

Einfluss von RSK auf die Aktivität von ERK, den axonalen
Transport und die synaptische Funktion in Motoneuronen von
Drosophila melanogaster



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katherina Beck

aus Stuttgart

Würzburg, Februar 2016

Eingereicht am

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender Prof. Dr. Thomas Rudel

Gutachter Prof. Dr. Thomas Raabe

Gutachter Prof. Dr. Charlotte Förster

Tag des Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Erklärung

Erklärung gemäß §4 Abs.3.S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15.März 1999 in der Fassung vom 12.August 2009.

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich erkläre, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre, dass ich außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich belegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 10. Februar 2016

Katherina Beck

Meinem Papa

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das larvale Nervensystem System von <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2	Aufbau des larvalen neuromuskulären Systems von <i>Drosophila</i>	1
1.3	Die neuromuskuläre Synapse von <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.4	Aufbau der postsynaptischen Seite.....	5
1.5	Aufbau der Aktiven Zone.....	7
1.6	Synaptische Plastizität.....	9
1.7	Axonaler Transport.....	9
1.8	Motorproteine.....	12
1.9	Transport von präsynaptischem Material.....	13
1.10	Axonaler Transport von Mitochondrien.....	15
1.11	RSK, die p90 ribosomale S6Kinase II.....	16
1.12	Die Struktur von RSK.....	17
1.13	Der Aktivierungsmechanismus von RSK.....	18
1.14	Bedeutung von RSK im MAPK-Signalweg.....	19
1.15	Die Regulation zellulärer Prozesse durch RSK.....	20
1.16	Neuronale Funktionen von RSK.....	22
1.17	Coffin-Lowry-Syndrom.....	23
1.18	Fragestellung und Zielsetzung.....	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material.....	25

2.1.1	Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	25
2.1.2	Reagenzien.....	25
2.1.3	Kits.....	25
2.1.4	Geräte.....	25
2.1.5	Software.....	26
2.1.6	Lösungen und Puffer.....	26
2.1.7	Primer.....	28
2.1.8	Antikörper.....	29
2.1.9	Fliegenlinien.....	30
2.1.10	<i>Drosophila</i> Aufzucht.....	31
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Herstellung transgener Fliegen.....	31
2.2.2	Herstellung von Lysaten der Ventralganglien.....	32
2.2.3	Herstellung von Lysaten aus adulten Köpfen.....	32
2.2.4	SDS-PAGE und Western Blot.....	33
2.2.5	Immunfluoreszenzfärbungen.....	33
2.2.6	<i>In vivo</i> Live-imaging von intakten Larven im frühen dritten Larvenstadium.....	35
2.2.7	Elektrophysiologie.....	35
2.2.8	Statistische Datenanalyse.....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Herstellung genomischer RSK-Rettungskonstrukte.....	37
3.2	Lokalisierung von RSK in den Motoneuronen.....	40

3.3	Lokalisierung von RSK und aktiviertem ERK in den Motoneuronen.....	41
3.4	Einfluss von RSK auf die Aktivität von ERK in Motoneuronen.....	43
3.5	Verlust von RSK verändert die Struktur und Funktion von neuromuskulären Synapsen.....	48
3.6	Einfluss von RSK auf die Boutons der neuromuskulären Synapse.....	53
3.7	Einfluss von RSK auf die Struktur von neuromuskulären Synapsen in Abhängigkeit von ERK.....	56
3.8	Effekt von RSK auf die synaptische Transmission.....	61
3.9	RSK wird für den axonalen Transport benötigt.....	63
4	Diskussion.....	67
4.1	Die Lokalisierung von RSK an der neuromuskulären Synapse.....	68
4.2	Lokalisierung von ERK und RSK in den Motoneuronen.....	68
4.3	Einfluss von RSK auf die Struktur und Funktion der neuromuskulären Synapse.....	69
4.4	Einfluss von RSK auf die Struktur und Funktion der neuromuskulären Synapse in Abhängigkeit der Aktivität von ERK.....	72
4.5	Der Verlust von RSK führt zu Defekten im axonalen Transport.....	76
4.6	Ausblick.....	79
5	Zusammenfassung.....	81
6	Summary.....	83
7	Danksagung.....	85
8	Publikationen.....	87

9	Abkürzungen.....	88
10	Literaturverzeichnis.....	91

1. Einleitung

1.1 Das larvale Nervensystem System von *Drosophila melanogaster*

Untersuchungen des Nervensystems von *Drosophila* haben maßgeblich zum Verständnis der Neurobiologie beigetragen. Die Verwendung der Vielzahl an genetischen Werkzeugen hat wichtige Entdeckungen zur Entwicklung und Funktion des Nervensystems ermöglicht (Bellen, 2010). Beispielsweise erlaubt das UAS-GAL4-System, das ursprünglich in Hefen entdeckt wurde, die zeitlich und räumlich kontrollierte Expression beliebiger DNA-Fragmente (Brand and Perrimon 1993).

Durch die leichte Zugänglichkeit eignet sich das larvale neuromuskuläre System von *Drosophila* als Modellsystem zur Untersuchung einer Vielzahl von Fragestellungen in der Neurobiologie, wie beispielsweise die Mechanismen der Neurotransmitter-Freisetzung sowie der funktionellen und strukturellen synaptischen Plastizität (Griffith and Budnik 2006). Da für die meisten Gene, deren Mutation beim Menschen mit neuropathologischen Defekten assoziiert ist, ein Homolog in Fliegen vorkommt, stellt *Drosophila* einen guten Modellorganismus zur Untersuchung dieser neuropathologischen Erkrankungen dar, wie die Forschung an ALS (Amyotrophe Lateralsklerose) oder der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit zeigen (Reiter, 2001; Greeve, 2004; Watson, 2008; Fernandes, 2011).

1.2 Aufbau des larvalen neuromuskulären Systems von *Drosophila*

Das larvale neuromuskuläre System von *Drosophila* ist einfach aufgebaut und besteht aus 32 Motoneuronen in jedem Hemisegment des Ventralganglions, die während der embryonalen Entwicklung gebildet werden (Bossing, 1996; Landgraf, 1997). Die Zellkörper der Motoneurone liegen im Cortex des Ventralganglions. Während der Embryonalentwicklung strecken sich die Axone aus dem Ventralganglion in die Peripherie aus. Die Motoneurone werden aufgrund ihrer Wegfindungsmechanismen, der Wachstumsbahn des Axons und der Art des zu innervierenden Muskels in drei Klassen und fünf Unterklassen aufgeteilt: Segmentalnerven (SNa und SNc), Intersegmentalnerven (ISN, ISNb und ISNd) oder Transversalnerven (TN) (Hoang and Chiba 2001). In jedem Hemisegment befinden sich 30 lange und durch ihre Position einfach zu bestimmende Muskelfasern, die sich in jedem

Abdominalsegment wiederholen (Abb. 1.1). Jedes Motoneuron verzweigt in einem charakteristischen Muster und innerviert bestimmte Muskelgruppen oder einzelne Muskeln. Fast jeder Muskel wird somit von mehreren Motoneuronen innerviert (Abb. 1.1) (Crossley, 1978; Keshishian and Chiba, 1993). Motoneurone sind anhand der hauptsächlich sekretierten Neurotransmitter in drei verschiedene Typen unterteilt. In *Drosophila* ist die häufigste Klasse die der Typ I-Motoneurone, die hauptsächlich den Neurotransmitter Glutamat ausschütten. Die Termini der Typ I-Motoneurone bilden glutamaterge Synapsen mit dem zu innervierenden Muskel. Durch die synaptische Transmission dieser Motoneurone wird die Muskelkontraktion stimuliert (Jan and Jan 1976; Johansen, 1989; Landgraf, 1997). Die beiden anderen Klassen von Motoneuronen, Typ II und Typ III, setzen hauptsächlich den Neurotransmitter Octopamin oder Neuropeptide frei, zudem enthalten sie aber auch Glutamat-gefüllte Vesikel (Cantera and Nassel, 1992; Monastirioti, 1995).

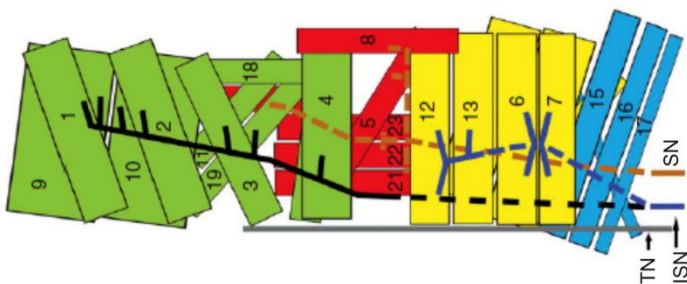


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Axonwege von Motoneuronen

Exemplarisch abgebildet sind die Innervierungsmuster des Intersegmentalnervs (IS), Segmentalnervs (SN) und des Transversalnervs (TN), wobei für den SN-Nerv nur SNa gezeigt ist. In dieser Darstellung sind nicht alle Muskeln und Motoneurone enthalten. Die gestrichelte Linie soll die Bereiche beschreiben, in denen der Nerv unterhalb der Muskeln liegt. Aus Menon, 2013.

Die stereotype Struktur der neuromuskulären Synapsen, der Innervierung eines Muskels in einem Abdominalsegment, weist das gleiche Verzweigungsmuster an einer Muskelfaser in verschiedenen Abdominalsegmenten auf. Der einfache Aufbau des neuromuskulären Systems und das stereotype Verzweigungsmuster der Motoneurone ermöglichen einzelne neuromuskuläre Synapsen zu identifizieren und identische Synapsen zwischen unterschiedlichen Tieren zu vergleichen (Keshishian and Chiba, 1993).

1.3 Die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila melanogaster*

Die molekulare Maschinerie von Synapsen ist hoch-konserviert, weshalb die grundlegenden funktionellen und strukturellen Prinzipien in Modellorganismen wie *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* untersucht werden können (Ruiz-Canada and Budnik, 2006).

Die larvalen neuromuskulären Synapsen von *Drosophila* sind glutamaterg und verwenden ionotrope Glutamatrezeptoren, deren Untereinheiten homolog zu den Untereinheiten der Glutamatrezeptoren des AMPA-Typs (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) im zentralen Nervensystem der Vertebraten sind (Schuster, 1991; Ultsch, 1992; Betz, 1993; Marrus, 2004; Featherstone, 2005; Qin, 2005). Auf der Oberfläche embryonaler Muskeln sind die Glutamatrezeptoren homogen verteilt. Erst nachdem der Wachstumskegel des Axons den Muskel erreicht hat, verdichten sie sich an der Kontaktstelle zusammen mit DLG (Disc large, Lahey, 1994), dem *Drosophila* Ortholog von PSD-95, ein postsynaptisches Gerüstprotein aus Säugern, als Antwort auf die Freisetzung von Glutamat der präsynaptischen Seite. Daraufhin differenziert der Wachstumskegel des Axons zu präsynaptische Termini (Broadie and Bate, 1993a and b; Featherstone, 2005). An jeder Muskelfaser hat sich bis zum Ende der Embryonalentwicklung eine funktionelle neuromuskuläre Synapse mit einer definierten Anzahl an synaptischen Endknöpfchen (Boutons) gebildet. Boutons beherbergen die synaptischen Verbindungen und enthalten mehrere Aktive Zonen, die zur Freisetzung von Neurotransmittern dienen. Jeder Aktiven Zone liegt ein Glutamatrezeptorfeld gegenüber (Abb. 1.3) (Jan and Jan, 1976).

Während der larvalen Entwicklung dringen die Glutamatrezeptorfelder tiefer in den Muskel ein und werden von Einstülpungen der Muskelmembran, dem Subsynaptischen Retikulum (SSR) umschlossen, das Rezeptoren, Gerüstproteine und postsynaptische Signalkomplexe enthält (Broadie and Bate, 1993a; Chen and Featherstone, 2005). In jedem Entwicklungsstadium der Larve und an den individuellen Muskeln weisen Typ I-Motoneurone eine stereotype Morphologie auf: ein fast reproduzierbares Verzweigungsmuster, eine bestimmte Eintrittsstelle des Nervs und eine Synapsen-spezifische Anzahl an Boutons (Budnik, 1990; Broadie and Bate, 1993a; Yoshihara, 1997). Während der Entwicklung vom frühen Embryonalstadium bis zum wandernden dritten Larvenstadium wächst die Fläche der Muskeln um das 100-Fache an. Um diese Veränderung zu bewältigen und die Stärke der synaptischen Transmission zu bewahren, werden während dieser Entwicklung stetig neue Boutons hinzugefügt. In dieser Entwicklungsphase wird die Anzahl der Boutons um das 10-fache, die Anzahl der Aktiven

Zonen um das bis zu 100-Fache erhöht (Atwood, 1993; Schuster, 1996). Die neuromuskulären Synapsen eignen sich als Modell zur Untersuchung der synaptischen Plastizität, da während des Muskelwachstums ihre Struktur stark verändert wird (Collins and DiAntonio, 2007). Im wandernden dritten Larvenstadium wurden zur Innervierung eines Muskels in einem Abdominalsegment in einer neuromuskulären Synapse etwa 20 - 50 Typ I-Boutons gebildet, die jeweils etwa 10 Aktive Zonen enthalten. Die neuromuskuläre Synapse der Muskeln 6/7, die in vielen Studien untersucht wird, innerviert zwei Muskeln und hat somit auch die doppelte Anzahl Boutons, Aktiver Zonen und Glutamatrezeptorfelder (Abb. 1.2) (Keshishian, 1993; Budnik, 2006).

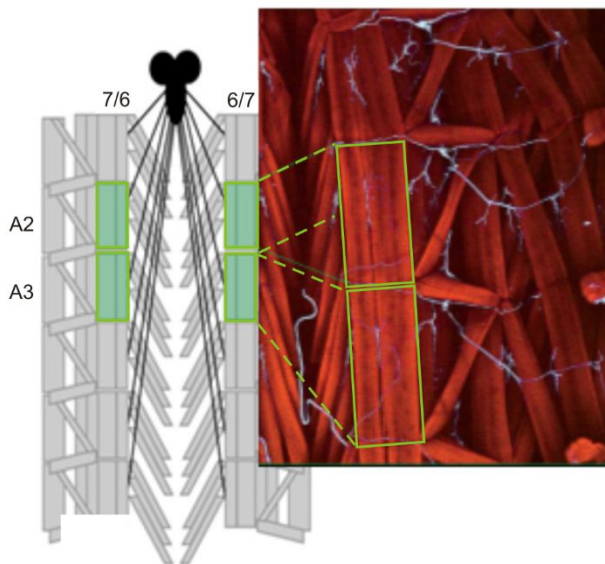


Abb. 1.2 Darstellung des Hautmuskelschlauchs von *Drosophila* im dritten Larvenstadium

Die Muskel 6/7 in den Abdominalsegmenten A2 und A3, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind in grün markiert. **(Links)** Schematische Darstellung des Hautmuskelschlauchs. Verändert nach Hoylab.cornell.edu. **(Rechts)** Präparation des Hautmuskelschlauchs gefärbt mit Phalloidin (rot), um die Muskeln sichtbar zu machen und mit einem Antikörper gegen HRP (blau), um den Nerv zu visualisieren. Aus Giffith and Budnik, 2006.

Die verzweigten Axon-Termini der Typ I-Motoneurone sind aufgrund der Größe der gebildeten Boutons in zwei Klassen unterteilt: Typ Ib (big; Durchmesser: 3 μm – 5 μm) und Typ Is (small; Durchmesser: 1 μm – 1,5 μm). Die meisten Typ Ib-Motoneurone innervieren nur einen Muskel und bilden große Boutons mit einem stark ausgeprägten und dicht gepackten SSR, während Typ Is-Motoneurone Muskelgruppen innervieren und kleinere Boutons bilden. Die beiden Klassen unterscheiden sich zudem in der Zusammensetzung der Untereinheiten der Glutamatrezeptoren. Jeder Muskel wird von mindestens einem Typ Ib-Motoneuron innerviert (Atwood, 1993; Hoang and Chiba, 2001; Landgraf, 2003; Marrus, 2004).

Die neuromuskuläre Synapse der Ventrolateralen Muskeln 6 und 7 enthält Typ Ib- und Typ Is-Boutons, da zwei Typ I-Motoneurone (RP3 und MN6/7b) die Muskeln innervieren. Das Motoneuron RP3 bildet Typ Ib-Boutons aus, während MN6/7b Typ Is-Boutons hervorbringt (Atwood, 1993; Keshishian, 1993).

1.4 Aufbau der postsynaptischen Seite

Die Postsynapse der neuromuskulären Synapse weist eine elektronendichte Struktur auf, die postsynaptische Verdichtung (PSD), in der sehr große Proteinkomplexe bestehend aus iGluRs, Gerüst- und Signalproteinen zu finden sind (Ziff, 1997; Dresbach, 2001).

Für die Stabilisierung der ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR) an der Synapse ist die Bildung von Heterotetrameren essentiell. Die iGluRs in *Drosophila* bestehen aus vier Untereinheiten: entweder GluRIIA oder GluRIIB, GluRIIC, GluRIID und GluRIIE (Qin, 2004). Der Verlust einer Untereinheit führt zu embryonaler Paralyse, da die iGluR naszierender Synapsen keine Cluster bilden können. Zudem ist die Expression jeder Untereinheit nicht nur essentiell für die Lebensfähigkeit, sondern auch für die Lokalisierung der anderen Untereinheiten (DiAntonio, 1999; Marrus, 2004; Featherstone, 2005; Qin, 2005).

Durch die Zusammensetzung des Glutamatrezeptors werden dessen elektrophysiologischen Eigenschaften reguliert. Die alternativen Untereinheiten GluRIIA und GluRIIB haben einen Einfluss auf Rezeptoreigenschaften, die Desensibilisierung des Rezeptors wird durch die Untereinheit GluRIIB beschleunigt (Typ B-Rezeptor), während GluRIIA diese verlangsamt und dadurch die synaptische Transmission verstärkt (Typ A-Rezeptor) (DiAntonio, 1999). Die Untereinheit GluRIIC ist essentiell für die synaptische Transmission; während die Untereinheit GluRIID, die in allen NMJs zu finden ist, nicht nur für die Stabilisierung und den Aufbau der iGluR an der neuromuskulären Synapse wichtig ist, sondern auch für das Wachstum der Synapsen und zudem die synaptische Transmission beeinflusst (Marrus, 2004; Featherstone, 2005; Qin, 2005). Die Zusammensetzung der iGluR reguliert demnach die Depolarisierungskinetik der Rezeptoren und den „Quantal Content“, der Anzahl an Vesikeln, die pro Aktionspotential freigesetzt wird (DiAntonio, 1999; Sigrist, 2002).

Die Mechanismen, die der Bildung von iGluR-Clustern zugrunde liegen, sind noch nicht aufgeklärt. In Säugern konnte gezeigt werden, dass die iGluR durch Interaktionen mit Gerüstproteinen der MAGUK-Familie (membrane-associated guanylate kinase) und dem Aktin-

Cytoskelett an der postsynaptischen Seite Cluster bilden. Dabei interagieren MAGUKs über PDZ-Domänen mit den iGluR-Untereinheiten (Bredt and Nicoll, 2003; Sheng and Pak, 2000). In Säugern sind an der Bildung der iGluR-Cluster neben den iGluR-Untereinheiten auch Proteine beteiligt, die PDZ-Domänen oder Gerüstkomponenten enthalten oder das Cytoskelett binden (Kim and Sheng, 2004; Groc and Choquet, 2006).

In *Drosophila* werden die GluR-Cluster durch einen anderen Mechanismus gebildet, da die iGluR-Untereinheiten keine PDZ-bindenden Domänen besitzen. Obwohl keine direkte Interaktion der iGluR-Untereinheiten mit DLG, einem postsynaptischen MAGUK-Protein aus *Drosophila*, vorliegt, ist DLG dennoch eine wichtige Komponente zur Stabilisierung der Typ B-Rezeptoren in den postsynaptischen Verdichtungen (Cheng and Featherstone, 2005).

Die iGluR-Komplexe diffundieren zunächst in den naszierenden Synapsen. Dabei werden Typ A-Rezeptoren stabil in die unreifen PSDs integriert, während DLG und andere postsynaptische Proteine beweglich bleiben (Rasse, 2005).

Bisher konnte nur für *Coracle* (Cora), einem *Drosophila* Homolog zu den *brain 4.1-Proteinen* aus Säugern, eine direkte Interaktion mit den iGluR-Untereinheiten nachgewiesen werden. Cora stabilisiert demnach Typ A-Rezeptoren in den PSDs, indem es die Rezeptoren mit dem Spectrin-Aktin-Cytoskelett verankert (Cheng, 2005). Zudem bindet Neto, ein Transmembranprotein, reife iGluR selektiv und effizient, um stabile Rezeptor-Komplexe zu bilden (Kim, 2012). Die PSD naszierender Synapsen enthalten hauptsächlich Typ A-Rezeptoren. In Abhängigkeit der neuronalen Aktivität wird die Zusammensetzung der Rezeptoren verändert, indem vermehrt GluRA- durch GluRB-Untereinheiten ersetzt werden (Koh, 1999; Morimoto, 2009).

Während der Reifung der neuromuskulären Synapse wird DLG an der postsynaptischen Seite, nicht aber in den PSDs angereichert. Die DLG-Konzentration nimmt mit dem Wachstum des SSR zu und reguliert dieses (Guan, 1996; Thomas, 2000). Darüber hinaus kontrolliert DLG durch die Interaktion mit FasciclinII (FasII) die Größe der synaptischen Verknüpfungen, wie beispielsweise die Fläche der Aktiven Zonen und PSDs (Cheng and Featherstone, 2005; Ataman, 2006). Während die neuromuskuläre Synapse wächst, wird die Bildung neuer Boutons durch lokale Veränderungen der FasII-Konzentration reguliert (Schuster, 1996a; Ashley, 2005).

1.5 Aufbau der Aktiven Zone

An der Aktiven Zone der präsynaptischen Endigungen findet die Freisetzung von Neurotransmittern statt (Couteaux and Pecot-Dechavassine, 1970). Ein Signal erreicht das präsynaptische Terminal in Form eines Aktionspotentials und wird durch die Ausschüttung von Neurotransmittern, die in synaptischen Vesikeln (SV) aufbewahrt werden, auf die postsynaptische Zelle übertragen. Durch die Depolarisation des Neurons werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, der folgende Ca^{2+} -Einstrom initiiert die Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran an spezialisierten Stellen, den Aktiven Zonen, die den PSDs, die die Rezeptorfelder beherbergen, gegenüberliegen (Couteaux and Pecot-Dechavassine, 1970). An den Aktiven Zonen der neuromuskulären Synapse von *Drosophila* befinden sich elektronendichte, T-förmige oder, dreidimensional gesehen, Donut-förmige Strukturen der Cytomatrix, die T-Bars, die durch ihre Struktur die Exozytose der synaptischen Vesikel begünstigen (Stewart, 1996; Reiff, 2005). Die Cytomatrix der Aktiven Zonen (CAZ) besteht aus Proteinen des Cytoskeletts, wie Aktin und Spectrin, und Gerüstproteinen verschiedener, konservierter Proteinfamilien, wie beispielsweise RIM (Rab3 (Ras-related in brain3)-interacting molecule) und RBP (RIM binding protein), Liprin- α , Unc-13 und schließlich Proteinen der ELKS/CAST-Familie (ELKS-rich protein/cytomatrix-associated scaffold protein (CAST)) (Atwood, 1993; tomDieck, 1998; Garner, 2000). In den Aktiven Zonen von Vertebraten sind zusätzlich Piccolo und Bassoon mit der CAZ assoziiert, es wird angenommen, dass ihre Aufgabe ist, die synaptischen Vesikel aus dem Bouton zur Aktiven Zone zu leiten. Bassoon wird zusätzlich zur Bildung und Aufrechterhaltung der Struktur der Aktiven Zonen und zur Lokalisierung der Calciumkanäle benötigt (Wang, 1999; Fenster, 2000; Hallermann, 2010). Die Gerüstproteine ELKS, RIM und RBP kontrollieren die genaue Abstimmung des Ca^{2+} -Einstroms mit der Exozytose der synaptischen Vesikeln über die Fusionsmaschinerie aus SYT (Synaptotagmin), Unc-13, Unc-18, SNAP-25 (synaptosomal-associated protein), Syntaxin und Synaptobrevin (Katz and Miledi, 1967; Söllner, 1993; Littleton, 1993; Chen, 1999; Chapman, 1995).

Eine Komponente der Aktiven Zone der Synapsen von *Drosophila* ist das Gerüstprotein Bruchpilot (BRP), dessen N-terminale Domäne Homologien zur ELKS/CAST-Familie der Vertebraten aufweist. Die C-terminale Domäne hingegen zeichnet sich durch Coil-Coil-Strukturen aus, wie sie bei Proteinen des Cytoskeletts zu finden sind. Als Hauptbestandteil der

T-Bars ist BRP wichtig für die Struktur der Aktiven Zonen und dient zum Andocken der SVs an die CAZ und ist somit an der Regulation der synaptischen Transmission beteiligt (Abb. 1.3).

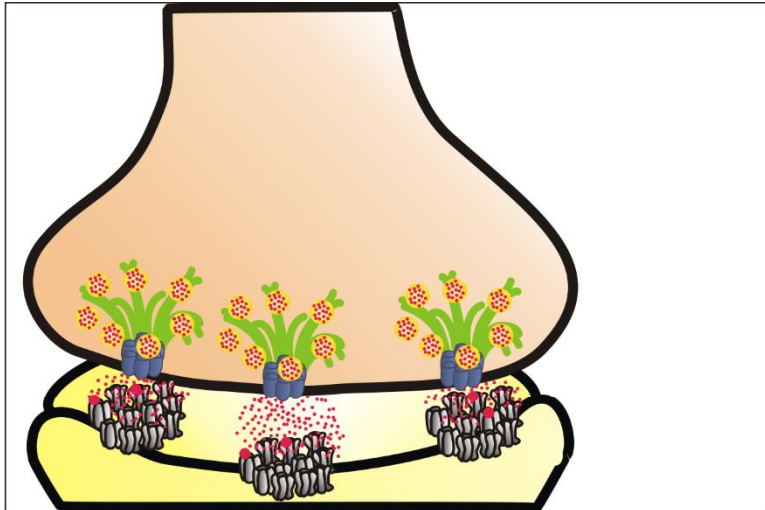


Abb. 1.3 Schematische Darstellung eines Boutons der neuromuskulären Synapse

Die Abbildung ist stark vereinfacht. Das Andocken synaptischer Vesikel (gelb) an die Aktive Zone wird über BRP (grün) vermittelt. Über Ca^{2+} -Kanäle, die Untereinheit Cacophony (Cac; blau) ist repräsentativ dargestellt, wird die Freisetzung von Glutamat (rot) ausgelöst. Auf der postsynaptischen Seite liegen die Glutamatrezeptorfelder (grau) den Aktiven Zonen gegenüber. Durch den Verlust von RSK sind die Flächen der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder kleiner.

Des Weiteren wird BRP zur Lokalisierung der Calciumkanäle an der Aktiven Zone benötigt. Somit vereint BRP die Funktionen der ELKS/CAST-Proteine und Komponenten des Cytoskeletts (Kawasaki, 2004; Wagh, 2006; Hallermann, 2010). Fife, ein mögliches Ortholog zu Piccolo in *Drosophila*, reguliert die Struktur und Funktion der Aktiven Zone (Bruckner, 2012). Die Gerüstproteine oligomerisieren zur CAZ (Dresbach, 2001; Zhai and Bellen, 2004; Wagh, 2006), wobei RBP mit den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen interagiert, die dadurch stabilisiert werden. Des Weiteren werden auch die Vesikel nahe an die Ca^{2+} -Kanäle gebracht, um die Effizienz und Geschwindigkeit der Signalübertragung zu erhöhen (Abb. 1.3) (Wang, 2002; Hibino, 2002; Spangler, 2007; Südhof 2012). Die CAZ ist ein essentieller Teil der molekularen Maschinerie, die zur Freisetzung von Neurotransmittern benötigt wird. Die Aktiven Zonen unterscheiden sich deutlich in ihrer Größe, die durch die Menge an BRP kontrolliert wird (Kittel, 2006).

1.6 Synaptische Plastizität

Neben den strukturellen Veränderungen, die auf das Muskelwachstum zurückzuführen sind, kann auch die neuronale Aktivität einen positiven Einfluss auf das Wachstum der neuromuskulären Synapse haben (Budnik, 1990). Dem Nervensystem dienen Veränderungen in der Struktur und der Funktion der synaptischen Signalübertragung zur Anpassung und Reaktion auf Veränderungen in der Umwelt und stellen so die fundamentalen Vorgänge in der Informationsverarbeitung, der Bildung des Gedächtnisses und dem Lernen dar (Kandel and Schwartz, 1982; Griffith and Budnik, 2006). In der neuromuskulären Synapse sind viele Signalkaskaden aktiv, um interne und äußere Veränderungen wahrzunehmen und folglich die Struktur der Synapse daran anzupassen. Diese Signalkaskaden sind auch wichtig für die Kurz- und Langzeitplastizität im ZNS von Vertebraten und Invertebraten (Griffith and Budnik, 2006).

Als Kurzzeitplastizität oder funktionelle Plastizität werden aktivitätsabhängige Veränderungen in der evozierten Antwort des Muskels auf einen Stimulus beschrieben, die als eEPSC-Amplitude (evozierte exzitatorische postsynaptische Ströme) gemessen werden können (Jan and Jan, 1978). Für die Langzeit- oder strukturelle Plastizität müssen Proteine synthetisiert werden, da die Struktur der Synapse durch aktivitätsabhängige Signalwege verändert wird. An der präsynaptischen Seite kann die Anzahl oder die Anordnung von axonalen Verzweigungen, sowie die Anzahl und Größe der Boutons verändert werden. Zudem kann auch die Anzahl und Fläche der Aktiven Zonen oder die Anzahl der Vesikel, die pro Aktionspotential ausgeschüttet werden, beeinflusst werden. Auf der postsynaptischen Seite können Anzahl oder Fläche der postsynaptischen Verdichtungen, sowie Anzahl und Lokalisierung der Rezeptoren oder Gerüstproteine modifiziert werden. Ein weiterer kritischer Aspekt für die Langzeit-Plastizität ist die Synthese von GluRIIA-Rezeptoren, wodurch die Rezeptoreigenschaften verändert werden (Griffith and Budnik, 2006).

1.7 Axonaler Transport

Für die Bildung und Erhaltung prä- und postsynaptischer Strukturen sowie die Entwicklung und Erhaltung von axonalen und dendritischen Prozessen ist ein regulierter aktiver Transport innerhalb des Neurons entscheidend. Durch Mechanismen, die vorrangig von Motorproteinen abhängen, können unterschiedliche Organellen und präsynaptische Proteine, sogenannte Cargos, im Axon entlang dem Cytoskelett bewegt werden. (Kreutzberg, 1969; Griffin, 1976).

Beispielsweise werden präsynaptische Proteine und synaptische Vesikelvorläufer (SVP) im Soma synthetisiert und müssen anschließend zur Synapse transportiert werden. Ebenso müssen Proteine und Botenstoffe, wie Neurotrophine, von den Synapsen zurück in den Zellkörper gebracht werden. Neurotrophine binden in der Präsynapse an Neurotrophinrezeptoren und werden daraufhin als Signalkomplexe zurück in das Soma transportiert, um Veränderungen in der Genexpression zu bewirken (Maday, 2014).

Der Transport vom Soma hin zu den Synapsen, in anterograder Richtung, wird von Motorproteinen der Kinesin-Familie übernommen, Cargos in retrograder Richtung, von den Synapsen zurück in den Zellkörper, werden durch Motorproteine der Dynein-Familie transportiert (Vale, 1985; Paschal, 1987; Hirokawa, 1990; Hirokawa, 1991). Die Motorproteine bewegen die Cargos in den Axonen entlang der Mikrotubuli, die aus Polymeren polarisierter Tubulin-Moleküle bestehen, deren Plus-Ende schnell-wachsend und deren Minus-Ende stabil und zur Synapse ausgerichtet ist (Burton und Paige, 1981; Stepanova, 2003). In Neuronen wird Tubulin direkt posttranslational modifiziert, wodurch die Aktivität der Motorproteine beeinflusst wird (Sirajuddin, 2014). Entlang der Mikrotubuli sind MAP (microtubule-associated proteins) gebunden, die die Polymerisation und somit die Stabilisation der Mikrotubuli vermitteln. Des Weiteren könnten sie einen Einfluss auf die Regulation des axonalen Transports haben, indem sie die Interaktion der Motorproteine mit den Mikrotubuli verändern (Vershinin, 2007; Dixit, 2008).

Die Zusammensetzung des Komplexes aus Motorproteinen, Adapter- und Gerüstproteinen, der an jedes Cargo gebunden ist, bestimmt das Bewegungs- und Lokalisierungsmuster des Cargos entlang dem Axon. Viele Cargos binden verschiedene Motorkomplexe gleichzeitig, obwohl der Transport fast ausschließlich in eine Richtung erfolgt. Stöchiometrischen Analysen zufolge sind multimere Komplexe aus ein bis zwei Kinesinen und 6 bis 12 Dyneinen gemeinsam an einem Transport-Organell assoziiert (Hendricks, 2010; Rai, 2013). Die Bewegungen der unterschiedlichsten Cargos sind so vielfältig, dass angenommen wird, dass die Regulation des Transports auf Ebene der zu transportierenden Organellen stattfindet, und nicht auf Ebene der Motoren, die den Transport ermöglichen (Maday, 2014).

Viele zusätzliche Mechanismen regulieren die Aktivität der Motorproteine, um die spezifischen Cargos zu transportieren, wobei Gerüstproteine eine Schlüsselrolle innehaben. Beispielsweise ist Huntingtin an der Regulation des Transports von BDNF (brain-derived neurotrophic factor)-positiven Vesikeln beteiligt (Gauthier, 2004; Wong, 2014), wobei JIP1 (JNK-interacting

protein) den Transport von APP (Amyloid precursor protein)-positiven Vesikeln und Autophagosomen reguliert (Fu and Holzbaur, 2013; Fu and Holzbaur, 2014).

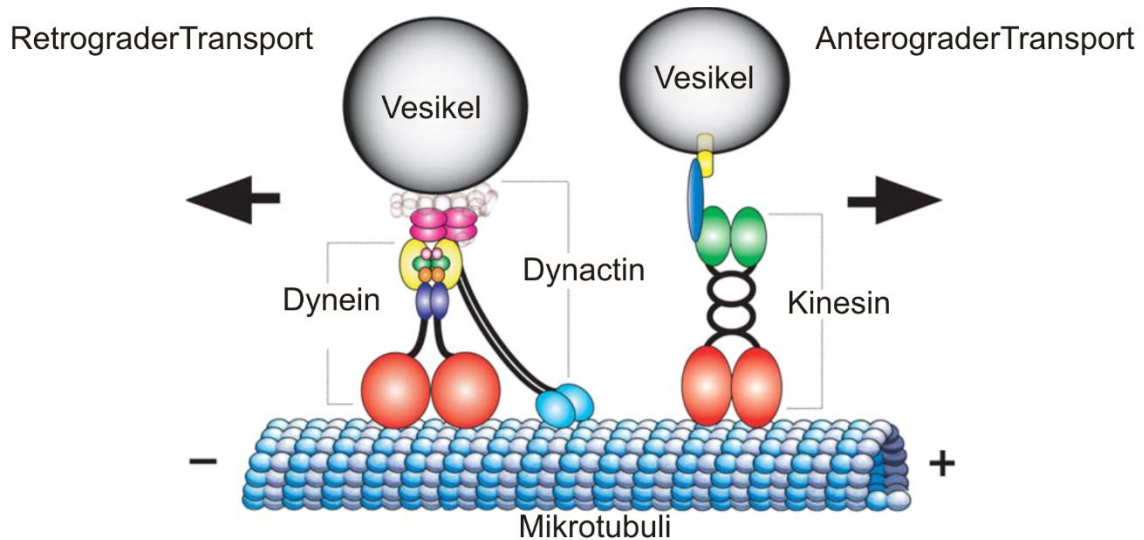


Abb. 1.4 Schematische Darstellung des axonalen Transports

Kinesin-1 bindet über den KHC-Kopf (kinesin heavy chain) an Mikrotubuli des Cytoskeletts, die Vesikel hingegen sind über Adapterproteine an KLC (kinesin light chain) gebunden. Cargos werden mit Hilfe des Kinesin-Motors in anterograder Richtung zum Minus-Ende der Mikrotubuli transportiert. Für den Transport in retrograder Richtung, zum Plus-Ende der Mikrotubuli, ist der Komplex aus Dynein und Dynactin verantwortlich, wobei der Dynactin-Komplex zur Dynein-Aktivierung dient und aus mehreren Proteinen besteht. Verändert nach Duncan, 2006.

Ein Komplex aus Miro und TRAK1/2 bzw. Milton, dem Homolog zu TRAK aus *Drosophila*, reguliert die Bindung des Mitochondriums an den Motorkomplex (Wang, 2009; Macaskill, 2009). Obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht bekannt sind, ist anzunehmen, dass auch vorgelagerte Kinasen, zu denen Cdk5 (cyclin-dependent kinase5), JNK (c-Jun N-terminal kinase) und p38-MAPK (mitogen activated protein kinase) gehören, an der Regulation des Transports beteiligt sind (Pandey and Smith, 2011; Fu and Holzbaur, 2013; Morfini, 2013). Trotz der vielfältigen Cargos weisen die Bewegungsmuster einige Gemeinsamkeiten auf, demnach bleiben Motorkomplexe und Cargo auch im inaktiven Zustand assoziiert und eine geringe Anzahl an Motoren kann ein großes Cargo über eine lange Distanz entlang der Axone transportieren. An der Regulation des axonalen Transports sind diverse Mechanismen beteiligt, wie beispielsweise die Rab-spezifische (Ras-related in brain) Beladung, aber auch Kinasen aus

verschiedenen Signalkaskaden, Phosphatasen und Gerüstproteinen (Maday, 2014). Die molekularen Mechanismen, durch die eine begrenzte Menge an Motorproteinen die Vielzahl der zu transportierenden Cargos bewältigt, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Mutationen in den Motorkomplexen des axonalen Transports sind verantwortlich für viele neurodegenerative Erkrankungen und neuronale Entwicklungsstörungen (Goldstein, 2003).

1.8 Motorproteine

Die Proteine der Kinesin-Superfamilie sind nach Ähnlichkeiten in der Struktur und Funktion unterteilt. Zu den Familien Kinesin-1, Kinesin-2 oder Kinesin-3 gehören Motorproteine, die im axonalen Transport in anterograder Richtung von Bedeutung sind (Lawrence, 2004). Die Motoren der Kinesin-1-Familie transportieren eine Vielzahl an Cargos, wie Vesikel, Organellen und Mitochondrien entlang dem Axon (Abb. 1.4) (Hirokawa, 2010). Ein aktiver Kinesin-1-Komplex besteht aus einem Dimer der schweren Ketten des Kinesins (KHC), KIF5A, KIF5B und KIF5C, oft verbunden mit einem Dimer aus KLCs (kinesin light chain), das einen Mechanismus zur Autoinhibition bereitstellt (Sun, 2011). Die autoinhibitorische Funktion von Kinesin-1 dient zur Regulation, durch die Bindung des Kinesin-Schwanzes an die Motordomäne wird die Motorfunktion blockiert. Erst durch die Bindung von spezifischen Bindungspartnern wie beispielsweise den Gerüstproteinen JIP1 und JIP3 wird die Autoinhibition gelöst. Die präzise Regulation der Aktivität von Kinesin-1 durch Gerüstproteine ermöglicht den axonalen Transport von Organellen in anterograder Richtung (Fu and Holzbaur, 2013; Sun, 2011).

Die Motoren der Kinesin-2-Familie bilden Homodimere oder Heterotrimere und transportieren Frodin-positive Plasmamembran-Vesikel, N-Cadherin, β -Catenin, Cholin-Acetyltransferase in anterograder Richtung und sind mit Rab7-positiven späten Endosom-Lysosom-Kompartimenten assoziiert (Scholey, 2013; Takeda, 2000). Synaptische Vesikel-Vorläufer (SVP) und Vesikel mit dichtem Kern (DCV) werden von Kinesin-3-Motoren bewegt (Okada, 1995; Lo, 2011).

Das Motorprotein Dynein ist für den Transport in retrograder Richtung verantwortlich. Der Motorkomplex wird aus einem Dimer aus schweren Kette des Dyneins (DHC) gebildet, an dessen Schwanz intermediäre, intermediär-leichte und leichte Ketten assoziieren, um eine Bindedomäne des Cargos zu bilden (Abb. 1.4). Die DHC von Dynein, die Motordomäne, wird

nur von einem Gen kodiert, wobei die intermediären und intermediär-leichten Ketten von mehreren Genen kodiert werden. Die unterschiedlichen Isoformen können entweder gemeinsam oder alternativ zum Motorkomplex assembliert werden, wodurch eine Diversität im Dynein-Motorkomplex entsteht. Diese Diversität könnte zur Organell-spezifischen Rekrutierung oder Regulation dienen. Des Weiteren bietet der Motorkomplex Bindestellen für Proteine, um die Funktion von Dynein zu regulieren. (Kuta, 2010; Roberts, 2013; Zhang, 2013). Dynactin dient als Aktivator von Dynein (Abb.1.4), indem es direkt an die intermediäre Kette des Dyneins, aber auch an die Mikrotubuli über eine CAP-Gly-Domäne bindet (cytoskeleton-associated protein-Glycin-rich domain), wodurch die Assoziation des Motorkomplexes mit den Mikrotubuli verstärkt und so der Transport initiiert wird (Karki, 1995; Schroer, 2004; Lloyd, 2012; Moughamian, 2012). Für den axonalen Transport ist auch die Regulation des Dynein-Motorkomplexes essentiell, der Mechanismus ist noch nicht ganz geklärt. Wichtig für die Regulation des Transports ist die direkte Bindung von Dynein an Lis1 (lissencephaly-1), das einen Komplex mit Nde1 (nude1) bildet. Diese Interaktion führt zur stärkeren Bindung von Dynein an die Mikrotubuli (Huang, 2012; Shao, 2013). Des Weiteren dienen die Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk-5 und Pct-1 (Pctaire-kinase-1) als Negativregulator des Dynein-Motorkomplexes (Ou, 2010; Goodwin, 2012).

1.9 Transport von präsynaptischem Material

Präsynaptische Proteine, einschließlich Neurotransmitter und Neurotrophine werden im Zellkörper gebildet und anschließend zur Synapse transportiert. Neurotransmitter und Proteine der präsynaptischen Vesikel werden in synaptischen Vesikelvorläufern (SVPs), Neurotrophine in Vesikeln mit dichtem Kern (DCVs) zur Synapse transportiert. In Vertebraten werden viele Proteine der CAZ, wie Piccolo und Bassoon, Syntaxin, SNAP-25 und N-Cadherin in PTVs (Piccolo-Bassoon transport vesicles) vom Zellkörper entlang dem Axon transportiert, um an speziellen Stellen der naszierenden Synapse zu fusionieren (Hall and Hedgecock, 1991; Okada, 1995; Zhai, 2001; Lo, 2011). Präsynaptisches Material wird in vorassemblierten Komplexen in den PTVs zusammen mit SVPs entlang dem Axon transportiert (Zhai, 2001; Tao-Cheng, 2007; Klassen, 2010).

In *Drosophila* fehlen Homologe zu einigen Komponenten der PTVs, bisher wurden keine speziellen Vesikel für den Transport von Proteinen der Aktiven Zonen gefunden, die den PTVs entsprechen könnten (Zhai, 2001). In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass BRP

und RBP gemeinsam entlang dem Axon transportiert werden, wobei RBP direkt an das Adapterprotein Aplip1 (APP-like protein interacting protein 1) bindet, das auch für den Transport der SVPs benötigt wird. Die Bindung zwischen RBP und Aplip1 ist essentiell für den präzisen Transport von CAZ-Proteinen, um die Interaktionen der vorassemblierten Gerüstproteine und folglich die Bildung von ektopischen Aktiven Zonen zu verhindern (Siebert, 2015). Die Assemblierung von ektopischen Aktiven Zonen und die einhergehenden Defekte im axonalen Transport von CAZ-Proteinen, wie beispielsweise BRP könnten einen wichtigen Aspekt in neuropathologischen Erkrankungen darstellen (Millecamps, 2013). Die SRPK79D (SR protein kinase 79D), die mit BRP im Axon und in den Synapsen kolokalisiert, hat einen Einfluss auf den axonalen Transport von BRP und sorgt dafür, dass die BRP-Moleküle während des Transports nicht zu ektopischen Aktiven Zonen im Axon akkumulieren (Nieratschker, 2009; Johnson, 2009).

Studien des Bewegungsmusters von SVPs aus *C. elegans* zeigten, dass nicht nur der axonale Transport, sondern auch das Einfangen der SVPs durch die Präsynapse wichtig für die Synapsenbildung an der richtigen Stelle ist. SVPs werden nicht direkt zur Synapse transportiert, sie werden durch das ganze Neuron befördert, in Dendriten und auch in distale Bereiche des Axons, ohne die Präsynapse zu erreichen (Herzog, 2011). Für den Transport von SVPs in *Drosophila* sind Unc-104 und Imac (immaculate connections), ein Motorprotein aus der Kinesin-3-Familie homolog zu KIF1A aus Vertebraten, essentiell (Okada, 1995; Pack-Chung, 2007). Liprin- α und DENN/MAD (differentially expressed in normal and neoplastic cells/MAP kinase activating death domain) dienen als Adapterproteine und verbinden KIF1A mit den SVPs, wobei Liprin- α außer KIF1A auch Gerüstproteine bindet. Auch DENN/MAD bindet direkt an KIF1A, dient aber zudem als GDP-GTP-Austauschfaktor von Rab3 und könnte ein Mechanismus zur Regulation der Rekrutierung der Motorproteine darstellen. Entlang der Axone können sich Minisynapsen bilden, die sowohl Aktive Zonen als auch synaptische Vesikel enthalten. Um die Aggregation zwischen SVPs und den Minisynapsen zu verhindern, fördert ARL-8 (arf-like small GTPase-8), das in den SVPs lokalisiert ist, die Dissoziation (Shin, 2003; Miller, 2005; Niwa, 2008).

DCVs können nur im Zellkörper beladen werden, weswegen sie permanent an die Synapse geliefert werden müssen. Sie werden aber nicht vom Zellkörper direkt an die Synapsen transportiert, stattdessen zirkulieren sie permanent zwischen proximalem Axon und synaptischen Boutons, wie in einer Studie an *Drosophila* gezeigt werden konnte. Die

Zirkulation wird durch zwei Bedingungen erreicht. Zunächst muss die Bewegungsrichtung ähnlicher Cargos genau reguliert werden. Außerdem muss das Einfangen der Vesikel an der Synapse ineffizient sein, um dort eine übermäßige Verdichtung zu vermeiden (Wong, 2012). Der Transport von DCVs ist auch von Unc-104 und Imac abhängig, wahrscheinlich wird der DCV-Transport durch einen dem SVP-Transport ähnlichen Mechanismus reguliert. Der Unc-104-abhängige Transport in den Axonen wird von Cdk5 positiv beeinflusst (Lo, 2011; Goodwin, 2012).

1.10 Axonaler Transport von Mitochondrien

Mitochondrien werden auch von den Motorproteinen Kinesin-1 und Dynein bidirektional transportiert. Viele Regionen im Neuron, wie Wachstumskegel und Synapsen, haben einen hohen Energiebedarf, der nicht durch die Diffusion von ATP aus dem Zellkörper gedeckt werden kann. Deshalb werden Mitochondrien, die für die ATP-Produktion und das Puffern der lokalen Ca^{2+} -Konzentration verantwortlich sind, aktiv zu den Stellen im Neuron mit hohem Bedarf transportiert. Durch die synaptische Aktivität entsteht lokal eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration, wodurch die Bewegung der Mitochondrien an dieser Stelle gestoppt wird. Somit wird der axonale Transport von Mitochondrien hauptsächlich über die synaptische Aktivität reguliert (Li, 2004; Wang, 2009; Maday, 2014). Miro (mitochondrial Rho GTPase), bestehend aus zwei GTPase und zwei Ca^{2+} -bindenden Domänen, dient als Ca^{2+} -Sensor, um den aktivitätsabhängigen Transport in anterograder und retrograder Richtung zu regulieren. Miro und das Adapterprotein von Kinesin-1 TRAK1 oder dem *Drosophila* Homolog Milton, bilden den Kern des Adapterproteinkomplexes, wobei TRAK1 das Mitochondrium über Miro an die Motorproteine bindet. Durch die Bindung von Ca^{2+} an Miro an der Synapse wird der Transport des Mitochondriums gestoppt, wobei der Mechanismus noch ungeklärt ist (Abb. 1.5) (Fransson, 2003; Fransson, 2006; MacAskill, 2009; Russo, 2009). Myosin ist mit den Aktin-Filamenten des Cytoskeletts verbunden und stört die Bewegung der Mitochondrien entlang der Mikrotubuli, und könnte so einen Mechanismus darstellen, um das Andocken der Mitochondrien zu erleichtern. Myosin könnte zudem für den lokalen Transport über kurze Distanzen verantwortlich sein (Abb. 1.5) (Gross, 2002; Pathak, 2010).

Ausschließlich im Axon ist in stationären Mitochondrien Syntaphilin angereichert, dessen Bindung an Kinesin-1 und Mikrotubuli durch Ca^{2+} vermittelt wird. Durch das Binden von KIF5 vermittelt Syntaphilin die aktivitätsabhängige Immobilisierung der transportierten

Mitochondrien (Chen and Sheng, 2013). Zudem hat die Verteilung der Mitochondrien in der Synapse Auswirkungen auf die synaptische Transmission und die Transmissionsstärke. Somit sorgt eine stabile Position der Mitochondrien in den Boutons für die Aufrechterhaltung der stetigen Neurotransmitterfreisetzung (Su, 2013).

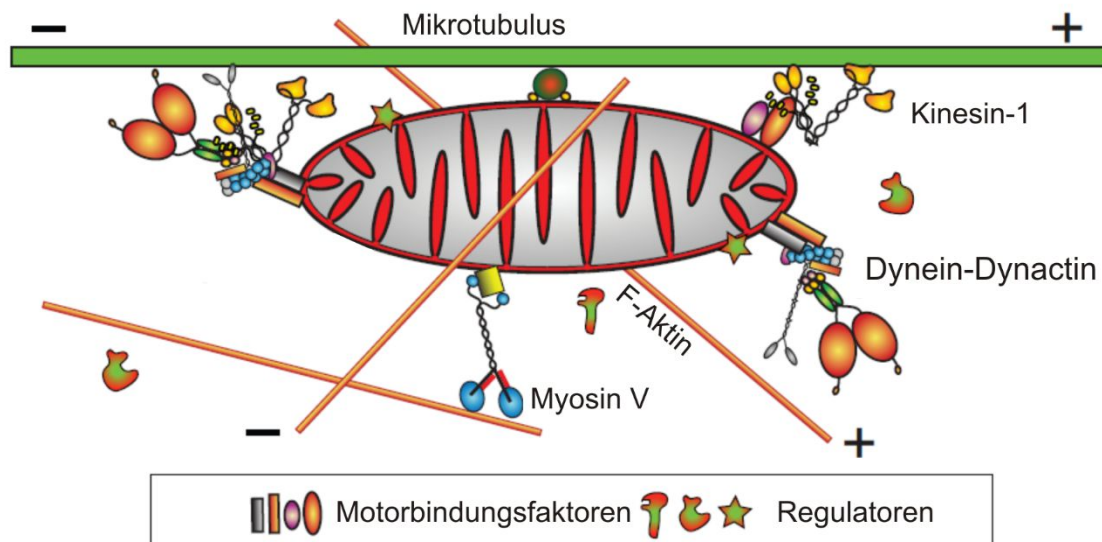


Abb. 1.5 Schematische Darstellung des mitochondrialen Transports

Der bidirektionale Transport von Mitochondrien wird durch Kinesin-1 und Dynein vermittelt. Cytosolisches Myosin dient hierbei als Regulator, in dem es den Mikrotubuli-basierten Transport stoppt. Des Weiteren könnte Myosin für den Transport des Mitochondriums über kurze Strecken von Bedeutung sein. Den Kern des Adapterkomplexes von Kinesin-1 bilden Miro und TRAK. Durch neuronale Aktivität wird die lokale Ca^{2+} -Konzentration erhöht, wobei Ca^{2+} an Miro bindet, das als Ca^{2+} -Sensor dient und durch die Ca^{2+} -Bindung die Transportbewegung stoppt. Verändert nach Saxton, 2012.

1.11 RSK, die p90 ribosomale S6 Kinase II

Die p90-ribosomale S6 Kinase II (RSK oder S6KII) ist eine Ser/Thr-Kinase und wurde 1985 von Erikson und Maller in *Xenopus laevis* Oozyten bei der Suche nach intrazellulären Kinasen, die das ribosomale Protein S6 (rpS6) der 40S Untereinheit phosphorylieren, entdeckt (Erikson, 1985). Durch biochemische Aufreinigung wurden zwei Kinasen S6KI und S6KII mit einem Molekulargewicht von 85-90 kDa identifiziert, daraufhin wurden homologe Proteine in Maus, Huhn, Ratte und *Caenorhabditis elegans* durch die Klonierung der cDNAs entdeckt. Später

wurden sie in p90RSKs oder RSK umbenannt, um sie von p70S6-Kinasen, S6K1/2 abzugrenzen (Jones, 1988; Alcorta, 1989; Blenis, 1991; Grove, 1993). In *Drosophila* wurde das für *p90rsk* kodierende Gen 1994 isoliert und sequenziert (Wassarman, 1994). RSK1 und RSK2 tragen zur Phosphorylierung von rpS6 bei, als Antwort auf die Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs durch Agonisten oder Onkogene (Roux, 2007).

In Säugern sind vier Isoformen von RSK (RSK1-4) bekannt, die zu 73-80 % homolog zu einander sind und sich hauptsächlich in den C- und N-terminalen Sequenzen unterscheiden. Außer RSK4 werden alle RSKs ubiquitär in allen Geweben exprimiert. Weiter konnte gezeigt werden, dass sich die Expression der RSK-Isoformen gewebsspezifisch unterscheidet. Die mRNAs von RSK1 konnten vorwiegend in Lunge, Niere und Pankreas gefunden werden, RSK2 und RSK3 hingegen hauptsächlich in skeletalen Muskeln, Herz und Pankreas (Alcorta, 1989; Zeniou, 2002; Kuang and Wu, 2009). Die Expression von RSK4 ist im Vergleich zu anderen Isoformen gering, konnte aber durch Northern Blot-Analysen in Herz, Niere und skeletalen Muskeln, sowie im Gehirn und Cerebellum nachgewiesen werden (Dummler, 2005). Im Gehirn wurde die mRNA von RSK1 vorwiegend im Cerebellum gefunden, RSK2 hingegen vorwiegend im Neocortex, Hippocampus und Cerebellum. RSK3 ist abundant im ZNS und kommt vorwiegend im zerebralen Cortex, im Gyrus dentatus des Hippocampus und in der Amygdala vor (Zeniou, 2002; Heffron, 2005). In *Drosophila melanogaster* ist nur eine RSK-Isoform vorhanden (Wassarman, 1994).

RSK lokalisiert im Cytoplasma, Zellkern und an der Zellmembran der Zelle und wird hauptsächlich an der Plasmamembran aktiviert und transloziert daraufhin teilweise aus dem Cytoplasma in den Zellkern (Chen, 1992; Zhao 1995).

1.12 Die Struktur von RSK

Die Familie der RSKs zeichnet sich durch zwei funktionale, aber doch unterschiedliche Kinasedomänen aus, die N- und C-terminale Kinasedomäne (NTKD und CTKD), die durch eine Linker-Region miteinander verbunden sind. Es wird angenommen, dass das *rsk*-Gen aus der Fusion der Gene zweier Proteinkinasen entstanden ist (Jones, 1988). Da RSK aus zwei Proteinkinasen besteht, gehört die RSK-Familie zwei unterschiedlichen Familien der Proteinkinasen an. Die CTKD gehört zur CAMK-Familie (Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinases), genauer zur Untergruppe der MAPKAPK (MAPK(mitogen-activated protein kinase)-

activated protein kinases). Diese Gruppe wird durch verschiedene MAP-Kinasen aktiviert und weist grundlegende Homologien in der Kinasedomäne auf. Die NTDK wiederum ist eine Kinase der AGC-Familie (protein kinase A, C und G), zu der auch beispielsweise Akt und die p70S6-Kinasen S6K1/2 gehören (Roux, 2004). Des Weiteren enthaltenen RSKs eine C-terminale Bindestelle für ERK (extracellular-signal regulated kinase), wodurch die spezifische Interaktion von ERK und RSK gewährleistet wird (Zhao, 1996; Smith, 1999).

Die CTDK erhält ein Aktivierungssignal durch den MAP-Kinase-Signalweg, das mit hoher Genauigkeit an die NTDK weitergeleitet wird und diese aktiviert, um so die Substrate von RSK zu phosphorylieren.

1.13 Der Aktivierungsmechanismus von RSK

Alle Isoformen von RSK verfügen über mehrere konservierte Phosphorylierungsstellen, die für die subsequentielle Aktivierung verantwortlich sind. Folgende Phosphorylierungsstellen sind für die vollständige Aktivierung des humanen RSK1 bedeutend: S²²¹, T³⁵⁹, S³⁶³, S³⁸⁰ und T⁵⁷³, welche den Phosphorylierungsstellen S³⁵⁷, S⁴⁹⁴, S⁴⁹⁸, S⁵¹⁵ und T⁷³² von *Drosophila* RSK entsprechen (Abb. 1.6) (Dalby, 1998; Tangredi, 2012). Nachdem aktives ERK an die ERK-Bindestelle von RSK gebunden hat, phosphoryliert ERK T⁵⁷³ in der Aktivierungsschleife der CTDK (Smith, 1999; Sutherland, 1993). Des Weiteren phosphoryliert ERK auch T³⁵⁹ und S³⁶³ in der Linker-Region (Dalby, 1998). Der CTDK-Aktivierung folgt die Autophosphorylierung von S³⁸⁰ in der Linker-Region, wodurch eine Bindestelle für PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1) geschaffen wird (Vik, 1997; Frödin, 2000). Nach der Bindung an RSK phosphoryliert PDK1 S²²¹ in der Aktivierungsschleife der NTDK (Jensen, 1999; Richards, 1999). Nachdem PDK1 von RSK dissoziiert, ist RSK vollständig aktiviert. Die folgende Autophosphorylierung von S⁷³⁷ am C-Terminus durch NTDK ermöglicht die Dissoziation von ERK und RSK (Abb. 1.6).

Interessanterweise ist die Kinase-Aktivität der NTKD für innere Uhr nicht essentiell. Zur Bildung der wildtypischen zirkadianen Rhythmik sind die CTKD-Aktivität und die ERK-Bindestelle von Bedeutung. Entscheidend für die Regulation der zirkadianen Periodik in *Drosophila* ist die Phosphorylierung von RSK an den Phosphorylierungsstellen S⁵¹⁵ und T⁷³² durch ERK, wodurch die CTDK aktiviert und die Bindestelle PDK1 gebildet wird (Tangredi, 2012).

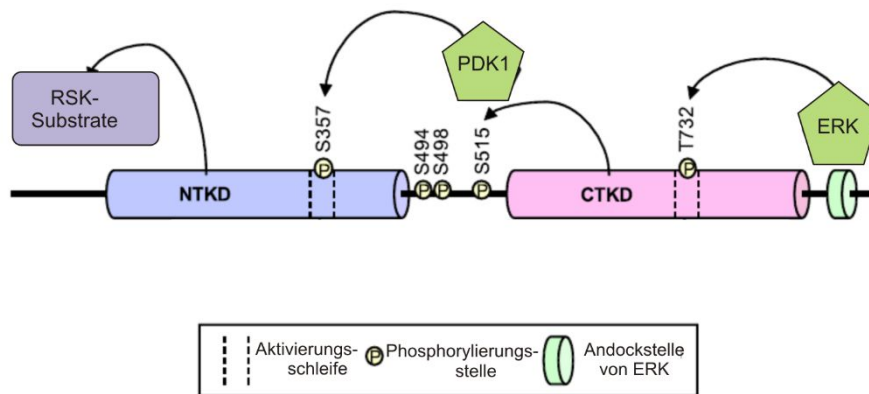


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der Struktur von RSK in *Drosophila*

Die beiden funktionellen Kinasedomänen von RSK, die N-terminale (NTKD) und C-terminale Kinasedomäne (CTKD) sind über eine Linker-Region verbunden. C-terminal von der CTKD befindet sich eine Bindestelle für ERK. Die subsequenzielle Aktivierung von RSK beginnt mit der Bindung von ERK, das daraufhin die Phosphorylierungsstellen T³⁵⁹ und S³⁶³ in der Linker-Region und T⁵⁷³ in der Aktivierungsschleife der CTKD phosphoryliert und die CTKD aktiviert. Durch Autophosphorylierung der CTKD wird eine Bindestelle für PDK1 gebildet. PDK1 phosphoryliert S²²¹ in der Aktivierungsschleife der NTKD, anschließend dissoziiert PDK1 von RSK, wodurch RSK vollständig aktiviert ist. Verändert nach Tangredi, 2012.

1.14 Bedeutung von RSK im MAPK-Signalweg

Der hoch-konservierte ERK/MAP-Kinase Signalweg (extracellular-signal regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) stellt einen zentralen Signalweg in der Zelle dar, wodurch extrazelluläre Signale an intrazelluläre Proteine übermittelt werden, um wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Zellwachstum zu regulieren. Im MAPK-Signalweg werden drei Kernkinasen aktiviert: MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), Raf, die wiederum die MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK), MEK1 und MEK2, durch Phosphorylierung aktivieren. Daraufhin werden die MAP-Kinasen (MAPK), ERK1 und ERK2, phosphoryliert und aktiviert (Abb. 1.7). Die Aktivierung von ERK führt zur Phosphorylierung unterschiedlicher Substrate. ERK1/2 liegen in der inaktiven Form hauptsächlich im Cytosol vor, da sie durch die Interaktion verschiedener Proteine, die als cytoplasmatische Verankerung dienen, dort bis zur Aktivierung zurückgehalten werden. (Rubinfeld, 2005; Kim, 2010; Romeo, 2012). Neben der durch Wachstumshormone vermittelten Stimulation können auch viele Peptidhormone und Neurotransmitter den Ras/ERK-Signalweg intrazellulär durch

Signalmoleküle wie PKC (protein kinase C), PI3K (phosphoinositide-3-kinase) oder cAMP (cyclic adenosine-monophosphate) (Frödin, 1999) aktivieren.

Aktiviertes ERK1/2 kann Substrate entweder an der Plasmamembran, im Cytosol oder im Nukleus phosphorylieren. Durch die Translokation von ERK in den Nukleus werden Genexpression und DNA-Replikation reguliert, indem verschiedene Transkriptionsfaktoren und die RSK-verwandten Kinasen MSK (mitogen and stress-activated protein kinases) phosphoryliert und aktiviert werden (Deak, 1998; Brunet, 1999).

Neben der Funktion von RSK als Effektor kinase des ERK/MAPK-Signalwegs konnte RSK auch eine Funktion in der Negativregulation des ERK/MAPK-Signalwegs während der Flügel- und Augenentwicklung von *Drosophila* nachgewiesen werden. RSK reguliert ERK-abhängige Entwicklungsprozesse in einer Kinase-unabhängigen Weise, indem der Eintritt von ERK in den Nukleus durch die Bindung an RSK verhindert wird. Demnach dient RSK als cytoplasmatischer Anker von ERK (Kim, 2006).

Der MAPK-Signalweg ist auch an der Regulation der neuronalen Plastizität sowie der Gedächtnisbildung beteiligt. Als Antwort auf die synaptische Aktivität wird der MAPK-Signalweg durch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und durch einen Anstieg des intrazellulären cAMP aktiviert (Fiore, 1993; Thomas, 2004). In *RSK2*-Nullmutanten wurde sowohl eine gesteigerte und verlängerte Aktivität von ERK als auch eine Abnahme in der Expression von ERK-Phosphatasen nachgewiesen, weshalb auf eine Funktion von *RSK2* in der negativen Feedback-Regulation von ERK geschlossen wurde (Dufresne, 2001).

1.15 Die Regulation zellulärer Prozesse durch RSK

Nach der Aktivierung transloziert ein Teil des RSKs in den Nukleus. Durch die unterschiedliche Lokalisierung kann RSK Substrate in verschiedenen subzellulären Kompartimenten phosphorylieren und damit einen Einfluss auf die Regulation diverser zellulärer Prozesse, wie den Zellzyklus, die Proliferation, das Zellwachstum und das Überleben der Zellen ausüben (Abb. 1.7) (Anjum, 2008).

Die Consensus-Sequenz von RSK-Substraten ist identisch mit dem basophilen Phosphorylierungsmotiv R/L-X-X-R-X-X-S/T oder R-R-X-S/T anderer Kinasen der AGC-Familie (Leighton, 1995). Beispielsweise aktiviert RSK den Transkriptionsfaktor CREB

(cAMP-response-element-binding protein) und den ELK-1/SRF-Komplex (ETS (E twenty-six)-like kinase-1/ Serum-response factor), wodurch RSK die mitogen-induzierte c-Fos-Transkription vermittelt und somit den Zellzyklus beeinflusst (De Cesare, 1998).

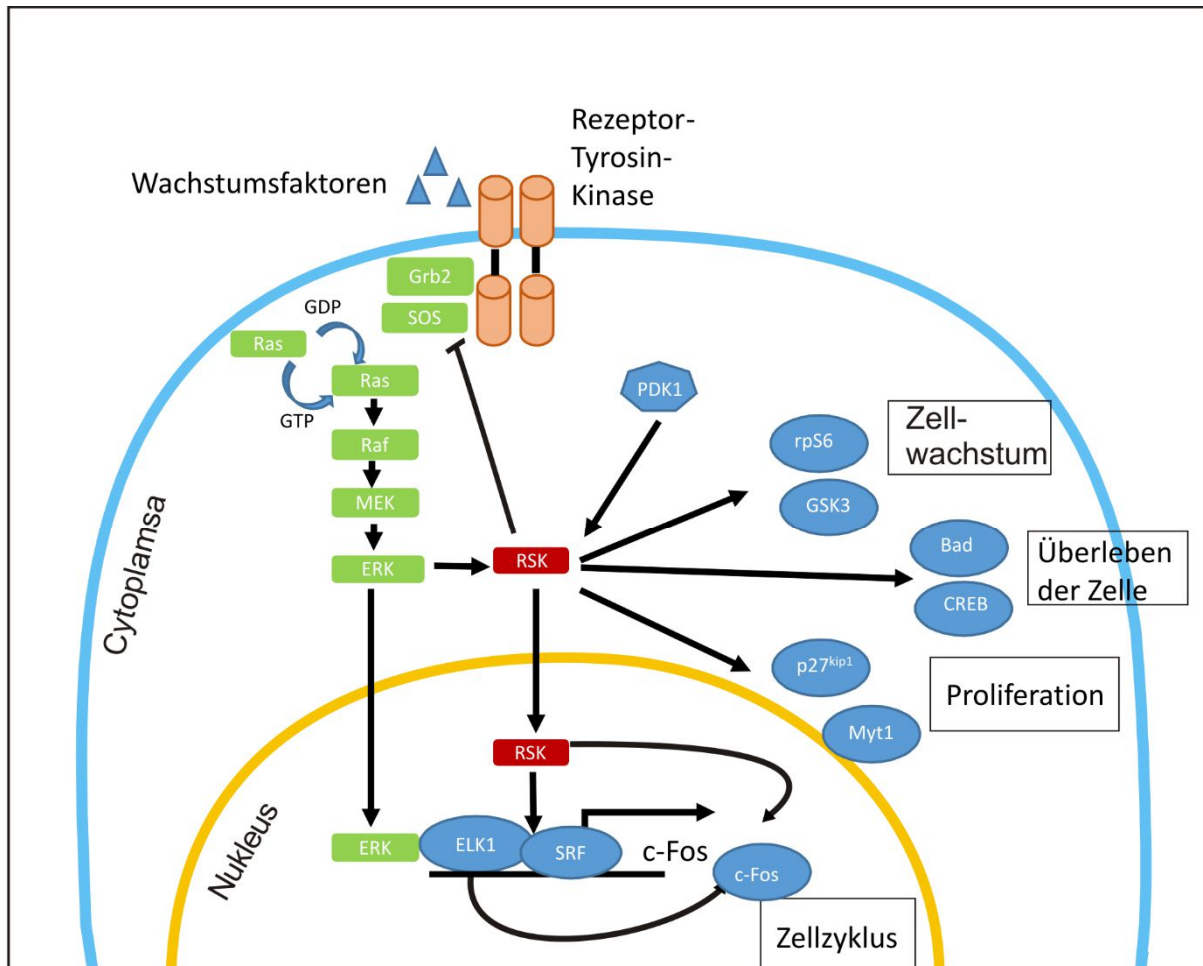


Abb. 1.7 Schematische Darstellung der RSK-Aktivierung über den ERK/MAPK-Signalweg

Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) über den Nukleotidaustauschfaktor SOS (Son of sevenless) wird die GTPase Ras aktiviert, das daraufhin Raf aktiviert. Aktives Raf phosphoryliert und aktiviert MEK1/2, das wiederum ERK1/2. RSK ist ein direktes Substrat von ERK, das an RSK bindet und dieses zusammen mit PDK1 aktiviert. Aktives RSK kann eine Vielzahl an Substraten im Cytosol phosphorylieren, transloziert aber auch in den Nucleus, um dort Substrate, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren. Nur eine Auswahl an RSK-Substraten ist hier dargestellt. Durch die vielfältigen Substrate kann RSK auf verschiedene zelluläre Prozesse, wie den Zellzyklus, die Proliferation und Differenzierung oder das Wachstum der Zelle Einfluss nehmen. Verändert nach Romeo, 2012.

Des Weiteren kann RSK auch Histon H3 oder den Transkription-Initiationsfaktor TIF-1A phosphorylieren, der für die Transkription der RNA-Polymerase I und somit für die Synthese der rRNA benötigt wird (Anjum, 2008). Durch Phosphorylierung und somit Inaktivierung des mitochondrialen, apoptotischen Proteins BAD und auch durch Phosphorylierung und Aktivierung von CREB, fördert RSK das Überleben der Zelle (Bonni, 1999). Durch Phosphorylierung und Inhibition von GSK3 β (glykogen synthase kinase 3 β) übt RSK unter anderem einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen aus. Beispielsweise beeinflusst RSK die Proliferation, indem es den Cdk2-Inhibitor (cyclin-dependent kinase 2) p27^{kip1} phosphoryliert oder Myt-1 (membrane-associated inhibitor kinase-1) inhibiert (Fujita, 2003; Sutherland, 1993; Torres, 1999).

Trotz der langen Liste der bekannten RSK-Substrate und der Signalkaskaden, in denen RSK beteiligt ist, konnte die physiologische Rolle von RSK bisher nicht eindeutig geklärt werden (Romeo, 2012).

1.16 Neuronale Funktionen von RSK

Wie zuvor erwähnt, sind die RSK-Isoformen in verschiedenen Regionen des ZNS unterschiedlich stark exprimiert, wobei die Expression von RSK2 in Regionen mit starker synaptischer Aktivität hoch ist (Zeniou, 2002). Bekanntlich wird RSK2 in Neuronen direkt von ERK1/2 aktiviert und ist so an einem zentralen Signalweg zur Regulation der synaptischen Plastizität und der Gedächtnisbildung beteiligt (Sweatt, 2001, 2004; Davis und Laroche, 2006). Obwohl RSK2 an vielen neurobiologischen Prozessen beteiligt ist, hat der Verlust von RSK2 keine Auswirkungen auf die Struktur des Gehirns auf makroskopischer Ebene. In verschiedenen Verhaltensstudien konnte nachgewiesen werden, dass RSK2 einen Einfluss auf das räumliche Lernen sowie das räumliche Langzeitgedächtnis hat. Demnach ist die Koordination in *RSK2*-Knockout-Mäusen beeinträchtigt. Des Weiteren wirkt RSK2 einen Einfluss auf das Wachstum der Axone von Motoneuronen in Mäusen aus (Dufresne, 2001; Poirier, 2007; Fischer, 2009a). Durch den Verlust von RSK2 ist die Menge an Dopamin und auch die Expression des Dopaminrezeptors DrDL2 im Kortex von Mäusen erhöht (Pereira, 2010). Im Hippocampus hingegen sorgt der Verlust von RSK2 für eine gesteigerte Expression der Untereinheit Gria2 des Glutamaterezeptors Glur2 des AMPA-Typs, wodurch die Kanaleigenschaften, die synaptische Transmission und die durch Langzeit-Potenzierung induzierte Genexpression verändert sind (Mehmood, 2011, 2013; Morice, 2013). Die

gesteigerte Expression von Gria2 wird durch die Hyperaktivierung von ERK1/2 verursacht, eine Folge der fehlenden Negativregulation des MAPK-Signalwegs durch RSK (Schneider, 2011; Mehmood, 2011, 2013). Auch in Motoneuronen von Mäusen konnte die Hyperaktivierung von ERK nachgewiesen werden (Fischer, 2009a). RSK dient auch in *Drosophila* als Inhibitor von ERK-abhängigen Differenzierungsprozessen in der Augenentwicklung, wobei RSK dort als cytoplasmatischer Anker von ERK dient (Kim, 2006). Des Weiteren konnte in *Drosophila* nachgewiesen werden, dass RSK an Prozessen, wie dem olfaktorischen, räumlichen und operanten Lernen und der Bildung des Gedächtnisses in der räumlichen Orientierung beteiligt ist (Putz, 2004; Neuser, 2008). RSK ist zudem an der negativen Regulation der Boutonbildung an der neuromuskulären Synapse von Motoneuronen beteiligt (Fischer, 2009b). Darüber hinaus übt RSK in den Uhrneuronen von *Drosophila* eine bisher unbekannt Funktion als Modulator der inneren Uhr aus, der für eine normale zirkadiane Rhythmik benötigt wird. Die Bindung von ERK an RSK und die folgende Phosphorylierung von RSK sind essentiell für eine normale zirkadiane Rhythmik. Die Untersuchungen zeigten, dass die Aktivität der C-terminalen Kinasedomäne nicht nur zur Autophosphorylierung von RSK dient, sondern auch für die Funktion von RSK als Modulator der zirkadianen Rhythmik verantwortlich ist. (Akten, 2009; Tangredi, 2012).

1.17 Coffin-Lowry-Syndrom

Der Verlust der RSK2-Funktion verursacht das Coffin-Lowry-Syndrom (CLS), eine X-chromosomal vererbte Erkrankung, die durch geistige Behinderung und Defekte im Knochenwachstum charakterisiert ist (Hanauer, 2002). Zuerst wurde diese Erkrankung von Coffin 1966 und unabhängig davon von Lowry 1971 beschrieben (Coffin, 1966; Lowry, 1971). In CLS-Patienten wurden bisher 140 inaktivierende Mutationen entdeckt, die über das ganze *RSK2*-Gen verteilt sind, aber ein Zusammenhang einer speziellen Mutation mit der Schwere der Erkrankung konnte nicht aufgezeigt werden (Jacquot, 1998; Delaunoy, 2001; Touraine, 2002). Die mentalen Fähigkeiten der Mehrheit der männlichen CLS-Patienten sind stark beeinträchtigt, der IQ liegt zwischen 15 und 60 und ist in schweren Fällen mit eingeschränkten sprachlichen Fähigkeiten verbunden. Auch die Entwicklung des Bewegungsapparates ist verzögert und äußert sich im Säuglingsalter durch eine allgemeine Hypotonie (Hanauer and Young, 2002).

1.18 Fragestellung und Zielsetzung

Mutationen im *rsk2*-Gen verursachen eine Form der mentalen Retardierung mit einhergehenden Störungen im Bewegungsapparat, das Coffin-Lowry Syndrom (CLS). Auch in Mäusen und *Drosophila* wurde nachgewiesen, dass RSK eine wichtige Funktion in Lern- und Gedächtnisprozessen übernimmt und zudem einen Einfluss auf die Struktur der Synapsen ausübt. Darüber hinaus konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass RSK den zirkadianen Rhythmus und die Augen- und Flügelentwicklung beeinflusst. In der Augen- und Flügelentwicklung konnte RSK eine Funktion als Negativregulator des ERK/MAPK-Signalwegs zugeschrieben werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Lokalisation von RSK und dessen Einfluss auf die Regulation des ERK/MAPK-Signalwegs in Motoneuronen von *Drosophila* untersucht werden. Hierfür wurde zunächst bestimmt, ob aktiviertes ERK und RSK in den Zellkörpern und den Synapsen der Motoneurone kolokalisieren. Weiter sollte untersucht werden, ob sich der Verlust von RSK auf die subzelluläre Lokalisation von aktivem ERK auswirkt. Außerdem wurde mit Hilfe von immunhistochemischen und elektrophysiologischen Untersuchungen der Einfluss von RSK auf die Struktur und Funktion der neuromuskulären Synapsen analysiert. Durch Untersuchungen der genetischen Interaktion von *erk* und *rsk* sollte geklärt werden, ob die Veränderungen in der Struktur der neuromuskulären Synapsen von *RSK*-Nullmutanten durch die fehlende Negativregulation des ERK/MAPK-Signalwegs verursacht werden oder durch die fehlende Phosphorylierung der RSK-Substrate entstanden sind. Da Defekte im axonalen Transport in vielen neuropathologischen Erkrankungen auftreten, sollte untersucht werden, ob RSK einen Einfluss auf den axonalen Transport präsynaptischer Proteine und Mitochondrien hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von Sarstedt, Greiner, Eppendorf, Biozym, Biometra und Biotech bezogen. Die Chemikalien stammten von Applichem, Sigma, Biorad, Roche, Roth und NEB.

2.1.2 Reagenzien

Reagenz	Verwendung	Hersteller
ECL prime	Western Blot	GE Healthcare
VectaShield H-1000	Immunfärbungen	Vector Laboratories

2.1.3 Kits

Kit	Hersteller
Plasmid Mini-Prep	Qiagen
Plasmid Midi-Prep	Qiagen
Plasmid Maxi-Prep	Qiagen

2.1.4 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Konfokalmikroskop	TCS SP5	Leica
Konfokalmikroskop	Fluoview 1000 IX81	Olympus
Western Blot Detektionssystem	ChemoCam Imager	Intas

2.1.5 Software

Software	Version	Hersteller
CorelDRAW	X4	Corel Coperation
EndNote	X7	Thomson Reuter
BioEdit	v7.2.5	Tom Hall, Ibis Bioscience
Origin	Pro9	OriginLab
Image J	1.48a	Wayne Rasband, NIH, USA
Matlab	R2010b	The MathWorks

2.1.6 Lösungen und Puffer

2xYT-Medium pH 7,0 (1 l)

16 g	Bactotrypton
10 g	Bacto Hefeextrakt
5 g	Natriumchlorid

TBE-Puffer pH 8,0

0,89 mM	Tris pH 8,0
0,89 mM	Borsäure
2 mM	EDTA

4 x SDS-PAGE Probenpuffer (Laemmli, 1970)

70 mM	Tris pH 6,8
2,5 mM	EDTA
3% (w/V)	SDS
40% (V/V)	Glycerin
5% (V/V)	β -Mercaptoethanol
0,05% (w/V)	Bromphenolblau

SDS-PAGE Laufpuffer

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1% (w/V)	SDS

SDS-PAGE Sammelgel

0,5 M	Tris pH 6,8
0,4% (w/V)	SDS

SDS-PAGE Trenngel

1,5 M	Tris pH 8,8
0,4% (w/V)	SDS

Transferpuffer

25 mM	Tris pH 8,3
150 mM	Glycin
10% (V/V)	Methanol

1 x TBST

10 mM	Tris pH 8,3
150M	Natriumchlorid
0,01% (V/V)	Tween 20

1 x PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,4

137 mM	Natriumchlorid
2,7 mM	Kaliumchlorid
8,1 mM	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
1,8 mM	Monokaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

1 x PBT pH 7,4

137 mM	Natriumchlorid
2,7 mM	Kaliumchlorid
8,1 mM	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)
1,8 mM	Monokaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
0,05% (V/V)	TritonX-100

HL₃ Medium pH 7,2 (hemolymph-like saline solution)

70 mM	Natriumchlorid
5 mM	Kaliumchlorid
20 mM	Magnesiumchlorid
10 mM	Natriumhydrogencarbonat
5 mM	D-(+)-Trehalose
115 mM	Sucrose
5 mM	HEPES
1,5 mM	Calciumchlorid

2.1.7 Primer

Primer	Sequenz
<i>PAC-BW-F</i>	ATCGGCATAGTATATCGGCATAG
<i>PAC-BW-R</i>	CTACACGACGTTCCGCTAATTCA

2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper

Antigen	Wirtstier	Klon-Nr.	Kat.-Nr.	Herkunft	Verdünnung	Anwendung
BRP	Maus	nc82		E. Buchner, Universität Würzburg	1:100 in 5% NGS	IF
CSP	Maus	ab49		E. Buchner, Universität Würzburg	1:100 in 5% NGS	IF
GluRIID	Kaninchen			S. Sigrist, FU Berlin	1:1000 in 5% NGS	IF
HRP-Cy5	Ziege		123-175- 021	Dianova	1:250 in 5% NGS	IF
GFP	Huhn		AB16901	Merck Millipore	1:1000 in 5% NGS	IF
Lamin Dm0	Maus	ADL67.10		Developmental Studies Hybridoma Bank	1:10 in 5% NGS	IF
Lamin Dm0	Maus	ADL195		Developmental Studies Hybridoma Bank	1:10 in 5% NGS	IF
Phospho-p44/42 (ERK1/2, Thr202/Tyr204)	Kaninchen monoklonal	D13.14	4370	Cell Signaling	1:200 in 5% NGS	IF
Phospho-p44/42 (ERK1/2, Thr202/Tyr204)	Kaninchen monoklonal	D13.14	4370	Cell Signaling	1:2000 in 5% BSA	WB
p44/42 (ERK1/2)	Kaninchen monoklonal	37F5	4695	Cell Signaling	1:1000 in 5% Milchpulver	WB
S6KII (RSK)	Kaninchen monoklonal	2596		T. Raabe, Universität Würzburg	1:500 in 1,5% BSA +2,5% Milchpulver	WB
α -Tubulin	Maus	DM1a	T9026	Sigma-Aldrich	1:10000 in 5% Milchpulver	WB

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugat	Spezies	Kat.-Nr.	Herkunft	Verdünnung	Anwendung
Huhn	DyLight488	Ziege	103-485-155	Dianova	1:200	IF
Maus	Alexa488	Ziege	A-11001	Molecular Probes	1:200	IF
Kaninchen	Alexa488	Ziege	A-11034	Molecular Probes	1:200	IF
Kaninchen	Cy3	Ziege	111-165-144	Dianova	1:200	IF
Maus	Cy5	Esel	715-175-151	Dianova	1:100	IF
Kaninchen	Cy5	Ziege	111-175-144	Dianova	1:100	IF
Maus	HRP	Schaf	NA931	GE Healthcare	1:10000	WB
Kaninchen	HRP	Esel	NA9340V	GE Healthcare	1:10000	WB

2.1.9 Fliegenlinien

Genotyp	Herkunft
<i>w¹¹⁸</i>	T. Raabe, Universität Würzburg, Deutschland
<i>rsk^{Δ58/1}</i>	M. Heisenberg Universität Würzburg, Deutschland (Putz, 2004)
<i>rsk^{D1}</i>	J. Chung Seoul National University, South Korea (Kim, 2006)
<i>Dp(1;3) DC389, PBac{DC389}VK00033</i>	Bloomington Stock Center #30785
<i>Dp(1;3) DC390, PBac{DC390}VK00033</i>	Bloomington Stock Center #30786
<i>rsk^{Δ58/1}; Dp(1;3) DC389, PBac{DC389}VK00033</i>	hergestellt für diese Arbeit
<i>rsk^{Δ58/1}; Dp(1;3) DC390, PBac{DC390}VK00033</i>	hergestellt für diese Arbeit
<i>rsk^{Δ58/1}; PBac{8-5M}VK00033</i>	hergestellt für diese Arbeit
<i>rsk^{D1}; PBac{8-5M}VK00033</i>	hergestellt für diese Arbeit
<i>rl^l</i>	T. Raabe, Universität Würzburg, Deutschland (Briggs, 1994)
<i>l(1) phl^{C110}; rl^{Sem/+}</i>	T. Raabe, Universität Würzburg, Deutschland (Brunner, 1994)
<i>rsk^{Δ58/1}; rl^{Sem/+}</i>	hergestellt für diese Arbeit
<i>rsk^{Δ58/1}; rl^{l/rl^l}</i>	hergestellt für diese Arbeit

Genotyp	Herkunft
<i>DMef2-Gal4</i>	C. Förster, Universität Würzburg, Deutschland (Ranganayakulu, 1998)
<i>D42-Gal4</i>	T. Raabe, Universität Würzburg, Deutschland (Yeh, 1995)
<i>OK6-Gal4</i>	T. Raabe, Universität Würzburg, Deutschland (Aberle, 2002)
<i>UAS-mCD8::GFP</i>	T. Raabe, Universität Würzburg, Deutschland (Lee, 1999)
<i>UAS-GFP::RSK-tg58h</i>	hergestellt von T. Raabe
<i>UAS-Mito::GFP</i>	T. Raabe, Universität Würzburg, Deutschland (Pilling, 2006)
<i>OK6-Gal4, UAS-Mito::GFP/Cyo</i>	S. Sigrist FU Berlin, Deutschland
<i>rsk^{Δ58/1}; OK6-Gal4, UAS-Mito::GFP/Cyo</i>	hergestellt für diese Arbeit

2.1.10 *Drosophila* Aufzucht

Die Fliegen wurden auf Standardfliegenfutter bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% in einem 12 h-Tag-Nacht-Zyklus gehalten.

2.2 Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden nach Sambrook et. al (1989) durchgeführt.

2.2.1 Herstellung transgener Fliegen

Die genomische BAC-Sammlung (CHORI-Genbank) stellt eine Auswahl genomischer Fragmente des X-Chromosoms von 20 kb Länge, die in einen *attB-P[acman]-Cm^R-BW*-Vektor kloniert sind, zur Verfügung (Venken, 2009). Für die Rettungsexperimente wurde aus dieser BAC-Sammlung der Klon *CH322-75N12* ausgewählt, der den Genlocus von *rsk* komplett enthält. Mit den vektorspezifischen Primern *PAC-BW-F* und *PAC-BW-R* wurde der ausgewählte Klon in beide Richtungen teilweise sequenziert, um die genauen Endpunkte des Fragments zu bestimmen und somit zu kontrollieren, ob das *rsk*-Gen vollständig enthalten ist. Der Klon wurde an der *attP*-Stelle, die sich an Position 65B2 auf dem dritten Chromosom

befindet, über eine $\Phi C31$ -vermittelte Integration in die Linie $y^l, w^{118}; PBac\{y^+ attP-3B\}VK00033$ (Bloomington Stock Center #9750) zielgerichtet inseriert. Die transgenen Fliegen wurden von BestGene Inc. (Chino Hills, USA) hergestellt. Die erhaltenen Linien wurden für Rettungsexperimente anschließend mit $rsk^{A58/1}$ gekreuzt ($rsk^{A58/1}; P[8-5M]-2$; $rsk^{A58/1}; P[8-5M]-4$; $rsk^{A58/1}; P[8-5M]-5$). Das Expressionslevel von RSK der Linie $rsk^{A58/1}; P[8-5M]-5$ war der endogenen RSK-Menge ähnlich, weshalb die Rettungsexperimente mit dieser Linie durchgeführt wurden.

2.2.2 Herstellung von Lysaten der Ventralganglien

Zunächst wurden 50 Gehirne aus Larven im späten dritten Larvenstadium in kalter Fixierungslösung (4% PFA in PBS) auf Eis präpariert und für insgesamt 10 min fixiert. Die Präparation wurde direkt in Fixierungslösung durchgeführt, um eventuelle Dephosphorylierung zu minimieren. Anschließend wurden die Gehirne dreimal für 20 min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die beiden Hemisphären entfernt und die Ventralganglien in 100 μ l 2 x Probenpuffer (Laemmli, 1970) überführt. Die Ventralganglien wurden mit einem Mikropistill homogenisiert, die Zellen durch eine dreimalige Behandlung mit Ultraschall für 30 s aufgeschlossen und die Proteine lysiert. Danach wurden die Lysate für 10 min bei 96°C erhitzt und anschließend mit 12 000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, um Zellrückstände zu entfernen.

2.2.3 Herstellung von Lysaten aus adulten Köpfen

Zur Extraktion der Proteine aus Köpfen adulter Fliegen wurden 20 Köpfe direkt in 40 μ l 2 x Probenpuffer (Laemmli, 1970) mit einem Mikropistill homogenisiert. Danach wurden die Zellen durch eine dreimalige Behandlung mit Ultraschall für 30 s aufgeschlossen und die Proteine durch Schütteln (900 rpm, 15 min) bei Raumtemperatur extrahiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 96°C erhitzt und mit 12 000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, um Chitin- und Zellrückstände zu entfernen.

2.2.4 SDS-PAGE und Western Blot

Die in den Lysaten enthaltenen Proteine wurden durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die SDS-PAGE wurde in einem Biometra-Gelsystem mit Trenngelen bestehend aus 10 % oder 12 % Acrylamid-Lösung durchgeführt, wobei die Proteine zunächst im 4,5%igen Sammelgel bei 50 V fokussiert und anschließend im Trenngel bei 120 V bis 180 V aufgetrennt wurden, bis der Größenbereich zwischen 30 kDa und 100 kDa optimal separiert war. Danach wurden die Proteine mit einem Semidry-Blotting-System (Biorad) bei 25 V innerhalb 90 min auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll, 0,2 µm) transferiert. Anschließend wurde die Membran in einer Blockierungslösung, die vom verwendeten primären Antikörper abhängig ist, für 60 min bei Raumtemperatur geschüttelt und dann über Nacht bei 4°C in dem primären Antikörper, der mit der jeweiligen Blockierungslösung verdünnt wurde, inkubiert. Bei Verwendung des Antikörpers, der gegen pERK gerichtet ist, wurde die Membran für zwei Tage bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären Antikörper, der mit TBST verdünnt war, für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde ECL Prime (GE Healthcare) nach Herstelleranweisung verwendet. Die Western Blots wurden in dem Chemocam Imager (Intas) aufgenommen und zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge mit Image J 1.48 analysiert.

Zur Bestimmung des Expressionslevels von RSK wurden 10 µl des Lysats aus Fliegenköpfen aufgetragen. Zur Quantifizierung der Menge an ERK und phosphoryliertem ERK wurden je 50 µl Lysat aus Ventralganglien untersucht.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Larven im späten, dritten Larvenstadium wurden in HL₃-Medium (Brent, 2009) präpariert. Für den Nachweis von phosphoryliertem ERK wurde die Präparation direkt in kalter Fixierungslösung auf Eis durchgeführt und insgesamt für 15 min auf Eis fixiert, um eine mögliche Dephosphorylierung während der Präparation zu minimieren. Abhängig vom jeweiligen Experiment wurden entweder nur Hautmuskelschläuche oder Hautmuskelschläuche inklusive Gehirn präpariert. Zur Bestimmung der Akkumulationen in den Axonen wurden Hautmuskelschläuche mit Gehirn und Axonen so präpariert, dass die Axone möglichst unverletzt blieben. Die Präparate wurden für 15 min bei Raumtemperatur fixiert (4% (w/V)

PFA in PBS), anschließend fünf Mal gespült und danach dreimal in PBT (PBS + 0,05% (V/V) Triton X-100) für 20 min bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden die Präparate für mindestens 30 min in 5% (w/V) NGS(normal goat serum) in PBT blockiert. Die Präparate wurden daraufhin über Nacht bei 4°C mit den primären Antikörpern, die in Blockierungslösung verdünnt wurden, inkubiert. Nach fünfmaligem Spülen und dreimaligem Waschen für 20 min mit PBT wurden die Präparate mit den Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpern, die in PBT verdünnt waren, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Präparate abermals fünf Mal mit PBT gespült und drei Mal für 20 min bei Raumtemperatur in PBT gewaschen wurden, wurden sie in VectaShield H-1000 (Vector Laboratories) eingebettet und mit Nagellack versiegelt. Bis zum Mikroskopieren wurden die fertigen Präparate bei -20°C gelagert. Um Variationen innerhalb eines Experimentes zu verhindern, wurden alle Präparate der zu vergleichenden Genotypen simultan gefärbt. Die Präparate wurden an einem inversen konfokalen Mikroskop aufgenommen. Hierfür standen ein Leica TCS SP5 oder das Olympus Fluoview 1000 IX 81 zur Verfügung. Die Aufnahmen der neuromuskulären Synapsen wurde mit einem 60x-NA 1,35-Öl-Objektiv und einer 1,5-fachen Vergrößerung, die der Ventralganglien und der Axone wurden mit einem 60x-NA 1,35-Öl-Objektiv und einer 3,0-fachen Vergrößerung durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixel und einer Geschwindigkeit von 4,0 Pixeln/ μ s bzw. 100 Hz durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden mit Image J 1.48 bearbeitet und analysiert.

Die Aufnahmen und Messungen der Parameter der neuromuskulären Synapse wurden wie zuvor beschrieben (Viquez, 2006; Andlauer and Sigrist, 2012a), an den Muskel 6/7 im Abdominalsegment A2 oder A3 durchgeführt. Alle Genotypen innerhalb eines Experiments wurden mit denselben Mikroskop-Einstellungen aufgenommen, so dass eine Sättigung des Signals vermieden wurde. Die quantitative Analyse wurde wie beschrieben durchgeführt (Andlauer and Sigrist, 2012b). Zur quantitativen Analyse wurden innerhalb eines Experiments dieselben Schwellenwerte für alle Genotypen verwendet.

Zur Quantifizierung der BRP- und CSP-Aggregate wurden die Axone über die ganze Länge vom Ventralganglion bis hin zu den Axontermini im Abdominalsegment A3 mit denselben Mikroskop-Einstellungen für alle Genotypen aufgenommen. Die Anzahl der BRP-bzw. CSP-Aggregate wurde auf die Fläche der Axone, die durch die HRP-Färbung bestimmt werden konnte, normalisiert.

2.2.6 *In vivo* Live-imaging von intakten Larven im frühen dritten Larvenstadium

Für die Untersuchungen des axonalen Transports von Mitochondrien in Motoneuronen von intakten Larven im frühen, dritten Larvenstadium wurde eine Aufnahme-Kammer wie von Sigrist und Andlauer beschrieben (Sigrist and Andlauer, 2012b; Sigrist and Andlauer, 2012c), in dem inversen konfokalen Mikroskop Fluoview 1000 IX 81 (Olympus) mit einem 60x-NA 1,35-Öl-Objektiv verwendet. Zur Untersuchung wurde ein 61,44 μm langer Bereich des Axons ausgewählt, der 100 μm von der Spitze des Ventralganglions entfernt war. Zunächst wurde dieser Bereich mit einer Laserintensität von 80% für 2-3 min gebleicht bis keine Signale mehr sichtbar waren. Die Aufnahme-Serien von 1000 Bildern pro Serie wurden in Intervallen von 720 ms mit einer Auflösung von 512x128 Pixel und mit einer Geschwindigkeit von 8,0 Pixel/ μs aufgenommen. Die Aufnahme-Serien wurden mit Image J 1.48a bearbeitet, indem zunächst die Aufnahmen auf den Axonbereich begrenzt wurden. Anschließend wurde das Hintergrundsignal innerhalb des Axons über die Bildserie gemessen und danach von der gesamten Bildserie subtrahiert. Des Weiteren wurden unspezifische Strukturen entfernt, die die Signale überdecken könnten. Zudem wurden die Signale mit einem Gaußschen Unschärfefilter (1/80) bearbeitet, um die Fokusebene zu korrigieren. Die Aufnahme-Serien konnten dann in Matlab (R2010b) in Kymographen dargestellt werden. Die Kymographen geben Auskunft über die Bewegungsrichtung und Geschwindigkeit der Mitochondrien. Zur quantitativen Analyse wurden alle Mitochondrien, die in selber Richtung bewegt wurden, ausgezählt und als prozentualer Anteil der gesamten Mitochondrien, die in dieser Serie gezählt wurden, angegeben.

2.2.7 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in Kollaboration mit AG Kittel, Institut für Physiologie der Universität Würzburg von N. Ehmman durchgeführt. Die „Two-Electrode-Voltage-Clamp“-Aufnahmen (Axoclamp 900A Verstärker, Molecular Devices) wurden am Muskel 6 in den Abdominalsegmenten A2 oder A3 männlicher Larven im späten dritten Larvenstadium aufgenommen (Ljaschenko, 2013). Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in extrazellulärem HL₃-Medium durchgeführt. Für die Messungen wurden intrazelluläre Elektroden mit Widerständen von 10-20 M Ω , die mit einer 3M KCL-Lösung gefüllt waren, verwendet. Die Zellen wurden während der Aufnahmen auf ein bestimmtes

Halte-Potential fixiert. Für die Aufnahmen der Minis wurde das Halte-Potential auf -80 mV festgelegt, für die Aufnahmen der exzitatorischen EPSC auf -60 mV. Um den synaptischen Strom zu evozieren wurde der Nerv in eine Saugelektrode (Durchmesser: 1,5 μm ; gefüllt mit extrazellulärer Lösung) eingesaugt und über die Saugelektrode mit einem Potential von 10 V in Intervallen von 300 ms stimuliert (Grass S88 Stimulator und Isolationseinheit SIU5, Astro-Med). Die gemessenen Signale wurden mit Clampfit 10.2 (Molecular Devices) analysiert. Nur Zellen mit einem anfänglichen Membranpotential von mindestens -50 mV und einem Membranwiderstand von mindestens 4 M Ω wurden in die Analyse aufgenommen. Der „Quantal Content“ wurde berechnet, indem ein Quotient aus der durchschnittlichen eEPSC-Amplitude und der durchschnittlichen Mini-Amplitude gebildet wurde, der anschließend für das hyperpolarisierte Haltepotential korrigiert wurde (Reduktion der Amplitude um 75%) (Hallermann, 2010).

2.2.8 Statistische Datenanalyse

Alle Untersuchungen wurden mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet. Bei mehrfachen Vergleichen innerhalb einer Messreihe wurde der Signifikanzwert $p < 0,005$ nach dem Bonferroni-Korrekturfaktor (Bonferroni, 1936) angepasst. Die Daten sind als \pm Standardfehler des arithmetischen Mittelwerts (S.E.M) angegeben. Die Sterne beschreiben die unterschiedlichen statistischen Signifikanzlevels: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung genomischer RSK-Rettungskonstrukte

Das *RSK*-Gen wird von einem anderen Gen (*CG17600*) umschlossen, dessen molekulare Funktion noch unbekannt ist, und befindet sich in dem Intron zwischen dem 4. und 5. Exon (Abb. 3.1 A, nach flybase.org). Durch diese Situation lässt sich schwer feststellen, ob die gefundenen Phänotypen durch das Fehlen des *RSK*-Gens verursacht werden oder eventuell durch Veränderungen des Genlocus von *CG17600* zustande kommen.

Um zu beweisen, dass die beschriebenen Defekte der neuromuskulären Synapse von *Drosophila* Larven (Fischer, 2009b), ausschließlich durch das Fehlen des *RSK*-Gen verursacht werden, wurden Fliegen aus der Stocksammlung: „Duplication Consortium X Chromosome Duplications“ Bloomington *Drosophila* Stock Center der Universität von Indiana (<http://flystocks.bio.indiana.edu>) bestellt. Diese Fliegen tragen verschiedene genomische Fragmente von 80 kb Länge aus der CHORI-Genombank („Children`s Hospital Research Institute“), die an einer definierten Stelle auf dem 3. Chromosom mittels der Φ C31-Integrase inseriert wurden (Bateman, 2006). Eines dieser Fragmente umschließt beide Gene, *RSK* und *CG17600* und sollte auch alle relevanten Promotorregionen von *RSK* enthalten (*Dp(1; 3) DC390* oder *P[DC390]*, Abb. 3.1 A). Eine früher beschriebene Nullmutante von *RSK* (*RSK^{Δ58/1}*; Putz, 2004) dient auch in dieser Arbeit als Nullmutante. Um festzustellen, ob die Proteinexpression vergleichbar zu der endogenen *RSK*-Expression ist, wurde die Proteinmenge mit Hilfe von Western Blots, die mit Antikörpern gegen *RSK* und α -Tubulin zur Normalisierung inkubiert wurden, quantitativ ausgewertet (Abb. 3.1 B). Das in dem 80 kb-Fragment enthaltene *RSK*-Gen wird im *RSK^{Δ58/1}*-Hintergrund stärker exprimiert als das endogene *RSK*-Gen des Wildtyps (Abb. 3.1 B: Wildtyp: $1,00 \pm 0,09$; *RSK^{Δ58/1}*; *P[DC390]*: $1,62 \pm 0,07$). Um zu untersuchen, ob der Verlust von *RSK* eine Auswirkung auf die strukturelle Morphologie der larvalen neuromuskulären Synapse hat, wurden Haut-Muskel-Schläuche männlicher Larven im wandernden 3. Larvenstadium präpariert, fixiert und mit Antikörpern gefärbt. Als Marker für die Aktiven Zonen wurde ein Antikörper gegen Bruchpilot (BRP) verwendet. Bruchpilot, das *Drosophila* Ortholog zu CAST/ELKS der Vertebraten, ist ein wichtiger Bestandteil der Zytomatrix, die mit den Aktiven Zonen assoziiert ist (Wagh, 2006). Die Bereiche, die durch BRP gefärbt waren, dienten zur Bestimmung der Gesamtzahl Aktiven Zonen der neuromuskulären Synapse, die die Muskeln 6 und 7 im Abdominalsegment A2 oder A3 innerviert. Die quantitative Analyse der Struktur der neuromuskulären Synapse wird im

Ergebnisteil 3.5 genauer beschrieben (Abb. 3.7). Der Verlust von RSK führt zu einer verringerten Gesamtzahl der Aktiven Zonen einer neuromuskulären Synapse (Abb. 3.1 C: Wildtyp: Anzahl Aktiver Zonen: $265,4 \pm 12,3$; $RSK^{458/1}$: Anzahl Aktiver Zonen: $208,4 \pm 9,4$; $p < 0,01$). Durch die Expression des genomischen Rettungskonstrukts im $RSK^{458/1}$ -Hintergrund ($RSK^{458/1}; P[DC390]$) ist die Gesamtzahl der Aktiven Zonen vergleichbar mit der Anzahl im Wildtyp (Abb. 3.1 C; Wildtyp: Anzahl Aktiver Zonen: $265,4 \pm 12,3$; $RSK^{458/1}; P[DC390]$: AZ-Anzahl: $263,5 \pm 19,7$).

Ein weiteres Fragment von 80 kb Länge (*DC389*), das weder das *RSK*-Gen, noch das *CG17600*-Gen abdeckt, und an derselben Stelle im Genom inseriert wurde, wurde auch im Bloomington Drosophila Stock Center bestellt (*Dp(1; 3) DC389* oder *P[DC389]*, Abb. 3.1 A). Dieser Fliegen-Stamm dient dazu auszuschließen, dass der Phänotyp durch weitere Mutationen im Genom entstanden ist, die weder *RSK* noch *CG17600* betreffen. Um auszuschließen, dass durch die Expression des *DC389*-Konstrukts kein RSK-Protein exprimiert wird, wurde das Transgen in den $RSK^{458/1}$ -Hintergrund gekreuzt und die RSK-Proteinexpression quantifiziert (Abb. 3.1 B: $RSK^{458/1}$: $0,1 \pm 0,02$; $RSK^{458/1}; P[DC389]$: $0,13 \pm 0,05$). Durch die Expression des Transgens wurde kein RSK-Protein exprimiert, die Gesamtzahl der Aktiven Zonen blieb im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert, vergleichbar der Anzahl in der Nullmutante (Abb. 3.1 C: Anzahl Aktiver Zonen: $RSK^{458/1}$: $208,4 \pm 9,4$; $RSK^{458/1}; P[DC389]$: $206,7 \pm 8,0$). Die verringerte Anzahl Aktiver Zonen der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 in Abdominalsegment A2 oder A3 von $RSK^{458/1}; P[DC389]$ zeigt, dass der Phänotyp nicht durch weitere Mutationen im Genom verursacht wurde. Die verringerte Gesamtzahl Aktiver Zonen ist auf den Verlust des *RSK*- oder des *CG17600*-Gens zurückzuführen.

Eine kürzere, 20 kb lange Duplikation des X-Chromosoms der CHORI-Datenbank wurde ausgewählt, die auch den Genlocus von *RSK* umschließt (8-5M; Klonnummer: CH322-75N12). Dieses Fragment dient zur Verifizierung, ob die beobachteten Phänotypen dem Verlust von RSK zuzuschreiben sind. Das Fragment wurde in einen P[acman]-Vektor kloniert (Venken, 2009), um dann mittels $\Phi C31$ -Integrase an derselben Stelle auf dem 3. Chromosom inseriert zu werden wie in *DC389* und *DC390*. Drei unabhängige Insertionen wurden anschließend in den $RSK^{458/1}$ -Hintergrund homozygot eingekreuzt ($P[8-5M]-2$; $P[8-5M]-4$; $P[8-5M]-5$). Die Expression des RSK-Proteins ist unterschiedlich hoch in den drei Linien (Abb. 3.1 B: $RSK^{458/1}; P[8-5M]-2$: $1,53 \pm 0,02$; $RSK^{458/1}; P[8-5M]-4$: $0,75 \pm 0,06$; $RSK^{458/1}; P[8-5M]-5$: $0,80 \pm 0,03$). Für die Rettungsversuche wurde die Linie *8-5M-5* ausgewählt, da die Menge an gebildetem RSK-Protein fast der Menge an endogenem RSK im Wildtyp entspricht.

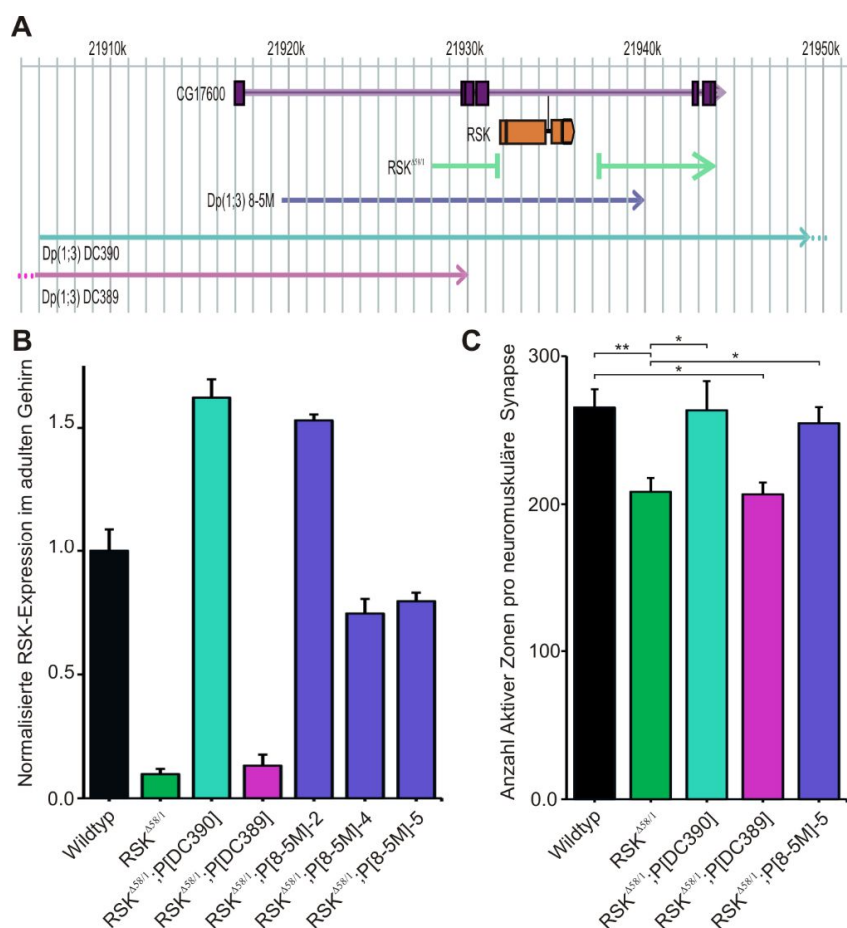


Abb. 3.1 Test verschiedener genomischer RSK-Konstrukte.

(A) Schematische Darstellung der X-chromosomalen Genregion von *RSK*. Gezeigt ist das *RSK*-Gen (orange) im Intron des Gens *CG17600* (violett) und der Deletionsbereich der Nullmutante *RSK^{AS8/1}* (grün), sowie verschiedene X-chromosomale Fragmente, die als Duplikation auf dem dritten Chromosom vorliegen (Dp1;3). *DC390* umfasst beide Gene, *CG17600* und *RSK* (hellblau), *DC389* umschließt keines der beiden Gene (pink) und 8-5M umfasst *RSK*, aber *CG17600* nicht vollständig (dunkelblau). (B) Quantitative Analyse der Proteinexpression von *RSK* in Wildtyp, *RSK^{AS8/1}* und den transgenen, genomischen Konstrukten im *RSK^{AS8/1}*-Hintergrund. Die gemessene Menge an *RSK*-Protein wurde auf die im Lysat enthaltene Menge an α -Tubulin normalisiert. Die normalisierte Menge an *RSK*-Protein wurde in Relation zur endogenen *RSK*-Menge des Wildtyp dargestellt; die Stichprobenzahl ist n=3. (C) Anzahl der Aktiven Zonen der larvalen neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 oder A3. Die Anzahl ist in *RSK^{AS8/1}*-Larven verringert. Dieser Defekt ist durch das Fehlen der *RSK*-Funktion bedingt und kann durch das Einbringen eines X-chromosomalen Fragments, das das *RSK*-Gen umschließt, gerettet werden.

Die Anzahl der Aktiven Zonen ist im Vergleich zu *RSK^{AS8/1}* signifikant erhöht und entspricht der Anzahl Aktiver Zonen wildtypischer Larven (Abb. 3.1 C; Anzahl Aktiver Zonen: *RSK^{AS8/1}*: $208,4 \pm 9,4$; *RSK^{AS8/1}*; *P[8-5M]-5*: $254,7 \pm 10,9$; $p < 0,05$; Wildtyp: $265,4 \pm 12,3$).

Durch die 20 kb lange Duplikation eines X-chromosomalen Fragments, das das *RSK*-Gen enthält, kann die verringerte Anzahl der Aktiven Zonen der neuromuskulären Synapse gerettet werden. Durch dieses Fragment wird der Genbereich von *RSK* nicht aber von *CG17600* vollständig abgedeckt, weshalb die verringerte Anzahl Aktiver Zonen auf den Verlust von *RSK* zurückzuführen ist. Alle weiteren Rettungsexperimente wurden mit dieser Linie durchgeführt, *RSK^{Δ58/1}; P[8-5M]*, die bis auf weiteres als *RSK^{Δ58/1}; P[RSK]* bezeichnet wird.

3.2 Lokalisierung von *RSK* in den Motoneuronen

Basierend auf vorangegangenen Studien, die eine Funktion von *RSK* in den Motoneuronen beschreiben (Fischer, 2009b), wurde zunächst die subzelluläre Lokalisierung von *RSK* in den Motoneuronen von *Drosophila* Larven bestimmt. Endogenes *RSK* konnte nicht immunhistochemisch gefärbt werden mit einem *RSK*-spezifischen Antiserum (S6KII-96), womöglich ist die endogene Proteinmenge von *RSK* zu gering. Um *RSK* in den Motoneuronen detektieren zu können, wurde ein GFP-markiertes cDNA-Konstrukt von *RSK* (*UAS-RSK::GFP*) in den Motoneuronen überexprimiert. Hierfür wurden transgene Fliegen, die ein *UAS-RSK::GFP*-Konstrukt tragen, mit Fliegen, die den Motoneuron-spezifischen Treiber *D42-Gal4* tragen, gekreuzt. Männliche Nachkommen im wandernden dritten Larvenstadium (L3), die *RSK::GFP* exprimierten, wurden ausgewählt, um den Hautmuskelschlauch zu präparieren und das überexprimierte *RSK::GFP* mittels eines Antikörpers gegen GFP in den neuromuskulären Synapsen detektiert (Abb. 3.2 A). Die Aktiven Zonen der Präsynapse wurden mit einem Antikörper gegen BRP gefärbt. Um die Postsynapse zu visualisieren, wurden die Glutamatrezeptoren des Typs II mit einem Antikörper gegen die gemeinsame Untereinheit D gefärbt (GluRIID). Das GFP-Signal konnte in der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 nachgewiesen werden.

Genauer befindet sich das überexprimierte *RSK::GFP* innerhalb der neuromuskulären Endknöpfchen, den Boutons. Die Lokalisierung von *RSK::GFP* ist aber nicht auf die Aktiven Zonen beschränkt (Abb. 3.2 A). Um zu bestimmen, ob *RSK* auch in der Postsynapse lokalisiert ist, wurde das Transgene *UAS-RSK::GFP* mit Hilfe der Treiberlinie *mef2-Gal4* Muskel-spezifisch exprimiert. Die Hautmuskelschlauch-Präparate männlicher L3-Larven wurden wie oben beschrieben mit Antikörpern gegen GFP, BRP und GluRIID gefärbt. *RSK::GFP* wird im gesamten Muskel exprimiert, verstärkt in perinukleären Regionen (Abb. 3.2 B). Eine Anreicherung im postsynaptischen Bereich der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im

Abdominalsegment A2 konnte nicht gezeigt werden. RSK ist nur auf der präsynaptischen Seite der neuromuskulären Synapse angereichert.

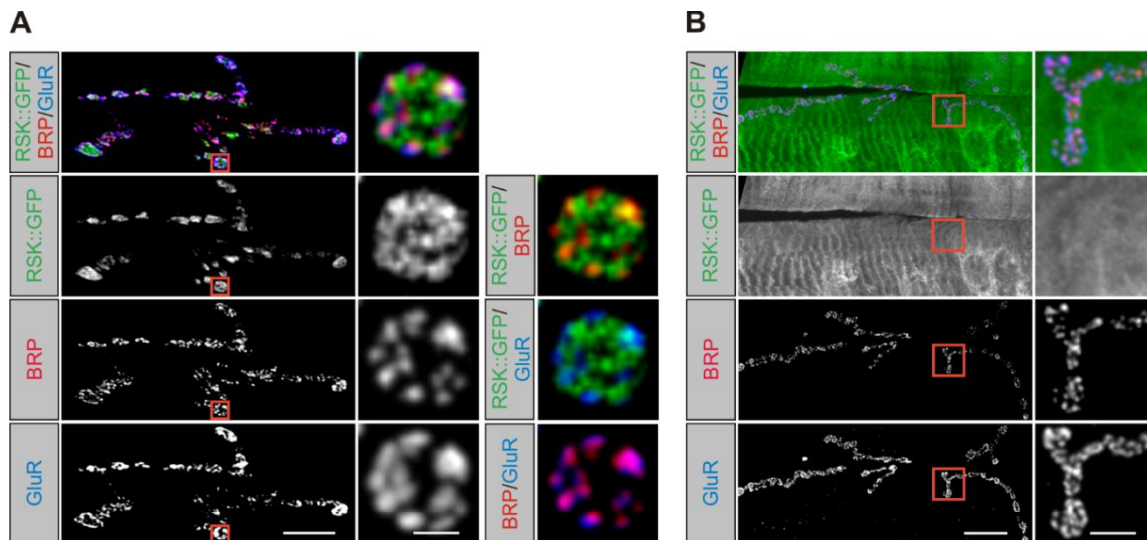


Abb. 3.2 Lokalisierung von RSK an der Synapse.

(A + B) Links: Projektionsansicht der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 zur Bestimmung der Lokalisierung des transgenen RSK::GFP (grün) an der Prä- oder Postsynapse. Maßstab: 20 µm. Rechts: Vergrößerung des in rotmarkierten Boutons. Maßstab: 2 µm. BRP (rot) markiert die Aktiven Zonen, GluRIID (blau) visualisiert die Glutamaterezeptorfelder innerhalb der Boutons. (A) Die Färbung des Motoneuron-spezifisch exprimierten *RSK::GFPs* ist nicht auf die Aktiven Zonen begrenzt. (B) Färbung des Muskel-spezifisch exprimierten *RSK::GFPs* zeigt keine Anreicherung des RSK::GFP an der Postsynapse, es wird gleichmäßig im Muskel exprimiert.

3.3 Lokalisierung von RSK und aktiviertem ERK in den Motoneuronen

RSK bindet ERK, das im aktiven Zustand RSK phosphoryliert und dadurch aktiviert. Somit korreliert die Aktivität von RSK stark mit der ERK-Aktivität (Sturgill, 1988; Chung, 1991). In jüngeren Studien wurde RSK als direkter Interaktionspartner von ERK identifiziert (Kim, 2006, Fischer, 2009b). Die Bindung zwischen RSK und ERK, nicht aber die Kinaseaktivität von RSK ist essenziell für die Funktion von RSK in der Entwicklung der Augen und Flügel von *Drosophila* (Kim, 2006). Durch genetische Untersuchungen wurde festgestellt, dass RSK in der Augen- und Flügelentwicklung als zytoplasmatischer Anker von ERK dient, um die Translokation von ERK in den Nukleus und somit die ERK-abhängige Transkription zu regulieren (Kim, 2006).

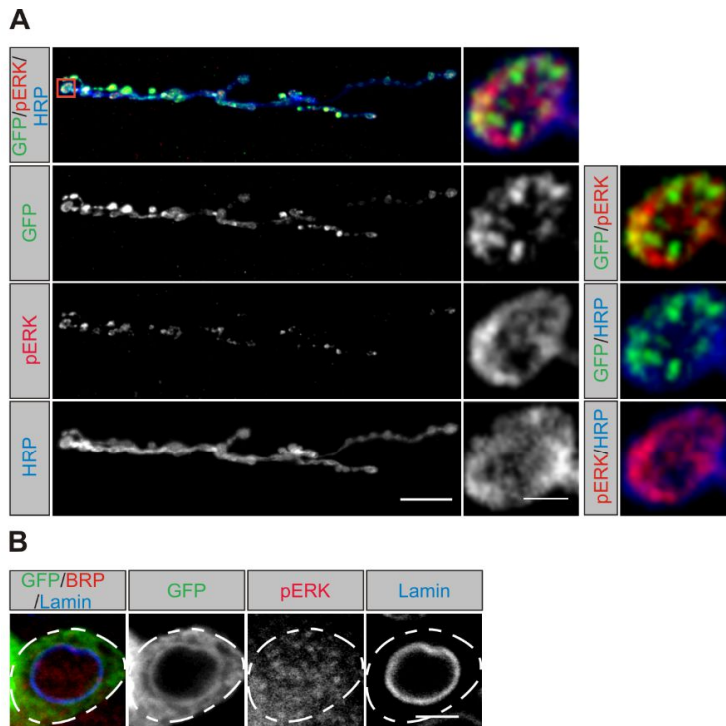


Abb. 3.3 Lokalisierung von RSK und aktivem ERK in den Motoneuronen von *Drosophila* Larven.

(A) Neuromuskuläre Synapse der Muskeln 6/7 in A2 gefärbt mit Antikörpern gegen GFP (grün), pERK (rot) und HRP (blau) als neuronaler Marker. Transgenes *GFP::RSK* wurde durch die Treiberlinie *D42-Gal4* Motoneuron-spezifisch exprimiert. Links: Darstellung der gesamten neuromuskulären Synapse. Maßstab: 20 μm . Rechts: Detaildarstellung des in rot markierten Boutons der neuromuskulären Synapse. Maßstab: 2 μm . GFP::*RSK* und pERK kolokalisieren innerhalb der Boutons in einem punktförmigen Muster. pERK weist eine breitere Verteilung als GFP::*RSK* auf. (B) Färbungen des Somas eines Motoneurons im Ventralganglion mit Antikörper gegen GFP (grün), pERK (rot) und Lamin (blau), als Marker der Kernmembran. Die gestrichelte Linie veranschaulicht den Umriss des Somas. Maßstab: 5 μm . GFP::*RSK* und aktives ERK sind im Cytoplasma des Perikaryons von Motoneuronen lokalisiert, pERK ist im Gegensatz zu RSK zusätzlich im Kern zu sehen.

Biochemische Untersuchungen in Vertebraten hingegen sprechen für eine Funktion von RSK in der negativen Feedback-Regulation des MAPK-Signalwegs (Romeo, 2012). Durch die vorangegangenen Studien kam die Frage auf, ob RSK und aktiviertes ERK auch in den Motoneuronen kolokalisieren. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen des Hautmuskelschlauchs von *Drosophila* L3-Larven mit einem Antikörper durchgeführt, der gegen doppelt-phosphoryliertes und somit aktives ERK (pERK) gerichtet ist. Des Weiteren wurde das transgene GFP-markierte RSK-Konstrukt (*UAS-GFP::RSK*), das mit Hilfe der

Treiberlinie *D42-Gal4* in den Motoneuronen exprimiert wurde, mit einem Antikörper gegen GFP gefärbt.

Zur Visualisierung der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 wurde ein Antikörper gegen HRP (Meerrettichperoxidase) als neuronaler Marker verwendet. GFP::RSK und aktives ERK akkumulieren an der präsynaptischen Seite der neuromuskulären Synapse in einem punktförmigen Muster, in unregelmäßiger Form in den Boutons (Abb. 3.3 A).

Die Kolokalisierung der beiden Proteine ist ersichtlich in manchen, aber nicht in allen Punkten, was darauf hindeutet, dass die Proteine nur an bestimmten Stellen interagieren. Um die Kolokalisierung von RSK und aktivem ERK in den Somata der Motoneurone nachzuweisen, wurden Ventralganglien von Larven im dritten Larvenstadium präpariert und mit Antikörpern gefärbt, die gegen pERK, GFP und Lamin, ein Protein der Kernmembran, gerichtet sind. GFP::RSK wird gleichmäßig im Perikaryon, nicht aber im Zellkern exprimiert, wohingegen pERK im Perikaryon und auch im Nukleus nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.3 B).

3.4 Einfluss von RSK auf die Aktivität von ERK in Motoneuronen

RSK und aktiviertes ERK in den Motoneuronen kolokalisieren, weshalb angenommen wurde, dass der Verlust von RSK die Aktivität von ERK dort auch verändert. Als Nullmutante wurde eine früher beschriebene Deletionsmutante von *RSK* verwendet (*RSK^{Δ58/1}*; Putz, 2004). Um die Population von Motoneuronen anzureichern, wurden ausschließlich die Ventralganglien larvaler Gehirne für die Analyse direkt in der Fixierlösung präpariert, um Veränderungen des Phosphorylierungsstatus zu minimieren. Anschließend wurden die Ventralganglien lysiert und mittels Western Blots mit Antikörpern gegen ERK, pERK und α -Tubulin zur Normalisierung analysiert (Abb. 3.4 A). Die normalisierte ERK-Menge wies keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Nullmutante auf (Abb. 3.4 B; normalisierte ERK-Menge: Wildtyp: $1,00 \pm 0,12$; *RSK^{Δ58/1}*: $1,02 \pm 0,11$). Der Verlust von RSK hat keinen Einfluss auf die Gesamtmenge von ERK in den Motoneuronen. Im Gegensatz dazu ist die Menge an aktiviertem ERK in der *RSK*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht (Abb. 3.4 C; normalisierte pERK-Menge: Wildtyp: $1,00 \pm 0,14$; *RSK^{Δ58/1}*: $1,25 \pm 0,16$; $p < 0,001$).

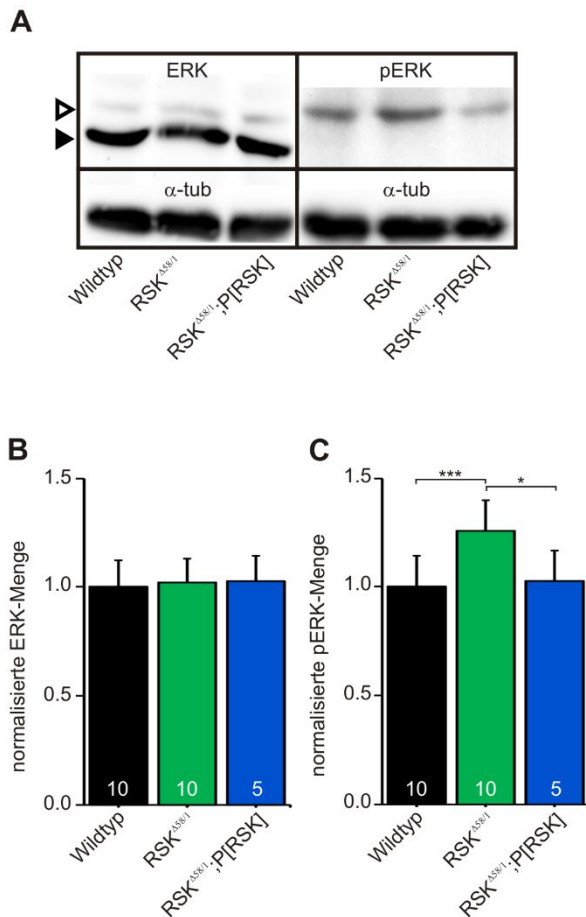


Abb.3.4: Der Verlust von RSK erhöht die ERK Aktivität in Ventralganglien.

(A) Western Blots von Lysaten der Ventralganglien aus Larven des späten dritten Larvenstadiums analysiert mit Antikörpern gegen ERK, pERK und α -Tubulin zur Normalisierung. Der ERK-Antikörper weist unphosphoryliertes (schwarzer Pfeil) und phosphoryliertes, (weißer Pfeil) ERK nach. (B,C) Quantifizierung der ERK- (B) und pERK-Menge (C), die auf die Menge an α -Tubulin im Lysat normalisiert wurden. Zur Quantifizierung wurden mindestens 5 unabhängige biologische Experimente durchgeführt (Stichprobenanzahl ist in den jeweiligen Balken vermerkt). In $RSK^{\Delta 58/1}$ war die pERK-Menge im Vergleich zum Wildtyp erhöht, die Gesamtmenge an ERK blieb unverändert. Durch die Expression des Rettungskonstrukt $P[RSK]$ konnte die pERK-Menge reduziert werden und war mit der wildtypischen vergleichbar.

Um zu bestätigen, dass die Veränderung der ERK-Aktivität durch den Verlust von RSK verursacht wird, wurde die Untersuchung mit Ventralganglien von Larven durchgeführt, die das genomische RSK -Konstrukt im $RSK^{\Delta 58/1}$ -Hintergrund exprimieren ($RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$). In den Ventralganglien von $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$ -Larven war die Menge aktiven ERKs signifikant unterschiedlich zu $RSK^{\Delta 58/1}$ -Larven (Abb. 3.4 C: normalisierte pERK-Menge: $RSK^{\Delta 58/1}$: $1,25 \pm 0,16$; $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$: $1,02 \pm 0,15$; $p < 0,05$), vergleichbar mit der Menge im Wildtyp. Die normalisierte Menge an ERK blieb auch hier unverändert (Abb. 3.4 B: normalisierte ERK-Menge: $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$: $1,02 \pm 0,12$). Der Verlust von RSK führt zu einer erhöhten ERK-Aktivität in den Ventralganglien, ohne Einfluss auf das Expressionslevel von ERK. Die Ergebnisse zeigen, wie schon in vorangegangenen Studien bewiesen wurde (Kim, 2006; Fischer, 2009b), dass RSK den ERK/MAPK-Signalweg auch in den Motoneuronen negativ reguliert.

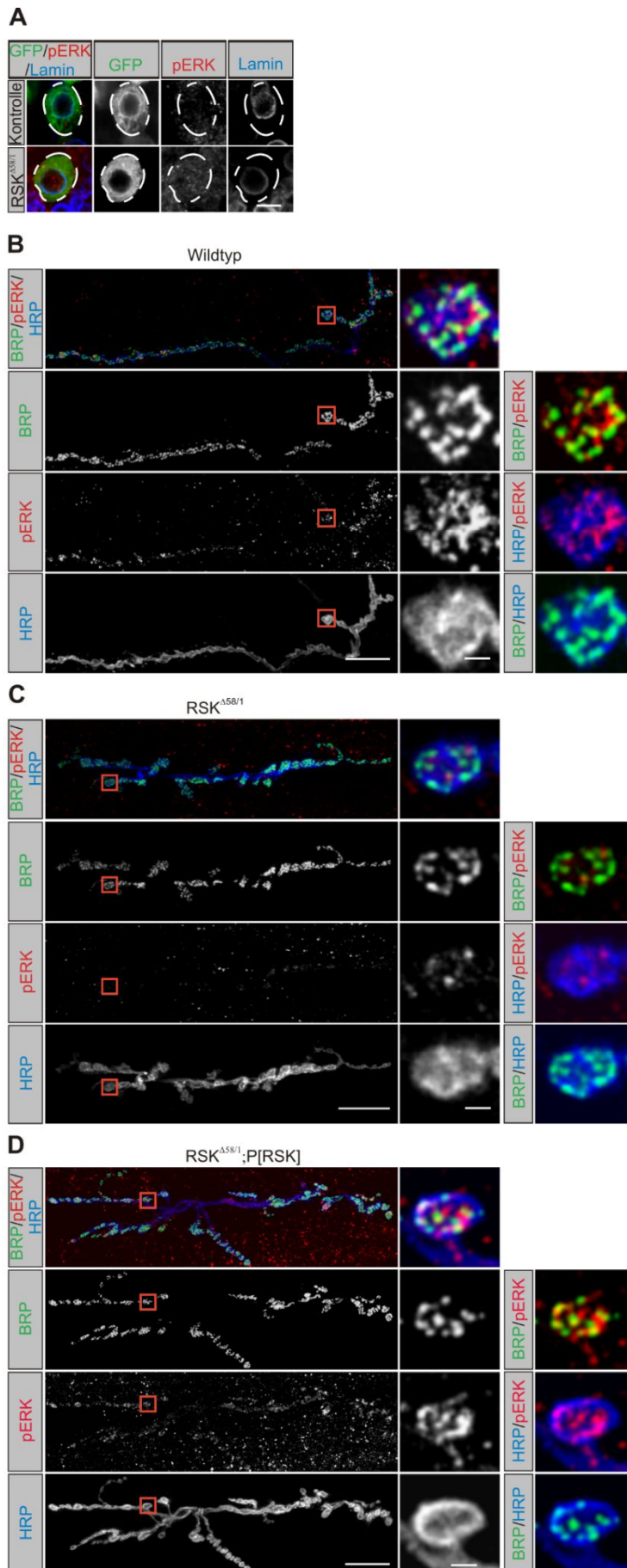


Abb. 3.5 RSK beeinflusst die subzelluläre Lokalisierung von aktivem ERK in Motoneuronen.

(A) Zellkörper von Motoneuronen aus Larven der Kontrolle (oben) und $RSK^{\Delta 58/1}$ (unten) wurden durch die Expression des $mCD8::GFP$ -Markers mit der Treiberlinie $D42-Gal4$ identifiziert. Die Färbung mit Antikörpern gegen GFP (grün), pERK (rot) und Lamin (blau), zeigen für pERK eine scheinbar verstärkte Signalintensität in den Somata der Nullmutante. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Abgrenzung des Somas. Maßstab: 5 μm .

(B-D) Links: Projektionsansicht der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 oder A3 gefärbt mit Antikörpern gegen BRP (grün), pERK (rot) und HRP (blau). Maßstab: 20 μm . Rechts: Vergrößerte Einzelbilder der Boutons. Maßstab: 2 μm . Dargestellt sind die neuromuskulären Synapsen vom Wildtyp (B), $RSK^{\Delta 58/1}$ (C) und $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$ (D). Die pERK-Färbung ist in $RSK^{\Delta 58/1}$ kaum sichtbar im Vergleich zum Wildtyp. Durch die Expression des RSK-Transgens ist pERK wieder in der Synapse des Motoneurons lokalisiert.

Um den Einfluss von RSK auf die subzelluläre Lokalisierung von aktivem ERK in den Zellkörpern der Motoneurone nachzuweisen, mussten zunächst die Motoneurone im Ventralganglion identifiziert werden. Hierfür wurde eine membrangebundene Variante von GFP (*UAS-mCD8::GFP*) mit der Treiberlinie *D42-Gal4* Motoneuron-spezifisch exprimiert im wildtypischen (Kontrolle) oder *RSK^{Δ58/1}*-Hintergrund (*RSK^{Δ58/1}*). Die larvalen Gehirne der männlichen Nachkommen wurden mit Antikörpern gegen GFP, pERK und Lamin gefärbt. Wie schon die Ergebnisse in 3.3. zeigten, ist auch hier in den Kontrolltieren eine Färbung des aktiven ERK in Perikaryon und Nukleus der Motoneurone zu sehen (Abb. 3.5 A). Obwohl sich scheinbar mehr aktives ERK in den Somata der Motoneurone von *RSK^{Δ58/1}* befindet, konnte keine Veränderung hinsichtlich der Lokalisierung von aktivem ERK zwischen Nukleus und Zytoplasma aufgezeigt werden. Dies unterschied sich von bisherigen Untersuchungen an sich differenzierenden Zellen während der Augenentwicklung.

Hier wurde gezeigt, dass der Verlust von RSK eine Auswirkung auf die Lokalisierung, nicht aber auf die Menge von aktivem ERK hat (Kim, 2006).

Um die RSK-abhängige Lokalisation von aktivem ERK an der neuromuskulären Synapse zu untersuchen, wurden Hautmuskelschlauch-Präparate mit Antikörpern gegen BRP, pERK und HRP gefärbt (Abb. 3.5 A - C). Die Lokalisierung von aktivem ERK wurde in der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 oder A3 untersucht. An der neuromuskulären Synapse wildtypischer Larven ist pERK vorwiegend an der präsynaptischen Seite lokalisiert (Abb. 3.5 B).

Betrachtet man hingegen die neuromuskuläre Synapse der Nullmutante, ist die pERK-Färbung an der Synapse kaum sichtbar (Abb. 3.5 C). Durch die Expression des genomischen Rettungskonstrukts im *RSK^{Δ58/1}*-Hintergrund (*RSK^{Δ58/1}; P[RSK]*) konnte aktives ERK wieder an der Präsynapse nachgewiesen werden (Abb. 3.5 D). Die Färbung von pERK im Muskel scheint deutlich stärker in *RSK^{Δ58/1}; P[RSK]* im Vergleich zum Wildtyp oder der Nullmutante.

Um die Menge an pERK quantitativ zu bestimmen, wurden die Versuche wiederholt. Ein membrangebundenes GFP-Konstrukt (*UAS-mCD8::GFP*) wurde mit Hilfe der Treiberlinie *OK6-Gal4* Motoneuron-spezifisch exprimiert, um die Motoneurone durch die spezifische Expression des membrangebundenen GFP im Ventralganglion zu visualisieren. Zunächst wurde die Motoneuron-spezifische Treiberlinie mit dem Wildtyp (Kontrolle) und der Nullmutante (*RSK^{Δ58/1}*) gekreuzt. Die Hautmuskelschläuche männlicher Larven im späten, dritten Larvenstadium von Kontrolle und *RSK^{Δ58/1}* wurden mit Gehirn präpariert und unter gleichen Bedingungen gefärbt, um die pERK-Menge in den Zellkörpern und der neuromuskulären

Synapse vergleichen zu können (Abb. 3.6). In den Präparaten wurden die Signalintensitäten der GFP- und pERK-Färbung von jeweils 10 Zellkörpern aus 10 Präparaten (Abb. 3.6 A) und den neuromuskulären Synapsen (Abb. 3.6 B, C) der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 bestimmt. Die Signalintensität der pERK-Färbung wurde auf die GFP-Signalintensität normalisiert und quantifiziert (Abb. 3.6 D, E).

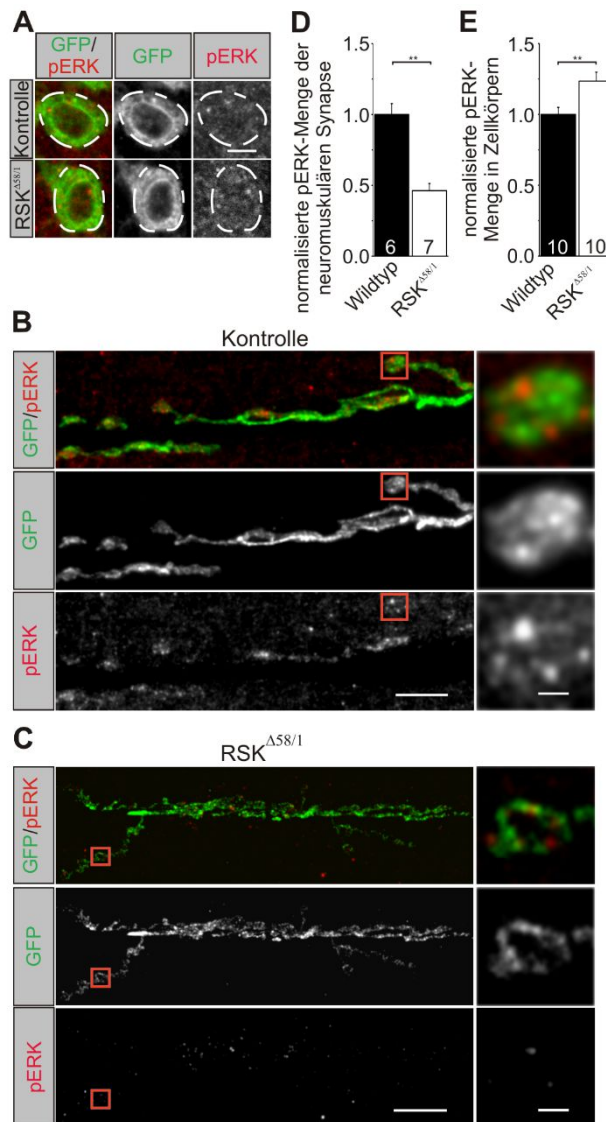


Abb. 3.6 Quantifizierung der Signalintensität von pERK in den subzellulären Kompartimenten der Motoneurone.

(A-C) Hautmuskelschlauch-Gehirn-Präparate von Kontrolle und $RSK^{\Delta 58/1}$, die *mCD8::GFP* mit der Treiberlinie *OK6-Gal4* Motoneuron-spezifisch exprimieren, wurden mit Antikörpern gegen GFP (grün) und pERK (rot) gefärbt. (D+E) Die Signalintensität von pERK wurde auf das GFP-Signal normalisiert und quantifiziert. (A) Zellkörper von Motoneuronen aus Larven der Kontrolle (oben) und $RSK^{\Delta 58/1}$ (unten). Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Abgrenzung des Somas. Maßstab: 5 μm . In den Zellkörpern von $RSK^{\Delta 58/1}$ -Larven ist die Menge an pERK im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht. (B, C) Links: Projektionsansicht der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 von Kontrolltieren (B) und $RSK^{\Delta 58/1}$ (C). Maßstab: 20 μm . Rechts: Detailansicht eines Boutons. Maßstab: 2 μm . (D) Quantifizierung der normalisierten Signalintensität von pERK an der neuromuskulären Synapse. Das normalisierte pERK-Signal an der präsynaptischen Seite ist in der Nullmutante im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert. (E) Quantifizierung der normalisierten pERK-Menge in den Zellkörpern der Motoneurone. Die normalisierte Signalintensität von pERK in den Zellkörpern der Motoneurone ist in der Nullmutante im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. Die Anzahl der analysierten Präparate ist in den Diagrammen benannt.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren war in der Nullmutante die Intensität der pERK-Färbung an den neuromuskulären Synapsen signifikant reduziert (Abb. 3.6 D; normalisierte pERK-Menge:

Kontrolle: $1,00 \pm 0,08$; $RSK^{458/1}$: $0,46 \pm 0,05$; $p < 0,01$), in den Zellkörpern hingegen signifikant erhöht (Abb. 3.6 E; normalisierte pERK-Menge: Kontrolle: $1,00 \pm 0,03$; $RSK^{458/1}$: $1,23 \pm 0,04$; $p < 0,01$). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass RSK nicht nur die Menge an aktivem ERK reguliert, sondern auch die Verteilung des aktiven ERKs zwischen den verschiedenen subzellulären Kompartimenten der Motoneurone bestimmt.

Die Struktur und Funktion neuromuskulären Synapsen von $RSK^{458/1}$ wurde weiter untersucht, da die Regulation der ERK-Aktivität in der Funktion der neuromuskulären Synapse eine Rolle spielt (Koh, 2002; Wairkar, 2009).

3.5 Verlust von RSK verändert die Struktur und Funktion von neuromuskulären Synapsen

Die Regulation des ERK/MAPK Signalwegs stellt einen möglichen Mechanismus der Synapsen-spezifischen Kontrolle der Struktur und der Transmission von neuromuskulären Synapsen dar. Beispielsweise führt der Verlust von UNC-51, einem Inhibitor von ERK, zu einer verringerten Anzahl und Dichte der Synapsen, sowie zu Appositionsdefekten zwischen Glutamatrezeptor-feldern und den gegenüberliegenden präsynaptischen Aktiven Zonen (Wairkar, 2009). Durch das stereotype Verzweigungsmuster und die Termini-spezifische Anzahl an Boutons der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 in den Abdominalsegmenten A2 oder A3 eignet sich die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila* als Modell, um den Einfluss von Proteinen auf die Struktur und die Transmission der Synapse zu untersuchen.

Für die quantitative Strukturanalyse der neuromuskulären Synapse wurden Hautmuskelschlauch-Präparate männlicher Larven im späten dritten Larvenstadium mit Antikörpern gegen BRP, GluRIID und HRP als neuronalen Marker gefärbt (Abb. 3.7). Die gemessene Gesamtgröße der neuromuskulären Synapse entspricht der Fläche der HRP-Färbung und umfasst die Fläche aller Boutons sowie die Verzweigungen des Axons (Abb. 3.7; Abb. 3,8 A).

Mit Hilfe der BRP-Färbungen wurden die Gesamtzahl und die durchschnittliche Fläche aller Aktiven Zonen innerhalb der neuromuskulären Synapse bestimmt (Abb. 3.7; Abb. 3.8 B, C). Die Gesamtzahl und durchschnittliche Fläche aller postsynaptischen Glutamatrezeptorfelder einer neuromuskulären Synapse wurde durch die Färbung mit dem Antikörper gegen GluRIID bestimmt (Abb. 3.7; Abb. 3.8 C, D).

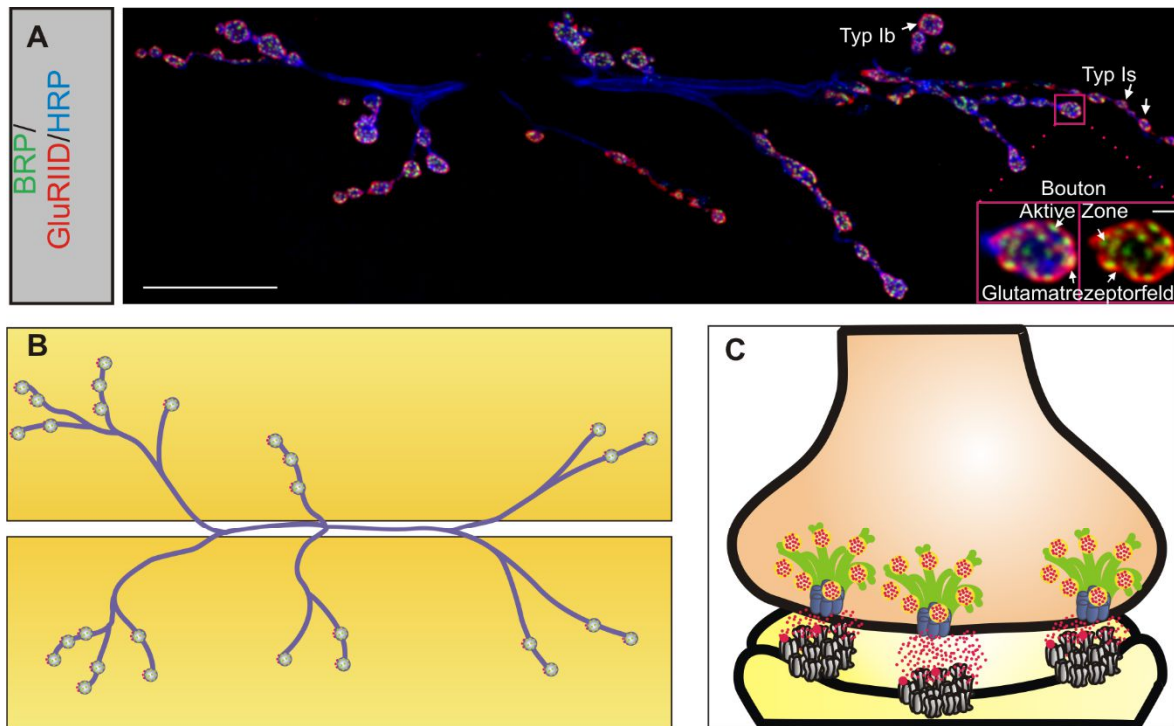


Abb.3.7 Immunhistochemische Färbung und schematische Darstellung der neuromuskulären Synapse

(A) Projektionsansicht der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 einer wildtypischen Larve gefärbt mit Antikörpern gegen BRP (grün), GluRIID (rot) und HRP (blau). Maßstab: 20 μm . Das rot markierte Bouton ist vergrößert dargestellt. Maßstab: 5 μm . Zur Bestimmung der Gesamtzahl der Aktiven Zonen bzw. Glutamatrezeptorfelder wurden die Bereiche gezählt, die durch BRP bzw. GluRIID gefärbt waren. Zur Berechnung der durchschnittlichen Flächen der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder wurden die Flächen dieser Bereiche bestimmt und gemittelt. Mit Hilfe der HRP-Färbung konnte die Größe der neuromuskulären Synapse bestimmt werden, sie stellt den gesamten präsynaptischen Bereich dar. (B) Schematische Darstellung der neuromuskulären Synapse. Die neuromuskuläre Synapse (violett) beherbergt mehrere Boutons, die hier kreisförmig dargestellt sind. In den Boutons befindet sich die Aktiven Zonen (grün), die den Glutamatrezeptorfeldern (rot) gegenüber liegen. Die innervierten Muskeln 6/7 sind in gelb dargestellt. (C) Schematische Darstellung eines Boutons. Das Andocken synaptischer Vesikel (gelb) an die Aktive Zone wird über BRP (grün) vermittelt. Über Ca^{2+} -Kanäle, die Untereinheit Cacophony (Cac; blau) ist repräsentativ dargestellt, wird die Freisetzung von Glutamat (rot) ausgelöst. Auf der postsynaptischen Seite liegen die Glutamatrezeptorfelder (grau) den Aktiven Zonen gegenüber.

Die Gesamtfläche der neuromuskulären Synapse war in der Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp verringert (Abb. 3.8 A; Gesamtgröße der neuromuskulären Synapse: Wildtyp: $642,1 \mu\text{m}^2 \pm 46,3 \mu\text{m}^2$; $RSK^{458/1}$: $464,2 \mu\text{m}^2 \pm 32,0 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$). Auf der präsynaptischen Seite waren Anzahl und Flächen der Aktiven Zonen in $RSK^{458/1}$ im Vergleich zum Wildtyp

signifikant reduziert (Abb. 3.8 B: Anzahl Aktiver Zonen: Wildtyp: $263,0 \pm 14,9$; $RSK^{\Delta 58/1}$: $205,3 \pm 11,8$; $p < 0,01$; Abb. 3.8 C: Flächen der Aktiven Zonen: Wildtyp: $0,77 \mu\text{m}^2 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$; $RSK^{\Delta 58/1}$: $0,51 \mu\text{m}^2 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$). Auch waren Anzahl und Flächen der Glutamatrezeptorfelder der postsynaptischen Seite in der Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (Abb. 3.8 D: Anzahl Glutamatrezeptorfelder: Wildtyp: $264,2 \pm 18,1$; $RSK^{\Delta 58/1}$: $214,6 \pm 11,9$; $p < 0,05$; Abb. 3.8 E: Flächen der Glutamatrezeptorfelder: Wildtyp: $1,11 \mu\text{m}^2 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$; $RSK^{\Delta 58/1}$: $0,82 \mu\text{m}^2 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$). Das Verhältnis von Aktiven Zonen zu Glutamatrezeptorfeldern der neuromuskulären Synapsen blieb unverändert, der Aufbau und die Zusammensetzung der synaptischen Verknüpfungen im Allgemeinen waren nicht gestört, da keine Appositionsdefekte von präsynaptischem BRP und postsynaptischen GluRIID beobachtet wurden (Abb. 3.8 F). Darin unterscheidet sich der Phänotyp von $RSK^{\Delta 58/1}$ von dem der *UNC-51*-Mutante, in der häufig Aktive Zonen ohne gegenüberliegende Glutamatrezeptorfelder gefunden wurden (Wairkar, 2009). Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Struktur der neuromuskulären Synapse sind in einer Übersicht zusammengefasst (Tab. 3.1). Um festzustellen, ob die strukturellen Veränderungen der Prä- und Postsynapse durch Verlust von RSK verursacht wurden, wurden die neuromuskulären Synapsen von Larven untersucht, die das zuvor beschriebene Rettungskonstrukt homozygot im $RSK^{\Delta 58/1}$ -Hintergrund tragen ($RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$). In diesen Tieren waren die Gesamtgröße der neuromuskulären Synapse (Abb. 3.8 A: $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$: $550,6 \mu\text{m}^2 \pm 24,1 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$ vs. $RSK^{\Delta 58/1}$), die Anzahl (Abb. 3.8 B: $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$: $248,4 \pm 11,3$; $p < 0,05$ vs. $RSK^{\Delta 58/1}$) und die Fläche der Aktiven Zonen (Abb. 3.8 C: $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$: $0,60 \mu\text{m}^2 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$ vs. $RSK^{\Delta 58/1}$) signifikant unterschiedlich zu $RSK^{\Delta 58/1}$, nicht aber zum Wildtyp. Die präsynaptischen Phänotypen konnten durch dieses Konstrukt vollständig gerettet werden. An der Postsynapse war die Anzahl der Glutamatrezeptorfelder (Abb. 3.8 D: $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$: $242,5 \pm 9,9$) weder zum Wildtyp noch zu $RSK^{\Delta 58/1}$ signifikant unterschiedlich. Die Fläche der Glutamatrezeptorfelder blieb vergleichbar zu $RSK^{\Delta 58/1}$ (Abb. 3.8 E: $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$: $0,78 \mu\text{m}^2 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$).

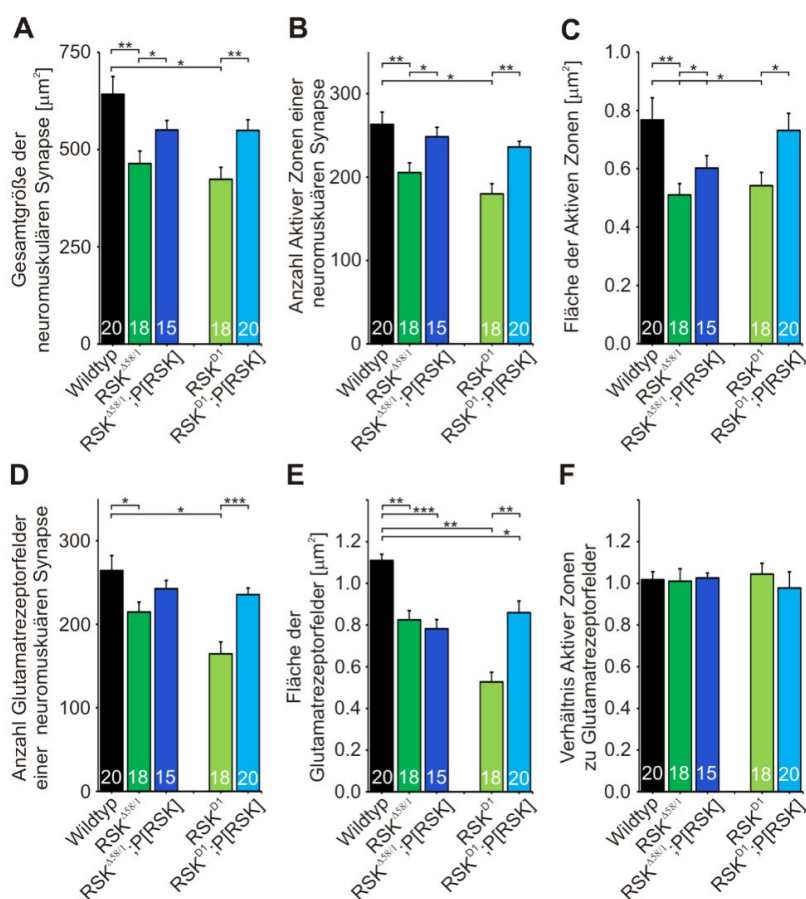


Abb. 3.8 Auswirkung des Verlusts von RSK auf die Struktur der neuromuskulären Synapse.

Quantifizierungen der larvalen neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 oder A3. Die Gesamtgröße der neuromuskulären Synapse wurde durch die HRP-Färbung bestimmt (A), die BRP-Färbung diente zur Bestimmung der Anzahl (B) und Fläche (C) der Aktiven Zonen. Mit Hilfe der GluRIID-Färbung wurden Anzahl (D) und Fläche (E) der Glutamaterezeptorfelder bestimmt. Im Vergleich zum Wildtyp sind die gemessenen Parameter in beiden *RSK*-Nullmutanten (*RSK^{Δ58/1}* und *RSK^{D1}*) signifikant reduziert. BRP- und GluRIID-Färbung dienten zusätzlich zur Ermittlung des Verhältnisses von Aktiven Zonen zu Glutamaterezeptorfeldern (F), das in den untersuchten Genotypen unverändert ist. Präsynaptische Defekte konnten durch das *RSK*-Transgen (*RSK^{Δ58/1}; P[RSK]*, *RSK^{D1}; P[RSK]*) gerettet werden, wobei die Defekte der Postsynapse nicht oder nur teilweise gerettet werden konnten.

Um zu bestätigen, dass die Veränderungen in der Struktur der neuromuskulären Synapse durch den Verlust von *RSK* entstanden sind, wurde die Analyse mit einer unabhängig generierten Nullmutante von *RSK* (*RSK^{D1}*; Kim 2006) erneut durchgeführt. Auch in dieser Nullmutante sind im Vergleich zum Wildtyp die Gesamtgröße der neuromuskulären Synapse (Abb. 3.8 A: *RSK^{D1}*: $423,6 \mu\text{m}^2 \pm 30,8 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$ vs. Wildtyp), die Anzahl (Abb. 3.8 B: *RSK^{D1}*: $179,9 \pm 12,0$; $p < 0,05$ vs. Wildtyp) und Fläche der Aktiven Zonen (Abb. 3.8 C: *RSK^{D1}*: $0,54 \mu\text{m}^2 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$;

$p < 0,05$ vs. Wildtyp) sowie die Anzahl (Abb. 3.8 D: RSK^{D1} : $164,4 \pm 14,3$; $p < 0,05$ vs. Wildtyp) und Fläche der Glutamatrezeptorfelder (Abb. 3.8 E: RSK^{D1} : $0,53 \mu\text{m}^2 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$ vs. Wildtyp) signifikant reduziert. Damit konnte verifiziert werden, dass die Veränderungen der Struktur der neuromuskulären Synapse durch den Verlust von RSK entstanden sind, nicht durch zusätzliche Mutationen im Genom.

	Größe der neuromuskulären Synapse	Anzahl Aktiver Zonen	Fläche Aktiver Zonen	Anzahl Glutamatrezeptorfelder	Fläche Glutamatrezeptorfelder	Verhältnis Aktiver Zonen zu Glutamatrezeptorfelder
Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp
$RSK^{A58/1}$	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	Wildtyp
$RSK^{A58/1}; P[RSK]$	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp/ reduziert	reduziert	Wildtyp
RSK^{D1}	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	Wildtyp
$RSK^{D1}; P[RSK]$	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp/ reduziert	Wildtyp

Tabelle 3.1: Übersicht der Rettungsversuche der Veränderungen in der Struktur der neuromuskulären Synapse durch genetisch unabhängige Nullmutanten von RSK.

Die Veränderungen der postsynaptischen Seite konnten durch die Expression des genomischen RSK -Konstrukts im $RSK^{A58/1}$ -Hintergrund nur teilweise gerettet werden. Deshalb wurde analog zu $RSK^{A58/1}$ das genomische RSK -Konstrukt in den RSK^{D1} -Hintergrund eingekreuzt ($RSK^{D1}; P[RSK]$) und die Struktur der neuromuskulären Synapse untersucht. Auch in Larven, die das Rettungskonstrukt im RSK^{D1} -Hintergrund trugen, waren die Gesamtgröße der neuromuskulären Synapse (Abb. 3.8 A: $RSK^{D1}; P[RSK]$: $549,3 \mu\text{m}^2 \pm 27,4 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$ vs. RSK^{D1}), die Anzahl der Aktiven Zonen (Abb. 3.8 B: $RSK^{D1}; P[RSK]$: $236,0 \pm 6,9$; $p < 0,01$ vs. RSK^{D1}) sowie die Fläche der Aktiven Zonen (Abb. 3.8 C: $RSK^{D1}; P[RSK]$: $0,73 \mu\text{m}^2 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$ vs. RSK^{D1}) signifikant verschieden zu RSK^{D1} , nicht aber zum Wildtyp.

Auf der postsynaptischen Seite war die Anzahl der Glutamatrezeptorfelder im Vergleich zu RSK^{D1} deutlich erhöht, vergleichbar mit dem Wildtyp (Abb. 3.8 D: $RSK^{D1}; P[RSK]$: $235,4 \pm 8,0$; $p < 0,001$ vs. RSK^{D1}). Die Fläche der Glutamatrezeptorfelder war im Vergleich zur Nullmutante deutlich erhöht, blieb aber signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.8 E: $RSK^{D1}; P[RSK]$: $0,86 \mu\text{m}^2 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$ vs. RSK^{D1} ; $p < 0,05$ vs. Wildtyp).

Mögliche Erklärungen für die vollständige Rettung der präsynaptischen, nicht aber der postsynaptischen Phänotypen könnte ein unvollständiges Expressionsmuster des transgenen

RSKs sein oder die Expression einer nicht-physiologischen Menge von RSK. Da endogenes RSK leider nicht immunhistochemisch nachweisbar ist, konnte die erste Begründung nicht weiter überprüft werden. Die quantitative Analyse der RSK-Expressionsmengen mittels Western Blot-Analyse zeigte allerdings, dass keines der transgenen *RSK*-Konstrukte eine RSK-Menge exprimiert, die identisch mit der endogenen RSK-Expression ist (Abb. 3.1 B).

3.6 Einfluss von RSK auf die Boutons der neuromuskulären Synapse

Die Strukturanalyse zeigte, dass die neuromuskulären Synapsen der Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp kleiner sind und auch eine reduzierte Gesamtzahl an Aktiven Zonen bilden. Dennoch wurde in vorangegangenen Studien festgestellt, dass durch den Verlust von RSK in den neuromuskulären Synapsen mehr Boutons gebildet werden (Fischer, 2009b). Zusammen betrachtet müssten die Boutons im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner sein.

Die Aufnahmen der Hautmuskelschlauch-Präparate aus der Strukturanalyse der neuromuskulären Synapsen (3.5) wurden verwendet, um die Anzahl und Größe der Boutons der neuromuskulären Synapsen auszuwerten. Die HRP-Färbung diente zur Identifizierung der einzelnen Boutons, die mit Hilfe der BRP-Färbung abgegrenzt wurden (Abb. 3.9 A).

Die Anzahl der Boutons ist in den unabhängig generierten Nullmutanten *RSK^{Δ58/1}* und *RSK^{D1}* im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (Abb. 3.9 B: Wildtyp: $51,7 \pm 3,3$; *RSK^{Δ58/1}*: $75,2 \pm 2,9$; $p < 0,01$ vs. Wildtyp; *RSK^{D1}*: $78,9 \pm 3,4$; $p < 0,001$ vs. Wildtyp).

Da die Anzahl der Boutons der neuromuskulären Synapsen durch den Verlust von RSK erhöht ist, die Gesamtzahl der Aktiven Zonen aber reduziert ist (Abb. 3.9 B), sollten folglich wenig Aktive Zonen in einem Bouton zu finden sein. Wie erwartet war in den Nullmutanten die Anzahl der Aktiven Zonen eines Boutons im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (Abb. 3.9 C: Wildtyp: $5,93 \pm 0,35$; *RSK^{Δ58/1}*: $2,92 \pm 0,16$; $p < 0,01$ vs. Wildtyp; *RSK^{D1}*: $2,70 \pm 0,30$; $p < 0,001$ vs. Wildtyp). In der Strukturanalyse wurde nachgewiesen, dass die neuromuskuläre Synapse durch den Verlust von RSK kleiner war (Abb. 3.8 A), aber mehr Boutons enthielt, weshalb auch die Größe der Boutons bestimmt wurde, die in den Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert war (Abb. 3.9 D: Wildtyp: $8,62 \mu\text{m}^2 \pm 0,39 \mu\text{m}^2$; *RSK^{Δ58/1}*: $4,51 \mu\text{m}^2 \pm 0,48 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$ vs. Wildtyp; *RSK^{D1}*: $4,74 \mu\text{m}^2 \pm 0,59 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$ vs. Wildtyp). Im Vergleich zu den wildtypischen bilden die Motoneurone der Nullmutanten kleinere Synapsen mit mehr, aber kleineren Boutons, die auch weniger Aktive Zonen beherbergen.

Um zu verifizieren, ob die Anzahl der Boutons durch den Verlust von RSK erhöht ist, wurden auch die neuromuskulären Synapsen der Larven untersucht, die das genomische *RSK*-Konstrukt im jeweiligen Nullmutanten Hintergrund tragen. Durch die Expression des transgenen *RSK*s war die Anzahl der Boutons im Vergleich zu der jeweiligen Nullmutante signifikant verringert (Abb. 3.9 B: *RSK^{Δ58/1}*; $P[RSK]$: $60,7 \pm 2,4$; $p < 0,05$ vs. *RSK*; *RSK^{D1}*; $P[RSK]$: $59,7 \pm 2,6$; $p < 0,05$ vs. *RSK^{D1}*). Die Anzahl der Aktiven Zonen eines Boutons im Vergleich zu der jeweiligen Nullmutante war signifikant erhöht (Abb. 3.9 C: *RSK^{Δ58/1}*; $P[RSK]$: $4,48 \pm 0,34$; $p < 0,05$ vs. *RSK^{Δ58/1}*; *RSK^{D1}*; $P[RSK]$: $4,17 \pm 0,25$; $p < 0,05$ vs. *RSK^{D1}*). Die Größe der Boutons blieb durch das Einbringen des transgenen *RSK*-Konstrukts im Vergleich zu der jeweiligen Nullmutante jedoch unverändert (Abb. 3.9 D: *RSK^{Δ58/1}*; $P[RSK]$: $5,03 \mu\text{m}^2 \pm 0,32 \mu\text{m}^2$; *RSK^{D1}*; $P[RSK]$: $4,91 \mu\text{m}^2 \pm 0,79 \mu\text{m}^2$).

In den neuromuskulären Synapsen sind kleine (Typ Is) und große Boutons (Typ Ib) vorhanden (Atwood, 1993). Da in den Nullmutanten mehr Boutons gezählt wurden, die durchschnittliche Größe der Boutons aber geringer war als im Wildtyp, wurden die Boutons anhand ihrer Größe in Typ Is und Typ Ib unterteilt, um festzustellen, ob mehr Boutons des Typs Is in den Nullmutanten vorhanden waren. Der relative Anteil der Boutons des Typs Is war in den Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht, der Anteil an Typ Ib-Boutons war dementsprechend reduziert (Abb. 3.9 E: Typ Is-Boutons: Wildtyp: $0,44 \pm 0,03$; *RSK^{Δ58/1}*: $0,62 \pm 0,02$; $p < 0,01$ vs. Wildtyp; *RSK^{D1}*: $0,74 \pm 0,03$; $p < 0,001$ vs. Wildtyp; Typ Ib Boutons: Wildtyp: $0,56 \pm 0,03$; *RSK^{Δ58/1}*: $0,38 \pm 0,02$; $p < 0,01$ vs. Wildtyp; *RSK^{D1}*: $0,26 \pm 0,03$; $p < 0,001$ vs. Wildtyp). Trotz der Expression des genomischen *RSK*-Konstrukts blieb das Verhältnis von Typ Is- zu Typ Ib-Boutons unverändert und vergleichbar mit den jeweiligen Nullmutanten (Abb. 3.8 E: Typ Is Boutons: *RSK^{Δ58/1}*; $P[RSK]$: $0,69 \pm 0,04$; *RSK^{D1}*; $P[RSK]$: $0,75 \pm 0,01$; Typ Ib Boutons: *RSK^{Δ58/1}*; $P[RSK]$: $0,31 \pm 0,02$; *RSK^{D1}*; $P[RSK]$: $0,25 \pm 0,03$).

Da die Zuordnung der Boutons in Typ Ib und Typ Is anhand ihrer Größe erfolgte, ist nicht geklärt, ob durch den Verlust von RSK mehr Typ Is-Boutons gebildet werden oder die Typ Ib-Boutons kleiner sind. Typ Ib-Boutons unterscheiden sich von Typ Is durch ein sehr stark ausgeprägtes subsynaptisches Retikulum (SSR), das durch Einstülpungen der Muskelmembran gebildet wird. Auch das Gerüstprotein DLG (Disc Large), eine im SSR lokalisierte Membran-assoziierte Guanylat-Kinase, ist abundanter in Typ Ib-Boutons (Bate and Broadie, 1995; Lahey, 1994). Durch die quantitative Auswertung einer DLG-Färbung der neuromuskulären Synapse könnte die Zuordnung in Typ Ib- und Typ Is-Boutons verifiziert werden.

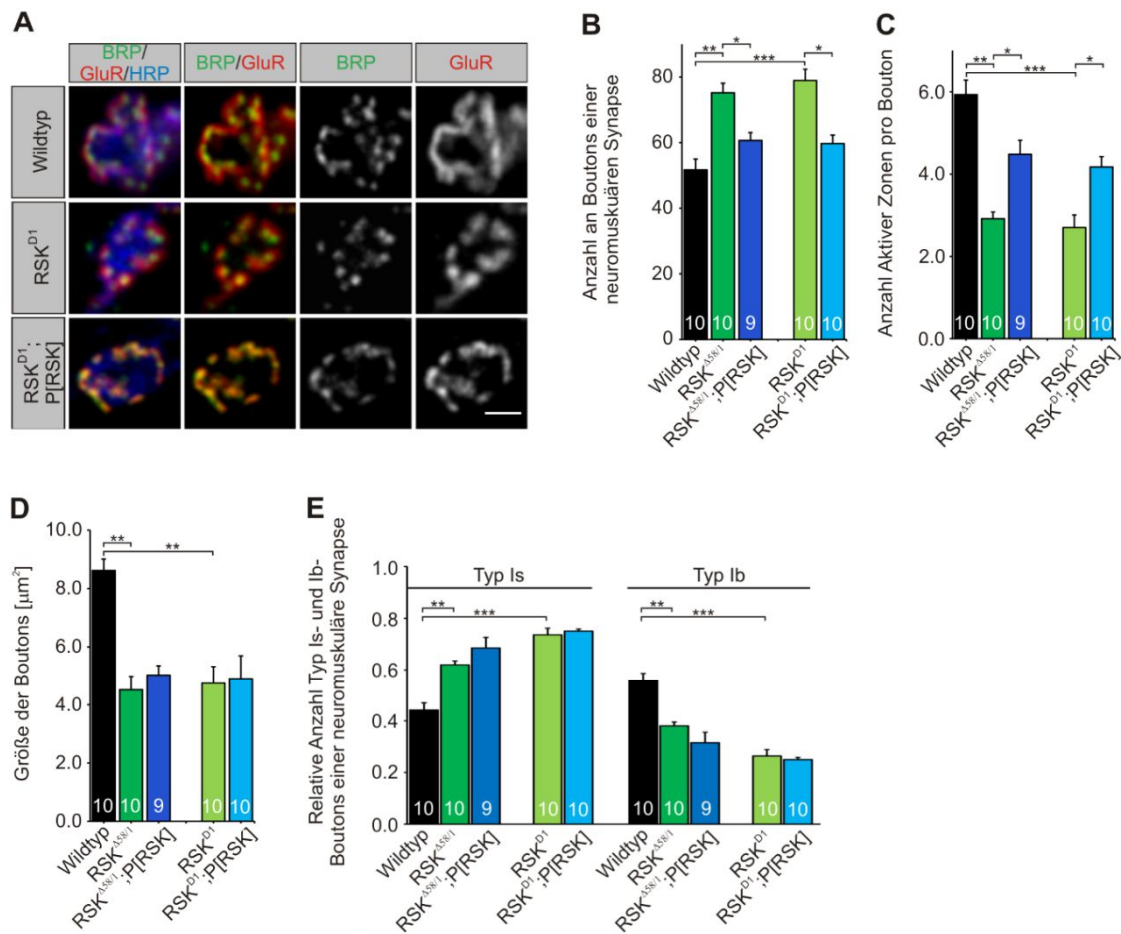


Abb. 3.9 Auswirkung von RSK auf die Boutons der neuromuskulären Synapse

(A) Färbungen der Boutons der neuromuskulären Synapse von Wildtyp, RSK^{D1} und $RSK^{D1}; P[RSK]$ mit Antikörpern gegen HRP (blau), BRP (grün) und GluRIID (rot). Maßstab: 2 μm. Quantifizierungen der Anzahl der Boutons der neuromuskulären Synapsen (B), der Anzahl Aktiver Zonen eines Boutons (C) und der Größe der Boutons (D). (E) Aufteilung der Boutons in kleine (Typ Ia) und große (Typ Ib) Boutons. Durch den Verlust von RSK werden mehr, aber kleinere Boutons gebildet, die auch weniger Aktive Zonen beherbergen. Durch die Expression des genomischen RSK -Konstrukts wurde eine wildtypische Anzahl Boutons gebildet, die mehr aktive Zonen beinhalteten als die Boutons der Nullmutanten. Die Boutongröße konnte jedoch nicht gerettet werden.

Wie auch schon in der Studie von Fischer et al. (2009) gezeigt wurde, war die Anzahl der Boutons in den neuromuskulären Synapsen durch den Verlust von RSK erhöht. Zusammenfassend hat RSK einen Einfluss auf die Anzahl der Boutons der neuromuskulären Synapsen und auch auf die Anzahl der Aktiven Zonen, die in einen Bouton gebildet werden. Durch den Verlust von RSK werden vermehrt kleinere Boutons gebildet, was durch Einbringen des genomischen RSK -Konstrukts nicht gerettet werden konnte.

3.7 Einfluss von RSK auf die Struktur von neuromuskulären Synapsen in Abhängigkeit von ERK

In Abschnitt 3.4. wurde für RSK die Beteiligung an der Inhibition des MAPK-Signalwegs in Motoneuronen nachgewiesen. RSK dient aber auch als Effektorkinase des MAPK-Signalwegs und phosphoryliert Substrate, die in neuronalem Gewebe eine wichtige Rolle spielen, wie beispielsweise CREB (cAMP-response-element-binding-protein; De Cesare, 1998) und GSK3 (Glykogensynthase-3; Sutherland, 1993). Um herauszufinden, ob die Auswirkung des Verlusts von RSK auf die Struktur der neuromuskulären Synapse durch die erhöhte Aktivität von ERK verursacht wurde, wurde die Struktur der neuromuskulären Synapse verschiedener ERK-Mutanten einzeln und in Kombination mit $RSK^{Δ58/1}$ analysiert. Für diese Analyse wäre die Kombination von Nullmutanten beider Gene ideal, leider sind Nullmutanten von *ERK*, das in *Drosophila* von dem Gen *rolled* (*rl*) kodiert wird, homozygot nicht lebensfähig.

Deshalb wurde das homozygot lebensfähige, hypomorphe rl^1 -Allel für die Analyse verwendet, das eine verringerte ERK-Aktivität aufweist (Biggs, 1994). In homozygoten rl^1/rl^1 -Tieren waren alle gemessenen Parameter der Struktur der neuromuskulären Synapse im Vergleich zu wildtypischen Tieren unverändert (Abb. 3.12 A-F), was auch schon in vorangegangenen Studien bewiesen wurde (Wairkar, 2009).

RSK besitzt eine duale Funktion im ERK/MAPK-Signalweg, einerseits dient es als Effektorkinase und phosphoryliert demnach Substrate nach seiner Aktivierung durch ERK. Andererseits hat RSK auch eine Funktion in der Regulation des MAPK-Signalwegs, indem es die Hyperaktivierung von ERK verhindert (Abb. 3.10 A). Beide Funktionen könnten verantwortlich für die Veränderungen in der Struktur der neuromuskulären Synapse sein. Unter der Annahme, dass RSK in den Motoneuronen nur durch die Veränderungen der ERK-Aktivität wirkt, wird durch den Verlust von RSK die Aktivität von ERK nicht mehr negativ reguliert, wodurch vermehrt ERK-Substrate phosphoryliert werden und somit die Veränderungen der Struktur der neuromuskulären Synapse verursacht werden (Abb. 3.10 B). Diese Veränderungen sollten in der Doppelmutante $RSK^{Δ58/1}; rl^1/rl^1$ deutlich abgeschwächt sein, da die Aktivität von ERK verringert ist (Abb. 3.10 C).

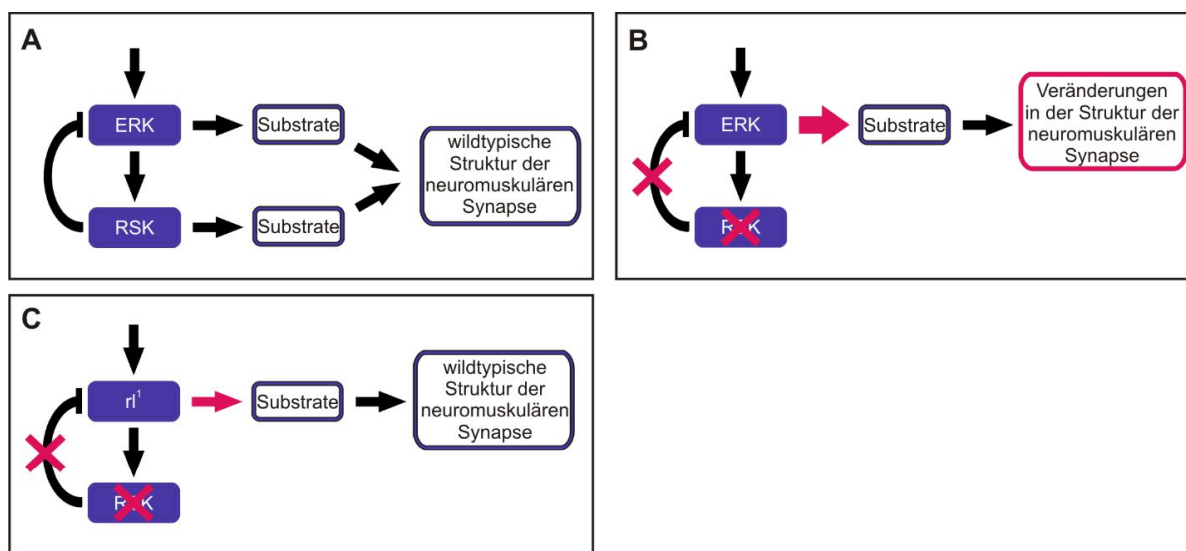


Abb. 3.10 Schematische Darstellung der Funktion von RSK als Negativregulator des MAPK-Signalwegs

(A) Duale Funktion von RSK als Effektor kinase des MAPK-Signalwegs und als Negativregulator von aktiviertem ERK. (B+C) Annahme, dass RSK in Motoneuronen nur durch Veränderungen der ERK-Aktivität Auswirkungen auf die Struktur der neuromuskulären Synapse hat. (B) Durch den Verlust von RSK ist ERK hyperaktiviert und phosphoryliert vermehrt Substrate, was zur Veränderungen in der Struktur der neuromuskulären Synapse führt. (C) In der Doppelmutante $RSK^{\Delta 58/1}; rl^1/rl^1$ wird die Hyperaktivierung durch die geringere ERK-Aktivität unterdrückt.

Die Analyse der Ergebnisse der Doppelmutante aus $RSK^{\Delta 58/1}$ und rl^1 zeigte, dass Anzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder zu $RSK^{\Delta 58/1}$ deutlich verändert waren, die Phänotypen waren weniger stark ausgeprägt als in $RSK^{\Delta 58/1}$ (Abb. 3.12 B: Anzahl Aktiver Zonen: $RSK^{\Delta 58/1}$: $205,0 \pm 6,1$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^1/rl^1$: $237,0 \pm 8,7$; $p < 0,01$; Abb. 3.12 D: Anzahl Glutamatrezeptorfelder: $RSK^{\Delta 58/1}$: $214,6 \pm 10,8$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^1/rl^1$: $259,4 \pm 10,0$; $p < 0,01$) und unterscheiden sich nicht signifikant vom Wildtyp (Abb. 3.12 B: Anzahl Aktiver Zonen: Wildtyp: $259,4 \pm 13,7$; Abb. 3.11 D: Anzahl Glutamatrezeptorfelder: Wildtyp: $258,3 \pm 15,0$). Die Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte ERK-Aktivität der RSK -Nullmutante durch die geringere ERK-Aktivität kompensiert wurde (Abb. 3.10). Aus der Analyse der genetischen Interaktion konnte geschlossen werden, dass RSK einen Einfluss auf die Negativregulation des MAPK-Signalwegs in der Regulation der Anzahl Aktiver Zonen und Glutamatrezeptorfelder hat. Dagegen blieb der negative Effekt von $RSK^{\Delta 58/1}$ auf die Größe der neuromuskulären Synapse sowie auf die Fläche der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder unverändert durch das Einbringen der rl^1 -Mutation (Abb. 3.12 A: Größe der neuromuskulären Synapse: $RSK^{\Delta 58/1}$: $447,6 \mu\text{m}^2 \pm 20,2 \mu\text{m}^2$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^1/rl^1$: $468,6 \mu\text{m}^2 \pm 41,7 \mu\text{m}^2$; Abb. 3.12 C: Fläche der Aktiven Zonen: $RSK^{\Delta 58/1}$: $0,48 \mu\text{m}^2 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^1/+$: $0,55 \mu\text{m}^2 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$;

Abb. 3.12 E: Fläche der Glutamatrezeptorfelder: $RSK^{A58/1}$: $0,81 \mu\text{m}^2 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$; $RSK^{A58/1}; r^l/+$: $0,78 \mu\text{m}^2 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$). RSK könnte somit als Effektor kinase des MAPK-Signalwegs die Größe der neuromuskulären Synapse und die Flächen der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder beeinflussen (Abb. 3.11 A). Durch den Verlust von RSK werden die Substrate nicht phosphoryliert, wodurch die Veränderungen in der Struktur der neuromuskulären Synapse verursacht werden könnten (Abb. 3.11 B). Somit hat die verringerte ERK-Aktivität der Doppelmutante keine zusätzlichen phänotypischen Auswirkungen (Abb. 3.11 C).

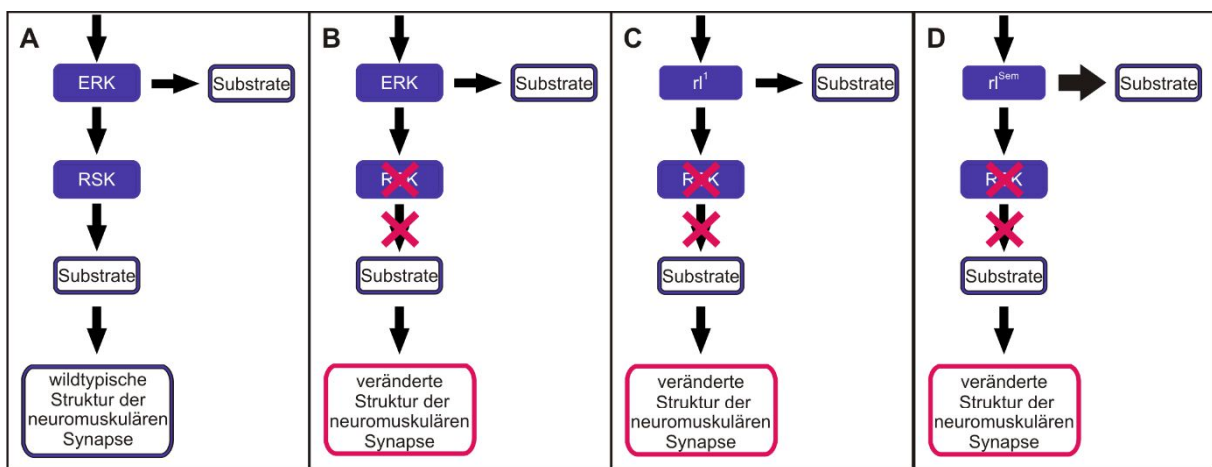


Abb. 3.11 Schematische Darstellung der Funktion von RSK als Effektor kinase des MAPK-Signalwegs

(A) RSK wird von ERK aktiviert, um Substrate zu phosphorylieren, die Auswirkungen auf die Struktur der neuromuskulären Synapse haben. (B) Durch den Verlust von RSK werden die Substrate nicht mehr phosphoryliert, die Struktur der neuromuskulären Synapse ist verändert. (C) In Doppelmutante $RSK^{A58/1}; r^l/r^l$ hat die verringerte ERK-Aktivität keine Auswirkung auf die Phosphorylierung der RSK-Substrate, der durch $RSK^{A58/1}$ verursachte Phänotyp wird nicht unterdrückt. (D) In der Doppelmutante $RSK^{A58/1}; r^{Sem}/+$ hat auch die erhöhte ERK-Aktivität keinen Einfluss auf die Aktivität der RSK-Substrate, der von RSK verursachte Phänotyp bleibt unverändert.

Um die Interpretation der Ergebnisse der Doppelmutante $RSK^{A58/1}; r^l/r^l$ zu bestätigen, wurde eine dominante ERK-Mutante, r^{Sem} (*rolled Sevenmaker*) analysiert. Hierbei handelt es sich um eine Form von ERK, die eine moderat erhöhte Kinaseaktivität zeigt und RSK nicht binden kann (Brunner, 1994; Oellers und Hafen, 1996). Die Einzelmutanten $RSK^{A58/1}$ und heterozygotes $r^{Sem}/+$ sollten durch die erhöhte ERK-Aktivität ähnliche oder stärker ausgeprägte Auswirkungen auf die Struktur der neuromuskulären Synapse aufweisen.

Diese Annahme trifft auf die Größe der neuromuskulären Synapse (Abb. 3.12 A: $RSK^{A58/1}$: $447,6 \mu\text{m}^2 \pm 20,2 \mu\text{m}^2$; $r^{Sem}/+$: $400,8 \mu\text{m}^2 \pm 29,8 \mu\text{m}^2$), die Anzahl der Aktiven Zonen

(Abb. 3.12 B: $RSK^{Δ58/1}$: $205,0 \pm 6,1$; $rl^{Sem}/+$: $170,9 \pm 20,6$) und die Anzahl der Glutamatrezeptorfelder (Abb. 3.12 D: $RSK^{Δ58/1}$: $214,6 \pm 10,8$; $rl^{Sem}/+$: $166,5 \pm 13,8$) zu. Im Gegensatz zu $RSK^{Δ58/1}$ unterscheiden sich die Flächen der Aktiven Zonen und der Glutamatrezeptorfelder in $rl^{Sem}/+$ jedoch nicht signifikant vom Wildtyp (Abb. 3.12 C: Fläche der Aktiven Zonen: Wildtyp: $0,72 \mu\text{m}^2 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$; $rl^{Sem}/+$: $0,77 \mu\text{m}^2 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$; Abb. 3.12 E: Fläche der Glutamatrezeptorfelder: Wildtyp: $1,14 \mu\text{m}^2 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$; $rl^{l}/+$: $1,22 \mu\text{m}^2 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$).

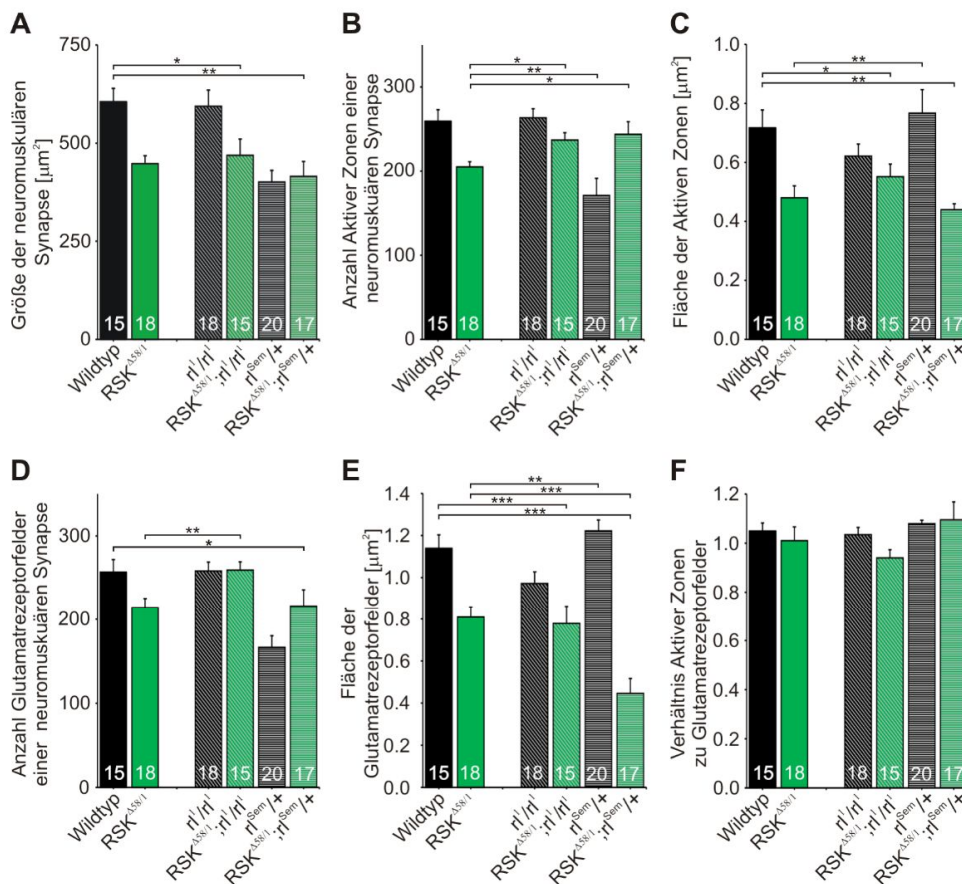


Abb. 3.12 Effekte von verschiedenen ERK-Mutanten in Kombination mit $RSK^{\Delta 58/1}$; auf die Struktur der neuromuskulären Synapse.

Quantifizierungen der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 oder A3. Die Gesamtgröße der neuromuskulären Synapse wurde durch die HRP-Färbung bestimmt (A), BRP diente zur Bestimmung der Anzahl (B) und Fläche (C) der Aktiven Zonen. Mit Hilfe der GluRIID-Färbung wurden Anzahl (D) und Fläche (E) der Glutamatrezeptorfelder bestimmt.

Die Größe der neuromuskulären Synapse und die Flächen der Aktiven Zonen in der Doppelmutante $RSK^{\Delta 58/1}; rl^{Sem/+}$ waren vergleichbar mit $RSK^{\Delta 58/1}$ (Abb. 3.12 A: Größe der neuromuskulären Synapse $RSK^{\Delta 58/1}$: $447,6 \mu\text{m}^2 \pm 20,2 \mu\text{m}^2$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^{Sem/+}$: $415,1 \mu\text{m}^2 \pm 37,9 \mu\text{m}^2$; Abb. 3.12 C: Fläche der Aktiven Zonen: $RSK^{\Delta 58/1}$: $0,48 \mu\text{m}^2 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^{Sem/+}$: $0,44 \mu\text{m}^2 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$). Die gesteigerte Aktivität von ERK durch rl^{Sem} hat keinen zusätzlichen Einfluss auf die Größe der neuromuskulären Synapse und die Fläche der Aktiven Zonen im Vergleich zu $RSK^{\Delta 58/1}$. Die Fläche der Glutamatrezeptorfelder war im Vergleich zu $RSK^{\Delta 58/1}$ deutlich stärker reduziert (Abb. 3.12 E: $RSK^{\Delta 58/1}$: $0,81 \mu\text{m}^2 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^{Sem/+}$: $0,45 \mu\text{m}^2 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$).

Die Anzahl der Aktiven Zonen ist in der Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant reduziert (Abb. 3.12 B: Anzahl Aktiver Zonen: Wildtyp: $259,4 \pm 13,7$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^{Sem/+}$: $243,7 \pm 15,0$). Die Anzahl der Glutamatrezeptorfelder ist wiederum in der Doppelmutante mit $RSK^{\Delta 58/1}$ vergleichbar (Abb. 3.12 D: $RSK^{\Delta 58/1}$: $214,6 \pm 10,8$; $RSK^{\Delta 58/1}; rl^{Sem/+}$: $216,3 \pm 19,5$). Die Ergebnisse sind in Tab. 3.2 in einer Übersicht zusammengefasst.

	Größe der neuromuskulären Synapse	Anzahl Aktiver Zonen	Fläche Aktiver Zonen	Anzahl Glutamatrezeptorfelder	Fläche Glutamatrezeptorfelder	Verhältnis Aktiver Zonen zu Glutamatrezeptorfelder
Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp
$RSK^{\Delta 58/1}$	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	reduziert	Wildtyp
rl^1/rl^1	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp
$RSK^{\Delta 58/1}; rl^1/rl^1$	reduziert	Wildtyp	reduziert	Wildtyp	reduziert	Wildtyp
$rl^{Sem/+}$	reduziert	reduziert	Wildtyp	reduziert	Wildtyp	Wildtyp
$RSK^{\Delta 58/1}; rl^{Sem/+}$	reduziert	Wildtyp	reduziert	reduziert	stark reduziert	Wildtyp

Tabelle 3.2: Übersicht der Auswirkungen der genetischen Interaktion von *rsk* und *rolled* (ERK) auf die Struktur der neuromuskulären Synapse.

Die Untersuchungen bestätigen, dass RSK als Effektor kinase des MAPK-Signalwegs einen Einfluss auf die Größe der neuromuskulären Synapse und die Flächen der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder hat. Aus den Untersuchungen der Doppelmutante $RSK^{\Delta 58/1}; rl^1/rl^1$ konnte angenommen werden, dass RSK durch negative Feedback-Regulation des MAPK-Signalwegs die Anzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder beeinflussen könnte. Durch die Untersuchungen der Doppelmutante $RSK^{\Delta 58/1}; rl^{Sem/+}$ konnte nicht verifiziert

werden, ob RSK als Negativregulator des MAPK-Signalwegs Einfluss auf die Anzahl Aktiver Zonen und Glutamatrezeptorfelder der neuromuskulären Synapsen nimmt.

3.8 Effekt von RSK auf die synaptische Transmission

Um festzustellen, ob die beobachteten morphologischen Veränderungen der neuromuskulären Synapse auch Auswirkungen auf die synaptische Transmission haben, wurden „Zwei Elektroden Voltage Clamp“-Ableitungen (TEVC) an der neuromuskulären Synapse der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 oder A3 männlicher Larven im dritten Larvenstadium analysiert in Kollaboration mit N. Ehmann und R. J. Kittel (Institut für Physiologie, Universität Würzburg) (Abb. 3.13). Die Amplitude der spontanen exzitatorischen Ströme (postsynaptisches Miniaturpotenzial; Mini), war im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert in *RSK^{Δ58/1}* (Abb. 3.13 A; Wildtyp: $-1,06 \text{ nA} \pm 0,04 \text{ nA}$, $n = 15$; *RSK^{Δ58/1}*: $-0,88 \text{ nA} \pm 0,04 \text{ nA}$, $n = 14$; $p < 0,001$). Die Mini-Amplitude stellt die postsynaptische Antwort auf die spontane Fusion eines einzelnen, Glutamat-gefüllten synaptischen Vesikels dar. Die reduzierte Mini-Amplitude weist auf eine reduzierte postsynaptische Sensitivität der *RSK*-Nullmutante hin. Das könnte durch die reduzierte Fläche der postsynaptischen Glutamatrezeptorfelder bedingt sein. Nach Expression des *RSK*-Transgens im *RSK^{Δ58/1}*-Hintergrund blieb die Mini-Amplitude unverändert gering (Abb. 3.13 A; *RSK^{Δ58/1}; P[RSK]*: $-0,86 \text{ nA} \pm 0,03 \text{ nA}$, $n = 15$; $p < 0,001$ vs. Wildtyp). Nach der Expression des *RSK*-Transgens im *RSK^{Δ58/1}*-Hintergrund blieb auch die Fläche der Glutamatrezeptorfelder im Vergleich zu *RSK^{Δ58/1}* unverändert gering, wodurch die reduzierte postsynaptische Sensitivität verursacht werden könnte.

Dagegen konnten keine funktionellen Veränderungen der Präsynapse festgestellt werden. Die Frequenz der Minis war in *RSK^{Δ58/1}* mit der wildtypischer Larven vergleichbar (Abb. 3.13 A; Wildtyp: $1,21 \text{ Hz} \pm 0,11 \text{ Hz}$, $n = 15$; *RSK^{Δ58/1}*: $1,12 \text{ Hz} \pm 0,13 \text{ Hz}$, $n = 14$). Die Amplitude der induzierten exzitatorischen postsynaptischen Ströme (eEPSC) stellt die postsynaptische Reaktion auf die Fusion von Vesikeln nach der Stimulation des Motoneurons dar. Die eEPSC-Amplitude war in *RSK^{Δ58/1}* und *RSK^{Δ58/1}; P[RSK]* im Vergleich zum Wildtyp verringert (Abb. 3.13 B; Wildtyp: $-64,68 \text{ nA} \pm 5,07 \text{ nA}$, $n = 15$; *RSK^{Δ58/1}*: $-49,09 \text{ nA} \pm 4,35 \text{ nA}$, $n = 14$ $p = 0,064$ vs. Wildtyp; *RSK^{Δ58/1}; P[RSK]*: $-44,54 \text{ nA} \pm 2,93 \text{ nA}$, $n = 15$; $p < 0,01$ vs. Wildtyp). Die reduzierte eEPSC-Amplitude kann auf die verringerte Mini-Amplitude zurückgeführt werden, da die eEPSC-Amplitude ein Vielfaches der Mini-Amplitude ist, weshalb sie auch durch die Expression des *RSK*-Transgens im *RSK^{Δ58/1}*-Hintergrund im Vergleich zu *RSK^{Δ58/1}* unverändert gering blieb.

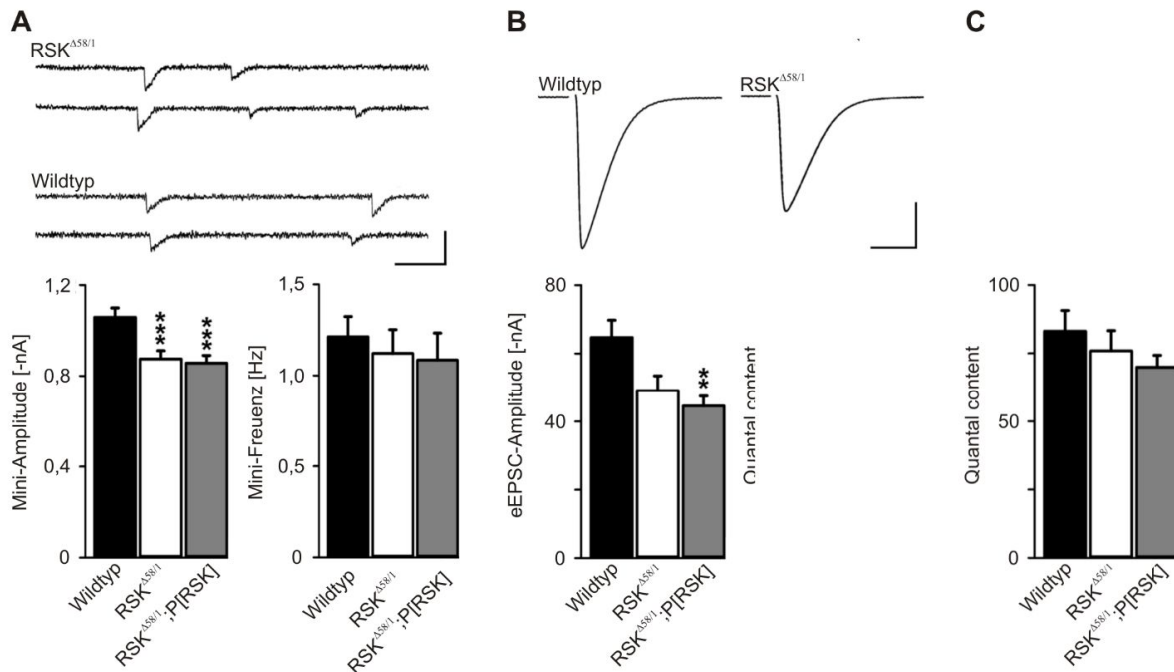


Abb. 3.13 Elektrophysiologische Charakterisierung der neuromuskulären Synapse von *RSK*-Mutanten.

(A-C) Analyse der TEVC-Ableitungen der neuromuskulären Synapsen der Muskeln 6/7 im Abdominalsegment A2 oder A3 von *Drosophila*-Larven durchgeführt von N. Ehmam (Institut für Physiologie, Universität Würzburg). (A) Exemplarische Aufnahmen und Quantifizierung der Minis. Die Mini-Amplitude war reduziert in $RSK^{\Delta 58/1}$ und konnte durch das *RSK*-Transgen nicht gerettet werden ($RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$). Die Frequenz der Minis wurde durch den Verlust von *RSK* nicht beeinträchtigt. Maßstab: 2 nA, 50 ms (B) Repräsentative eEPSCs während der niederfrequenten Stimulation des Nervs (0,2 Hz). Maßstab: 20 nA, 10 ms. Die eEPSC-Amplitude war in $RSK^{\Delta 58/1}$ und $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$ reduziert. (C) Die Transmitterfreisetzung pro Aktionspotential (Quantal Content) blieb in den untersuchten Genotypen unverändert.

Die Anzahl der fusionierten Vesikel, und somit die Transmitterfreisetzung pro Aktionspotential (Quantal content) war vergleichbar in den untersuchten Genotypen (Abb. 3.13 C; Wildtyp: 83 ± 8 ; $n = 15$; $RSK^{\Delta 58/1}$: 76 ± 7 , $n = 14$; $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$: 70 ± 4 , $n = 15$). Grundlegende Eigenschaften der Neurotransmitter-Freisetzung sind durch den Verlust von *RSK* nicht beeinflusst. Die elektrophysiologischen Untersuchungen belegen stattdessen eine Rolle von *RSK* in der Funktion der Postsynapse glutamaterger Synapsen von *Drosophila*. Diese Ergebnisse passen zu den beobachteten Defekten in der Struktur der Postsynapse, die durch die Expression des *RSK*-Transgens auch nicht vollständig gerettet werden konnten (Abb. 3.8).

3.9 RSK wird für den axonalen Transport benötigt

Die morphologische Analyse des larvalen, neuromuskulären Systems von *Drosophila* zeigte für *RSK^{Δ58/1}* einen weiteren interessanten Phänotyp: Im Vergleich zum Wildtyp waren in den Segmentalnerven der Nullmutante vermehrt BRP-Partikel zu finden. Anreicherungen von präsynaptischem Material im Axon könnten ein Anzeichen für einen vorliegenden Defekt im axonalen Transport sein, der mit der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen im Zusammenhang steht (De Vos, 2008; Hirokawa, 2010; Maday, 2014). Der Transport entlang der Mikrotubuli, in anterograder Richtung mittels Kinesin-Motorproteinen und in retrograder Richtung durch Dynein-Motoren ist wichtig für die Funktion der Nerven und zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Die Entwicklung und Funktion der Präsynapse hängt maßgeblich von einem koordinierten Transport und der Bereitstellung von verschiedenen Proteinen ab. In Vertebraten sind verschiedene Organellen für den axonalen Transport bekannt: Mitochondrien, Vorläufer von synaptischen Vesikeln (engl. „synaptic vesicle precursor“; SVP), Vesikeln mit dichtem Kern (engl. „dense core vesicle“), in denen präsynaptische Proteine transportiert werden, Transportvesikel für Proteine synaptischer Vesikel (STV) und Piccolo-Bassoon-Transportvesikel (PTV), die vorassemblierte synaptische Proteine der Cytomatrix enthalten (Zhai, 2001; Maday, 2014; Maeder, 2014). In Motoneuronen von *Drosophila* wurden bislang keine Vesikel für den Transport von Proteinen der Aktiven Zonen vergleichbar mit PTVs identifiziert (Zhai, 2001). Mutationen in einem Kinesin-3 (*immaculate connections*; *imac*) verhindern den Transport von Proteinen synaptischer Vesikel zu den naszierenden Synapsen und bewirken eine fehlerhafte Bildung der Aktiven Zonen. Ein wichtiger Bestandteil für die korrekte Bildung der Aktiven Zonen ist der *imac*-abhängige axonale Transport (Pack-Chung, 2007).

Um die Aggregate zu quantifizieren, wurden Hautmuskelschläuche inklusive Gehirn und Axone präpariert, fixiert und mit Antikörpern gegen BRP und HRP zur Bestimmung der Axonfläche gefärbt. In der Nullmutante befanden sich die Akkumulationen hauptsächlich im proximalen Teil des Nerven, nahe dem Ventralganglion, weniger im distalen Bereich, nahe der Synapse (Abb. 3.14 A).

Die Quantifizierung der BRP-Aggregate zeigte deutlich, dass sich im Vergleich zum Wildtyp mehr BRP-Punkte im Axon der Nullmutante befanden (Abb. 3.14 B: *RSK^{Δ58/1}*: $0,290 \pm 0,022$ BRP-Partikel pro μm^2 Axonfläche; Wildtyp: $0,179 \pm 0,014$ BRP-Partikel pro μm^2 Axonfläche; $p < 0,05$) Dieser Phänotyp konnte durch die Expression des *RSK*-Transgens im *RSK^{Δ58/1}*-

Hintergrund gerettet werden (Abb. 3.14 A, B: $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$ ($0,125 \pm 0,026$ BRP-Partikel pro μm^2 Axonfläche; $p < 0,05$ vs. $RSK^{\Delta 58/1}$).

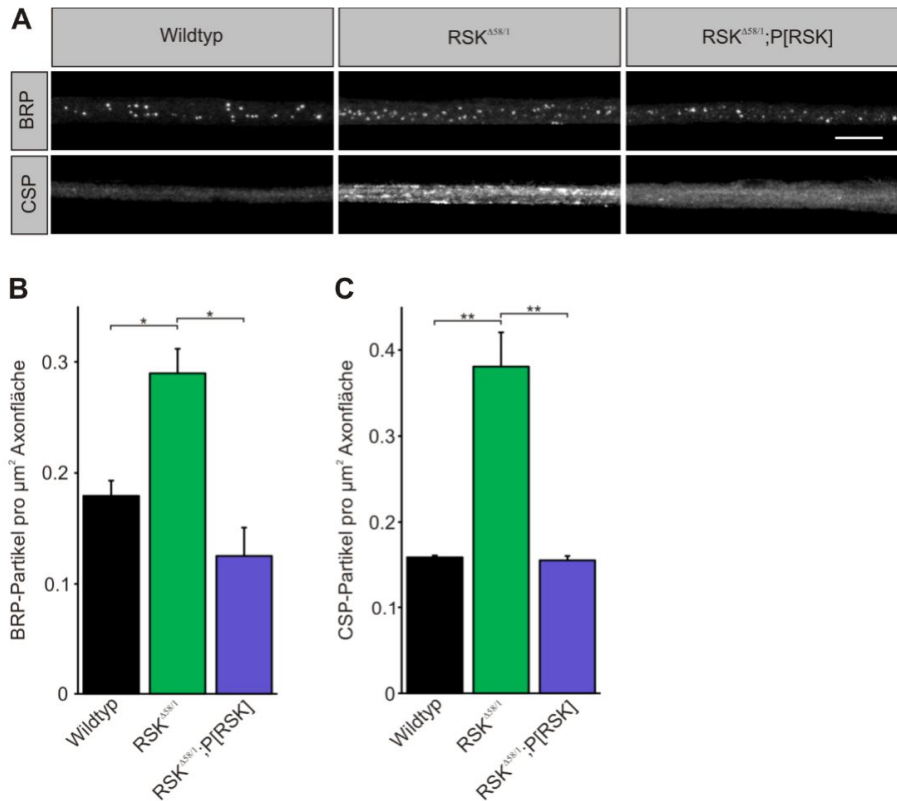


Abb. 3.14 Einfluss von RSK auf den axonalen Transport verschiedener präsynaptischer Proteine

(A) Axone der Motoneurone von Wildtyp, $RSK^{\Delta 58/1}$ und $RSK^{\Delta 58/1}; P[RSK]$ gefärbt mit Antikörpern gegen BRP (oben) und CSP (unten). Maßstab: 20 μm . (B) Quantifizierung der BRP-Partikel im Axon ($n = 5$ Larven pro Genotyp). (C) Quantifizierung der CSP-Partikel im Axon ($n = 8$ Larven pro Genotyp). In den Axonen der Nullmutante befinden vermehrt Akkumulationen präsynaptischer Proteine, die durch die Expression des *RSK*-Transgens verringert wurden.

Um festzustellen, ob der Verlust von RSK nur den Transport von BRP oder auch den anderer Organellen beeinflusst, wurde auch der Transport von CSP (Cysteine string protein; Zinsmaier 1994) untersucht, das an synaptische Vesikel assoziiert ist. CSP ist mit der cytoplasmatischen Oberfläche von synaptischen Vesikeln assoziiert und wird in STVs transportiert (Zhai, 2001). Die quantitative Analyse zeigte, dass sich im Vergleich zum Wildtyp mehr CSP-Aggregate im proximalen Teil der Axone von Motoneuronen aus $RSK^{\Delta 58/1}$ -Larven befanden (Abb. 3.14 A, B: $RSK^{\Delta 58/1}$: $0,381 \pm 0,040$ CSP-Partikel pro μm^2 Axonfläche; Wildtyp: $0,159 \pm 0,002$ CSP-

Partikel pro μm^2 Axonfläche; $p < 0,01$). Durch die Expression des RSK-Transgens im $RSK^{458/1}$ -Hintergrund war die Menge der CSP-Aggregate im proximalen Teil des Axons vergleichbar zum Wildtyp (Abb. 3.14 A, B: $0,156 \pm 0,005$ CSP-Partikel pro μm^2 Axonfläche; $p < 0,01$ vs. $RSK^{458/1}$). Die Akkumulationen von BRP und CSP in proximalen Regionen des Axons könnten auf Schäden in der Assemblierung oder dem Transport von Organellen zu den Synapsen hinweisen. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass RSK eine Rolle beim axonalen Transport synaptischer Proteine spielen könnte.

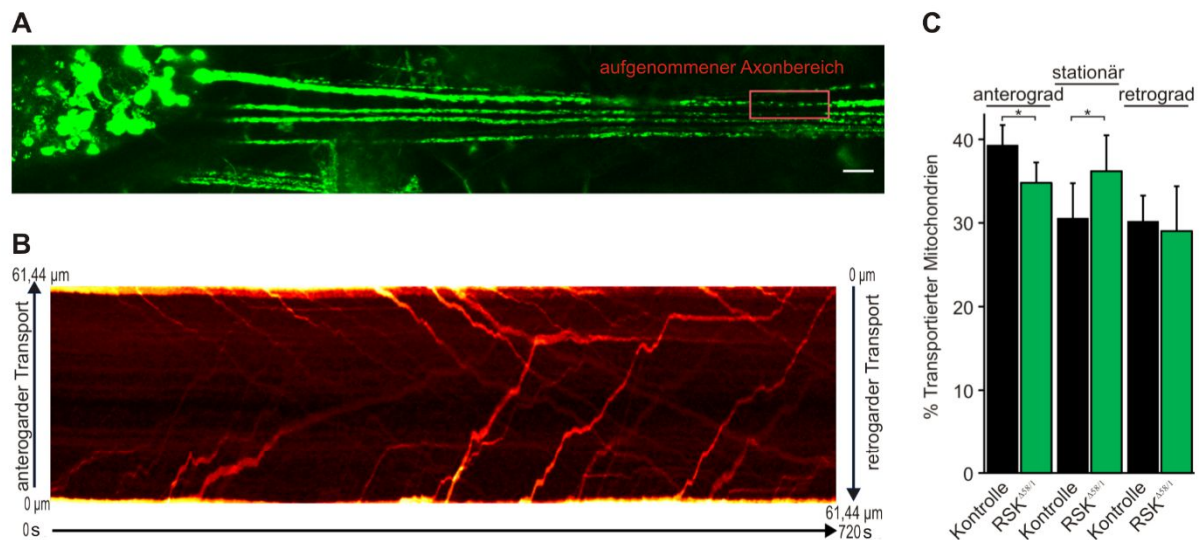


Abb. 3.15 Einfluss von RSK auf den axonalen Transport von Mitochondrien

(A) Darstellung des aufgenommenen Bereichs des Axons während der *in-vivo* „time-lapse-imaging“-Versuche. Nach dem Ausbleichen eines Axonbereichs (roter Kasten) wurden in anästhesierten Larven die Bewegungen der Mitochondrien entlang dem Axon aufgenommen. Maßstab: 10 μm . (B) Die gerichtete Bewegung der Mitochondrien innerhalb des gebleichten Axonbereichs wurden in einem Kymograph dargestellt. (C) Darstellung der Verteilung des axonalen Transports von Mitochondrien durch *in-vivo* „time-lapse-imaging“ in anterograden und retrograden Transport und stationäre Phasen in Kontrolltieren (*OK6-Gal4; UAS-mito::GFP*, $n = 15$) und RSK-Nullmutanten (*RSK^{458/1}; OK6-Gal4; UAS-mito::GFP*, $n = 10$)

Der bidirektionale Transport von Mitochondrien entlang des Axons wurde mittels *in-vivo* „time-lapse-imaging“ analysiert, um festzustellen, ob der Verlust von RSK auch den axonalen Transport von Mitochondrien in bestimmter Richtung beeinflusst. Die Bewegungsmuster von Mitochondrien sind komplex: Phasen schneller anterograder Bewegungen können in stationäre Phasen übergehen, auch kann die Transport-Richtung abrupt geändert werden (Zinsmaier, 2009; Sheng und Cai, 2012). In lebenden und intakten Larven im frühen dritten Larvenstadium wurde der Transport von Mitochondrien aufgenommen, indem ein mitochondriales GFP-

Konstrukt (*UAS-mito::GFP*) mit Hilfe der Motoneuron-spezifischen Treiberlinie *OK6-Gal4* in einem ansonsten wildtypischen oder im *RSK^{Δ58/1}*- Hintergrund exprimiert wurde. Nach dem Ausbleichen eines Axonbereichs, der etwa 150 μm vom Ventralganglion entfernt lag, wurden die Bewegungen der Mitochondrien in Zeitintervallen von 720 ms über eine Dauer von 12 min aufgenommen. Diese Aufnahmen wurden in einen Kymograph dargestellt (Abb. 3.15 A, B) und anschließend untersucht, wie viele Mitochondrien in anterograder oder retrograder Richtung transportiert wurden und wie viele sich in stationären Phasen befanden (Abb. 3.15 C).

In den Axonen der Nullmutante wurden im Vergleich zum Wildtyp weniger Mitochondrien in anterograder Richtung transportiert (Abb. 3.15 C: *OK6-Gal4; UAS-mito::GFP*: 39,3% ± 2,4%; *RSK^{Δ58/1}; OK6-Gal4; UAS-mito::GFP*: 34,8% ± 2,5%; $p < 0,05$). Hingegen war der Anteil Mitochondrien, die sich in einer stationären Phase befanden, signifikant erhöht (Abb. 3.15 C: *OK6-Gal4; UAS-mito::GFP*: 30,6% ± 4,2%; *RSK^{Δ58/1}; OK6-Gal4; UAS-mito::GFP*: 36,2% ± 4,3% $p < 0,05$). Der mitochondriale Transport in retrograder Richtung blieb unverändert (Abb. 3.15 C: *OK6-Gal4; UAS-mito::GFP*: 30,2% ± 3,1%; *RSK^{Δ58/1}; OK6-Gal4; UAS-mito::GFP*: 29,0% ± 5,4% $p = 0,49$). Der Einfluss von RSK auf den axonalen Transport von Mitochondrien ist somit auf den Transport in anterograder Richtung beschränkt. RSK hat demnach eine spezielle Funktion in der Regulation des anterograd-gerichteten Transports von Mitochondrien.

4 Diskussion

In Tiermodellen für das Coffin-Lowry-Syndrom (CLS) konnte gezeigt werden, dass der Verlust von RSK zu einer Dysregulation des ERK-Signalwegs führt (Dufresne, 2001; Kim, 2006). Der ERK/MAPK-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zelle, aber auch in neuronalen Prozessen wie der synaptischen Plastizität und der Gedächtnisbildung, wobei eine genaue Regulation der Komponenten des MAPK-Signalwegs wichtig ist (Thomas, 2004). Durch die Regulation der Aktivität von ERK1/2 werden diverse neuronale Funktionen wie die synaptische Plastizität oder die Bildung des Gedächtnisses kontrolliert (Thiels, 2002; Schneider, 2011). Im Hippocampus von *RSK2*-Knockout Mäusen konnte eine erhöhte Menge an phosphoryliertem ERK1/2 nachgewiesen werden (Schneider, 2011). Als Effektor kinase von ERK phosphoryliert RSK eine Vielzahl an Substraten, dennoch wird RSK auch eine Rolle in der Regulation des ERK/MAPK-Signalwegs zugeschrieben (Douville and Downward, 1997; Kim, 2006). Die mentale Retardierung der CLS-Patienten könnte auf Defekte in der synaptischen Plastizität zurückgeführt werden, die durch die gesteigerte Aktivität von ERK verursacht sein könnten. (Fischer, 2009b; Schneider, 2011). In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen des deregulierten ERK/MAPK-Signalwegs auf die Struktur und Funktion von glutamatergen Synapsen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass RSK nicht nur die Aktivität von ERK in Motoneuronen von *Drosophila* Larven reguliert, sondern auch dessen subzelluläre Lokalisation innerhalb der Motoneurone beeinflusst. Die Aufgaben von RSK im MAPK-Signalweg sind komplex, einerseits hat RSK eine Funktion in der negativen Regulation des MAPK-Signalwegs, andererseits dient RSK als Effektor kinase des Signalwegs, um zahlreiche Substrate zu phosphorylieren (Romeo, 2012). Dieses vielschichtige Bild des Zusammenspiels von RSK und ERK zeigte sich auch in den Untersuchungen der genetischen Interaktion von *rsk* und *rl* (ERK). Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass RSK als Negativregulator von ERK einen Einfluss auf die Anzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder in der neuromuskulären Synapse ausübt. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass RSK an der präzisen Regulation des axonalen Transports von präsynaptischem Material und Mitochondrien beteiligt ist.

4.1 Die Lokalisierung von RSK an der neuromuskulären Synapse

Bislang wurde kein Antikörper hergestellt, durch den endogenes RSK in neuronalem Gewebe immunhistochemisch gefärbt werden kann. Aber mit Hilfe einer Motoneuron-spezifischen Überexpression von RSK konnte gezeigt werden, dass RSK ringförmige Strukturen an der Synapse bildet, die CSP umschließen. RSK ist demnach an der Präsynapse lokalisiert (Fischer, 2009b). Durch die Motoneuron-spezifische Expression eines transgenen *RSK-GFP*-Konstrukts konnte verifiziert werden, dass RSK an der präsynaptischen Seite innerhalb der Boutons lokalisiert ist. RSK kolokalisiert nur teilweise mit BRP an den Aktiven Zonen der neuromuskulären Synapse von *Drosophila*.

Darüber hinaus zeigten vorangegangene Studien, dass durch den Verlust von RSK2 in Mäusen die Expression von Gria2, einer AMPA-Untereinheit des Glutamatrezeptors GluR2, beeinflusst wird (Morice, 2013). Demnach hat RSK nicht nur eine prä-, sondern auch eine postsynaptische Funktion. Durch die Muskel-spezifische Expression des transgenen *RSK-GFP*-Konstrukts konnte keine selektive Anreicherung von RSK an der postsynaptischen Seite gezeigt werden. RSK ist nahezu homogen im Muskel verteilt, in den Zellkernen ist RSK angereichert. Obwohl durch die Überexpression von *RSK* mit Hilfe von Gewebe-spezifischen Treiberlinien keine postsynaptischen Anreicherungen von RSK nachgewiesen werden konnten, besteht weiterhin die Frage, wie stark das Lokalisierungsmuster durch die Betrachtung von überexprimierten *RSK*-Konstrukten im Vergleich zum Lokalisierungsmuster von endogenem RSK verändert ist.

4.2 Lokalisierung von ERK und RSK in den Motoneuronen

In vitro Untersuchungen zeigten, dass RSK SOS (son of sevenless) eine Komponente des MAPK-Signalwegs phosphoryliert, weshalb angenommen wurde, dass RSK eine Funktion in der Regulation des ERK/MAPK-Signalwegs übernimmt, indem RSK durch negative Rückkopplung die Aktivität von SOS inhibiert (Douville and Downward, 1997). In ruhenden Zellen von Säugern sind ERK 1/2 mit RSK konstitutiv assoziiert, erst durch einen mitogenen Stimulus dissoziiert der Komplex vorübergehend oder komplett (Roux, 2003). In Motoneuronen von *Drosophila* ist die Lokalisierung von RSK und aktiviertem ERK an der Synapse nicht auf die Aktiven Zonen beschränkt; die Verteilungsmuster überschneiden sich teilweise in den Boutons. Das Verteilungsmuster von aktivem ERK ist aber breiter im Vergleich zur Verteilung von RSK. RSK und ERK sind nicht in allen Bereichen des Boutons in einem

Komplex assoziiert. ERK könnte demnach in den Bereichen, in denen es nicht mit RSK kolokalisiert, aktiv sein und weitere Substrate aktivieren. Auch in den Zellkörpern konnte eine Kolokalisierung RSK und aktiviertes ERK im Cytoplasma gezeigt werden, wobei nur aktives ERK auch im Nukleus nachgewiesen wurde.

Kim *et al.* (2006) konnten zeigen, dass zwischen RSK und ERK eine epistatische Beziehung besteht, wobei RSK aktiviertes ERK im Cytosol zurückhält, und somit dessen Translokation in den Nukleus verhindert. RSK dient demnach als cytoplasmatischer Anker von ERK (Kim, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust von RSK dazu führt, dass im Perikaryon der Zellkörper von Motoneuronen deutlich mehr aktiviertes ERK vorhanden ist, an den neuromuskulären Synapsen hingegen deutlich weniger aktives ERK nachgewiesen werden konnte. RSK könnte in der Regulation der Lokalisierung von aktiviertem ERK innerhalb der subzellulären, cytoplasmatischen Kompartimenten des Motoneurons beteiligt sein (Abb. 4.1).

In Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass durch den Verlust von RSK2 die Aktivität von ERK im Hippocampus erhöht ist und so zur Dysregulation der durch ERK vermittelten Transkription führt (Mehmood, 2011; Schneider, 2011). Der Verlust von RSK und die dadurch entstandene Misslokalisierung von aktivem ERK im Motoneuron könnten nicht nur die ERK-vermittelte Transkription beeinflussen, sondern auch lokale Auswirkungen auf Struktur und Funktion der neuromuskulären Synapse haben.

4.3 Einfluss von RSK auf die Struktur und Funktion der neuromuskulären Synapse

In vorangegangenen Studien konnte eine gesteigerte Aktivität von ERK im Hippocampus von *RSK2*-Knockout Mäusen nachgewiesen werden (Mehmood, 2011; Schneider, 2011). Die Expression der Untereinheit Gria2 des AMPA-Rezeptors GluR2 ist durch den Verlust von RSK2 erhöht, wie biochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen in isolierten Zellen des Cortex und des Hippocampus zeigten. Die elektrophysiologischen Analysen zeigten, dass der Verlust von RSK2 die von AMPA-Rezeptoren vermittelte synaptische Transmission beeinträchtigt. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass RSK2 benötigt wird, um durch Phosphorylierung der postsynaptischen Proteine, die PDZ-Domänen enthalten, die Eigenschaften der Ca²⁺-Kanäle zu regulieren (Thomas, 2005; Morice, 2013). Putz *et al.* (2004) konnten in *Drosophila* zeigen, dass der Verlust von RSK Defizite in Lernprozessen und der

Gedächtnisbildung verursacht, weshalb angenommen wurde, dass RSK eine Rolle in der Regulation der synaptischen Plastizität übernimmt.

Ein wichtiger Vorgang in Lernprozessen ist die Langzeit-Potenzierung (LTP), eine speziellen Form synaptischer Plastizität. Dabei werden AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran inseriert, die eine schnelle postsynaptische Antwort auf die Freisetzung von Neurotransmittern geben, wodurch die synaptische Transmission verstärkt wird. ERK hat durch die Regulation der Insertion von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran einen Einfluss auf die synaptische Plastizität (Zhu, 2002; Zadran, 2009; Fleming, 2010).

Mit immunhistochemischen Untersuchungen der neuromuskulären Synapsen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass RSK einen Einfluss auf die Struktur der Synapsen hat. Die präsynaptische Seite des Motoneurons, an der die RSK-Lokalisierung gezeigt werden konnte, wies durch den Verlust von RSK strukturelle Veränderungen auf. Die neuromuskuläre Synapse ist insgesamt kleiner und bildet weniger Aktive Zonen mit geringerer Fläche aus, dabei werden mehr Boutons gebildet; diese sind jedoch kleiner und beherbergen weniger Aktive Zonen (Abb. 4.1). Da jeder Aktiven Zone ein Glutamatrezeptorfeld gegenüberliegt, ist die Organisation der Synapse durch den Verlust von RSK nicht beeinflusst. RSK könnte demnach direkt die Regulation der synaptischen Eigenschaften beeinflussen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Funktion der neuromuskulären Synapse bestätigten, dass RSK an der postsynaptischen Seite für die Regulation der Antwort auf die synaptische Transmission benötigt wird. Die reduzierte Mini-Amplitude weist auf einen postsynaptischen Defekt der *RSK*-Mutante hin; entweder sind weniger Glutamatrezeptoren in den postsynaptischen Rezeptorfeldern vorhanden oder die Zusammensetzung der Rezeptoren ist unterschiedlich, wodurch die Rezeptoreigenschaften verändert sind.

Patienten mit Coffin-Lowry-Syndrom leiden unter schwerer mentaler Retardierung durch den Verlust der RSK2-Funktion. Die AMPA-Rezeptoren sind wichtig für die Langzeitpotenzierung (LTP) somit auch für die Gedächtnisbildung im Hippocampus (Collingridge, 1983). Die strukturellen Veränderungen der ionotropen glutamatergen Synapsen des neuromuskulären Systems von *Drosophila*, die als Modell für AMPA-Rezeptoren dienen, weisen auf Defekte in der synaptischen Plastizität aufgrund der fehlenden RSK-Funktion hin (Budnik, 2006).

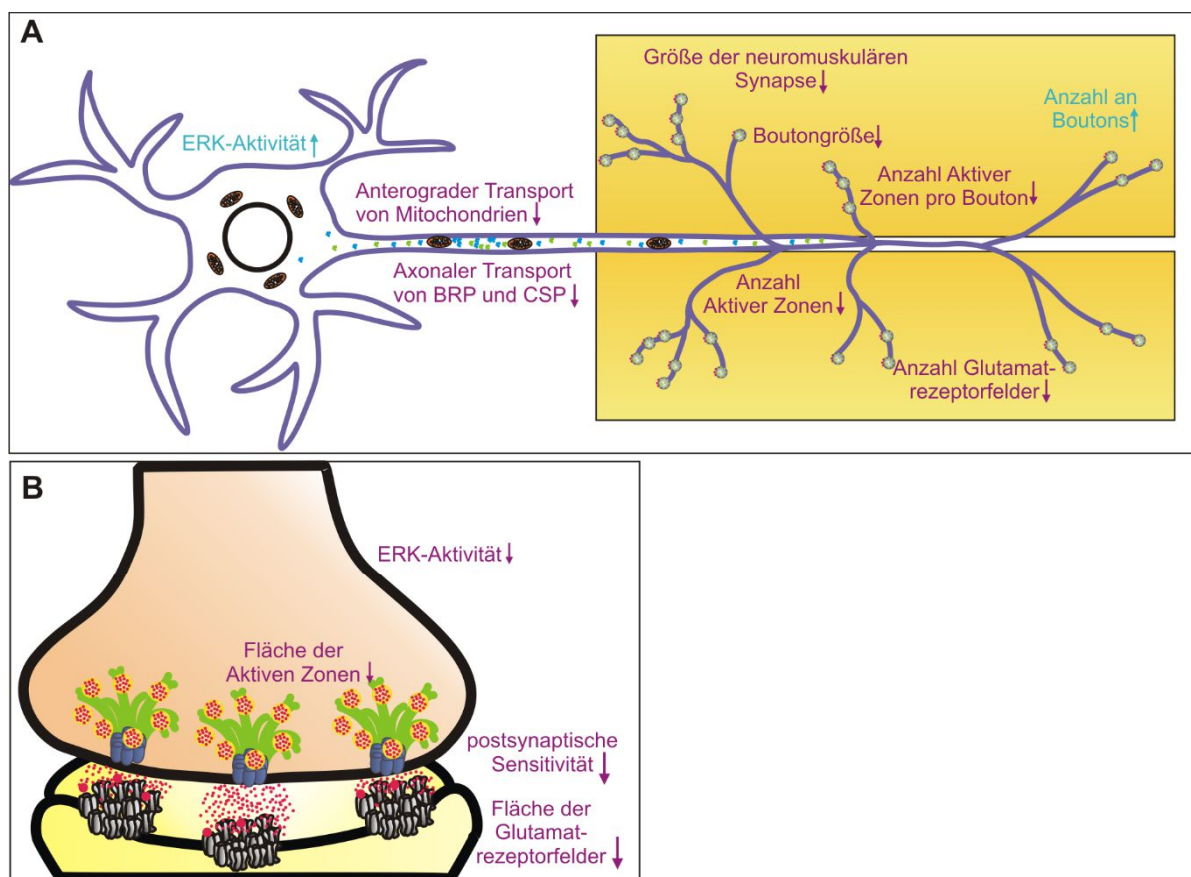


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Auswirkungen des Verlusts von RSK auf Motoneuron und neuromuskuläre Synapse

(A) Schematische Darstellung eines Motoneuron (violett) mit dem innervierten Muskel (gelb). Durch den Verlust von RSK ist ERK im Zellkörper hyperaktiviert. Auf der präsynaptischen Seite führt der Verlust von RSK zu verändertem axonalem Transport von CSP (blau) und BRP (grün), der anterograde Transport der Mitochondrien (braun) entlang dem Axon (violett) ist beeinträchtigt. Durch den Verlust von RSK ist die neuromuskuläre Synapse kleiner und bildet mehr, aber kleinere Boutons aus. Die Gesamtzahl der Aktiven Zonen (grün) sowie die Anzahl der Aktiven Zonen pro Bouton ist verringert. Auf der postsynaptischen Seite (gelb) zeigt sich der Verlust von RSK durch die verringerte Anzahl an Glutamatrezeptorfeldern (rot). (B) Schematische Darstellung eines Boutons. Das Andocken synaptischer Vesikel (gelb) an die Aktive Zone wird über BRP (grün) vermittelt. Über Ca^{2+} -Kanäle, die Untereinheit Cacophony (Cac; blau) ist repräsentativ dargestellt, wird die Freisetzung von Glutamat (rot) ausgelöst. Auf der postsynaptischen Seite liegen die Glutamatrezeptorfelder (grau) den Aktiven Zonen gegenüber. Durch den Verlust von RSK sind die Flächen der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder kleiner und die postsynaptische Sensitivität der Glutamatrezeptorfelder ist reduziert.

Die Defekte in der synaptischen Plastizität und die abgeschwächte synaptische Transmission könnten die Beeinträchtigung im Lernen und der Gedächtnisbildung bei CLS-Patienten verursachen.

Die neuromuskuläre Synapse der Muskeln 6/7 wird von unterschiedlichen Typ I-Motoneuronen innerviert: Das Motoneuron RP3, das Typ Ib-Boutons ausbildet und das Motoneuron MN6/7b, wodurch die Synapse auch Typ Is-Boutons enthält (Atwood, 1993; Karunanithi, 2002). Durch den Verlust von RSK ist die Anzahl der Typ Ib-Boutons reduziert, die Anzahl der Typ Is-Boutons ist dagegen erhöht. Die Ergebnisse deuten auf eine Funktion von RSK in Regulation der Synapsen-Bildung hin, die vom Motoneuron-Typ abhängig sein könnte. Um diese Aussage zu verifizieren, sollten in weiterführenden Experimenten die neuromuskulären Synapsen mit einem Antikörper gegen DLG gefärbt werden, um die Größe des SSR der verschiedenen Boutons zu bestimmen. So könnte man herausfinden, ob durch den Verlust von RSK mehr Typ Is-Boutons gebildet werden, oder ob die Typ Ib-Boutons im Vergleich zum Wildtyp kleiner sind.

4.4 Einfluss von RSK auf die Struktur und Funktion der neuromuskulären Synapse in Abhängigkeit der Aktivität von ERK

In welchem Zusammenhang stehen die durch den Verlust von RSK verursachten Veränderungen in der synaptischen Transmission und der Struktur der neuromuskulären Synapsen mit der erhöhten Aktivität von ERK und dessen veränderter Lokalisierung im Motoneuron von *Drosophila*? Koh *et al.* (2002) fanden heraus, dass die Veränderung der ERK-Aktivität an der neuromuskulären Synapse mit der Menge an FascilinII (FasII), einem neuronalen Zelladhäsionsprotein, umgekehrt korreliert. ERK reguliert über FasII die Anzahl der synaptischen Boutons. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass in ERK-positiven Bereichen keine FasII-Färbung vorhanden war, weshalb ein Regulationsmechanismus auf Protein-Ebene plausibel erscheint (Koh, 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den Verlust von RSK die Anzahl der Boutons verändert ist. Mit weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen zur FasII-Lokalisierung in *RSK*-Mutanten könnte bestimmt werden, ob RSK einen Einfluss auf ERK-abhängige Regulation der FasII-vermittelten Zelladhäsion hat.

Die Serin-Threonin-Kinase Unc-51 stellt einen weiteren Negativregulator des ERK/MAPK-Signalwegs in Motoneuronen dar (Wairkar, 2009). Mutationen in *rsk* und *unc-51* könnten also

ähnliche synaptische Phänotypen aufweisen. Tatsächlich sind die Größe der neuromuskulären Synapse, die Anzahl der Aktiven Zonen sowie die eEPSC-Amplitude in beiden Mutanten verringert. Interessanterweise konnten die Defekte in der Elektrophysiologie und somit in der Funktion der Synapse durch die Expression eines genomischen Rettungskonstrukts in beiden Mutanten nicht behoben werden, wodurch die Wichtigkeit der präzisen Regulation der ERK-Aktivität zur Aufrechterhaltung der synaptischen Funktion verdeutlicht wird. Wie in den immunhistochemischen Untersuchungen zur Lokalisierung des aktiven ERK gezeigt werden konnte, ist das Verteilungsmuster von aktiviertem ERK in den Larven, die das genomische *RSK*-Rettungskonstrukt tragen, im Vergleich zu wildtypischen Larven unterschiedlich (Abb. 3.5). In Larven, die das genomische Rettungskonstrukt exprimieren, ist ERK nicht nur an den neuromuskulären Synapsen angereichert, sondern im ganzen Muskel abundant. Die unterschiedliche Verteilung von aktivem ERK könnte für die Änderungen der postsynaptischen Struktur und Funktion der *RSK*-Nullmutante verantwortlich sein und sich somit auch auf die Funktion der Postsynapse auswirken, weshalb die Defekte durch die Expression des Rettungskonstrukts nicht behoben werden konnten.

Dennoch weisen *rsk*- und *unc-51*-Mutanten erhebliche Unterschiede auf. Der Verlust von *unc-51* verursacht stärker ausgeprägte Phänotypen; beispielsweise enthält die neuromuskuläre Synapse viele Glutamatrezeptorfelder ohne gegenüberliegende Aktive Zonen. In der *RSK*-Nullmutante konnten diese Defekte in der Organisation der synaptischen Verknüpfungen nicht gefunden werden. Beide Nullmutanten zeigten eine verringerte eEPSC-Amplitude, wobei dieser Phänotyp in der *unc-51*-Mutante auf eine defekte Freisetzung der Neurotransmitter zurückgeführt wurde. Dieser präsynaptische Defekt konnte in der *RSK*-Mutante nicht festgestellt werden, der „Quantal Content“ war im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Stattdessen konnte eine Reduktion der Mini-Amplitude gemessen werden, die auf eine verringerte postsynaptische Sensitivität hinweist. Diese war durch den Verlust von *Unc-51* nicht verändert. Obwohl *RSK* und *Unc-51* als Negativregulatoren der ERK-Aktivität dienen, scheint ihr Beitrag auf die Auswirkungen der ERK-Aktivität verschieden. Wairkar et al. (2009) vermuteten, die Negativregulation der ERK-Aktivität könnte einen möglichen Mechanismus zur Synapsen-spezifischen Kontrolle der Zusammensetzung der Aktiven Zonen darstellen. *RSK* könnte durch die veränderte ERK-Lokalisierung und die Negativregulation der ERK-Aktivität die Anzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder, die in einer NMJ gebildet werden, kontrollieren.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der ERK/MAPK-Signalweg wichtige Aufgaben in der Bildung von Synapsen und der Regulation der synaptischen Plastizität übernimmt. Beispielsweise ist der ERK/MAPK-Signalweg an der Regulation der Langzeitplastizität beteiligt, indem ERK nach der Translokation in den Nukleus die Aktivität von Transkriptionsfaktoren reguliert (Martin, 1997; Huang, 2001; Alonso, 2004; Hans, 2004). Da ERK in verschiedenen subzellulären Kompartimenten aktiv ist, übernimmt es verschiedene Funktionen in der Kurz- und Langzeitplastizität (Sweatt, 2004; Boggio, 2007). RSK könnte in den Motoneuronen die Lokalisierung von aktivem ERK in den subzellulären Kompartimenten kontrollieren und so die verschiedenen Funktionen von ERK im Motoneuron koordinieren. Durch den Verlust von RSK konnte eine reduzierte postsynaptische Sensitivität beobachtet werden, die möglicherweise durch die Dysregulation der ERK-Aktivität verursacht wurde.

Des Weiteren konnte in *in-vitro* Versuchen festgestellt werden, dass durch Inhibition des ERK/MAPK-Signalwegs das exzitatorische postsynaptische Potential verändert war. Der ERK/MAPK-Signalweg ist demnach an der Regulation der aktivitätsabhängigen Kurzzeitplastizität der Synapsen beteiligt (Giachello, 2010). Beispielsweise spielt die ERK/MAPK-abhängige Phosphorylierung von Synapsin nicht nur eine Rolle in der Bildung funktionaler Synapsen, sondern beeinflusst auch die Kurzzeitplastizität (Giachello, 2010). Um festzustellen, ob die veränderte Aktivität von ERK in der *RSK*-Nullmutante Auswirkungen auf die Phosphorylierung von Synapsin in den Motoneuronen hat, müssten biochemische Untersuchungen durchgeführt werden, die zeigen, ob die Menge an phosphoryliertem Synapsin in der *RSK*-Mutante verändert ist.

Die Untersuchungen der genetischen Interaktion von *rsk* und *rolled* (ERK) konnten durch die Kombination von *rsk*^{A58/1} und *rl*¹, einer hypomorphen ERK-Mutante mit verringerter Aktivität, zeigen, dass RSK als Negativregulator der ERK-Aktivität an der Prä- und Postsynapse dient und durch die Inhibition des aktiven ERKs die Anzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder beeinflusst. RSK hat als Effektor kinase des ERK/MAPK-Signalwegs einen Einfluss auf die Regulation der Größe der neuromuskulären Synapse und auf die Fläche der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder (Abb. 4.2). In der Regulation der Struktur der neuromuskulären Synapsen wird die duale Funktion von RSK im ERK/MAPK-Signalweg deutlich.

Die Untersuchungen der Struktur der neuromuskulären Synapse von *rl*^{Sem}, einer ERK-Mutante mit moderat erhöhter Aktivität zeigten, dass durch die erhöhte ERK-Aktivität die Größe der

neuromuskulären Synapse sowie die Anzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder verringert ist. Die Flächen der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder sind in rl^{Sem} unverändert.

In der Kombination von $rsk^{A58/1}$ und rl^{Sem} sollten die Phänotypen der rl^{Sem} -Mutante, die durch die fehlende Negativregulation von ERK entstanden sind, durch das Fehlen von RSK nicht verstärkt werden. Falls die Phänotypen jedoch durch die fehlende Funktion von RSK als Effektor kinase des ERK/MAPK-Signalwegs begründet sind, sollten sie durch das Fehlen der RSK-Funktion noch verstärkt sein. Die Analyse bestätigt, dass RSK als Negativregulator von aktivem ERK die Größe der neuromuskulären Synapse beeinflusst, aber als Effektor kinase des ERK/MAPK-Signalwegs die Größe der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder reguliert. Ob die Anzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder durch die fehlende Negativregulation von ERK verursacht wurde, konnte durch diese Analyse nicht bestätigt werden.

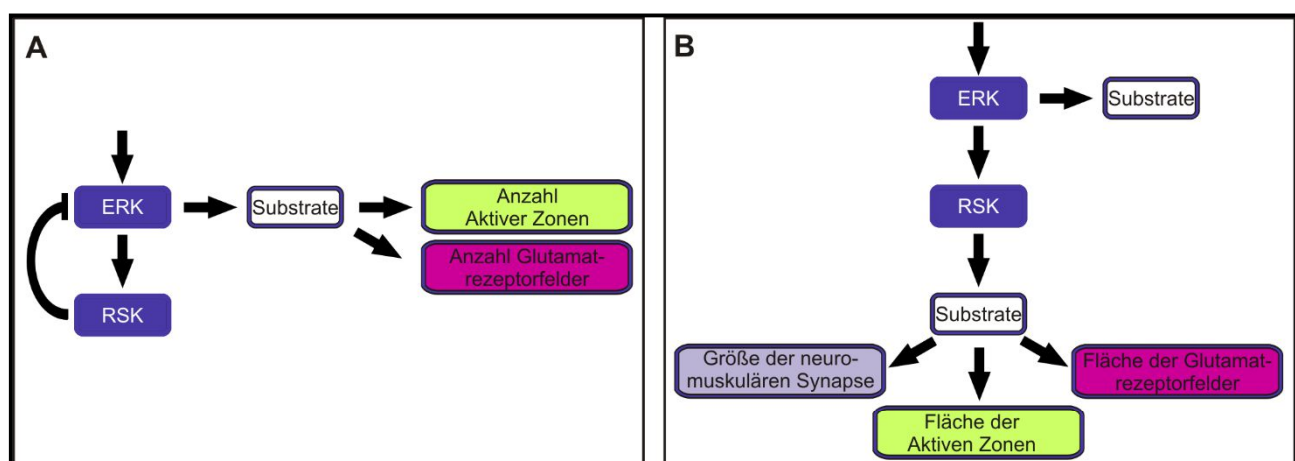


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der Funktion von RSK im MAPK-Signalweg

(A) Nachdem ERK RSK phosphoryliert, inhibiert aktiviertes RSK ERK, um eine Hyperaktivierung von ERK und somit eine vermehrte Substratphosphorylierung durch ERK zu unterbinden. In der Regulation der Anzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder dient RSK als Negativregulator der ERK-Aktivität. (B) RSK wird von ERK aktiviert, um Substrate zu phosphorylieren, die Auswirkungen auf die Struktur der neuromuskulären Synapse haben. RSK hat durch die Phosphorylierung von Substraten Auswirkungen auf die Größe der neuromuskulären Synapse und auf die Fläche der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder.

Die Untersuchungen der genetischen Interaktion von rsk und rl^l sowie von $rsk^{A58/1}$ und rl^{Sem} führten zu teilweise unterschiedlichen Ergebnissen, was mehrere Ursachen haben könnte. In der untersuchten Fliegenlinie $rsk^{A58/1}; rl^{Sem}/+$ war ein wildtypisches rl -Allel vorhanden, das den durch rl^{Sem} verursachten Effekt überdecken könnte. Das wildtypische ERK-Allel ist aber

notwendig, da dominantes r^{Sem} zur Sterilität der weiblichen Fliegen führt. Des Weiteren ist die Bindestelle für RSK in r^{Sem} nicht mehr vorhanden. Somit kann RSK in der r^{Sem} -Mutante nicht mehr als cytoplasmatischer Anker von ERK dienen.

Fischer *et al.* (2009) vermuteten, dass RSK ERK an den Synapsen bindet und somit die Aktivität von ERK inhibiert, weshalb nur ungebundenes ERK phosphoryliert und aktiviert werden kann und zur Synapse wandert (Fischer, 2009b). Wie aber in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dient RSK nicht nur als Negativregulator der ERK-Aktivität, sondern spielt auch eine wichtige Rolle in der subzellulären Lokalisierung von ERK innerhalb des Motoneurons. Vermutlich ist präzises Verhältnis von RSK und ERK wichtig für die Regulation von Struktur und Funktion der Synapse, wobei RSK auf unterschiedliche Weise die Aktivität und Lokalisierung von ERK beeinflusst.

4.5 Der Verlust von RSK führt zu Defekten im axonalen Transport

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass durch den Verlust von RSK die präsynaptischen Proteine BRP und CSP, die zur Synapse transportiert werden sollen, in den Axonen der Motoneurone akkumulieren. Für den Transport von präsynaptischem Material zu den Axontermini zum Aufbau und Erhalt der Synapsen ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen Motorproteinen, verschiedenen Transportkomponenten wie beispielsweise Adapter- und Gerüstproteinen sowie die lokale Aktivierung von Signalwegen notwendig. Zusätzlich existieren Mechanismen, um die Lokalisierung der präsynaptischen Komponenten auf die Axontermini zu beschränken (Goldstein, 2008; Maeder, 2014). So führt beispielsweise der Verlust von Liprin- α in Motoneuronen von *Drosophila* zur Bildung ektopischer Akkumulationen synaptischer Vesikel und präsynaptischer Cytomatrix-Proteine in distalen Bereichen des Axons nahe der Synapsen, ohne Auswirkung auf die Lokalisierung der Mitochondrien oder Motorproteinen (Li, 2014). Die Serin/Arginin-Proteinkinase SRPK79D verhindert, dass während des Transports große BRP-Agglomerate im Axon gebildet werden, wodurch ektopische Aktive Zonen entstehen. Da der Transport anderer präsynaptischer Proteine durch den Verlust von SRPK79D nicht beeinflusst wird, ist anzunehmen, dass die Funktion der Kinase spezifisch für die Bildung der Aktiven Zonen an der präsynaptischen Membran ist (Johnson, 2009; Nieratschker, 2009). Mutationen in den Motorproteinen verursachen große, mit Organellen gefüllte Axonschwellungen, die aber den Transport von Mitochondrien nicht beeinträchtigen. Diese Schwellungen sind vermutlich Stellen, an denen die Autophagozytose stattfinden kann (Pilling, 2006). In *dAcs1* (acetyl-CoA synthetase long

chain)-Mutanten bleibt der axonale Transport von Mitochondrien unbeeinflusst, allerdings ist die Transportgeschwindigkeit von Vesikeln in anterograder Richtung beschleunigt, in retrograder Richtung jedoch verlangsamt, was zu Ansammlungen von Vesikeln in distalen Bereichen des Axons führt (Liu, 2011). Mutationen im humanen Ortholog *ACSL4* (acetyl-CoA synthase long chain family member 4) verursachen eine nicht-syndromale X-chromosomale mentale Retardierung (Meloni, 2002; Longo, 2003).

Die axonalen Phänotypen der *RSK*-Nullmutante unterscheiden sich in mehreren Aspekten von den beschriebenen Phänotypen. Die BRP- bzw. CSP-Aggregate waren im proximalen Bereich der Axone, nahe dem Ventralganglion zu finden; es konnten jedoch keine Axonschwellungen beobachtet werden. Zusammen mit den Beobachtungen, dass sich mehr Mitochondrien in stationären Phasen befinden und weniger in anterograder Richtung transportiert werden, könnte *RSK* eine Funktion in der Regulation der Interaktionen innerhalb des Motorkomplexes aus Motorproteinen, Adapter- und Gerüstproteinen und Cargo übernehmen.

Die Spezifität des Transports von Cargos in anterograder Richtung wird durch individuelle Kinesine und Cargo-spezifische Adapterproteine bestimmt (Hirokawa, 2010; Maday, 2014). In *Drosophila* interagiert die katalytische Untereinheit von Kinesin-1, KHC (kinesin heavy chain) mit Mitochondrien über das Adapterprotein Milton. Milton wiederum bindet an die Cargo-Bindedomäne des Kinesins über dem Rezeptor Miro, der mit der mitochondrialen Außenmembran interagiert. Die Interaktionen von Motor- und Adapterproteinen bieten effektive Möglichkeiten zur Regulation des Transports (Stowers, 2002). Miro dient als Ca^{2+} -Sensor in der Regulation der Bewegung der Mitochondrien. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen bindet das Mitochondrium über den Motor-Adapter-Komplex an Kinesin. Das Mitochondrium wird entlang des Axons bewegt, bis Miro erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen detektiert. Daraufhin wird die Konformation von Miro verändert, wodurch der Motorkomplex inaktiviert und das Mitochondrium freigesetzt wird (MacAskill, 2009; Guo, 2005; Chen and Sheng, 2013). In *RSK*-Nullmutanten ist der Transport von Mitochondrien in anterograder Richtung beeinträchtigt. Miro reguliert den anterograden Transport von Mitochondrien und ihre exakte Lokalisierung an den Synapsen. *RSK* könnte den Transport von Mitochondrien in anterograder Richtung über die Regulation von Miro beeinflussen.

Für den Transport von Proteinen der synaptischen Vesikel wie Synaptotagmin stellt Unc-76 eine Verbindung zwischen Cargo und Motorprotein dar (Gindhart, 2003). Die Interaktion zwischen Cargo und Motorprotein wird zudem phosphorylierungsabhängig reguliert, wie die von Unc-51-abhängige Interaktion von Unc-76 mit Synaptotagmin zeigt. Der Verlust von Unc-

51 oder Unc-76 verursacht Akkumulationen synaptischer Vesikel im Axon (Toda, 2008). Da RSK wie Unc-51 ein Negativregulator des ERK/MAPK-Signalwegs ist, könnte RSK auch einen Einfluss auf die phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen Cargo und Motorprotein haben und dadurch den Transport von Proteinen synaptischer Vesikel regulieren. Wairkar *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die negative Regulation der Aktivität von ERK für den axonalen Transport nicht von Bedeutung ist (Wairkar, 2009). Die durch das Fehlen von RSK verursachten Defekte im axonalen Transport sind demnach nicht der Funktion von RSK als Negativregulator des ERK/MAPK-Signalwegs zuzuschreiben.

Die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) stellt einen weiteren Regulator des anterograden Transports dar. GSK3 interagiert mit dem Kinesin-Motorkomplex und inhibiert durch Phosphorylierung KLC (kinesin light chain), wodurch die membrangebundenen Organellen (MBO) vom Motorkomplex dissoziieren. An den Stellen, an denen die Organellen vom Motorkomplex dissoziieren, ist die Aktivität von GSK3 erhöht. Durch die Phosphorylierung von KLC inhibiert GSK3 den schnellen axonalen Transport in einer Cargo-unabhängigen Weise (Morfini, 2002). In Neuronen des Hippocampus konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der GSK3-Aktivität den Transport von Mitochondrien in anterograder Richtung stimuliert. In Neuronen des Hippocampus von Ratten konnte gezeigt werden, dass GSK3 durch Phosphorylierung von KLC2 die Aktivität von Kinesin-1 blockiert und Langzeit-Depression (LTD) inhibiert (Morfini, 2002; Chen, 2007). Aufgrund genetischer Untersuchungen in *Drosophila* kann angenommen werden, dass GSK3 die Aktivität der Motorproteine beeinflusst, nicht aber die Interaktion von Cargo und Motorkomplex (Weaver, 2013). Weiter konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität von GSK3 den anterograden Transport von Mitochondrien reduziert und das Verweilen in stationären Phasen begünstigt (Morel, 2010). Über *in vitro* Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass RSK2 die Aktivität von GSK3 in verschiedenen zellulären Prozessen durch Phosphorylierung inhibiert (Sutherland, 1993; Romeo, 2012). Wenn RSK durch Phosphorylierung die Aktivität von GSK3 inhibiert, wird die Aktivität von Kinesin-1 begünstigt. Die beobachteten Defekte im anterograden Transport der Mitochondrien in der RSK-Nullmutante könnten demnach durch die fehlende Regulation der GSK3-Aktivität verursacht werden.

Bislang ist keine direkte oder indirekte Funktion von RSK in der Phosphorylierung der Komponenten des Motorkomplexes bekannt. Um die Funktion von RSK in der von GSK-3 vermittelten Regulation des anterograden Transports aufzuklären, sind weitere Untersuchungen zum Einfluss von RSK auf die Aktivität von GSK3 nötig. Experimente zur Kollokalisierung von

RSK und GSK3 in den verschiedenen Subkompartimenten der Motoneurone könnten genaueren Einblick in die Regulation des anterograden Transports von Mitochondrien geben.

Da in *RSK*-Mutanten ein allgemeiner Defekt im anterograden Transport verschiedener Cargos zu beobachten ist, könnte RSK allgemeine Mechanismen zur Regulation des schnellen axonalen Transports beeinflussen und nicht spezifische Komponenten der verschiedenen Motorkomplexe regulieren. Somit könnte RSK Auswirkungen auf das Mikrotubuli-Cytoskelett haben, da die Mikrotubuli als Schienen für den Transport aller Organellen im Axon dienen.

Entlang der Mikrotubuli sind MAPs (microtubule-associated proteins) gebunden, die die Polymerisierung und Stabilisierung der Mikrotubuli begünstigen und eine Rolle in der Regulation des axonalen Transports spielen, indem sie die Interaktion der Motorproteine mit den Mikrotubuli modulieren (Dixit, 2008). Durch die Phosphorylierung und Inhibition von GSK3 wird die Phosphorylierung der MAPs, wie beispielsweise Futsch, das homolog zu humanem MAP1B ist, modifiziert und somit die Stabilität und Organisation der Mikrotubuli verändert (Roos, 2000; Gögel, 2006). RSK könnte durch die Inhibition von GSK3 Auswirkungen auf die Stabilität und Organisation der Mikrotubuli haben und dadurch den axonalen Transport verschiedener Organelle beeinflussen.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass RSK nicht nur die Aktivität von ERK reguliert, sondern auch die Lokalisierung von aktivem ERK beeinflusst. In weiterführenden Untersuchungen könnte der Einfluss von RSK auf die Lokalisierung von FasII analysiert werden, um festzustellen, ob die ERK-abhängige FasII-vermittelte Zelladhäsion von RSK reguliert wird. Da das Zusammenspiel von ERK und RSK komplex zu sein scheint, könnten Untersuchungen des Transcriptoms von *RSK*-Mutanten auch Aufschluss über die regulatorische Funktion von RSK im ERK/MAPK-Signalweg geben.

Bislang ist eine Funktion von RSK als Inhibitor von GSK3 nur aus *in-vitro* Versuchen bekannt. Die Interaktion von RSK und GSK3 sollte in Motoneuronen untersucht werden, um herauszufinden, ob RSK durch Phosphorylierung von GSK3 den anterograden Transport beeinflusst. Um die Auswirkungen des Verlustes von RSK im axonalen Transport genauer zu bestimmen, sollte auch der Einfluss von RSK auf die Komponenten der Motorkomplexe wie beispielsweise Miro und Milton untersucht werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt sind die Defekte im klassischen olfaktorischen Lernen gemeinsam mit dem Einfluss von RSK auf die synaptische Plastizität und Transmission (Putz, 2004). Immunhistochemische Untersuchungen der Pilzkörper könnten Aufschluss darüber geben, ob RSK in den Mikroglomeruli, den synaptischen Verknüpfungen der Kalyx der Pilzkörper, prä- oder postsynaptisch lokalisiert ist. Zudem könnten Untersuchungen der Volumina der Mikroglomeruli den Einfluss von RSK auf die synaptische Plastizität verifizieren.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Funktion von RSK in Motoneuronen von *Drosophila* untersucht werden. Mutationen im *RSK2*-Gen verursachen das Coffin-Lowry-Syndrom (CLS), das durch mentale Retardierung charakterisiert ist. RSK2 ist hauptsächlich in Regionen des Gehirns exprimiert, in denen Lernen und Gedächtnisbildung stattfinden. In Mäusen und *Drosophila*, die als Modellorganismen für CLS dienen, konnten auf makroskopischer Ebene keine Veränderungen in den Hirnstrukturen gefunden werden, dennoch wurden in verschiedenen Verhaltensstudien Defekte im Lernen und der Gedächtnisbildung beobachtet.

Die synaptische Plastizität und die einhergehenden Veränderungen in den Eigenschaften der Synapse sind fundamental für adaptives Verhalten. Zur Analyse der synaptischen Plastizität eignet sich das neuromuskuläre System von *Drosophila* als Modell wegen des stereotypen Innervierungsmusters und der Verwendung ionotroper Glutamatrezeptoren, deren Untereinheiten homolog sind zu den Untereinheiten der Glutamatrezeptoren des AMPA-Typs aus Säugern, die wesentlich für die Bildung von LTP im Hippocampus sind.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass RSK in den Motoneuronen von *Drosophila* an der präsynaptischen Seite lokalisiert ist, wodurch RSK eine Synapsen-spezifische Funktion ausüben könnte. Morphologische Untersuchungen der Struktur der neuromuskulären Synapsen konnten aufzeigen, dass durch den Verlust von RSK die Größe der neuromuskulären Synapse, der Boutons sowie der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder, reduziert ist. Obwohl mehr Boutons gebildet werden, sind weniger Aktive Zonen und Glutamatrezeptorfelder in der neuromuskulären Synapse enthalten. RSK reguliert die synaptische Transmission, indem es die postsynaptische Sensitivität, nicht aber die Freisetzung der Neurotransmitter an der präsynaptischen Seite beeinflusst, obwohl in immunhistochemischen Analysen eine postsynaptische Lokalisierung von RSK nicht nachgewiesen werden konnte. RSK ist demnach an der Regulation der synaptischen Plastizität glutamaterger Synapsen beteiligt.

Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass aktiviertes ERK an der präsynaptischen Seite lokalisiert ist und diese synaptische Lokalisierung von RSK reguliert wird. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass durch den Verlust von RSK hyperaktiviertes ERK in den Zellkörpern der Motoneurone vorliegt. RSK wird durch den ERK/MAPK-Signalweg aktiviert und übernimmt eine Funktion sowohl als Effektor kinase als auch in der Negativregulation des Signalwegs. Demnach dient RSK in den

Zellkörpern der Motoneurone als Negativregulator des ERK/MAPK-Signalwegs. Darüber hinaus könnte RSK die Verteilung von aktivem ERK in den Subkompartimenten der Motoneurone regulieren.

Da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass ERK an der Regulation der synaptischen Plastizität beteiligt ist, indem es die Insertion der AMPA-Rezeptoren zur Bildung der LTP reguliert, sollte in dieser Arbeit aufgeklärt werden, ob der Einfluss von RSK auf die synaptische Plastizität durch seine Funktion als Negativregulator von ERK zustande kommt. Untersuchungen der genetischen Interaktion von *rsk* und *rolled*, dem Homolog von ERK in *Drosophila*, zeigten, dass die durch den Verlust von RSK beobachtete reduzierte Gesamtzahl der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder der neuromuskulären Synapse auf die Funktion von RSK als Negativregulator von ERK zurückzuführen ist. Die Größe der neuromuskulären Synapse sowie die Größe der Aktiven Zonen und Glutamatrezeptorfelder beeinflusst RSK allerdings durch seine Funktion als Effektor kinase des ERK/MAPK-Signalwegs.

Studien des axonalen Transports von Mitochondrien zeigten, dass dieser in vielen neuropathologischen Erkrankungen beeinträchtigt ist. Die durchgeführten Untersuchungen des axonalen Transports in Motoneuronen konnten eine neue Funktion von RSK in der Regulation des axonalen Transports aufdecken. In den Axonen der Motoneurone von *RSK*-Nullmutanten wurden BRP- und CSP-Agglomerate nachgewiesen. RSK könnte an der Regulation des axonalen Transports von präsynaptischem Material beteiligt sein. Durch den Verlust von RSK wurden weniger Mitochondrien in anterograder Richtung entlang dem Axon transportiert und mehr Mitochondrien befanden sich in einer stationären Phase. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch der anterograde Transport von Mitochondrien durch den Verlust von RSK beeinträchtigt ist.

6. Summary

In this thesis the function RSK in motoneurons of *Drosophila* has been analyzed. Mutations in the *RSK2*-gene cause the Coffin-Lowry-Syndrome (CLS) which is characterized by mental retardation. RSK2 is predominantly expressed in regions of the brain where learning and formation of the memory take place. Even no obvious changes in brain structures could be observed at macroscopic level in mouse and *Drosophila* which serve as an animal model for CLS. However deficits in various learning tasks could be observed due to the loss of the RSK-function.

Synaptic plasticity and the following changes in synaptic properties are fundamental for adaptive behaviors. The neuromuscular system of *Drosophila* suits as a model for studies of the synaptic plasticity because of the stereotypic innervation pattern and the use of ionotropic glutamate receptors which subunits are homologous to the subunits of the mammalian AMPA-type of glutamate receptors which are essential for the formation of LTP in the hippocampus.

This study shows that RSK is located at the presynaptic site of the motoneurons of *Drosophila* which indicates a synapse-specific function of RSK. The structural analysis of the neuromuscular junction (NMJ) show that the loss of RSK causes a reduction in size of the NMJ, boutons, active zones and glutamate receptor fields. More boutons were found at the NMJ, but less active zones and glutamate receptor fields were established. The localization of RSK at the postsynaptic side could not be detected in this study although RSK regulates the synaptic transmission by affecting the postsynaptic sensitivity but not the presynaptic neurotransmitter release. Hence RSK could take part in the regulation of synaptic plasticity.

Immunohistochemical analysis could depict a novel function of RSK in the synapse-specific localization of ERK. Further this study show that due to the loss of RSK more activated ERK is located in den cell bodies of the motoneurons. RSK functions as a negative regulator of the ERK/MAPK signaling in the somata of motoneurons. Additionally, RSK could regulate the distribution of ERK in the different subcompartments of the motoneurons.

Previous studies show ERK as a regulator of synaptic plasticity by influencing the insertion of AMPA receptors into the postsynaptic membrane during LTP. RSK is activated by the ERK/MAPK signaling and functions not only as an effector kinase but also as a negative regulator of this pathway. If the effect of RSK on synaptic plasticity is due to its function as a negative regulator of ERK should be clarified in this work.

Analysis of the genetic interactions of *rsk* and *rolled*, the *Drosophila* homologue of mammalian ERK, show that the reduced number of active zones and glutamate receptor fields found at the NMJ of *RSK* null mutants is caused by the function of RSK as a negative regulator of ERK. In turn RSK affects the size of the NMJ, also the size of the active zones and glutamate receptor fields by its function as an effector kinase of the ERK/MAPK signaling.

Several studies have shown that the axonal transport of mitochondria is affected in many neuropathological diseases. This work could uncover a novel function of RSK in the regulation of the axonal transport in motoneurons. The loss of RSK causes the formation of agglomerates of the presynaptic proteins BRP and CSP. Therefore RSK takes part in the regulation of the transport of presynaptic material. In absence of RSK less mitochondria are transported in anterograde direction and more mitochondria are pausing. This results implicate a function of RSK in regulating the anterograde transport of mitochondria.

7. Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Thomas Raabe sehr für die Übernahme des Erstgutachtens und der Möglichkeit, meine Doktorarbeit an diesem spannenden Projekt in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich bedanke mich auch ganz besonders für die offene und herzliche Art, mit der er mich mit seinem fachlichen und methodischen Wissen beim Erstellen dieser Arbeit und der Publikation unterstützt hat. Auch für die Geduld, die er aufbrachte, mir zu erklären, warum meine erdachten Experimente in der Form nicht zu realisieren sind, bin ich sehr dankbar. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an einer internationalen Konferenz.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Prof. Dr. Charlotte Förster für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Dr. Robert Kittel und Dr. Nadine Ehmann für die tolle Kollaboration und die fruchtbaren Diskussionen meiner Ergebnisse, die mir sehr geholfen haben, die komplexen Zusammenhänge zu verstehen. Ein ganz großes Dankeschön gilt Nadine, die immer bereit war, weitere Larven für mich zu analysieren. Auch danke ich Dmitrij Ljaschenko für die Hilfe bei der Analyse der neuromuskulären Synapsen und für die Bereitstellung von ImageJ-Macros, welche die Analyse sehr viel angenehmer machten.

Dr. Till Andlauer danke ich für seine permanente gute Laune und die ausdauernde Bereitschaft, mir Methoden zu zeigen und mir bei der Lösung aufgetretener Probleme zu helfen. Ganz speziell danke ich ihm für die Einweisung in das „Live-imaging“ intakter Larven und die Bereitstellung von Matlab-Scripten, die für die Analyse des axonalen Transports unabdingbar waren.

Ich danke Prof. Dr. Erich Buchner herzlich für die angenehme Art, meine Ergebnisse mit mir zu diskutieren und für die vielen Antikörper und Fliegenlinien, die ich von ihm bekommen habe.

Für ihre aufmunternde Fröhlichkeit danke ich Dr. Beatrice Blanco, in der ich eine gute Freundin gefunden habe.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Anna Hovhanyan, mit der mich mittlerweile eine innige Freundschaft verbindet. Nicht nur die tollen wissenschaftlichen Unterhaltungen, sondern auch die Gespräche über den Sinn und Unsinn des Lebens haben mir viel Freude bereitet. Am

meisten danke ich ihr, dass ich mit jedem Problem zu ihr kommen konnte und sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, besonders in ganz schweren Zeiten.

Ich danke natürlich auch allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Raabe, Dr. Stefanie Pütz, Dr. Benjamin Mentzel, Dr. Juliane Melzer, Dr. Felix Stark, Viera Albertova und Heike Wecklein, für ihre Unterstützung und Hilfe bei all den kleinen und großen Dingen des Laboralltags. Sie haben eine angenehme Arbeitsatmosphäre geschaffen, in der es viel zu lachen gab. Ein ganz besonderer Dank geht an Gunther Tietsch für das Basteln der Imaging-Kammern und seine stete Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden für das Verständnis und die Unterstützung, die sie während der Zeit der Doktorarbeit für mich aufbrachten. Besonders wenn ich zu spät zu Verabredungen kam, weil ich mal wieder zu lang im Labor war.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie. Meinen Eltern, besonders meinem Vater, der mich Zeit seines Lebens bei allen Vorhaben tatkräftig unterstützt und dabei immer an mich geglaubt hat. Markus, Iris und natürlich auch Vincent und Joschua danke ich dafür, dass sie mir stets zur Seite stehen, viel Verständnis für mich haben und mich immer zum Lachen bringen.

8. Publikationen

Publikationen

Beck, K., et al. (2015). "Loss of the Coffin-Lowry syndrome-associated gene RSK2 alters ERK activity, synaptic function and axonal transport in *Drosophila* motoneurons." *Dis Model Mech* 8(11): 1389-1400.

Voolstra, O., et al. (2010). "Light-dependent phosphorylation of the *Drosophila* transient receptor potential ion channel." *J Biol Chem* 285(19): 14275-14284.

Posterpräsentation

Beck, K., Ljaschenko, D., Kittel, R., Raabe, T. (2013) The Role of RSK as a Regulator of the ERK/MAPK Signaling in Motoneurons. *23rd European Drosophila Research Conference, Barcelona, Spain*

9. Abkürzungen

AGC	protein kinase A, C und G
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
Aplip1	APP-like protein interacting protein 1
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BRP	Bruchpilot
CAMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinases
cAMP	cyclic adenosine-monophosphate
CAP-Gly	cytoskeleton-associated protein-Glycin-rich domain
CAST	cytomatrix-associated scaffold protein
CAZ	Cytomatrix der Aktiven Zonen CAZ
Cdk	cyclin-dependent kinase
CLS	Coffin-Lowry-Syndrom
Cora	Coracle
CREB	cAMP-response-element-binding protein
CSP	Cysteine string protein
CTKD	C-terminale Kinasedomäne
DCV	Vesikel mit dichtem Kern
DENN/MAD	differentially expressed in normal and neoplastic cells/MAP kinase activating death domain
DHC	Dynein heavy chain
DLG	Disc large
DNA	Desoxyribonucleic acid
DrDL2	Dopaminrezeptor
eEPSC	evozierte exzitatorische postsynaptische Ströme
EPSC	exzitatorischen postsynaptischen Ströme
ELK-1/SRF	ETS (E twenty-six)-like kinase-1/ Serum-response factor
ELKS/CAST	ELKS-rich protein/cytomatrix-associated scaffold protein
EPSC	postsynaptischen Ströme
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FasII	FascilinII
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GDP	Guanosin-Diphosphat

GFP	green fluorescence protein
GluR	Glutamatrezeptor
GSK	Glykogen-Synthase-Kinase
GTP	Guanosin-Triphosphat
H3	Histon H3
HRP	horseradish peroxidase
iGluR	ionotrope Glutamatrezeptoren
Imac	immaculate connections
ISN	Intersegmentalnerven
JIP	JNK-interacting protein
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KHC	schweren Ketten des Kinesins
KIF	kinesin-like protein
KLC	kinesin light chain
Lis1	lissencephaly-1
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
MAGUK	membrane-associated guanylate kinase
MAP	microtubule-associated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK	MAPK-activated protein kinases
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MBO	membrangebundenen Organellen
Mef	myocyte enhancer factor
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSK	mitogen and stress-activated protein kinases
Myt	membrane-associated inhibitor kinase-1
Ndel	nudel
NTKD	N-terminale Kinasedomäne
Pct-1	Pctaire-kinase-1
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase 1
pERK	phosphoryliertes ERK
PFA	Prarformaldehyd
PI3K	phosphoinositide-3-kinase
PKC	protein kinase C
PSD	postsynaptische Verdichtung

PTV	Piccolo-Bassoon transport vesicles
Rab	Ras-related in brain
RBP	RIM binding protein
RIM	Rab3 (Ras-related in brain3)-interacting molecule
rl	rolled
rpS6	ribosomale Protein S6
RSK	p90-ribosomale S6 Kinase II
S6KII	p90-ribosomale S6 Kinase II
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel
SN	Segmentalnerv
SNAP	synaptosomal-associated protein
SRPK79D	Serine/arginine protein kinase 79D
SSR	Subsynaptischen Retikulum SSR
SV	Synaptische Vesikel
SVP	Synaptische Vesikel-Vorläufer
SYT	Synaptotagmin
TEVC	Zwei Elektroden Voltage Clamp
TIF	Transkription-Initiationsfaktor
TN	Transversalnerven
TRAK	Trafficking kinesin protein
Unc	uncoordinated
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Literaturverzeichnis

- Aberle, H., et al. (2002). "wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*." *Neuron* 33(4): 545-558.
- Akten, B., et al. (2009). "Ribosomal s6 kinase cooperates with casein kinase 2 to modulate the *Drosophila* circadian molecular oscillator." *J Neurosci* 29(2): 466-475.
- Alcorta, D. A., et al. (1989). "Sequence and expression of chicken and mouse rsk: homologs of *Xenopus laevis* ribosomal S6 kinase." *Mol Cell Biol* 9(9): 3850-3859.
- Alonso, M., et al. (2004). "Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development." *J Neurochem* 89(1): 248-256.
- Andlauer, T. F. and S. J. Sigrist (2012a). "Quantitative analysis of *Drosophila* larval neuromuscular junction morphology." *Cold Spring Harb Protoc* 2012(4): 490-493.
- Andlauer, T. F. and S. J. Sigrist (2012b). "In vivo imaging of the *Drosophila* larval neuromuscular junction." *Cold Spring Harb Protoc* 2012(4): 481-489.
- Andlauer, T. F. and S. J. Sigrist (2012c). "Building an imaging chamber for in vivo imaging of *Drosophila* larvae." *Cold Spring Harb Protoc* 2012(4): 476-480.
- Anjum, R. and J. Blenis (2008). "The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(10): 747-758.
- Ashley, J., et al. (2005). "Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint." *J Neurosci* 25(25): 5943-5955.
- Ataman, B., et al. (2006). "Scaffolding proteins at the *Drosophila* neuromuscular junction." *Int Rev Neurobiol* 75: 181-216.
- Atwood, H. L., et al. (1993). "Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae." *J Neurobiol* 24(8): 1008-1024.
- Bate, M. and K. Broadie (1995). "Wiring by fly: the neuromuscular system of the *Drosophila* embryo." *Neuron* 15(3): 513-525.
- Bateman, J. R., et al. (2006). "Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange." *Genetics* 173(2): 769-777.
- Bellen, H. J., et al. (2010). "100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future." *Nat Rev Neurosci* 11(7): 514-522.
- Betz, H., et al. (1993). "Molecular biology of ionotropic glutamate receptors in *Drosophila melanogaster*." *Trends Pharmacol Sci* 14(12): 428-431.
- Biggs, W. H., 3rd, et al. (1994). "The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway." *EMBO J* 13(7): 1628-1635.
- Blenis, J. (1991). "Growth-regulated signal transduction by the MAP kinases and RSKs." *Cancer Cells* 3(11): 445-449.

- Blenis, J., et al. (1991). "Distinct mechanisms for the activation of the RSK kinases/MAP2 kinase/pp90rsk and pp70-S6 kinase signaling systems are indicated by inhibition of protein synthesis." *Cell Growth Differ* 2(6): 279-285.
- Boggio, E. M., et al. (2007). "Visual stimulation activates ERK in synaptic and somatic compartments of rat cortical neurons with parallel kinetics." *PLoS ONE* 2(7): e604.
- Bonferroni E. C. (1936): *Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità*, Pubblicazioni del R. Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze, 8 pp. 3-62.
- Bonni, A., et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science* 286(5443): 1358-1362.
- Bossing, T., et al. (1996). "The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm." *Dev Biol* 179(1): 41-64.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* 118(2): 401-415.
- Brent, J. R., et al. (2009). "Drosophila larval NMJ dissection." *J Vis Exp*(24).
- Broadie, K. and M. Bate (1993a). "Activity-dependent development of the neuromuscular synapse during *Drosophila* embryogenesis." *Neuron* 11(4): 607-619.
- Broadie, K. and M. Bate (1993b). "Muscle development is independent of innervation during *Drosophila* embryogenesis." *Development* 119(2): 533-543.
- Bruckner, J. J., et al. (2012). "Fife, a *Drosophila* Piccolo-RIM homolog, promotes active zone organization and neurotransmitter release." *J Neurosci* 32(48): 17048-17058.
- Brunet, A., et al. (1999). "Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry." *EMBO J* 18(3): 664-674.
- Brunner, D., et al. (1994). "A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways." *Cell* 76(5): 875-888.
- Budnik, V., et al. (2006). "Selected methods for the anatomical study of *Drosophila* embryonic and larval neuromuscular junctions." *Int Rev Neurobiol* 75: 323-365.
- Budnik, V., et al. (1990). "Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability." *J Neurosci* 10(11): 3754-3768.
- Burton, P. R. and J. L. Paige (1981). "Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(5): 3269-3273.
- Cantera, R. and D. R. Nassel (1992). "Segmental peptidergic innervation of abdominal targets in larval and adult dipteran insects revealed with an antiserum against leucokinin I." *Cell Tissue Res* 269(3): 459-471.
- Chapman, E. R., et al. (1995). "Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1." *J Biol Chem* 270(40): 23667-23671.

- Chen, K. and D. E. Featherstone (2005). "Discs-large (DLG) is clustered by presynaptic innervation and regulates postsynaptic glutamate receptor subunit composition in *Drosophila*." *BMC Biol* 3: 1.
- Chen, P., et al. (2007). "Glycogen synthase kinase 3 regulates N-methyl-D-aspartate receptor channel trafficking and function in cortical neurons." *Mol Pharmacol* 72(1): 40-51.
- Chen, R. H., et al. (1992). "Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases." *Mol Cell Biol* 12(3): 915-927.
- Chen, Y. and Z. H. Sheng (2013). "Kinesin-1-syntrophin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport." *J Cell Biol* 202(2): 351-364.
- Chen, Y. A., et al. (1999). "SNARE complex formation is triggered by Ca²⁺ and drives membrane fusion." *Cell* 97(2): 165-174.
- Cheng, A. M., et al. (2005). "Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis." *Nucleic Acids Res* 33(4): 1290-1297.
- Coffin GS, Siris E, Wegienka LC (1966) Mental retardation with osteocartilaginous anomalies. *Am J Dis Child* 112: 205-213
- Collingridge, G. L., et al. (1983). "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus." *J Physiol* 334: 33-46.
- Collins, C. A. and A. DiAntonio (2007). "Synaptic development: insights from *Drosophila*." *Curr Opin Neurobiol* 17(1): 35-42.
- Couteaux, R. and M. Pecot-Dechavassine (1970). "[Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction]." *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 271(25): 2346-2349.
- Dalby, K. N., et al. (1998). "Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK." *J Biol Chem* 273(3): 1496-1505.
- Davis, S. and S. Laroche (2006). "Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review." *Genes Brain Behav* 5 Suppl 2: 61-72.
- De Cesare, D., et al. (1998). "Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21): 12202-12207.
- De Vos, K. J., et al. (2008). "Role of axonal transport in neurodegenerative diseases." *Annu Rev Neurosci* 31: 151-173.
- Deak, M., et al. (1998). "Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB." *EMBO J* 17(15): 4426-4441.
- Delaunoy, J., et al. (2001). "Mutations in the X-linked RSK2 gene (RPS6KA3) in patients with Coffin-Lowry syndrome." *Hum Mutat* 17(2): 103-116.
- DiAntonio, A., et al. (1999). "Glutamate receptor expression regulates quantal size and quantal content at the *Drosophila* neuromuscular junction." *J Neurosci* 19(8): 3023-3032.

- Dixit, R., et al. (2008). "Regulation of dynactin through the differential expression of p150Glued isoforms." *J Biol Chem* 283(48): 33611-33619.
- Dresbach, T., et al. (2001). "The presynaptic cytomatrix of brain synapses." *Cell Mol Life Sci* 58(1): 94-116.
- Dufresne, S. D., et al. (2001). "Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice." *Mol Cell Biol* 21(1): 81-87.
- Dummler, B. A., et al. (2005). "Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types." *J Biol Chem* 280(14): 13304-13314.
- Duncan, J. E. and L. S. Goldstein (2006). "The genetics of axonal transport and axonal transport disorders." *PLoS Genet* 2(9): e124.
- Erikson, E. and J. L. Maller (1985). "A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(3): 742-746.
- Featherstone, D. E., et al. (2005). "An essential *Drosophila* glutamate receptor subunit that functions in both central neuropil and neuromuscular junction." *J Neurosci* 25(12): 3199-3208.
- Fenster, S. D., et al. (2000). "Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon." *Neuron* 25(1): 203-214.
- Fernandes, J. J. and H. Keshishian (1996). "Patterning the dorsal longitudinal flight muscles (DLM) of *Drosophila*: insights from the ablation of larval scaffolds." *Development* 122(12): 3755-3763.
- Fiore, R. S., et al. (1993). "p42 mitogen-activated protein kinase in brain: prominent localization in neuronal cell bodies and dendrites." *Neuroscience* 55(2): 463-472.
- Fischer, M., et al. (2009a). "P90 Ribosomal s6 kinase 2 negatively regulates axon growth in motoneurons." *Mol Cell Neurosci* 42(2): 134-141.
- Fischer, M., et al. (2009b). "*Drosophila* RSK negatively regulates bouton number at the neuromuscular junction." *Dev Neurobiol* 69(4): 212-220.
- Fleming, J. J. and P. M. England (2010). "AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective." *Nat Chem Biol* 6(2): 89-97.
- Frodin, M. and S. Gammeltoft (1999). "Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction." *Mol Cell Endocrinol* 151(1-2): 65-77.
- Frodin, M., et al. (2000). "A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1." *EMBO J* 19(12): 2924-2934.
- Fu, M. M. and E. L. Holzbaur (2013). "JIP1 regulates the directionality of APP axonal transport by coordinating kinesin and dynein motors." *J Cell Biol* 202(3): 495-508.
- Fu, M. M. and E. L. Holzbaur (2014). "Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins." *Trends Cell Biol* 24(10): 564-574.

- Fujita, N., et al. (2003). "Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization." *J Biol Chem* 278(49): 49254-49260.
- Garner, C. C., et al. (2000). "PDZ domains in synapse assembly and signalling." *Trends Cell Biol* 10(7): 274-280.
- Gauthier, L. R., et al. (2004). "Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules." *Cell* 118(1): 127-138.
- Giachello, C. N., et al. (2010). "MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity." *J Cell Sci* 123(Pt 6): 881-893.
- Gindhart, J. G., et al. (2003). "The kinesin-associated protein UNC-76 is required for axonal transport in the *Drosophila* nervous system." *Mol Biol Cell* 14(8): 3356-3365.
- Gogel, S., et al. (2006). "The *Drosophila* microtubule associated protein Futsch is phosphorylated by Shaggy/Zeste-white 3 at an homologous GSK3beta phosphorylation site in MAP1B." *Mol Cell Neurosci* 33(2): 188-199.
- Goldstein, A. Y., et al. (2008). "Axonal transport and the delivery of pre-synaptic components." *Curr Opin Neurobiol* 18(5): 495-503.
- Goldstein, L. S. (2003). "Do disorders of movement cause movement disorders and dementia?" *Neuron* 40(2): 415-425.
- Goodwin, P. R., et al. (2012). "Cyclin-dependent kinase 5 regulates the polarized trafficking of neuropeptide-containing dense-core vesicles in *Caenorhabditis elegans* motor neurons." *J Neurosci* 32(24): 8158-8172.
- Greeve, I., et al. (2004). "Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*." *J Neurosci* 24(16): 3899-3906.
- Griffin, J. W., et al. (1976). "Axonal transport to and from the motor nerve ending." *Ann N Y Acad Sci* 274: 31-45.
- Griffith, L. C. and V. Budnik (2006). "Plasticity and second messengers during synapse development." *Int Rev Neurobiol* 75: 237-265.
- Groc, L. and D. Choquet (2006). "AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse." *Cell Tissue Res* 326(2): 423-438.
- Grove, J. R., et al. (1993). "Regulation of an epitope-tagged recombinant Rsk-1 S6 kinase by phorbol ester and erk/MAP kinase." *Biochemistry* 32(30): 7727-7738.
- Guan, B., et al. (1996). "The *Drosophila* tumor suppressor gene, *dlg*, is involved in structural plasticity at a glutamatergic synapse." *Curr Biol* 6(6): 695-706.
- Guo, X., et al. (2005). "The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses." *Neuron* 47(3): 379-393.
- Hall, D. H. and E. M. Hedgecock (1991). "Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*." *Cell* 65(5): 837-847.

- Hallermann, S., et al. (2010). "Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse." *Neuron* 68(4): 710-723.
- Hallermann, S., et al. (2010). "Mechanisms of short-term plasticity at neuromuscular active zones of *Drosophila*." *HFSP J* 4(2): 72-84.
- Hanauer, A. and I. D. Young (2002). "Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features." *J Med Genet* 39(10): 705-713.
- Hans, A., et al. (2004). "Persistent, noncytolytic infection of neurons by Borna disease virus interferes with ERK 1/2 signaling and abrogates BDNF-induced synaptogenesis." *FASEB J* 18(7): 863-865.
- Heffron, D. and J. W. Mandell (2005). "Differential localization of MAPK-activated protein kinases RSK1 and MSK1 in mouse brain." *Brain Res Mol Brain Res* 136(1-2): 134-141.
- Hendricks, A. G., et al. (2010). "Motor coordination via a tug-of-war mechanism drives bidirectional vesicle transport." *Curr Biol* 20(8): 697-702.
- Herzog, E., et al. (2011). "In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice." *J Neurosci* 31(43): 15544-15559.
- Hibino, H., et al. (2002). "RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels." *Neuron* 34(3): 411-423.
- Hirokawa, N., et al. (2010). "Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease." *Neuron* 68(4): 610-638.
- Hirokawa, N., et al. (1991). "Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo." *J Cell Biol* 114(2): 295-302.
- Hirokawa, N., et al. (1990). "Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo." *J Cell Biol* 111(3): 1027-1037.
- Hoang, B. and A. Chiba (2001). "Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses." *Dev Biol* 229(1): 55-70.
- Huang, C. F. and G. Banker (2012). "The translocation selectivity of the kinesins that mediate neuronal organelle transport." *Traffic* 13(4): 549-564.
- Huang, Z., et al. (2001). "Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway is required for extracellular calcium stimulation of human osteoblast proliferation." *J Biol Chem* 276(24): 21351-21358.
- Jacquot, S., et al. (1998). "Germline mosaicism in Coffin-Lowry syndrome." *Eur J Hum Genet* 6(6): 578-582.
- Jan, L. Y. and Y. N. Jan (1976). "Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*." *J Physiol* 262(1): 189-214.
- Jan, Y. N. and L. Y. Jan (1978). "Genetic dissection of short-term and long-term facilitation at the *Drosophila* neuromuscular junction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1): 515-519.
- Jensen, C. J., et al. (1999). "90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1." *J Biol Chem* 274(38): 27168-27176.

- Johansen, J., et al. (1989). "Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae." *J Neurosci* 9(2): 710-725.
- Johnson, E. L., 3rd, et al. (2009). "Negative regulation of active zone assembly by a newly identified SR protein kinase." *PLoS Biol* 7(9): e1000193.
- Jones, S. W., et al. (1988). "A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(10): 3377-3381.
- Kandel, E. R. and J. H. Schwartz (1982). "Molecular biology of learning: modulation of transmitter release." *Science* 218(4571): 433-443.
- Karki, S. and E. L. Holzbaur (1995). "Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex." *J Biol Chem* 270(48): 28806-28811.
- Karunanithi, S., et al. (2002). "Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses." *J Neurosci* 22(23): 10267-10276.
- Katz, B. and R. Miledi (1967). "A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses." *J Physiol* 192(2): 407-436.
- Kawasaki, F., et al. (2004). "Active zone localization of presynaptic calcium channels encoded by the cacophony locus of *Drosophila*." *J Neurosci* 24(1): 282-285.
- Keshishian, H., et al. (1993). "Cellular mechanisms governing synaptic development in *Drosophila melanogaster*." *J Neurobiol* 24(6): 757-787.
- Kim, E. and M. Sheng (2004). "PDZ domain proteins of synapses." *Nat Rev Neurosci* 5(10): 771-781.
- Kim, M., et al. (2006). "Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development." *EMBO J* 25(13): 3056-3067.
- Kim, Y. H., et al. (2010). "Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF-kappaB-mediated signals in activated microglia." *Int Immunopharmacol* 10(12): 1560-1572.
- Kim, Y. J., et al. (2012). "*Drosophila* Neto is essential for clustering glutamate receptors at the neuromuscular junction." *Genes Dev* 26(9): 974-987.
- Kittel, R. J., et al. (2006). "Active zone assembly and synaptic release." *Biochem Soc Trans* 34(Pt 5): 939-941.
- Klassen, M. P., et al. (2010). "An Arf-like small G protein, ARL-8, promotes the axonal transport of presynaptic cargoes by suppressing vesicle aggregation." *Neuron* 66(5): 710-723.
- Koh, Y. H., et al. (1999). "Regulation of DLG localization at synapses by CaMKII-dependent phosphorylation." *Cell* 98(3): 353-363.
- Kreutzberg, G. W. (1969). "Neuronal dynamics and axonal flow. IV. Blockage of intra-axonal enzyme transport by colchicine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 62(3): 722-728.
- Kuang, E., et al. (2009). "Mechanism of sustained activation of ribosomal S6 kinase (RSK) and ERK by kaposi sarcoma-associated herpesvirus ORF45: multiprotein complexes retain active

- phosphorylated ERK AND RSK and protect them from dephosphorylation." *J Biol Chem* 284(20): 13958-13968.
- Kuta, A., et al. (2010). "Mouse cytoplasmic dynein intermediate chains: identification of new isoforms, alternative splicing and tissue distribution of transcripts." *PLoS ONE* 5(7): e11682.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lahey, T., et al. (1994). "The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure." *Neuron* 13(4): 823-835.
- Landgraf, M., et al. (1997). "The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motoneurons of *Drosophila*." *J Neurosci* 17(24): 9642-9655.
- Landgraf, M., et al. (2003). "Embryonic origins of a motor system: motor dendrites form a myotopic map in *Drosophila*." *PLoS Biol* 1(2): E41.
- Lawrence, C. J., et al. (2004). "A standardized kinesin nomenclature." *J Cell Biol* 167(1): 19-22.
- Lee, T., et al. (1999). "Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast." *Development* 126(18): 4065-4076.
- Leighton, I. A., et al. (1995). "Comparison of the specificities of p70 S6 kinase and MAPKAP kinase-1 identifies a relatively specific substrate for p70 S6 kinase: the N-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-1 is essential for peptide phosphorylation." *FEBS Lett* 375(3): 289-293.
- Li, L., et al. (2014). "*Drosophila* Syd-1, liprin-alpha, and protein phosphatase 2A B' subunit Wrd function in a linear pathway to prevent ectopic accumulation of synaptic materials in distal axons." *J Neurosci* 34(25): 8474-8487.
- Littleton, J. T., et al. (1993). "Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca(2+)-activated neurotransmitter release." *Cell* 74(6): 1125-1134.
- Liu, Z., et al. (2011). "*Drosophila* Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 regulates axonal transport of synaptic vesicles and is required for synaptic development and transmission." *J Neurosci* 31(6): 2052-2063.
- Ljaschenko, D., et al. (2013). "Hebbian plasticity guides maturation of glutamate receptor fields in vivo." *Cell Rep* 3(5): 1407-1413.
- Lloyd, T. E., et al. (2012). "The p150(Glued) CAP-Gly domain regulates initiation of retrograde transport at synaptic termini." *Neuron* 74(2): 344-360.
- Lo, K. Y., et al. (2011). "KIF1A is the primary anterograde motor protein required for the axonal transport of dense-core vesicles in cultured hippocampal neurons." *Neurosci Lett* 491(3): 168-173.
- Longo, I., et al. (2003). "A third MRX family (MRX68) is the result of mutation in the long chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4) gene: proposal of a rapid enzymatic assay for screening mentally retarded patients." *J Med Genet* 40(1): 11-17.

- Lowry, B., et al. (1971). "A new dominant gene mental retardation syndrome. Association with small stature, tapering fingers, characteristic facies, and possible hydrocephalus." *Am J Dis Child* 121(6): 496-500.
- Macaskill, A. F., et al. (2009). "Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses." *Neuron* 61(4): 541-555.
- Maday, S., et al. (2014). "Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation." *Neuron* 84(2): 292-309.
- Maeder, C. I., et al. (2014). "Axon and dendritic trafficking." *Curr Opin Neurobiol* 27: 165-170.
- Marrus, S. B., et al. (2004). "Differential localization of glutamate receptor subunits at the *Drosophila* neuromuscular junction." *J Neurosci* 24(6): 1406-1415.
- Martin, K. C., et al. (1997). "MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*." *Neuron* 18(6): 899-912.
- Mehmood, T., et al. (2013). "Rsk2 Knockdown in PC12 Cells Results in Sp1 Dependent Increased Expression of the *Gria2* Gene, Encoding the AMPA Receptor Subunit GluR2." *Int J Mol Sci* 14(2): 3358-3375.
- Mehmood, T., et al. (2011). "Transcriptome profile reveals AMPA receptor dysfunction in the hippocampus of the *Rsk2*-knockout mice, an animal model of Coffin-Lowry syndrome." *Hum Genet* 129(3): 255-269.
- Meloni, I., et al. (2002). "FACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation." *Nat Genet* 30(4): 436-440.
- Millicamps, S. and J. P. Julien (2013). "Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurosci* 14(3): 161-176.
- Miller, K. E., et al. (2005). "Direct observation demonstrates that Liprin-alpha is required for trafficking of synaptic vesicles." *Curr Biol* 15(7): 684-689.
- Monastirioti, M., et al. (1995). "Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*." *J Comp Neurol* 356(2): 275-287.
- Morel, M., et al. (2010). "Glycogen synthase kinase-3beta and the p25 activator of cyclin dependent kinase 5 increase pausing of mitochondria in neurons." *Neuroscience* 167(4): 1044-1056.
- Morfini, G. A., et al. (2013). "Inhibition of fast axonal transport by pathogenic SOD1 involves activation of p38 MAP kinase." *PLoS ONE* 8(6): e65235.
- Morice, E., et al. (2013). "Defective synaptic transmission and structure in the dentate gyrus and selective fear memory impairment in the *Rsk2* mutant mouse model of Coffin-Lowry syndrome." *Neurobiol Dis* 58: 156-168.
- Morimoto, Y., et al. (2009). "Total synthesis and determination of the absolute configuration of (+)-omaezakianol." *Angew Chem Int Ed Engl* 48(14): 2538-2541.
- Moughamian, A. J. and E. L. Holzbaur (2012). "Dynactin is required for transport initiation from the distal axon." *Neuron* 74(2): 331-343.

- Neuser, K., et al. (2008). "Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*." *Nature* 453(7199): 1244-1247.
- Nieratschker, V., et al. (2009). "Bruchpilot in ribbon-like axonal agglomerates, behavioral defects, and early death in SRPK79D kinase mutants of *Drosophila*." *PLoS Genet* 5(10): e1000700.
- Niwa, S., et al. (2008). "KIF1Bbeta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD." *Nat Cell Biol* 10(11): 1269-1279.
- Oellers, N. and E. Hafen (1996). "Biochemical characterization of rolledSem, an activated form of *Drosophila* mitogen-activated protein kinase." *J Biol Chem* 271(40): 24939-24944.
- Okada, Y., et al. (1995). "The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors." *Cell* 81(5): 769-780.
- Ou, C. Y., et al. (2010). "Two cyclin-dependent kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components." *Cell* 141(5): 846-858.
- Pack-Chung, E., et al. (2007). "A *Drosophila* kinesin required for synaptic bouton formation and synaptic vesicle transport." *Nat Neurosci* 10(8): 980-989.
- Pandey, J. P. and D. S. Smith (2011). "A Cdk5-dependent switch regulates Lis1/Ndel1/dynein-driven organelle transport in adult axons." *J Neurosci* 31(47): 17207-17219.
- Paschal, B. M. and R. B. Vallee (1987). "Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C." *Nature* 330(6144): 181-183.
- Pereira, P. M., et al. (2010). "Coffin-Lowry syndrome." *Eur J Hum Genet* 18(6): 627-633.
- Pilling, A. D., et al. (2006). "Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons." *Mol Biol Cell* 17(4): 2057-2068.
- Poirier, R., et al. (2007). "Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene *Rsk2* in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior." *Behav Genet* 37(1): 31-50.
- Putz, G., et al. (2004). "The *S6KII* (*rsk*) gene of *Drosophila melanogaster* differentially affects an operant and a classical learning task." *J Neurosci* 24(44): 9745-9751.
- Qin, G., et al. (2005). "Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*." *J Neurosci* 25(12): 3209-3218.
- al. (2013). "Molecular adaptations allow dynein to generate large collective forces inside cells." *Cell* 152(1-2): 172-182.
- Ranganayakulu, G., et al. (1998). "Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice." *Development* 125(16): 3037-3048.
- Rasse, T. M., et al. (2005). "Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo." *Nat Neurosci* 8(7): 898-905.

- Reiff, D. F., et al. (2005). "In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies." *J Neurosci* 25(19): 4766-4778.
- Reiter, L. T., et al. (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*." *Genome Res* 11(6): 1114-1125.
- Richards, S. A., et al. (1999). "Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK." *Curr Biol* 9(15): 810-820.
- Roberts, A. J., et al. (2013). "Functions and mechanics of dynein motor proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(11): 713-726.
- Romeo, Y., et al. (2012). "Regulation and function of the RSK family of protein kinases." *Biochem J* 441(2): 553-569.
- Roos, J., et al. (2000). "*Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth." *Neuron* 26(2): 371-382.
- Roux, P. P., et al. (2004). "Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(37): 13489-13494.
- Roux, P. P., et al. (2003). "Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity." *Mol Cell Biol* 23(14): 4796-4804.
- Roux, P. P., et al. (2007). "RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation." *J Biol Chem* 282(19): 14056-14064.
- Rubinfeld, H. and R. Seger (2005). "The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling." *Mol Biotechnol* 31(2): 151-174.
- Ruiz-Canada, C. and V. Budnik (2006). "Introduction on the use of the *Drosophila* embryonic/larval neuromuscular junction as a model system to study synapse development and function, and a brief summary of pathfinding and target recognition." *Int Rev Neurobiol* 75: 1-31.
- Sambrook J. (1989); E.F. Fritsch; T. Maniatis - *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*
- Schneider, A., et al. (2011). "Altered ERK/MAPK signaling in the hippocampus of the *mrsk2_KO* mouse model of Coffin-Lowry syndrome." *J Neurochem* 119(3): 447-459.
- Scholey, J. M. (2013). "Compare and contrast the reaction coordinate diagrams for chemical reactions and cytoskeletal force generators." *Mol Biol Cell* 24(4): 433-439.
- Schroer, T. A. (2004). "Dynactin." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 759-779.
- Schuster, C. M., et al. (1996). "Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth." *Neuron* 17(4): 641-654.
- Schuster, C. M., et al. (1996). "Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity." *Neuron* 17(4): 655-667.

- Schuster, C. M., et al. (1991). "Molecular cloning of an invertebrate glutamate receptor subunit expressed in *Drosophila* muscle." *Science* 254(5028): 112-114.
- Shao, C. Y., et al. (2013). "Distinct functions of nuclear distribution proteins LIS1, Ndel1 and NudCL in regulating axonal mitochondrial transport." *Traffic* 14(7): 785-797.
- Sheng, Z. H. and Q. Cai (2012). "Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration." *Nat Rev Neurosci* 13(2): 77-93.
- Shin, H., et al. (2003). "Association of the kinesin motor KIF1A with the multimodular protein liprin-alpha." *J Biol Chem* 278(13): 11393-11401.
- Siebert, M., et al. (2015). "A high affinity RIM-binding protein/Aplip1 interaction prevents the formation of ectopic axonal active zones." *Elife* 4.
- Sigrist, S. J., et al. (2002). "The postsynaptic glutamate receptor subunit DGluR-IIA mediates long-term plasticity in *Drosophila*." *J Neurosci* 22(17): 7362-7372.
- Sirajuddin, M., et al. (2014). "Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications." *Nat Cell Biol* 16(4): 335-344.
- Smith, J. A., et al. (1999). "Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo." *J Biol Chem* 274(5): 2893-2898.
- Sollner, T., et al. (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." *Nature* 362(6418): 318-324.
- Spangler, S. A. and C. C. Hoogenraad (2007). "Liprin-alpha proteins: scaffold molecules for synapse maturation." *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5): 1278-1282.
- Stepanova, T., et al. (2003). "Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein)." *J Neurosci* 23(7): 2655-2664.
- Stewart, B. A., et al. (1996). "Homeostasis of synaptic transmission in *Drosophila* with genetically altered nerve terminal morphology." *J Neurosci* 16(12): 3877-3886.
- Stowers, R. S., et al. (2002). "Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila* protein." *Neuron* 36(6): 1063-1077.
- Sturgill, T. W., et al. (1988). "Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II." *Nature* 334(6184): 715-718.
- Su, B., et al. (2014). "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced mitochondrial motility arrest and presynaptic docking contribute to BDNF-enhanced synaptic transmission." *J Biol Chem* 289(3): 1213-1226.
- Sudhof, T. C. (2012). "The presynaptic active zone." *Neuron* 75(1): 11-25.
- Sun, F., et al. (2011). "Sunday Driver/JIP3 binds kinesin heavy chain directly and enhances its motility." *EMBO J* 30(16): 3416-3429.

- Sutherland, C., et al. (1993). "Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling." *Biochem J* 296 (Pt 1): 15-19.
- Sweatt, J. D. (2001). "The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory." *J Neurochem* 76(1): 1-10.
- Sweatt, J. D. (2004). "Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory." *Curr Opin Neurobiol* 14(3): 311-317.
- Takeda, S., et al. (2000). "Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associated vesicles important for neurite building." *J Cell Biol* 148(6): 1255-1265.
- Tangredi, M. M., et al. (2012). "The C-terminal kinase and ERK-binding domains of *Drosophila* S6KII (RSK) are required for phosphorylation of the protein and modulation of circadian behavior." *J Biol Chem* 287(20): 16748-16758.
- Tao-Cheng, J. H. (2007). "Ultrastructural localization of active zone and synaptic vesicle proteins in a preassembled multi-vesicle transport aggregate." *Neuroscience* 150(3): 575-584.
- Thiels, E., et al. (2002). "Long-term depression in the adult hippocampus in vivo involves activation of extracellular signal-regulated kinase and phosphorylation of Elk-1." *J Neurosci* 22(6): 2054-2062.
- Thomas, G. M. and R. L. Huganir (2004). "MAPK cascade signalling and synaptic plasticity." *Nat Rev Neurosci* 5(3): 173-183.
- Thomas, G. M., et al. (2005). "Ribosomal S6 kinase 2 interacts with and phosphorylates PDZ domain-containing proteins and regulates AMPA receptor transmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42): 15006-15011.
- Thomas, U., et al. (2000). "Synaptic targeting and localization of discs-large is a stepwise process controlled by different domains of the protein." *Curr Biol* 10(18): 1108-1117.
- Toda, H., et al. (2008). "UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly." *Genes Dev* 22(23): 3292-3307.
- tom Dieck, S., et al. (1998). "Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals." *J Cell Biol* 142(2): 499-509.
- Torres, M. A., et al. (1999). "Regulation of ribosomal S6 protein kinase-p90(rsk), glycogen synthase kinase 3, and beta-catenin in early *Xenopus* development." *Mol Cell Biol* 19(2): 1427-1437.
- Touraine, R. L., et al. (2002). "A syndromic form of X-linked mental retardation: the Coffin-Lowry syndrome." *Eur J Pediatr* 161(4): 179-187.
- Ultsch, A., et al. (1992). "Glutamate receptors of *Drosophila melanogaster*: cloning of a kainate-selective subunit expressed in the central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10484-10488.
- Vale, R. D., et al. (1985). "Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility." *Cell* 42(1): 39-50.

- Venken, K. J., et al. (2009). "Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*." *Nat Methods* 6(6): 431-434.
- Vershinin, M., et al. (2007). "Multiple-motor based transport and its regulation by Tau." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1): 87-92.
- Vik, T. A. and J. W. Ryder (1997). "Identification of serine 380 as the major site of autophosphorylation of *Xenopus* pp90rsk." *Biochem Biophys Res Commun* 235(2): 398-402.
- Viquez, N. M., et al. (2006). "The B' protein phosphatase 2A regulatory subunit well-rounded regulates synaptic growth and cytoskeletal stability at the *Drosophila* neuromuscular junction." *J Neurosci* 26(36): 9293-9303.
- Wagh, D. A., et al. (2006). "Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*." *Neuron* 49(6): 833-844.
- Wairkar, Y. P., et al. (2009). "Unc-51 controls active zone density and protein composition by downregulating ERK signaling." *J Neurosci* 29(2): 517-528.
- Wang, K. L. and B. D. Roufogalis (1999). "Ca²⁺/calmodulin stimulates GTP binding to the ras-related protein ral-A." *J Biol Chem* 274(21): 14525-14528.
- Wang, X. and T. L. Schwarz (2009). "The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility." *Cell* 136(1): 163-174.
- Wang, Y., et al. (2002). "A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14464-14469.
- Wassarman, D. A., et al. (1994). "The *Drosophila melanogaster* ribosomal S6 kinase II-encoding sequence." *Gene* 144(2): 309-310.
- Weaver, C., et al. (2013). "Endogenous GSK-3/shaggy regulates bidirectional axonal transport of the amyloid precursor protein." *Traffic* 14(3): 295-308.
- Wong, M. and S. Munro (2014). "Membrane trafficking. The specificity of vesicle traffic to the Golgi is encoded in the golgin coiled-coil proteins." *Science* 346(6209): 1256898.
- Wong, M. Y., et al. (2012). "Neuropeptide delivery to synapses by long-range vesicle circulation and sporadic capture." *Cell* 148(5): 1029-1038.
- Yeh, E., et al. (1995). "Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 7036-7040.
- Yoshihara, M., et al. (1997). "Transition from growth cone to functional motor nerve terminal in *Drosophila* embryos." *J Neurosci* 17(21): 8408-8426.
- Zadran, S., et al. (2009). "17-Beta-estradiol increases neuronal excitability through MAP kinase-induced calpain activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(51): 21936-21941.
- Zeniou, M., et al. (2002). "Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning." *Hum Mol Genet* 11(23): 2929-2940.

- Zhai, R. G. and H. J. Bellen (2004). "The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal." *Physiology (Bethesda)* 19: 262-270.
- Zhai, R. G., et al. (2001). "Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle." *Neuron* 29(1): 131-143.
- Zhang, J., et al. (2013). "Establishing a novel knock-in mouse line for studying neuronal cytoplasmic dynein under normal and pathologic conditions." *Cytoskeleton (Hoboken)* 70(4): 215-227.
- Zhao, Y., et al. (1996). "Regulation and interaction of pp90(rsk) isoforms with mitogen-activated protein kinases." *J Biol Chem* 271(47): 29773-29779.
- Zhao, Y., et al. (1995). "RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation." *Mol Cell Biol* 15(8): 4353-4363.
- Zhu, J. J., et al. (2002). "Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity." *Cell* 110(4): 443-455.
- Ziff, E. B. (1997). "Enlightening the postsynaptic density." *Neuron* 19(6): 1163-1174.
- Zinsmaier, K. E., et al. (2009). "Mitochondrial transport dynamics in axons and dendrites." *Results Probl Cell Differ* 48: 107-139.
- Zinsmaier, K. E., et al. (1994). "Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*." *Science* 263(5149): 977-980.