYB, How JY, Stewart BZ, Humbert PO, Richardson HE, Kvangsakul M (2018) *Drosophila melanogaster* Guk-holder interacts with the Scribbled PDZ1 domain and regulates epithelial development with Scribbled and Discs Large. *Journal of Biological Chemistry* 293:4519-4531.
- Carmena A (2020) The Case of the Scribble Polarity Module in Asymmetric Neuroblast Division in Development and Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 21.
- 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.
- Chen K, Featherstone DE (2011) Pre and postsynaptic roles for *Drosophila* CASK. *Molecular and Cellular Neuroscience* 48:171-182.
- Chen L, Chetkovich DM, Petralia RS, Sweeney NT, Kawasaki Y, Wenthold RJ, Brecht DS, Nicoll RA (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408:936-943.
- Chen X, Vinade L, Leapman RD, Petersen JD, Nakagawa T, Phillips TM, Sheng M, Reese TS (2005) Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11551-11556.
- Chen X, Levy JM, Hou A, Winters C, Azzam R, Sousa AA, Leapman RD, Nicoll RA, Reese TS (2015) PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:E6983-E6992.
- Cho K-O, Hunt CA, Kennedy MB (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9:929-942.
- Cohen R, Blomberg F, Berzins K, Siekevitz P (1977) The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex: I. overall morphology and protein composition. *Journal of Cell Biology* 74:181-203.
- Collins TJ (2007) ImageJ for microscopy. *BioTechniques* 43:S25-S30.
- Delaunay J (1995) Genetic disorders of the red cell membranes. *FEBS Lett* 369:34-37.
- DiAntonio A (2006) Glutamate Receptors At The *Drosophila* Neuromuscular Junction. In: *International Review of Neurobiology*, pp 165-179: Academic Press.

- DiAntonio A, Petersen SA, Heckmann M, Goodman CS (1999) Glutamate receptor expression regulates quantal size and quantal content at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:3023-3032.
- Dinka A (2011) Impact of Metro and Discs Large on the Glutamatergic Neuromuscular Junction of *Drosophila melanogaster*. In: Leibniz Institute for Neurobiology Otto-von-Guericke University Magdeburg.
- Doerks T, Bork P, Kamberov E, Makarova O, Muecke S, Margolis B (2000) L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7. *Trends in Biochemical Sciences* 25:317-318.
- Fang M, Tao Y-X, He F, Zhang M, Levine CF, Mao P, Tao F, Chou C-L, Sadegh-Nasseri S, Johns RA (2003) Synaptic PDZ Domain-mediated Protein Interactions Are Disrupted by Inhalational Anesthetics. *Journal of Biological Chemistry* 278:36669-36675.
- Feng W, Long J-F, Fan J-S, Suetake T, Zhang M (2004) The tetrameric L27 domain complex as an organization platform for supramolecular assemblies. *Nature Structural & Molecular Biology* 11:475-480.
- Fouquet W, Oswald D, Wichmann C, Mertel S, Depner H, Dyba M, Hallermann S, Kittel RJ, Eimer S, Sigrist SJ (2009) Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *J Cell Biol* 186:129-145.
- Frank CA, James TD, Muller M (2020) Homeostatic control of *Drosophila* neuromuscular junction function. *Synapse* 74:e22133.
- 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 Biol* 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.
- Fux CM, Krug M, Dityatev A, Schuster T, Schachner M (2003) NCAM180 and glutamate receptor subtypes in potentiated spine synapses: an immunogold electron microscopic study. *Mol Cell Neurosci* 24:939-950.
- Ghosh A, Ramagopal UA, Bonanno JB, Brenowitz M, Almo SC (2018) Structures of the L27 Domain of Disc Large Homologue 1 Protein Illustrate a Self-Assembly Module. *Biochemistry* 57:1293-1305.
- Goda Y, Davis GW (2003) Mechanisms of Synapse Assembly and Disassembly. *Neuron* 40:243-264.
- Goel P, Khan M, Howard S, Kim G, Kiragasi B, Kikuma K, Dickman D (2019a) A Screen for Synaptic Growth Mutants Reveals Mechanisms That Stabilize Synaptic Strength. *J Neurosci* 39:4051-4065.

- Goel P, Dufour Bergeron D, Bohme MA, Nunnally L, Lehmann M, Buser C, Walter AM, Sigrist SJ, Dickman D (2019b) Homeostatic scaling of active zone scaffolds maintains global synaptic strength. *J Cell Biol* 218:1706-1724.
- Gorczyca D, Ashley J, Speese S, Gherbesi N, Thomas U, Gundelfinger E, Gramates LS, Budnik V (2007) Postsynaptic membrane addition depends on the Discs-Large-interacting t-SNARE Gtaxin. *J Neurosci* 27:1033-1044.
- Gosens I, van Wijk E, Kersten FF, Krieger E, van der Zwaag B, Marker T, Letteboer SJ, Dusseljee S, Peters T, Spierenburg HA, Punte IM, Wolfrum U, Cremers FP, Kremer H, Roepman R (2007) MPP1 links the Usher protein network and the Crumbs protein complex in the retina. *Hum Mol Genet* 16:1993-2003.
- 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.
- Haghighi AP, McCabe BD, Fetter RD, Palmer JE, Hom S, Goodman CS (2003) Retrograde Control of Synaptic Transmission by Postsynaptic CaMKII at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *Neuron* 39:255-267.
- Handschuh J (2009) Comparative Analysis of Splice Variants of the Synaptic Scaffolding Protein Metro at the Neuromuscular Junction of *Drosophila melanogaster*. In: Leibniz Institute for Neurobiology: Otto-von-Guericke University Magdeburg.
- Hata Y, Butz S, Sudhof T (1996) CASK: a novel *dlg*/PSD95 homolog with an N-terminal calmodulin-dependent protein kinase domain identified by interaction with neuexins. *The Journal of Neuroscience* 16:2488-2494.
- Heine M, Holcman D (2020) Asymmetry Between Pre- and Postsynaptic Transient Nanodomains Shapes Neuronal Communication. *Trends Neurosci* 43:182-196.
- Hough CD, Woods DF, Park S, Bryant PJ (1997) Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the *Drosophila* MAGUK Discs large. *Genes Dev* 11:3242-3253.
- Jan LY, Jan YN (1976a) L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Physiol* 262:215-236.
- Jan LY, Jan YN (1976b) Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Physiology* 262:189-214.
- Karunanithi S, Marin L, Wong K, Atwood HL (2002) Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses. *J Neurosci* 22:10267-10276.
- Kilinc D (2018) The Emerging Role of Mechanics in Synapse Formation and Plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12.
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771-781.

- Kim JH, Liao D, Lau L-F, Huganir RL (1998) SynGAP: a Synaptic RasGAP that Associates with the PSD-95/SAP90 Protein Family. *Neuron* 20:683-691.
- Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M (2005) Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Ras-ERK Signaling and AMPA Receptor Trafficking. *Neuron* 46:745-760.
- Kim YJ, Bao H, Bonanno L, Zhang B, Serpe M (2012) *Drosophila* Neto is essential for clustering glutamate receptors at the neuromuscular junction. *Genes Dev* 26:974-987.
- Kindler S, Rehbein M, Classen B, Richter D, Böckers TM (2004) Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: a novel dendritically localized mRNA. *Molecular Brain Research* 126:14-21.
- Kiragasi B, Wondolowski J, Li Y, Dickman DK (2017) A Presynaptic Glutamate Receptor Subunit Confers Robustness to Neurotransmission and Homeostatic Potentiation. *Cell Rep* 19:2694-2706.
- Kistner U, Wenzel BM, Veh RW, Cases-Langhoff C, Garner AM, Appeltauer U, Voss B, Gundelfinger ED, Garner CC (1993) SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg-A*. *Journal of Biological Chemistry* 268:4580-4583.
- Kobler O (2007) Etablierung von Verfahren zur quantitativen Erfassung und Lebenddarstellung von Proteinen des Dlg-Komplexes an der Neuromuskulären Verbindung von *Drosophila melanogaster*. In: Leibniz Institute for Neurobiology: Otto-von-Guericke-University Magdeburg.
- Koh YH, Popova E, Thomas U, Griffith LC, Budnik V (1999) Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation. *Cell* 98:353-363.
- Koles K, Budnik V (2012) Wnt Signaling in Neuromuscular Junction Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4.
- Kumar V, Fricke R, Bhar D, Reddy-Alla S, Krishnan KS, Bogdan S, Ramaswami M (2009) Syndapin promotes formation of a postsynaptic membrane system in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 20:2254-2264.
- Kuriu T, Inoue A, Bito H, Sobue K, Okabe S (2006) Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J Neurosci* 26:7693-7706.
- Lahey T, Gorczyca M, Jia XX, Budnik V (1994) The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron* 13:823-835.
- Lee S, Fan S, Makarova O, Straight S, Margolis B (2002) A novel and conserved protein-protein interaction domain of mammalian Lin-2/CASK binds and recruits SAP97 to the lateral surface of epithelia. *Mol Cell Biol* 22:1778-1791.

- Lee T, Luo L (1999) Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker for Studies of Gene Function in Neuronal Morphogenesis. *Neuron* 22:451-461.
- Li J, Ashley J, Budnik V, Bhat MA (2007) Crucial Role of Drosophila Neurexin in Proper Active Zone Apposition to Postsynaptic Densities, Synaptic Growth, and Synaptic Transmission. *Neuron* 55:741-755.
- Li Y, Karnak D, Demeler B, Margolis B, Lavie A (2004) Structural basis for L27 domain-mediated assembly of signaling and cell polarity complexes. *EMBO J* 23:2723-2733.
- Linkert M, Rueden CT, Allan C, Burel JM, Moore W, Patterson A, Loranger B, Moore J, Neves C, Macdonald D, Tarkowska A, Sticco C, Hill E, Rossner M, Eliceiri KW, Swedlow JR (2010) Metadata matters: access to image data in the real world. *J Cell Biol* 189:777-782.
- Lnenicka GA, Keshishian H (2000) Identified motor terminals in Drosophila larvae show distinct differences in morphology and physiology. *J Neurobiol* 43:186-197.
- Lowe N et al. (2014) Analysis of the expression patterns, subcellular localisations and interaction partners of Drosophila proteins using a pigP protein trap library. *Development* 141:3994-4005.
- Lue RA, Marfatia SM, Branton D, Chishti AH (1994) Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:9818-9822.
- 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* 6:299-309.
- Mandal PK, Pettegrew JW (2008) Clinically Relevant Concentration Determination of Inhaled Anesthetics (Halothane, Isoflurane, Sevoflurane, and Desflurane) by <sup>19</sup>F NMR. *Cell Biochemistry and Biophysics* 52:31.
- Marfatia SM, Byron O, Campbell G, Liu SC, Chishti AH (2000) Human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein forms an oligomer in solution. Identification of the self-association site. *J Biol Chem* 275:13759-13770.
- Marqués G, Bao H, Haerry TE, Shimell MJ, Duchek P, Zhang B, O'Connor MB (2002) The Drosophila BMP Type II Receptor Wishful Thinking Regulates Neuromuscular Synapse Morphology and Function. *Neuron* 33:529-543.
- Marrus SB, Portman SL, Allen MJ, Moffat KG, DiAntonio A (2004) Differential Localization of Glutamate Receptor Subunits at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience* 24:1406-1415.
- Mathew D, Gramates LS, Packard M, Thomas U, Bilder D, Perrimon N, Gorczyca M, Budnik V (2002) Recruitment of scribble to the synaptic scaffolding complex requires GUK-holder, a novel DLG binding protein. *Curr Biol* 12:531-539.

- Mauceri D, Cattabeni F, Di Luca M, Gardoni F (2004) Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Phosphorylation Drives Synapse-associated Protein 97 into Spines. *Journal of Biological Chemistry* 279:23813-23821.
- McDonald TJ (1975) Neuromuscular Pharmacology of Insects. *Annual Review of Entomology* 20:151-166.
- McGee AW, Brecht DS (1999) Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J Biol Chem* 274:17431-17436.
- McGee AW, Dakoji SR, Olsen O, Brecht DS, Lim WA, Prehoda KE (2001) Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins. *Mol Cell* 8:1291-1301.
- Mendoza-Topaz C, Urrea F, Barria R, Albornoz V, Ugalde D, Thomas U, Gundelfinger ED, Delgado R, Kukuljan M, Sanxaridis PD, Tsunoda S, Ceriani MF, Budnik V, Sierralta J (2008) DLGS97/SAP97 is developmentally upregulated and is required for complex adult behaviors and synapse morphology and function. *J Neurosci* 28:304-314.
- Mendoza C, Olguin P, Lafferte G, Thomas U, Ebisch S, Gundelfinger ED, Kukuljan M, Sierralta J (2003) Novel isoforms of Dlg are fundamental for neuronal development in *Drosophila*. *J Neurosci* 23:2093-2101.
- Metwally E, Zhao G, Li W, Wang Q, Zhang YQ (2019) Calcium-Activated Calpain Specifically Cleaves Glutamate Receptor IIA But Not IIB at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience* 39:2776-2791.
- Miech C, Pauer H-U, He X, Schwarz TL (2008) Presynaptic Local Signaling by a Canonical Wingless Pathway Regulates Development of the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience* 28:10875-10884.
- Mills J, Hanada T, Hase Y, Liscum L, Chishti AH (2019) LDL receptor related protein 1 requires the I3 domain of discs-large homolog 1/DLG1 for interaction with the kinesin motor protein KIF13B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866:118552.
- Morin X, Daneman R, Zavortink M, Chia W (2001) A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15050-15055.
- Mosca TJ, Hong W, Dani VS, Favaloro V, Luo L (2012) Trans-synaptic Teneurin signalling in neuromuscular synapse organization and target choice. *Nature* 484:237-241.
- Muhammad K, Reddy-Alla S, Driller JH, Schreiner D, Rey U, Böhme MA, Hollmann C, Ramesh N, Depner H, Lützkendorf J, Matkovic T, Götz Torsten, Bergeron DD, Schmoranzler J, Goettfert F, Holt M, Wahl MC, Hell SW, Scheiffele P, Walter AM, Loll B, Sigrist SJ (2015) Presynaptic spinophilin tunes neurexin signalling to control active zone architecture and function. *Nature Communications* 6:8362.

- Muller B, Kistner U, Veh R, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger E, Garner C (1995) Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *The Journal of Neuroscience* 15:2354-2366.
- Muller BM, Kistner U, Kindler S, Chung WJ, Kuhlendahl S, Fenster SD, Lau LF, Veh RW, Hagan RL, Gundelfinger ED, Garner CC (1996) SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* 17:255-265.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:13940-13945.
- Nakagawa T, Futai K, Lashuel HA, Lo I, Okamoto K, Walz T, Hayashi Y, Sheng M (2004) Quaternary structure, protein dynamics, and synaptic function of SAP97 controlled by L27 domain interactions. *Neuron* 44:453-467.
- Opazo P, Sainlos M, Choquet D (2012) Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Current Opinion in Neurobiology* 22:453-460.
- Oshima K, Fehon RG (2011) Analysis of protein dynamics within the septate junction reveals a highly stable core protein complex that does not include the basolateral polarity protein Discs large. *J Cell Sci* 124:2861-2871.
- Otsu N (1979) A threshold selection method from grey level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9:62-66.
- Owald D, Fouquet W, Schmidt M, Wichmann C, Mertel S, Depner H, Christiansen F, Zube C, Quentin C, Korner J, Urlaub H, Mechtler K, Sigrist SJ (2010) A Syd-1 homologue regulates pre- and postsynaptic maturation in Drosophila. *J Cell Biol* 188:565-579.
- Owald D, Khorramshahi O, Gupta VK, Banovic D, Depner H, Fouquet W, Wichmann C, Mertel S, Eimer S, Reynolds E, Holt M, Aberle H, Sigrist SJ (2012) Cooperation of Syd-1 with Neurexin synchronizes pre- with postsynaptic assembly. *Nat Neurosci* 15:1219-1226.
- Parks AL et al. (2004) Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the Drosophila melanogaster genome. *Nat Genet* 36:288-292.
- Pawson C, Eaton BA, Davis GW (2008) Formin-Dependent Synaptic Growth: Evidence That Dlar Signals via Diaphanous to Modulate Synaptic Actin and Dynamic Pioneer Microtubules. *The Journal of Neuroscience* 28:11111-11123.
- Pennetta G, Hiesinger PR, Fabian-Fine R, Meinertzhagen IA, Bellen HJ (2002) Drosophila VAP-33A Directs Bouton Formation at Neuromuscular Junctions in a Dosage-Dependent Manner. *Neuron* 35:291-306.

- Petersen SA, Fetter RD, Noordermeer JN, Goodman CS, DiAntonio A (1997) Genetic Analysis of Glutamate Receptors in *Drosophila* Reveals a Retrograde Signal Regulating Presynaptic Transmitter Release. *Neuron* 19:1237-1248.
- Petrosky KY, Ou HD, Löhr F, Dötsch V, Lim WA (2005) A General Model for Preferential Hetero-oligomerization of LIN-2/7 Domains: MECHANISM UNDERLYING DIRECTED ASSEMBLY OF SUPRAMOLECULAR SIGNALING COMPLEXES. *Journal of Biological Chemistry* 280:38528-38536.
- Pielage J, Fetter RD, Davis GW (2005) Presynaptic spectrin is essential for synapse stabilization. *Curr Biol* 15:918-928.
- Pielage J, Fetter RD, Davis GW (2006) A postsynaptic spectrin scaffold defines active zone size, spacing, and efficacy at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Cell Biol* 175:491-503.
- Ponting CP, Phillips C (1995) DHR domains in syntrophins, neuronal NO synthases and other intracellular proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 20:102-103.
- Qian Y, Prehoda KE (2006) Interdomain interactions in the tumor suppressor discs large regulate binding to the synaptic protein GukHolder. *J Biol Chem* 281:35757-35763.
- 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.
- Ramos CI, Igiesuorobo O, Wang Q, Serpe M (2015) Neto-mediated intracellular interactions shape postsynaptic composition at the *Drosophila* neuromuscular junction. *PLoS Genet* 11:e1005191.
- 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.
- Roberts S, Delury C, Marsh E (2012) The PDZ protein discs-large (DLG): the 'Jekyll and Hyde' of the epithelial polarity proteins. *The FEBS Journal* 279:3549-3558.
- Roos J, Hummel T, Ng N, Klambt C, Davis GW (2000) *Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* 26:371-382.
- Roote J, Prokop A (2013) How to Design a Genetic Mating Scheme: A Basic Training Package for *Drosophila* Genetics. *G3: Genes|Genomes|Genetics* 3:353-358.
- Rostaing P, Real E, Siksou L, Lechaire JP, Boudier T, Boeckers TM, Gertler F, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S (2006) Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. *Eur J Neurosci* 24:3463-3474.

- Sanyal S (2009) Genomic mapping and expression patterns of C380, OK6 and D42 enhancer trap lines in the larval nervous system of *Drosophila*. *Gene Expression Patterns* 9:371-380.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682.
- Schlüter OM, Xu W, Malenka RC (2006) Alternative N-Terminal Domains of PSD-95 and SAP97 Govern Activity-Dependent Regulation of Synaptic AMPA Receptor Function. *Neuron* 51:99-111.
- Schmid A, Qin G, Wichmann C, Kittel RJ, Mertel S, Fouquet W, Schmidt M, Heckmann M, Sigrist SJ (2006) Non-NMDA-type glutamate receptors are essential for maturation but not for initial assembly of synapses at *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci* 26:11267-11277.
- Schmid A, Hallermann S, Kittel RJ, Khorramshahi 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.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-675.
- Sheng M, Kim E (2000) The Shank family of scaffold proteins. *Journal of Cell Science* 113:1851-1856.
- Sheng M, Hoogenraad CC (2007) The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annual Review of Biochemistry* 76:823-847.
- Schumacher, J und Bertrand (2019) THUNDER IMAGERS: How do they really work? Leica Microsystems GmbH: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/thunder-technology-note/>
- Sigrist SJ, Thiel PR, Reiff DF, Schuster CM (2002) The Postsynaptic Glutamate Receptor Subunit DGluR-IIA Mediates Long-Term Plasticity in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* 22:7362-7372.
- Steiner P, Higley MJ, Xu W, Czervionke BL, Malenka RC, Sabatini BL (2008) Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. *Neuron* 60:788-802.
- Stewart BA, Schuster CM, Goodman CS, Atwood HL (1996) Homeostasis of Synaptic Transmission in *Drosophila* with Genetically Altered Nerve Terminal Morphology. *The Journal of Neuroscience* 16:3877-3886.

- Stewart BA, Atwood HL, Renger JJ, Wang J, Wu CF (1994) Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *Journal of Comparative Physiology A* 175:179-191.
- Stewart M, Murphy C, Fristrom JW (1972) The recovery and preliminary characterization of X chromosome mutants affecting imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 27:71-83.
- Sugiyama Y, Kawabata I, Sobue K, Okabe S (2005) Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nature Methods* 2:677-684.
- Sun M, Liu L, Zeng X, Xu M, Liu L, Fang M, Xie W (2009) Genetic interaction between Neurexin and CAKI/CMG is important for synaptic function in *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuroscience Research* 64:362-371.
- Suzuki T, Kametani K, Guo W, Li W (2018) Protein components of post-synaptic density lattice, a backbone structure for type I excitatory synapses. *Journal of Neurochemistry* 144:390-407.
- Sytnyk V, Leshchynska I, Nikonenko AG, Schachner M (2006) NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *J Cell Biol* 174:1071-1085.
- Tang A-H, Chen H, Li TP, Metzbower SR, MacGillavry HD, Blanpied TA (2016) A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature* 536:210-214.
- 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<sup>+</sup> channels in vivo. *J Neurosci* 17:152-159.
- Thomas U, Sigrist SJ (2012) Glutamate Receptors in Synaptic Assembly and Plasticity: Case Studies on Fly NMJs. In: *Synaptic Plasticity: Dynamics, Development and Disease* (Kreutz MR, Sala C, eds), pp 3-28. Vienna: Springer Vienna.
- Thomas U, Kobler O, Gundelfinger ED (2010) The *Drosophila* larval neuromuscular junction as a model for scaffold complexes at glutamatergic synapses: benefits and limitations. *J Neurogenet* 24:109-119.
- 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.
- Thomas U, Ebitsch S, Gorczyca M, Koh YH, Hough CD, Woods D, Gundelfinger ED, Budnik V (2000) Synaptic targeting and localization of discs-large is a stepwise process controlled by different domains of the protein. *Curr Biol* 10:1108-1117.
- Topinka JR, Brecht DS (1998) N-Terminal Palmitoylation of PSD-95 Regulates Association with Cell Membranes and Interaction with K<sup>+</sup> Channel Kv1.4. *Neuron* 20:125-134.

- Van Vactor D, Sigrist SJ (2017) Presynaptic morphogenesis, active zone organization and structural plasticity in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 43:119-129.
- Vandenberghe W, Nicoll RA, Brecht DS (2005) Stargazin is an AMPA receptor auxiliary subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:485-490.
- 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.
- Woods DF, Bryant PJ (1991) The discs-large tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66:451-464.
- Wu H, Reissner C, Kuhlendahl S, Coblentz B, Reuver S, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC (2000) Intramolecular interactions regulate SAP97 binding to GKAP. *The EMBO Journal* 19:5740-5751.
- Yamada KH, Hanada T, Chishti AH (2007) The Effector Domain of Human Dlg Tumor Suppressor Acts as a Switch That Relieves Autoinhibition of Kinesin-3 Motor GAKIN/KIF13B. *Biochemistry* 46:10039-10045.
- Yang J, Pawlyk B, Wen XH, Adamian M, Soloviev M, Michaud N, Zhao Y, Sandberg MA, Makino CL, Li T (2007) Mpp4 is required for proper localization of plasma membrane calcium ATPases and maintenance of calcium homeostasis at the rod photoreceptor synaptic terminals. *Hum Mol Genet* 16:1017-1029.
- Zhai RG, Bellen HJ (2004) The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)* 19:262-270.
- Zhang Y, Guo H, Kwan H, Wang JW, Kosek J, Lu B (2007) PAR-1 kinase phosphorylates Dlg and regulates its postsynaptic targeting at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron* 53:201-215.
- Zheng CY, Petralia RS, Wang YX, Kachar B, Wenthold RJ (2010) SAP102 is a highly mobile MAGUK in spines. *J Neurosci* 30:4757-4766.
- Zhong Y, Wu C (1991) Altered synaptic plasticity in *Drosophila* memory mutants with a defective cyclic AMP cascade. *Science* 251:198-201.
- Zhu J, Shang Y, Zhang M (2016a) Mechanistic basis of MAGUK-organized complexes in synaptic development and signalling. *Nature Reviews Neuroscience* 17:209-223.
- Zhu J, Shang Y, Xia Y, Zhang R, Zhang M (2016b) An Atypical MAGUK GK Target Recognition Mode Revealed by the Interaction between DLG and KIF13B. *Structure* 24:1876-1885.
- Zinsmaier KE, Hofbauer A, Heimbeck G, Pflugfelder GO, Buchner S, Buchner E (1990) A Cysteine-String Protein is Expressed in Retina and Brain of *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics* 7:15-29.

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.

## Anhang

Tabelle A1: Anzahl der Präparate zur Bouton-Größenbestimmung

	Wildtyp	<i>metro</i> <sup>47</sup>	<i>metro</i> <sup>47</sup> <i>tubP&gt;metroB</i>	<i>dLin-7</i> <sup>#66</sup> / <i>Df</i>	<i>dLin-7</i> <sup>#66</sup> / <i>Df</i> <i>OK6;C57&gt;dLin-7</i>
# Tiere	7	7	6	6	6
# NMJs <sup>1</sup> (A2, m6/7)	10	13	12	11	12
# konfokale Bildstapel <sup>2</sup>	17	29	20	19	24
# Boutons	337	298	346	317	458

1. bezieht sich auf n-Anzahl, die der Statistik in Abb.3.4B, B' und 3.6D zugrunde liegt.
2. Jeder Bildstapel beinhaltet eins bis drei Nervendigungen mit mehreren Typ Ib-Boutons

Tabelle A2: Anzahl der Präparate, die der Quantifizierung der GRFs zugrunde liegen

	Wildtyp	<i>dlgS97</i> <sup>flpV</sup>	<i>metro</i> <sup>47</sup> / <i>Df</i>	<i>metro</i> <sup>47</sup>	<i>metro</i> <sup>47</sup> <i>tubP&gt;metroB</i>	<i>dlgS97</i> <sup>flpV</sup> ; <i>metro</i> <sup>47</sup>	<i>dLin-7</i> <sup>#66</sup> / <i>Df</i>	<i>dLin-7</i> <sup>#66</sup> / <i>Df</i> <i>OK6;C57&gt;dLin-7</i>
# Tiere	10	8	6	7	6	7	9	6
# NMJs <sup>1</sup> (A2, m6/7)	14	15	12	13	12	12	16	12
# konfokale Bildstapel <sup>2</sup>	23	29	16	29	20	15	26	24
# GRFs <sup>3</sup>	4437	8255	4598	3888	3733	3383	5247	3637

1. bezieht sich auf n-Anzahl, die der Statistik in Abb.3.12A und 3.13D zugrunde liegt.
2. Jeder Bildstapel beinhaltet eins bis drei Nervendigungen mit mehreren Typ Ib-Boutons.
3. Mehr als 200 GRFs an Typ Ib-Boutons wurden per NMJ analysiert

Tabelle A3: Aufnahme- und Dekonvolutionsparameter zu der präsynaptischen Lokalisation des DlgS97-Metro-DLin-7-Komplexes (Kapitel 3.5)

Abbildung	Dekonvolution					Mikroskop	Objektiv	Zoom	Format [Pixel]	Laser [nm]	Detektoren [nm]	z-step [nm]
	AutoDeblur BG	IT	Huygens Express	Profesional S/N	QT							
3.19A-E, A'-E'	/	/	/	/	/	TCS-SP5	63x1,4NA	3	1024x512	488/561/633	500-530/570-600/650-710	250
3.19D", E"	<i>high</i>	10	/	/	/	TCS-SP5	63x1,4NA	3	1024x512	488/561/633	500-530/570-600/650-710	250
3.20A-C, A'-C'	/	/	/	/	/	TCS-SP5	63x1,4NA	3	1024x512	488/561/633	500-530/570-600/650-710	250
3.20D-E"	<i>high</i>	10	/	/	/	TCS-SP5	63x1,4NA	4	1024x1024	488/561/633	500-530/570-600/650-710	250
3.21	/	/	<i>Standard</i>	/	/	TCS-SP5	63x1,4NA	3	1024x512	488/561/633	500-530/570-600/650-710	250
3.22	/	/	<i>Standard</i>	/	/	TCS-SP5	63x1,4NA	3	1024x512	488/561/633	500-530/570-600/650-710	250
3.23A			<i>Standard</i>	/	/	TCS-SP5	63x1,4NA	4	1024x512	488/561/633	500-530/570-600/650-710	130
3.23B-B'', C, C'	<i>high</i>	10	/	/	/	TCS-SP2	63x1,32NA	3	1024x512	488/561/633	500-530/570-600/650-710	300
3.24A-B"	<i>high</i>	10	/	/	/	TCS-SP5	63x1,4NA	3	1024x512	488/561/633	500-530/570-600/650-710	250
3.24C-C"	Siehe ausführliche Beschreibung im Methodenteil											

Alle Aufnahmen wurden mit 400 Linien/sec. im unidirektionalen Modus durchgeführt.

BG: engl.: *Background* (Hintergrund)

IT: engl.: *Iterations* (Iterationen)

S/N: engl.: *Signal to Noise ratio* (Signal zu Rausch-Verhältnis)

QT: engl.: *Quality Threshold* (Qualitätsschwellenwert)

## Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Magdeburg, den 23.06.2020

---

(Oliver Kobler)