

Aus dem Physiologischen Institut
Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologie
Schwerpunkt Neurophysiologie
Vorstand: Professor Dr. med. Manfred Heckmann

Vesikelverkehr in Aktiven Zonen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Mila Marie Paul

aus Wülfrath

Würzburg, Juni 2014



Referent: Prof. Dr. med. Manfred Heckmann

Korreferentin: Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2015

Die Promovendin ist Ärztin.

Denen, die mich lieben.

*Each problem solved stimulates an infinite number of new questions and today's discovery contains the seed of tomorrow's.
(Santiago Ramón y Cajal)*

Inhalt

1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	
2	Abkürzungsverzeichnis	
3	Einleitung	1
3.1	Mechanismen synaptischer Transmission	1
3.2	Von der Kognition zur Molekülfunktion	4
3.3	<i>Drosophila</i> als Modellorganismus	8
4	Material und Methoden	9
4.1	Aufzucht und Fliegenstämme	9
4.2	Elektrophysiologie	10
4.3	Immunfluoreszenz	15
4.4	Statistik	17
5	Ergebnisse	19
5.1	Differenzierung von Synapsen	19
5.2	Mutation eines hochkonservierten Proteinmotivs	23
5.3	RIM C ₂ A-Domäne beeinflusst synaptische Transmission	26
5.4	Veränderte präsynaptische Organisation durch RIM-Mutationen	29
5.5	Molekulare Mechanismen synaptischer Differenzierung	31
5.6	Zusammenspiel von Bruchpilot und Synaptotagmin	35
6	Diskussion	46
6.1	Synaptische Differenzierung und Plastizität entlang eines Axons	46
6.2	C ₂ A-Domäne von RIM	48
6.3	Bruchpilot und Synaptotagmin sind Partner	53
6.4	Ausblick	57
7	Zusammenfassung	59
8	Referenzen	60
9	Danksagung	71
10	Lebenslauf	73

1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Synapsis means a process of contact*	2
Abb. 2:	Dynamik synaptischer Übertragungen	3
Abb. 3:	Aufbau und Funktion synaptischer Vesikel	4
Abb. 4:	Organisation Aktiver Zonen	6
Abb. 5:	Funktionelle Charakterisierung von Synapsen	14
Abb. 6:	Die Chromosomen der Fliege	20
Abb. 7:	Räumliche Differenzierung glutamaterger Endigungen	21
Abb. 8:	Funktionelle Differenzierung von Wildtyp-Synapsen	22
Abb. 9:	Stammbaum einer Familie mit CORD7 Mutation	23
Abb. 10:	RIM-Domänen und Sequenz der C ₂ A-Domäne	25
Abb. 11:	RIM C ₂ A-Domäne beeinflusst die synaptische Transmission	26
Abb. 12:	Vergrößerte und beschleunigte Ströme durch RIM-Mutationen	27
Abb. 13:	Calciumabhängiger Effekt der C ₂ A-Mutationen	28
Abb. 14:	Morphologie der NMJ bei Überexpression der RIM-Mutationen	29
Abb. 15:	RIM-Punktmutationen verändern präsynaptische Organisation	30
Abb. 16:	Synaptotagmin-RNAi reduziert präsynaptisches Proteinlevel	32
Abb. 17:	Bruchpilot-Mutanten brauchen kein Synaptotagmin	33
Abb. 18:	Strukturelle Plastizität von Rab3-Nullmutanten	34
Abb. 19:	Funktionelle Differenzierung ohne Bruchpilot und Synaptotagmin	36
Abb. 20:	Morphologische Differenzierung synaptischer Boutons	37
Abb. 21:	Reduktion von Synaptotagmin verändert AZ-Organisation	38
Abb. 22:	Kristallstruktur der RIM C ₂ A-Domäne	50
Tabelle 1:	Genetik	11
Tabelle 2:	Elektroden	12
Tabelle 3:	Synaptische Ströme nach RIM-Mutationen	40
Tabelle 4:	Anzahl Aktiver Zonen und Boutongrößen nach RIM-Mutationen	41
Tabelle 5:	Synaptische Ströme bei reduziertem Synaptotagmin-Level	42
Tabelle 6:	Evozierte synaptische Ströme proximaler und distaler Boutons	43
Tabelle 7:	Anzahl Aktiver Zonen entlang des Ib und Is Axons	44
Tabelle 8:	Boutongrößen entlang des Ib und Is Axons	45

2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
aa / AA	amino acids
Abb.	Abbildung
α -Liprin	Lar-interacting-protein-related-protein α
AP	Aktionspotential
AZ	Aktive Zone
Brp	Bruchpilot
Ca^{2+}	Calcium-Ionen
Cac	Cacophony
Cam	Calmodulin
Ca_v	voltage gated Calcium channel
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CE	<i>Caenorhabditis elegans</i> , Fadenwurm
CORD7	cone rod dystrophy type 7
Cpx	Complexin
CSP	Cystein string protein
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Dap160	Dynamin associated protein of 160 kDa
DM	<i>Drosophila melanogaster</i> , Taufliege
DMZ-Puller	Dudel Müller Zeitz-Puller
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doc2	double C2 domain protein
dSTORM	direct stochastic optical reconstruction microscopy
Dyn	Dynamin
eEPSC	evoked excitatory postsynaptic current
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FE	fokale Elektrode
g	Gramm
GFP	green fluorescent protein
GTP/GDP	Guanosintri-(di-)phosphat
HL-3	haemolymph-like solution 3
HRP	horseradish-peroxidase

HS	<i>Homo sapiens</i> , Mensch
Hz	Hertz
IZR-Elektrode	intrazelluläre Elektrode
kDa	Kilo-Dalton
KD	knock-down, RNAi-Expression
KO	knock-out, Nullmutante
l	Liter
L1-3	Larve 1. bis 3. Stadium
LED	light-emitting diode
M	molar = mol/Liter
Mb	Megabasen
MEA	Mercaptoethylamin
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic current
MM	<i>Mus musculus</i> , Maus
MW	Mittelwert
NA	numerische Apertur
NGS	natural goat serum
N-Terminus	Amino-Terminus
n	number of
NMJ	neuromuscular junction
p-Wert	probability value, Signifikanzwert
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii – Wert
PPR	paired pulse ratio, Doppelpulsratio
PSD	postsynaptic density
PxxP	Proline enriched region
RIM	Rab3 interacting molecule
<i>RIM^{wt}</i>	RIM mit wildtyp cDNA überexprimiert
<i>RIM^{R915H}</i>	RIM mit R915H Mutation überexprimiert
<i>RIM^{R916H}</i>	RIM mit R916H Mutation überexprimiert
<i>RIM^{R915H,R916H}</i>	RIM mit R915H,R916H Mutation überexprimiert
RIM-BP /RBP	Rab3 interacting molecule binding protein
RN	<i>Rattus norvegicus</i> , Ratte

RNAi	interference Ribonukleinsäure
Rph	Rabphilin
S	Sekunde
SE	Saugelektrode
SEM	standard error of the mean
SNAP-25	synaptosomal-associated protein of 25 kDa
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachement receptor
STED-Mikroskopie	Stimulated Emission Depletion Mikroskopie
Stn	Stoned
SV	synaptic vesicle
Syb	Synaptobrevin
Synd	Syndapin
Syt	Synaptotagmin
Syx	Syntaxin
τ	tau decay, Abfallszeitkonstante
TEVC	two-electrode voltage clamp, Zwei-Elektroden- Spannungsklemme
TMD	Transmembrandomäne
UAS	upstream activation sequence
V	Volt
VGCC	voltage gated Calcium channel
VIQ	verbal IQ
wt / WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

3 Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es elementare Aspekte der Informationsverarbeitung und den Zusammenhang mit molekularen Mechanismen in Aktiven Zonen besser zu verstehen. Im Folgenden werden daher Grundlagen synaptischer Transmission erläutert, zwei zentrale Moleküle, RIM und Synaptotagmin, eingeführt und der für die Untersuchungen verwendete Modellorganismus *Drosophila melanogaster* vorgestellt.

3.1 Mechanismen synaptischer Transmission

Aufbau und Funktion von Synapsen Der Begriff Synapse für einen spezialisierten Kontakt zwischen Nervenzellen/ Neuronen oder einem Neuron und einer Muskelzelle wurde erstmals 1897 von Charles Scott Sherrington in Foster's „Textbook of Physiology“ verwendet. Es wird zwischen elektrischen und chemischen Synapsen unterschieden, die jeweils prä- und postsynaptische Anteile besitzen. In dieser Arbeit werden chemische Synapsen untersucht. An ihnen werden präsynaptisch Botenstoffe/ Neurotransmitter aus speziellen Organellen, den Vesikeln, in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Die Transmitter diffundieren zu postsynaptischen Rezeptoren, öffnen Kanäle durch die Ionen strömen und lösen so ein postsynaptisches Signal aus (Katz 1969). Abbildung 1 A zeigt schematisch die Morphologie einer Synapse. Im Fokus dieser Arbeit stehen die Aktiven Zonen, spezialisierte präsynaptische Kompartimente an denen die Vesikelexozytose stattfindet. Die in Abbildung 1 A in rot markierten Dichten Projektionen sind wesentlicher Bestandteil der Aktiven Zonen.

Die gesamte synaptische Übertragung spielt sich im Bereich weniger Millisekunden ab. Abbildung 1 B illustriert dies am Beispiel der Calyx von Held, einer zentralen Säugersynapse, die ein weit verbreitetes Modellsystem für Studien zur synaptischen Transmission ist (Schneppenburger & Forsythe, 2006). Das präsynaptische Aktionspotential (AP) depolarisiert die Plasmamembran und bewirkt den Einstrom von Calcium-Ionen (Hodgkin, Huxley & Katz, 1949; Fatt & Katz, 1952; Katz & Miledi, 1965a). Die folgende Transmitterausschüttung löst einen postsynaptischen Strom aus, der wiederum ein Aktionspotential generieren kann. Die Zeit zwischen dem Ankommen des APs in der Nerventerminalie und dem Beginn des postsynaptischen Stroms wird synaptische Latenz genannt (Katz & Miledi, 1965b). Im Laufe der

Einleitung

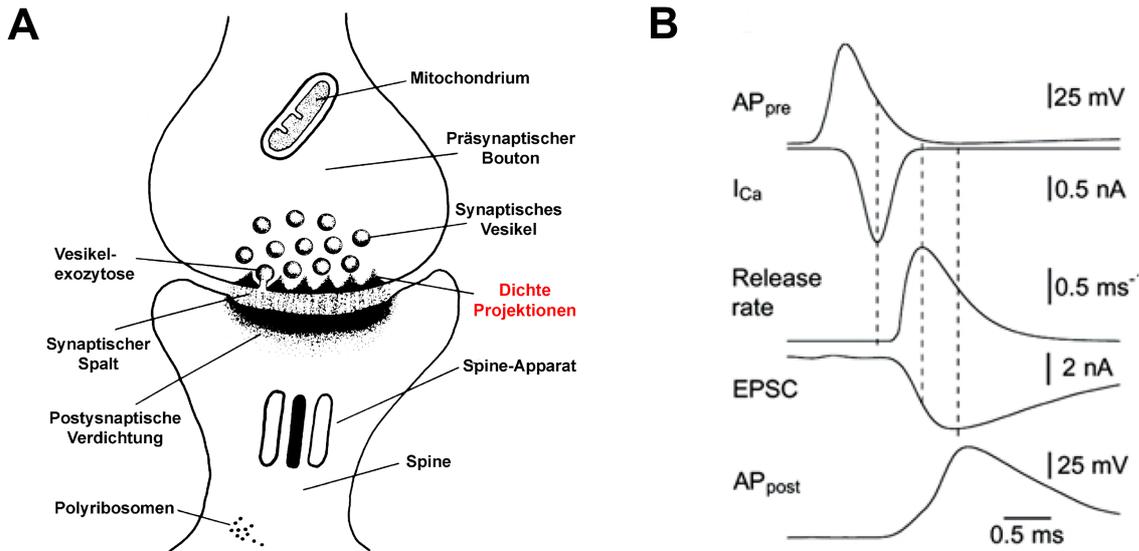


Abb. 1: Synapsis means a process of contact*

A Schematische Darstellung einer kortikalen Synapse. Der präsynaptische Bouton enthält mit Neurotransmitter gefüllte Vesikel, die im Bereich der Dichten Projektionen (rot) mit der Plasmamembran verschmelzen (= Vesikelexozytose). Der Transmitter diffundiert im synaptischen Spalt und bindet an postsynaptische Rezeptoren (modifiziert aus Frotscher 1996).

B Synaptische Signalkaskade. Das präsynaptische Aktionspotential (AP_{pre}) löst einen Calciumeinstrom (I_{Ca}) aus. Der postsynaptische Strom (EPSC) beginnt ca. 0,5 ms nach dem maximalen Calciumstrom (Meinrenken et al., 2003).

* Zitat Arthur Verrall in persönlicher Kommunikation mit Michael Foster, um 1897

Entwicklung wird das präsynaptische Aktionspotential und damit einhergehend auch die Latenzzeit deutlich kürzer (Taschenberger & von Gersdorff, 2000). Der gesamte zeitliche Verlauf der Signalübertragung lässt Rückschlüsse auf die molekularen Vorgänge an einer Synapse zu (Jahn & Fasshauer, 2012).

Plastizität von Synapsen Synapsen können ihr Verhalten ändern. Dies wird als synaptische Plastizität bezeichnet, welche grundlegend für Lernen und Gedächtnis ist (Kandel 2007). Man unterscheidet zwischen Kurzzeit- und Langzeitplastizität, die Zeiträume von Millisekunden bis zu lebenslanger Dauer umfassen, wobei die Mechanismen insbesondere des Langzeitgedächtnisses noch kontrovers diskutiert werden (Tsien 2013). Abbildung 2 zeigt eine gleichzeitige Ableitung von drei kortikalen Neuronen. In der Pyramidenzelle (P) werden durch elektrische Reizung Aktionspotentiale hervorgerufen. Die Zelle bildet glutamaterge, synaptische Kontakte mit zwei Interneuronen, die unterschiedliche postsynaptische Antworten zeigen. Bei

Einleitung

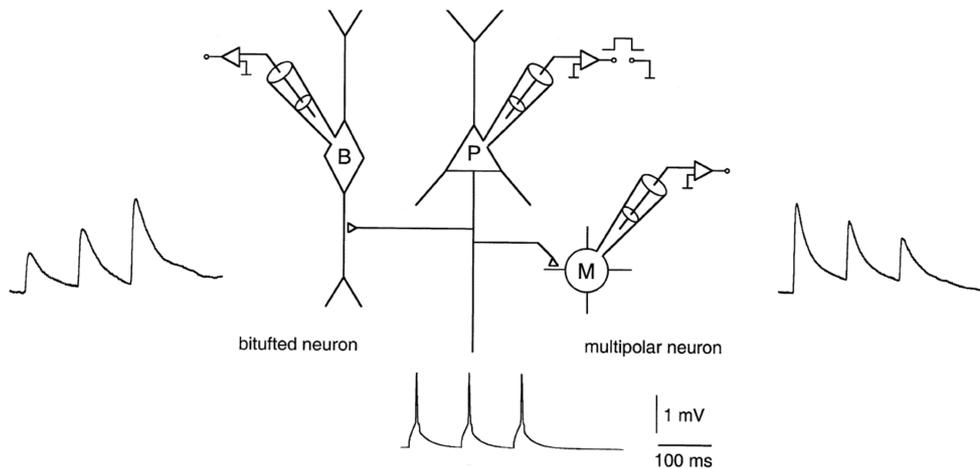


Abb. 2: Dynamik synaptischer Übertragungen

Ableitungen von einer kortikalen Pyramidenzelle (P) und zwei Interneuronen (B, M). Präsynaptische Aktionspotentiale in der Pyramidenzelle (dargestellt unter P) rufen die neben B bzw. M gezeigten postsynaptischen Antworten hervor, die bei B größer und bei M kleiner werden (modifiziert aus Rozov et al., 2001).

Neuron B ist die zweite Antwort größer als die erste, dies wird synaptische Bahnung genannt. Bei Neuron M hingegen wird die Antwort kleiner, dies wird als synaptische Depression bezeichnet. Die Dynamik der Transmitterfreisetzung wird durch externe Einflüsse aber auch durch die Dichte und Lokalisation präsynaptischer Calciumkanäle sowie deren Kopplung an die Freisetzungsorte moduliert (Rozov et al., 2001). Bahnung (facilitation) und Depression (depression) können die Signalübertragung an Synapsen für Millisekunden bis Sekunden verändern und zählen zur Kurzzeitplastizität. Veränderungen im Rahmen post-tetanischer Potenzierung (post-tetanic potentiation), die bis zu Minuten andauern, werden ebenfalls dazu gezählt. Die aktivitätsabhängigen Veränderungen der Übertragungsstärke führen zur Informationsspeicherung an Synapsen. Dieses „synaptische Gedächtnis“ ist eine weit verbreitete neuronale Eigenschaft und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen werden intensiv untersucht (Fioravante & Regehr, 2011).

Synaptische Vesikel Transmitterfreisetzung erfolgt in Quanten, Untereinheiten ähnlicher Molekülzahl (Fatt & Katz, 1952; del Castillo & Katz, 1954), deren morphologisches Korrelat synaptische Vesikel sind. Abbildung 3 A zeigt eine Computeranimation eines Vesikels, dessen Aufbau und Zusammensetzung bereits eingehend untersucht wurde. Zu erkennen sind unter anderem zwei Vesikelproteine,

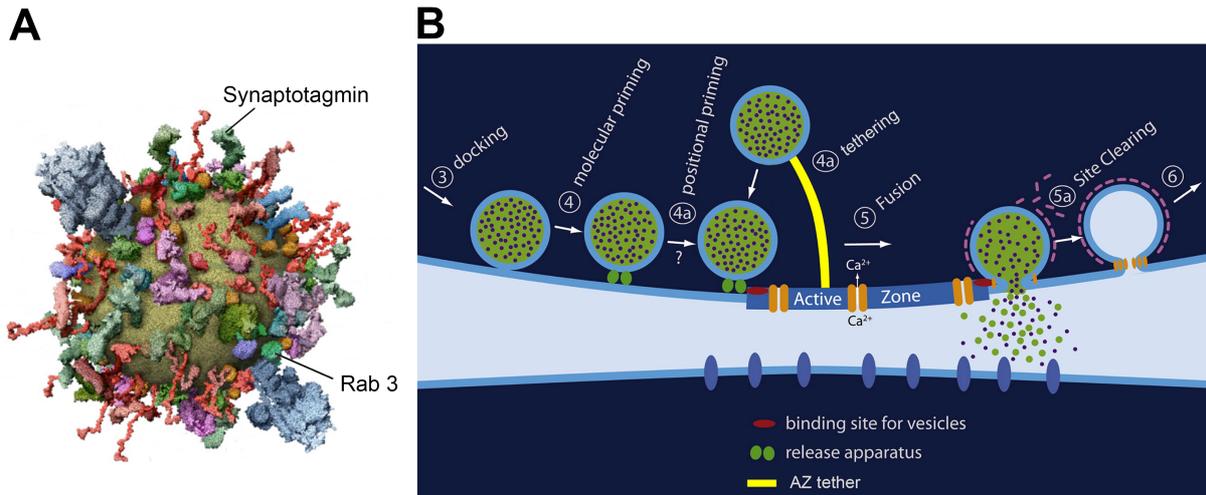


Abb. 3: Aufbau und Funktion synaptischer Vesikel

A Synaptisches Vesikel (Außendurchmesser ca. 40 nm, Masse ca. 30×10^{-18} g) mit Membranproteinen. Im Mittel enthält ein Vesikel 15 Kopien von Synaptotagmin und 10 Kopien von Rab3. Beide Proteine spielen beim Vesikelzyklus zentrale Rollen (modifiziert aus Takamori et al., 2006).

B Abschnitt des Vesikelzyklus an einer Aktiven Zone. Im Schema nähert sich links ein Vesikel der präsynaptischen Membran (3, docking), gefolgt vom Aufbau der Freisetzungsmaschine (4, molecular priming). Anschließend rückt das Vesikel zur Aktiven Zone (4a, positional priming), wobei lange filamentöse Proteine in die Positionierung involviert sind (4a, tethering). An der Aktiven Zone findet die Verschmelzung mit der Plasmamembran statt (5, fusion). Schließlich wird der Fusionsort frei geräumt (5a, site clearing; modifiziert aus Neher & Sakaba 2008).

Synaptotagmin und Rab3. Ihre Funktion soll im Verlauf dieser Arbeit näher betrachtet werden. Die Koordination des Vesikelverkehrs, sprich Annäherung an und Verschmelzung des Vesikels mit der präsynaptischen Membran, Öffnung des Vesikels zur Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt und die anschließende Endozytose der Vesikelmembran, ist hingegen noch recht unklar. Wesentliche Schritte des Vesikelzyklus sind in Abbildung 3 B illustriert, ohne dass auf konkrete Proteine eingegangen wird (modifiziert aus Neher & Sakaba, 2008).

3.2 Von der Kognition zur Molekülfunktion

Untersuchung höherer Hirnfunktion Bisher ist noch unklar, zu welchem Anteil kognitive Funktionen genetisch determiniert sind. Die Distanz zwischen Proteinveränderung und Phänotyp stellt eine enorme Herausforderung bei der molekularen Analyse höherer Hirnfunktionen dar. Neuronale Plastizität dient der Informationsverarbeitung und kann zu molekularen Veränderungen führen, diese

Einleitung

aber auch maskieren. Dadurch wird die genetische Analyse kognitiver Merkmale erschwert. Molekulare Komponenten zur Steuerung höherer Hirnfunktionen lassen sich durch Verwendung menschlicher Populationen mit veränderten kognitiven Fähigkeiten identifizieren. In dieser Arbeit wird eine Punktmutation im Aktive Zonen Protein RIM (Rab3 interacting molecule), die mit höheren Werten bei Intelligenztests einhergeht, untersucht.

Aktive Zonen Der Begriff Aktive Zone als umschriebener Bereich der präsynaptischen Membran geht auf René Couteaux (1909-1999) zurück. Er beschrieb den Aufbau einer Synapse aus Nerventerminalie und der unmittelbar gegenüberliegenden Membran (Couteaux 1944 und 1946). Anschließend wurde das Konzept des synaptischen Komplexes bestehend aus einer lokalen präsynaptischen Membranverdichtung, assoziierten Vesikeln und der verdickten postsynaptischen Membran formuliert (Palade & Palay, 1954). Daraus entwickelte Couteaux den Begriff Aktive Zone für die präsynaptische Region, an der Vesikelverschmelzung und Transmitterabgabe stattfinden. Er kommunizierte John C. Eccles die Idee 1961 in einem persönlichen Schreiben, der den Begriff in seinem Buch „Physiology of the synapse“ (1964) als von Couteaux stammend zitierte (Couteaux, 1961).

Aktive Zonen als Fusions- und Freisetzungsorte bestehen aus drei Komponenten (Zhai & Bellen, 2004). Erstens aus der präsynaptischen Plasmamembran, die unmittelbar gegenüber der verdichteten postsynaptischen Membran (postsynaptic density, PSD) liegt. Hier fusionieren die Vesikel an den Freisetzungstellen, die sich eng gekoppelt zu spannungsgesteuerten Calciumkanälen befinden (Bennett et al., 2000; Atwood & Karunanithi, 2002). Für die Positionierung einer AZ gegenüber der zugehörigen PSD sind Adhäsionsmoleküle wie Cadherine relevant (Shapiro & Colman, 1999). Zweitens bestehen Aktive Zonen aus der Cytomatrix, die der präsynaptischen Membran als elektronendichte Struktur von innen anliegt. Molekulares Korrelat der Matrix sind Gerüstproteine wie das bereits erwähnte RIM, Munc13, RIM-BP (RIM binding protein) und α -Liprin (Wang et al., 1997; Südhof, 2013). Nach aktuellem Verständnis ist RIM für die initiale Kontaktaufnahme von Vesikel und Membran sowie die Fusionsvorbereitung relevant (Schoch et al., 2002; Gracheva et al., 2008; Deng et al., 2011), außerdem dient es wie auch RIM-BP der Lokalisation von Calciumkanälen (Hibino et al., 2002; Kaeser et al., 2011). Dritte Komponente Aktiver Zonen sind von der Plasmamembran ins Cytoplasma ragende

Einleitung

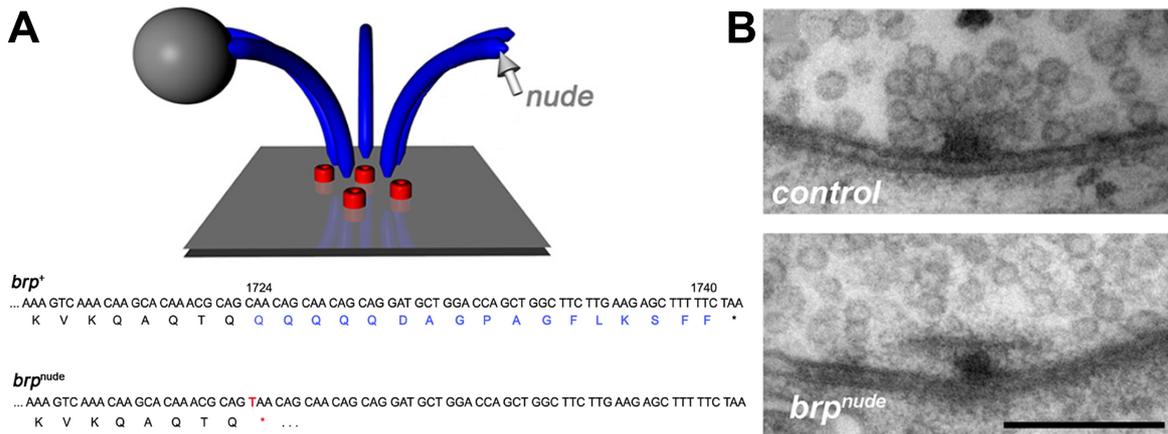


Abb. 4: Organisation Aktiver Zonen

A Schemazeichnung von Bruchpilot-Filamenten (Brp, blau), einem synaptischen Vesikel (grau) und präsynaptischen Calciumkanälen (rot). Durch ein vorzeitiges Stop-Codon im Wildtyp Brp-Protein (*brp*⁺) fehlen bei der *brp*^{nude} Mutante die letzten 17 C-terminalen Aminosäuren (Pfeil *nude*).

B Elektronenmikroskopische AZ-Bilder von Wildtyp (*control*) und *brp*^{nude}. Während der T-bar im Wildtyp von einer Vesikelwolke umgeben ist, fehlt bei *brp*^{nude} das Vesikelkleid. Skala 200 nm (modifiziert aus Hallermann et al., 2010).

bis zu 100 nm lange Filamente der Proteine Bassoon oder Piccolo im Säuger. Sie binden vermutlich dem Nachschub dienende Vesikel. Bei *Drosophila* werden die von der Seitansicht T-förmigen Strukturen an Aktiven Zonen als T-bars bezeichnet, enthalten Filamente des Proteins Bruchpilot (Wagh et al., 2006; Kittel et al., 2006) und sind von einer haloartigen Vesikelwolke umgeben (Abb. 4). An Aktiven Zonen mit trunkierten Bruchpilot-Filamenten ist der Vesikelnachschub gestört und der T-bar nackt (Abb. 4B, Hallermann et al., 2010).

Synaptische Proteine mit C2 Domänen Das bereits erwähnte Vesikelprotein Synaptotgamin (Syt) spielt bei der synaptischen Übertragung eine Schlüsselrolle. Seit rund 20 Jahren wird es als Calciumsensor der evozierten Transmitterfreisetzung angesehen (Brose et al., 1992). Es besitzt eine N-terminale Transmembrandomäne und zwei C-terminale, cytoplasmatische C2 Domänen, C₂A und C₂B (Perin et al., 1990; Perin et al., 1991). Initial als p65 beschrieben (Matthew et al., 1981) ist heute bekannt, dass das Säuger genom 16 Isoformen des Proteins kodiert (Craxton 2007). Die C2 Domänen von acht der 16 Isoformen haben die Fähigkeit Calcium-Ionen zu binden (Gustavsson & Han, 2009). Synaptotgamin 1, 2 und 9 werden auf synaptischen und neuroendokrinen Vesikeln exprimiert und vermitteln die synchrone,

Einleitung

calciumabhängige Exozytose (Littleton et al., 1993; Nonet et al., 1993; Geppert et al., 1994; Xu et al., 2007). *Drosophila* besitzt drei verschiedene Isoformen, Synaptotagmin 1, 4 und 7, von denen Synaptotagmin 1 essentiell für die synchrone Transmitterfreisetzung ist (DiAntonio et al., 1993; Littleton et al., 1993). Neben der Funktion als Calciumsensor scheint Synaptotagmin in weitere Schritte des Vesikelzyklus involviert zu sein. Dazu zählt neben der Verankerung von Vesikeln an die präsynaptische Membran (docking, vgl. Abb. 3B, Reist et al., 1998) auch die Vesikelendozytose (Jorgensen et al., 1995; Littleton et al., 2001; Poskanzer et al., 2003) und das Näherbringen synaptischer Vesikel an die Freisetzungsorte (positional priming, vgl. Abb. 3B, Young & Neher, 2009). Untersuchungen zur Funktion der beiden C2 Domänen zeigten, dass die C₂A-Domäne als Fusionsklemme wirkt, während die C₂B-Domäne für die Aufrechterhaltung der evozierten, synchronen Transmitterfreisetzung relevant ist (Mackler et al., 2002; Loewen et al., 2006; Mace et al., 2009). Beide Domänen regulieren die Öffnung der Fusionspore (Wang et al., 2001; Wang et al., 2003).

Punktmutationen in der C₂B-Domäne von Synaptotagmin verkürzen die Stromabfallszeitkonstante quantaler Ereignisse (C. Pawlu & M. Heckmann, unpublizierte Daten). Dies deutet auf die Relevanz der Domäne für die Fusionsporenregulation und den Prozess der Transmitterfreisetzung hin. Ein Beispiel dafür ist die KQ-Mutante, bei der ein hochkonserviertes Polylysinmotiv (K 379, 380, 384) innerhalb der C₂B-Domäne durch drei Glutamine (Q) ausgetauscht ist (Mackler und Reist, 2001). Quantale Ströme dieser Mutante zeigen eine deutlich verkürzte Abfallszeitkonstante verglichen mit Wildtyp. Dies verdeutlicht die Bedeutung von C2 Domänen als Proteinmodule für die synaptische Funktion.

RIMs wurden initial als Rab3 Effektorproteine beschrieben (Wang et al., 1997). Während im Säuger vier Isoformen von RIM bekannt sind, kodiert das *Drosophila*-Genom nur ein Gen (Wang & Südhof, 2003). RIM ist ein Multidomänenprotein und interagiert mit multiplen Aktiven Zonen Proteinen (vgl. Abb. 10). Es besitzt ebenfalls eine C₂A- und eine C₂B-Domäne, die jedoch nach aktuellem Verständnis nicht calciumbindend sind (Dai et al., 2005). RIM1 ist für die intakte Neurotransmission sowie Kurz- und Langzeitplastizität von Synapsen essentiell (Schoch et al., 2002; Castillo et al., 2002; Calakos et al., 2004). Erste *Drosophila*-Studien konnten kürzlich zeigen, dass RIM Calciumkanäle an Aktiven Zonen lokalisiert, die Vesikelverteilung

beeinflusst und für die evozierte Transmitterfreisetzung relevant ist (Graf et al., 2012; Müller et al., 2012).

3.3 *Drosophila* als Modellorganismus

Vorteile von *Drosophila* In dieser Arbeit wurde die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, ein seit rund 100 Jahren weit verbreiteter Modellorganismus, verwendet (Kohler 1994). Verglichen mit anderen Modellorganismen bietet *Drosophila* einige Vorteile (Venken & Bellen, 2005 und 2007). Bereits vor mehr als zehn Jahren wurde das gesamte Fliegen-genom sequenziert (Adams et al., 2000), das im Vergleich zu Säugergenomen kompakt ist. Es existieren zahlreiche Werkzeuge, um Mutationen ins Genom einzuführen. Außerdem gibt es bereits viele Mutanten, die unter Wissenschaftlern frei ausgetauscht werden. Hinzu kommt der Vorteil einer kurzen Generationszeit und der aufgrund von Körpergröße, anspruchslosigkeit in der Aufzucht und geringer Kosten leicht zu realisierenden Haltung großer Mengen genetisch veränderter Organismen. *Drosophila* ist in der Lage zu lernen und zeigt komplexes Verhalten (Benzer 1973), sodass fundamentale Fragestellungen zur Informationsverarbeitung im Nervensystem, Verhaltensbildung (Heisenberg et al., 2001) und selbst Krankheitsmechanismen (Bayat et al., 2011; Haddad et al., 2013) untersucht werden können.

Neuromuskuläre Synapse Die glutamaterge, neuromuskuläre Synapse (neuromuscular junction, NMJ) von Larven des dritten Entwicklungsstadiums ist als Modell für zentrale, erregende Säugersynapsen etabliert. Ihr Aufbau unterscheidet sich deutlich von dem neuromuskulärer Synapsen bei Säugern und ihre Plastizität ähnelt der vieler kortikaler Säugersynapsen (Atwood & Karunanithi, 2002; Ljaschenko et al., 2013). Synaptische Ströme lassen sich gut mit fokalen Elektroden registrieren (Heckmann & Dudel, 1995) und die Verwendung genetisch kodierter Calciumsensoren bietet einen optischen Ansatz zur funktionellen Analyse (Guerrero et al., 2005). Methoden zur morphologischen Untersuchung reichen von konventioneller Immunhistochemie über Elektronenmikroskopie (Atwood et al., 1993) bis hin zu neuerer höchstauflösender Bildgebung wie STED-Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion-Mikroskopie, Kittel et al., 2006; Liu et al., 2009) oder *d*STORM (*direct* Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, Ehmann et al., in revision).

4 Material und Methoden

4.1 Aufzucht und Fliegenstämme

Aufzucht Fliegen wurden in Plastikgefäßen auf Standardmedium unter Zugabe von konventioneller Backhefe in der Regel bei 20 bzw. 25°C gehalten (Ashburner, 1989). Um eine höhere RNAi-Expression zu erreichen wurden die Fliegen der entsprechenden Kreuzungen bei 29°C gehalten. Sämtliche hier beschriebenen Experimente wurden an männliche Larven des dritten Entwicklungsstadiums, die sich im Futterbrei befanden, durchgeführt.

Genetik Als Wildtypstamm von *Drosophila melanogaster* diente w^{1118} . Zur Herstellung aller weiteren Genotypen wurde das binäre GAL4/UAS-System verwendet (Brand & Perrimon, 1993). GAL4 ist ein transkriptionsaktivierendes Protein, welches über ein P-Element ins Genom gebracht wird und UAS (upstream activation sequence) eine kleine Promotorsequenz. Zur Aktivierung der Transkription eines UAS-kontrollierten Gens muss GAL4 an den Promotor binden. Durch die Kreuzung eines gezielten Aktivatorstamms (GAL4) mit dem Effektorstamm (UAS) kann man die Transkription eines Gens zellspezifisch aktivieren. Zur Expression in Motoneuronen wurde *ok6-GAL4* verwendet und zur panneuronalen Expression *elav-GAL4* (Abb. 7 und Tabelle 1).

Für die in Abschnitt 5.3 und 5.4 geschilderten RIM-Experimente wurden transgene *Drosophila* Stämme hergestellt, die unter der Kontrolle des UAS-Promotors entweder die wildtypische RIM cDNA-Sequenz oder mit einer der Punktmutationen R915H bzw. R916H oder der Doppelmutation R915H, R916H exprimierten. Alle Transgene wurden mit einer *attP40* landing site auf dem zweiten Chromosom integriert (Markstein et al., 2008), welche eine phi31-vermittelte Rekombination zur besseren Kontrolle des Integrationsortes und vergleichbarer transkriptionaler Expressionslevel verwendete (Groth et al., 20004; BestGene Inc, Chino Hills, USA). Durch die Verwendung von *ok6-GAL4* wurde die Expression der Transgene auf Motoneurone beschränkt.

Um den Effekt von Synaptotagmin auf Aktive Zonen zu untersuchen (vgl. 5.5 und 5.6) wurde die Synaptotagmin-Proteinmenge durch RNAi reduziert. Für Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Messungen (vgl. 4.2) wurde diese mit *ok6-GAL4* und

eIav-GAL4 exprimiert. Bei Experimenten zur morphologischen Charakterisierung der neuromuskulären Synapsen wurde *ok6-GAL4* verwendet. Für fokale Messungen wurde zur Elektrodenplatzierung das grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein, GFP) in Motoneuronen exprimiert.

Tabelle 1 listet sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Genotypen sowie die zur Erzeugung benötigten Kreuzungen der Ausgangsstämme auf und kennzeichnet das oder die jeweils genetisch veränderten Chromosom(en). Tabelle 2 geht auf Details zu Herstellung und Verwendung der im nächsten Abschnitt beschriebenen Glaselektroden für elektrophysiologische Messungen ein.

4.2 Elektrophysiologie

Lösungen Als extrazelluläre Badlösung wurde eine wöchentlich neu angesetzte HL-3 Lösung (hemolymph-like solution 3) in folgender Zusammensetzung verwendet (in mM): NaCl 70, KCl 5, MgCl₂ 20, NaHCO₃ 10, Trehalose 5, Succrose 115, Hepes 5. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,2 eingestellt (Stewart et al., 1994). Zwischen den Experimenten wurde die Lösung bei 4°C gelagert. Zur Einstellung der jeweils erforderlichen Calciumkonzentration wurde 1 M CaCl₂-Lösung verwendet. Intrazelluläre Elektroden für Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Messungen wurden mit einer 3 M KCl Lösung, aufbewahrt bei Raumtemperatur, gefüllt.

Präparation Männliche Larven des dritten Entwicklungsstadiums wurden präpariert und von diesen die neuromuskulären Synapsen der longitudinalen Abdominalmuskeln 6/7 in den Segmenten A2 und A3 verwendet (Atwood et al., 1993). Die Präparation erfolgte in eiskalter HL3-Lösung auf einem mit Sylgard (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) beschichteten Deckglas. Die Larve wurde an beiden Polen mit je einer gekürzten Minutie (Durchmesser 0,1 mm, Austerlitz Insect Pins, Slakov u Brna, Tschechien) oder Histoacrylkleber aus Enbucrilat (BRAUN, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) fixiert, mit einer Schere von dorsal eröffnet und die Innereien mit einer feinen Pinzette entfernt. Die vier freien Endigungen des Präparats wurden flach aufgespannt und entweder mit gekürzten Minutien oder Histoacrylkleber fixiert. Anschließend wurde das zentrale Nervensystem angehoben und abgeschnitten. Dabei wurde möglichst wenig Zug ausgeübt und die das ZNS verlassenden Motoneurone nicht zu kurz abgeschnitten, um eine zuverlässige Nervenstimulation zu ermöglichen.

Name	Genotyp	Kreuzung
<i>RIM^{wt}</i>	<i>ok6-GAL4/UAS-RIM(wt)</i> [II]	<i>+/+;p{UAS-RIM(wt)w⁺}^{attP40}/CyoGFP(w⁻);+/+ x +/+;ok6-GAL4;+/+</i>
<i>RIM^{R915H}</i>	<i>ok6-GAL4/UAS-RIM(R915H)</i> [II]	<i>+/+;p{UAS-RIM(R915H)w⁺}^{attP40}/CyoGFP(w⁻);+/+ x +/+;ok6-GAL4;+/+</i>
<i>RIM^{R916H}</i>	<i>ok6-GAL4/UAS-RIM(R916H)</i> [II]	<i>+/+;p{UAS-RIM(R916H)w⁺}^{attP40}/CyoGFP(w⁻);+/+ x +/+;ok6-GAL4;+/+</i>
<i>RIM^{R915H, R916H}</i>	<i>ok6-GAL4/UAS-RIM(R915H,R916H)</i> [II]	<i>+/+;p{UAS-RIM(R915H,R916H)w⁺}^{attP40}/CyoGFP(w⁻);+/+ x +/+;ok6-GAL4;+/+</i>
<i>wt</i>	<i>elav-GAL4/+</i> [III]	<i>w¹¹¹⁸ x +/+;+/+;elav-GAL4</i>
<i>syt^{KD}</i>	<i>elav-GAL4/UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵</i> [III]	<i>+/+;+/+;UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵ x +/+;+/+;elav-GAL4</i>
<i>brp^{KO}</i>	<i>brp⁶⁹/BSC²⁹;elav-GAL4/+</i> [II und III]	<i>+/+;BSC²⁹/CyoGFP(w⁻);+/+ x +/+;brp⁶⁹/CyoGFP(w⁻);elav-GAL4/+</i>
<i>brp^{KO}, syt^{KD}</i>	<i>brp⁶⁹/BSC²⁹;elav-GAL4/UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵</i> [II und III]	<i>+/+;BSC²⁹/CyoGFP(w⁻);UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵ x +/+;brp69/CyoGFP(w⁻);elav-GAL4</i>
<i>rab3^{KO}</i>	<i>rab3^{rup}/DfED2076;elav-GAL4/+</i> [II und III]	<i>+/+;rab3^{rup};+/+ x +/+;DfED2076/CyoGFP(w⁻);elav-GAL4</i>
<i>rab3^{KO}, syt^{KD}</i>	<i>rab3^{rup}/DfED2076;elav-GAL4/UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵</i> [II und III]	<i>+/+;rab3^{rup}/CyoGFP(w⁻);UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵/Tm6b, Tb x +/+;DfED2076/CyoGFP(w⁻);elav-GAL4</i>
<i>wt</i>	<i>ok-GAL4/+</i> [II]	<i>w¹¹¹⁸ x +/+;ok6-GAL4;+/+</i>
<i>syt^{KD}</i>	<i>ok6-GAL4/+;UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵/+</i> [II und III]	<i>+/+;+/+;UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵ x +/+;ok6-GAL4;+/+</i>
<i>brp^{KO}</i>	<i>brp⁶⁹ok6-GAL4/BSC²⁹</i> [II]	<i>+/+;BSC²⁹/CyoGFP(w⁻);+/+ x brp⁶⁹ok6-GAL4/Cyo actGFPw[*]</i>
<i>brp^{KO}, syt^{KD}</i>	<i>brp⁶⁹ok6-GAL4/BSC²⁹;UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵/+</i> [II und III]	<i>+/+;BSC²⁹/CyoGFP(w⁻);UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵/+ x +/+;brp⁶⁹ok6-GAL4/Cyo actGFPw[*];+/+</i>
<i>rab3^{KO}</i>	<i>rab3^{rup}/DfED2076 ok6-GAL4/+</i> [II]	<i>+/+;rab3^{rup};+/+ x +/+;DfED2076 ok6-GAL4/CyoGFP(w⁻);+/+</i>
<i>rab3^{KO}, syt^{KD}</i>	<i>rab3^{rup}/DfED2076 ok6-GAL4; UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵/+</i> [II und III]	<i>+/+;rab3^{rup}/CyoGFP(w⁻);UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵/Tm6bTb x +/+;DfED2076 ok6-GAL4/CyoGFP(w⁻);+/+</i>
<i>wt</i>	<i>ok6-GAL4/+;UAS-mCD8::GFP/+</i> [II und III]	<i>w¹¹¹⁸ x +/+;ok6-GAL4/CyoGFP(w⁻);UAS-mCD8::GFP</i>
<i>syt^{KD}</i>	<i>ok6-GAL4/+;UAS-mCD8::GFP/UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵</i> [II und III]	<i>+/+;+/+;UAS-Syt1_RNAi⁸⁸⁷⁵ x +/+;ok6-GAL4/CyoGFP(w⁻);UAS-mCD8::GFP</i>
<i>brp^{KO}</i>	<i>brp⁶⁹ok6-GAL4/BSC²⁹;UAS-mCD8::GFP/+</i> [II und III]	<i>+/+;BSC²⁹/CyoGFP(w⁻);UAS-mCD8::GFP/Tm6b, Tb x +/+;brp⁶⁹ok6-GAL4/Cyo actGFPw[*];+/+</i>

Tabelle 1: Genetik. Auflistung der Genotypen mit betroffenen Chromosom in eckigen Klammern und Kreuzungen. Ein Semikolon trennt Chromosomen, ein Plus steht für ein Wildtyp-Allel. *wt*: Wildtyp, *syt^{KD}*: Synaptotagmin-RNAi, *brp^{KO}*: Bruchpilot-Nullmutante (Kittel et al., 2006), *rab3^{KO}*: Rab3-Nullmutante (Graf et al., 2009).

Typ	Glas	Füllung	∅ Öffnung	R	DMZ P(A)		DMZ P(B)					
SE	GB 150F-8P Borosilicat 1,5 mm	HL-3	8-10 µm	< 100 kΩ	H	100	t(F1)	050	H	0 0	t(F1)	050
					F(TH)	150	F1	000	(TH)	040	F1	015
					s(TH)	016	s(F2)	000	s(TH)	040	s(F2)	003
					t(TH)	012	F2	000	t(TH)	006	F2	030
					s(H)	040	A	030	s(H)	000	AD	250
FE	GB 200F-10 Borosilicat 2,0 mm	HL-3	5 µm	550-650 kΩ	H	400	t(F1)	000	H	347	t(F1)	020
					F(TH)	040	F1	000	F(TH)	040	F1	080
					s(TH)	12	s(F2)	000	s(TH)	010	s(F2)	005
					t(TH)	05	F2	000	t(TH)	050	F2	160
					s(H)	050	AD	151	s(H)	000	AD	796
IZR	GB 150F-8P Borosilicat 1,5 mm	3 M KCl	< 1 µm	10-15 MΩ	H	400	t(F1)	000	H	500	t(F1)	325
					F(TH)	120	F	000	F(TH)	120	F1	180
					s(T)	030	s(F2)	000	s(TH)	013	s(F2)	012
					t(H)	000	F2	000	t(TH)	150	F2	330
					s(H)	000	AD	010	s(H)	000	AD	000

Tabelle 2: Elektroden. SE: Saugelektrode, FE: fokale Elektrode, IZR: intrazelluläre Elektrode, ∅ Öffnung: Öffnungsdurchmesser, R: Widerstand in HL-3 bzw. KCl Lösung, DMZ P(A/B): Programm P(A/B) des Elektrodenziehgeräts (DMZ-Puller, Heizfilamentstärke: 4,5 mm, Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland). Die Parameter stehen für H: Hitze (heat), F(TH): Kraft Vorbereitungszug (force preliminary pull), s(TH): Distanz bis Zugende (distance threshold), s(H): Distanz bis Hitzeende (distance heatstop), t(F1): Zeit zwischen Vorbereitungs- und Hauptzug (delay pull 1), F1: Kraft Hauptzug 1 (force pull 1), s(F2): Distanz von Hauptzug 1 zu 2 (distance pull 2), F2: Kraft Hauptzug 2 (force pull 2), AD: Feineinstellung (adjust). Borosilicat-Glas von Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland.

Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (two-electrode voltage clamp, TEVC) Die Messungen wurden in extrazellulärer HL-3 mit einer Calciumkonzentration von 1,0 mM bei Raumtemperatur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) vorgenommen (Abb. 5A, Kittel et al., 2006). Dazu wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop FS1, Carl Zeiss AG, Deutschland) und ein Axo Clamp Verstärker (Axo Clamp2B, Axon instruments, Sunnyvale, USA) verwendet. Die intrazellulären Elektroden besaßen Widerstände von 10-15 M Ω (Tabelle 2). Das Haltepotential (V_{holding}) wurde bei der Messung der evozierten Ströme (evoked excitatory postsynaptic currents, eEPSCs) auf -60 mV und bei der Messung der spontanen (miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSCs) auf -80 mV eingestellt. Die Ableitungen erfolgten ausschließlich von Muskel 6 und nur Zellen, die ein initiales Membranpotential von ≥ -50 mV und Eingangswiderstände von ≥ 4 M Ω aufwiesen, wurden verwendet. Synaptische Antworten wurden durch Pulse von 0,3 ms Länge und 5-10 V Amplitude über eine mit extrazellulärer HL-3 Lösung gefüllte Saugelektrode ausgelöst. Es wurde ein Doppelpulsprotokoll mit einer Frequenz von 0,2 Hz und 30 ms Interpulsintervall benutzt. Die Daten wurden mit einem externen 10 kHz low-pass Bessel-Filter gefiltert.

Fokale Ableitungen Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) in HL-3 Lösung. Die Badtemperatur wurde konstant bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ gehalten, indem die Zuflussgeschwindigkeit aus einem mit Eis gekühlten Vorratsgefäß ($5-8^\circ\text{C}$) über eine Pumpe reguliert wurde. Abbildung 5 B zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Sämtliche Glaselektroden wurden mit einem Elektrodenziehgerät (puller, DMZ-Puller, Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Deutschland) aus Borosilicat-Glas (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) hergestellt (Tabelle 2). Die Saugpipette (GB 150F-8P) besaß einen Außendurchmesser von 1,5 mm und einen Öffnungsdurchmesser von 8-10 μm . Nach Befüllung mit extrazellulärer Lösung wurde sie mit einem Mikromanipulator (MM3A-LS, Kleindiek Nanotechnik, Reutlingen, Deutschland) unter optischer Kontrolle im Winkel von ca. 25° zur Wasseroberfläche auf das Präparat gefahren. Der efferente Nerv wurde mit einer Spritze, die über einen dünnen Plastikschlauch mit der Elektrode in Verbindung stand, eingesaugt. Aktionspotentiale im Nerv wurden durch 0,2 ms Pulse mit 7 V Amplitude aus einem Stimulator (Grass S88, Natus Neurology Incorporated - Grass Products, Warwick RI, USA) ausgelöst. Die fokalen Messdaten wurden mit einem Patch-Clamp-Verstärker (EPC10, HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet.

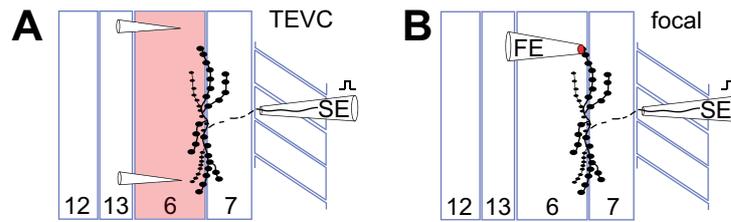


Abb. 5: Funktionelle Charakterisierung von Synapsen

A Versuchsanordnung bei Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Messungen (TEVC) am Muskel 6/7. Das Motoneuron wird über eine Saugel Elektrode (SE) durch kurze Strompulse gereizt. Die Muskelzelle wird auf ein definiertes Potential geklemmt und der postsynaptische Strom der gesamten Zelle (Muskel 6, rotes Rechteck) abgeleitet.

B Anordnung bei fokalen Ableitungen (focal). Auch hier dient die Saugel Elektrode (SE) der Nervenstimulation. Die fokale Elektrode (FE) wird auf einem einzelnen synaptischen Bouton platziert (roter Kreis), um extrazellulär lokal den postsynaptischen Strom abzuleiten.

Dabei wurde mit 20 kHz digitalisiert und intern mit einem low-pass Bessel-Filter gefiltert. Die Stimulationsfrequenz betrug 0,2 Hz und es wurde stets ein Doppelpulsprotokoll mit einem Interpulsintervall von 30 ms verwendet. Die fokale Elektrode (GB 200F-10, Außendurchmesser 2,0 mm, Tabelle 2) wurde mit einem Sutter Manipulator (MPC-200, Sutter Instruments, Novato, USA) platziert. Bei einem Öffnungsdurchmesser an der Spitze von ca. 5 μm betrug der elektrische Widerstand in HL-3 Lösung $550 \pm 100 \text{ k}\Omega$. Die Elektrode diente zur extrazellulären Ableitung der postsynaptischen Ströme. Das Präparat wurde durch ein aufrechtes Mikroskop (Axioskop 2FS plus, Carl Zeiss AG, Deutschland) mit einem Objektiv mit sechzigfacher Vergrößerung (LUMIPlanFI/IR, 0,9 NA, Wasserimmersion, Olympus Hamburg, Deutschland) betrachtet. Eine Kamera mit Monitoranschluss (Nikon D3X, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) wurde zur Beobachtung des Präparats und der Elektroden während der Datenakquisition und zur Dokumentation jedes Einzelexperiments verwendet. Das Fluoreszenzsignal wurde mit einer LED (488 nm Wellenlänge, Cool LED precisExcite, CoolLED, New York, USA; GFP-Filtersatz 38 HE, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) angeregt.

Datenanalyse Bei den Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Ableitungen wurden pro Messung 20 aufeinanderfolgende Datenspurten gemittelt und ausgewertet, bei den fokalen Ableitungen jeweils 60. Die Daten wurden auf einen iMac (Apple, Cupertino, USA) transferiert und mit Clampfit 10.3 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) oder

IGOR Pro (Version 6.05A, Wave Metrics, Portland, USA) analysiert. Es wurden die maximale Amplitude des synaptischen Stroms (peak current amplitude) und die Stromanstiegszeit (rise time) von 10 auf 90 % der maximalen Amplitude ausgewertet. Zur Bestimmung der Stromabfallszeitkonstante (decay time, τ decay) wurde eine mono-exponentielle Kurve ab dem Punkt des 60%igen Stromabfalls bis zur Grundlinie angelegt (Pawlu et al., 2004). Die Latenz der synaptischen Antwort (synaptic delay) wurde vom Beginn des Stimulationsartefakts bis zum Anfang des Anstiegs des postsynaptischen Stroms gemessen. Synaptische Bahnung wurde über das Verhältnis der Amplituden der postsynaptischen Antworten als die Doppelpuls-Ratio (paired-pulse ratio, PPR) bestimmt, indem die Amplitude der jeweiligen zweiten Antwort durch die der ersten Antwort dividiert wurde.

4.3 Immunfluoreszenz

Präparation Die Herstellung der Nerv-Muskel-Präparate für Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgte im Wesentlichen wie in 4.2 beschrieben. Zur Fixierung der Larven wurden hier immer Minuten verwendet und die Nervenfasern wurden möglichst kurz abgeschnitten um eine Überlagerung von Synapsen zu vermeiden.

Antikörper Aktive Zonen wurden mit dem gegen Bruchpilot gerichteten monoklonalen Maus Antikörper Brp^{Nc82} (1:250, Hofbauer 1991) und einem sekundären Alexa Fluor 488-konjugierten Anti-Maus Antikörper (1:250, Invitrogen Carlsbad, USA) markiert. Für die Färbung präsynaptischer Membranen wurde Cy3-konjugierter Ziege Anti-horseradish peroxidase Antikörper (α -HRP 1:250, Jackson Immuno Research, West Grove USA) verwendet. Für die dSTORM-Messungen wurden Aktive Zonen wiederum mit Brp^{Nc82} (1:2000) als Primärantikörper markiert. Als Sekundärantikörper wurden F(ab')₂ Ziege Anti-Maus Fragmente (A10534, Invitrogen) mit Cy5-NHS (PA15101, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) konjugiert. Der Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von $5,2 \times 10^{-8}$ M verwendet. Die Darstellung der Boutons erfolgte mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Ziege Anti-horseradish peroxidase Antikörper (α -HRP, 1:250, Jackson Immuno Research).

Strukturierte Beleuchtungs-Mikroskopie (Structured Illumination Microscopy)

Die Färbungen erfolgten nach einem modifizierten Protokoll (Schmid & Sigrist, 2008). Die Nerv-Muskel-Präparate wurden für zehn Minuten mit 4 % PFA (Paraformaldehyd) in 0,2 mM PBS (phosphate buffered saline) fixiert. Unspezifische

Material und Methoden

Bindungsstellen wurden mit 5 % NGS (natural goat serum, Dianova, Hamburg, Deutschland) in PBT (PBS inklusive 0,05 % Triton X-100, Sigma-Aldrich, Deutschland) für 30 Minuten geblockt. Die primären Antikörper wurden über Nacht bei 4°C hinzugefügt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 20 Minuten mit PBS wurden die Präparate für zwei bis vier Stunden mit den sekundären Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert, erneut gefolgt von dreimaligem Waschen für je 20 Minuten mit PBS. Die Präparate wurden in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingebettet, mit Nagellack versiegelt und die Bilder mit einem ApoTome System (Carl Zeiss, Deutschland, Mikroskop Axiovert 200M Zeiss, Objektiv 63x Plan Apochromat, NA 1,4, Ölimmersion) aufgenommen. Die Analyse mit der Software ImageJ (1.440, NIH, Bethesda, USA) erfolgte an Maximalprojektionen von Bildstapeln mit je 15-20 Bildern im Abstand von 250 nm. Es wurden sowohl die Bruchpilot-Punkte pro NMJ gezählt, als auch für die Analyse einzelner Boutons entsprechende Endigungen synaptischer Äste definiert. Distal bezeichnet dabei den jeweils letzten Bouton eines Astes und proximal einen näher an der Eintrittsstelle des Motoneurons gelegenen. Zur Analyse des morphologischen Gradienten wurden die jeweils letzten drei Boutons eines Astes verwendet. Boutons wurden als quantifizierbar angesehen, wenn sie exponiert und nicht überlagert, sowie klar umschreibbar zu erkennen waren. Mit ImageJ wurden Fläche, Länge (parallel zum Achsenverlauf des Astes) und Breite (90° zur Länge) der Boutons anhand des α -HRP Signals gemessen.

dSTORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) Für die dSTORM Aufnahmen wurden gefärbte Nerv-Muskel-Präparate in einen Puffer (100 mM Mercaptoethylamin, Sigma-Aldrich, Deutschland, in PBS, pH-Wert = 7,8 - 7,9) eingebettet, welcher das reversible Schalten der Fluorophore während der Aufnahme ermöglicht (van de Linde et al., 2008). Die Bildaufnahmen wurden an einem inversen Mikroskop (Olympus IX-71, 60x, NA 1,45, Ölimmersion, Olympus Hamburg, Deutschland) mit einem nosepiece-stage (IX2-NPS, Olympus) angefertigt. Zur Anregung von Cy5 wurde ein 644 nm Diodenlaser (iBEAM-SMART-640-S, TOPTICA Photonics AG, Gräfelfing, Deutschland) und von Alexa Fluor 488 ein 488 nm Laser (iBEAM-SMART-488-S, TOPTICA Photonics AG) verwendet. Die Laserstrahlen wurden durch je einen Clean-Up Filter (Brightline HC 642/10, Semrock, Rochester, USA bzw. ZET 488/10, Chroma, Vermont, USA) und zwei dichroide Spiegel (Laser MUX-Strahlteiler 514-543, Semrock und HC-Quadband Laserstrahlteiler BP

R405/488/561/635, Semrock) auf die Probe gelenkt. Das emittierte Licht wurde zunächst mit einem Quadbandfilter (HC-Quadband, 446/523/600/677, Semrock) gefiltert und danach mit einem dichroiden Spiegel (HC-Beamsplitter 640 imaging, Semrock) auf zwei Kameras (iXon Ultra DU-897-U, Andor, Belfast, UK) aufgeteilt. Nach dem dichroiden Spiegel wurde das Emissionslicht zusätzlich im roten Kanal mit einem Langpassfilter (Edge Basic 635, Semrock) und im grünen Kanal mit einem Bandpassfilter (Brightline HC 525/50, Semrock) gefiltert. Die Pixelgröße betrug 126 nm (rot) bzw. 128 nm (grün). Bei *d*STORM wird ein hochaufgelöstes Bild aus der Rekonstruktion vieler Einzelbilder ermittelt. Dazu wird ein Film des fluoreszenzgefärbten Präparats gefertigt. Für ein hochaufgelöstes Bild wurden hier jeweils 15.000 Einzelbilder bei einer Belichtungsdauer von 10 ms aufgenommen. Durch die Pufferbedingungen und die Laseranregung befinden sich die Fluorophore während der meisten Zeit in einem reversiblen Aus-Zustand und emittieren kein Licht. Durch die präzise Lokalisation einzelner, stochastisch aktivierter Fluorophore in den Einzelbildern wird so das hochaufgelöste Bild rekonstruiert (Heilemann et al., 2008; van de Linde et al., 2011). Dies wurde hier mit der *rapid*dSTORM Software (Wolter et al., 2010; AG Sauer, Biozentrum, Universität Würzburg) realisiert, wobei ausschließlich Fluoreszenzspots mit mehr als 1000 Counts analysiert wurden (10 nm/Pixel sub-pixel binning). Zur weiteren Bearbeitung der Bilder (8-bit Datentiefe) wurde mithilfe von ImageJ (1.440, NIH) eine Maske kreiert, indem ein Gauss-Filter (Pixel-Radius 1) und ein Schwellenwert von 0,10 angewandt wurden. Dann wurden Originalbild und Maske übereinander gelegt und die Aktiven Zonen anhand ihrer Fläche (mindestens 300 Pixel) identifiziert. Die Zuordnung Aktiver Zonen zu den jeweils letzten sechs Boutons eines Astes erfolgte mithilfe des α -HRP Signals. Die Anzahl der Bruchpilot-Lokalisationen pro Aktiver Zone wurde durch die Multiplikation des mittleren Grauwertes mit der Fläche der jeweiligen AZ ermittelt (Ehmann et al., in revision).

4.4 Statistik

Alle Daten werden als Mittelwert (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) angegeben. Die Berechnung der Statistik und Erstellung der Diagramme erfolgte mit Sigma Plot 12.0 (Systat Software, San Jose, USA). Zunächst erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test. Für die anschließende Signifikanzberechnung wurde der nicht parametrische

Material und Methoden

Rangsummentest nach Mann-Whitney (rank sum test) verwendet. p-Werte unter 0,05 werden als signifikant angesehen, wobei ein Stern $p < 0,05$, zwei Sterne $p < 0,01$ und drei Sterne $p < 0,001$ bedeuten. n kennzeichnet die jeweilige Anzahl der Experimente.

5 Ergebnisse

5.1 Differenzierung von Synapsen

Genetik *Drosophila melanogaster* eignet sich für neurophysiologische Untersuchungen und ist hervorragend genetisch manipulierbar. Das Genom der Fliege besteht aus drei autosomalen Chromosomenpärchen (Nummer II, III und IV), sowie den Geschlechtschromosomen X und Y (Nummer I, Abb. 6). Insgesamt ist es etwa 180 Mb groß und kodiert um die 13.600 Gene. In dieser Arbeit wurden Punktmutationen im Aktive Zonen Protein RIM (Rab3 interacting molecule), das auf dem dritten Chromosom kodiert ist, untersucht. Außerdem wurde eine Synaptotagmin-RNAi-Linie in Nullmutanten der präsynaptischen Proteine Bruchpilot und Rab3 exprimiert, die auf dem zweiten Chromosom kodiert sind (Tabelle 1). Ziel dieser Untersuchungen war es, synaptische Plastizität, die relevant für Lernen und Gedächtnis ist, auf Molekül-Ebene zu analysieren.

Morphologischer Gradient Wie bereits in der Einleitung erwähnt ist synaptische Differenzierung essentiell für höhere Hirnfunktionen. Ihre Entstehung ist bisher nur zum Teil verstanden. In dieser Arbeit wurde die Differenzierung als Beispiel für synaptische Plastizität an einer bestimmten neuromuskulären Kontaktstelle von *Drosophila* untersucht. Alle Analysen wurden an männlichen Larven des dritten Entwicklungsstadiums durchgeführt. Zur Reduktion der Variabilität wurden ausschließlich die neuromuskulären Synapsen (neuromuscular junction, NMJ) der ventralen longitudinalen Abdominalmuskeln 6 und 7 in den Körpersegmenten A2 und A3 verwendet. Die Abdominalmuskeln 6 und 7 werden von zwei Motoneuronen innerviert, die glutamaterge synaptische Kontakte bilden. Das sogenannte MN6/7-Ib- (RP3-) Neuron bildet große synaptische Endigungen, die als Typ Ib Boutons bezeichnet werden (Atwood et al., 1993; Brodie et al., 1993). Das zweite Neuron MNSNb/d-Is bildet kleinere, sogenannte Typ Is Boutons (Kurdyak et al., 1994; Lnenicka et al., 2000; Hoang & Chiba, 2001). Typ Is Boutons zeigen größere quantale Antworten und ein schwächeres Bahnungsverhalten als Typ Ib Boutons und enthalten etwas größere synaptische Vesikel (Karunanithi et al., 2002). Außerdem besitzen sie weniger Aktive Zonen (AZs) und T-bars (Atwood et al., 1993). Abbildung 7 zeigt eine Immunfluoreszenz-Färbung einer neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Segment A3 im Wildtyp. Die Antikörper richteten sich gegen

Ergebnisse

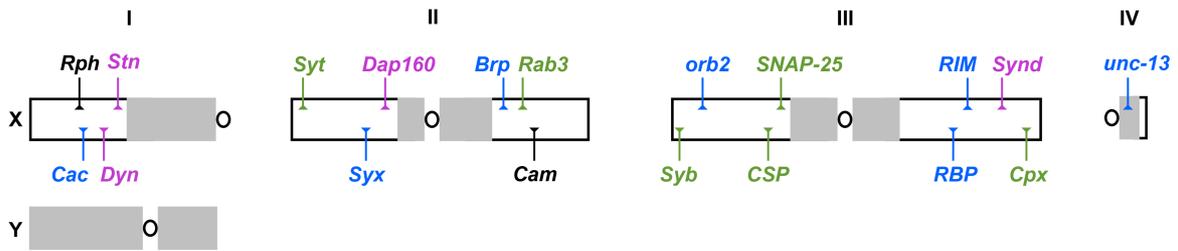


Abb. 6: Die Chromosomen der Fliege

Das *Drosophila*-Genom besteht aus den vier Chromosomenpaaren I (X und Y), II, III und IV. Centromer-Regionen (Kreise), Euchromatin (schwarz) und Heterochromatin (grau) sowie genetische Kodierungsorte wichtiger präsynaptischer Proteine sind markiert. Es wird zwischen Vesikel- (grün), Aktive Zonen- (blau), Endozytose- (magenta) und anderen Proteinen (schwarz) unterschieden. Gewebespezifische Treiber: ok6 (II.), elav (X bzw. III.), Brp: Bruchpilot, Cac: Cacophony, Cam: Calmodulin, Cpx: Complexin, CSP: cystein string protein, Dap160: Dynamin associated protein of 160 kDa, Dyn: Dynamin, RBP: RIM-binding protein, RIM: Rab3 interacting molecule, Rph: Rabphilin, SNAP25: Synaptosomal associated protein of 25 kDa, Stn: Stoned, Syb: Synaptobrevin, Synd: Syndapin, Syt: Synaptotagmin, Syx: Syntaxin (modifiziert aus Adams et al., 2000 nach www.flybase.org).

präsynaptische Membranen (α -HRP) und Bruchpilot (BRP^{Nc82}), eine essentielle Komponente Aktiver Zonen (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006). Primäres Ziel des ersten Teils der Untersuchungen war es zu klären, ob es im Wildtyp neben der oben genannten Differenzierung in Ib und Is Boutons auch eine Differenzierung der Boutons entlang eines Axons gibt (Atwood & Karunanithi, 2002). Dafür wurden verschiedene Parameter in den jeweils letzten drei Boutons eines Ib bzw. Is Astes ausgewertet (Abb. 7, Tabelle 7 und 8). Die Analyse konzentrierte sich auf die Größe der Boutons und die Anzahl der Bruchpilot-Punkte als Maß für die Aktiven Zonen. Distale, am Ende des Astes gelegene Is Boutons besaßen gleich viele bzw. nur wenig mehr Aktive Zonen als proximale, nahe der Eintrittsstelle des Motoneurons gelegene Boutons (Abb. 7A). Distale Ib Boutons hingegen wiesen weitaus mehr Aktive Zonen als proximale auf. Die Vermessung von Fläche, Länge und Breite der Boutons zeigte außerdem, dass distale Ib Boutons die größten entlang des Axons waren (Abb. 7B). Entsprechende Untersuchungen wurden auch für Typ Is Boutons durchgeführt, zeigten jedoch keine derartigen Unterschiede. Alle Ergebnisse sind den Tabellen 7 und 8 zusammen mit Ergebnissen aus weiter hinten dargelegten Experimenten (vgl. 5.5 und 5.6) zu entnehmen. Typ Is und Typ Ib Boutons

Ergebnisse

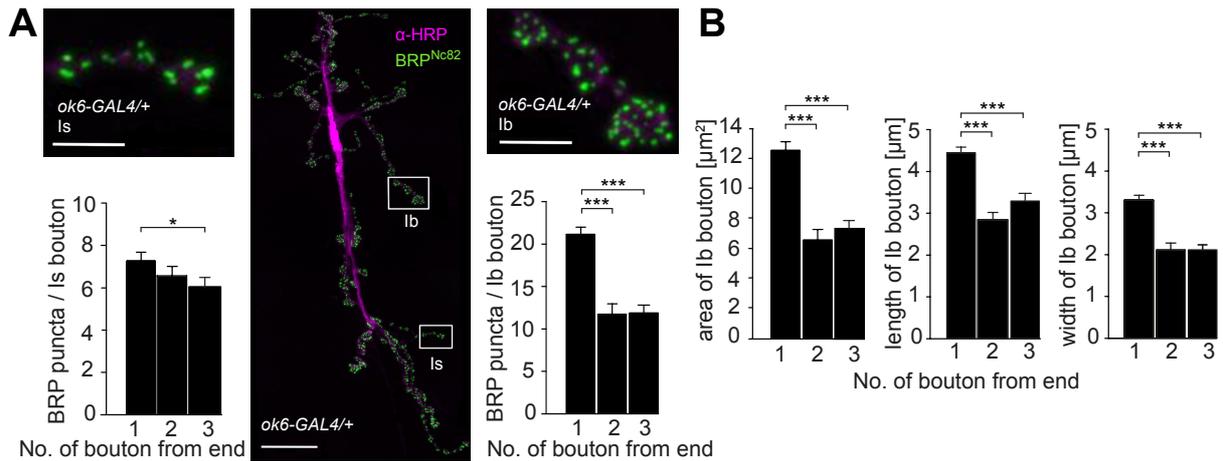


Abb. 7: Räumliche Differenzierung glutamaterger Endigungen

A Wildtyp NMJ gefärbt mit Antikörpern gegen präsynaptische Membranen (α -HRP, magenta) und Bruchpilot (BRP^{Nc82} , grün). Markierung der jeweils letzten drei lb und ls Boutons eines Astes und vergrößerte Darstellung. Die Anzahl der Bruchpilot-Punkte pro Bouton steigt bei ls zum distalen hin leicht an ($p = 0,026$; $n = 38$ ls Boutons). Bei lb Boutons besitzt der distale deutlich mehr Bruchpilot-Punkte als weiter proximale gelegene (jeweils $p < 0,001$; $n = 98, 38$ und 38 lb Boutons).

B Fläche, Länge und Breite der letzten drei lb Boutons. Der distale Bouton zeigt in allen drei Parametern höhere Werte als weiter proximale (jeweils $p < 0,001$). Skala 2 und $20 \mu\text{m}$ (**A**).

unterscheiden sich also deutlich, wobei in dieser Arbeit von nun an in erster Linie lb Boutons betrachtet werden.

Funktioneller Gradient Um proximale und distale Boutons auch auf funktionelle Unterschiede zu prüfen wurden selektive fokale Ableitungen durchgeführt (Abb. 8 und Tabelle 6). Mit fokalen Elektroden wurden die postsynaptischen Ströme distaler und proximaler lb Boutons abgeleitet. Zur Charakterisierung synaptischer Funktion sind neben der Amplitude die Anstiegszeit, Abfallszeitkonstante und synaptische Latenz wichtige Parameter. Ihre jeweilige Interpretation ist nicht ganz einfach. Für Anstiegszeit und Abfallszeitkonstante sind neben der Synchronizität einzelner Fusionsereignisse auch die Diffusion von Glutamat im synaptischen Spalt und die Komposition der postsynaptischen Glutamatrezeptoren entscheidend. Wie bereits in Abschnitt 3.1 erwähnt, wird die Zeit zwischen Ankommen des Aktionspotentials und Beginn des postsynaptischen Stroms als Latenz bezeichnet. Diese ist im Unterschied zur Amplitude auch bei Veränderung der extrazellulären Calcium- oder Kalium-Ionenkonzentration, des pH-Werts oder der Stimulationsfrequenz recht stabil (Katz &

Ergebnisse

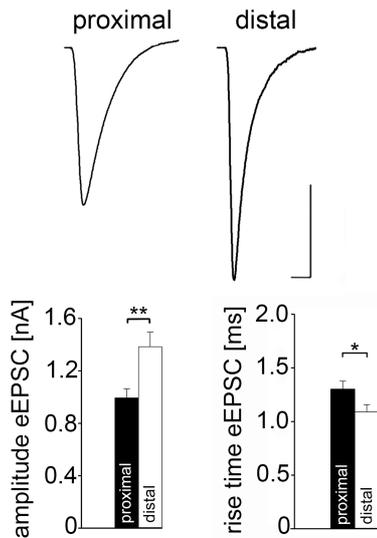


Abb. 8: Funktionelle Differenzierung von Wildtyp-Synapsen

Zehn repräsentative, gemittelte nervenevozierte EPSCs aufgenommen mit einer fokalen Elektrode von einem proximalen und einem distalen Bouton im Wildtyp sowie die mittlere eEPSC-Amplitude und -Stromanstiegszeit \pm Standardfehler für die Lokalisationen. Distale Boutons zeigen größere ($p = 0,003$) und schnellere ($p = 0,03$) synaptische Ströme als proximale ($n = 13$ distale und 20 proximale Boutons). Skala 1 ms und 0,5 nA.

Miledi, 1965b; Datyner & Gage, 1980). Jedoch unterliegt die Latenz temperaturabhängigen Änderungen. In den vorliegenden Messungen zeigten distale Boutons größere Stromamplituden und schnellere Stromanstiegszeiten als proximale. Abfallszeitkonstante und Latenz der Ströme unterschieden sich nicht. Außerdem wurden die Amplituden zweier aufeinanderfolgender, postsynaptischer Antworten im Abstand von 30 Millisekunden gemessen. Durch Division von zweiter durch erste Amplitude erhält man die sogenannte Doppelpulsratio (paired pulse ratio, PPR), die als Maß für die Kurzzeitplastizität von Synapsen gilt. Ist diese > 1 und damit die zweite Antwort größer als die erste, so spricht man von Bahnung. Ist hingegen die erste Antwort größer, liegt synaptische Depression vor (vgl. 3.1). Die Doppelpulsratio proximaler und distaler Ib Boutons unterschieden sich nicht.

Die geschilderten Unterschiede von Bouton-Aufbau und -Verhalten deuten darauf hin, dass eine strukturelle und funktionelle Differenzierung im Verlauf des MN6/7-Ib-Motoneurons erfolgt. Die beschriebene Charakterisierung der Wildtyp-Synapse ist Voraussetzung für die Einordnung der im Folgenden dargestellten Ergebnisse. Weitere Aspekte zur Einordnung des ersten Abschnitts der Ergebnisse finden sich in der Diskussion (vgl. 6.1). Die folgenden Experimente sollen Einblicke in die Entstehung synaptischer Differenzierung und Plastizität geben. Dabei wird zunächst die Funktion des Aktive Zonen Proteins RIM beleuchtet werden (5.2 bis 5.4). Anschließend wird die Rolle des Calciumsensors Synaptotagmin und der T-bar-Komponente Bruchpilot für die Differenzierung untersucht werden (5.5 und 5.6).

5.2 Mutation eines hochkonservierten Proteinmotivs

CORD7 Mutation Vor einigen Jahren wurde man auf eine Mutation im Aktive Zonen Protein RIM aufmerksam (Sisodiya et al., 2007). Bei einer blinden Patientengruppe wurde eine autosomal-dominant vererbte, als CORD7 (cone rod dystrophy type 7) bezeichnete Punktmutation auf Chromosom 6q14 festgestellt (Johnson et al., 2003). Ein Basenaustausch (Guanin zu Adenin) führt zum Aminosäureaustausch Arginin zu Histidin an Position 844 innerhalb der C₂A-Domäne von RIM. Kognitive Testung der Familie anhand von Zahlenspannweite (digit span) und verbalem Intelligenzquotient (VIQ) lieferten erstaunliche Ergebnisse. Abbildung 9 zeigt den aus Sisodiya et al. (2007) modifizierten Familienstammbaum. In beiden Parametern erreichten die Mutationsträger höhere Testwerte als ihre gesunden Verwandten (Zahlenspannweite 15 ± 2 versus 10 ± 2 , VIQ 127 ± 15 versus 99 ± 10 , jeweils Mittelwerte \pm SEM für betroffene und nicht-betroffene Individuen). Absolute Höchstwerte der Familie erzielten die beiden Brüder in der dritten Generation. Sie erreichten VIQ-Werte von 150 bzw. 146. Nicht-Träger der CORD7 Mutation wiesen allesamt durchschnittliche Testergebnisse auf. Ebenso zeigte der Vergleich mit einer blinden Kontrollgruppe, dass nicht die Blindheit selbst die erhöhten Testwerte erklären kann (Sisodiya et al., 2007).

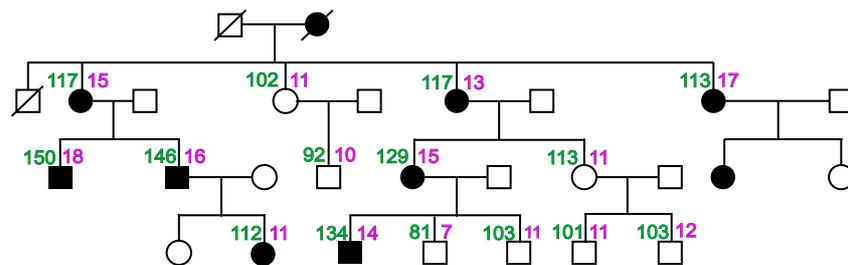


Abb. 9: Stammbaum einer Familie mit CORD7 Mutation

Vier-Generationen Stammbaum einer britischen Familie mit der autosomal-dominant vererbten CORD7-Punktmutation. Schwarze Symbole stehen für erkrankte Individuen, weiße für gesunde und Kästchen kennzeichnen Männer und Kreise Frauen. Durchgestrichene Symbole markieren zum Untersuchungszeitpunkt verstorbene Personen. Einzelwerte für den verbalen IQ (VIQ, grün) und die Zahlenspannweite (magenta) sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben (modifiziert aus Sisodiya et al., 2007).

Ergebnisse

Aus früheren Arbeiten in der Maus war bekannt, dass RIM eine zentrale Rolle bei der Ausbildung synaptischer Kurz- und Langzeitplastizität spielt (Schoch et al., 2002; Castillo et al., 2002) und wichtig für die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Lernen und Gedächtnis ist (Powell et al., 2004). Die Studien wiesen auf eine prinzipielle Bedeutung von RIM für die Differenzierung von Synapsen hin, ließen aber keine Aussagen über die Funktion einzelner Domänen zu.

Veränderte Calciumströme C-terminale Bereiche von RIM interagieren mit präsynaptischen, spannungsgesteuerten Calciumkanälen (Hibino et al., 2002; Kiyonaka et al., 2007; Uriu et al., 2010). Miki et al. (2007) untersuchten den Einfluss der CORD7 Mutation auf Calciumströme in Zellkultur. Es zeigte sich, dass P/Q-Typ Kanäle vermehrt aktiviert wurden und größere Ströme zeigten. L-Typ Kanäle hingegen wurden durch die Mutation verstärkt inaktiviert. Um den Effekt der Punktmutation zu charakterisieren wurden die folgenden Analysen an einer bestimmten Synapse im Tiermodell durchgeführt.

RIM-Domänen Die CORD7 Mutation liegt in der C₂A-Domäne von RIM. Neben der putativen direkten Interaktion mit Calciumkanälen gibt es Hinweise für eine Bindung an das Vesikelprotein Synaptotagmin und das SNARE-Protein SNAP-25 (Coppola et al., 2001). RIM besitzt weitere Domänen, die mit verschiedenen Aktiven Zonen Komponenten interagieren (Abb. 10A). Der N-terminale Zinkfinger interagiert mit den Vesikelproteinen Rab3 und Rab27 (Wang et al., 1997; Takao-Rikitsu et al., 2004). Außerdem heterodimerisiert RIM hier mit der C₂A-Domäne von Munc13 und lokalisiert es so an der Aktiven Zone (Dulubova et al., 2005; Andrews-Zwilling et al., 2006). Für die PDZ-Domäne wurden Interaktionen mit Proteinen der ELKS/CAST-Familie beschrieben, zu der in der Fliege Bruchpilot gehört (Ohtsuka et al., 2002; Wang et al., 2002). Außerdem bindet sie an präsynaptische Calciumkanäle vom P/Q- und N-Typ (Kaeser et al., 2011). Die PxxP-Domäne interagiert mit RIM-binding protein und verankert RIM somit weiter C-terminal am Calciumkanal (Hibino et al., 2002). Mit der C₂B-Domäne bindet RIM an α -Liprin und Synaptotagmin. Auch die Modulation von Calciumkanälen wird für diese Domäne diskutiert (Schoch et al., 2002; Uriu et al., 2010).

Ergebnisse

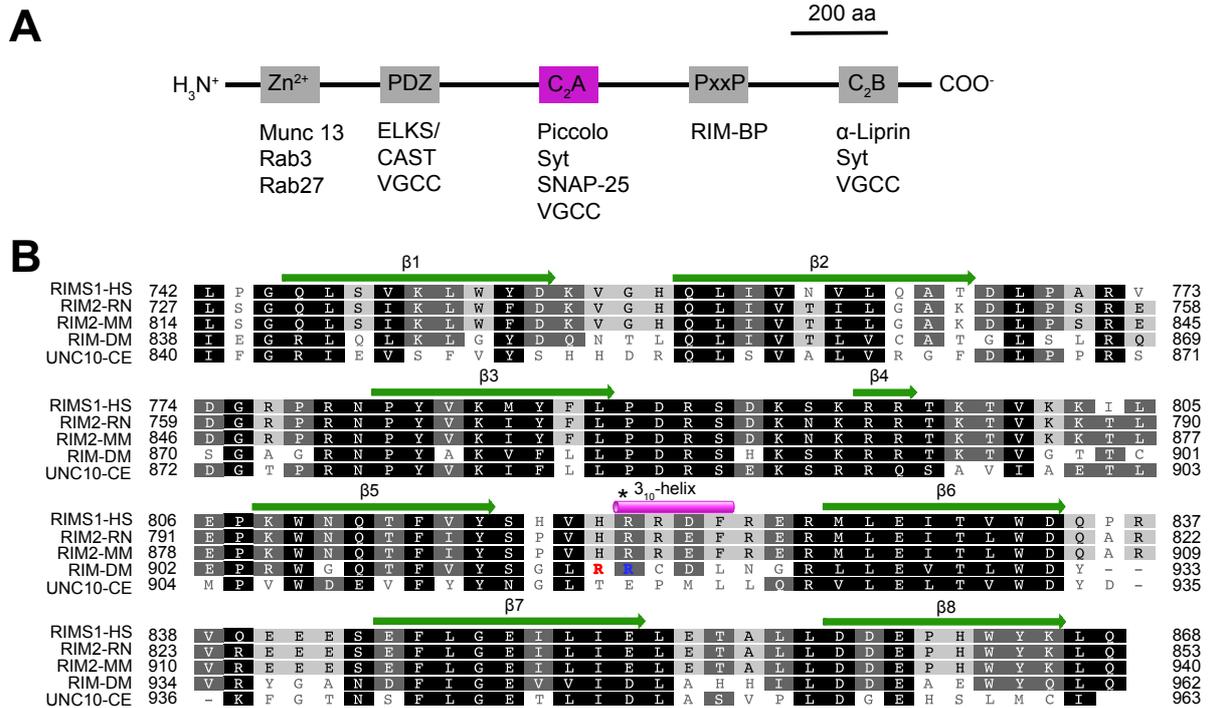


Abb. 10: RIM-Domänen und Sequenz der C₂A-Domäne

A Skizzierung der RIM-Domänen. Grau dargestellt der N-terminale Zinkfinger, PDZ- und C₂B-Domäne sowie PxxP-Sequenz und die betroffene C₂A-Domäne in magenta. Darunter sind putative Interaktionspartner angegeben.

B Sequenzalignment der RIM C₂A-Domänen verschiedener Spezies. Die Länge der Domäne beträgt 127 Aminosäuren bei Mensch (RIMS1_HS), Ratte (RIM2_RN) und Maus (RIM2_MM), 125 bei der Fliege (RIM_DM) und 124 bei *C. elegans* (UNC10_CE). Die Positionen der 3₁₀ Helix und der acht β-Faltblätter sind markiert (magenta und grüne Balken). Die mutierten Arginine sind in rot (R915H) und blau (R916H) hervorgehoben und der Stern markiert die CORD7-Position. GenBank-Einträge: Q86UR5 für RIMS1_HS, AF199329_1 für RIM2_RN, Q99NE5 für RIM2_MM, für RIM_DM siehe Graf et al. (2012) und Q22366 für UNC10_CE.

Konservierung des RR-Motivs Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der C₂A-Domäne verschiedener Spezies zeigte eine insgesamt hohe Konservierung (Abb. 10B). Die sogenannte 3₁₀ Helix besteht aus vier benachbarten Aminosäuren. Die CORD7 Mutation entspricht im menschlichen Protein dem ersten Arginin dieser Helix. In dessen direkter Nachbarschaft befindet sich ein zweiter Arginin-Rest. Beide Arginine, zusammengefasst als Arginin-Pärchen oder RR-Motiv, sind von Säuger bis Fliege, nicht aber im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* konserviert. Die humane Mutation kommt in diesem Vergleich an Position R820 zu liegen, obwohl die initiale Publikation Position R844 beschrieb (Johnson et al., 2003). Eine Überprüfung der

Ergebnisse

cDNA Daten anhand der Splice-Varianten des humanen RIM1 ergab, dass diese Verschiebung durch ein alternatives Start-Codon zu erklären ist.

Expression in *Drosophila* Durch Mutation der beiden Arginine des RR-Motivs in der C₂A Domäne sollte ihre Funktion in unserem Präparat getestet werden. Zu diesem Zweck wurden Fliegenstämme hergestellt, die entweder die wildtypische RIM cDNA exprimierten oder RIM mit der Mutation des ersten (R915H), des zweiten (R916H) oder beider Arginine (R915H, R916H). Die Genotypen werden im Folgenden als *RIM^{wt}*, *RIM^{R915H}*, *RIM^{R916H}* und *RIM^{R915H, R916H}* bezeichnet (grau, rot, blau und violett in Abb. 11-15). Um zu testen, ob das transgene RIM weiterhin Aktive Zonen ansteuert, wurden außerdem RIM-Konstrukte mit einer N-terminal lokalisierten EGFP-Markierung (enhanced green fluorescent protein) hergestellt. Färbungen von neuromuskulären Synapsen mit anti-EGFP Antikörper zeigten eine Kollokalisierung mit Bruchpilot und damit die RIM-Expression in der präsynaptischen Endigung.

5.3 RIM C₂A-Domäne beeinflusst synaptische Transmission

Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) Um die funktionelle Auswirkung der Mutationen zu testen, wurden TEVC-Messungen bei 1,0 mM extrazellulärer Calciumkonzentration durchgeführt (Abb. 11 und Tabelle 3B). Intrazelluläre Ableitungen von Muskel 6 lieferten hierbei die durch Motoneuron-Stimulation hervorgerufenen, postsynaptischen Ströme. Es zeigte sich, dass die *RIM^{R915H}*

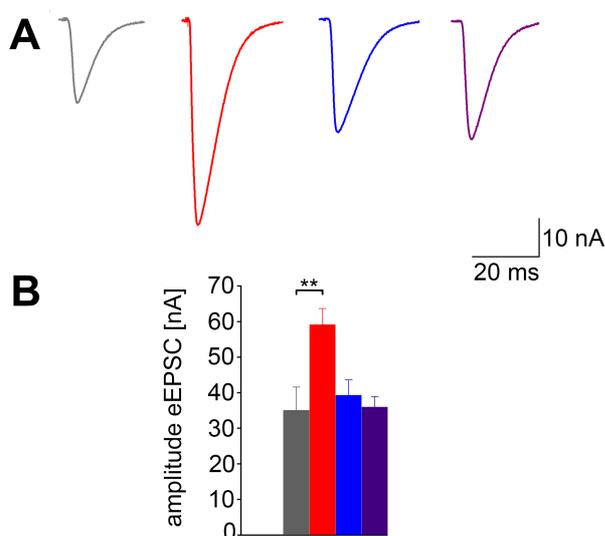


Abb. 11: RIM C₂A-Domäne beeinflusst die synaptische Transmission

A Repräsentative gemittelte eEPSCs gemessen im TEVC-Modus in HL-3 mit 1,0 mM Ca²⁺ bei *RIM^{wt}* (grau), *RIM^{R915H}* (rot), *RIM^{R916H}* (blau) und *RIM^{R915H, R916H}* (violett).

B Mittelwerte ± Standardfehler der eEPSC-Amplituden der vier Genotypen. Die Überexpression der *RIM^{R915H}* Punktmutation vergrößert die Amplitude im Vergleich zu *RIM^{wt}* (p = 0,004; n = 11, 11, 12 und 12).

Ergebnisse

Mutation die Strom-Amplituden im Vergleich zu RIM^{wt} vergrößerte. Die Amplituden von RIM^{R916H} und $RIM^{R915H, R916H}$ waren hingegen nicht verändert. Die Kinetik der Ströme wurde durch keine der Mutationen beeinflusst und auch die Doppelpulsratio war unverändert. Die spontanen postsynaptischen Ströme wiesen hinsichtlich Frequenz, Amplitude und Kinetik keine signifikanten Unterschiede auf (Tabelle 3A).

Fokale Ableitungen Um die räumliche und zeitliche Auflösung der Messungen zu erhöhen (vgl. 4.2) wurden im nächsten Schritt fokale Ableitungen durchgeführt. Damit war es möglich die postsynaptischen Ströme von Is und Ib Boutons zu trennen und durch gezieltes, proximal-distales Ableiten Zugang zur räumlichen Differenzierung zu erlangen. Durch niederfrequente Nervenstimulation wurden wiederum Aktionspotentiale im Axon ausgelöst, jedoch diesmal postsynaptische Ströme von einzelnen Boutons abgeleitet (Abb. 12 und Tabelle 3C). Die fokale

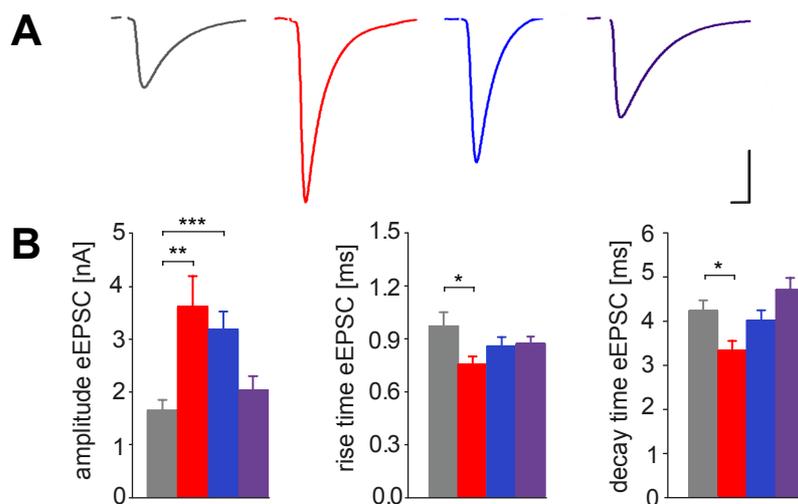


Abb. 12: Vergrößerte und beschleunigte Ströme durch RIM-Mutationen

A Repräsentative gemittelte eEPSCs gemessen in HL-3 mit 1,0 mM Ca^{2+} mit einer fokalen Elektrode in RIM^{wt} (grau), RIM^{R915H} (rot), RIM^{R916H} (blau) und $RIM^{R915H, R916H}$ (violett) Larven.

B Mittelwerte ± SEM für eEPSC-Amplitude, -Stromanstiegszeit und -Stromabfallszeitkonstante für die vier Genotypen. Die Punktmutationen RIM^{R915H} und RIM^{R916H} vergrößern die Amplitude des synaptischen Stroms im Vergleich zu RIM^{wt} ($p = 0,009$ und $< 0,001$). RIM^{R915H} beschleunigt zusätzlich Stromanstiegszeit ($p = 0,011$) und Abfallszeitkonstante ($p = 0,014$). Die Doppelmutation $RIM^{R915H, R916H}$ normalisiert den Strom in Amplitude und Kinetik. $n = 11, 10, 10$ und 10 . Skala 2 ms, 1 nA (**A**).

Ergebnisse

Elektrode wurde hier ohne direkte optische Darstellung der Boutons platziert (vgl. Abb. 8 und 19 für selektiv proximal-distale Ableitungen). Die RIM^{R915H} Mutation vergrößerte wie zuvor die Stromamplitude im Vergleich zu RIM^{wt} . Zusätzlich verkürzte sie Stromanstiegszeit und Abfallszeitkonstante. Auch Larven mit der RIM^{R916H} Mutation zeigten größere synaptische Antworten als RIM^{wt} . Ihre Kinetik war jedoch unverändert. Erstaunlicherweise wurden Amplitude und Kinetik postsynaptischer Ströme durch die Doppelmutation $RIM^{R915H, R916H}$ wieder normalisiert und keiner der gemessenen Parameter bei diesen Synapsen unterschied sich von RIM^{wt} . Wie zuvor bei den TEVC-Messungen veränderte keine der drei RIM-Mutationen die Doppelpulsratio.

Veränderte Calciumabhängigkeit Da es Hinweise gab, dass die CORD7 Mutation die Ströme präsynaptischer Calciumkanäle beeinflusst (Miki et al., 2007; vgl. 5.2), wurden die fokalen Messungen bei niedrigem, extrazellulären Calcium (0,5 mM) wiederholt (Abb. 13 und Tabelle 3D). Es zeigte sich, dass die Amplitude der

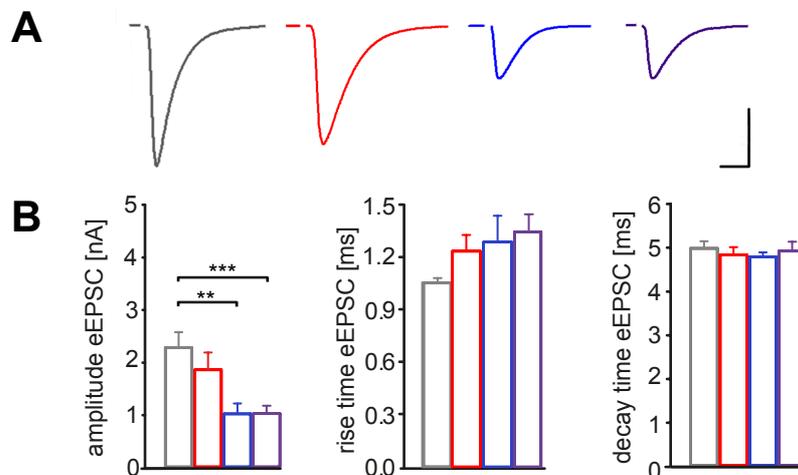


Abb. 13: Calciumabhängiger Effekt der C₂A-Mutationen

A Repräsentative gemittelte eEPSCs gemessen in HL-3 mit 0,5 mM Ca^{2+} mit einer fokalen Elektrode bei RIM^{wt} (grau), RIM^{R915H} (rot), RIM^{R916H} (blau) und $RIM^{R915H,R916H}$ (violett) Larven.

B Mittelwerte \pm SEM von eEPSC-Amplitude, -Stromanstiegszeit und -Abfallszeitkonstante für die vier Genotypen. RIM^{R915H} führt hier zu unveränderten und die RIM^{R916H} und $RIM^{R915H,R916H}$ Mutationen zu kleineren Amplituden verglichen mit RIM^{wt} ($p = 0,006$ und $< 0,001$). Die Kinetik ist unbeeinflusst. $n = 10, 6, 6$ und 10 . Skala 2 ms, 1 nA (**A**).

Ergebnisse

postsynaptischen Ströme bei RIM^{R915H} Synapsen nun gleich groß wie bei RIM^{wt} war. Die Amplituden von RIM^{R916H} und $RIM^{R915H, R916H}$ Synapsen waren kleiner als bei RIM^{wt} . Die Kinetik der synaptischen Antworten war bei allen vier Genotypen gleich. Hinsichtlich der Doppelpulsratio unterschieden sie sich, wie bereits in den Messungen zuvor, nicht.

Insgesamt zeigen die geschilderten Experimente, dass die RIM^{R915H} und RIM^{R916H} Mutationen die Funktion neuromuskulärer Synapsen beeinflusst.

5.4 Veränderte präsynaptische Organisation durch RIM-Mutationen

Morphologie der NMJ Mit Immunfluoreszenz-Färbungen wurde überprüft, ob die RIM-Mutationen auch die Struktur der Synapsen verändern. Zunächst wurde die Anzahl Aktiver Zonen pro NMJ bei allen Genotypen verglichen. Abbildung 14 A zeigt eine Beispielfärbung einer RIM^{R915H} NMJ. Die Anzahl Aktiver Zonen pro NMJ unterschied sich bei den Einzelmutationen nicht von der bei RIM^{wt} . Bei der Doppelmutation $RIM^{R915H, R916H}$ war die Anzahl leicht erhöht (Abb. 14B, RIM^{wt} 692 ± 37 , RIM^{R915H} 708 ± 36 , RIM^{R916H} 769 ± 38 , $RIM^{R915H, R916H}$ 817 ± 42 , $n = 17, 17, 20$ und 20 NMJs).

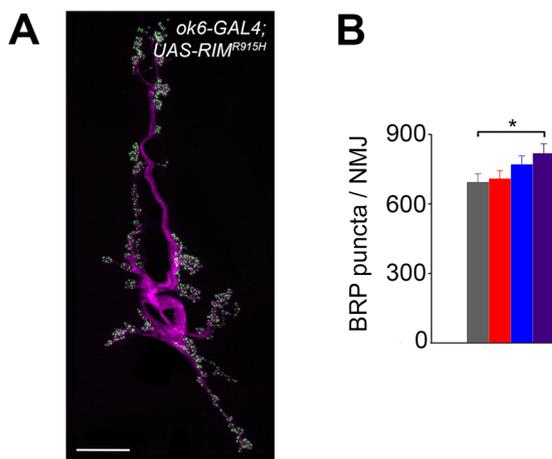


Abb. 14: Morphologie der NMJ bei Überexpression der RIM-Mutationen

A Immunfluoreszenz-Färbung einer RIM^{R915H} NMJ mit Antikörpern gegen präsynaptische Membranen (α -HRP, magenta) und Bruchpilot (BRP^{Nc82} , grün).

B Die Quantifizierung der Bruchpilot-Punkte pro NMJ bei allen RIM-Mutanten (RIM^{wt} grau, RIM^{R915H} rot, RIM^{R916H} blau und $RIM^{R915H, R916H}$ violett) zeigt einen leichten Anstieg bei den Doppelmutanten $RIM^{R915H, R916H}$ im Vergleich zu RIM^{wt} ($p = 0,037$) und keine Veränderung bei den Einzelmutationen. $n = 17, 17, 20$ und 20 NMJs. Skala $20 \mu m$ (A).

Differenzierte Bouton-Analyse Die Bouton-Analyse im Verlauf eines Axons bei Wildtyp-Larven von *Drosophila* hatte gezeigt, dass Unterschiede in der Differenzierung bestehen (vgl. 5.1). Deswegen wurden analog zu diesen Analysen

Ergebnisse

die Boutons der neuromuskulären Synapsen mit den RIM-Mutationen untersucht (Abb. 15 und Tabelle 4). Es zeigte sich, dass bei RIM^{R915H} die Anzahl Aktiver Zonen in distalen Ib Boutons geringer war als bei RIM^{wt} (Abb. 15A). Bei RIM^{R916H} und $RIM^{R915H, R916H}$ war dies nicht der Fall. Außerdem wurde die Größe distaler Ib Boutons aller Genotypen verglichen (Abb. 15C). Die Einzelmutationen RIM^{R915H} und RIM^{R916H} zeigten kleinere und kürzere Boutons als RIM^{wt} . Die Doppelmutation $RIM^{R915H, R916H}$ veränderte Fläche und Länge nicht, verbreiterte die Boutons

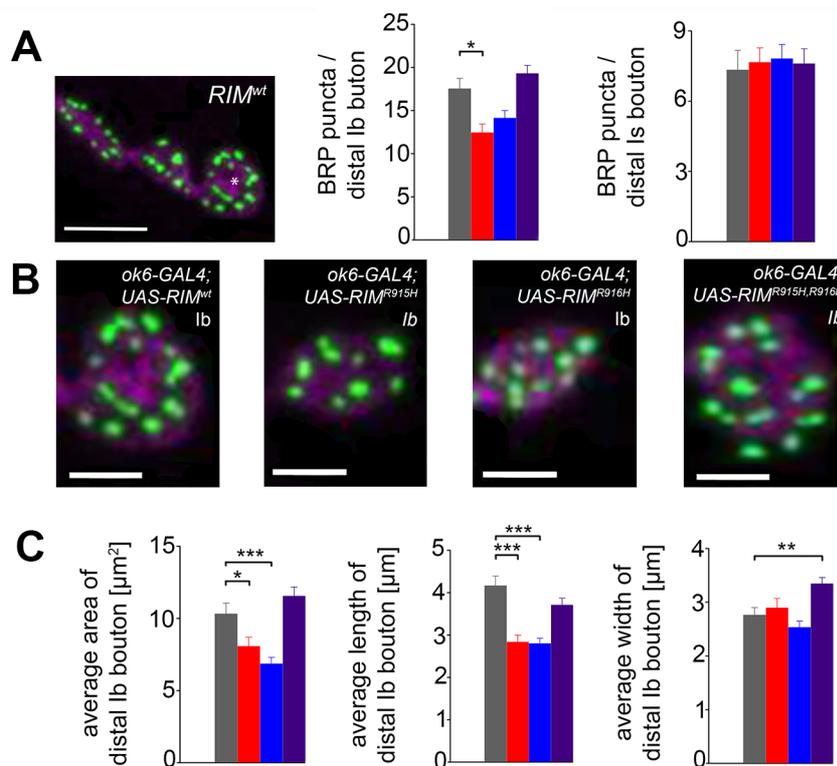


Abb. 15: RIM-Punktmutationen verändern präsynaptische Organisation

A Repräsentative Darstellung der letzten drei Ib Boutons von RIM^{wt} gefärbt mit α -HRP (magenta) und Brp^{Nc82} (grün) Antikörper. Mittelwerte \pm SEM der Bruchpilotpunkte in den distalen Ib und Is Boutons bei RIM^{wt} (grau), RIM^{R915H} (rot), RIM^{R916H} (blau) und $RIM^{R915H, R916H}$ (violett). Distale Ib Bouton von RIM^{R915H} besitzen weniger Aktive Zonen als die von RIM^{wt} ($p = 0,003$).

B Repräsentative Darstellung distaler Ib Boutons für die vier Genotypen.

C Mittelwerte \pm SEM für Fläche, Länge und Breite distaler Ib Boutons gemessen anhand des α -HRP-Signals. RIM^{R915H} und RIM^{R916H} Boutons sind kleiner ($p = 0,005$ und $< 0,001$) und kürzer (jeweils $p < 0,001$) als die von RIM^{wt} . Die Doppelmutation zeigt leicht verbreiterte distale Ib Boutons ($p = 0,002$). $n = 67, 57, 69$ und 85 distale Ib Boutons und $n = 15, 23, 26$ und 27 distale Is Boutons. Skala $5 \mu\text{m}$ (**A**) und $2 \mu\text{m}$ (**B**).

allerdings leicht. Die gleichartige Analyse der Is Boutons ergab keine Unterschiede - Anzahl Aktiver Zonen und Boutongrößen waren hier bei RIM^{wt} und den Mutationen gleich. Die RIM C₂A-Domäne moduliert demnach neben synaptischer Funktion auch Organisation und Struktur der Boutons. Das Arginin-Pärchen hat augenscheinlich entscheidenden Einfluss auf die präsynaptische Differenzierung. Auf die molekulare Interpretation dieser Befunde und zukünftige Experimente für ein weitergehendes Verständnis wird im Rahmen der Diskussion eingegangen (vgl. 6.2 und 6.4).

Aus den geschilderten Analysen der Immunfluoreszenz-Färbungen ist ersichtlich, dass RIM die Verteilung von Bruchpilot an der Synapse verändert. Sämtliche Ergebnisse der geschilderten Abschnitte 5.3 und 5.4 sind den Tabellen 3 und 4 am Ende des Ergebnisteils (ab Seite 40) zu entnehmen. Die nun folgenden Experimente zielten darauf ab, die grundsätzlichen Mechanismen der Entstehung synaptischer Differenzierung besser zu verstehen. Anstelle von RIM stand nun Bruchpilot selbst im Mittelpunkt der Analyse.

5.5 Molekulare Mechanismen synaptischer Differenzierung

AZ-Komponente Bruchpilot Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist das Aktive Zonen Protein Bruchpilot ein wesentlicher Bestandteil der elektronendichten Projektionen in *Drosophila* (vgl. 3.2). Das große, filamentöse Protein ist für die Anordnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle und für eine normale synaptische Transmission essentiell (Kittel et al., 2006). Inwieweit Bruchpilot auch die proximal-distale Differenzierung der neuromuskulären Synapsen beeinflusst, ist hingegen unklar. In den vorherigen Experimenten wurde die Anzahl der Bruchpilot-Punkte pro NMJ oder Bouton als Marker verwendet, um quantitative Veränderungen Aktiver Zonen zu messen (Abb. 14 und 15). Im Folgenden wurde der direkte Einfluss des Proteins auf die synaptische Differenzierung untersucht. Dafür wurden zunächst Synapsen von Bruchpilot-Nullmutanten verwendet, deren Aktive Zonen ohne Bruchpilot funktionieren. Als anderes Extrem wurden Synapsen der Rab3-Nullmutante genutzt, die wenige Aktive Zonen mit sehr viel Bruchpilot besitzen (Graf et al., 2009). In diesen Mutanten sind die postsynaptischen Ströme von Muskel 6 bei niederfrequenter Stimulation im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Es ist unklar, ob und wie sich der Ablauf der synaptischen Signalkaskade bei Aktiven Zonen ohne und mit viel Bruchpilot molekular unterscheidet. An Wildtyp Aktiven Zonen ist die Funktion des Sensorproteins Synaptotagmin essentiell, das durch Bindung von Calcium-Ionen

Ergebnisse

die Vesikelfusion fördert (DiAntonio et al., 1993; Fernández-Chacón et al., 2001). Um zu testen, inwieweit die Funktion Aktiver Zonen mit unterschiedlichem Bruchpilot-Gehalt von Synaptotagmin abhängt, wurde eine Synaptotagmin-RNAi-Linie im Wildtyp und in Bruchpilot- und Rab3-Nullmutanten exprimiert. Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen Synaptotagmin zeigten, dass die Expression der Synaptotagmin-RNAi-Linie das Proteinlevel in den präsynaptischen Boutons reduziert und dass in der Nullmutante kein Synaptotagmin mehr nachweisbar ist (Abb. 16). Im Folgenden wurde die synaptische Funktion von Bruchpilot- und Rab3-Nullmutanten mit und ohne Reduktion des Synaptotagmin-Levels mit TEVC untersucht (Abb. 17 und Tabelle 5).

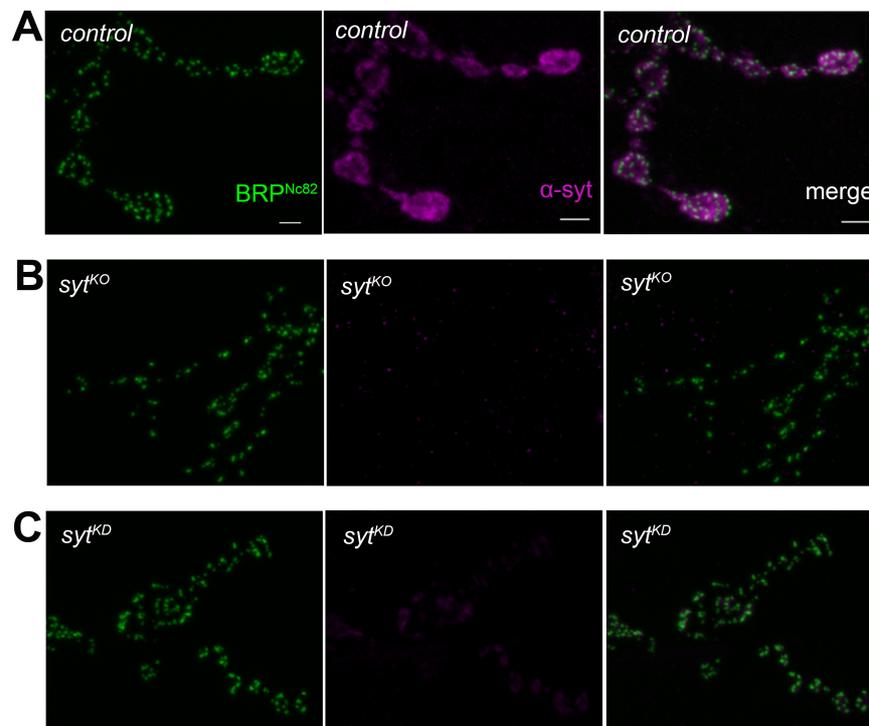


Abb. 16: Synaptotagmin-RNAi reduziert präsynaptisches Proteinlevel

A Ausschnitt einer wildtyp NMJ (*control*) auf Muskel 6/7 gefärbt mit Antikörpern gegen Bruchpilot (BRP^{Nc82}, grün) und Synaptotagmin (α-Syt, magenta).

B Ausschnitt einer NMJ auf Muskel 6/7 einer Synaptotagmin-Nullmutante (*syt^{KO}*).

C Ausschnitt einer NMJ auf Muskel 6/7 von einer Larve mit Synaptotagmin-RNAi-Expression (*syt^{KD}*). Skala 2 μm (A-C).

Ergebnisse

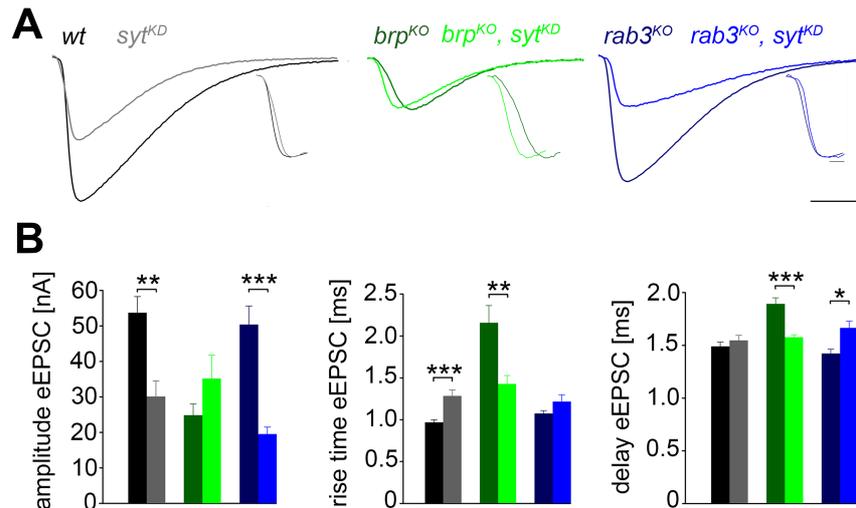


Abb. 17: Bruchpilot-Mutanten brauchen kein Synaptotagmin

A eEPSC-Beispielspuren gemessen im Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Modus in 1,0 mM Ca^{2+} von Wildtyp (*wt*, schwarz), Bruchpilot-Nullmutante (*brp^{KO}*, dunkelgrün) und Rab3-Nullmutante (*rab3^{KO}*, dunkelblau) und jeder Genotyp mit zusätzlicher Synaptotagmin-RNAi-Expression (*syt^{KD}* grau, *brp^{KO}, syt^{KD}* hellgrün und *rab3^{KO}, syt^{KD}* hellblau). Normalisierte Beispielspuren versetzt.

B Mittelwerte \pm SEM für eEPSC-Amplitude, -Stromanstiegszeit und synaptische Latenz für die sechs Genotypen. Im Wildtyp führt die Synaptotagmin-RNAi zur Amplitudenreduktion und verlängerten Stromanstiegszeit ($p = 0,002$ und $< 0,001$, $n = 17$ *wt* und 11 *syt^{KD}*). In Bruchpilot-Nullmutanten hingegen bleibt die Amplitude unbeeinflusst und Stromanstiegszeit und Latenz werden verkürzt ($p = 0,008$ und $< 0,001$, $n = 11$ *brp^{KO}* und 12 *brp^{KO}, syt^{KD}*). Im Gegensatz dazu führt die RNAi-Expression in der Rab3-Nullmutante zur drastischen Amplitudenreduktion und verlängerten Latenz ($p < 0,001$ und $= 0,013$, $n = 10$ *rab3^{KO}* und 14 *rab3^{KO}, syt^{KD}*). Skala 5 ms und 10 nA bzw. 1 ms für normalisierte Beispielspuren (**A**).

Synaptotagmin-Reduktion in der Bruchpilot-Nullmutante Die Expression der Synaptotagmin-RNAi im Wildtyp verkleinerte die Amplitude postsynaptischer Ströme und verlängerte die Stromanstiegszeit ohne Latenz oder Abfallszeitkonstante zu beeinflussen. Die Doppelpulsratio wurde wie erwartet verstärkt (Abb. 17 und Tabelle 5, Saraswati et al., 2007). Im Gegensatz dazu veränderte die Reduktion in der Bruchpilot-Nullmutante die Amplitude nicht. Stromanstiegszeit und synaptische Latenz wurden verkürzt und dem Wildtyp-Niveau angenähert. Abfallszeitkonstante und Doppelpulsratio waren unverändert (Tabelle 5). Die Funktion Bruchpilot-freier Aktiver Zonen wurde also durch Reduktion von Synaptotagmin verbessert.

Ergebnisse

Bruchpilot-reiche Aktive Zonen brauchen Synaptotagmin Im nächsten Schritt wurde die Synaptotagmin-RNAi in der Rab3-Nullmutante exprimiert (Abb. 17 und Tabelle 5). Die Amplitude postsynaptischer Ströme wurde dadurch um mehr als 50 % reduziert und die Latenz verlängert. Stromanstiegszeit und Abfallszeitkonstante waren unverändert. Die Doppelpulsratio hingegen nahm deutlich zu. Aktive Zonen mit viel Bruchpilot reagierten also hochempfindlich auf eine Proteinlevel-Reduktion des Calciumsensors.

Daraufhin wurde mit Immunfluoreszenz-Färbungen geprüft, ob die Synaptotagmin-Reduktion auch strukturelle Auswirkungen auf Bruchpilot-reiche Aktive Zonen hatte. Dafür wurde zunächst die Anzahl der Bruchpilot-Punkte pro NMJ in Wildtyp-Larven und Rab3-Nullmutanten jeweils mit und ohne Expression der Synaptotagmin-RNAi-Linie gezählt (Abb. 18A). Durch die RNAi-Expression wurde die Anzahl der Punkte

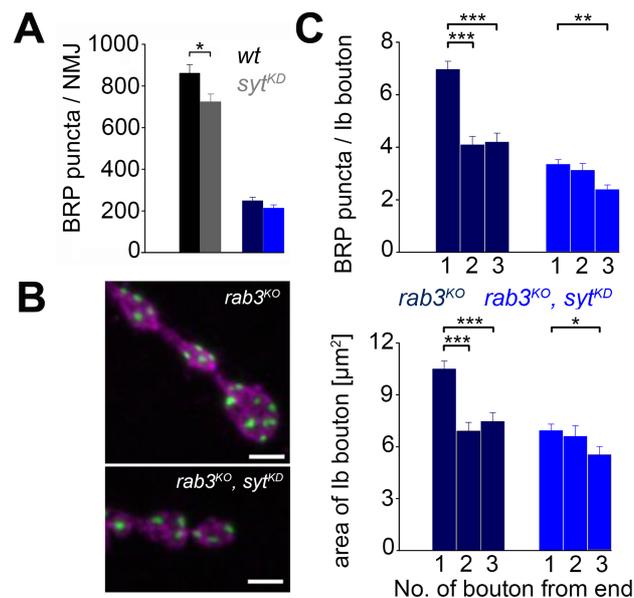


Abb. 18: Strukturelle Plastizität von Rab3-Nullmutanten

A Mittelwerte \pm SEM für die Anzahl der Bruchpilot-Punkte pro NMJ bei *wt* (schwarz), *syt^{KD}* (grau), *rab3^{KO}* (dunkelblau) und *rab3^{KO}, syt^{KD}* (hellblau). Der *syt^{KD}* reduzierte diese im Vergleich zu *wt* ($p = 0,019$, $n =$ jeweils 16 NMJs).

B Beispielbilder der letzten drei lb Boutons bei *rab3^{KO}* und *rab3^{KO}, syt^{KD}*.

C Quantifizierung der Bruchpilot-Punkte und Fläche in den letzten drei lb Boutons bei *rab3^{KO}* und *rab3^{KO}, syt^{KD}*. Während an *rab3^{KO}* NMJs distale lb Boutons mehr BRP-Punkte haben und größer sind als weiter proximale (jeweils $p < 0,001$), reduziert die Synaptotagmin-RNAi diesen Gradienten ($p = 0,002$ und $0,015$). $n = 117, 57$ und 57 lb Boutons bei *rab3^{KO}* und $110, 60$ und 60 bei *rab3^{KO}, syt^{KD}*. Skala $2 \mu\text{m}$ (B).

Ergebnisse

im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die Expression in der Rab3-Nullmutante veränderte die Anzahl der Bruchpilot-Punkte pro NMJ nicht (*wt* 861 ± 41 , *syt^{KD}* 724 ± 38 , *rab3^{KO}* 249 ± 16 , *rab3^{KO}, syt^{KD}* 213 ± 16 , jeweils $n = 16$). Da die Bedeutung des Calciumsensors an Aktiven Zonen von deren Organisationsstatus abzuhängen schien, ließ sich die Hypothese aufstellen, dass auch Synaptotagmin selbst einen Beitrag zur synaptischen Differenzierung leistet. Deswegen erfolgte analog zu den vorherigen Experimenten die Quantifizierung der Aktiven Zonen in einzelnen Boutons sowie die Vermessung der Boutongrößen entlang beider Axone (Abb. 18 B, C und Tabelle 7 und 8). In der Rab3-Nullmutante enthielten distale Ib Boutons mehr Aktive Zonen als proximale. Durch die Expression der Synaptotagmin-RNAi wurde dieser Gradient abgeschwächt. Ebenso verhielt es sich mit der Boutongröße. Fläche, Länge und Breite waren bei distalen Ib Boutons größer als bei proximalen und durch die Expression der RNAi wurde der Gradient abgeschwächt. Gleichartige Analysen von Is Boutons zeigten keine proximal-distalen Unterschiede in der Differenzierung (Tabelle 7 und 8).

Funktion und Struktur Bruchpilot-reicher Aktiver Zonen werden demnach durch das Vorhandensein von Synaptotagmin in erheblichem Maß beeinflusst. Synaptotagmin selbst scheint die Differenzierung Aktiver Zonen zu beeinflussen. Die geringere Relevanz von Synaptotagmin an einer Bruchpilot-freien Aktiven Zone legt außerdem nahe, dass die Proteine miteinander interagieren. Um diese Hypothesen zu verifizieren, wurden weitere Experimente durchgeführt.

5.6 Zusammenspiel von Bruchpilot und Synaptotagmin

Proximal-distale Differenzierung Die postsynaptischen Ströme proximaler und distaler Ib Boutons im Wildtyp unterscheiden sich in Amplitude und Kinetik (vgl. **5.1**). Es wurde getestet, welchen Einfluss Synaptotagmin auf die Entstehung dieser Differenzierung hat. Dafür wurden fokale Ableitungen von proximal und distal lokalisierten Boutons Synaptotagmin-RNAi-exprimierender Larven durchgeführt (Abb. 19 und Tabelle 6). Gleichzeitig wurde geklärt, ob auch Bruchpilot selbst für die proximal-distale Differenzierung wichtig ist. Deswegen wurden dieselben Messungen auch in Bruchpilot-Nullmutanten durchgeführt. Die postsynaptischen Ströme proximaler und distaler Ib Boutons unterschieden sich bei beiden Genotypen in allen analysierten Parametern nicht. Die funktionelle, synaptische Differenzierung entlang

Ergebnisse

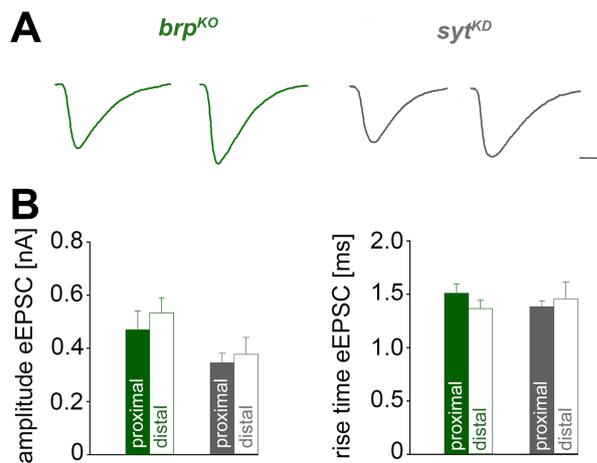


Abb. 19: Funktionelle Differenzierung ohne Bruchpilot und Synaptotagmin

A Zehn repräsentative, gemittelte eEPSCs aufgenommen mit einer fokalen Elektrode von proximalen und distalen Boutons bei *brp^{KO}* (grün) und *syt^{KD}* (grau).

B Mittelwerte \pm SEM für eEPSC-Amplitude und -Stromanstiegszeit proximaler und distaler Boutons bei beiden Genotypen. n = jeweils 13 proximale und 11 distale Boutons. Skala 1 ms und 0.5 nA (**A**).

der MN6/7-Ib-Motoneurone hängt also sowohl von Synaptotagmin, als auch Bruchpilot ab.

Um zu klären, ob dies auch auf strukturellem Niveau gilt, wurden wie bereits in den vorherigen Experimenten Is und Ib Boutons mit Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 20 und Tabelle 7 und 8). In der Bruchpilot-Nullmutante, bei der allein die Vermessung der Boutongrößen möglich ist, zeigte sich, dass Fläche, Länge und Breite distaler Boutons größer waren als die proximaler (Abb. 20A und Tabelle 8, $p < 0.001$ und $= 0.02$ für Länge, $p < 0.001$ und < 0.001 für Breite). An neuromuskulären Synapsen mit reduziertem Synaptotagmin-Level waren die Boutons an jeder Lokalisation gleich groß und besaßen gleich viele Bruchpilot-Punkte (Abb. 20 B-D). Im absoluten Vergleich waren sie viel kleiner als Ib Boutons von Wildtyp-Synapsen und die Anzahl der Bruchpilot-Punkte war massiv reduziert. Gleichartige Analysen der Is Boutons bei beiden Genotypen zeigten wie bereits zuvor keine proximal-distale Differenzierung (Tabelle 7 und 8).

Analyse der Ultrastruktur Aktiver Zonen Die Reduktion von Synaptotagmin störte die morphologische Differenzierung neuromuskulärer Synapsen auf Bouton-Niveau. Um zu testen, ob sie auch die Anordnung von Bruchpilot innerhalb der Aktiven Zonen verändert, wurde ein höchstauflösendes lichtmikroskopisches Verfahren verwendet (Abb. 21). Mit der hier benutzten dSTORM Technik (*direct* Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) wird die XY-Auflösung im Vergleich zum konfokalen Niveau um ein Vielfaches erhöht (Heilemann et al., 2008; van de

Ergebnisse

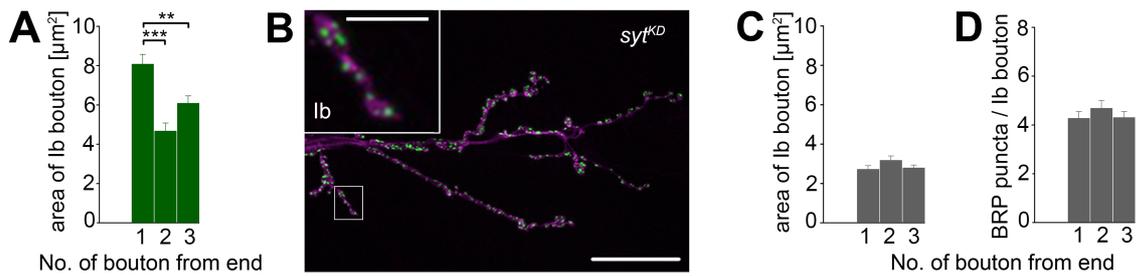


Abb. 20: Morphologische Differenzierung synaptischer Boutons

A Mittelwerte \pm SEM der Boutonflächen bei *brp*^{KO} in den letzten drei Boutons. Distale lb Boutons sind größer als zweit- und drittletzte ($p < 0,001$ und $= 0,003$, $n = 49$, 49 und 49 lb Boutons).

B Beispielausschnitt einer *syt*^{KD} NMJ (α -HRP magenta, BRP grün) mit typischer feiner Verästelung und kleinen Boutons. Die weiße Box illustriert die letzten drei Boutons eines lb-Astes.

C Mittelwerte \pm SEM der Boutonflächen von *syt*^{KD} Larven.

D Mittelwerte \pm SEM der Bruchpilot-Punkte pro Bouton in den letzten drei lb Boutons bei *syt*^{KD} Larven. $n = 125$, 109 und 109 lb Boutons. Skala 20 und $2 \mu\text{m}$ (B).

Linde et al., 2011). Damit ist es möglich eine Aktive Zone nicht nur als Punkt darzustellen, sondern die Anordnung einzelner Proteinfilamente aufzulösen (Ehmann et al., in revision). Es wurden die Aktiven Zonen Synaptotagmin-RNAi exprimierender Larven mit denen vom Wildtyp verglichen. Zur Analyse wurden die jeweils letzten sechs lb Boutons herangezogen und die Anzahl der Bruchpilot-Lokalisationen pro Fläche ausgewertet (Abb. 21A). Im Wildtyp zeigten distale lb Boutons mehr Lokalisationen pro Fläche als weiter proximal gelegene (Abb. 21C, distale 697 ± 41 , $n = 140$, zweitletzte 613 ± 49 , $p > 0.05$, $n = 67$, drittletzte 517 ± 36 , $p = 0.019$, $n = 57$, viertletzte 563 ± 46 , $p > 0.05$, $n = 64$, fünftletzte 543 ± 46 , $p = 0.008$, $n = 69$ und sechstletzte 495 ± 35 , $p < 0.001$, $n = 71$). An Synaptotagmin-reduzierten Aktiven Zonen war die Anzahl der Lokalisationen pro Fläche in allen sechs Boutons gleich (Abb. 21C, distale 796 ± 90 , $n = 46$, zweitletzte 687 ± 61 , $n = 80$, drittletzte 682 ± 65 , $n = 48$, viertletzte 741 ± 91 , $n = 40$, fünftletzte 635 ± 65 , $n = 43$ und sechstletzte 740 ± 71 , $n = 43$, jeweils $p > 0.05$). In allen sechs Boutons gemittelt besaßen Aktive Zonen im Wildtyp 590 ± 19 Lokalisationen pro Fläche und Synaptotagmin-reduzierte

Ergebnisse

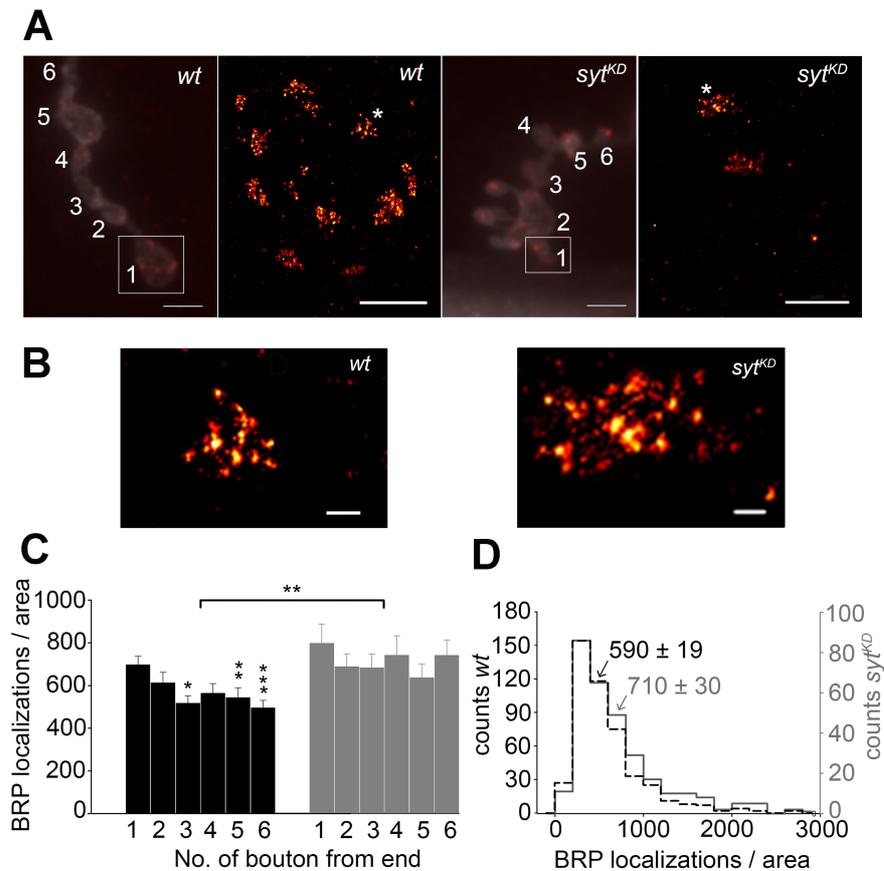


Abb. 21: Reduktion von Synaptotagmin verändert AZ-Organisation

A Zwei-Kanal Epifluoreszenz Bilder mit Antikörper-Färbungen gegen HRP (grau) und Bruchpilot (rot) zeigen die letzten sechs Ib Boutons einer *wt* und einer *syt^{KD}* L3-Larve. Vergrößerte Darstellung der distalen Boutons (Nummer 1, weiße Box) zur Illustration der AZ-Ultrastruktur bestehend aus Bruchpilot-Clustern.

B Vergrößerung der in A mit Sternchen markierten Aktiven Zonen.

C Mittelwerte \pm SEM der Bruchpilot-Lokalisierungen pro Fläche jeweiliger Aktiven Zone für die letzten sechs Ib Boutons bei *wt* (schwarz, $n = 140, 67, 57, 64, 69$ und 71 Aktive Zonen) und *syt^{KD}* (grau, $n = 46, 80, 48, 40, 43$ und 43 Aktive Zonen). Im *wt* besitzen AZs distaler Ib Boutons mehr Lokalisierungen als die des dritten, vierten, fünften oder sechsten Boutons. Im *syt^{KD}* ist dieser Gradient nicht vorhanden und die AZs enthalten gemittelt in allen Boutons mehr Lokalisierungen pro Fläche als im *wt*.

D Gemittelte Verteilung der Lokalisierungen pro Fläche bei *wt* (schwarz) und *syt^{KD}* (grau). Die Pfeile zeigen die korrespondierenden Mittelwerte \pm SEM. Skala $2 \mu\text{m}$ (Epifluoreszenz), $1 \mu\text{m}$ (*d*STORM) (**A**), 100 nm (**B**).

Ergebnisse

710 ± 30 (Abb. 21D, p = 0,003). Außerdem führte die RNAi-Expression zu breiter verteilten Lokalisationswerten mit einer höheren Anzahl großer Aktiver Zonen als im Wildtyp (Abb. 21D). Die Experimente zeigen, dass Synaptotagmin die Anordnung von Bruchpilot in Aktiven Zonen entlang einzelner Axone der MN6/7-Ib-Motoneurone beeinflusst. Gleichzeitig scheinen die Menge an Bruchpilot und der Bedarf an Synaptotagmin für die Vesikelfusion zu korrelieren. Diese Befunde legen eine Interaktion beider Proteine und ihre Bedeutung für synaptische Plastizität nahe.

	Amplitude [nA]	Anstiegszeit [ms]	τ [ms]	Frequenz [Hz]	n
A) mEPSCs (TEVC)					
<i>RIM</i> ^{wt}	0,96 ± 0,1	0,9 ± 0,03	7,3 ± 0,4	2,7 ± 0,4	14
<i>RIM</i> ^{R915H}	0,98 ± 0,1	1,0 ± 0,05	6,7 ± 0,5	3,2 ± 0,5	14
<i>RIM</i> ^{R916H}	1,10 ± 0,1	1,0 ± 0,05	6,8 ± 0,4	3,3 ± 0,3	16
<i>RIM</i> ^{R915H,R916H}	0,93 ± 0,03	0,9 ± 0,02	6,1 ± 0,3	3,0 ± 0,4	17
	Amplitude [nA]	Anstiegszeit [ms]	τ [ms]	PPR	n
B) eEPSCs (TEVC 1,0 mM Ca²⁺)					
<i>RIM</i> ^{wt}	35,1 ± 6,5	1,1 ± 0,08	5,9 ± 0,3	1,4 ± 0,1	11
<i>RIM</i> ^{R915H}	59,1 ± 4,5 **	1,2 ± 0,06	5,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1	11
<i>RIM</i> ^{R916H}	39,2 ± 4,4	1,3 ± 0,08	6,2 ± 0,5	1,6 ± 0,1	12
<i>RIM</i> ^{R915H,R916H}	35,9 ± 3,0	1,5 ± 0,06	5,0 ± 0,3	1,4 ± 0,1	12
C) eEPSCs (fokal 1,0 mM Ca²⁺)					
<i>RIM</i> ^{wt}	1,6 ± 0,2	0,97 ± 0,08	4,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	11
<i>RIM</i> ^{R915H}	3,6 ± 0,6 **	0,75 ± 0,05 *	3,3 ± 0,2 *	0,8 ± 0,04	10
<i>RIM</i> ^{R916H}	3,2 ± 0,4 ***	0,9 ± 0,05	4,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	10
<i>RIM</i> ^{R915H,R916H}	2,0 ± 0,3	0,9 ± 0,04	4,7 ± 0,3	1,1 ± 0,1	10
D) eEPSCs (fokal 0,5 mM Ca²⁺)					
<i>RIM</i> ^{wt}	2,3 ± 0,3	1,1 ± 0,03	5,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1	10
<i>RIM</i> ^{R915H}	1,9 ± 0,3	1,2 ± 0,1	4,8 ± 0,3	1,0 ± 0,1	6
<i>RIM</i> ^{R916H}	1,0 ± 0,2 **	1,3 ± 0,2	4,8 ± 0,2	1,4 ± 0,2	6
<i>RIM</i> ^{R915H,R916H}	1,0 ± 0,2 ***	1,4 ± 0,1	4,9 ± 0,3	1,3 ± 0,1	10

Tabelle 3: Synaptische Ströme nach RIM-Mutationen. Spontane (mEPSCs) und evozierte (eEPSCs) Ströme bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. τ : Abfallszeitkonstante, PPR: Doppelpulsratio, n: Anzahl der Messungen pro Genotyp. Sterne bezeichnen p-Werte (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001) und beziehen sich auf den Vergleich des jeweiligen Genotyps mit *RIM*^{wt}.

	1. lb	2. lb	3. lb	1. ls	2. ls	3. ls
# BRP / Bouton						
<i>RIM^{wt}</i>	17,5 ± 1,2	12,0 ± 1,2 *	13,0 ± 1,3	7,3 ± 0,8	6,6 ± 0,9	5,7 ± 0,6
<i>RIM^{R915H}</i>	12,4 ± 1,0 *	12,1 ± 1,4	13,9 ± 1,5	7,7 ± 0,6	6,1 ± 0,4	5,3 ± 0,6 **
<i>RIM^{R916H}</i>	14,1 ± 0,9	12,1 ± 1,0	12,8 ± 1,1	7,7 ± 0,6	6,7 ± 0,6	7,3 ± 0,6
<i>RIM^{R915H,R916H}</i>	19,3 ± 1,0	12,2 ± 1,3 ***	12,4 ± 1,0 ***	7,6 ± 0,6	6,6 ± 0,5	7,6 ± 0,6
Fläche [µm²]						
<i>RIM^{wt}</i>	10,3 ± 0,8	7,5 ± 0,7 *	7,6 ± 0,7 *	4,3 ± 0,6	3,9 ± 0,4	3,7 ± 0,5
<i>RIM^{R915H}</i>	8,1 ± 0,6 *	7,8 ± 0,7	8,3 ± 0,8	3,7 ± 0,4	2,9 ± 0,3	2,6 ± 0,2 *
<i>RIM^{R916H}</i>	6,9 ± 0,5 ***	6,0 ± 0,5	6,9 ± 0,7	2,8 ± 0,3 *	2,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2
<i>RIM^{R915H,R916H}</i>	11,6 ± 0,6	7,2 ± 0,8 ***	7,5 ± 0,6 ***	3,1 ± 0,3	2,7 ± 0,3	3,5 ± 0,3 *
Länge [µm]						
<i>RIM^{wt}</i>	4,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2 *	3,4 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2	2,2 ± 0,2
<i>RIM^{R915H}</i>	2,8 ± 0,2 ***	2,8 ± 0,2	3,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1
<i>RIM^{R916H}</i>	2,8 ± 0,1 ***	2,6 ± 0,1	3,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1 *	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1
<i>RIM^{R915H,R916H}</i>	3,7 ± 0,2	2,7 ± 0,2 ***	3,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1 *	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,2
Breite [µm]						
<i>RIM^{wt}</i>	2,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1 ***	1,9 ± 0,1 ***	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
<i>RIM^{R915H}</i>	2,9 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
<i>RIM^{R916H}</i>	2,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1 **	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
<i>RIM^{R915H,R916H}</i>	3,3 ± 0,1 **	2,3 ± 0,2 ***	2,2 ± 0,1 ***	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1
n						
<i>RIM^{wt}</i>	67	29	29	15	15	15
<i>RIM^{R915H}</i>	57	23	23	23	23	23
<i>RIM^{R916H}</i>	69	31	31	26	26	26
<i>RIM^{R915H,R916H}</i>	85	35	35	27	27	27

Tabelle 4: Anzahl Aktiver Zonen und Boutongrößen nach RIM-Mutationen. Ausgewertet wurden die jeweils letzten drei lb und ls Boutons eines Astes. 1. lb bzw. ls: distaler Bouton. # BRP / Bouton: Bruchpilot-Punkte pro Bouton, Fläche in µm², Länge und Breite in µm. n: Anzahl der ausgewerteten Boutons pro Genotyp. Sterne bezeichnen p-Werte (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001) und beziehen sich auf den Vergleich der distalen Boutons der Genotypen mit *RIM^{wt}* (*) bzw. des jeweils 2. oder 3. Boutons mit dem distalen (*).

eEPSCs (*elav-GAL4*)

Genotyp	Amplitude [nA]	Anstiegszeit [ms]	τ [ms]	Latenz [ms]	PPR	n
<i>wt</i>	53,6 ± 4,7	1,0 ± 0,03	4,8 ± 0,4	1,5 ± 0,04	1,2 ± 0,1	17
<i>syt^{KD}</i>	30,0 ± 4,5 **	1,3 ± 0,1 ***	5,9 ± 0,6	1,5 ± 0,05	1,5 ± 0,1 **	11
<i>brp^{KO}</i>	24,8 ± 3,3	2,2 ± 0,2	5,5 ± 0,8	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	11
<i>brp^{KO}, syt^{KD}</i>	35,1 ± 6,7	1,4 ± 0,1 **	6,6 ± 0,4	1,6 ± 0,03 ***	1,8 ± 0,2	12
<i>rab3^{KO}</i>	50,3 ± 5,3	1,1 ± 0,04	6,8 ± 0,6	1,4 ± 0,04	1,0 ± 0,1	10
<i>rab3^{KO}, syt^{KD}</i>	19,5 ± 2,1 ***	1,2 ± 0,1	7,0 ± 0,5	1,7 ± 0,1 *	1,5 ± 0,1 ***	14

eEPSCs (*ok6-GAL4*)

Genotyp	Amplitude [nA]	Anstiegszeit [ms]	τ [ms]	Latenz [ms]	PPR	n
<i>wt</i>	49,5 ± 4,3	1,4 ± 0,1	6,9 ± 0,4	1,6 ± 0,04	1,6 ± 0,04	15
<i>syt^{KD}</i>	28,4 ± 3,9 **	1,5 ± 0,1	8,9 ± 0,3 ***	2,1 ± 0,1 ***	1,4 ± 0,1 *	12
<i>brp^{KO}</i>	14,7 ± 2,5	2,1 ± 0,2	9,5 ± 0,7	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,3	10
<i>brp^{KO}, syt^{KD}</i>	9,2 ± 1,3	1,9 ± 0,1	8,9 ± 0,6	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,2	10
<i>rab3^{KO}</i>	55,4 ± 2,9	1,4 ± 0,1	9,1 ± 0,5	1,6 ± 0,04	1,0 ± 0,04	18
<i>rab3^{KO}, syt^{KD}</i>	22,4 ± 1,6 ***	1,3 ± 0,1	8,9 ± 0,4	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1 ***	12

Tabelle 5: Synaptische Ströme bei reduziertem Synaptotagmin-Level. TEVC-Messungen evozierter synaptischer Ströme (eEPSCs) von Larven mit panneuronaler (*elav-GAL4*) und motoneuronaler (*ok6-GAL4*) Expression der Synaptotagmin-RNAi. τ : Abfallszeitkonstante, PPR: Doppelpulsratio, n: Anzahl der Messungen pro Genotyp, *wt*: Wildtyp, *syt^{KD}*: Synaptotagmin-RNAi, *brp^{KO}*: Bruchpilot-Nullmutante (Kittel et al., 2006), *rab3^{KO}*: Rab3-Nullmutante (Graf et al., 2009). Sterne bezeichnen p-Werte (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001) und beziehen sich auf die jeweiligen Vergleiche von *syt^{KD}* mit *wt*, *brp^{KO}*, *syt^{KD}* mit *brp^{KO}* und *rab3^{KO}*, *syt^{KD}* mit *rab3^{KO}*.

	Amplitude [nA]		Anstiegszeit [ms]		τ [ms]		Latenz [ms]		PPR	
	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal	proximal	distal
<i>wt</i>	1,0 ± 0,1 **	1,4 ± 0,1	1,30 ± 0,1*	1,09 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,7 ± 0,03	0,6 ± 0,1
<i>syt^{KD}</i>	0,34 ± 0,04	0,38 ± 0,1	1,38 ± 0,1	1,45 ± 0,2	6,6 ± 0,4	6,5 ± 0,5	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,3
<i>brp^{KO}</i>	0,47 ± 0,1	0,53 ± 0,1	1,51 ± 0,1	1,37 ± 0,1	4,7 ± 0,2	5,0 ± 0,02	2,4 ± 0,1	2,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1

Tabelle 6: Evozierte synaptische Ströme proximaler und distaler Boutons. Evozierte Ströme (eESPCs) selektiv fokal gemessen von proximalen und distalen Ib Boutons in 0,5 mM extrazellulärer Calciumkonzentration in HL-3 Lösung. τ : Abfallszeitkonstante, PPR: Doppelpulsratio. *wt*: Wildtyp, *syt^{KD}*: Synaptotagmin-RNAi, *brp^{KO}*: Bruchpilot-Nullmutante (Kittel et al., 2006). Die Anzahl der Messungen pro Genotyp beträgt für jeweils proximal und distal *wt*: 20 und 13, *syt^{KD}*: 13 und 11, *brp^{KO}*: 13 und 11. Sterne bezeichnen p-Werte (* < 0,05, ** < 0,01) und beziehen sich auf den jeweiligen Vergleich proximaler zu distaler Bouton.

	1. lb	2. lb	3. lb	1. ls	2. ls	3. ls
# BRP / Bouton						
<i>wt</i>	21,16 ± 0,85	11,74 ± 1,22 ***	11,74 ± 0,92 ***	7,26 ± 0,41	6,58 ± 0,44	5,95 ± 0,47 *
<i>syt^{KD}</i>	4,3 ± 0,3	4,7 ± 0,3	4,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,5 ± 0,2
<i>brp^{KO}</i>						
<i>rab3^{KO}</i>	7,0 ± 0,3	4,1 ± 0,3 ***	4,2 ± 0,3 ***	1,2 ± 0,07	1,3 ± 0,06	1,3 ± 0,07
<i>rab3^{KO},syt^{KD}</i>	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,3	2,4 ± 0,2 **	1,1 ± 0,04	1,05 ± 0,04	1,1 ± 0,04
n						
<i>wt</i>	98	38	38	38	38	38
<i>syt^{KD}</i>	125	109	109	50	50	50
<i>brp^{KO}</i>	49	49	49			
<i>rab3^{KO}</i>	117	57	57	63	63	63
<i>rab3^{KO},syt^{KD}</i>	110	60	60	60	60	60

Tabelle 7: Anzahl Aktiver Zonen entlang des lb und ls Axons. Ausgewertet wurden die jeweils letzten drei lb und ls Boutons eines Astes. 1. lb bzw. ls: distaler Bouton. # BRP / Bouton: Bruchpilot-Punkte pro Bouton. n: Anzahl der ausgewerteten Boutons pro Genotyp, *wt*: Wildtyp, *syt^{KD}*: Synaptotagmin-RNAi, *brp^{KO}*: Bruchpilot-Nullmutante (Kittel et al., 2006), *rab3^{KO}*: Rab3-Nullmutante (Graf et al., 2009). Sterne bezeichnen p-Werte (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001) und beziehen sich auf den Vergleich des jeweils 2. oder 3. Boutons mit dem distalen.

	1. lb	2. lb	3. lb	1. ls	2. ls	3. ls
Fläche [μm^2]						
<i>wt</i>	12,54 ± 0,58	6,56 ± 0,71 ***	7,31 ± 0,57 ***	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2
<i>syt^{KD}</i>	2,7 ± 0,2	3,2 ± 0,2	2,8 ± 0,2			
<i>brp^{KO}</i>	8,1 ± 0,5	4,7 ± 0,4 ***	6,1 ± 0,4 **			
<i>rab3^{KO}</i>	11,5 ± 0,5	6,9 ± 0,5 ***	7,5 ± 0,5 ***			
<i>rab3^{KO},syt^{KD}</i>	6,9 ± 0,4	6,6 ± 0,6	5,5 ± 0,5 *			
Länge [μm]						
<i>wt</i>	4,45 ± 0,14	2,85 ± 0,17 ***	3,29 ± 0,18 ***	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1
<i>syt^{KD}</i>	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1			
<i>brp^{KO}</i>	3,6 ± 0,4	2,5 ± 0,1 ***	2,9 ± 0,1 *			
<i>rab3^{KO}</i>	3,9 ± 0,1	3,2 ± 0,2 ***	3,3 ± 0,2 *			
<i>rab3^{KO},syt^{KD}</i>	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,2	2,7 ± 0,2			
Breite [μm]						
<i>wt</i>	3,26 ± 0,11	2,08 ± 0,16 ***	2,08 ± 0,12 ***	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,04
<i>syt^{KD}</i>	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1			
<i>brp^{KO}</i>	2,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1 ***	2,1 ± 0,1 ***			
<i>rab3^{KO}</i>	3,9 ± 0,1	3,2 ± 0,2 ***	3,3 ± 0,2 ***			
<i>rab3^{KO},syt^{KD}</i>	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1 *			

Tabelle 8: Boutongrößen entlang des lb und ls Axons. Größenmessung der jeweils letzten drei lb und ls Boutons eines Astes aus Tabelle 7. Fläche in μm^2 , Länge und Breite in μm . *wt*: Wildtyp, *syt^{KD}*: Synaptotagmin-RNAi, *brp^{KO}*: Bruchpilot-Nullmutante (Kittel et al., 2006), *rab3^{KO}*: Rab3-Nullmutante (Graf et al., 2009). Sterne bezeichnen p-Werte (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001) und beziehen sich auf den Vergleich des jeweils 2. oder 3. Boutons mit dem distalen.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden molekulare Mechanismen synaptischer Plastizität untersucht und es wurden drei Hauptergebnisse erzielt. 1. Wildtyp *Drosophila* Larven zeigen eine proximal-distale Differenzierung glutamaterger, neuromuskulärer Synapsen. 2. Die Struktur und Funktion dieser Synapsen wird durch die CORD7 Mutation beeinflusst. 3. Bruchpilot, eine Schlüsselkomponente Aktiver Zonen, und der Calciumsensor Synaptotagmin sind beide essentiell für die synaptische Differenzierung. Im Folgenden werden die drei Ergebnisteile im Kontext aktueller Studien diskutiert.

6.1 Synaptische Differenzierung und Plastizität entlang eines Axons

Die synaptische Transmission ist ein dynamischer Prozess und führt zu plastischen Veränderungen des neuronalen Netzwerks und der Informationsübertragung. Synaptische Stärke bezeichnet die relative Amplitude einer postsynaptischen Antwort, die durch die Aktivität einer präsynaptischen Zelle hervorgerufen wird (Atwood & Karunanithi, 2002). Sie ist entscheidend für synaptische Plastizität und die Ausbildung von Lernen und Gedächtnis. Dabei ist die Differenzierung von Synapsen, die regionale oder zellspezifische Unterschiede von Struktur oder Funktion bezeichnet, ein wichtiger Aspekt. Vor mehr als 50 Jahren zeigten Studien an Crustacea, dass synaptische Stärke nicht nur zwischen Neuronen-Populationen sondern auch entlang der Äste einer Synapse variieren kann (Katz 1936; Hoyle & Wiersma, 1958). Ein einzelnes Neuron war in der Lage unterschiedliche Antworten in zwei verschiedenen Zielzellen hervorzurufen. Die prä- und postsynaptischen Beiträge zu dieser Variabilität werden nach wie vor intensiv untersucht. Auf der postsynaptischen Seite sind elektrische und strukturelle Zelleigenschaften, also beispielsweise die Größe der Rezeptorfelder und Komposition der Rezeptoren, relevant für die Größe der hervorgerufenen Antwort. Präsynaptisch richtet sich das Augenmerk vor allem auf die Anzahl und den Aufbau der Aktiven Zonen und die dort freigesetzte Transmittermenge (Atwood & Karunanithi, 2002). Wichtige präsynaptische Einflussfaktoren sind die Anzahl der spannungsgesteuerten Calciumkanäle, sowie Anzahl und Größe der fusionsbereiten Vesikel. Die relative Lokalisation der Calciumkanäle zu den Vesikeln hat wesentlichen Einfluss auf den Zeitverlauf und die Effizienz der Transmitterfreisetzung. Sind Calciumkanäle und

Diskussion

Vesikel eng gekoppelt und somit die Diffusionswege für die lokal einströmenden Ionen zum Calciumsensor kurz, ist die synaptische Latenz auf ein Minimum verkürzt (Bucurenciu et al., 2008). Dies ist beispielsweise bei ausdifferenzierten, kortikalen Neuronen für das Erreichen hoher Übertragungsfrequenzen essentiell (Schmidt et al., 2013). Allgemein wird zwischen enger Kopplung (nanodomain, < 100 nm), die reife, auf Schnelligkeit spezialisierte Synapsen charakterisiert, und lockerer Kopplung (microdomain, > 100 nm), die bei unreifen Synapsen überwiegt, unterschieden. Hippokampale Ableitungen zeigten eine Schlüsselfunktion für lockere Kopplungsdistanzen für die Ausprägung präsynaptischer Plastizität (Vyleta & Jonas, 2014).

Es ist bekannt, dass die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung entlang eines Axons variieren kann (Atwood & Wojtowicz, 1999; Rosenmund et al., 1993). Studien an Säugern und auch an *Drosophila* ergaben Hinweise für eine Korrelation der Freisetzungswahrscheinlichkeit mit der Größe einer Aktiven Zone (Murthy et al., 2001; Marrus & DiAntonio, 2004). Die glutamaterge, neuromuskuläre Synapse von *Drosophila* besteht aus Ketten synaptischer Boutons, die ein gewisses Maß an Plastizität zeigen. Untersuchungen mit einem genetisch exprimierten Calciumsensor zeigten eine heterogene Verteilung der Transmitterfreisetzung im Verlauf der MN6/7-Ib-Motoneurone, deren synaptische Endigungen als Typ Ib Boutons bezeichnet werden (vgl. 5.1, Guerrero et al., 2005). Distale Boutons wiesen mehr präsynaptischen Calciumeinstrom auf, als weiter proximal gelegene. Bereits in früheren Arbeiten wurden elektrophysiologische Methoden verwendet, um die funktionellen Eigenschaften von Typ Is und Ib Boutons zu charakterisieren (Kurdyak et al., 1994; Pawlu et al., 2004). Neu ist jedoch die Charakterisierung von Ib Boutons entlang der Boutonkette. Dies war wichtig, um die Befunde der nachfolgenden Abschnitte verstehen zu können (vgl. 6.2 und 6.3). Außerdem führten die funktionellen Analysen zu einer genaueren Betrachtung der Boutonstruktur und zu den ebenfalls neuen Erkenntnissen, dass sich die Anzahl Aktiver Zonen und die Größendimensionen der Boutons im Verlauf eines Axons an der *Drosophila* neuromuskulären Synapse unterscheiden. Dieser Gradient ist ein Beispiel für die Differenzierung von Synapsen, welche funktionelle Unterschiede der synaptischen Transmission bedingen kann und die Plastizität des Nervensystems, die relevant für Lernen und Gedächtnis ist, beschreibt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten differenzierte funktionelle und morphologische Untersuchungen von proximal und distal gelegenen Is und Ib Boutons der Synapse. Distale Ib Boutons zeigen größere und schnellere postsynaptische Ströme als proximale, sind größer und besitzen mehr Aktive Zonen als weiter proximale. Die Aktiven Zonen Dichte ist damit im Verlauf des Motoneurons konstant. Is Boutons hingegen sind distal und proximal gleich groß und mit gleich vielen Aktiven Zonen ausgestattet. In einer anderen Arbeit wurde kürzlich mit *dSTORM* gezeigt, dass der Gradient bei Ib auch in der Ultrastruktur besteht: Aktive Zonen distaler Boutons sind größer und besitzen mehr Bruchpilot als die weiter proximaler Boutons (Ehmann et al., in revision; Abb. 21). Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass die Größe eines präsynaptischen Calciumsignals mit der Bruchpilot-Menge korreliert und wiederum distal am höchsten ist (Peled & Isacoff, 2011). Weiter konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Aktive Zone entweder spontane oder evozierte Transmitterausschüttung bevorzugt (Peled et al., 2014). Bruchpilot charakterisiert vor allem Stellen evozierter Freisetzung. Allerdings gibt es auch widersprüchliche Aussagen bezüglich des proximal-distalen Gradienten. Melom et al. (2013) fanden weder bei spontaner noch bei evozierter Freisetzung eine Differenzierung entlang des Axons. Die Auflösung präsynaptischer Calciumsignale an der *Drosophila* NMJ ist jedoch aufgrund des ungünstigen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses schwierig. Außerdem ist zu beachten, dass die Analysen teils an der neuromuskulären Synapse auf Muskel 4 durchgeführt wurden (Melom et al., 2013; Peled & Isacoff, 2011; Peled et al., 2014), die vom Motoneuron MN4-Ib gebildet wird und nur Typ Ib Boutons besitzt (Hoang & Chiba, 2001). Zur Aufklärung dieser Diskrepanzen sollten die hier eingeführten Methoden auch zur Analyse des proximal-distalen Gradienten der neuromuskulären Synapse auf Muskel 4 genutzt werden.

Insgesamt zeigen die Experimente synaptische Differenzierung an der neuromuskulären Synapse von *Drosophila* im Verlauf des MN6/7-Ib-Motoneurons auf dem Level einzelner Boutons. Diese besteht sowohl im funktionellen als auch im strukturellen Sinn und passt zu früheren Befunden an diesem sowie an anderen Präparaten.

6.2 C₂A-Domäne von RIM

In dieser Arbeit wurde das Argininpärchen an Position R915 und R916 innerhalb der C₂A-Domäne des Aktive Zonen Proteins RIM an der *Drosophila* NMJ untersucht. C2

Diskussion

Domänen wurden initial in Proteinkinase C Isozymen als konservierte Sequenzen mit Verwandtschaft zu Immunglobulin-artig gefalteten Proteindomänen beschrieben (Grobler & Hurley, 1997). Heute ist bekannt, dass sie membranbindende Module einer Vielzahl von Proteinen sind und aus etwa 130 Aminosäuren bestehen (Nalefski & Falke, 1996; Cho & Stahelin, 2006). Außer in RIM sind sie in einer Vielzahl weiterer synaptischer Proteine wie beispielsweise Synaptotagmin (vgl. 3.2), Piccolo oder Munc13 enthalten. Sie bestehen aus einem kompakten, acht β -Faltblätter umfassenden Kern und flexiblen Schleifen an den Polen. Aminosäure-Unterschiede der Schleifen bedingen ihre Affinität Phospholipide oder Calcium-Ionen zu binden und mit Proteinen zu interagieren (Rizo & Südhof, 1998). Der C₂A-Domäne von RIM fehlt das typische Calcium-Ionen-Bindungsmotiv bestehend aus fünf Aspartat-Resten an der oberen Schleife. Es wird angenommen, dass die Funktion der Domäne einerseits in einer calciumunabhängigen Bindung an Lipidmembranen und andererseits in einer Bindung an Calciumkanäle oder andere Proteine liegt. Über die Funktion der am unteren Domänenpol liegenden 3₁₀ Helix mit dem hier untersuchten, hochkonservierten Arginin-Pärchen ist bisher wenig bekannt (Südhof 2012).

Die Konservierung großer Sequenzbereiche der C₂A-Domäne inklusive des RR-Motivs weist auf ihre hohe funktionelle Bedeutung hin (vgl. Abb. 10B). Die Positionen der Arginine sind in *Drosophila* im Vergleich zum Säuger um eine Aminosäure verschoben. Damit entspricht die CORD7-Position gemäß dem Sequenzvergleich dem ersten Arginin im Säuger und dem zweiten Arginin in der Fliege. Parallel zur vorliegenden Arbeit wurde in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe aus Oxford ein Kristall der *Drosophila* RIM C₂A-Domäne hergestellt (Abb. 22A, Paul et al., in preparation). Die 3₁₀ Helix (gelb) liegt zwischen dem fünften und sechsten β -Faltblatt und die beiden untersuchten Arginine R915 und R916 sind gekennzeichnet. Der Vergleich mit der Kristallstruktur der Ratte (Dai et al., 2005) zeigt, dass die Domänen inklusive der Helixregion hohe strukturelle Homologien aufweisen (Abb. 22B). Die Seitenketten der Arginine liegen bei *Drosophila* an den gleichen Stellen wie bei Vertebraten, jedoch sind ihre Positionen invertiert. Somit sind die jeweiligen CORD7-Arginine in Fliege und Ratte (R916 und R805) gleich ausgerichtet. Vergleicht man die elektrostatischen Oberflächenpotentiale beider Domänen, zeigt sich ebenfalls große Ähnlichkeit (Abb. 22C). Die Homologie der C₂A-Domänen von Fliege und Säuger besteht demnach auch auf Strukturebene.

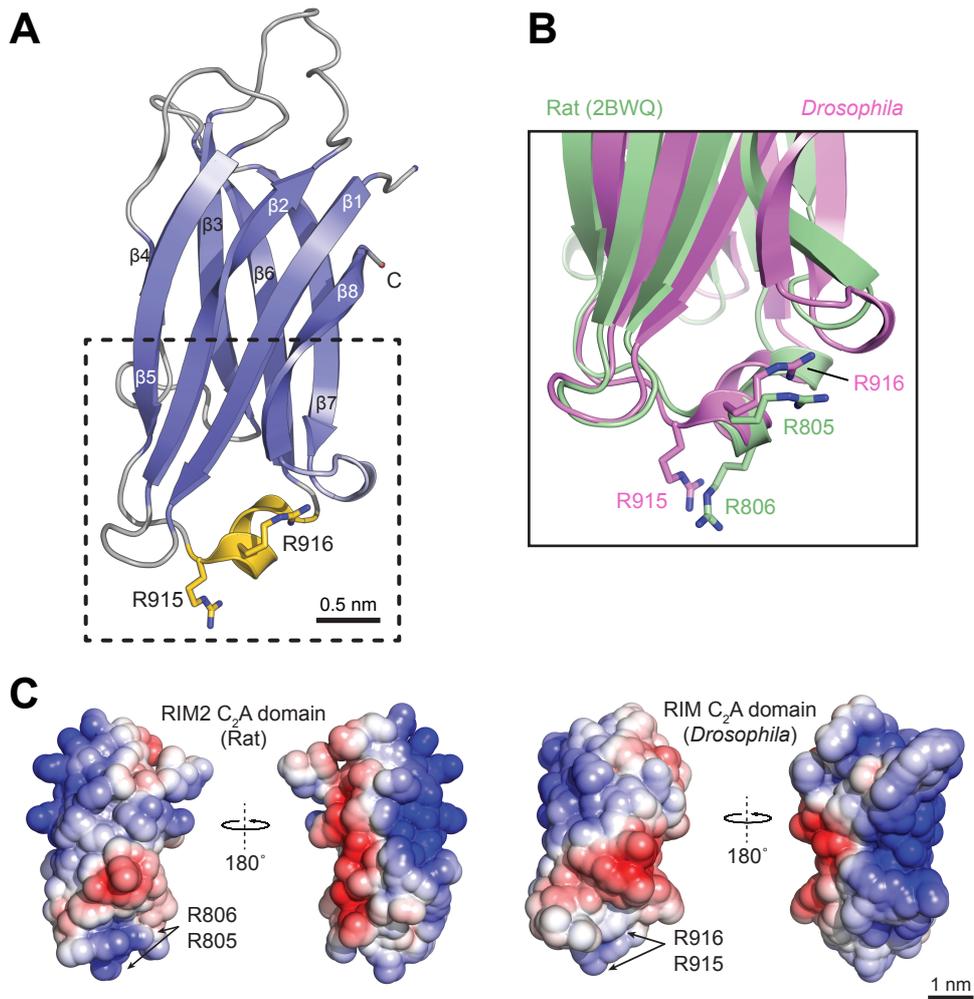


Abb. 22: Kristallstruktur der RIM C₂A-Domäne

A Schematische Darstellung der RIM C₂A-Domänenstruktur von *Drosophila*. Die acht β -Faltblätter (β 1- β 8) sind in violett dargestellt und die 3_{10} Helix, welche β 5 und β 6 verbindet, in gelb. Die in der Studie betrachteten und mit der CORD7 Mutation assoziierten Arginine R915 und R916 sind gekennzeichnet.

B Übereinanderlagerung der 3_{10} Helix Regionen der *Drosophila* C₂A-Domäne (magenta) und der 2005 publizierte C₂A-Domäne der Ratte (grün, Dai et al., 2005). Die Arginine sind als Stäbe gekennzeichnet.

C Elektrostatische Potentiale der Domänenoberflächenstruktur für die Ratten C₂A-Domäne (links) und der *Drosophila* C₂A-Domäne (rechts) von jeweils zwei Ansichten (modifiziert aus Paul et al., in preparation).

Zur Prüfung von funktionellen Auswirkungen der CORD7 Mutation wurden TEVC und fokale Ableitungen verwendet. Die Mutation des ersten Arginins R915 vergrößert die Amplitude der postsynaptischen Ströme. Dies zeigt sich in 1,0 mM extrazellulärer Calciumkonzentration bei beiden Messkonfigurationen. Mit fokalen Elektroden

Diskussion

werden weitere Änderungen deutlich, die vermutlich aufgrund der geringeren räumlichen und zeitlichen Auflösung mit TEVC nicht erfasst werden. Außerdem ist zu beachten, dass bei TEVC-Messungen die Differenzierung der Boutons in Typ Ia und Ib sowie proximal-distale Unterschiede nicht aufzulösen sind. So zeigt sich, dass die erste Punktmutation RIM^{R915H} nicht nur die Amplitude postsynaptischer Ströme vergrößert, sondern auch ihre Kinetik beschleunigt und dass außerdem die zweite Punktmutation RIM^{R916H} auch die Amplitude vergrößert. Da die quantalen Ereignisse durch alle RIM-Mutationen unbeeinflusst bleiben, ist eine veränderte Synchronizität multiquantaler Fusionsereignisse naheliegend. Die Menge ausgeschütteten Transmitters pro Zeit und der Zeitverlauf des Exozytoseprozesses werden durch die Mutation eines Arginin-Restes der 3₁₀ Helix verändert. Zudem zeigt sich, dass die gleichzeitige Mutation beider Arginine $RIM^{R915H, R916H}$ die beschriebenen Effekte wieder aufhebt. Es ist denkbar, dass sich Konformation, Lokalisation oder Bindungsfähigkeit der Helix abhängig vom Vorhandensein der Arginine ändern und damit Interaktionen mit beispielsweise präsynaptischen Calciumkanälen beeinflusst werden.

Messungen in niedrigem, extrazellulärem Calcium legen eine veränderte Calciumabhängigkeit der Transmitterfreisetzung nahe. So reagieren Synapsen nach Mutation des ersten Arginins weitaus empfindlicher auf das niedrige Calcium als Synapsen mit Wildtyp-RIM. Um den Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Neurotransmission zukünftig genauer zu charakterisieren, könnten mittels einer Pipettenperfusion verschiedene Calcium-Ionenkonzentrationen lokal auf einen Bouton appliziert und die postsynaptischen Ströme mit einer fokalen Elektrode registriert werden. Diese Experimente sind jedoch aufgrund von Signalstörungen durch die Perfusion und Bewegungsartefakten des Präparats beim Calciumwechsel nicht leicht durchzuführen. Wie in Abschnitt **5.3** erwähnt, zeigte sich bereits in Zellkulturexperimenten, dass die *CORD7* Mutation Einfluss auf die Modulation spannungsgesteuerter Calciumkanäle hat (Miki et al., 2007). Aktuell ist nicht klar, ob die Veränderung der synaptischen Funktion mit einer Kanal-Interaktion und Modulation präsynaptischer Calciumströme zusammenhängt, jedoch stützen die vorliegenden Befunde diese Annahme. Außerdem ist aus Studien im Säuger und in *Drosophila* bekannt, dass RIM die Calciumkanal-Anordnung innerhalb der Aktiven Zone beeinflusst (Kaeser et al., 2011; Han et al., 2011; Graf et al., 2012). Um zu testen, ob die Mutationen des RR-Motivs die Anordnung

Diskussion

verändern, könnten diese gemeinsam mit GFP-markierten Kanälen an der *Drosophila* NMJ exprimiert und mit konfokaler und *d*STORM Mikroskopie analysiert werden. Mit genetischen oder synthetischen Calciumsensoren kann der direkte Einfluss der Mutationen auf die präsynaptischen Calciumströme gemessen werden. Die genetisch exprimierbaren GCamPs wurden bereits in anderen *Drosophila*-Mutanten zur differenziellen Analyse der Calciumsignale auf dem Niveau einzelner Boutons verwendet (Peled & Isacoff, 2011). Mit exogenen Farbstoffen zeigte sich bereits in RIM-Nullmutanten, dass das globale Calcium in der Präsynapse verändert ist (Müller et al., 2012). Entsprechende Änderungen wären auch bei Mutation des RR-Motivs aufgrund der Modulation der Calciumkanäle denkbar. Über die PDZ-Domäne ist RIM direkt am Calciumkanal verankert (Kaeser et al., 2011) und an der PxxP-Sequenz indirekt über RIM-binding protein (Hibino et al., 2002). Da die C₂A-Domäne mit dem RR-Motiv zwischen diesen beiden Domänen liegt, ist zu vermuten, dass sie ebenfalls membrannah lokalisiert ist. Das hier untersuchte Arginin-Pärchen liegt an der Oberfläche der 3₁₀ Helix und ragt am unteren Domänenpol ins Cytoplasma (vgl. Abb. 22). Dies macht eine direkte Bindung der Arginine an den Calciumkanal möglich. Durch den Austausch eines Arginins gegen ein Histidin könnte die Bindungsaffinität steigen, wodurch der Kanal schneller, länger oder einfacher öffnen und zu größeren Calciumsignalen führen würde. Dies könnte wiederum größere und schnellere postsynaptische Antworten zur Folge haben. Untersuchungen eines anderen Argininpärchens in der C₂B-Domäne von Synaptotagmin stützen die Annahme, dass RR-Motive essentielle Proteinfunktionen vermitteln (Young & Neher 2009). Der N-terminale Zinkfinger von RIM ragt im Gegensatz zu den C-terminalen Bereichen des Proteins ins Cytoplasma und vermittelt durch Interaktion mit Rab3 und Munc13 die initiale Kontaktaufnahme mit dem Vesikel (Wang et al., 1997; Koushika et al., 2001; Weimer et al., 2006; Gracheva et al., 2008). Dies passt zu hier nicht näher dargestellten Befunden aus funktionellen Analysen der in Abschnitt 5.3 erwähnten N-terminal markierten RIM-Konstrukte. Die Fluoreszenzmarkierung störte die synaptische Funktion signifikant. Dies verdeutlicht die Relevanz der Zinkfinger-Interaktionen für eine intakte synaptische Transmission. Aufgrund der Vesikelinteraktion auf der einen Seite und der Verankerung an und Interaktion mit präsynaptischen Calciumkanälen auf der anderen Seite ist RIM also in einer idealen Position Vesikel und Aktive Zone miteinander zu verknüpfen und die eigentlichen Freisetzungsorte zu markieren.

Wie bereits in Abschnitt **5.2** erwähnt, ist RIM essentiell für synaptische Plastizität (Schoch et al., 2002; Castillo et al., 2002). Um zu prüfen, ob die CORD7 Mutation und das RR-Motiv die Plastizität beeinflussen, wurde die proximal-distale Differenzierung der *Drosophila* NMJ mit Immunfluoreszenz untersucht. Es zeigt sich, dass die Punktmutation des ersten Arginins RIM^{R915H} , die auch in den elektrophysiologischen Messungen den stärksten Phänotyp hat, die proximal-distale Differenzierung der Ib Boutons stört. Distale Ib Boutons sind kleiner als bei RIM^{wt} Synapsen und haben weniger Aktive Zonen. Daraus lässt sich schließen, dass das RR-Motiv synaptische Differenzierung und Plastizität beeinflusst.

6.3 Bruchpilot und Synaptotagmin sind Partner

Unterschiede in der reinen Architektur Aktiver Zonen können die enorme funktionelle Diversität von Synapsen nur unzureichend erklären. Deswegen ist zusätzlich die Betrachtung auf dem Niveau einzelner Moleküle notwendig (Atwood & Karunanithi, 2002). In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Bruchpilot, einer Schlüsselkomponente Aktiver Zonen und Hauptbestandteil des T-bars (vgl. Abb. 4), mit Synaptotagmin, dem Calciumsensor der Transmission, untersucht. Dafür wurde eine Synaptotagmin-RNAi Linie an Synapsen mit unterschiedlicher Bruchpilot-Menge exprimiert. Es zeigt sich, dass die RNAi-Expression im Wildtyp die postsynaptischen Ströme verkleinert und verlangsamt. Dies ist aufgrund von Voruntersuchungen an der *Drosophila* NMJ erwartungsgemäß (Littleton et al., 1993; DiAntonio & Schwarz, 1994). Die Expression in der Bruchpilot-Nullmutante hingegen führt nicht zur Verschlechterung der synaptischen Funktion. Dies deutet auf eine Interaktion zwischen beiden Proteinen hin. Aktive Zonen der Rab3-Nullmutante haben einen hohen Bruchpilot-Gehalt (Graf et al., 2009) und die Expression der Synaptotagmin-RNAi führt zu einer drastischen Reduktion der Amplitude und Verlängerung des Zeitverlaufs postsynaptischer Ströme. Auf struktureller Ebene wird die proximal-distale Differenzierung an diesen Synapsen durch die RNAi-Expression gestört. Die Befunde unterstreichen die Hypothese, dass die Menge an Bruchpilot und Synaptotagmin an einer Aktiven Zone korreliert. Das wiederum legt eine Interaktion bei der Aufrechterhaltung synaptischer Plastizität nahe.

Die Expression der Synaptotagmin-RNAi verändert die Parameter der postsynaptischen Ströme in Abhängigkeit vom Bruchpilot-Vorkommen an der Aktiven Zone. Wie bereits in Abschnitt **5.1** erwähnt, können stets mehrere Parameter zur

Diskussion

Analyse postsynaptischer Ströme herangezogen werden. Die Amplitude erlaubt Rückschlüsse auf die Menge freigesetzten Neurotransmitters und Amplitudenfluktuationen bilden die Grundlage für Analysen auf quantalem Niveau (del Castillo & Katz, 1954). Um die Größe eines multiquantalen Fusionsereignisses korrekt zu interpretieren, sollten Variationen der Quantengröße beachtet werden. Diese können sich je nach Eigenschaften der postsynaptischen Rezeptoren, Größe der Vesikel und Konzentration an Transmitter und Grad der Vesikelöffnung zur Transmitterfreigabe unterscheiden (Atwood & Karunanithi, 2002). Die Betrachtung des Zeitverlaufs synchroner Fusionsereignisse lässt Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen der Freisetzung zu (Katz & Miledi, 1965c; Barrett & Stevens, 1972). Die Anordnung und Funktion der am Fusionsprozess beteiligten Moleküle können die Synchronizität deutlich beeinflussen. So hat beispielsweise die Kopplungsdistanz von Calciumkanälen und Vesikeln enormen Einfluss auf die Effektivität der Freisetzung (Eggermann et al., 2011).

Die Verkürzung der Stromanstiegszeit durch die Expression der Synaptotagmin-RNAi in der Bruchpilot-Nullmutante weist darauf hin, dass einzelne Vesikelfusionen synchroner, schneller bzw. leichter stattfinden. Dies ist beispielsweise durch die Übernahme der Sensorfunktion durch ein anderes Synaptotagmin oder weiteres Sensorprotein zu erklären (s.u.). Die Verkürzung der synaptischen Latenz ist in Anbetracht der Stabilität des Parameters recht erstaunlich (Barrett & Stevens, 1972; Datwyner & Gage, 1980). Allerdings konnten Studien zeigen, dass Formen von Kurzzeitplastizität Auswirkungen auf die Latenz haben (Wu & Borst, 1999; Waldeck et al., 2000). Die synchrone Transmitterfreisetzung ist ein dynamischer und enorm schnell ablaufender Prozess und es ist erstaunlich und nicht vollständig verstanden, dass die synaptische Latenz solch enorm kurze Dauer aufweisen kann (Eggermann et al., 2011). Nach aktuellem Verständnis ist eine Erklärung für diesen Parameter zeitlich nach dem präsynaptischen Calciumeinstrom zu suchen (Lin & Faber, 2002). Die Initiation des Fusionsprozesses von Vesikel- und Plasmamembran und die Fusion selbst unterliegen also Schnelligkeitsschwankungen, die den Zeitverlauf der Freisetzung verändern können. Geht man davon aus, dass Synaptotagmin 1 der einzige bzw. hauptsächliche Calciumsensor für die synchrone Transmitterfreisetzung an der *Drosophila* NMJ ist (DiAntonio et al., 1993; Littleton et al., 1993), so kann die veränderte Latenz bei reduziertem Proteinlevel zunächst durch Effekte auf den Vesikelpool erklärt werden. In Chromaffinzellen ohne Synaptotagmin 1 ist die Latenz

Diskussion

der Vesikelexozytose durch Destabilisierung des unmittelbar freisetzbaren Vesikelpools verlängert (Voets et al., 2001). Alternativ ist vorstellbar, dass weitere präsynaptische Proteine wie beispielsweise die Familie der GTP/GDP-bindenden, filamentösen Septine den Zeitverlauf der Freisetzung durch Effekte auf die initiale Anbindung von Vesikeln an die Membran verändern. Vor allem an unreifen Synapsen, welche gewissermaßen den Aktiven Zonen der Bruchpilot-Nullmutante entsprechen, haben Septine direkten Einfluss auf die synaptische Latenz (Yang et al., 2010).

Eine veränderte Affinität des Sensors Synaptotagmin 1 beeinflusst den Zeitverlauf der Transmitterfreisetzung. Dies zeigte sich durch Untersuchung der Punktmutation R233Q in der C₂A-Domäne von Synaptotagmin 1, welche die Affinität der calciumabhängigen Phospholipid-Bindung um den Faktor zwei und die Affinität der Transmitterfreisetzung in ähnlichem Maße minderte (Fernández-Chacón et al., 2001). Passend dazu zeigten Messungen an Chromaffinzellen, dass die Mutation die Latenz der Freisetzung verlängerte und höhere intrazelluläre Calciumlevel notwendig waren, um Vesikelfusionen auszulösen (Sørensen et al., 2003). Da in den vorliegenden Messungen jedoch das Proteinlevel reduziert wurde ohne die verbleibenden Moleküle qualitativ zu verändern, ist eine Änderung der Calciumaffinität des Sensors unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher wäre in diesem Fall davon auszugehen, dass verschiedene Synaptotagmin-Isoformen vorliegen und die Kinetik der Ströme beeinflussen. Dazu kann wiederum deren jeweilige Affinität, also Bindungs- und Ablösekinetik, beitragen. Studien an Säugersynapsen zeigten, dass die drei neuronal exprimierten Isoformen Synaptotagmin 1, 2 und 9 verschiedene Calcium-Affinitäten besitzen. An Synapsen, die für das räumliche Hören notwendig sind und extrem schnell Informationen weiterleiten, wird vor allem Synaptotagmin 2 exprimiert (Sun et al., 2007). Diese Isoform verkürzt die Stromanstiegszeit und Abfallszeitkonstante um 20-30 % verglichen mit Synaptotagmin 1 (Xu et al., 2007). Im Gegensatz dazu ist Synaptotagmin 9, das vorwiegend an Synapsen des limbischen Systems für die Vermittlung emotionaler Inhalte zuständig ist, die langsamere Isoform. Es vermittelt die Exozytose zwei- bis dreimal langsamer als Synaptotagmin 1 und 2 und zeigt eine deutlich geringere Calcium-Affinität (Xu et al., 2007). Studien an Chromaffinzellen zeigten außerdem, dass Synaptotagmin 1 und 7 gemeinsam die calciumgesteuerte Vesikelexozytose vermitteln und Synaptotagmin 7 partiell den Verlust von Synaptotagmin 1 kompensieren kann (Schonn et al., 2008).

Diskussion

Da an der *Drosophila* NMJ neben Synaptotagmin 1 auch 4 und 7 exprimiert werden, wäre denkbar, dass die Isoformen 4 oder 7 partiell die Funktion des primären Sensors Synaptotagmin 1 übernehmen und sich deren intrinsische Eigenschaften vor allem in Kooperation mit Bruchpilot zeigen. Weiterhin ist zu bedenken, dass Synaptotagmin 1 nicht nur Sensorfunktion hat, sondern auch als Fusionsklemme wirkt. Durch die Verhinderung spontaner Vesikelfusionen mit der Plasmamembran vermittelt es die Präzision der Freisetzung (Littleton et al., 1993; Xu et al., 2009). In der Bruchpilot-Nullmutante ist diese Klemmfunktion aufgrund der Umorganisation der Aktiven Zone möglicherweise weniger effektiv und führt neben der Fehlanordnung der Calciumkanäle zur verlängerten Stromanstiegszeit. Durch die Reduktion des Synaptotagmin-Levels und dadurch grundsätzliche Änderung der Sensorfunktion wird möglicherweise die Klemme gestärkt und die Vesikelexozytose synchronisiert. Nicht zuletzt ist in Betracht zu ziehen, dass die Transmitterfreisetzung an desorganisierten Aktiven Zonen ohne Bruchpilot verstärkt durch einen anderen Calciumsensor vermittelt werden könnte. Im Säuger wurden bereits acht verschiedene Sensorproteine identifiziert (Walter et al. 2011). Proteine der Doc2-Familie gelten als potenzielle Kandidaten, auch wenn ihre Funktionen nach wie vor kontrovers diskutiert wird (Groffen et al., 2010; Pang et al., 2011). *Drosophila* besitzt das Doc2-homologe Protein Rabphilin, welches bei den vorliegenden Untersuchungen als potenzieller, alternativer Sensor denkbar ist.

Um den Einfluss von Bruchpilot und Synaptotagmin auf die proximal-distale Differenzierung und synaptische Plastizität zu testen, wurden fokale Ableitungen von proximalen und distalen Ib Boutons in Bruchpilot-Nullmutanten und Larven mit Expression der Synaptotagmin-RNAi durchgeführt. Bei beiden Genotypen zeigen die Boutons gleichartige postsynaptische Ströme. Dies deutet darauf hin, dass die Proteine relevant für die funktionelle, proximal-distale Differenzierung sind. In Bruchpilot-Nullmutanten sind distale Ib Boutons jedoch genau wie im Wildtyp größer als weiter proximal gelegene. Durch die Verwendung anderer Antikörper zur Markierung und Quantifizierung der Aktiven Zonen im Verlauf der Axone kann der Gradient auf diesem Niveau weiter untersucht werden. Auch für die Untersuchung der Ultrastruktur einer Aktiven Zone in der Bruchpilot-Nullmutante ist zunächst die Etablierung eines geeigneten Markers notwendig. Es ist bekannt, dass die neuromuskulären Synapsen von Synaptotagmin-Nullmutanten feiner verzweigt und verästelt sind, als Wildtyp Synapsen (Dickmann et al., 2006). Der Einfluss des

Proteins auf die Anordnung und Struktur einzelner Aktiver Zonen wurde hingegen bisher nicht analysiert. Durch die differenzierte Analyse der Boutons entlang der beiden Axone konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Synaptotagmin grundlegenden Einfluss auf die Boutonstruktur und die Anzahl und Anordnung Aktiver Zonen hat. Hervorzuheben ist außerdem, dass es für die strukturelle, proximal-distale Differenzierung essentiell ist. Dies passt zu dem Befund, dass der proximal-distale Gradient auch auf funktionellem Niveau nicht mehr vorhanden ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch ultrastrukturelle Untersuchungen mit höchstauflösender Lichtmikroskopie durchgeführt. Die hier angewandte *d*STORM Technik ermöglicht die Auflösung einzelner Moleküle in Aktiven Zonen (van de Linde et al., 2011; Ehmann et al., in revision). Die Reduktion des Synaptotagmin-Levels beeinflusst die Anordnung von Bruchpilot-Molekülen innerhalb einer Aktiven Zone und entlang des MN6/7-Ib-Motoneurons. Dies unterstreicht wiederum, dass Synaptotagmin und Bruchpilot an Aktiven Zonen interagieren und dies für die Aufrechterhaltung synaptischer Transmission und Plastizität relevant ist.

6.4 Ausblick

Auch wenn grundlegende Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen synaptischer Plastizität und der Fusion von Vesikeln an Aktiven Zonen gewonnen werden konnten, bleiben viele Vorgänge unklar. Die direkte Korrelation funktioneller, fokaler Daten mit höchstauflösender Lichtmikroskopie sollte die Quantifizierung der Transmitterfreisetzung einzelner Aktiver Zonen ermöglichen (vgl. **6.1**). Neue Generationen genetisch exprimierbarer Calciumsensoren können zur genaueren Analyse beitragen. Für eine weitergehende Analyse von RIM (vgl. **6.2**) ist dessen Ausrichtung an der Aktiven Zone zu klären. Die Fluoreszenzmarkierung des RIM-Proteins ermöglicht die Lokalisation relativ zu Bruchpilot oder Membranproteinen zu klären. Auch die Interaktion der C₂A-Domäne mit Calciumkanälen könnte damit eventuell adressiert werden, wobei zu berücksichtigen ist, dass dies unter Umständen eine sehr hohe räumliche Auflösung erfordert. Um die Auswirkungen der CORD7 Mutation auf Lernen und Gedächtnis im Tiermodell zu prüfen sind Fliege und Maus gleichermaßen interessant. Hierbei sollte vor allem das Arbeitsgedächtnis untersucht werden, da dieses bei den CORD7 Patienten betroffen ist. Dafür könnte die Mutation über ein virales Expressionssystem ins Säugerhirn gebracht oder eine transgene Mauslinie hergestellt werden. Zusätzlich ist die Identifikation weiterer

Diskussion

Mutationsträger in menschlichen Populationen reizvoll, um die Auswirkungen von RIM und der CORD7 Mutation auf synaptische Plastizität weiter zu analysieren. Um weitere Erkenntnisse über die Interaktion von Synaptotagmin und Bruchpilot zu erlangen, kann versucht werden die Synaptotagmin-Nullmutante mit mutierten und bereits charakterisierten Proteinmotiven der C₂A- und C₂B-Domäne von Synaptotagmin zu retten. An unreifen Aktiven Zonen ohne Bruchpilot fusionieren Vesikel unter Umständen mithilfe eines alternativen Sensors, dessen Identifizierung helfen würde das molekulare Zusammenspiel der synaptischen Transmission besser zu verstehen.

Bereits vor 20 Jahren wurden detaillierte Aussagen zur Differenzierung der *Drosophila* NMJ getroffen (Atwood et al., 1993; Kurdyak et al., 1994). Inzwischen ist die Untersuchung einzelner Moleküle und ihrer Funktionen in den Blickpunkt gerückt. Dies liegt am Fortschritt genetischer und technischer Möglichkeiten, der Entdeckung von Schlüsselproteinen wie Bruchpilot und auch am zunehmenden Verständnis des Zusammenhangs von synaptischer Struktur und Funktion. Die selektive funktionelle Charakterisierung von Synapsen wird in Kombination mit höchstauflösender Lichtmikroskopie weitere Erkenntnisse über die molekulare Organisation des Vesikelverkehrs ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Aktive Zonen (AZs) sind hoch spezialisierte, subzelluläre Kompartimente von Neuronen, die der synaptischen Übertragung dienen. Sie enthalten Gerüstproteine wie RIM (Rab3 interacting molecule) sowie elektronendichte Projektionen bestehend aus Bruchpilot bei *Drosophila melanogaster* oder Bassoon im Säuger, welche Schlüsselkomponenten des Vesikelverkehrs darstellen. Bei der Fliege sind Anzahl und Verteilung von Bruchpilot-Molekülen in AZs relevant für die funktionelle Differenzierung. Ihre Anordnung wird im Abstand von weniger als einem Mikrometer innerhalb einer präsynaptischen Endigung reguliert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden elektrophysiologische Ableitungen und konfokale sowie höchstauflösende, immunhistochemische Bildgebung mit dem dSTORM (*direct* Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) Verfahren an larvalen, neuromuskulären Synapsen von *Drosophila* durchgeführt. Dabei wurde das genetische Potenzial des Modellorganismus genutzt, um relevante Proteinfunktionen und -interaktionen zu analysieren.

RIM als zentrale Komponente Aktiver Zonen ist relevant für synaptische Plastizität. Eine als CORD7 (cone-rod dystrophy type 7) bezeichnete Punktmutation (Arginin zu Histidin) innerhalb der 3_{10} Helix der C₂A-Domäne von RIM wurde mit erhöhten kognitiven Fähigkeiten einer Patientengruppe in Verbindung gebracht. Weil die *Drosophila* C₂A-Domäne eine hohe Homologie zur Säugerdomäne aufweist, konnte der Einfluss dieser Mutation auf Struktur und Funktion von Synapsen untersucht werden. Es zeigte sich, dass der Aminosäureaustausch der CORD7-Position und des benachbarten Arginin-Restes die synaptische Organisation und Transmission beeinflussen.

In einer Reihe weiterer Experimente wurde das Zusammenspiel von Bruchpilot und Synaptotagmin, dem Calciumsensor der evozierten Transmitterfreisetzung, analysiert. Während AZs ohne Bruchpilot auch ohne Synaptotagmin funktionieren, führt dessen Reduktion zu einer Umverteilung von Bruchpilot-Molekülen innerhalb von AZs und zu dramatischen Änderungen in ihrer Anzahl. Abschließend wurde so ein Beitrag zum Verständnis der molekularen Organisation synaptischer Informationsverarbeitung und Plastizität geleistet, wobei zu klären bleibt, wie die zuverlässige Speicherung von Informationen an AZs erreicht werden kann.

8 Referenzen

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Andrews-Zwilling YS, Kawabe H, Reim K, Varoqueaux F, Brose N (2006) Binding to Rab3A-interacting molecule RIM regulates the presynaptic recruitment of Munc13-1 and ubMunc13-2. *J Biol Chem* 281:19720-19731.
- Ashburner M (1989) *Drosophila: A laboratory handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Atwood HL, Govind CK, Wu CF (1993) Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* 4:1008-1024.
- Atwood HL, Wojtowicz JM (1999) Silent synapses in neural plasticity: current evidence. *Learn Mem* 6:542-571.
- Atwood HL, Karunanithi S (2002) Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 3:497-516.
- Barrett EF, Stevens CF (1972) The kinetics of transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 227:691-708.

Referenzen

- Bayat V, Jaiswal M, Bellen HJ (2011) The BMP signaling pathway at the *Drosophila* neuromuscular junction and its links to neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol* 21:182-188.
- Bennett MR, Farnell L, Gibson WG (2000) The probability of quantal secretion near a single calcium channel of an active zone. *Biophys J* 78:2201-2221.
- Benzer S (1973) Genetic dissection of behavior. *Sci Am* 229:24-37.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Broadie K, Sink H, Van Vactor D, Fambrough D, Whitington PM, Bate M, Goodman CS (1993) From growth cone to synapse: the life history of the RP3 motor neuron. *Dev Suppl* 1993:227-238.
- Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256:1021-1025.
- Bucurenciu I, Kulik A, Schwaller B, Frotscher M, Jonas P (2008) Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and Ca^{2+} sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron* 57:536-545.
- Calakos N, Schoch S, Südhof TC, Malenka RC (2004) Multiple roles for the active zone protein RIM1alpha in late stages of neurotransmitter release. *Neuron* 42:889-896.
- Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Südhof TC, Malenka RC (2002) RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature* 415:327-330.
- Cho W, Stahelin RV (2006) Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim Biophys Acta* 1761:838-849.
- Coppola T, Magnin-Luthi S, Perret-Menoud V, Gattesco S, Schiavo G, Regazzi R (2001) Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca^{2+} channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *J Biol Chem* 276:32756-32762.
- Couteaux R (1944) Nouvelles observations sur la structure de la plaque motrice et interprétation des rapports myo-neuraux. *C R Soc Biol* 138:976-979.
- Couteaux R (1946) Sur les gouttières synaptiques du muscle strié. *C R Soc Biol* 140:270-273.
- Craxton M (2007) Evolutionary genomics of plant genes encoding N-terminal-TM-C2 domain proteins and the similar FAM62 genes and synaptotagmin genes of metazoans. *BMC Genomics* 8:259.
- Dai H, Tomchick DR, García J, Südhof TC, Machius M, Rizo J (2005) Crystal structure of the RIM2 C₂A-domain at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* 44:13533-13542.
- Datwyner NB, Gage PW (1980) Phasic secretion of acetylcholine at a mammalian neuromuscular junction. *J Physiol* 303:299-314.
- del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.

Referenzen

- Deng L, Kaeser PS, Xu W, Südhof TC (2011) RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron* 69:317-331.
- DiAntonio A, Parfitt KD, Schwarz TL (1993) Synaptic transmission persists in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. *Cell* 73:1281-1290.
- DiAntonio A, Schwarz TL (1994) The effect on synaptic physiology of synaptotagmin mutations in *Drosophila*. *Neuron* 12:909-920.
- Dickman DK, Lu Z, Meinertzhagen IA, Schwarz TL (2006) Altered synaptic development and active zone spacing in endocytosis mutants. *Curr Biol* 16:591-598.
- Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, Schneggenburger R, Südhof TC, Rizo J (2005) A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J* 24:2839-2850.
- Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P (2011) Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci* 13:7-21.
- Ehmann N, van de Linde S, Alon A, Ljaschenko D, Keung XZ, Holm T, Rings A, DiAntonio A, Hallermann S, Ashery U, Heckmann M, Sauer M, Kittel RJ (2014) Quantitative Super-Resolution Imaging of Active Zone States. In revision.
- Fatt P, Katz B (1952) Some problems of neuro-muscular transmission. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 17:275-280.
- Fernández-Chacón R, Königstorfer A, Gerber SH, García J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41-49.
- Fioravante D, Regehr WG (2011) Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 21:269-274.
- Frotscher M (1996) Synaptic Transmission. In: Greger R und Windhorst U (Hg.) *Comprehensive Human Physiology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 321-334.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Südhof TC (1994) Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79:717-727.
- Gracheva EO, Hadwiger G, Nonet ML, Richmond JE (2008) Direct interactions between *C. elegans* RAB-3 and Rim provide a mechanism to target vesicles to the presynaptic density. *Neurosci Lett* 444:137-142.
- Graf ER, Daniels RW, Burgess RW, Schwarz TL, DiAntonio A (2009) Rab3 dynamically controls protein composition at active zones. *Neuron* 64:663-677.
- Graf ER, Valakh V, Wright CM, Wu C, Liu Z, Zhang YQ, DiAntonio A (2012) RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* 32:16586-16596.

Referenzen

- Grobler JA, Hurley JH (1997) Similarity between C2 domain jaws and immunoglobulin CDRs. *Nat Struct Biol* 4:261-262.
- Groffen AJ, Martens S, Díez Arazola R, Cornelisse LN, Lozovaya N, de Jong AP, Goriounova NA, Habets RL, Takai Y, Borst JG, Brose N, McMahon HT, Verhage M (2010) Doc2b is a high-affinity Ca^{2+} sensor for spontaneous neurotransmitter release. *Science* 327:1614-1618.
- Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004) Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* 166:1775-1782.
- Guerrero G, Reiff DF, Agarwal G, Ball RW, Borst A, Goodman CS, Isacoff EY (2005) Heterogeneity in synaptic transmission along a *Drosophila* larval motor axon. *Nat Neurosci* 8:1188-1196.
- Gustavsson N, Han W (2009) Calcium-sensing beyond neurotransmitters: functions of synaptotagmins in neuroendocrine and endocrine secretion. *Biosci Rep* 29:245-259.
- Haddad DM, Vilain S, Vos M, Esposito G, Matta S, Kalscheuer VM, Craessaerts K, Leyssen M, Nascimento RM, Vianna-Morgante AM, De Strooper B, Van Esch H, Morais VA, Verstreken P (2013) Mutations in the intellectual disability gene *Ube2a* cause neuronal dysfunction and impair parkin-dependent mitophagy. *Mol Cell* 50:831-843.
- Hallermann S, Kittel RJ, Wichmann C, Weyhersmüller A, Fouquet W, Mertel S, Oswald D, Eimer S, Depner H, Schwärzel M, Sigrist SJ, Heckmann M (2010) Naked dense bodies provoke depression. *J Neurosci* 30:14340-14345.
- Han Y, Kaeser PS, Südhof TC, Schneggenburger R (2011) RIM determines Ca^{2+} channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. *Neuron* 69:304-316.
- Heckmann M, Dudel J (1995) Recordings of glutamate-gated ion channels in outside-out patches from *Drosophila* larval muscle. *Neurosci Lett* 196:53-56.
- Heilemann M, van de Linde S, Schüttpelz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M (2008) Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:6172-6176.
- Heisenberg M, Wolf R, Brembs B (2001) Flexibility in a single behavioral variable of *Drosophila*. *Learn Mem* 8:1-10.
- Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Vologodskaja M, Hudspeth AJ, Lesage F (2002) RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca^{2+} channels. *Neuron* 34:411-423.
- Hoang B, Chiba A (2001) Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev Biol* 229:55-70.
- Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1949) Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci physiol* 3:129-150.

Referenzen

- Hofbauer A (1991) Eine Bibliothek monoklonaler Antikörper gegen das Gehirn von *Drosophila melanogaster*. Habilitation thesis. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Deutschland.
- Hoyle G, Wiersma CA (1958) Excitation at neuromuscular junctions in Crustacea. *J Physiol* 143:403-425.
- Jahn R, Fasshauer D (2012) Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* 490:201-207.
- Johnson S, Halford S, Morris AG, Patel RJ, Wilkie SE, Hardcastle AJ, Moore AT, Zhang K, Hunt DM (2003) Genomic organisation and alternative splicing of human RIM1, a gene implicated in autosomal dominant cone-rod dystrophy (CORD7). *Genomics* 81:304-314.
- Jorgensen EM, Hartweg E, Schuske K, Nonet ML, Jin Y, Horvitz HR (1995) Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 378:196-199.
- Kaesler PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC (2011) RIM proteins tether Ca^{2+} channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144:282-295.
- Kandel ER (2007) Auf der Suche nach dem Gedächtnis: Die Entstehung einer neuen Wissenschaft des Geistes. Pantheon Verlag, Verlagsgruppe Random House GmbH.
- 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.
- Katz B (1936) Neuro-muscular transmission in crabs. *J Physiol* 87:199-221.
- Katz B (1969) The Release of Neural Transmitter Substances. Liverpool Univ Press, Liverpool, U.K.
- Katz B, Miledi R (1965a) The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161:496-503.
- Katz B, Miledi R (1965b) The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161:483-495.
- Katz B, Miledi R (1965c) The effect of temperature on the synaptic delay at the neuromuscular junction. *J Physiol* 181:656-670.
- Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca^{2+} channel clustering, and vesicle release. *Science* 312:1051-1054.
- Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y (2007) RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to

Referenzen

- presynaptic Ca^{2+} channels. *Nat Neurosci* 10:691-701.
- Kohler RE (1994) *Lords of the fly: Drosophila Genetics and the Experimental Life*. The University of Chicago Press, Chicago & London, USA.
- Koushika SP, Richmond JE, Hadwiger G, Weimer RM, Jorgensen EM, Nonet ML (2001) A post-docking role for active zone protein Rim. *Nat Neurosci* 4:997-1005.
- Kurdyak P, Atwood HL, Stewart BA, Wu CF (1994) Differential physiology and morphology of motor axons to ventral longitudinal muscles in larval *Drosophila*. *J Comp Neurol* 350:463-472.
- Lin JW, Faber DS (2002) Modulation of synaptic delay during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25:449-455.
- Littleton JT, Stern M, Schulze K, Perin M, Bellen HJ (1993) Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca^{2+} -activated neurotransmitter release. *Cell* 74:1125-1134.
- Littleton JT, Bai J, Vyas B, Desai R, Baltus AE, Garment MB, Carlson SD, Ganetzky B, Chapman ER (2001) synaptotagmin mutants reveal essential functions for the C2B domain in Ca^{2+} -triggered fusion and recycling of synaptic vesicles in vivo. *J Neurosci* 21:1421-1433.
- Liu KS, Siebert M, Mertel S, Knoche E, Wegener S, Wichmann C, Matkovic T, Muhammad K, Depner H, Mettke C, Bückers J, Hell SW, Müller M, Davis GW, Schmitz D, Sigrist SJ (2011) RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science* 334:1565-1569.
- Ljaschenko D, Ehmann N, Kittel RJ (2013) Hebbian plasticity guides maturation of glutamate receptor fields in vivo. *Cell Rep* 3:1407-1413.
- Lnenicka GA, Keshishian H (2000) Identified motor terminals in *Drosophila* larvae show distinct differences in morphology and physiology. *J Neurobiol* 43:186-197.
- Loewen CA, Lee SM, Shin YK, Reist NE (2006) C₂B polylysine motif of synaptotagmin facilitates a Ca^{2+} -independent stage of synaptic vesicle priming in vivo. *Mol Biol Cell* 17:5211-5226.
- Mace KE, Biela LM, Sares AG, Reist NE (2009) Synaptotagmin I stabilizes synaptic vesicles via its C₂A polylysine motif. *Genesis* 47:337-345.
- Mackler JM, Reist NE (2001) Mutations in the second C2 domain of synaptotagmin disrupt synaptic transmission at *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Comp Neurol* 436:4-16.
- Mackler JM, Drummond JA, Loewen CA, Robinson IM, Reist NE (2002) The C₂B Ca^{2+} -binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature* 418:340-344.
- Markstein M, Pitsouli C, Villalta C, Celniker SE, Perrimon N (2008) Exploiting position

Referenzen

- effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nat Genet* 40:476-483.
- Marrus SB, DiAntonio A (1994) Preferential localization of glutamate receptors opposite sites of high presynaptic release. *Curr Biol* 14:924-931.
- Matthew WD, Tsavaler L, Reichardt LF (1981) Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *J Cell Biol* 91:257-269.
- Meinrenken CJ, Borst JG, Sakmann B (2003) Local routes revisited: the space and time dependence of the Ca^{2+} signal for phasic transmitter release at the rat calyx of Held. *J Physiol* 547:665-689.
- Melom JE, Akbergenova Y, Gavornik JP, Littleton JT (2013) Spontaneous and evoked release are independently regulated at individual active zones. *J Neurosci* 33:17253-17263.
- Miki T, Kiyonaka S, Uriu Y, De Waard M, Wakamori M, Beedle AM, Campbell KP, Mori Y (2007) Mutation associated with an autosomal dominant cone-rod dystrophy CORD7 modifies RIM1-mediated modulation of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Channels* 1:144-147.
- Müller M, Liu KS, Sigrist SJ, Davis GW (2012) RIM controls homeostatic plasticity through modulation of the readily-releasable vesicle pool. *J Neurosci* 32:16574-16585.
- Murthy VN, Schikorski T, Stevens CF, Zhu Y (2001) Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron* 32:673-682.
- Nalefski EA, Falke JJ (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 12:2375-2390.
- Neher E, Sakaba T (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59:861-872.
- Nonet ML, Grundahl K, Meyer BJ, Rand JB (1993) Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin. *Cell* 73:1291-1305.
- Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai Y (2002) Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol* 158:577-590.
- Palade GE, Palay SL (1954) Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat Rec* 118:335-336.
- Pang ZP, Bacaj T, Yang X, Zhou P, Xu W, Südhof TC (2011) Doc2 supports spontaneous synaptic transmission by a Ca^{2+} -independent mechanism. *Neuron* 70:244-251.
- Pawlu C, DiAntonio A, Heckmann M (2004) Postfusional control of quantal current shape. *Neuron* 42:607-618.

Referenzen

- Peled ES, Isacoff EY (2011) Optical quantal analysis of synaptic transmission in wild-type and rab3-mutant *Drosophila* motor axons. *Nat Neurosci* 14:519-526.
- Peled ES, Newman ZL, Isacoff EY (2014) Evoked and spontaneous transmission favored by distinct sets of synapses. *Curr Biol* 24:484-493.
- Perin MS, Fried VA, Mignery GA, Jahn R, Südhof TC (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345:260-263.
- Perin MS, Brose N, Jahn R, Südhof TC (1991) Domain structure of synaptotagmin (p65) *J Biol Chem* 266:623-629.
- Poskanzer KE, Marek KW, Sweeney ST, Davis GW (2003) Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo. *Nature* 426:559-563.
- Powell CM, Schoch S, Monteggia L, Barrot M, Matos MF, Feldmann N, Südhof TC, Nestler EJ (2004) The presynaptic active zone protein RIM1alpha is critical for normal learning and memory. *Neuron* 42:143-153.
- Reist NE, Buchanan J, Li J, DiAntonio A, Buxton EM, Schwarz TL (1998) Morphologically docked synaptic vesicles are reduced in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. *J Neurosci* 18:7662-7673.
- Rizo J, Südhof TC (1998) C2-domains, structure and function of a universal Ca^{2+} -binding domain. *J Biol Chem* 273:15879-15882.
- Rosenmund C, Clements JD, Westbrook GL (1993) Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science* 262:754-757.
- Rozov A, Burnashev N, Sakmann B, Neher E (2001) Transmitter release modulation by intracellular Ca^{2+} buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics. *J Physiol* 531:807-826.
- Saraswati S, Adolfsen B, Littleton JT (2007) Characterization of the role of the Synaptotagmin family as calcium sensors in facilitation and asynchronous neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci* 104:14122-14127.
- Schmid A, Sigrist SJ (2008) *Methods in Molecular Biology: Drosophila: Methods and Protocols*, Humana Press Inc, Totowa, NJ.
- Schmidt H, Brachtendorf S, Arendt O, Hallermann S, Ishiyama S, Bornschein G, Gall D, Schiffmann SN, Heckmann M, Eilers J (2013) Nanodomain coupling at an excitatory cortical synapse. *Curr Biol* 23:244-249.
- Schneggenburger R, Forsythe ID (2006) The calyx of Held. *Cell Tissue Res* 326:311-337.
- Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC, Südhof TC (2002) RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* 415:321-326.

Referenzen

- Schonn JS, Maximov A, Lao Y, Südhof TC, Sørensen JB (2008) Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca^{2+} sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci* 105:3998-4003.
- Shapiro L, Colman DR (1999) The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron* 23:427-430.
- Sisodiya SM, Thompson PJ, Need A, Harris SE, Weale ME, Wilkie SE, Michaelides M, Free SL, Walley N, Gumbs C, Gerrelli D, Ruddle P, Whalley LJ, Starr JM, Hunt DM, Goldstein DB, Deary IJ, Moore AT (2007) Genetic enhancement of cognition in a kindred with cone-rod dystrophy due to RIMS1 mutation. *J Med Genet* 44:373-380.
- Sørensen JB, Fernández-Chacón R, Südhof TC, Neher E (2003) Examining synaptotagmin 1 function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca^{2+} . *J Gen Physiol* 122:265-276.
- Stewart BA, Atwood HL, Renger JJ, Wang J, Wu CF (1994) Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol* 175:179-191.
- Südhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11-25.
- Südhof TC (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80:675-690.
- Sun J, Pang ZP, Qin D, Fahim AT, Adachi R, Südhof TC (2007) A dual- Ca^{2+} -sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature* 450:676-682.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831-846.
- Takao-Rikitsu E, Mochida S, Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Inoue M, Ohtsuka T, Takai Y (2004) Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon, in neurotransmitter release. *J Cell Biol* 164:301-311.
- Taschenberger H, von Gersdorff H (2000) Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 20:9162-9173.
- Tsien RY (2013) Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. *Proc Natl Acad Sci* 110:12456-12461.
- Uriu Y, Kiyonaka S, Miki T, Yagi M, Akiyama S, Mori E, Nakao A, Beedle AM, Campbell KP, Wakamori M, Mori Y (2010) Rab3-interacting molecule gamma isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long lasting currents but block neurotransmitter vesicle anchoring in voltage-dependent P/Q-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 285:21750-21767.
- van de Linde S, Kasper R, Heilemann M, Sauer M (2008) Photoswitching microscopy with standard fluorophores. *Applied Physics B-Lasers and Optics* 93:725-731.

Referenzen

- van de Linde S, Löschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M (2011) Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc* 6:991-1009.
- Venken KJ, Bellen HJ (2005) Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 6:167-178.
- Venken KJ, Bellen HJ (2007) Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. *Development* 134:3571-3584.
- Voets T, Moser T, Lund PE, Chow RH, Geppert M, Südhof TC, Neher E (2001) Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci* 98:11680-11685.
- Vyleta NP, Jonas P (2014) Loose coupling between Ca²⁺ channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science* 343:665-670.
- Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck 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.
- Waldeck RF, Pereda A, Faber DS (2000) Properties and plasticity of paired-pulse depression at a central synapse. *J Neurosci* 20:5312-5320.
- Walter AM, Groffen AJ, Sørensen JB, Verhage M (2011) Multiple Ca²⁺ sensors in secretion: teammates, competitors or autocrats? *Trends Neurosci* 34:487-497.
- Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, Jackson MB (2001) Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 294:1111-1115.
- Wang CT, Lu JC, Bai J, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, Jackson MB (2003) Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature* 424:943-947.
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593-598.
- Wang Y, Liu X, Biederer T, Südhof TC (2002) A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones. *Proc Natl Acad Sci* 99:14464-14469.
- Wang Y, Südhof TC (2003) Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins. *Genomics* 81:126-137.
- Weimer RM, Gracheva EO, Meyrignac O, Miller KG, Richmond JE, Bessereau JL (2006) UNC-13 and UNC-10/rim localize synaptic vesicles to specific membrane domains. *J Neurosci* 26:8040-8047.
- Wolter S, Schüttpelz M, Tscherepanow M, van de Linde S, Heilemann M, Sauer M (2010) Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *J*

Referenzen

Microsc 237:12-22.

Wu LG, Borst JG (1999) The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron* 23:821-832.

Xu J, Mashimo T, Südhof TC (2007) Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca^{2+} sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* 54:567-581.

Xu J, Pang ZP, Shin OH, Südhof TC (2009) Synaptotagmin-1 functions as a Ca^{2+} sensor for spontaneous release. *Nat Neurosci* 12:759-766.

Yang YM, Fedchyshyn MJ, Grande G, Aitoubah J, Tsang CW, Xie H, Ackerley CA, Trimble WS, Wang LY (2010) Septins regulate developmental switching from microdomain to nanodomain coupling of Ca^{2+} influx to neurotransmitter release at a central synapse. *Neuron* 67:100-115.

Young SM Jr, Neher E (2009) Synaptotagmin has an essential function in synaptic vesicle positioning for synchronous release in addition to its role as a calcium sensor. *Neuron* 63:482-496.

Zhai RG, Bellen HJ (2004) The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology Bethesda* 19:262-270.

9 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Manfred Heckmann, dass er mein Interesse an Forschung und insbesondere den Neurowissenschaften geweckt hat und stets fördert. Die gemeinsame elektrophysiologische Arbeit und stete Betreuung bei Experimenten war für meine Ausbildung entscheidend. Ohne ihn würde diese Arbeit nicht in heutiger Form existieren.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Anna-Leena Sirén für die Begutachtung meiner Dissertation.

Ich danke Herrn Dr. Dr. Tobias Langenhan für seine Hilfe bei genetischen und molekularbiologischen Fragen und die Zusammenarbeit im RIM-Projekt. Herrn Dr. Robert J. Kittel danke ich für die Hilfe beim Erlernen der Präparationstechniken und die Zusammenarbeit im Synaptotagmin-Projekt. Beiden danke ich für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit und dass sie in den vergangenen Jahren dazu beitrugen mich in die Wissenschaft und Neurophysiologie einzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frauke Köhler für jegliche Unterstützung im Rahmen der experimentellen Arbeit insbesondere bei der Erstellung und Auswertung der Bilddaten, sowie für ihren Arbeitseinsatz und das stetig wachsende Vertrauen. Des Weiteren möchte ich Tanja Martini für ihr Engagement bei den Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Messungen danken. Ich danke Herrn Dr. Martin Pauli für die Etablierung optischer Methoden und die Unterstützung bei der Lösung experimenteller Probleme, die mir die Erstellung dieser Arbeit erleichtert haben. Nadine Ehmann danke ich für die Unterstützung im Rahmen der dSTORM-Messungen. Nicole Hartmann danke ich für Hilfestellungen bei Genetik und Immunhistochemie, sowie anregende Diskussionen im Synaptotagmin-Projekt. Allen weiteren Mitarbeitern des Physiologischen Instituts Würzburg gilt mein Dank für ihre Unterstützung auf meinem Weg.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Markus Sauer und den Mitarbeitern seiner Abteilung für die Vermittlung der nanoskopischen Perspektive auf diese Welt.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jens Eilers für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut, für die Hilfe bei elektrophysiologischen

Danksagung

Analysen und die stimulierenden Diskussionen bedanken. Herrn Prof. Dr. Stefan Hallermann danke ich für seine Unterstützung beim Erlernen diverser für diese Arbeit benötigter Fähigkeiten. Außerdem danke ich beiden dafür, dass sie mich dazu anregten und immer wieder begeistern neurowissenschaftliche Probleme und Fragestellungen zu bearbeiten.

Ich danke Stefan für die Unterstützung und sein Verständnis im Rahmen der Fertigstellung dieser Arbeit. Ebenso danke ich meinem Bruder für die Motivation, die er mir bewusst oder unbewusst gibt und meiner gesamten Familie für die Begleitung. In besonderem Maße gilt mein Dank meinen Eltern, die mich in jeder Lebenslage und auch bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und gefördert haben.

10 Lebenslauf

Mila Marie Paul

geboren am 24. Juni 1987 in Haan, Nordrhein-Westfalen, Deutschland

Schulbildung und Studium

06/2006 Abitur am Städtischen Gymnasium Wülfrath
2006-2012 Studium der Humanmedizin in Leipzig, Universität Leipzig
12/2012 Staatsexamen und Approbation als Ärztin

Klinische Ausbildung

02/2009 Pädiatrie, Wuppertal (Famulatur)
08/2009 Orthopädie, Royal Infirmary of Edinburgh, Schottland (Famulatur)
02/2010 Neurochirurgie, Universitätsklinikum Würzburg (Famulatur)
08/2010 Chirurgie, Hospital General de México, Mexico City (Famulatur)
02/2011 Psychiatrie, Universitätsklinikum Würzburg (Famulatur)
2011 Neurochirurgie, Universitätsklinikum Leipzig (PJ)
2011 Chirurgie, Rambam Health Care Campus, Haifa, Israel (PJ)
2012 Kardiologie, Herzzentrum Leipzig (PJ)
2012 Gastroenterologie, Universitätsklinikum Leipzig (PJ)
2012 Neurologie, Universitätsklinikum Leipzig (Wahlterial PJ)

Wissenschaftliche Arbeit

2007/08 Präparationen für Fortgeschrittene (vorklinisches Wahlfach) und wissenschaftliche Arbeit im 4. Semester als Tutorin im Präparierkurs. Institut für Anatomie, Universität Leipzig (damals Lehrstuhl Prof. Dr. K. Spänel-Borowski)
2009-2013 Studien zur synaptischen Übertragung. Physiologisches Institut, Universität Würzburg (Lehrstuhl Prof. Dr. med. M. Heckmann) und Physiologisches Institut, Universität Leipzig (Lehrstuhl Prof. Dr. med. J. Eilers)
2011-2013 Teilnahme am Lebenswissenschaftlichen Kolleg der Studienstiftung des Deutschen Volkes, AG 4 Zelluläre und

Lebenslauf

Molekulare Neurobiologie (Leitung: Prof. Dr. med. Thomas Kuner, Anatomisches Institut Heidelberg und Prof. Dr. rer. nat. Andreas Schäfer, MRC National Institute for Medical Research, London)

02/2013-heute wissenschaftliche Mitarbeiterin am Physiologischen Institut, Universität Würzburg (Lehrstuhl Prof. Dr. med. M. Heckmann)

Lehrtätigkeit

04/2013-heute Betreuung des Praktikums der Physiologie für Studenten der Human- und Zahnmedizin im 3. und 4. Fachsemester

10/2013-heute Seminar der Physiologie für Studenten der Humanmedizin im 4. Fachsemester

Stipendien

2010-2012 Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Mitgliedschaften

seit 04/2011 Mitglied der Deutschen Physiologischen Gesellschaft (DPG)

seit 04/2011 aktive Gestaltung der DPG-Untergruppe „Junge Physiologen“ mit Organisation von Symposien (09/2011 und 10/2013), DFG-Infoveranstaltung (03/2012), Vorträgen (03/2012 und 03/2013)

seit 02/2013 Alumni der Studienstiftung des Deutschen Volkes

seit 05/2013 Mitglied der Society for Neuroscience (SfN)

Wissenschaftliche Präsentationen

Paul M, Ljaschenko D, Heckmann M, Kittel RJ. (2010) Rabphilin supports evoked synaptic release in *Drosophila*. The Society for Neuroscience, Annual Meeting in San Diego, USA (Poster-Präsentation)

Paul M, Heckmann M (2011) Vesikelverkehr in aktiven Zonen. Von-Frey Symposium Lehrstuhl für Physiologie, Schwerpunkt Neurophysiologie, Universität Würzburg (Vortrag)

Paul M, Ljaschenko D, Heckmann M, Kittel RJ (2011) Rabphilin supports evoked synaptic release in *Drosophila*. 90. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Regensburg (Poster-Präsentation)

Paul M, Heckmann M, Gehring J, DiAntonio A, Kittel RJ, Langenhan T (2012) Human *CORD-7* RIM-mutation alters presynaptic function in *Drosophila*. 91. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden (Poster-Präsentation)

Lebenslauf

Paul M, Heckmann M, Gehring J, DiAntonio A, Kittel RJ, Langenhan T (2012) Human CORD-7 RIM-mutation alters presynaptic function in *Drosophila*. Abschluss-symposium des SFB 581 Molekulare Modelle für Erkrankungen des Nervensystems, Universität Würzburg (Poster-Präsentation)

Langenhan T, Paul M, Gehring J, Kittel RJ, DiAntonio A, Hatzopoulos G, Shiroma J, Vakonakis I, Heckmann M (2013) Conserved structure of the RIM C₂A domain and CORD7 site position. 92. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Heidelberg (Poster-Präsentation)

Paul M, Kittel RJ, Heckmann M (2013) Bruchpilot and Synaptotagmin – partners for rapid neurotransmitter release? The Society for Neuroscience, Annual Meeting in San Diego, USA (Poster-Präsentation)

Paul M, Kittel RJ, Heckmann M (2014) Bruchpilot and Synaptotagmin are partners for rapid neurotransmitter release. 93. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Mainz (Vortrag)

Paul M, Kittel RJ, Heckmann M (2014) Bruchpilot and Synaptotagmin are partners for rapid neurotransmitter release. Active Zone Meeting, Universität Würzburg (Poster-Präsentation)

Publikationen

Paul M, Heckmann M, Gehring J, DiAntonio A, Hatzopoulos G, Shiroma J, Vakonakis I, Langenhan T (2014) Human CORD7 RIM-mutation modulates presynaptic plasticity in *Drosophila*. (in preparation)

Paul M, Kittel RJ, Heckmann M (2014) Bruchpilot and Synaptotagmin are essential teammates for active zone differentiation. (in preparation)