

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

Strukturelle Differenzierung und Plastizität präsynaptischer Aktiver Zonen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Achmed Mrestani
aus Halle (Saale)

Würzburg, November 2019

1. Überarbeitung, Januar 2021



Referent: Prof. Dr. med. Manfred Heckmann

Korreferent: Prof. Dr. med. Tobias Langenhan, D.Phil. (Oxon)

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2021

Der Promovend ist Arzt.

*Am not I
A fly like thee?
Or art not thou
A man like me?
(William Blake, 1794)*

Meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| | 1.1 Synaptische Transmission | 1 |
| | 1.2 Mechanismen synaptischer Differenzierung und Plastizität | 4 |
| | 1.3 Hochauflösende Lichtmikroskopie | 12 |
| 2 | Material und Methoden | 16 |
| | 2.1 Fliegenaufzucht und Genetik | 16 |
| | 2.2 Fluoreszenzmikroskopie | 16 |
| | 2.3 Molekularbiologie | 25 |
| | 2.4 Statistik | 27 |
| 3 | Ergebnisse | 28 |
| | 3.1 Hochauflösende Bildgebung aktiver Zonen | 28 |
| | 3.2 Analyse lokalisationsmikroskopischer Daten | 30 |
| | 3.3 Differenzierung der Struktur auf der Nanometerebene | 39 |
| | 3.4 Strukturelles Korrelat präsynaptischer Homöostase | 44 |
| | 3.5 Tagging weiterer Epitope mittels CRISPR/Cas9-Verfahren | 59 |
| 4 | Diskussion | 65 |
| | 4.1 AZ-Differenzierung phasischer und tonischer Synapsen | 66 |
| | 4.2 Strukturelles Korrelat akuter Plastizität | 67 |
| | 4.3 Nanoskopie der aktiven Zone | 71 |
| | 4.4 Ausblick | 74 |
| 5 | Zusammenfassung | 76 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 77 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis | 91 |
| 8 | Abkürzungsverzeichnis | 92 |
| 9 | Anhang | 95 |
| | 9.1 Python-Code | 95 |
| | 9.2 Plasmidsequenzen | 95 |
| | 9.3 Anmerkung zu den Abbildungen | 102 |
| 10 | Danksagung | |
| 11 | Lebenslauf | |

1 Einleitung

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über strukturelle Differenzierung und Plastizität präsynaptischer aktiver Zonen auf nanoskopischer Ebene unter Nutzung der Lokalisationsmikroskopie sowie strukturierter Beleuchtungsmikroskopie zu gewinnen. In diesem Rahmen wurden neue Auswertelgorithmen für schnelle, objektive und detaillierte Quantifizierung lokalisationsmikroskopischer Daten entwickelt und darüber hinaus neue genetische Werkzeuge unter Anwendung des CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated 9)-Systems für die molekulare Bildgebung von Synapsen geschaffen.

1.1 Synaptische Transmission

Funktion und Aufbau von Synapsen

Die grundlegende Struktur des Nervensystems besteht in einem Netzwerk von Nervenzellen, den Neuronen, deren Zahl im menschlichen Gehirn auf etwa 86 Milliarden geschätzt wird (Azevedo et al., 2009) und die über spezielle Kontakte miteinander in Verbindung stehen und kommunizieren. Sowohl Kontakte zwischen Nervenzellen als auch zwischen Nerven- und Muskelzellen bezeichnet man als Synapsen, ein Ausdruck, der 1897 von Sir Charles Scott Sherrington in Michael Fosters Lehrbuch der Physiologie (Originaltitel „Textbook of Physiology“) eingeführt und sogleich von der Fachwelt aufgegriffen wurde. Santiago Ramón y Cajal trug maßgeblich zur Entdeckung dieses grundlegenden Konzeptes bei, indem er die Silberfärbung nach Camillo Golgi anwendete, um neuronale Strukturen verschiedener Säugetiere zu studieren (Ramón y Cajal 1894). Grundsätzlich unterscheidet man anhand des Modus der Informationsübermittlung elektrische von chemischen Synapsen, wobei die Untersuchungen zu struktureller Plastizität in dieser Arbeit an einer chemischen Synapse, der neuromuskulären Synapse (neuromuscular junction, NMJ) von *Drosophila melanogaster*, durchgeführt wurden. Der Nachweis der chemischen Übertragung an der neuromuskulären Endplatte geht auf die Arbeit von Henry Hallett Dale und Otto Loewi zurück. Loewi konnte zeigen, dass die Substanz Acetylcholin der parasymphatische Überträgerstoff in Vertebraten ist (Loewi

Einleitung

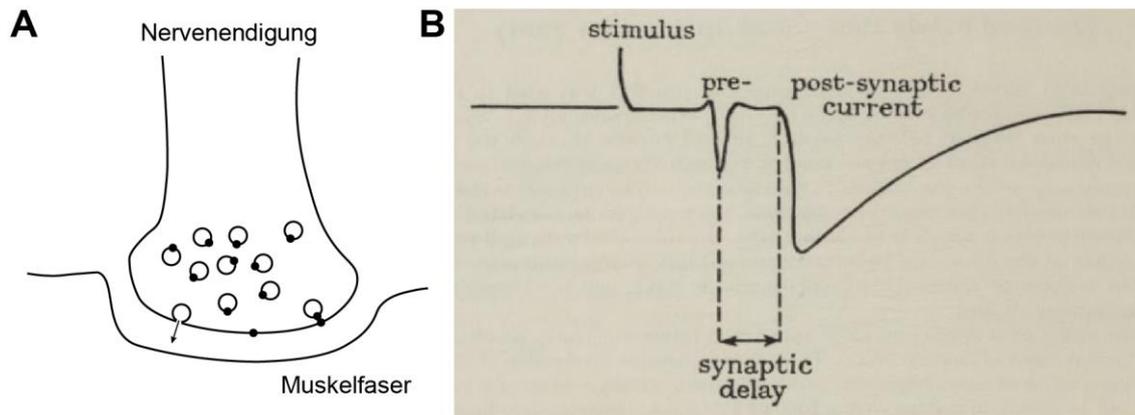


Abb. 1: Aufbau und Funktion von Synapsen

A Vereinfachte Darstellung einer neuromuskulären Synapse. In der präsynaptischen Nervenendigung befinden sich mit Neurotransmitter gefüllte Membranvesikel, deren Fusion mit der präsynaptischen Membran an reaktiven Stellen oder Zonen (reactive sites, schwarze Punkte) stattfindet. Die Transmitter diffundieren nach der Exozytose (schwarzer Pfeil) in den synaptischen Spalt und binden an postsynaptische Rezeptoren (angelehnt an eine Darstellung aus Katz 1969).

B Schema der fokalen Antwort an der Frosch-Endplatte. Dargestellt sind das Stimulationsartefakt sowie der mit einer fokalen Calciumpipette gemessene prä- und postsynaptische Strom. Die Messung der synaptischen Latenz erfolgt zwischen dem Maximum des prä- und dem Beginn des postsynaptischen Stroms. Sie beträgt etwa 0,4 bis 4 ms (modifiziert aus Katz & Miledi, 1965b, Genehmigung unter der Lizenznummer 1076514-1).

1921). Viele grundlegende Erkenntnisse zur Transmission an chemischen Synapsen sind durch Untersuchungen der neuromuskulären Endplatte durch Sir Bernard Katz und Kollegen etwa in der Mitte des 20. Jahrhunderts entstanden. Abbildung 1A zeigt den allgemeinen Aufbau einer neuromuskulären Synapse (Katz 1969). Es sind ein prä- und postsynaptischer Teil zu unterscheiden, die durch den 20-50 nm breiten synaptischen Spalt voneinander getrennt sind. Die Kommunikation zwischen Prä- und Postsynapse erfolgt, indem präsynaptische elektrische Aktivität in die Freisetzung von Neurotransmittern übersetzt wird. Die Transmittersubstanzen diffundieren durch den synaptischen Spalt zu postsynaptischen Rezeptoren, an die sie binden und wodurch die postsynaptische Antwort ausgelöst wird. Die elektrische Information geht präsynaptisch in Form von Aktionspotentialen (APs, Hodgkin & Huxley, 1939; Hodgkin & Huxley, 1952) ein, die durch die spannungsabhängige Veränderung der Leitfähigkeit der Membran für Natrium- und Kaliumionen

Einleitung

entstehen, und die letztlich den Einstrom von Calcium bewirken. Die Transmitterfreisetzung erfolgt in Form von Quanten, die den in präsynaptischen Membranvesikeln gespeicherten Paketen von Neurotransmittern entsprechen. Die quantale Natur der Freisetzung wurde durch die Analyse der Spontanaktivität an der neuromuskulären Endplatte in Vertebraten entdeckt (del Castillo & Katz, 1954; Fatt & Katz, 1952). Die Anwesenheit von Calcium ist essenziell für die Vesikelfreisetzung (Katz & Miledi 1965a; Katz & Miledi 1967). Die Verzögerung zwischen präsynaptischer Erregung und postsynaptischer Antwort wird als synaptische Latenz bezeichnet und liegt im Bereich von ca. 0,4 bis 4 Millisekunden, wobei die Diffusion des Transmitters im synaptischen Spalt nur eine untergeordnete Rolle spielt (Abb. 1B, Katz & Miledi, 1965b). Das bedeutet, dass der Großteil dieser Verzögerung durch die Übersetzung des Anstiegs der präsynaptischen Calciumkonzentration in die Vesikelfusion zustande kommt.

Synaptische Vesikel

Die Struktur und der Proteinbesatz synaptischer Vesikel konnten mit biochemischen Methoden aufgeklärt und quantifiziert werden (Takamori et al., 2006). Ein wichtiges Vesikelprotein ist Synaptotagmin, das als Sensor für den Anstieg der Calciumkonzentration betrachtet wird (Brose et al., 1992; Littleton et al., 1993; Südhof 2002). Die Bindung von Calcium an die C2A- und die C2B-Domäne von Synaptotagmin beeinflusst dessen Interaktion mit Proteinen des soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor (SNARE)-Komplexes sowie Phospholipiden der präsynaptischen Membran und bewirkt so die Fusion der Vesikel (Südhof 2004; Jahn et al., 2003; Chen & Scheller, 2001). Zwischen dem maximalen präsynaptischen Calciumstrom und dem Maximum der Vesikelexozytose vergeht nur etwa eine halbe Millisekunde (Meinrenken et al., 2003). Der reibungslose Ablauf sowie die adaptive Beeinflussung dieses Prozesses zwischen Calciumeinstrom und Neurotransmitterfreisetzung erfordert eine präzise zeitliche und räumliche Koordination. Diese Aufgabe übernimmt ein hochspezialisierter Proteinkomplex, die präsynaptische aktive Zone (AZ, Südhof 2012; Zhai & Bellen, 2004). Bernard Katz bezeichnete die Orte der Vesikelfusion mit der präsynaptischen Membran in einer frühen Darstellung als „reactive sites“ (reaktive Stellen oder Zonen, Katz 1969, Abbildung 1A).

Einleitung

Elektronenmikroskopische Studien konnten zeigen, dass der Ort der Fusion tatsächlich dem Ort der Transmitterausschüttung entspricht (Heuser et al., 1979; Heuser & Reese, 1981). Der Begriff „Aktive Zone“ als Bezeichnung für den Ort der Vesikelfreisetzung geht auf Couteaux und Pecot-Dechavassine zurück (Couteaux & Pecot-Dechavassine, 1970) und fand erstmals 1964 schriftliche Erwähnung im Buch „The Physiology of Synapses“ von Sir John Carew Eccles, der den Begriff als von Couteaux stammend zitierte. An aktiven Zonen findet das Priming und Docking (Andocken) der synaptischen Vesikel statt (Neher & Sakaba, 2008). Durch die enge Assoziation zu Calciumkanälen sind sie entscheidend an der räumlichen Organisation der Transmitterfreisetzung beteiligt (Indriati et al., 2013; Miki et al., 2017; Kittel et al., 2006).

1.2 Mechanismen synaptischer Differenzierung und Plastizität

Plastizität und Gedächtnis

Aufbauend auf der Pionierarbeit von Ramón y Cajal, der aufgrund seiner neuroanatomischen Beobachtungen bereits Dynamik und Anpassbarkeit in der Vernetzung von Neuronen annahm, stellte sich im Laufe des 20. Jahrhunderts im Gegensatz zu den Vertretern der bioelektrischen Feldtheorie heraus, dass synaptische Plastizität die Grundlage von Informationsspeicherung und -verarbeitung im zentralen Nervensystem ist (Kandel 2009). Entscheidende theoretische Überlegungen zur Informationsspeicherung in neuronalen Netzwerken lieferte Donald Olding Hebb (Hebb 1949). Untersuchungen von Patienten mit Läsionen im medialen Temporallappen enthüllten dessen Bedeutung für die Entstehung und Abrufung von Erinnerungen (Scoville & Millner, 1957). Später konnte diesem Bereich, im Speziellen Neuronen des Hippocampus, eine besondere Form der synaptischen Plastizität, die sogenannte Langzeitpotenzierung (LTP), zugeordnet werden (Bliss & Lømo, 1973). Strukturelle Korrelate der LTP sind nachgewiesen worden und man geht davon aus, dass sie einen entscheidenden Beitrag zur Gedächtnisbildung liefert (Bailey & Kandel, 1993). Im Allgemeinen unterscheidet man deklaratives von prozeduralem Gedächtnis (Squire 2009). Auch das prozedurale Gedächtnis, zu dem u. a. motorisches Lernen aber auch einfache Reflexbögen zählen, wurde anhand zahlreicher Beispiele eindeutig mit synaptischer Plastizität in Ver-

Einleitung

bindung gebracht (Bailey & Kandel, 1993). Neben der Langzeitplastizität, die in engem Zusammenhang mit der Regulierung der Transkription im Zellkern steht (Kandel 2012), unterscheidet man verschiedene Formen der synaptischen Kurzzeitplastizität (Zucker & Regehr, 2002; von Gersdorff & Borst, 2002). Hierzu zählt die synaptische Bahnung oder Fazilitation, der u. a. eine additive Wirkung verbleibender Calciumionen nach vorangegangenen APs zugrunde liegt (Hypothese des residualen Calciums), sowie die synaptische Depression aufgrund der Erschöpfung freisetzungsbereiter Vesikel oder der Desensibilisierung postsynaptischer Rezeptoren. Auf die synaptische Homöostase als spezielle Form der präsynaptischen Plastizität wird später in diesem Abschnitt eingegangen. Eine interessante Hypothese der letzten beiden Jahrzehnte, zu der nach und nach mehr experimentelle Evidenzen veröffentlicht werden, ist die Beteiligung physiologischer Prionen bei der aktivitätsabhängigen Markierung von Synapsen und bei der Gedächtnisbildung (Rayman & Kandel, 2017; Keleman et al., 2007; Si et al., 2003a, Si et al., 2003b).

Funktionelle und strukturelle Differenzierung

Grundlage der Plastizität von Synapsen ist ihre strukturelle und funktionelle Diversität. Nachdem die Bedeutung synaptischer Plastizität im vorangegangenen Abschnitt dargestellt wurde, schließt sich die Frage an, was die Determinanten verschiedener funktioneller Eigenschaften von Synapsen sind. Es liegt hierbei nahe, die Struktur funktionell unterschiedlicher Synapsen zu untersuchen. Ein Beispiel für die Differenzierung in phasische und tonische Synapsen im Kleinhirn der Ratte zeigt Abbildung 2. Bei einer elektrischen Serienstimulation kommt es an der phasischen Kletterfaser, einhergehend mit einer höheren Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel, zu einer Abnahme der Amplitude exzitatorischer postsynaptischer Ströme (excitatory postsynaptic current, EPSC), bei der tonischen Parallelfaser zu einer Zunahme (Dittman et al., 2000). Trotz dieser klaren funktionellen Differenzierung konnte mittels serieller Schnitte in der Elektronenmikroskopie kein deutlicher struktureller Unterschied gefunden werden. An beiden Synapsen wurden etwa 7-8 gedockte Vesikel sowie eine ähnliche Fläche der postsynaptischen Verdichtung (postsynaptic density, PSD) gefunden (Xu-Friedman et al., 2001).

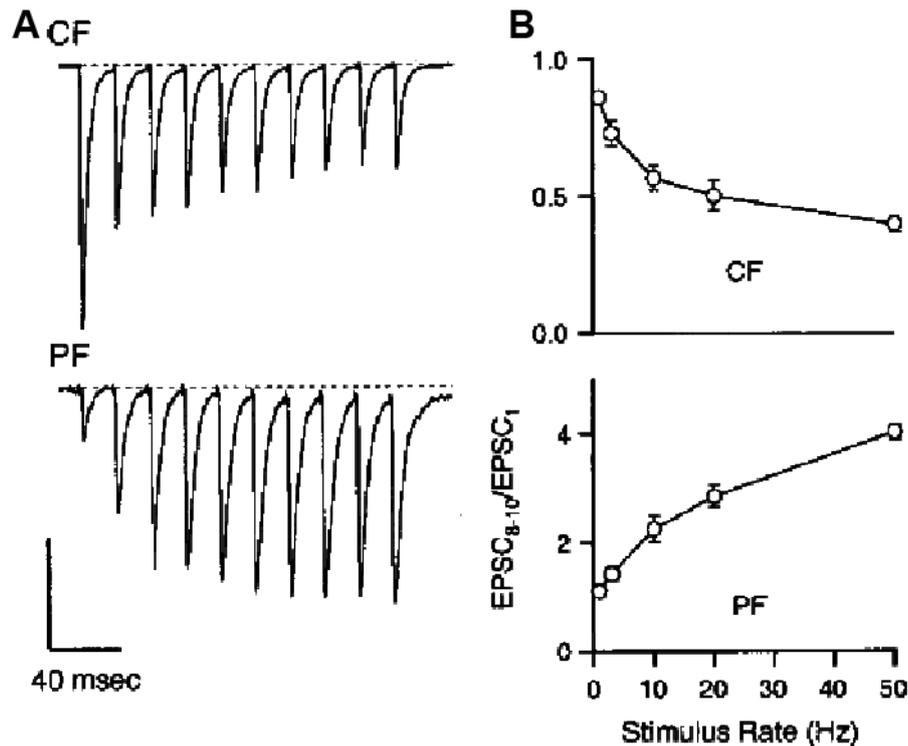


Abb. 2: Funktionelle Differenzierung phasischer und tonischer Synapsen

A EPSCs bei 50 Hz Serienstimulation an der Kletterfaser-zu-Purkinjezell-Synapse (CF, oben) und an der Parallelfaser-zu-Purkinjezell-Synapse (PF, unten) im Kleinhirn der Ratte. Die phasische CF zeigt synaptische Depression, die PF hingegen Bahnung. Vertikale Skala 2 und 400 pA für CF bzw. PF.

B Punktdiagramme (Mittelwert \pm Standardfehler) zeigen den Quotienten aus den gemittelten 8.-10. EPSCs und dem 1. EPSC der Stimulationsserie in Abhängigkeit von der Stimulationsrate für CF (oben) und PF (unten, modifiziert aus Dittman et al., 2000, Copyright 2000 Society for Neuroscience).

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass hinsichtlich des strukturellen Korrelats funktioneller synaptischer Differenzierung viele Fragen offen sind. Ähnliche Formen der Differenzierung konnten an verschiedenen Synapsen in zahlreichen Modellorganismen gefunden werden (Atwood & Karunanithi, 2002). Es wurde gezeigt, dass tonische Synapsen eine losere Kopplung von, d. h. einen größeren Abstand zwischen, Vesikeln und Calciumkanälen sowie eine geringere Affinität des Calciumsensors aufweisen (Rozov et al., 2001). Letztere scheint auch an der neuromuskulären Synapse des Flusskrebsses entscheidend zu sein und auch hier wurden nur milde strukturelle Korrelate der Differenzierung gefunden (Msghina et al., 1999).

Die *Drosophila*-NMJ als experimentelles Modell

Drosophila melanogaster ist ein vielseitiger Modellorganismus mit komplexem Verhalten, der wichtige Beiträge zu grundlegenden Erkenntnissen der Biologie und Neurowissenschaft sowie der Erforschung der Genetik von Verhalten und Gedächtnis geliefert hat (Bellen et al., 2010; Benzer 1973; Heisenberg 2015). In dieser Arbeit wurde die glutamaterge NMJ von *Drosophila* als Modellsystem verwendet. Seit ihrer initialen elektrophysiologischen Charakterisierung (Jan & Jan, 1976a, b; Stewart et al., 1994) wird sie als standardisiertes Präparat für eine Vielzahl von Studien zu synaptischer Transmission verwendet (Heckmann et al., 1997; Petersen et al., 1997; Hallermann et al., 2010a). In Kombination mit neuesten bildgebenden Verfahren konnten wichtige Erkenntnisse zu Struktur und Funktion präsynaptischer AZs (Kittel et al., 2006; Ehmann et al., 2014; Liu et al., 2011; Böhme et al., 2016) und postsynaptischer Glutamatrezeptoren (Rasse et al., 2005; Schmid et al., 2008; Heckmann & Dudel, 1995) gewonnen werden. Auch an dieser Synapse existiert die im vorangegangenen Abschnitt eingeführte Form der phasisch-tonischen Differenzierung. An der glutamatergen NMJ sind an den abdominalen Muskeln 6 und 7 zwei Motoneuronen zu unterscheiden (Atwood et al., 1993). Das Neuron MN6/7b-Ib (RP3) bildet die größeren Ib-Boutons und das Neuron MNSNb/d-Is bildet die kleineren Is-Boutons (Kurdyak et al., 1994; Lnenicka & Keshishian, 2000; Hoang & Chiba, 2001). Die Ib-Boutons weisen kleinere postsynaptische Potentiale sowie eine stärkere Kurzzeit-Bahnung auf, wohingegen Is-Boutons größere postsynaptische Potentiale, weniger Bahnung sowie eine erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel zeigen (Kurdyak et al., 1994; Karunanithi et al., 2002; Lu et al., 2016; Newman et al., 2017). Auch morphologische Unterschiede konnten bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden. Während Ib-Neuronen eine deutliche Differenzierung entlang der Boutonkette zeigen, fehlt dieses Muster bei Is-Neuronen (Ehmann et al., 2014; Paul et al., 2015). Is-AZs sind kleiner und haben weniger Brp-Moleküle als Ib-AZs (Ehmann et al., 2014). Besonders eindrücklich ist der strukturelle Unterschied an den größeren Vesikeln der Is-Neurone zu erkennen (Abb. 3, Karunanithi et al., 2002; Atwood & Karunanithi, 2002).

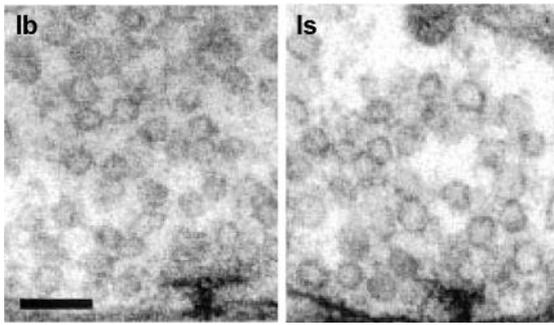


Abb. 3: Phasische Is-Boutons haben größere präsynaptische Vesikel

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von T-bar-Strukturen und umgebenden Vesikeln in Ib- (links) und Is-Boutons (rechts). Skala 100 nm (modifiziert aus Karunanithi et al., 2002, Copyright 2002 Society for Neuroscience).

Plastizität aktiver Zonen

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Nanoarchitektur aktiver Zonen im Zusammenhang mit funktioneller Differenzierung und Plastizität. Schon früh konnten Belege für strukturelle Änderungen der AZ in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität gezeigt werden (Bailey & Chen, 1983). Trotz großer Variabilität in Struktur und funktionellen Details teilen aktive Zonen verschiedener Synapsen bestimmte bauliche Grundprinzipien. So setzen sie sich aus drei topologisch unterscheidbaren Elementen zusammen: (i) Die präsynaptische Plasmamembran liegt der PSD direkt gegenüber. Sie beinhaltet die spannungsgesteuerten Calciumkanäle und den Ort der Vesikelfusion. (ii) Die Cytomatrix der aktiven Zone (cytomatrix at the active zone, CAZ) schließt sich am Inneren der Membran an. Hier erfolgt das Docking der synaptischen Vesikel. (iii) Das dritte Element sind die elektronendichten Projektionen, die sich von der CAZ aus ins Cytoplasma erstrecken und die für das Tethering (Anbinden) der Vesikel verantwortlich sind (Zhai & Bellen, 2004). Darüber hinaus zeigen AZs eine beeindruckende strukturelle Variabilität (Ackermann et al., 2015). AZs bestehen aus einem unlöslichen Proteinkomplex variabler Komposition mit 5 Kernbestandteilen: RIM (Rab3-interacting molecule), Munc13 (mammalian uncoordinated homology 13), RIM-BP (RIM-binding protein), α -Liprin (Lar-interacting-protein-related-protein α) und ELKS/CAST (Südhof 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Größe der AZ sowie die Menge von RIM und spannungsgesteuerten Calciumkanälen mit der Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel korrelieren (Holderith et al., 2012). Bei der Untersuchung der Differenzierung von CA3 Synapsen wurden bei synaptischen Endigungen mit hoher Freisetzungswahrscheinlichkeit größere Calciumtransienten, eine höhere Kanaldichte sowie kleinere, kompaktere AZs gefunden (Éltes et al., 2017). An der Held'schen Calyx korreliert die

Einleitung

Freisetzungswahrscheinlichkeit mit der Größe der Kanalcluster und der Enge der Kopplungsdistanz (Fekete et al., 2019).

Die CAZ bei Insekten, und im Speziellen bei *Drosophila*, nimmt morphologisch eine Sonderstellung ein. Ihr strukturelles Korrelat in der Elektronenmikroskopie wird als T-förmige Struktur oder T-bar bezeichnet (Abb. 3, Abb. 4A, Atwood et al., 1993; Karunanithi et al., 2002; Hallermann et al., 2010b). Ein Kernbestandteil der AZ bei *Drosophila* ist das glutaminreiche coiled-coil Protein Bruchpilot (Brp), dessen N-terminaler Teil strukturelle Ähnlichkeit zu ELKS/CAST in Säugern aufweist (Held & Kaeser, 2018; Wagh et al., 2006). In Mutanten mit trunkiertem *bruchpilot*-Gen sind die T-bar-Strukturen nicht mehr zu sehen, weshalb Brp als Teil des Hauptgerüsts der AZ in *Drosophila* angesehen wird (Kittel et al., 2006; Atwood 2006). Brp ist entscheidend am Docking der präsynaptischen Vesikel beteiligt. Fehlen die letzten 17 Aminosäuren, wie in der als *brp^{nude}* bezeichneten *Drosophila*-Mutante, ist der T-bar nackt (Abb. 4B, Hallermann et al., 2010b). Weiterhin ist es für eine synchronisierte Transmitterfreisetzung und die Lokalisierung von Calciumkanälen wichtig (Kittel et al., 2006). Mithilfe eines hochspezifischen monoklonalen Antikörpers, der als Brp^{Nc82} bezeichnet wird und der gegen den C-terminalen Teil des Proteins gerichtet ist, konnte die räumliche Anordnung des Epitops mit konfokaler und hochauflösender Mikroskopie weiter aufgeklärt werden (Kittel et al., 2006; Hallermann et al., 2010b; Fouquet et al., 2009). Unter Anwendung von Lokalisationsmikroskopie, auf die im nächsten Abschnitt weiter eingegangen wird, konnte gezeigt werden, dass die nanoskopische Struktur von Brp mit verschiedenen funktionellen Zuständen der AZ korreliert. So zeigen die Mutanten *brp^{nude}* und *rab3^{rup}*, bei der die vesikelassoziierte GTPase Rab3 (Ras-related protein Rab3) fehlt (Graf et al., 2009), eine verkleinerte bzw. vergrößerte CAZ bei funktionell gestörter Kurzzeitplastizität (Abb. 4C, D) und die Brp-Wolke unterliegt sowohl innerhalb einer Boutonkette als auch zwischen den funktionell unterschiedlichen Ib- und Is-Neuronen einer strukturellen Differenzierung (Ehmann et al., 2014; Paul et al., 2015). Die Menge an Brp korreliert mit der Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel und es scheint bevorzugt an evozierter Freisetzung beteiligt zu sein (Peled et al., 2014; Akbergenova et al., 2018). Bezüglich der erläuterten

Einleitung

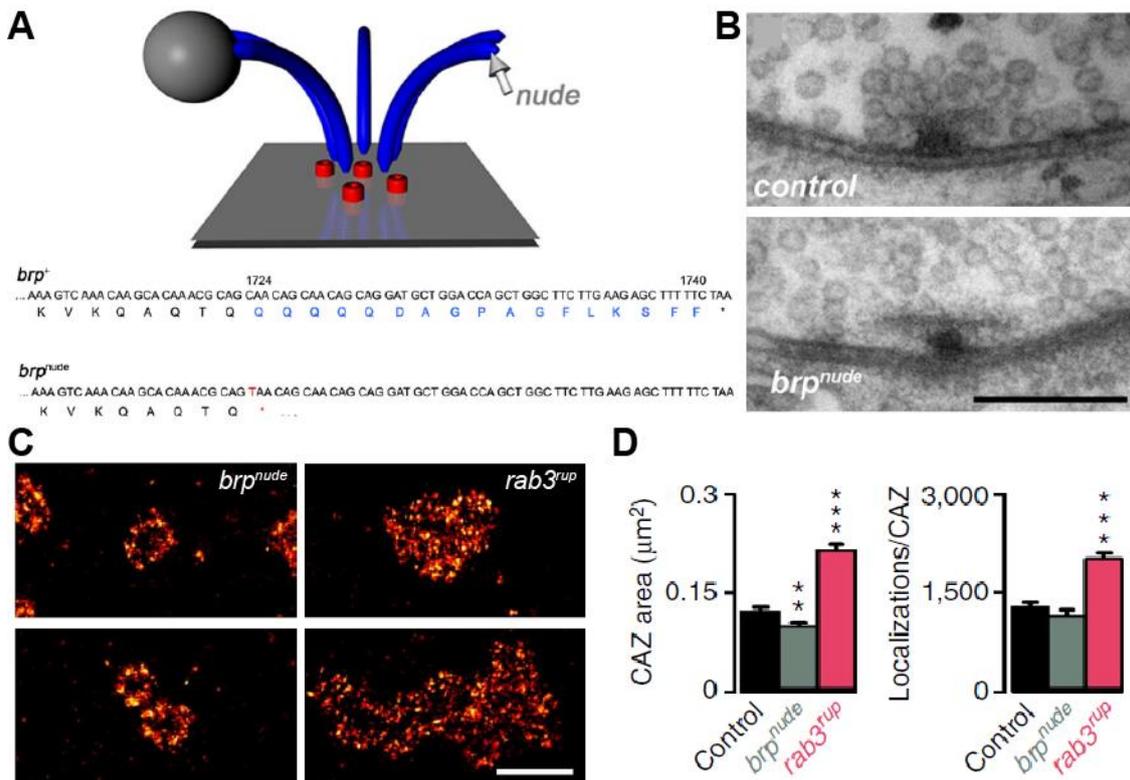


Abb. 4: Struktur aktiver Zonen in *Drosophila melanogaster*

A Schematische Darstellung einer AZ mit Brp-Filamenten (blau), einem Vesikel (grau) und präsynaptischen Calciumkanälen (rot). Ein vorzeitiges Stopcodon führt bei *brp*^{nude} zur Expression eines trunkierten Brp, bei dem die letzten 17 Aminosäuren fehlen.

B Elektronenmikroskopische Aufnahmen von AZs im Wildtyp (control) und in *brp*^{nude}. Der Mutante fehlt die Vesikelbedeckung des T-bars. Skala 200 nm (modifiziert aus Hallermann et al., 2010b, Copyright 2010 Society for Neuroscience).

C dSTORM-Aufnahmen von AZs, die durch die Anfärbung von Brp mit dem Antikörper Brp^{Nc82} und Cy5-gekoppelten F(ab')₂-Fragmenten dargestellt wurden, in *brp*^{nude} (links) und *rab3*^{up} (rechts).

D Quantifizierung der Fläche und der Anzahl an Brp-Lokalisierungen pro AZ im Wildtyp (Control, schwarz), *brp*^{nude} (grau) und *rab3*^{up} (rot, modifiziert aus Ehmann et al., 2014, Genehmigung unter einer Creative Commons Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion aktiver Zonen spricht man von sog. „active zone states“ (AZ-Zuständen, Kittel & Heckmann, 2016; Ghelani & Sigrist, 2018). AZs können in Abhängigkeit von funktionellen Anforderungen verschiedene Zustände mit einem spezifischen strukturellen Korrelat

einnehmen bzw. durchlaufen. Damit in Verbindung stehen auch akute strukturelle Anpassungen.

Präsynaptische Homöostase

Eine in den letzten Jahren zunehmend untersuchte Form der synaptischen Plastizität ist die präsynaptische homöostatische Potenzierung an der *Drosophila* NMJ (Davis & Müller, 2015). Dieses Modell dient in dieser Arbeit der Untersuchung akuter, struktureller Plastizität der Brp-Anordnung in der AZ auf der Nanometerebene und wird folgend eingeführt. Die postsynaptischen Glutamatrezeptoren an der *Drosophila* NMJ sind Heterotetramere, die sich aus den Untereinheiten GluRIIC, GluRIID, GluRIIE und entweder GluRIIA oder GluRIIB zusammensetzen (Qin et al., 2005). Die Anwesenheit von GluRIIA oder GluRIIB bestimmt die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors (DiAntonio et al., 1999). Fehlt die GluRIIA-Untereinheit, kommt es zu einer verringerten Amplitude der quantalen Antworten. Die evozierten postsynaptischen Potentiale bleiben durch einen 2-3fachen Anstieg des quantalen Inhalts, d. h. der Anzahl der pro AP freigesetzten Vesikel (Weyhersmüller et al., 2011), in ihrer Amplitude jedoch unverändert (Abb. 5A, Petersen et al., 1997; Davis & Müller, 2015). Diesen kompensatorischen Mechanismus bezeichnet man als präsynaptische homöostatische Plastizität (presynaptic homeostatic plasticity, PHP, Frank et al., 2014). Neben dieser genetisch induzierten, chronischen Form existiert die akute, pharmakologisch induzierte PHP, bei der nach 10-minütiger Inkubation mit dem Porenblocker Philanthotoxin (PhTx) ähnliche elektrophysiologische Phänomene beobachtet werden (Abb. 5B, C, Frank et al., 2006). Die PhTx-induzierte Homöostase eignet sich somit als Modell, das strukturelle Korrelat akuter funktioneller Änderungen zu untersuchen.

Einleitung

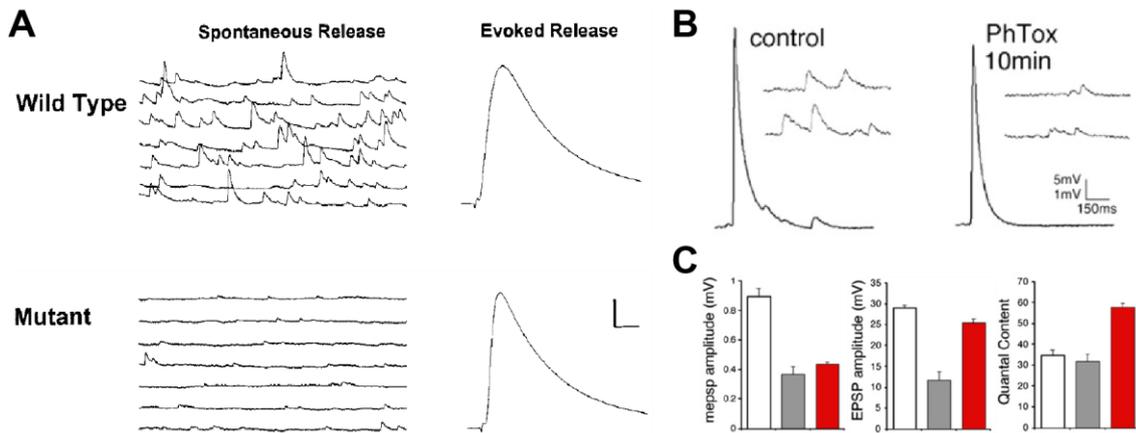


Abb. 5: Präsynaptische homöostatische Plastizität

A Spontanaktivität (links) und evozierte Transmitterfreisetzung (rechts) an Muskel 6, Segment A3 von *Drosophila*-Larven im 3. Entwicklungsstadium, aufgenommen mit einer intrazellulären Elektrode, im Wildtyp (*Canton S*) und GluRIIA Knockout (*DGluRIIASP16/Df(2L)c1h4*). Vertikale Skala 2 mV. Horizontale Skala 200 ms (Spontanaktivität) und 16 ms (evozierte Freisetzung, modifiziert aus Petersen et al., 1997, Genehmigung unter der Lizenznummer 4944180740945).

B Beispielspuren für Spontanaktivität und evozierte Freisetzung in Kontrollen (control) und Philanthotoxin-behandelten Larven.

C Mittlere mEPSPs (miniature excitatory postsynaptic potential, entspricht der Amplitude der quantalen Antwort), EPSPs und mittlerer quantaler Inhalt (quantal content) in Kontrollen (weiß), nach 30-sekündiger Philanthotoxin-Inkubation (grau) und nach 10-minütiger Inkubation (rot). Es war eine statistisch signifikante Zunahme des quantalen Inhalts zu beobachten (modifiziert aus Frank et al., 2006, Genehmigung unter der Lizenznummer 4944180240341).

1.3 Hochauflösende Lichtmikroskopie

Die Überwindung der Auflösungsgrenze

Aktive Zonen sind Strukturen mit einer wenige 100 nm großen räumlichen Ausdehnung (Taschenberger et al., 2002; Karunanithi et al., 2002). Die von Ernst Abbe 1873 bestimmte diffraktionsbedingte physikalische Begrenzung des räumlichen Auflösungsvermögens linsenoptischer Mikroskope liegt bei etwa der Hälfte der Wellenlänge des verwendeten Lichts, im Optimalfall also 200 nm, und ist damit limitierend bei der Untersuchung der räumlichen Ausdehnung und vor allem der Substruktur der AZ. Bessere Auflösung im Bereich von Nanometerbruchteilen bis wenigen nm bieten elektronenmikroskopische

Einleitung

Verfahren. Nachteil ist hier die langwierige und komplizierte Verarbeitung der Proben, die im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie eingeschränkten Möglichkeiten des molekulspezifischen Nachweises und die fehlende Möglichkeit, lebende Zellen zu untersuchen. Daher sind trotz der Auflösungsvorteile dieser Verfahren viele Anstrengungen unternommen worden, die Abbe'sche Diffraktionsbarriere in der Fluoreszenzmikroskopie zu überwinden (Hell 2007). Ausgewählte Beispiele der daraus hervorgegangenen hochauflösenden Verfahren werden im Folgenden kurz eingeführt. Bei der STED (stimulated emission depletion)-Mikroskopie wird ein regulärer Anregungslaser mit einem hochenergetischen STED-Laser kombiniert, der einen Donut-förmigen Bereich am Rand des angeregten Bereiches auslöscht, wodurch im Gewebe eine laterale Auflösung von etwa 30 nm erreicht werden kann (Hell & Wichmann, 1994; Hell 2007; Böhme et al., 2019). Ein weiteres Verfahren ist die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (structured illumination microscopy, SIM). Hier erfolgt die Beleuchtung der Probe mit einem Gitter, dessen Position mehrfach verändert wird. Durch die daraus entstehenden Überlagerungen kann mithilfe des Moiré-Effekts ein Bild mit etwa verdoppeltem Auflösungsvermögen errechnet werden (Gustafsson 2005; Gustafsson et al., 2008). Einem anderen Funktionsprinzip folgen stochastische, lokalisationsmikroskopische Verfahren, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Lokalisationsmikroskopie

Einzelne Fluorophore erzeugen beugungsbegrenzte Emissionsprofile (Abb. 6A, B) mit einer im Vergleich zur eigentlichen Struktur viel größeren räumlichen Ausdehnung. Diese Profile können als Punktspreizfunktion (point spread function, PSF) dargestellt werden, deren Helligkeitsmaximum und damit die exakte Lokalisation des Fluorophors mit einer Präzision im Bereich von etwa 2 bis 25 nm bestimmt werden kann (Betzig et al., 2006; Heilemann et al., 2008). Bei herkömmlichen fluoreszenzmikroskopischen Methoden wie der konfokalen Mikroskopie oder der Epifluoreszenzmikroskopie wird jedoch eine große Population von Fluorophoren gleichzeitig angeregt und detektiert, wodurch die PSFs überlappen und die Information über die Einzelmoleküllokalisierung verloren geht. Lokalisationsmikroskopische Verfahren teilen das Prinzip, dass

Einleitung

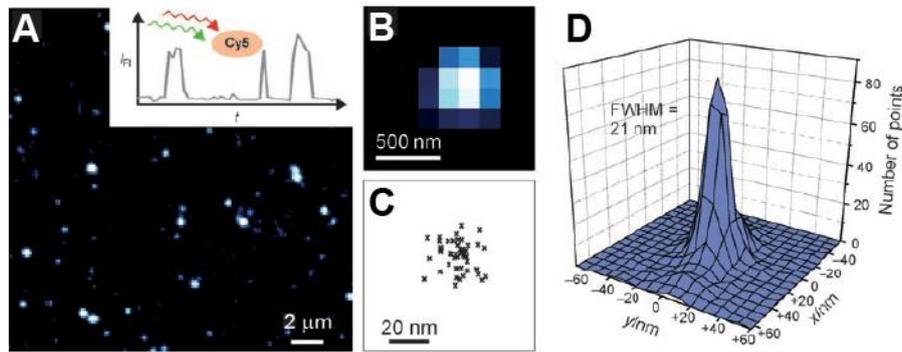


Abb. 6: Grundsätzliches Prinzip von dSTORM

A TIRF (total internal reflection)-mikroskopisches Bild von Cy5-markierten, doppelsträngigen DNA-Molekülen in wässrigem Puffer, immobilisiert auf einem Objektträger. Bei gleichzeitiger Anregung mit einem roten (647 nm) und einem grünen (514 nm) Laser schaltet Cy5 reversibel zwischen einem fluoreszierenden An- und einem dunklen Aus-Zustand.

B Typisches Emissionsprofil eines einzelnen, Cy5-markierten DNA-Moleküls bei konventioneller Fluoreszenzmikroskopie. Mittels einer Gauß'schen Funktion wird die präzise Position des Emitters bestimmt.

C Lokalisationen eines repetitiv schaltenden, Cy5-markierten DNA-Moleküls, dargestellt als Kreuze.

D Aligierte 2-dimensionale Lokalisationsverteilungen von 50 Cy-5-markierten DNA-Molekülen veranschaulichen ein räumliches Auflösungsvermögen von etwa 21 nm (modifiziert aus Heilemann et al., 2008, Genehmigung unter der Lizenznummer 4944200199345).

unter Ausnutzung bestimmter Eigenschaften der verwendeten Fluorophore eine Serie von beugungsbegrenzten Bildern aufgenommen wird, bei denen sich jeweils nur ein Bruchteil der Moleküle im Zustand der Emission befindet (Abb. 6A). Hieraus lassen sich Einzelmoleküllokalisationen berechnen und ein hochaufgelöstes Bild rekonstruieren. Eric Betzig und Kollegen gelang damit 2006 unter Verwendung schaltbarer fluoreszierender Proteine Bildgebung im Nanometerbereich und die Technologie wurde PALM (photoactivated light microscopy) genannt. Bei einer anderen Technik, die als STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) bezeichnet wird, nutzt man die Eigenschaft bestimmter organischer Farbstoffe wie dem Cyanin-Farbstoff Cy5, sich bei Anregung mit Licht hoher Intensität in einen reversiblen Aus-Zustand zu begeben, der bei Anwesenheit eines weiteren Farbstoffs, bspw. Cy3, und gleichzeitiger Anregung mit Licht niedrigerer Wellenlänge stochastisch wieder in

Einleitung

einen emittierenden Zustand gebracht werden kann (Rust et al., 2006). Auch hier werden Nanometerauflösungen erzielt, es konnten Mehrfarbanwendungen gezeigt werden und auch 3-dimensionale Bildgebung unter Nutzung des Astigmatismus und Analyse der Verzerrung der PSF in Abhängigkeit von der Lage des Emitters zur fokalen Ebene des Objektivs ist möglich (Bates et al., 2007; Huang et al., 2008; Rust et al., 2006). Mit dem Verfahren *d*STORM (*direct* STORM) konnte gezeigt werden, dass organische Fluorophore bei Anwesenheit von Thiolgruppen auch direkt geschaltet werden können (Heilemann et al., 2008; van de Linde et al., 2008; van de Linde et al., 2011; van de Linde et al., 2013) und auch hier sind mehrere Farben (van de Linde et al., 2009) sowie 3-dimensionale Bildgebung möglich (Proppert et al., 2014; Pauli et al., 2019). Wird *d*STORM mit regulären organischen Fluorophoren wie bspw. Cy5 angewendet, ist eine Auflösung von ca. 20 nm möglich (Abb. 6C, D, Heilemann et al., 2008). Eine Besonderheit der Lokalisationsmikroskopie ist die Möglichkeit der Proteinquantifizierung, da die Anzahl der Blinkereignisse mit der Anzahl der vorhandenen Farbstoffe und damit der Anzahl der Epitope bzw. Fluorophor-gekoppelten Moleküle korreliert (Löschberger et al., 2012; Ehmann et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde das lokalisationsmikroskopische Verfahren *d*STORM in Kombination mit neuen Auswertalgorithmen angewendet, um die strukturelle Differenzierung aktiver Zonen phasischer Is- und tonischer Ib-Neurone sowie akute, strukturelle Plastizität auf der Nanometerebene zu untersuchen. Um den Zusammenhang mit früheren Befunden aus der konfokalen und STED-Mikroskopie herzustellen, wurden Simulationen niedrigerer räumlicher Auflösung in Lokalisationsdaten sowie korrelative konfokale und *d*STORM-Bildgebung durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Fliegenaufzucht und Genetik

Drosophila melanogaster wurde auf einem Standardmedium bei 25 °C in Plastikgefäßen aufgezogen. Für die Experimente wurden männliche Larven des dritten Entwicklungsstadiums (3rd instar, drittes Nymphenstadium) verwendet. Hierzu wurden die größten Tiere selektiert, die sich im Futterbrei befanden und begannen, an der Wand des Gefäßes entlang zu kriechen.

Als Wildtypstamm diente der Genotyp *w¹¹¹⁸* (Bloomington Drosophila Stock Center, BDSC). Zur Erstellung transgener Fliegen wurde das CRISPR/Cas9-System angewandt und folgende Genotypen wurden für diese Arbeit generiert und verwendet: *cac::V5-DsRed/FM7i*;*+*, *cac::EGFP-DsRed/FM7i*;*+*, *+*;*Ca-beta::EGFP/CyO*. Für die RIM-Bildgebung wurde *w[1118]*;*+*;*rim-ΔRab3-attP{V5::Rab3(pLM11) mW-}* benutzt. Dieser Stamm wurde von Herrn Prof. Tobias Langenhan (Universität Leipzig) zur Verfügung gestellt. Zur Bildgebung von Brp mit Anti-GFP (green fluorescent protein)-Nanobody wurde die entsprechende RMCE (recombinase mediated cassette exchange)-Linie aus dem MiMIC (Minos Mediated Integration Cassette)-Projekt des Bellen-Labors (Baylor College of Medicine; Howard Hughes Medical Institute) bestellt (*y[1] w[67c23]; Mi{PT-GFSTF.0}brp[Mi02987-GFSTF.0]*, BDSC #59292).

2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Präparation und Fixierung

Zur Erstellung des Nerv-Muskel-Präparates wurde physiologische HL-3-Lösung (haemolymph-like solution) in folgender Zusammensetzung (in mM) hergestellt: NaCl 70, KCl 5, MgCl₂ 20, NaHCO₃ 10, Trehalose 5, Succrose 115, Hepes 5. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH-Lösung auf 7,2 eingestellt (Stewart et al., 1994). Die Lösung wurde auf 4 °C gelagert und maximal für eine Woche verwendet. Selektierte Larven wurden in destilliertem Wasser von Verunreinigungen mit Nahrungsresten gereinigt. Anschließend wurden die Tiere in eiskalte HL-3-Lösung überführt, um eine Betäubung zu erreichen. Die Präparation erfolgte auf Sylgard-Gel (Dow Corning GmbH, Wiesbaden,

Material und Methoden

Deutschland) mit gekürzten Minutien-Pins (Durchmesser 0,1 mm, Austerlitz Insect Pins, Slakov u Brna, Tschechien). Die Larven wurden am kranialen Pol mittig, distal der Kauwerkzeuge und anschließend am kaudalen Pol mittig, zwischen den Malpighi-Gefäßen festgesteckt, wobei die dorsale Seite nach oben gewandt war. Es erfolgte eine Inzision am kaudalen Pol, leicht kranial der Einstichstelle. Anschließend wurde die dorsale Rumpfwand vorsichtig aufgeschnitten und die Larve mit vier weiteren Pins aufgeklappt und festgesteckt. Die inneren Organe sowie das Tracheensystem wurden vom Rumpf getrennt. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst wenig Zug auf das Präparat auszuüben. Schließlich wurden die Tiere zwei- bis dreimal mit HL-3-Lösung gespült und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) 10 Minuten lang chemisch fixiert. Danach wurde das zentrale Nervensystem herausgeschnitten und die Nerven gekürzt, um eine optimale Darstellung der neuromuskulären Synapse zu gewährleisten.

Philanthotoxin-Behandlung

Philanthotoxin-433-tris(trifluoroacetate)-Salz (P207 Sigma, St. Louis, USA) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst, um eine 4 mM Stammlösung herzustellen, die bei -20 °C gelagert wurde. Zur Durchführung der Experimente wurde 1 µl dieser Stammlösung in 199 µl frisch hergestellter HL-3-Lösung aufgelöst, um eine Zielkonzentration von 20 µM PhTx in 0,5 % DMSO zu erreichen. Kontrollexperimente erfolgten mit der gleichen DMSO-Konzentration in HL-3 ohne PhTx. Die PhTx-Behandlung wurde an einer speziellen Larvenpräparation, der halbintakten Präparation (semi-intact preparation) wie in Frank et al., 2006 beschrieben, durchgeführt. Die Präparation erfolgte wie weiter oben beschrieben in calciumfreier, eiskalter HL-3-Lösung bis zur dorsalen Inzision. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig abgekippt und verbliebene Lösung wurde vorsichtig abgezogen. Anschließend wurden 10 µl der 20 µM PhTx-Lösung bei Raumtemperatur (22 °C) auf die Larve pipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die PhTx-Lösung entfernt und wieder mit eiskalter HL-3-Lösung vorsichtig aufgefüllt. Die Präparation wurde wie weiter oben beschrieben vollendet und fixiert.

Färbung

Nach der Fixation wurden die Larven für 30 Minuten in PBT (PBS mit 0,05 % Triton X-100, Sigma) mit 5 % natürlichem Ziegenserum (normal goat serum, NGS, Dianova, Hamburg, Deutschland) geblockt. Die Färbung mit Primärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach zwei kurzen und drei langen Waschschritten (20 min) mit PBT erfolgte die Färbung mit Sekundärantikörpern über 2-4 Stunden bei Raumtemperatur. Es schlossen sich erneut 2 kurze und drei lange Waschschriffe mit PBT an. Die Präparate für dSTORM-Messungen wurden für maximal einen Tag in PBS bei 4 °C gelagert. Präparate für die srSIM-Bildgebung wurden in Vectashield-Medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingebettet und nach Aufbringen der Deckgläser mit Nagellack versiegelt. Alle Aufnahmen erfolgten an NMJs der abdominalen Rumpfwandmuskeln 6 und 7 in den Körpersegmenten A2 und A3 bis auf das Experiment an Muskel 4. Hier wurde in den Segmenten A2 bis A4 gemessen. Daten, die direkt statistisch verglichen wurden, stammen von Larven, die im selben Gefäß gefärbt und in der gleichen experimentellen Sitzung bearbeitet wurden.

Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie

Für die hochauflösende strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (superresolution SIM, srSIM) wurden der monoklonale Maus Primärantikörper Brp^{Nc82} (1:250), ein Cy3-konjugierter Ziege Anti-Maus Sekundärantikörper (Jackson Immuno Research, West Grove, USA) und ein Cy5-konjugierter Ziege Anti-horseradish-peroxidase (α -hrp, Jackson Immuno Research) Antikörper (1:250) verwendet. Die Aufnahmen erfolgten an einem kommerziellen srSIM-Mikroskop (Zeiss ELYRA S.1, Plan-Apochromat 63x, NA 1,4). Die Laserbelichtung erfolgte für 100 ms in beiden Kanälen (561 und 642 nm). Für jeden Z-Stapel wurden 13-71 Ebenen mit 150 nm Abstand aufgenommen. Die hochaufgelösten Bilder wurden mit der ZEN 12 Software (black edition, Zeiss AG) rekonstruiert. Die restlichen Aufnahmen wurden mit einem ApoTome System (Carl Zeiss, Deutschland, Mikroskop Axiovert 200M Zeiss, Objektiv 63x Plan Apochromat, NA 1,4, Ölimmersion) durchgeführt. Hier wurden als weitere monoklonale Primärantikörper ein Maus Anti-GFP Antikörper (1:500, GFP-20, Sigma) und ein Maus Anti-V5 Antikörper (1:250-1:500, R960-25, Thermofisher, Waltham USA)

Material und Methoden

benutzt sowie ein Cy3-konjugierter Ziege α -hrp Antikörper (1:250, Jackson Immuno Research). Als Sekundärantikörper diente ein Alexa Fluor 488-konjugierter Ziege Anti-Maus Antikörper (1:250-1:500, Invitrogen, Carlsbad, USA).

dSTORM (*direct stochastic optical reconstruction microscopy*)

Die Präparate wurden wiederum mit dem monoklonalen Maus Antikörper Brp^{Nc82} (1:100, Antikörperregistrierungs-ID: AB_2314866, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, USA) und mit Alexa Fluor647-markierten Ziege Anti-Maus F(ab')₂-Fragmenten (1:500, A21237, Thermofisher) als Sekundärantikörper inkubiert. Die Boutons wurden mit Alexa Fluor488-konjugierten α -hrp Antikörpern (1:250) angefärbt. Weitere verwendete Antikörper waren eine monoklonarer Maus Anti-V5-Antikörper (1:500, R960-25, Thermofisher) sowie ein Sulfo-Cyanin 5-gekoppelter Anti-GFP-Nanobody (1:500, NanoTag Biotechnologies GmbH, Göttingen, Deutschland). Nach der Färbung wurden die Präparate in einem PBS-Puffer mit 100 mM Mercaptoethylamin (MEA, Sigma) und einem pH-Wert von 7,8 bis 7,9 inkubiert, um ein reversibles Schalten einzelner Fluorophore während der Datenerfassung zu ermöglichen (van de Linde et al., 2008; Ehmann et al., 2014). Die Filme wurden an einem inversen Mikroskop (Olympus IX-71, 60x, NA 1,49, Ölimmersion) aufgenommen, das mit einem Objektivrevolver (IX2-NPS, Olympus) ausgestattet war. Laser mit 647 nm (F-04306-113, MBP Communications Inc.) und 488 nm (iBEAM-SMART-488-S, Toptica) wurden zur Anregung von Alexa Fluor647 bzw. Alexa Fluor488 verwendet. Der Strahlengang führte jeweils durch einen Reinigungsfilter (Brightline HC 642/10, Semrock bzw. ZET 488/10, Chroma). Die Laserstrahlen wurden durch einen dichroitischen Spiegel (LaserMUX BS 473-491R, 1064R, F38-M03, AHF Analysentechnik) vereint und durch einen dichroitischen Anregungsfilter (HC Quadband BS R405/488/532/635, F73-832, AHF Analysentechnik) auf die Proben gelenkt. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit einem Quadband-Filter (HC-Quadband 446/523/600/677, Semrock) und einem Langpass- (Edge Basic 635, Semrock) oder Bandpassfilter (Brightline HC 525/50, Semrock) für den roten bzw. grünen Kanal gefiltert und unter Verwendung eines dichroitischen Spiegels (HC-BS 640 Imaging, Semrock) auf zwei Kameras (iXon Ultra DU-

897-U, Andor) aufgeteilt. Die Bildauflösung betrug 126 bis 127 nm pro Pixel im hochaufgelösten, roten Kanal. Die Lokalisierung der einzelnen Blinkereignisse und die Rekonstruktion der hochaufgelösten Bilder erfolgte mit der rapidSTORM-Software (Wolter et al., 2012; Heilemann et al., 2008; van de Linde et al., 2011, www.super-resolution.de). Es wurden nur Fluoreszenzereignisse mit einem A/D-count von 12000 oder mehr analysiert und ein Subpixel-Binning von 10 nm pro Pixel angewendet. Zur Visualisierung repräsentativer dSTORM-Messungen wurden rekonstruierte Bilder aus rapidSTORM mit 5-nm-Binning in Fiji geöffnet und der Kontrast erhöht. Die Lokalisationspräzision wurde mit dem NeNa-Algorithmus (Nearest Neighbor Based Analysis, Endesfelder et al., 2014) bestimmt, der im LAMA-Softwarepaket (LocAlization Microscopy Analyzer, Malkusch und Heilemann, 2016) implementiert ist. Um eine homogene Ausleuchtung der Proben zu überprüfen, wurde die Helligkeit der Lokalisationen aller dSTORM-Messungen (i) für das gesamte Bild und (ii) nur für die ausgewerteten Bereiche analysiert und verglichen und dabei wurden keine Unterschiede in den A/D-counts zwischen den Versuchsgruppen festgestellt.

Konfokale Mikroskopie

Die Präparation, Fixierung und Färbung für die konfokale Bildgebung erfolgten analog zur dSTORM-Bildgebung. Die Präparate wurden in PBS eingebettet und die Aufnahmen wurden an einem kommerziellen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 700, Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil M27) durchgeführt. Die Anregung von Alexa Fluor647 und Alexa Fluor488 erfolgte mit 639 nm bzw. 488 nm Dioden-Lasern. Zur Steuerung des Mikroskops diente die ZEN 12 Software (black edition, Zeiss AG). Für jeden Z-Stapel wurden 7-13 Ebenen mit 200 nm Abstand aufgenommen. Für den roten und grünen Laser wurden der Master Gain auf 700 bzw. 600 und die Laserpower auf 1,5 % bzw. 1 % eingestellt. Damit wurde eine gute Bildqualität mit geringem Bleichen der Farbstoffe erreicht, um die anschließende Bildgebung mit dSTORM zu gewährleisten. Die Pinhole-Öffnung wurde auf 70,6 μm , entsprechend 1,32 Airy-Einheiten im roten und 1,73 Airy-Einheiten im grünen Kanal, eingestellt. Als Datenformat wurde 1024 x 1024 (Zeilen x Pixel), entsprechend 16-Bit Datentiefe, gewählt. Aufgrund der theoretisch möglichen lateralen Auflösung

Material und Methoden

von etwa 200 nm im roten Kanal wurde eine Pixelgröße von ca. 83 nm mit einem Zoom-Faktor von 1,2 eingestellt, um dem Nyquist-Theorem gerecht zu werden. Insgesamt resultierte die gewählte Konfiguration in einer Pixelverweildauer von 3,15 μ s.

Auswertung

srSIM-Daten wurden mit der Software Fiji (vormals ImageJ, 1.51w, NIH) analysiert. Um die Anzahl der aktiven Zonen pro NMJ und pro Bouton zu quantifizieren, wurden Maximalprojektionen der Z-Stapel erzeugt und Brp-positive AZs wurden manuell gezählt. Die Zuordnung zu einzelnen Boutons von distal nach proximal erfolgte unter Verwendung des α -hrp-Signals. Die Boutons wurden von distal nach proximal nummeriert, wobei der am weitesten distal gelegene Bouton als Nummer 1 bezeichnet wurde. Für die Darstellung der ApoTome-Aufnahmen wurden ebenfalls Maximalprojektionen der Z-Stapel erzeugt und anschließend der Kontrast optimiert.

Die Lokalisationsdaten wurden mit einem speziell dafür programmierten Python-Code (<https://www.python.org/>, Version 3.6) und der webbasierten Python-Oberfläche Jupyter (<https://jupyter.org/index.html>) ausgehend von Lokalisationstabellen aus rapidSTORM analysiert. Zugang zum programmierten Code und zu Beispieldaten findet sich im Anhang dieser Arbeit. Mit der Software Fiji wurden anhand der rekonstruierten Bilder aus rapidSTORM Masken erstellt, um die auszuwertenden Bereiche (region of interest, ROI), d. h. die distalen 6 Boutons gemäß der α -hrp-Färbung, vor der pythonbasierten Analyse zu definieren. In früheren Arbeiten zu hochaufgelösten Brp-Daten wurde zur Identifizierung von AZ-Subclustern dichte-basiertes Clustering (density-based spatial clustering of application with noise, DBSCAN) angewandt (Ehmann et al., 2014). Unter Berücksichtigung der Parameter k und ϵ betrachtet DBSCAN eine Gruppe von Lokalisationen als Cluster, wenn sich mindestens k Lokalisationen in einem Kreis mit einem Radius ϵ um eine bestimmte Lokalisation befinden (Ester et al., 1996, Vgl. Abschnitt **3.2**). Hier wurde eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes verwendet, der als hierarchisches dichte-basiertes räumliches Clustering von Anwendungen mit Rauschen (hierarchical density-based spatial clustering of applications with noise,

HDBSCAN) bezeichnet wird und im Gegensatz zu DBSCAN die robustesten Cluster aus einer Clusterhierarchie über verschiedene ϵ -Umgebungen extrahiert, die für ϵ -Variationen am wenigsten empfänglich sind, d. h. die längste Lebensdauer im Clusterbaum aufweisen (Campello et al., 2013). Der Algorithmus ist dadurch für die Clustererkennung in Daten mit variabler Dichte optimiert. In dieser Arbeit wurde die Python-Implementierung von HDBSCAN (McInnes et al., 2017; <https://github.com/scikit-learn-contrib/hdbscan>) verwendet, bei der die minimale Clustergröße der wichtigste freie Parameter ist. Es wurden zwei Ebenen des Clusterings mit verschiedenen Werten für die minimale Clustergröße durchgeführt: (i) um die AZs zu identifizieren und (ii) um die Subcluster aus den AZs zu extrahieren. Um optimale Clusterparameter für die Erkennung aktiver Zonen zu finden, wurde der Parameter minimale Clustergröße variiert. HDBSCAN in Python verwendet einen weiteren Parameter namens `minimum samples`. Standardmäßig ist dieser Parameter auf die minimale Clustergröße eingestellt. Durch Auswahl eines kleineren Werts kann der Algorithmus jedoch weniger konservativ sein, d. h. Cluster extrahieren, die möglicherweise kleiner als die minimale Clustergröße sind, aber in der Clusterhierarchie sehr robust sind. `minimum samples` wurde als konstanter Anteil von 25 % der minimalen Clustergröße variiert. Wie erwartet führt eine Erhöhung der minimalen Clustergröße auch dazu, dass die Clustergrößen tendenziell zunehmen. Die visuelle Überprüfung der Ergebnisse der Clusteranalysen führte zu dem Schluss, dass eine minimale Clustergröße von 100 die zuverlässigsten Ergebnisse für die AZ-Erkennung liefert. Zu hohe Werte führen zu einem Verschmelzen benachbarter AZs, während zu niedrige Werte dazu führen, dass AZs in kleinere Cluster fragmentiert werden. Ein zweiter HDBSCAN der einzelnen AZ-Cluster wurde mit einer minimalen Clustergröße von 24 durchgeführt, und eine ähnliche Anzahl von Subclustern wurde im Vergleich zur DBSCAN-basierten Subclusteranalyse von Ehmann et al., 2014 gefunden. Für die Subclusteranalyse wurde die Clusterauswahlmethode „leaf clustering“ verwendet, die eine Tendenz zu homogeneren Clustern aufweist, indem diejenigen extrahiert werden, die an Knotenpunkten des Clusterbaums liegen. Um die Clusterfläche zu quantifizieren, wurden 2D-alpha-shapes mit CGAL (The Computational Geometry Algorithms Library, <https://www.cgal.org>) in Python berechnet. Alpha-shapes können verwendet werden, um die Form

Material und Methoden

und damit die Fläche einer Punktwolke zu berechnen. Bei einer endlichen Menge von Punkten und einem Alpha-Wert α wird eine Begrenzung der Alpha-shape zwischen zwei Punkten gezeichnet, wenn sie auf einem Kreis mit Radius $\alpha^{1/2}$ liegen, der keine weiteren Punkte enthält (Edelsbrunner & Mücke, 1994). Um die Alpha-shapes der AZ-Cluster und AZ-Subcluster zu erhalten, wurden α -Werte von 800 nm^2 bzw. 300 nm^2 gewählt. Der Massenmittelpunkt des Subclusters (center of mass, c. o. m.) wurde als Mittelwert der x- und y-Koordinaten aller Lokalisationen des Subclusters und das AZ-c. o. m. als Mittelwert seiner Subcluster-c. o. m.s berechnet. Damit konnte die Entfernung der Subcluster vom Zentrum der AZ abgeschätzt werden, indem der euklidische Abstand dieser Punkte berechnet wurde. Um die flächennormierte Entfernung zu erhalten, wurde dieser Abstand durch die Quadratwurzel der jeweiligen AZ-Fläche dividiert. Zur Auswertung der Brp-Cluster-Zirkularität wurde das Verhältnis der Eigenwerte jedes Clusters berechnet, wobei 1 einen perfekten Kreis anzeigt und Werte < 1 eine abnehmende Zirkularität anzeigen. Ausschlusskriterien für Ausreißer in allen *d*STORM-Datenauswertungen waren AZ-Fläche $< 0,03 \text{ } \mu\text{m}^2$ (Ehmann et al., 2014) und $> 0,3 \text{ } \mu\text{m}^2$, absolute Lokalisationszahlen pro AZ > 8000 und mittlere AZ-Lokalisationsdichte > 60000 Lokalisationen pro μm^2 (etwa 3-5-facher Median). Zusätzliche Ausschlusskriterien für Aufnahmen an Ib-Neuronen waren eine mittlere AZ-Lokalisationszahl < 1000 und gleichzeitig eine mittlere AZ-Fläche $< 0,095 \text{ } \mu\text{m}^2$ pro Bild als Hinweis auf unzureichende Datenqualität. Zur Visualisierung des lokalisationsbasierten Analysealgorithmus wurden Punktdiagramme in Python erstellt. H-Funktionen als Ableitungen von Ripleys K-Funktion wurden mit dem Python-Paket Astropy (Robitaille et al., 2013) für jede einzelne AZ und für eine zufällige Poisson-Verteilung berechnet und die Kurven für die Auswertung gemittelt. Die Funktion wurde in nm-Schritten für Radien von 0 bis 120 nm ausgewertet. Für die Nächste-Nachbarn-Analyse (nearest neighbour analysis) wurde Scikit Learn (Pedregosa et al., 2011) verwendet und die mittlere Entfernung zum nächsten Nachbarn (nearest neighbor distance, NND) aller Lokalisationen pro AZ berechnet.

Zur Simulation konfokaler Auflösung wurden Lokalisationstabellen aus rapid*d*STORM mit 5-nm-Binning in Fiji-lesbare Dichtematrizen konvertiert, wobei

die rohe integrierte Dichte (raw integrated density) der Lokalisationszahl in einem Pixel entspricht. Die Bilder wurden auf 0,1 % gesättigte Pixel kontrastverstärkt, ein Gauß'scher Filter mit 150 nm Standardabweichung wurde angewendet und die Bilder wurden auf eine Pixelgröße von 80 nm skaliert. Repräsentative Bilder wurden für beide Versuchsgruppen ausgewählt und es wurden nur Pixel in denselben ROIs wie oben beschrieben für die anschließende Prozessierung und Analyse verwendet. Die Bilder wurden in 8-Bit konvertiert und alle Pixel in beiden Bildern wurden auf den gleichen Wert skaliert (der hellste Wert aller analysierten Pixel aus beiden Bildern wurde auf den Maximalwert von 255 eingestellt). Nach einem Standardprotokoll zur Quantifizierung von konfokalen Daten an der *Drosophila*-NMJ (Schmid et al., 2008; Weyhermüller et al., 2011) wurde ein Mindestschwellenwert von 50 a. u. (arbitrary units) angewendet und die Funktion „Analyze particles...“ in Fiji genutzt, wodurch individuelle Masken entstanden. Die resultierenden Masken wurden auf die Originalbilder angewendet, um die AZ-Fläche sowie die mittlere Pixelintensität der AZ zu quantifizieren. Für die Simulation von STED-Auflösung wurde ein Gauß'scher Filter von 25 nm verwendet. Die Intensität wurde nicht skaliert, da 8-bit bereits ausgenutzt waren. Fläche und mittlere Pixelintensität pro AZ wurden mit einem Schwellenwert von 18 a. u. (Böhme et al., 2019) ermittelt und Intensitätsmaxima wurden in Fiji mit der Funktion „Find Maxima...“ bestimmt und pro AZ gezählt.

Die konfokalen Aufnahmen wurden in Fiji prozessiert und ausgewertet. Maximalprojektionen der Z-Stapel wurden erstellt. Die Segmentierung des Brp-Signals erfolgte wiederum grenzwertbasiert im 8-Bit-Raum mit der Funktion „Analyze particles...“ mit Grenzwerten von 50, 100 und 150 a. u. (Abb. 22A). Die entstandenen Masken wurden auf die Originalbilder angewandt, um die mittlere Pixelintensität pro AZ zu vermessen. Mit 100 a. u. extrahierte AZs wurden den entsprechenden Brp-Lokalisationsclustern der nachgeschalteten *d*STORM-Aufnahmen manuell zugeordnet. Nur eindeutig einander zuzuordnende AZs wurden in die korrelative Quantifizierung einbezogen.

2.3 Molekularbiologie

Zur Erstellung transgener Fliegen wurde das CRISPR/Cas9-System verwendet. Hierzu wurden modifizierte Protokolle und Reagenzien aus den O'Connor-Giles- (Brown University), Harrison- (University of Wisconsin-Madison) und Wildonger- (University of Wisconsin-Madison) Laboren genutzt (Gratz et al., 2013; Gratz et al., 2015; <http://flycrispr.molbio.wisc.edu/>). Für die gezielte genetische Modifikation wurden jeweils zwei Plasmide mit gRNAs (guidance ribonucleic acids) und ein Reparaturkonstrukt für die homologe Rekombination erstellt. Als Ausgangsvektor für die Klonierung der gRNAs wurde *pU6-BbsI-chiRNA*, das von hier an als *pTL621* bezeichnet wird, genutzt. Für die Klonierung der Reparaturkonstrukte wurde die *attP*-Sequenz (Groth et al., 2004) aus *pHD-DsRed-attP* entfernt. Dieses modifizierte Plasmid wurde von Prof. Tobias Langenhan zur Verfügung gestellt und wird von hier an als *pTL715* bezeichnet. Alle Transformationen wurden mit dem kompetenten *Escherichia coli* Stamm XL-Blue und einem standardisierten Hitzeschock-Protokoll durchgeführt. Alle Plasmid-Injektionen in *Drosophila*-Embryonen erfolgten durch die Firma BestGene (BestGene Inc, Chino Hills, Kalifornien, USA). Informationen und Zugang zu den vollständigen Sequenzen der generierten Plasmide befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

gRNA-Plasmide

Zur Identifizierung der CRISPR-Zielsequenzen für das gezielte Schneiden der Cas9-Endonuklease wurde der CRISPR Optimal Target Finder benutzt (<http://targetfinder.flycrispr.neuro.brown.edu/>). *pTL621* wurde mit dem Restriktionsenzym BbsI (New England Biolabs, NEB, Ipswich Massachusetts, USA) verdaut und mit der Antarctic Phosphatase (NEB) dephosphoryliert. Die DNA-Primer mit den Sequenzen der gRNAs wurden mit einer 5'-Phosphatgruppe und HPLC (high pressure liquid chromatography)-Aufreinigung bestellt (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) und mit einer Konzentration von 100 µM verwendet. Zur Anlagerung der gegenläufigen Primer wurden je 1 µl der beiden Primer mit 1 µl T4-Ligase-Puffer (NEB) und 7 µl destilliertem Wasser versetzt. Das Gemisch wurde für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und danach durch Abschalten des Hitzeblocks langsam auf

Material und Methoden

Raumtemperatur (25 °C) abgekühlt. 1 µl des Ansatzes wurde mit etwa 50 ng des verdauten pTL621, 1 µl T4-Ligase-Puffer (NEB) und 1µl T4-DNA-Ligase (NEB) versetzt und mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und die Ligation erfolgte in der Regel bei 16 °C über Nacht. Folgende Primer wurden verwendet: cttcgtatacatgttaagcatggt, aaacaccatgcttaacatgtatac, cttcggattgtggagtctgcataa, aaacttatgcagactccacaatcc (für Cacophony, Plasmide: *pAM48*, *pAM49*); cttcgcacatccatagggtccgacaga, aaactctgtcggacctatggatgc, cttcgaacacctgcccgcctcgttc, aaacgaacgagcgggcaggtgttc (für Ca-beta, Plasmide: *pAM54*, *pAM55*).

Reparaturkonstrukte

Zur Erstellung der mit einem EGFP (enhanced GFP) oder V5-Tag versehenen Cacophony-Konstrukte wurde ein 1,9 Kilobasen (kb) großes PCR-Fragment (Primer *am_135f* + *am_136r*) aus genomischer DNA von *w¹¹¹⁸* amplifiziert. Das Fragment und *pTL715* wurden mit AarI (ThermoFisher) verdaut und ligiert und das entstehende Plasmid mit AvrII (NEB) verdaut. Nun wurde ein 3,7 kb großes Fragment (Primer *am_177f* + *am_178r*) amplifiziert, mit AvrII geschnitten und mit dem zuvor entstandenen Plasmid ligiert. Das entstandene Produkt wurde mit SgfI (Promega, Mannheim Deutschland) geschnitten. Zum Einbringen von EGFP und V5 ohne Restsequenzen direkt nach dem Stop-Codon des *cacophony*-Gens wurden Plasmide synthetisiert (Eurofins Genomics), mit SgfI geschnitten und ein 1 kb bzw. 0,4 kb großes Fragment in den zuvor geschnittenen Vektor ligiert (Plasmide: *pAM46*, *pAM47*). Zur Herstellung der Ca-beta-Konstrukte wurden ein 1,4 kb Fragment (Primer *am_159f* + *am_160r*) und ein 3 kb Fragment (Primer *am_143f* + *am_144r*) in zwei Schritten mittels SLIC (sequence and ligase independent cloning, Primer für den Plasmid-Backbone *am_157r* + *am_158f*; https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/cloning_methods/lic/) bzw. Restriktionsverdau mit SapI (NEB) in *pTL715* kloniert. Zum Einbringen von EGFP ohne Restsequenzen direkt nach den konservierten Aminosäuren WKATH wurden wiederum ein Plasmid synthetisiert und ein 1,3 kb großes Fragment mittels Verdau mit EcoNI (NEB) in den zuvor entstandenen Vektor ligiert (Plasmid: *pAM53*). Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen der verwendeten Primer aufgelistet:

Material und Methoden

am_135f agtccacctgcagtctcgcgtcatccgcggtatccaagagg
am_136r agtccacctgcagtcttatcatatctgtggtagtaactggg
am_177f agtccctagggcaggcaatggtccagtattgtttttg
am_178r agtccctagggatcggaaagtgtgagaggagc
am_159f ctaattatgggggtgtcgcccttcgcctcggaggccattatatcggcc
am_160r tatagcatacattatacgaagttatcgatctgctggtggattcggc
am_143f agtcgctcttcgtagtcttagactgcttgatattccc
am_144r agtcgctcttcggaccgggaaagtcttaagtaaagcc
am_157r gcgaagggcgacaccccataat
am_158f ataacttcgtataatgtatgc

2.4 Statistik

Statistische Analysen wurden mit Sigma Plot 13 (Systat Software) durchgeführt. Der Shapiro-Wilk-Test wurde verwendet, um die Verteilung der Daten zu analysieren. Wenn die Daten nicht normal verteilt waren, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Rangsummentest zur statistischen Analyse angewendet und die Daten als Median (25.-75. Perzentil) angegeben, sofern nicht anders beschrieben. Wenn die Daten normal verteilt waren, wurde ein t-Test gerechnet und die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler (standard error of the mean, SEM) dargestellt, sofern nicht anders angegeben. Sternchen weisen auf statistische Signifikanz hin (p -Wert $< 0,05$) und n bezeichnet die Stichprobengröße. In Boxdiagrammen stehen horizontale Linien für den Median, Boxbegrenzungen für Quartile und Whisker für das 10. und 90. Perzentil. Punktdiagramme zeigen einzelne Datenpunkte, sofern nicht anders angegeben. Histogramme wurden normalisiert, indem die absolute Anzahl in einer Klasse durch die Anzahl aller beobachteten Ereignisse geteilt wurde. Lineare Regressionen wurden in Sigma Plot erstellt und die Spearman-Korrelation wurde verwendet, um die statistische Signifikanz der Korrelationen zu bewerten. Alle Diagramme wurden mit der Sigma Plot-Software oder in Python erstellt. Die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit Adobe Illustrator (Adobe, Release 2015.1.1).

3 Ergebnisse

3.1 Hochauflösende Bildgebung aktiver Zonen

Darstellung präsynaptischer Feinstrukturen

Die räumliche Ausdehnung aktiver Zonen umfasst wenige hundert Nanometer. Um detaillierte Vorstellungen von der molekularen Architektur aktiver Zonen zu gewinnen, ist daher Bildgebung jenseits der Abbe'schen Begrenzung von im besten Fall ca. 200 nm notwendig. Wie in der Einleitung beschrieben gibt es in diesem Bereich seit einigen Jahren technologische Fortschritte. Hierzu zählt die hochaufgelöste strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (srSIM) mit einer lateralen Auflösung von etwa 100 nm. Abbildung 7A zeigt beispielhaft eine srSIM-Aufnahme der neuromuskulären Synapse von *Drosophila melanogaster* an einer Wildtyp-Larve des Stammes *w¹¹¹⁸* an den Rumpfwandmuskeln 6 und 7. Die neuronale Membran wurde mit einem Cy5-gekoppelten α -hrp Antikörper sichtbar gemacht und die aktiven Zonen wurden mit dem monoklonalen Antikörper Brp^{Nc82} in Kombination mit einem Cy3-gekoppelten Ziege Anti-Maus Sekundärantikörper angefärbt. Auf diesem Level der Auflösung ist bereits die Differenzierung in zwei morphologisch unterscheidbare Motoneurone zu erkennen, verdeutlicht durch die herausvergrößerten Boutons in Abbildung 7B. Die tonischen Ib-Boutons sind größer und haben größere AZs während die phasischen Is-Boutons kleiner sind und kleinere AZs aufweisen (Vgl. 1.2, Ehmann et al., 2014; Paul et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Brp in Ib AZs nicht homogen verteilt ist und etwa 15 Subcluster bildet (Ehmann et al., 2014). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf dieser Ebene der Feinstruktur eine vergleichende Analyse der strukturellen Differenzierung zwischen Ib- und Is-AZs durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde Lokalisationsmikroskopie angewendet, die Bildgebung auf Einzelmolekülebene ermöglicht.

Lokalisationsmikroskopie der aktiven Zone

Abbildung 8A zeigt dSTORM-Aufnahmen eines repräsentativen Ib-Boutons (links) sowie einer herausvergrößerten AZ (rechts). Es handelt sich hierbei um die Bildausgabe der Prozessierungssoftware rapidSTORM mit 5 nm Pixeln (siehe Abschnitt 2.2). Diese Darstellung wird in dieser Arbeit als Rohdaten

Ergebnisse

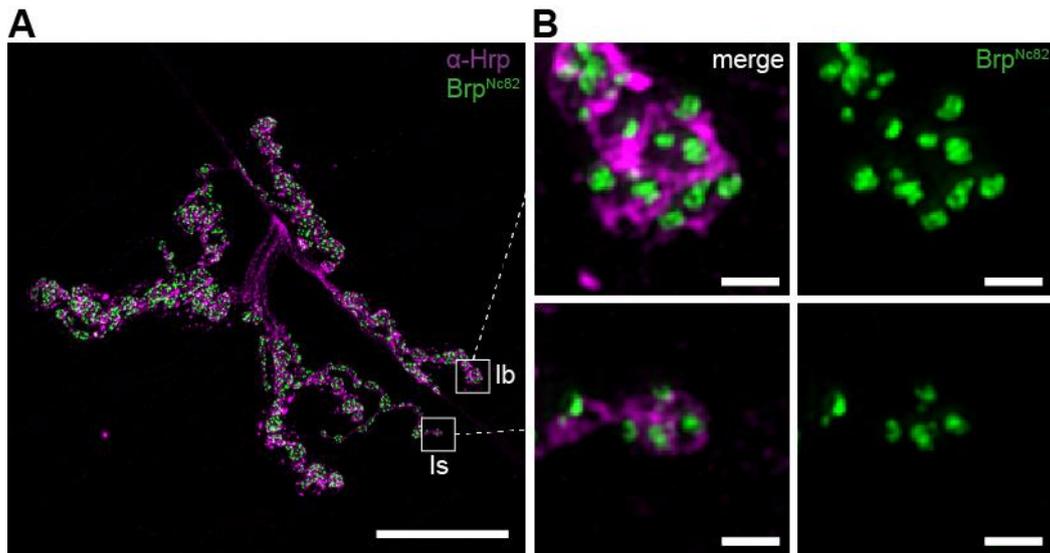


Abb. 7: Hochaufgelöste strukturierte Beleuchtungsmikroskopie an der *Drosophila* NMJ

A Übersichtsbild einer repräsentativen NMJ der Rumpfwandmuskeln 6 und 7 einer männlichen *Drosophila melanogaster* Wildtyp-Larve (w^{1118}) im dritten Entwicklungsstadium. Das AZ-Protein Bruchpilot wurde mit dem primären, monoklonalen Maus Antikörper Brp^{Nc82} sowie einem Cy3-gekoppelten Ziege Anti-Maus Sekundärantikörper angefärbt (grün) und die präsynaptische Membran mit einem Cy5-gekoppelten α -hrp Antikörper (magenta). Die weißen Boxen entsprechen den vergrößerten Bereichen in **B**. Skala 20 μ m.

B Vergrößerte Ib- (oben) und Is-Boutons (unten) entsprechend der weißen Boxen in **A**. Skala 1 μ m.

betrachtet. In Abbildung 8B wiederum ist die gleiche Art der Visualisierung für einen Is-Bouton sowie eine Is-AZ zu sehen. Exemplarisch sind hier die bereits erwähnten Unterschiede zwischen den AZs der beiden Motoneurontypen zu erkennen. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, lokalisationsmikroskopische Daten pixelbasiert zu analysieren (Paul et al., 2015; Ehmann et al., 2014). In den zitierten Arbeiten wurden die räumlichen Ausmaße einzelner Objekte mit auf Intensitätsgrenzwerten basierender Bildsegmentierung quantifiziert. Dies kann z. B. mit der Software Fiji und der Funktion „Analyze particles...“ durchgeführt werden. Um AZs in Lokalisationsdaten als zusammenhängende Objekte zuverlässig zu erkennen, wurde ein Gauß'scher Filter verwendet, wodurch auf der einen Seite die Fragmentierung zusammenhängender Objekte verhindert, auf der anderen Seite jedoch die Auflösung verschlechtert wurde. Dies kommt besonders bei der Untersuchung subtiler Änderungen zwischen

Ergebnisse

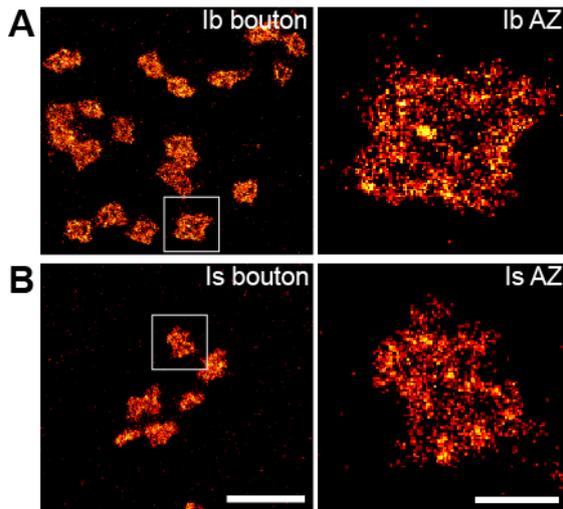


Abb. 8: Darstellung der Substruktur aktiver Zonen mit dSTORM

A Repräsentative dSTORM-Aufnahme eines Ib-Boutons (links) einer *Drosophila* Wildtyp-NMJ, angefärbt mit dem Antikörper Brp^{Nc82}, der mit Alexa Fluor647-gekoppelten F(ab')₂-Fragmenten sichtbar gemacht wurde. Die weiße Box markiert die vergrößerte AZ (rechts).

B dSTORM-Aufnahme eines Is-Boutons wie in **A**. Skala 1 μm (links) und 200 nm (rechts) für **A, B**.

experimentellen Gruppen zum Tragen, wie in Abschnitt 3.4 noch weiter ausgeführt wird. In dieser Arbeit sollte daher eine Quantifizierung anhand der Lokalisationskoordinaten erarbeitet werden. Zentrale Aspekte zur Entwicklung neuer Analysewerkzeuge auf Grundlage von dichte-basiertem Clustering zur schnellen und objektiven Quantifizierung werden im nächsten Abschnitt erläutert.

3.2 Analyse lokalisationsmikroskopischer Daten

HDBSCAN

Der rasante Fortschritt hochauflösender bildgebender Verfahren bewirkte einen großen Bedarf an spezialisierter Software, um die entstehenden Daten angemessen auszuwerten. Da in der vorliegenden Arbeit in erster Linie das lokalisationsmikroskopische Verfahren dSTORM angewandt wurde, konzentriert sich die folgende Darstellung einiger aktueller Fortschritte auf diesem Gebiet auf hierfür relevante Punkte. Aufgrund der Verwandtschaft der Methodik und Fragestellung dieser Arbeit zu Ehmann et al., 2014 stellt dichte-basiertes Clustering den Ausgangspunkt der Ausführungen dar. Ein prominentes Beispiel ist der Clusteralgorithmus DBSCAN (density-based spatial clustering of applications with noise). DBSCAN wurde bereits zur Analyse lokalisationsmikroskopischer Daten angewendet (Ehmann et al., 2014; Rahbeck-Clemmensen et al., 2017; Szoboszlay et al., 2017, Rebola et al., 2019). Abbildung 9 stellt schematisch die Funktionsweise von DBSCAN dar und

Ergebnisse

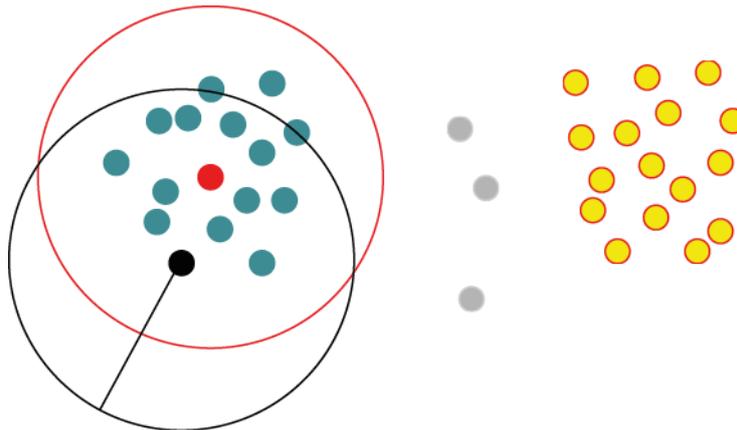


Abb. 9: Arbeitsweise von DBSCAN

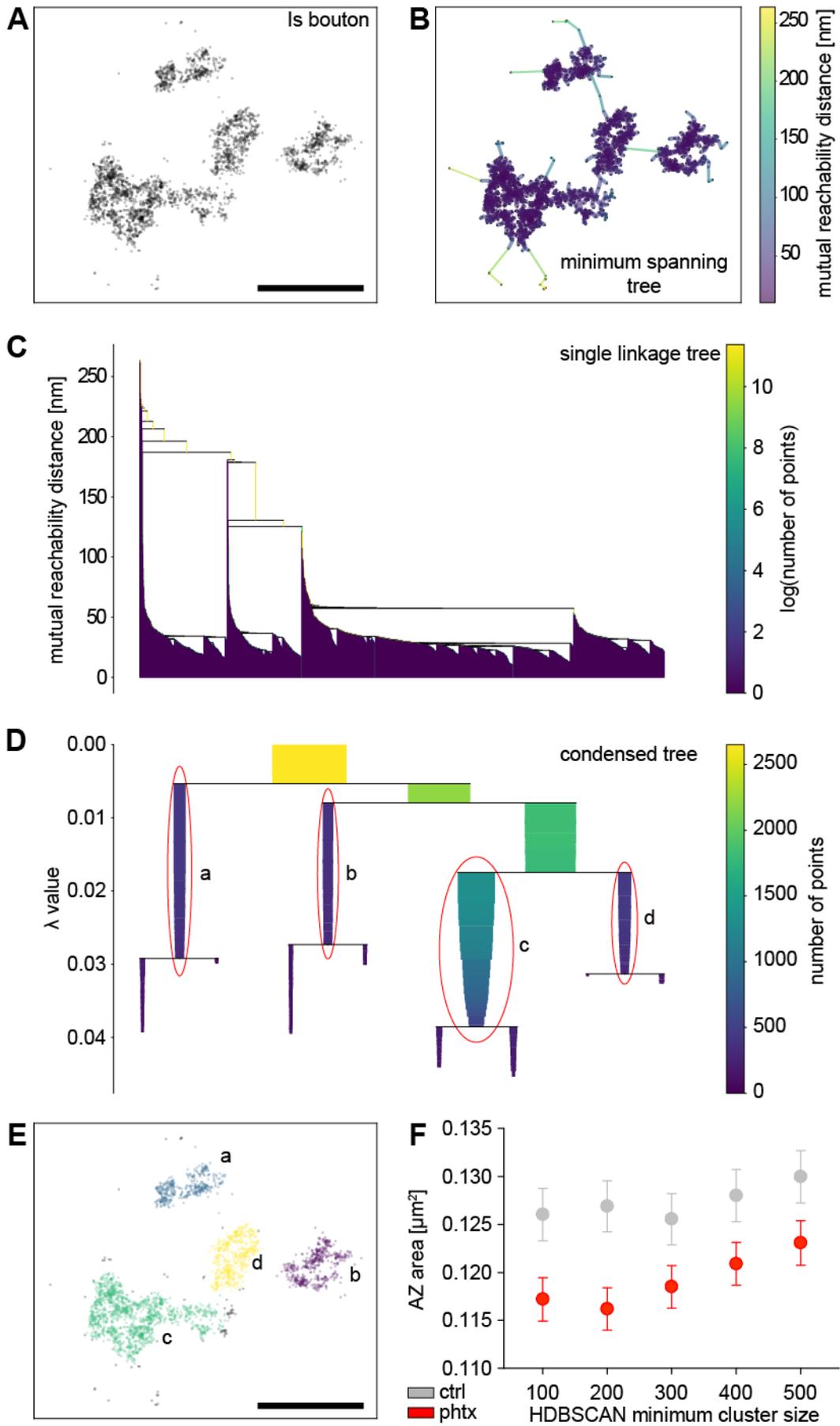
Schematische Darstellung zur Funktionsweise von DBSCAN (siehe Abschnitt 3.2 für die detaillierte Erläuterung). Die Radien des roten und schwarzen Kreises entsprechen ϵ . Der rote, der schwarze und die blauen Punkte entsprechen gemeinsam einem durch DBSCAN ermittelten Cluster für $k = 16$. Dasselbe trifft auf die gelben Punkte zu. Die grauen Punkte hingegen haben keine Clusterzugehörigkeit.

soll hier einer kurzen Erläuterung dienen. Zunächst werden ausgehend von einer Lokalisation (roter Punkt in Abb. 9) zwei Parameter definiert, eine Lokalisationsanzahl k (in diesem Beispiel 16) und ein Radius ϵ . Nun wird ein Kreis des Radius ϵ mit der Lokalisation als Mittelpunkt gebildet und die Anzahl an Lokalisationen innerhalb dieses Kreises ermittelt. Ist diese Anzahl $\geq k$ so bekommt die Lokalisation den Status der Clusterzugehörigkeit. Der Algorithmus wandert nun zur nächsten, übernächsten usw. Lokalisation im Kreis und prüft erneut die erläuterten Kriterien bis eine Lokalisation erreicht wird, die die Kriterien nicht mehr erfüllt und damit zu einer Randlokalisierung wird. Der Lokalisationscluster endet hier. Die schwarze Lokalisation in Abbildung 9 stellt diesen Fall exemplarisch dar. Während die blauen Lokalisationen die o. g. Kriterien erfüllen, beinhaltet der Kreis mit Radius ϵ und der schwarzen Lokalisation als Mittelpunkt weniger als k Lokalisationen. Obwohl der Algorithmus DBSCAN ein vergleichsweise robustes Clustering liefert (Szoboszlai et al., 2017) weist er gewisse Probleme auf. Aufgrund der gegebenen Parameter wird eine feste Dichte der Cluster definiert (k Lokalisationen pro Kreisfläche mit Radius ϵ). Bei homogener Dichte der Daten ist das unproblematisch, bei schwankender Dichte kann dies jedoch zu erheblichen Fehlern führen. Diesem Punkt wird bei der aktuelleren Weiter-

Ergebnisse

entwicklung HDBSCAN (hierarchical density-based spatial clustering of applications with noise, Campello et al., 2013) Rechnung getragen. Vereinfacht ausgedrückt wird hier eine Clusterhierarchie über variierende ϵ -Umgebungen erstellt, aus der dann die stabilsten Cluster extrahiert werden. Wie bereits erwähnt wurde in dieser Arbeit die pythonbasierte Implementierung von HDBSCAN angewendet (McInnes et al., 2017). Zunächst soll eine kurze Erläuterung des Algorithmus anhand lokalisationsmikroskopischer Daten erfolgen (Abb. 10). Das bereits in der Einleitung erwähnte Aktive-Zonen-Protein Brp wurde mit dem monoklonalen Antikörper Brp^{Nc82} und einem Alexa Fluor 647-gekoppelten F(ab')₂-Fragment angefärbt (siehe Abschnitt 2.2). Als Beispiel wurde ein präsynaptischer Bouton eines Is-Neurons gewählt, da hier eine kleine Anzahl an aktiven Zonen vorliegt und die Visualisierung der einzelnen Schritte des HDBSCAN besser nachzuvollziehen ist. Abbildung 10A zeigt die Koordinaten der Brp-Lokalisationen als Punktdiagramm. In Abbildung 10B ist der daraus berechnete minimale Spannbaum (minimal spanning tree, https://hdbscan.readthedocs.io/en/latest/how_hdbscan_works.html) zu sehen. Der Farbbalken kodiert für die Gegenseitige-Erreichbarkeits-Distanz (mutual reachability distance) der einzelnen Lokalisationen. Vereinfachend ausgedrückt handelt es sich hierbei um eine gewichtete Entfernung zweier Punkte. Durch Definition eines freien Parameters k wird die sog. Kern-Distanz (core distance) jeder Lokalisation festgelegt und zwar als Radius des Kreises mit dieser Lokalisation als Mittelpunkt, der $k+1$ Lokalisationen beinhaltet. Die Gegenseitige-Erreichbarkeits-Distanz wird vom tatsächlichen Abstand zweier Punkte sowie der Kern-Distanz abgeleitet. Ist der tatsächliche Abstand zweier Lokalisationen größer oder kleiner als die Kern-Distanz beider Lokalisationen, so entspricht die Gegenseitige-Erreichbarkeits-Distanz diesem Abstand. Liegt der tatsächliche Abstand zwischen den beiden Kern-Distanzen, so nimmt die Gegenseitige-Erreichbarkeits-Distanz den Wert der größeren Kern-Distanz an. Somit erhält man ein Maß, bei dem dichte Lokalisationen ihren Abstand beibehalten und weniger dichte Lokalisationen voneinander entfernt werden. Ordnet man die Lokalisationen aufsteigend nach diesem Maß der Distanz und führt sie Stück für Stück zu Clustern zusammen, erhält man die Clusterhierarchie wie in Abbildung 10C gezeigt. Grob gesagt entsprechen die Cluster beim DBSCAN denjenigen, die man mithilfe einer horizontalen Linie auf

Ergebnisse



(Forts. Seite 34)

Abb. 10: HDBSCAN Prinzip und Robustheit

A Punktdiagramm der Brp-Lokalisationen eines Is-Boutons. Skala 500 nm.

B Minimaler Spannbaum der Lokalisationen in **A**, der mit HDBSCAN in Python (minimale Clustergröße 100, minimum samples 25, Clusterauswahlmethode „excess of mass“, siehe Abschnitt 2.2) berechnet wurde. Die Farbe der Verbindungslinien zwischen den Lokalisationen stellt anhand des Farbbalkens die Gegenseitige-Erreichbarkeits-Distanz dar.

C Clusterhierarchie (single linkage tree), die basierend auf der Gegenseitige-Erreichbarkeits-Distanz erstellt wurde.

D Kondensierte Clusterhierarchie, die anhand der minimalen Clustergröße aus dem single linkage tree berechnet wurde. Rote Kreise markieren die robustesten Cluster in diesem Beispiel und die kleinen Buchstaben dienen der Zuordnung zu **E**.

E Die gleichen Lokalisationen wie in **A** mit individuellen Clustern in verschiedenen Farben und kleinen Buchstaben zur Zuordnung zu **D**. Skala 500 nm.

F Punktdiagramme (Mittelwert \pm SEM) zeigen die AZ-Fläche in Abhängigkeit variiertes minimaler Clustergröße für HDBSCAN, wobei minimum samples stets 25 % der minimalen Clustergröße betrug, für Kontrolle (ctrl, grau) und PhTx-behandelte Gruppe (phtx, rot) in Ib-Boutons der Muskeln 6 und 7. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigen eine von der Parametervariation unabhängige Tendenz und werden als robust angesehen. Alle im Graphen enthaltenen Daten wurden auf die gleiche Weise gefiltert (siehe Abschnitt 2.2).

Höhe einer bestimmten Distanz (entspricht ϵ) in der Clusterhierarchie schneiden würde. Der nächste Schritt des HDBSCAN ist die Erstellung der kondensierten Clusterhierarchie (Abb. 10D) mittels des Parameters minimale Clustergröße. Ausgehend vom größten Cluster (enthält alle Lokalisationen) der ursprünglichen Hierarchie wird an jedem Knotenpunkt berechnet, ob die Cluster der nächsten Ebene die minimale Clustergröße aufweisen und nur wenn dies der Fall ist, zerfällt der größere Cluster in kleinere Cluster. Der sog. λ -Wert (Abb. 10D) ist der Kehrwert der Gegenseitige-Erreichbarkeits-Distanz. Abschließend werden die robustesten Cluster, die am längsten der Variation des λ -Wertes standhalten, extrahiert (dargestellt durch rote Kreise in Abb. 10D). Um sich die extrahierten Cluster anzusehen, kann man die Zugehörigkeit zu einem Cluster bspw. farblich kodieren (Abb. 10E). Ein weiterer freier Parameter wird als minimum samples bezeichnet. In der hier benutzten pythonbasierten

Ergebnisse

Implementierung von HDBSCAN ist dieser Parameter gleich der minimalen Clustergröße voreingestellt. Man kann minimum samples jedoch auch kleiner wählen. Dies ermöglicht ein weniger konservatives Clustering und lässt auch robuste Cluster zu, die kleiner als die minimale Clustergröße sind (siehe Abschnitt 2.2). Die Parameter für dieses Beispiel waren 100 für die minimale Clustergröße und 25 für minimum samples. Um ein Gefühl für die Robustheit des Clusterings mittels HDBSCAN zu entwickeln, wurden verschiedene Parameterkombinationen getestet (Abb. 10F, Abb. 11). Wie bereits in Abschnitt 2.2 erwähnt sind die Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen bei Variation der Parameter stabil.

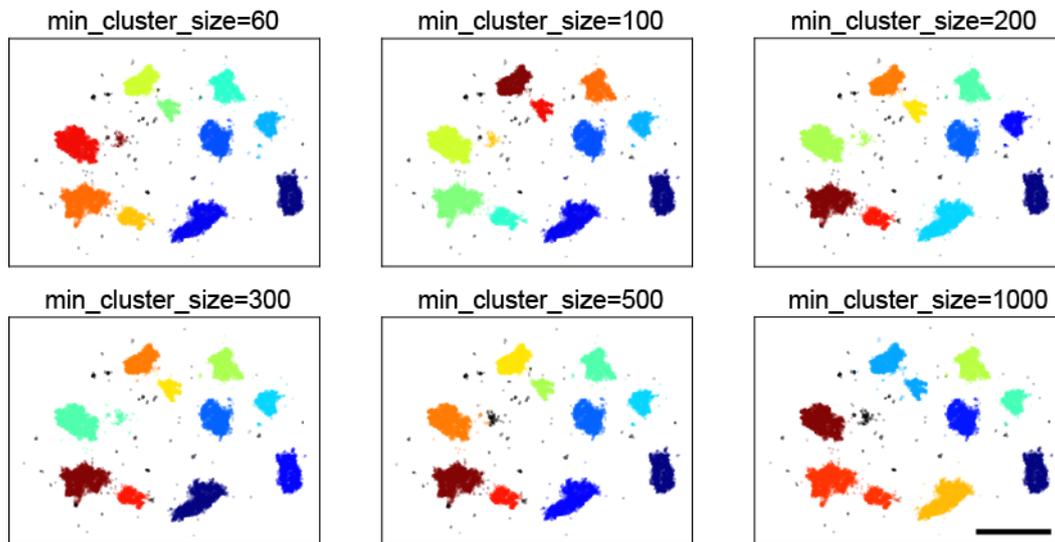


Abb. 11: Erkennung aktiver Zonen mit verschiedenen HDBSCAN-Parametern

Punktdiagramme der Brp-Lokalisationen eines Ib-Boutons mit durch HDBSCAN extrahierten Clustern in verschiedenen Farben. Über einen weiten Bereich der minimalen Clustergröße sind die detektierten Cluster kaum unterschiedlich. Minimum samples wurde konstant bei 25 % der minimalen Clustergröße gehalten. Für die Quantifizierung in dieser Arbeit wurde die Parameterkombination minimale Clustergröße 100 und minimum samples 25 für die AZ-Erkennung ausgewählt. Skala 1 μm .

Ripleys K-Funktion

Mit dem pythonbasierten HDBSCAN steht nun ein robustes Werkzeug zur Identifizierung von Brp-Clustern zur Verfügung. Da Brp zu den häufigsten Proteinen des AZ-Gerüsts bei *Drosophila* gehört, werden in dieser Arbeit Parameter der Brp-Cluster wie Fläche und Dichte als Parameter der AZs

Ergebnisse

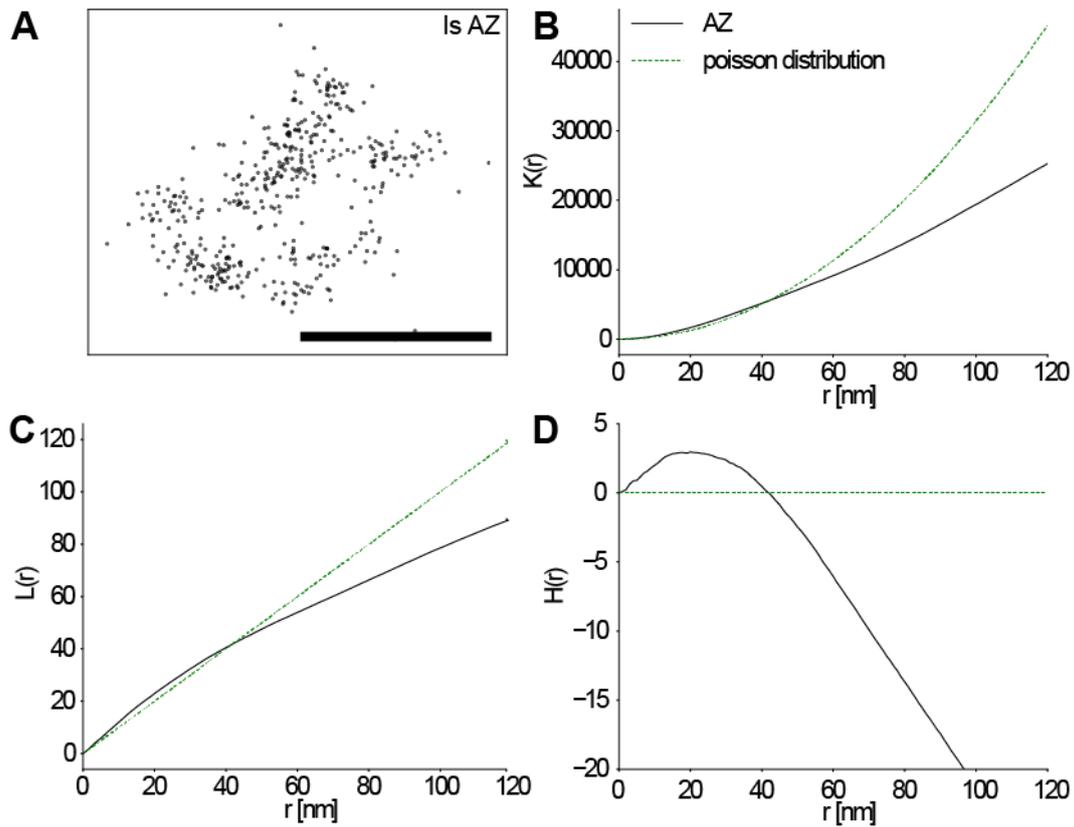


Abb. 12: Ripleys K-Funktion und ihre Ableitungen für Lokalisationsdaten

A Punktdiagramme der Brp-Lokalisierungen einer Is-AZ (entspricht Cluster b in Abb. 10E). Skala 200 nm.

B Ripleys K-Funktion, die in nm-Schritten für die Radien r von 0 bis 120 nm berechnet wurde, für die Lokalisierungen in **A** (schwarz) und ein zufälliges Verteilungsmuster (Poisson-Verteilung, grün).

C L-Funktion, die durch Teilen der K-Funktion in **B** durch π und anschließendes Wurzelziehen ermittelt wurde. Die Erwartungswerte einer zufälligen Poissonverteilung zeigen einen linearen Anstieg.

D H-Funktion, die durch Abzug des Radius r von der L-Funktion in **C** abgeleitet wurde. Der Erwartungswert einer zufälligen Poisson-Verteilung entspricht einer Geraden durch 0. Positive Werte deuten auf Clustering und negative Werte auf Dispersion hin.

interpretiert, wenn nicht anders aufgeführt. Wesentlich komplexer als die Identifizierung von AZs ist die Analyse molekularer Substrukturen. Zwar sind DBSCAN und HDBSCAN starke Algorithmen, um robuste Cluster in Lokalisationsdaten zu finden. Jedoch sind sie weniger dazu geeignet, festzustellen, ob überhaupt Clustering vorliegt oder ob die Daten zufällig verteilt

Ergebnisse

sind. Für Brp wurde ein modulares Arrangement bereits etabliert (Ehmann et al., 2014; Böhme et al., 2019), aber für andere AZ-Proteine wie spannungsgesteuerte Calciumkanäle (voltage-gated calcium channel, VGCC) ist es unklar, ob eine geclusterte Molekülverteilung funktionelle Eigenschaften verschiedener Synapsen erklären kann (Rebola et al., 2019). In dieser Arbeit wurden Ripleys K-Funktion sowie deren Ableitungen verwendet, um Lokalisationsverteilungen unabhängig von Clusteralgorithmen analysieren zu können. Ausgehend von einer einzelnen aktiven Zone (Abb. 12A, entspricht Cluster b in Abb. 10E) wurde zunächst die K-Funktion berechnet (siehe Abschnitt 2.2, Abb. 12B). Der erwartete Wert der K-Funktion ist bei zufälliger Verteilung, πr^2 und ist als grüne gestrichelte Linie in Abbildung 12B dargestellt. Abweichungen von dieser Verteilung, wie sie für diese AZ zu erkennen sind, weisen demnach auf eine Abweichung von einem zufälligen Verteilungsmuster der Lokalisationen hin (Kiskowski et al., 2009). Eine Normalisierung der K-Funktion kann durch Teilen durch π und anschließendes Wurzelziehen erreicht werden, man erhält die L-Funktion und es entsteht eine Gerade mit linearem Anstieg als Erwartungswert (Abb. 12C). Zieht man nun den Radius, ab ergibt sich die H-Funktion mit 0 als Erwartungswert für eine zufällige Verteilung (Abb. 12D). Diese normalisierte Version der K-Funktion ist am einfachsten lesbar, denn positive Werte deuten auf den Bereich des Clusterings hin, während negative Werte auf Dispersion der Lokalisationen hindeuten (Kiskowski et al., 2009). Für dieses Beispiel (Abb. 12A) ergibt sich somit Clustering im Bereich 1-42 nm mit dem Maximum bei 21 nm. Dieses Maximum deutet auf den Bereich maximaler Aggregation hin und deutet an, welchen Radius man für Substrukturen erwarten kann (Kiskowski et al., 2009). Wie später noch ausführlicher gezeigt wird entspricht dieser Radius in etwa dem Zahlenwert, der für die bereits ermittelte Größe von Brp-Subclustern zu erwarten ist (Ehmann et al., 2014). Hiermit steht ein Werkzeug zur Verfügung, um zu entscheiden, ob das Signal einzelner AZs geclustert ist oder nicht.

Ausleuchtung und Lokalisationspräzision

Ziel dieser Arbeit ist die Vermessung subtiler struktureller Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen mittels Lokalisationsmikroskopie. Hierzu ist

Ergebnisse

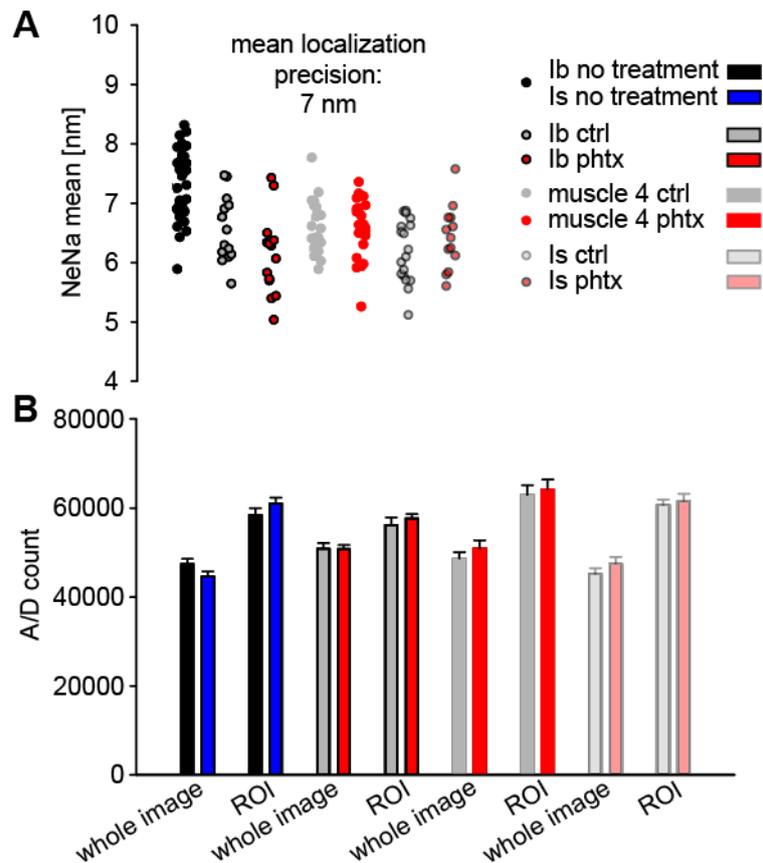


Abb. 13: Bestimmung der Lokalisationspräzision und Ausleuchtung

A Punktdiagramme zeigen die Lokalisationspräzision (berechnet mit dem NeNa-Algorithmus, siehe Abschnitt 2.2). Jeder Datenpunkt entspricht einer einzelnen *d*STORM-Messung.

B Balkendiagramme (Mittelwert \pm SEM) der A/D-counts der ganzen *d*STORM-Bilder und der analysierten Bereiche (ROI) aller statistisch miteinander verglichenen experimentellen Gruppen.

es notwendig, für standardisierte experimentelle Bedingungen zu sorgen. Für alle Aufnahmen wurde unter Anwendung des NeNa-Algorithmus (Endesfelder et al., 2014), eingebettet in das LAMA Softwarepaket (Malkusch & Heilemann, 2016), die Lokalisationspräzision bestimmt (Abb. 13A). Als mittlere Lokalisationspräzision aller ausgewerteten *d*STORM-Messungen in dieser Arbeit ergaben sich ca. 7 nm. Weiterhin wurde kontrolliert, ob eine vergleichbare Ausleuchtung der Proben erfolgt ist. Hierzu wurde der A/D-count (Analog-zu-digital-Wert) der ausgewerteten Blinkereignisse als Maß für die Helligkeit des Signals und somit die Beleuchtungsintensität, sowohl für ganze Aufnahmen als auch beschränkt auf die analysierten Bereiche (ROI)

ausgewertet und verglichen. Zwischen den experimentellen Gruppen, die für statistische Analysen miteinander verglichen wurden, ergaben sich keine Unterschiede in der Ausleuchtung (Abb. 13B).

3.3 Differenzierung der Struktur auf der Nanometerebene

Ib und Is AZs unterscheiden sich in ihrer Substruktur

Ob sich die eingangs erläuterten funktionellen Unterschiede zwischen Ib- und Is-Neuronen in strukturellen Unterschieden auf der Nanometerebene der AZ widerspiegeln, sollte im nächsten Schritt unter Anwendung der im vorangegangenen Abschnitt eingeführten Analysewerkzeuge untersucht werden. Abbildung 14A verdeutlicht die Vermessung des Brp-Signals aus Abbildung 8 mittels HDBSCAN. Die individuellen Cluster sind über verschiedene Farben identifizierbar. Die schwarzen Linien entsprechen Alpha-shapes, die genutzt wurden, um die Fläche der Lokalisationscluster zu berechnen (siehe Abschnitt 2.2). Wie bereits vorbeschrieben (Ehmann et al., 2014) ergaben sich für Is AZs kleinere Flächen und außerdem weniger Brp-Lokalisationen (locs.) im Vergleich zu Ib AZs (Fläche: Abb. 14B, Median (25.-75. Perzentil) 0,088 (0,06-0,142) μm^2 und 0,106 (0,078-0,162) μm^2 , $p < 0,001$; Lokalisationen: Abb. 14C, 1399 (873-2194) locs. pro AZ und 1586 (1031-2369) locs. pro AZ, $p < 0,001$, in Is- und Ib-boutons). Es stellt sich die Frage, wie eine kleinere Cytomatrix mit weniger Molekülen zu einer erhöhten Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel passt. Ein weiterer Parameter wurde aus Fläche und absoluter Lokalisationszahl abgeleitet: die Lokalisationsdichte, die mit der molekularen Dichte und damit der Proteinkonzentration der AZ korreliert. Interessanterweise ist die Brp-Dichte an Is AZs höher als an Ib AZs (Abb. 14D, 15146 (12939-17583) locs. pro μm^2 und 13819 (11555-16486) locs. pro μm^2 in Is- und Ib-boutons, $p < 0,001$). Als weiteres Werkzeug wurde eine Analyse der Form individueller AZs durch die Berechnung der Zirkularität implementiert. Diese beruht auf dem Verhältnis der Eigenwerte der Punktwolken, wobei ein Wert von 1 eine vollkommen kreisrunde Form anzeigt und Werte < 1 abnehmende Zirkularität bedeuten (siehe Abschnitt 2.2). Interessanterweise zeigen Is-AZs eine geringere Zirkularität im Vergleich zu Ib-AZs (Abb. 14E, 0,58 (0,45-0,72) und 0,65 (0,52-0,76) in Is- und Ib-

Ergebnisse

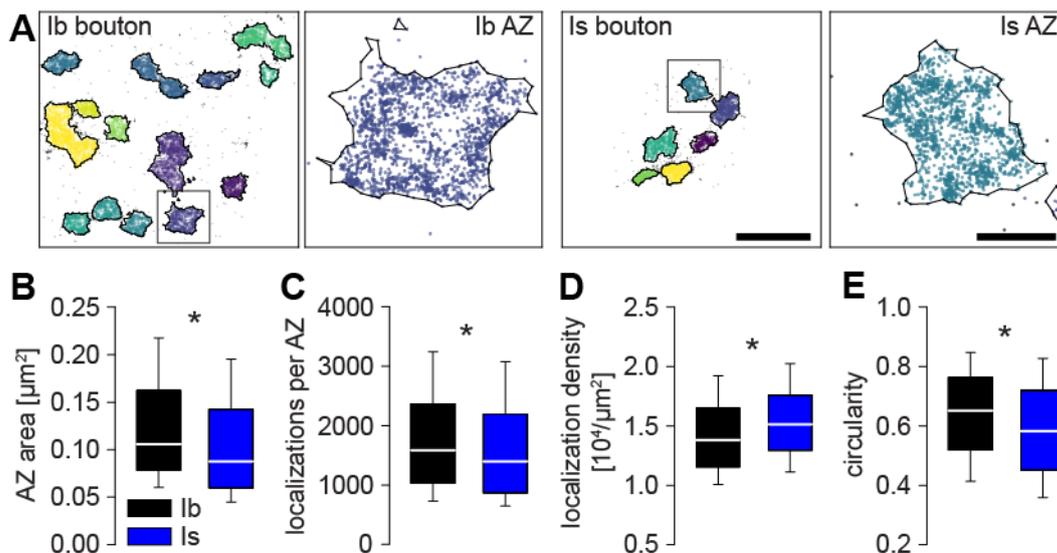


Abb. 14: Kompaktere Brp-Anordnung in Is-AZs

A Boutons und vergrößerte AZs aus Abbildung 8 mit individuellen Brp-Clustern in verschiedenen Farben (Vgl. Abb. 10E, Abb. 11). Die einzelnen AZs sind mit schwarzen Linien umrandet, entsprechend den Alpha-shapes, die zur Flächenbestimmung genutzt wurden. Geclusterte Brp-Lokalisationen sind als farbige und ungeclusterte als graue Punkte dargestellt. Skala 1 μm für Boutons und 200 nm für AZs.

B AZ-Fläche in lb- (schwarz, für B-E: $n = 1120$ AZs aus 22 NMJs aus 10 Tieren) und Is-Boutons (blau, für B-E: $n = 673$ AZs aus 18 NMJs aus 10 Tieren), dargestellt als Boxdiagramme.

C-E Anzahl der Brp-Lokalisationen pro AZ, Brp-Lokalisationsdichte und AZ-Zirkularität in beiden Bouton-Typen.

boutons, $p < 0,001$). Auf mögliche Gründe wird in der Diskussion weiter eingegangen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die kleineren, dichten AZs an Is-Neuronen insgesamt eine kompaktere Brp-Anordnung aufweisen.

H-Funktion

Im nächsten Schritt wurde eine Analyse der AZ-Substruktur durchgeführt, um zu untersuchen, ob Muster der Differenzierung auch auf dieser Ebene der Organisation zu finden sind. Die Berechnung von Ripleys H-Funktion erfolgte, analog der Beschreibung für eine einzelne AZ weiter oben, für den gesamten Datensatz und die gemittelten Kurven aller lb- bzw. Is-AZs wurden miteinander

Ergebnisse

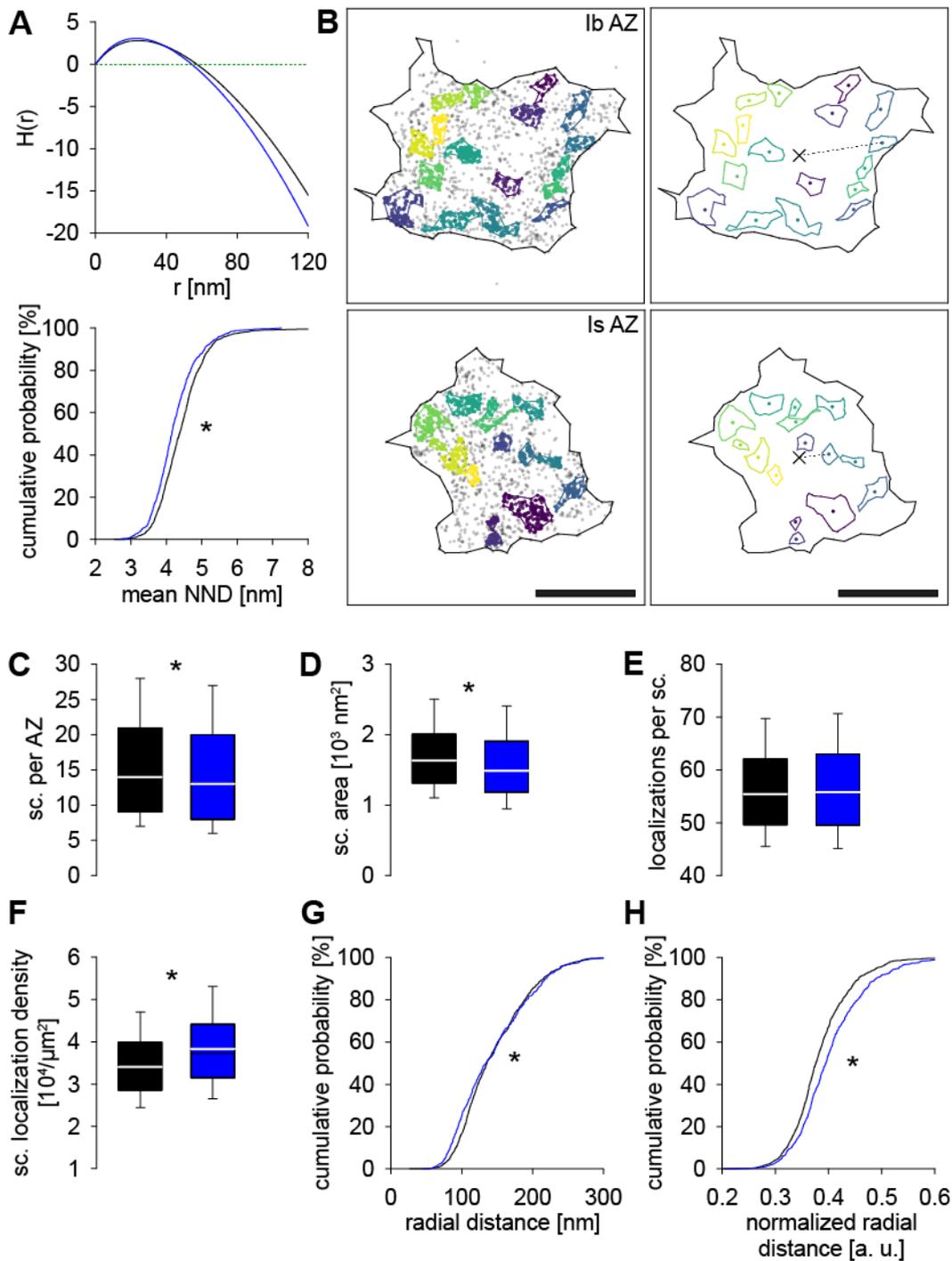


Abb. 15: Differenzierte Brp-Subcluster-Organisation in Ib- und Is-Boutons

A Oben: Gemittelte H-Funktionen (Ableitung von Ripleys K-Funktion, Vgl. 2.2, 3.2) aller AZs in Ib- (schwarz) und Is-Boutons (blau). Unten: Kumulatives Diagramm der mittleren NND aller Brp-Lokalisierungen pro AZ in Ib- ($n = 1120$ AZs aus 22 NMJs aus 10 Tieren) und Is-Boutons ($n = 673$ AZs aus 18 NMJs aus 10 Tieren).

B Links: Punktdiagramme zeigen den Subcluster-Algorithmus, der auf die AZs in Abbildung 8 und Abbildung 14 angewendet wurde, mit Brp-Subclustern in verschiedenen Farben, umrandet mit farbigen Linien entsprechend der Alpha-

Ergebnisse

shapes zur Flächenbestimmung. Graue Punkte entsprechen ungeclusterten Lokalisationen. Rechts: Bestimmung des Massenmittelpunkts (c. o. m., siehe 2.2) der AZ (Kreuz) und der einzelnen c. o. m. der Subcluster (Punkte) zur Ermittlung der radialen Distanz (gestrichelte Linie). Skala 200 nm.

C Anzahl der Subcluster (sc.) pro AZ in Ib- (für C-H: n = 1120 AZs aus 22 NMJs aus 10 Tieren) und Is-Boutons (für C-H: n = 673 AZs aus 18 NMJs aus 10 Tieren).

D-F Subcluster-Fläche (**D**), Anzahl der Brp-Lokalisationen pro Subcluster (**E**) und Brp-Lokalisationsdichte (**F**) in beiden Bouton-Typen.

G Kumulative Diagramme der radialen Distanz zwischen AZ c. o. m. und c. o. m. der einzelnen Subcluster in beiden Bouton-Typen.

H Kumulative Diagramme der radialen Distanz wie in **G**, auf die AZ-Fläche normalisiert.

verglichen (Abb. 15A, oben). Die Kurven zeigen positive Werte zwischen 1 und 58 nm und 1 und 55 nm mit Maxima bei 24 nm und 23 nm für Ib- bzw. Is-AZs. Damit ist eine geclusterte Anordnung an beiden AZ-Typen wahrscheinlich (Kiskowski et al., 2009). Darauf aufbauend schloss sich die Frage an, ob es auch auf dieser Ebene Unterschiede gibt. Eine Möglichkeit, die Verteilung der Lokalisationen unabhängig von Clusteralgorithmen miteinander zu vergleichen, ist die Nächste-Nachbarn-Analyse (Szoboszlay et al., 2017).

Nächste-Nachbarn-Analyse

Der Parameter mittlere Nächste-Nachbarn-Distanz (NND) kann verwendet werden, um die Struktur und Dynamik von AZ-Proteinen mittels Lokalisationsmikroskopie zu untersuchen (Glebov et al., 2017; Rebola et al., 2019). Abbildung 15A unten zeigt kumulative Verteilungen der mittleren NND, die als Mittelwert der NND aller Lokalisationen pro AZ berechnet wurde, und es ergab sich ein kleinerer Abstand für Is-AZs im Vergleich zu Ib-AZs (Abb. 15A, unten, 4,1 (3,7-4,5) nm und 4,3 (3,9-4,7) nm in Is- und Ib-Boutons, $p < 0,001$). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der dichteren Molekulanordnung und deutet auf Unterschiede auf Ebene der AZ-Substruktur hin.

Vermessung der Subcluster

Da nun vom Clusteralgorithmus unabhängige Hinweise auf substrukturelle Unterschiede zwischen Ib- und Is-AZs vorlagen, wurde eine zweite Ebene des

Ergebnisse

HDBSCAN, diesmal mit der Option „leaf clustering“ (siehe Abschnitt **2.2**), angewandt, um eine detaillierte Vermessung der Substrukturen durchzuführen. In Abbildung 15B sind die gleichen AZs wie in Abbildung 8 und Abbildung 14 zu sehen, jedoch sind die individuellen Subcluster in verschiedenen Farben eingefärbt und die ungeclusterten Lokalisationen als schwarze Punkte dargestellt. Die absolute Anzahl an Brp-Subclustern pro AZ ist kleiner in Is-AZs (Abb. 15C, 13 (8-20) und 14 (9-21) in Is- und Ib-Boutons, $p = 0,004$). Zur Flächenberechnung der Subcluster wurden wiederum Alpha-shapes verwendet. Entsprechend der insgesamt kleineren Is-AZs ergaben sich auch für die Fläche der Subcluster der Is-AZs kleinere Flächen im Vergleich zu Ib-AZs (Abb. 15D, $1,5 (1,2-1,9) \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ und $1,6 (1,3-2,0) \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ in Is- und Ib-Boutons, $p < 0,001$). Die Anzahl an Lokalisationen und damit Molekülen pro Subcluster (sc.) war gleich (Abb. 15E, 56 (50-63) locs. pro sc. und 55 (50-62) locs. pro sc. in Is- und Ib-Boutons, $p = 0,618$). Der Dichteunterschied scheint sich jedoch auch auf Ebene der Subcluster widerzuspiegeln (Abb. 15F, 37238 (31515-44125) locs. pro μm^2 und 34077 (28599-39907) locs. pro μm^2 in Is- und Ib-Boutons, $p < 0,001$). Weiter wurde der Massenmittelpunkt (c. o. m., siehe **2.2**) der einzelnen Subcluster als Mittelwert ihrer Lokalisationen ermittelt und der Mittelpunkt der AZ wiederum als deren Mittelwert bestimmt. Der mittlere euklidische Abstand zwischen dem AZ c. o. m. zu den c. o. m. der Subcluster pro AZ wird fortan als radiale Distanz der Subcluster bezeichnet. Diese wurde zwischen den beiden Boutontypen verglichen und es ergab sich eine kleinere radiale Distanz in Is-AZs (Abb. 15G, 114 (90-154) nm und 120 (99-156) nm in Is- und Ib-Boutons, $p < 0,001$). Da jedoch die Gesamtfläche in diesen AZs ebenfalls kleiner ist, wurde zusätzlich eine auf die Fläche normierte radiale Distanz ermittelt. Überraschenderweise ergab sich hierfür ein entgegengesetzter Effekt (Abb. 15H, 0,39 (0,35-0,43) a. u. und 0,37 (0,34-0,4) a. u. in Is- und Ib-Boutons, $p < 0,001$), was für eine unterschiedliche Anordnung von Brp-Subclustern in Ib und Is-AZs spricht. Zusammenfassend bestehen AZs der Is-Neuronen aus weniger und kleineren sowie dichteren Brp-Subclustern, die näher am Zentrum der AZ lokalisiert sind. Daraus folgt, dass sich die höheren postsynaptischen Antworten und die höhere Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel an Is-Neuronen in einer kompakteren Konfiguration der AZ sowie ihrer Subcluster niederschlagen.

3.4 Strukturelles Korrelat präsynaptischer Homöostase

Nachdem die neuen Auswertelgorithmen zur Identifizierung nanoskopischer Unterschiede zwischen AZs funktionell unterschiedlicher Neurontypen angewendet wurden, schloss sich die Frage an, ob auch akute Änderungen der synaptischen Funktion ein strukturelles Korrelat auf dieser Ebene der Auflösung zeigen. Hierzu wurde das Modell der präsynaptischen Homöostase angewendet, das in Abschnitt 1.2 eingeführt wurde (Abb. 5).

Keine Änderung der allgemeinen NMJ-Morphologie nach Philanthotoxin-Behandlung

Vor der lokalisationsmikroskopischen Auswertung wurde überprüft, ob höhergeordnete strukturelle Änderungen der Synapse sichtbar sind. Bisherige Studien wiesen darauf hin, dass es auf Ebene der Anzahl an Brp-positiven AZs keine Veränderung nach PhTx-Behandlung gibt (Weyhersmüller et al., 2011; Goel et al., 2017). Zur Untersuchung dieses Aspektes wurde srSIM angewendet (Abb. 16A) und es konnte bestätigt werden, dass sich die Anzahl der AZs pro NMJ an Muskel 6/7 durch akute Homöostase zwischen PhTx-behandelten (phtx) und DMSO-behandelten Tieren (ctrl) nicht ändert (Abb. 16B, Mittelwert \pm SEM 906 ± 41 AZs pro NMJ und 884 ± 58 AZs pro NMJ in phtx und ctrl, $p = 0,757$). Als Nächstes sollte die räumliche Differenzierung der AZ-Anzahl entlang der Boutonkette (Boutons 1-3) untersucht werden, bzgl. derer eine Abnahme von distal nach proximal beschrieben wurde (Paul et al., 2015). Dieses Muster der Differenzierung zeigte sich als unabhängig gegenüber der PhTx-Behandlung (Abb. 16C, ctrl: $16,5 \pm 1,3$ (1), $12,7 \pm 1,1$ (2), $11,2 \pm 1$ (3), $p = 0,024$ für (1) und (2) und $p < 0,001$ für (1) und (3); phtx: $18 \pm 1,1$ (1), $11,6 \pm 0,9$ (2), $11 \pm 0,7$ (3), $p < 0,001$ jeweils für (1) und (2) und (1) und (3), p-Werte aus Mann-Whitney Rank Sum Test) und die Anzahl der AZs pro distalem Bouton unterschied sich ebenfalls nicht ($p = 0,313$). Somit schien das Zustandekommen der homöostatischen Kompensation durch die Änderung der übergeordneten Anzahl aktiver Zonen unwahrscheinlich und die detaillierte, nanoskopische Untersuchung schloss sich an.

Ergebnisse

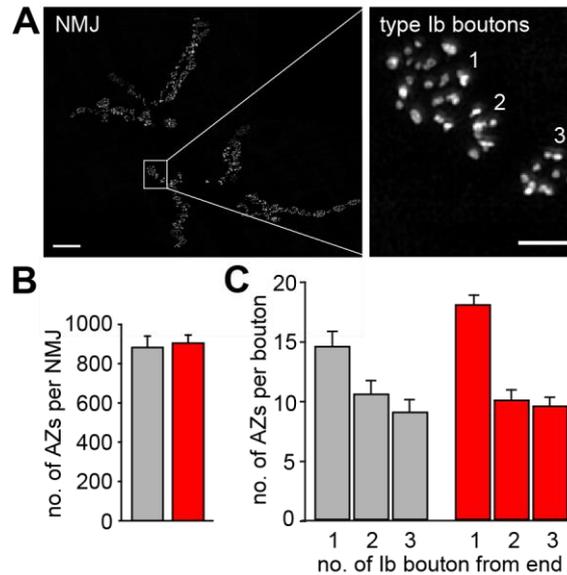


Abb. 16: Unveränderte NMJ-Morphologie nach PhTx-Behandlung

A Repräsentative NMJ der abdominalen Muskeln 6 und 7 in Segment A2, gefärbt gegen Brp und aufgenommen mit srSIM wie in Abb. 7. Die Vergrößerung der weißen Box zeigt die Ib-Boutons 1-3 vom Ende der Kette gezählt. Skala 10 und 2 μm .

B Balkendiagramme der Anzahl der AZs aller Bouton-Typen pro NMJ in ctrl (grau) und phtx (rot, n = jeweils 16 NMJs aus 6 Tieren).

C Anzahl der AZs pro Bouton in den distalen drei Boutons in ctrl (grau, n = 48 Ib-Neurone aus 16 NMJs aus 6 Tieren) und phtx (rot, n = 64 Ib-Neurone aus 16 NMJs aus 6 Tieren).

Verdichtung der AZ nach Philanthotoxin an Ib-Neuronen

Im nächsten Schritt wurde der Effekt der akuten, präsynaptischen Homöostase mittels dSTORM untersucht. Hierbei lag der Fokus zunächst auf AZs der Ib-Boutons 1-6 entlang der Boutonkette und es erfolgte ein Vergleich zwischen Wildtyp-Larven, die mit DMSO oder PhTx inkubiert wurden (Abb. 17A). Erstaunlicherweise war die AZ-Fläche in phtx Larven reduziert (Abb. 17B, 0,109 (0,074-0,169) μm^2 und 0,101 (0,068-0,148) μm^2 in ctrl und phtx, p = 0,009). Während sich die absolute Molekülnzahl nach akuter Homöostase nicht änderte (Abb. 17C, 1532 (1007-2303) locs. pro AZ und 1453 (926-2346) locs. pro AZ in ctrl und phtx, p = 0,236), zeigte sich jedoch, vergleichbar mit dem Befund an Is-AZs, eine höhere Brp-Lokalisationsdichte nach PhTx-Behandlung (Abb. 17D, 13555 (11308-16236) locs. pro μm^2 und 14082 (11756-17204) locs. pro μm^2 in ctrl und phtx, p = 0,009). Ähnlich der im vorangegangenen Abschnitt erläuterten

Ergebnisse

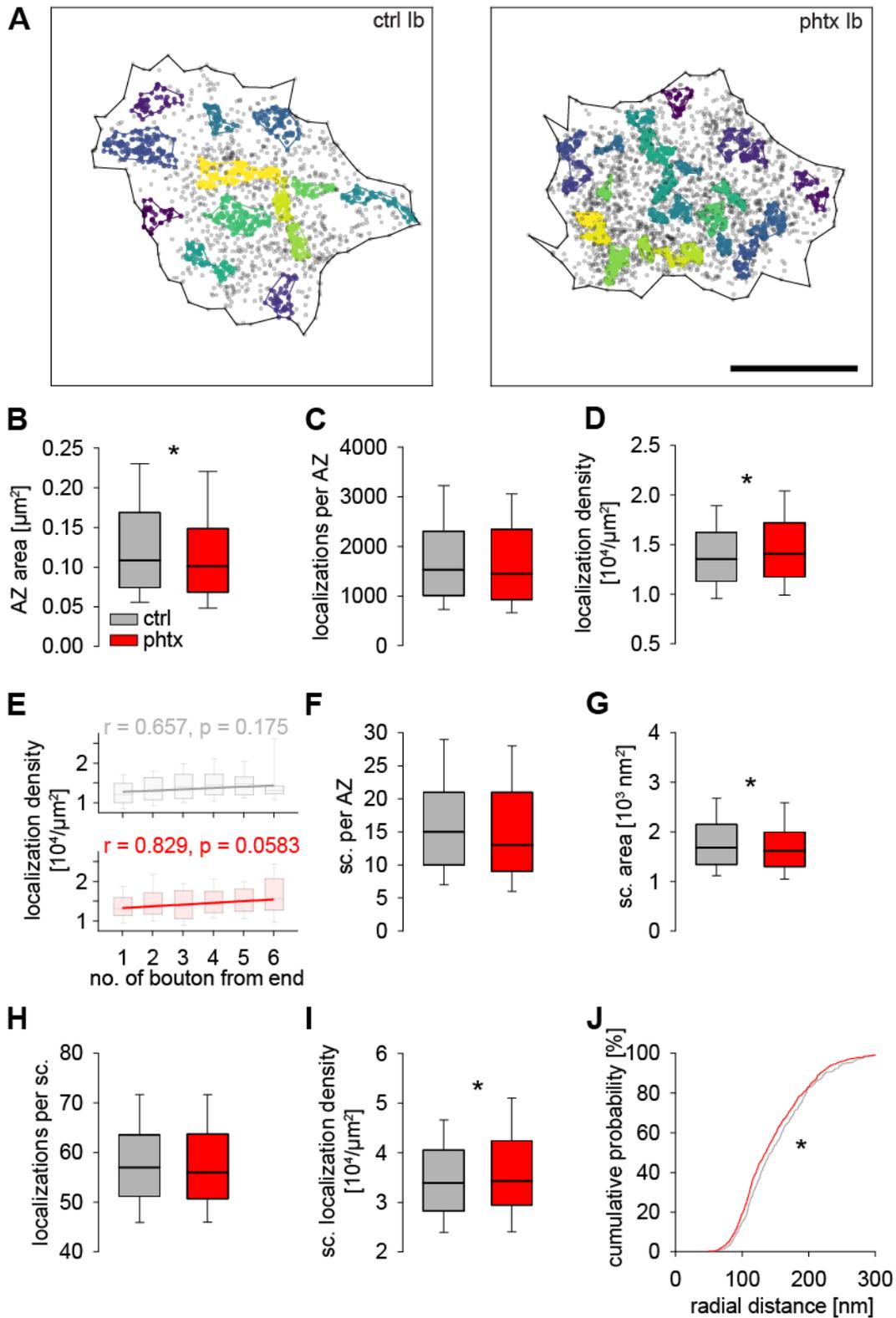


Abb. 17: Akute homöostatische Plastizität verringert die AZ-Größe, erhöht die Brp-Lokalisationsdichte und verändert die Subcluster-Organisation in Ib-Boutons

A Punktdiagramme von Ib-AZs aus einer Kontrolle (ctrl, links) und einem PhTx-behandelten Tier (phtx, rechts). Skala 200 nm.

Ergebnisse

B-D AZ-Fläche (**B**), Anzahl der Brp-Lokalisationen pro AZ (**C**) und Brp-Lokalisationsdichte (**D**) in ctrl- (grau, für B-J: n = 568 AZs aus 13 NMJs aus 6 Tieren) und phtx-Larven (rot, für B-J: n = 792 AZs aus 14 NMJs aus 5 Tieren).

E Brp-Lokalisationsdichte in beiden Gruppen für die Boutons 1-6 vom Ende der Boutonkette gezählt. Spearman-Korrelationskoeffizienten zeigen keine signifikante Korrelation zwischen Boutonposition und Lokalisationsdichte (ctrl: n = 240, 140, 102, 71, 54, 19 AZs; phtx: n = 251, 134, 146, 117, 78, 51 AZs jeweils für Bouton 1-6).

F-I Anzahl der Subcluster pro AZ (**F**), Subcluster-Fläche (**G**), Anzahl der Brp-Lokalisationen pro Subcluster (**H**) und Brp-Lokalisationsdichte der Subcluster (**I**) in ctrl- und phtx-Larven.

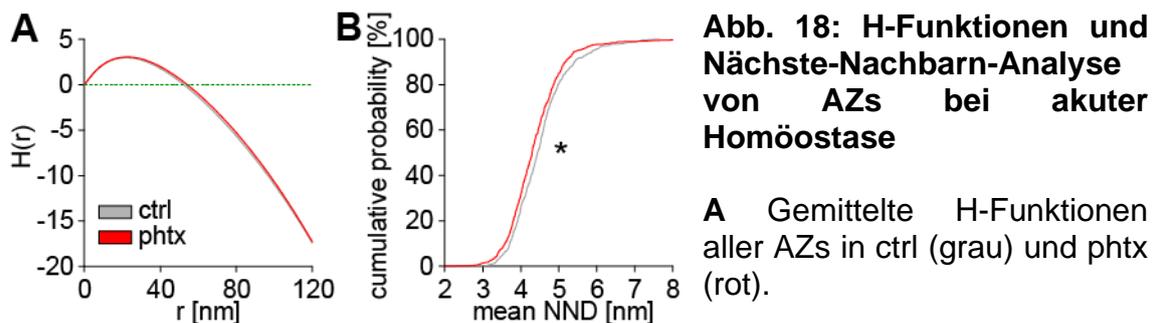
J Kumulative Diagramme der radialen Distanz zwischen AZ c. o. m. und c. o. m. der Subcluster für beide Gruppen.

Differenzierung der AZ-Anzahl entlang der Boutonkette in Ib-Neuronen wurde eine abnehmende Fläche und Lokalisationsanzahl pro AZ von distal nach proximal beschrieben (Ehmann et al., 2014). Entsprechend wurde als Nächstes untersucht, ob die molekulare Dichtezunahme nach PhTx eine räumliche Differenzierung aufweist. Dazu wurde die Brp-Lokalisationsdichte einzeln für die Boutontypen 1-6 von distal nach proximal ermittelt, für ctrl und phtx Larven jeweils eine lineare Regression durchgeführt sowie eine Spearman-Korrelation zwischen Boutonposition und Lokalisationsdichte berechnet. Für beide Gruppen ergab sich keine signifikante Korrelation (Abb. 17E, ctrl: $r = 0,657$ und $p = 0,175$; phtx: $r = 0,829$ und $p = 0,0583$), woraus sich schließen lässt, dass die Dichtezunahme homogen entlang der Boutonkette stattfindet. Zusammenfassend zeigte sich interessanterweise auch bei akuter, präsynaptischer Homöostase eine kompaktere Anordnung von Brp mit kleineren, dichter gepackten AZs.

Subcluster-Analyse

Naheliegend war als Nächstes die Frage, ob auch bei der schnellen, präsynaptischen Potenzierung ein strukturelles Korrelat auf Ebene der Subcluster zu finden ist. Entsprechend der Analysen weiter oben erfolgte der Vergleich zwischen ctrl- und phtx-Larven zunächst mittels Ripleys H-Funktion und der Nächste-Nachbarn-Analyse. Wie zu erwarten zeigen die gemittelten Kurven der H-Funktion (Abb. 18A) auch hier Clustering und deuten auf eine

Ergebnisse



submodulare Anordnung von Brp hin. Passend zur beschriebenen Dichtezunahme der AZs nach PhTx-Behandlung ergab sich eine geringere mittlere NND pro AZ in dieser experimentellen Gruppe (Abb. 18B, 4,4 (3,9-4,7) nm und 4,2 (3,8-4,6) nm in ctrl und phtx, $p < 0,001$). Nun schloss sich die detaillierte Vermessung der Subcluster mittels HDBSCAN an. Wie weiter oben bereits für den Vergleich von Ib- und Is-AZs in Abbildung 15 beschrieben zeigt Abb. 17A repräsentative AZs für ctrl und phtx als Punktdiagramme mit unterschiedlichen Farben für die einzelnen Subcluster, schwarzen Punkten für ungeclusterte Lokalisationen und Linien für Alpha-shapes. Während die absolute Anzahl der Brp-Subcluster nach Induktion präsynaptischer Homöostase unverändert war (Abb. 17F, 15 (10-21) und 13 (9-21) in ctrl und phtx, $p = 0,084$), ähnelten die Unterschiede in Fläche, Anzahl an Lokalisationen und Lokalisationsdichte der Subcluster den Befunden für Is-AZs im Vergleich zu Ib-AZs (jeweils in ctrl und phtx, Fläche: Abb. 17G, $1,7 (1,3-2,1) \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ und $1,6 (1,3-2,0) \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$, $p = 0,025$; Lokalisationen pro sc.: Abb. 17H, 57 (51-64) locs. pro sc. und 56 (51-64) locs. pro sc., $p = 0,480$; sc. Lokalisationsdichte: Abb. 17I, 33914 (28276-40553) locs. pro μm^2 und 34290 (29464-42454) locs. pro μm^2 in, $p = 0,022$). Außerdem war nach PhTx-Behandlung auch die radiale Distanz der Subcluster verringert (Abb. 17J, 125 (102-163) nm und 116 (96-153) nm in ctrl und phtx, $p = 0,003$). Die Brp-Substruktur der CAZ zeigt nach präsynaptischer Potenzierung zusammenfassend also erstaunliche Ähnlichkeiten zu AZs an Synapsen mit hoher Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel. Dieser Befund passt gut zur beschriebenen Vergrößerung des Pools an zur Freisetzung bereiten Vesikeln (readily-releasable vesicle pool, Weyhermüller et al., 2011).

Analyse der Orientierung der AZ

Die Brp-Anordnung wird häufig mit einem Ring oder einem Donut verglichen. Wirft man allerdings einen Blick auf Abbildung 8 wird deutlich, dass die Form der Brp-positiven AZs eine starke Heterogenität aufweist. Dass nicht jede AZ als Kreis mit einem Loch in der Mitte erscheint ist sicherlich neben dem Vorhandensein anderer Formen der Anordnung auf die Orientierung bzw. die Position des Signals in der Bildgebungsebene zurückzuführen. Die Orientierung einzelner AZs sollte bei der Analyse der radialen Verteilungen von Molekülclustern daher berücksichtigt werden. Zu diesem Zweck verwendeten wir das weiter oben beschriebene Werkzeug des Analysealgorithmus zur Messung der Brp-Zirkularität (siehe Abschnitt 2.2) und extrahierten die Verteilungen in ctrl- und phtx-Larven (Abb. 19A). Die AZ-Zirkularität nach der PhTx-Behandlung blieb unverändert (Abb. 19A, 0,64 (0,52-0,75) und 0,65 (0,52-0,77) in ctrl und phtx, $p = 0,161$). Daher erschien die bisherige Analyse des gesamten Datensatzes ohne Berücksichtigung der Orientierung als angemessen. Um nun zu testen, ob sich planar orientierte AZs (d. h. AZs mit einer Zirkularität, die näher an 1 liegt) nach PhTx-Behandlung in ähnlicher Weise wie die gesamte AZ-Population ändern, wurde die Beziehung zwischen der AZ-Fläche und der AZ-Zirkularität untersucht. Interessanterweise zeigte sich eine negative Korrelation, die mithilfe des Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet wurde (Abb. 19B, $r = -0,241$, $p < 0,001$ und $r = -0,271$, $p < 0,001$ in ctrl und phtx). Dieser Befund wird so interpretiert, dass niedrige Werte für Zirkularität und dementsprechend eine weniger kreisrunde Form, neben auf in der Seitenansicht getroffene AZs, auf große Brp-Cluster hindeuten, die z. B. von in der 2D-Projektion räumlich nahe gelegenen einzelnen AZs stammen und folglich miteinander verschmelzen. Letztere wurden als Doppelringstrukturen, gruppierte CAZ-Einheiten oder Cluster-AZs bezeichnet (Kittel et al., 2006; Ehmann et al., 2014; Akbergenova et al., 2018). Unter der Annahme, dass einige Parameter stark von der Ausrichtung der AZ abhängen, wurden die AZ-Fläche und die radiale Distanz der Subcluster in einer Teilstichprobe des Datensatzes, die durch eine Zirkularität $\geq 0,5$ und damit die Annahme einer planaren Ausrichtung gekennzeichnet war, analysiert (Abb. 19C). Hierbei zeigte sich eine stärkere Abnahme der AZ-Fläche (0,103 (0,075-0,149) μm^2 und 0,094 (0,068-0,135) μm^2 in ctrl und phtx, $p = 0,002$) und

Ergebnisse

ebenfalls eine Verringerung der radialen Distanz (119 (101-148) nm und 112 (95-139) nm in ctrl und phtx, $p < 0,001$). Diese Analyse stützt die Hypothese, dass akute, präsynaptische Homöostase mit der Verlagerung der Brp-Subcluster zum Zentrum der AZ hin einhergeht.

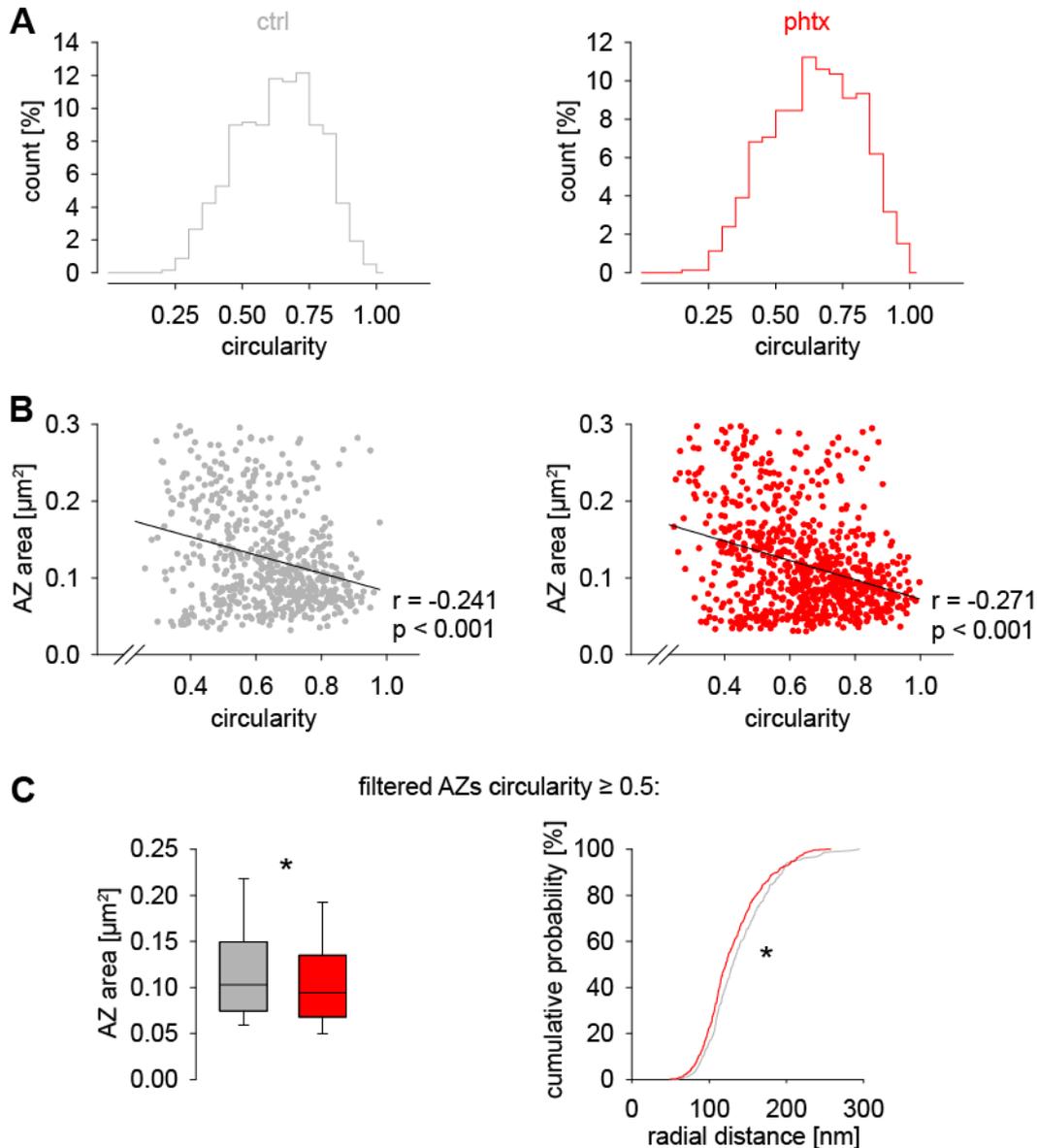


Abb. 19: AZ-Zirkularität in Ib-Boutons nach PhTx-Behandlung

A Histogramme der AZ-Zirkularität in ctrl (grau, $n = 568$ AZs aus 13 NMJs aus 6 Tieren) und phtx (rot, $n = 792$ AZs aus 14 NMJs aus 5 Tieren).

B Punktdiagramme mit Regressionsgeraden (schwarze Linien) zeigen den Zusammenhang zwischen Zirkularität und Fläche der AZ. Die Spearman-Korrelationskoeffizienten mit p-Werten zeigen eine signifikante, negative Korrelation beider Parameter.

Ergebnisse

C AZs mit einer Zirkularität $\geq 0,5$ wurden automatisch selektiert und hinsichtlich Fläche (Boxdiagramme) und radialer Distanz (kumulative Plots) analysiert (ctrl: $n = 442$ AZs aus 13 NMJs aus 6 Tieren; phtx: $n = 621$ AZs aus 14 NMJs aus 5 Tieren).

AZ-Verdichtung an Muskel 4

Die vorangegangenen Befunde wurden an NMJs der abdominalen Muskeln 6 und 7 erhoben. Im Gegensatz dazu wurden frühere Analysen zum strukturellen Korrelat der präsynaptischen Homöostase in AZs teilweise an NMJs des abdominalen Muskels 4, der weiter lateral gelegen ist, durchgeführt (Goel et al., 2017; Böhme et al., 2019). Theoretisch bestand die Möglichkeit, dass es an den verschiedenen Synapsen zu einer differentiellen strukturellen Adaptation kommt. Die NMJ an Muskel 4 wird nur von Typ Ib-Boutons gebildet, wodurch ein Vergleich von verschiedenen motoneuronalen Eingängen der gleichen NMJ nicht möglich ist und was zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Daher wurde erneut eine PhTx-Behandlung mit anschließender *d*STORM-Bildgebung der NMJs von Muskel 4 durchgeführt und die beschriebene Clusteranalyse angewandt. Zusammenfassend ergaben sich in diesem Versuch ähnliche Ergebnisse im Vergleich zum PhTx-Effekt auf Ib-AZs an Muskel 6 und 7 (Abb. 20). Es ist davon auszugehen, dass verschiedene NMJs die gleiche Form der strukturellen Adaptation bei akuter, präsynaptischer Potenzierung zeigen.

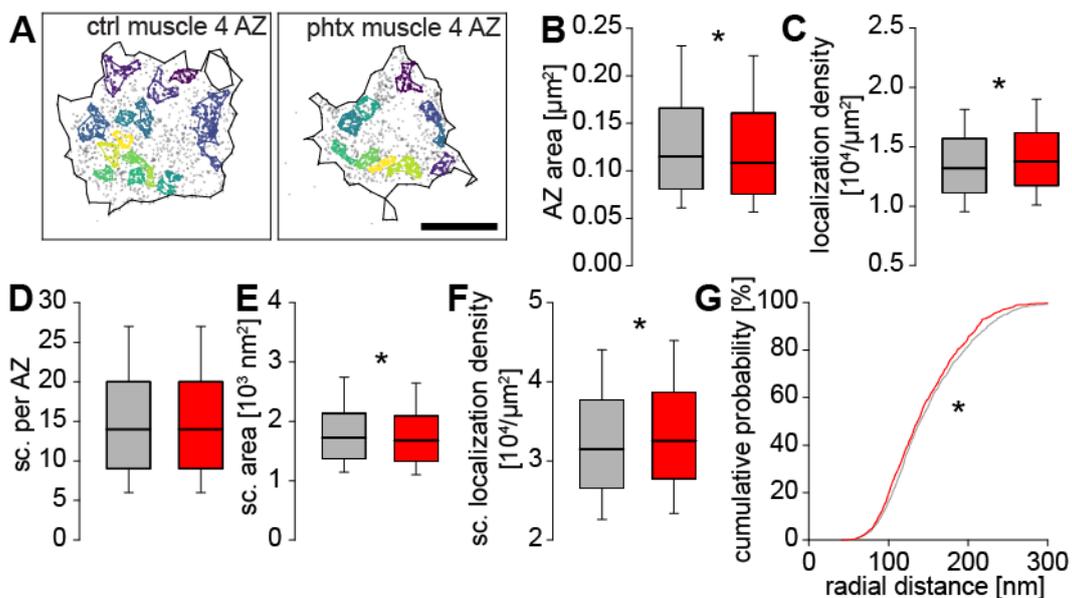


Abb. 20: AZ-Nanoarchitektur in Ib-Boutons von NMJs des abdominalen Muskels 4 (Forts. Seite 52)

Ergebnisse

A Punktdiagramme der Brp-Lokalisationen je einer AZ in einer ctrl- und phtx-Larve. Skala 200 nm.

B, C AZ-Fläche (**B**) und Brp-Lokalisationsdichte (**C**) in ctrl (grau, für B-G: n = 1183 AZs aus 20 NMJs aus 6 Tieren) und phtx (rot, für B-G: n = 1445 AZs aus 22 NMJs aus 8 Tieren).

D-F Anzahl der Subcluster pro Ib-AZ (**D**), Subcluster-Fläche (**E**) und Subcluster-Lokalisationsdichte (**F**) in beiden Gruppen.

G Kumulative Diagramme der radialen Distanz zwischen AZ c. o. m. und c. o. m. der Subcluster in ctrl und phtx.

Simulation konfokaler Auflösung und STED-Simulation

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zum ultrastrukturellen Korrelat der präsynaptischen Homöostase sind nicht ohne Weiteres mit einigen Vorbefunden in Einklang zu bringen. Die Erstbeschreibung einer Veränderung des Brp-Signals, bei der mit konfokaler Mikroskopie gearbeitet wurde, zeigte dessen Intensitätszunahme nach PhTx-Behandlung und unter Verwendung von STED-Mikroskopie wurde eine Zunahme der AZ-Fläche bei chronischer, genetisch induzierter Homöostase beobachtet (Weyhermüller et al., 2011). Spätere Analysen mit konfokaler Mikroskopie zeigten auch eine Flächenzunahme bei akuter, PhTx-induzierter Homöostase (Goel et al., 2017) und eine aktuelle Studie berichtet von einer erhöhten Anzahl an Brp-Clustern pro AZ, wobei eine positive Korrelation der AZ-Fläche mit der Clusterzahl gezeigt wurde (Böhme et al., 2019). Um herauszufinden, wie die beschriebenen Befunde dieser Arbeit damit in Zusammenhang zu bringen sind, wurde eine Strategie entwickelt, konfokale Auflösung in lokalisationsmikroskopischen Daten zu simulieren (siehe Abschnitt 2.2, Abb. 21A, B). Der Kern dieser Simulation war die Anwendung eines Gauß'schen Filters mit einer Standardabweichung von 150 nm, was in etwa der maximal möglichen Auflösung eines konfokalen Mikroskops entspricht, sowie das Anlegen eines Pixel-Binnings von 80 nm. Diese Prozessierung wurde an je einem repräsentativen Bild aus beiden experimentellen Gruppen (ctrl und phtx) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Analyse der Daten, angelehnt an eine Standardmethode zur Quantifizierung konfokaler Daten der *Drosophila* NMJ (Schmid et al., 2008; Weyhermüller et al., 2011). Dabei liegt, wie bereits in vorangegangenen Abschnitten angesprochen, eine Intensitätsgrenzwert-basierte Bildsegmentierung zugrunde.

Ergebnisse

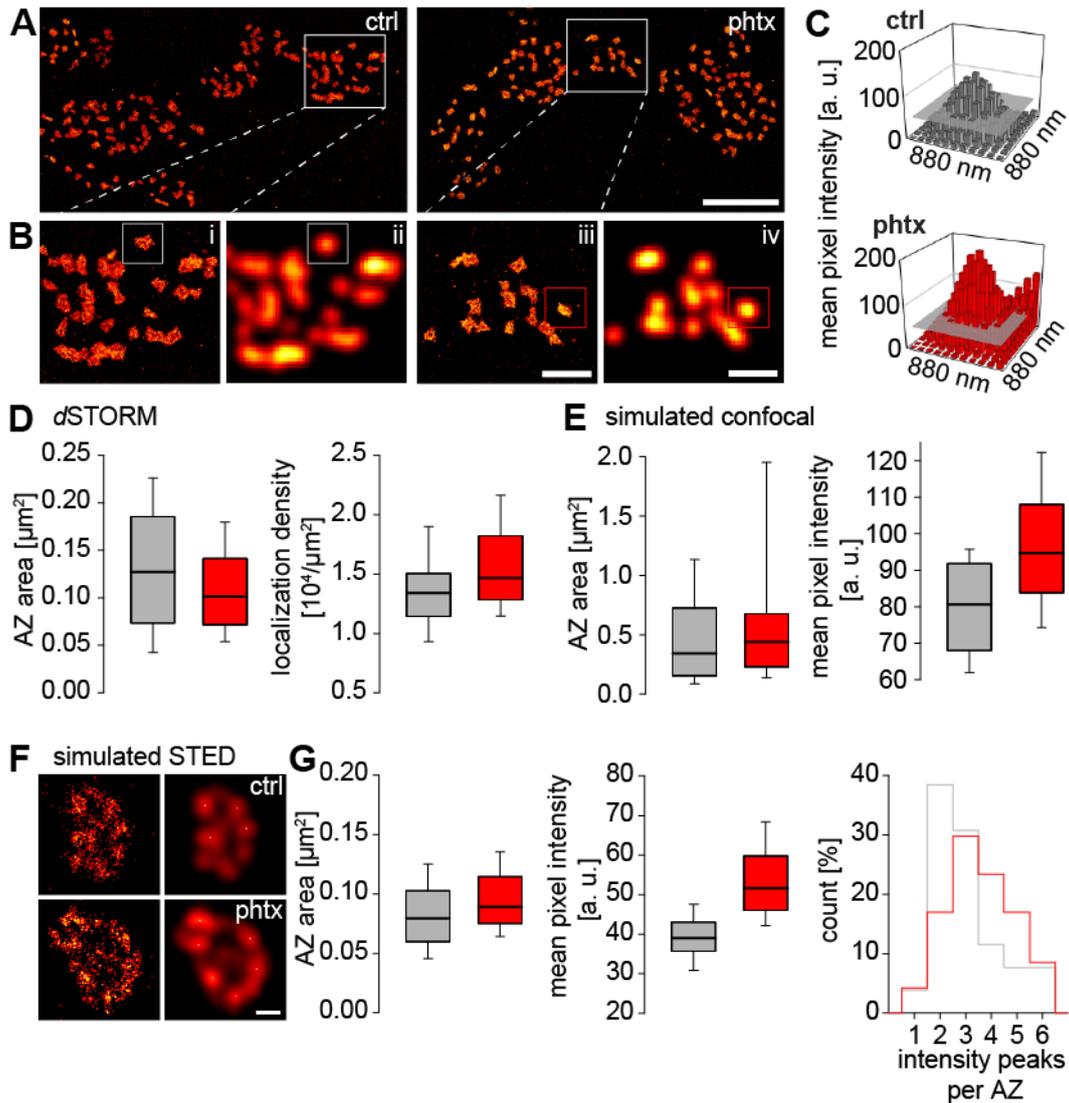


Abb. 21: Verdichtung auf der Nanoskala erscheint als Flächen- und Intensitätszunahme in konfokaler Simulation und als Zunahme der Brp-Cluster in STED-Simulation

A Ausschnitte aus dSTORM-Bildern in ctrl- (links) und phtx-Larven (rechts) in der regulären dSTORM-Auflösung dieser Arbeit (5-nm-Pixel-Binning, Vgl. 2.2). Die weißen Boxen entsprechen den vergrößerten Bereichen in **B**. Skala 4 μm .

B Vergrößerte Bereiche aus **A** mit dSTORM-Auflösung (i / iii) und simulierter konfokaler Auflösung (ii / iv, 80 nm Pixel, 150 nm Gauß'scher Filter, Vgl. 2.2). Die Boxen markieren die ausgewählten AZs in **C**. Skala 1,2 μm .

C 3D-Balkendiagramme der Pixelintensität bei konfokaler Auflösung der markierten AZs in **B**. Die graue Ebene entspricht dem Intensitätsgrenzwert von 50 a. u., der für die Quantifizierung in **E** angewendet wurde (Vgl. Weyhermüller et al., 2011 Abb. 4B).

Ergebnisse

D AZ-Fläche und Brp-Lokalisationsdichte aus der *d*STORM-Analyse in ctrl (grau, n = 57 AZs aus 1 Aufnahme) und phtx (rot, n = 100 AZs aus 1 Aufnahme).

E AZ-Fläche und mittlere Pixelintensität vermessen wie in **C** unter der Annahme konfokaler Auflösung in ctrl (n = 30 AZs in 1 Aufnahme) und phtx (n = 35 AZs in 1 Aufnahme). Konfluierende Brp-Flecken führen auf dieser Ebene der Auflösung zu einer abweichenden Anzahl der AZs im Vergleich zu **D**.

F Beispiel-AZs (links) und simulierte STED-Auflösung (25 nm Gauß'scher Filter, rechts) in ctrl (oben) und phtx (unten). Die weißen Pixel entsprechen den mit Fiji ermittelten Intensitätsmaxima. Skala 100 nm.

G AZ-Fläche, mittlere Pixelintensität und Anzahl der Intensitätsmaxima bzw. Brp-Cluster pro AZ aus der Analyse der simulierten STED-Daten (Vgl. **2.2**) in ctrl (grau, n = 26 AZs aus 1 Aufnahme) und phtx (rot, n = 47 AZs aus 1 Aufnahme).

Diese ist in Abbildung 21C exemplarisch für je eine ctrl- und eine phtx-AZ für einen Grenzwert von 50 arbiträren Einheiten (a. u.) dargestellt (Vgl. Weyhermüller et al., 2011 Abb. 4B). Zunächst wurden die ausgewählten Bilder mit originaler *d*STORM-Auflösung hinsichtlich AZ-Fläche und Brp-Lokalisationsdichte ausgewertet und es ergaben sich die gleichen Tendenzen im Vergleich zur Auswertung des kompletten Datensatzes (Abb. 21D, 0,127 (0,074-0,185) μm^2 und 0,101 (0,072-0,141) μm^2 , 13396 (11444-15049) locs. pro μm^2 und 14657 (12834-18221) locs. pro μm^2 in ctrl und phtx). Nun wurden die AZ-Fläche und die mittlere Pixelintensität in den gleichen Bildern mit konfokaler Auflösung quantifiziert und in beiden Parametern war interessanterweise eine Zunahme nach PhTx-Behandlung zu beobachten (Abb. 21E, AZ-Fläche Median (25.-75. Perzentil): 0,346 (0,155-0,725) μm^2 und 0,442 (0,230-0,678) μm^2 ; Mittlere Pixelintensität (Mittelwert \pm SEM): 80 \pm 2 a. u. und 96 \pm 3 a. u. in ctrl und phtx). Daraus lässt sich schließen, dass sich die Zunahme der Lokalisations- und damit Moleküldichte in *d*STORM in eine Zunahme der Pixelintensität bei konfokaler Auflösung übersetzt, während die Flächenvermessung bei letzterer intensitätsabhängig erfolgt und gegensätzliche Effekte zeigt. Im nächsten Schritt wurde STED-Auflösung in den ausgewählten Bildern simuliert, indem ein Gauß'scher Filter von 25 nm angewendet wurde (Abb. 21F). Zusätzlich erfolgte eine verblindete Selektion planar getroffener AZs, angelehnt an frühere Brp-Quantifizierungen mit STED-Mikroskopie (Böhme et al., 2019). Erneut erfolgte die Flächenvermessung Grenzwert-basiert

Ergebnisse

(18 a. u., Vgl. Böhme et al., 2019) und die Anzahl der Brp-Cluster wurde in Fiji mit der Funktion „Find Maxima...“ ermittelt. Es ergab sich nach Induktion von PHP eine Zunahme der Fläche und der mittleren Pixelintensität sowie eine leichte Zunahme der Brp-Cluster pro AZ (Abb. 21G, AZ-Fläche Median (25.-75. Perzentil): 0,08 (0,06-0,103) μm^2 und 0,089 (0,075-0,115) μm^2 ; Mittlere Pixelintensität (Mittelwert \pm SEM): 39 \pm 1 a. u. und 53 \pm 1 a. u.; Brp-Cluster pro AZ Median (25.-75. Perzentil): 3 (2-4) und 3 (3-5) in ctrl und phtx). Folglich führt auch bei STED-Auflösung die intensitätsabhängige Quantifizierung zu inversen Ergebnissen bei AZ-Fläche und Zahl der Brp-Cluster im Vergleich zu *d*STORM.

Übersetzung der *d*STORM-Lokalisationsdichte in Intensität und AZ-Fläche in der konfokalen Mikroskopie bei korrelativer Bildgebung

Die Ergebnisse der im vorangegangenen Abschnitt erläuterten Simulationen implizieren einen Zusammenhang zwischen der in *d*STORM gemessenen molekularen Dichte von AZs und ihrer Fläche und Intensität in der konfokalen Mikroskopie. Um diesen Zusammenhang experimentell zu belegen, wurde korrelative konfokale und *d*STORM-Bildgebung von Ib-Boutons durchgeführt. Die Brp-Färbung erfolgte analog zum bisherigen Protokoll und die gleichen Präparate wurden nacheinander auf einem konfokalen Mikroskop und mit *d*STORM-Bildgebung vermessen (Abb. 22A, B). Dieses Vorgehen ermöglichte die sequenzielle Untersuchung der gleichen Farbstoff-Population mit beiden Techniken. Um den Einfluss verschiedener Intensitätsgrenzwerte auf die Quantifizierung zu untersuchen, wurde das konfokale Signal mit verschiedenen Grenzwerten (50, 100 und 150 a. u.) ausgewertet (Abb. 22A). Es zeigte sich, dass höhere Grenzwerte eine bessere Bildsegmentierung bei größerem Signalverlust bewirken, wohingegen bei niedrigem Grenzwert die Signalerhaltung am besten ist, die Segmentierung jedoch nicht zufriedenstellend erfolgt. Für die weitere Quantifizierung wurde ein Grenzwert von 100 a. u. angewandt. In Abbildung 22C wurde das konfokale Signal mit den entsprechenden Lokalisationsdaten, deren Farbe die Clusterzugehörigkeit anzeigt, übereinander gelegt. Die magenta und blau gefärbten AZs in Abbildung 22Ci haben jeweils eine Fläche von 0,143 μm^2 und 0,118 μm^2 in *d*STORM sowie Lokalisationsdichten von 20590 locs. pro μm^2 bzw. 14775 locs. pro μm^2 .

Ergebnisse

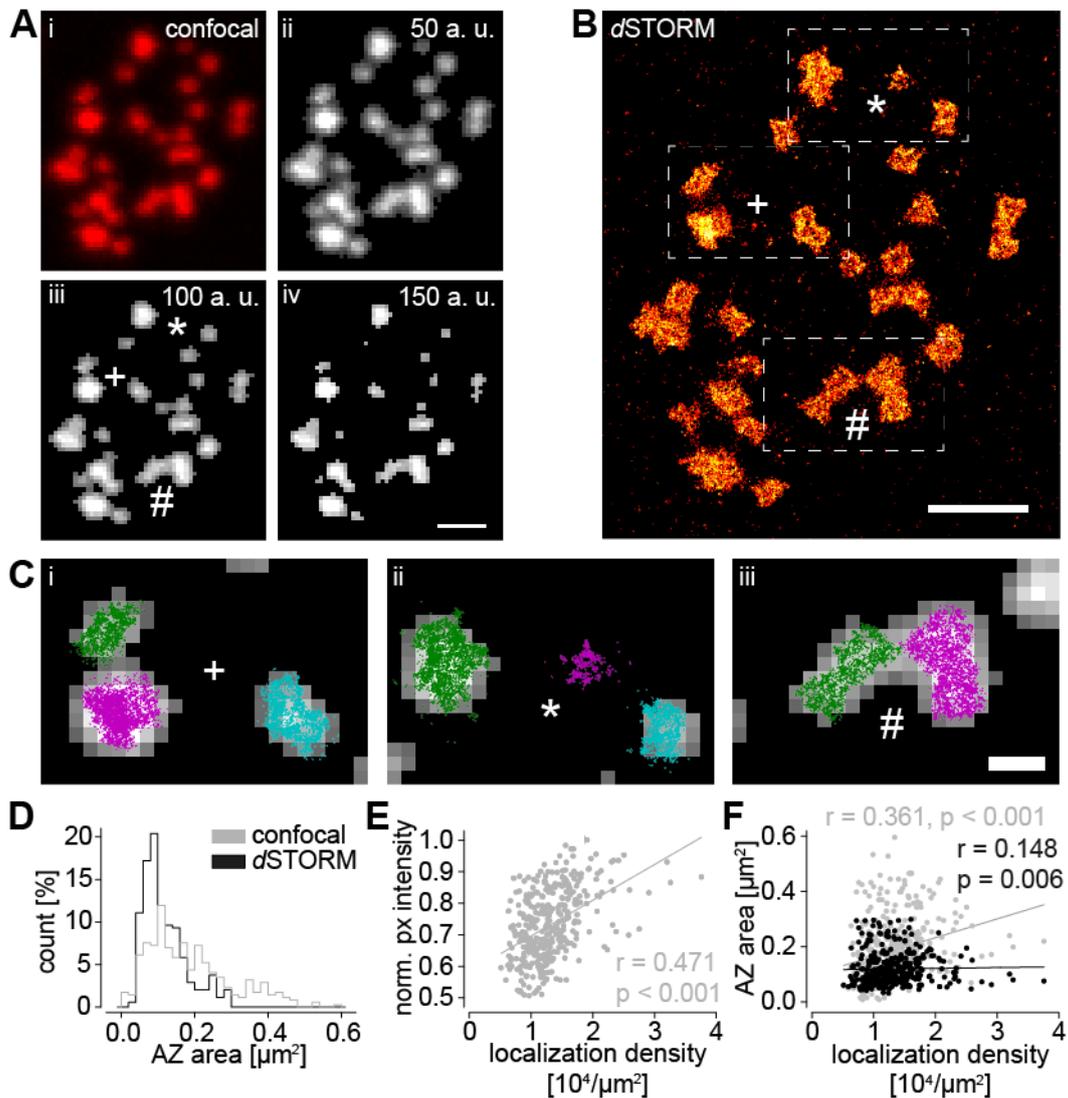


Abb. 22: Korrelative konfokale und dSTORM-Bildgebung

A Repräsentative konfokale Aufnahme eines Ib-Boutons. Färbung wie in Abbildung 8. (i) zeigt das Originalbild und (ii, iii, iv) zeigen das Signal nach der Anwendung eines Intensitätsgrenzwerts in 8-Bit von 50, 100 und 150 a. u. auf das Originalbild. Die Symbole markieren die korrespondierenden Bereiche in **B**, die in **C** vergrößert wurden. Skala 1 μm .

B Repräsentative dSTORM-Aufnahme des gleichen Ib-Boutons wie in **A**. Die Boxen entsprechen den vergrößerten Bereichen in **C**. Skala 1 μm .

C Vergrößerungen der in **B** markierten Bereiche. Das konfokale Signal (100 a. u.) wurde mit Punktdiagrammen der korrespondierenden dSTORM-Lokalisationen übereinander gelegt, wobei die Farbe die Clusteridentität anzeigt. Lokalisationscluster an den Bildrändern sind ausgespart. Skala 330 nm.

D AZ-Fläche in der konfokalen (grau) und dSTORM-Bildgebung (schwarz, für D-F: $n = 343$ korrespondierende AZs aus 12 NMJs aus 7 Tieren).

Ergebnisse

E Spearman-Korrelation für die mittlere Pixelintensität in der konfokalen Bildgebung (norm. px intensity) und die *d*STORM-Lokalisationsdichte.

F Die Spearman-Korrelation zeigt eine stärkere Korrelation der *d*STORM-Lokalisationsdichte zur konfokal vermessenen AZ-Fläche (grau) als zur *d*STORM-AZ-Fläche (schwarz).

Außerdem ist eine klar getrennte grüne AZ zu sehen. Aufgrund der hohen Lokalisationsdichte der magenta gefärbten AZ wird die grüne AZ in der konfokalen Bildgebung nicht als getrennt erkannt und gemeinsam bewirken beide Faktoren eine erhebliche Überschätzung der AZ-Fläche ($0,417 \mu\text{m}^2$ der verschmolzenen grünen und magenta gefärbten AZs im Vergleich zu $0,171 \mu\text{m}^2$ der blauen AZ). Weiterhin kann die grenzwertbasierte Auswertung konfokaler Bilder zum kompletten Verlust von Signal führen, das in *d*STORM als AZ erkannt wird (Abb. 22Cii). Außerdem ist die Segmentierung nahe gelegener AZs in der HDBSCAN-basierten Auswertung von Lokalisationsdaten im Vergleich deutlich besser (Abb. 22Ciii). Im nächsten Schritt erfolgte die Auswertung der AZ-Fäche des gesamten Datensatzes zur korrelativen Bildgebung. Die Verteilung der AZ-Fläche war in der konfokalen Bildgebung deutlich breiter im Vergleich zu *d*STORM (Abb. 22D, $0,164 (0,103-0,246) \mu\text{m}^2$ und $0,101 (0,0768-0,147) \mu\text{m}^2$). Wie aufgrund der Simulationen erwartet, korrelierte die in der konfokalen Mikroskopie gemessene mittlere Pixelintensität mit der korrespondierenden *d*STORM-Lokalisationsdichte (Abb. 22E, $r = 0,471$, $p < 0,001$). Außerdem korrelierte die Lokalisationsdichte stärker mit der konfokal gemessenen als mit der in *d*STORM gemessenen AZ-Fläche (Abb. 22F, $r = 0,361$, $p < 0,001$ und $r = 0,148$, $p = 0,00618$). Insgesamt zeigen diese Befunde, dass sich eine höhere Lokalisationsdichte in *d*STORM in eine scheinbare Flächenzunahme in der konfokalen Mikroskopie übersetzen kann und liefern einen experimentellen Beleg für die Ergebnisse der Simulationen.

Is-Neurone zeigen keine akute, strukturelle Plastizität

Abschließend stellte sich die Frage, ob es auch an den AZs der phasischen Is-Neurone zu akuten, strukturellen Veränderungen bei PHP kommt. Es wurde bereits beschrieben, dass funktionelle und strukturelle Veränderungen bei chronischer, genetisch-induzierter Homöostase auf Ib-Neuronen beschränkt sind (Newman et al., 2017; Li et al., 2018). Zur akuten Homöostase gibt es

Ergebnisse

jedoch noch keine Befunde. Die oben beschriebenen Auswerte-Algorithmen wurden nun verwendet, um den Effekt von PhTx auf Is-AZs an den Muskeln 6 und 7 anzuwenden (Abb. 23A). Bemerkenswerterweise zeigte sich dabei weder eine Änderung der AZ-Fläche, noch der absoluten Brp-Lokalisationszahlen oder der Brp-Lokalisationsdichte (Abb. 23B, C). Anschließend wurde die Subclusteranalyse durchgeführt und auch hier war keine Änderung bzw. Umorganisation zu beobachten (Abb. 23D-G). Diese Befunde deuten darauf hin, dass es an den im Grundzustand dichteren und kleineren AZs der Is-Neurone zu keiner weiteren Verdichtung der CAZ nach Induktion von PHP kommt.

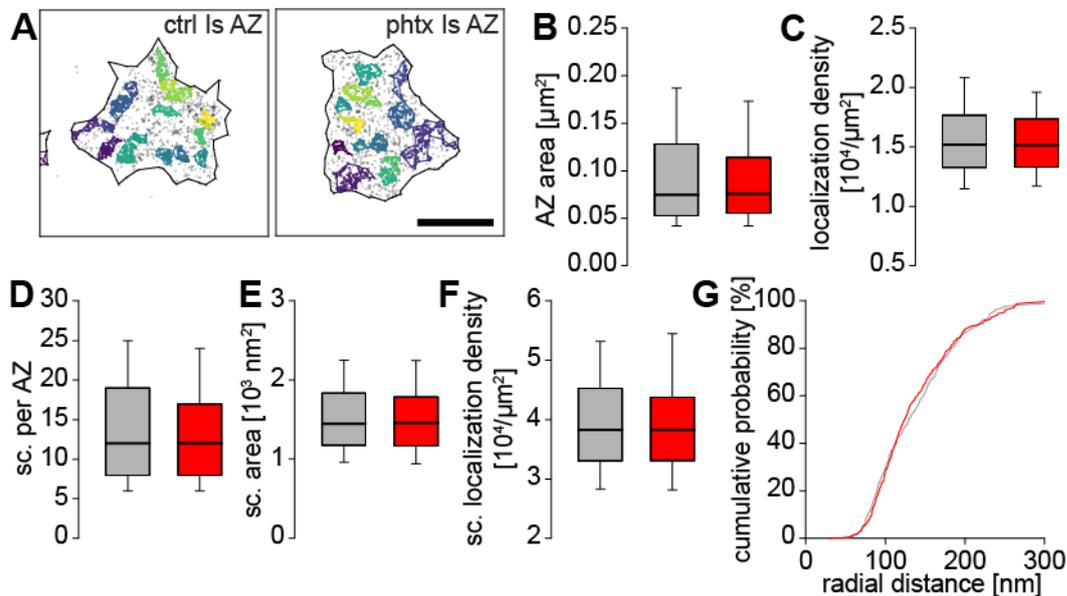


Abb. 23: PhTx-Stimulation bewirkt keine weitere AZ-Vedichtung in Is-Boutons

A Punktdiagramme von Is-AZs in ctrl- und phtx-Larven. Skala 200 nm.

B, C AZ-Fläche (**B**) und Brp-Lokalisationsdichte (**C**) in ctrl (grau, für B-G: $n = 449$ AZs aus 16 NMJs aus 6 Tieren) und phtx (rot, für B-G: $n = 406$ AZs aus 13 NMJs aus 5 Tieren).

D-F Anzahl der Subcluster pro AZ (**D**), der AZ-Fläche (**E**) und der Subcluster-Lokalisationsdichte (**F**) in ctrl und phtx.

G Kumulatives Diagramm der radialen Distanz zwischen AZ c. o. m. und c. o. m. der Subcluster in beiden Gruppen.

3.5 Tagging weiterer Epitope mittels CRISPR/Cas9-Verfahren

Effiziente Manipulation des *Drosophila*-Genoms

Zu den Vorteilen des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* zählt seine einzigartige genetische Modifizierbarkeit. Das *Drosophila*-Genom konnte im Jahr 2000 komplett entschlüsselt werden (Adams et al., 2000). Mittlerweile existiert eine breite Palette an genetischen Werkzeugen. Entscheidend waren die Einführung des UAS/Gal4-Systems, das die gezielte Expression in bestimmten Geweben ermöglicht (Brand & Perrimon, 1993), die Etablierung der homologen Rekombination (homology directed repair, HDR, Rong et al., 2002; Scholz et al., 2015), die Erstellung ganzer Bibliotheken mit Modifikationen in zahlreichen Genen (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015a, b) sowie die Entwicklung multipler *attP*-Sites zur simultanen Modifikation mehrerer genetischer Loci (Blanco-Redondo & Langenhan, 2018). Besonders hervorzuheben ist die Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems zur Erstellung transgener Fliegen, wodurch eine effiziente und zielgerichtete Mutagenese in jedem gewünschten Gen möglich ist (Gratz et al., 2013; Xue et al., 2014; Gratz et al., 2015). Als Bestandteil der adaptiven Immunabwehr von Bakterien und Archaeen konnte das System vor wenigen Jahren erstmals erfolgreich zur molekulargenetischen Modifikation in Bakterien (Jinek et al., 2012) und kurze Zeit später auch in Säugern (Wang et al., 2013) eingesetzt werden. Die Cas9-Endonuklease schneidet fremde, virale Nukleinsäuren in einem Komplex mit zwei kleinen RNA-Molekülen, der variablen CRISPR RNA (crRNA) mit der Zielsequenz und einer konstanten, aktivierenden RNA (transactivating crRNA, tracrRNA), die für molekularbiologische Zwecke in einer einzigen RNA, der gRNA (guidance RNA), fusioniert werden können (Jinek et al., 2012; Gratz et al., 2013). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Strategie zur Erstellung transgener Fliegen beruht auf für die Anwendung in *Drosophila* modifizierten Protokollen (siehe Abschnitt 2.3) und ist in Abbildung 24 dargestellt (Gratz et al., 2015). Die Erzeugung einer beliebigen Punktmutation oder das gezielte Einführen eines Tags erfordert die Erstellung von lediglich drei Plasmiden. Für das gezielte Schneiden der Cas9-Endonuklease werden zwei gRNA-Plasmide erstellt und für die Modifikation mittels HDR wird ein Plasmid als Reparaturkonstrukt mit der modifizierten Zielsequenz, entsprechenden Homologiearmen und Mini-Gen zur

Ergebnisse

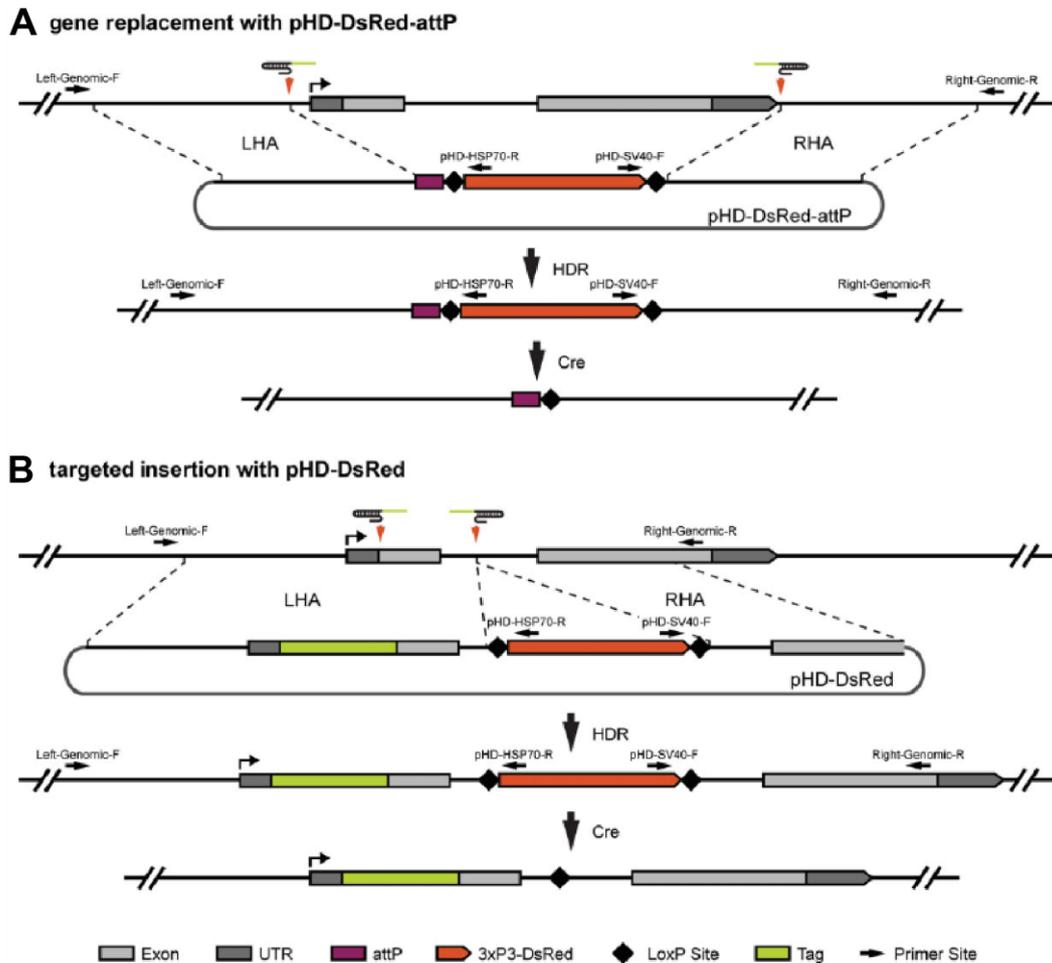


Abb. 24: CRISPR/Cas9-Strategie zur Erstellung transgener Fliegen

Struktur der Reparaturplasmide und Integrationschritte mittels HDR mit dem *pHD-DsRed-attP*- (A) und *pHD-DsRed*-Vektor (B). Beide Vektoren verfügen über eine Selektionskassette (3xP3-DsRed) und flankierende *LoxP*-Sequenzen zum Entfernen des Markers sowie Polylinker (multiple cloning sites, MCS) zum Einfügen des 5'- und 3'-Homologiearms für die HDR.

A Die Cas9-Endonuklease schneidet mittels zweier gRNAs das zu ersetzende Gen aus. Durch HDR wird die entfernte Sequenz durch eine *attP*-Kassette und die Sequenz für den Selektionsmarker DsRed ersetzt. Durch Expression der Cre-Rekombinase wird DsRed entfernt und es verbleibt die *attP*- mit einer einzelnen *LoxP*-Kassette.

B Zum direkten Tagging eines Gens kann die Sequenz für das Tag in einen der Homologiearme kloniert werden. Nach Entfernung des Selektionsmarkers verbleibt die Sequenz für das Tag an der gewünschten Stelle sowie eine einzelne *LoxP*-Kassette in einem angrenzenden Intron. Diese Strategie wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt (modifiziert aus Gratz et al., 2015, Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Inc.).

Ergebnisse

Expression von DsRed (Discosoma red fluorescent protein) für die Selektion positiver Transformanden benötigt. Rechnet man die Zeit für die Injektion der *Drosophila*-Embryonen ein, kann man mit diesem Protokoll transgene Tiere innerhalb weniger Monate erhalten (Gratz et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fliegenlinien mit markierten Calciumkanälen für deren fluoreszenzmikroskopischen Nachweis erzeugt.

Erstellung transgener Fliegen mit gezielt markierten Calciumkanälen

Spannungsgesteuerte Calciumkanäle sind essenzielle Schaltstellen bei der Regulation der synaptischen Transmission (Vgl. Abschnitte 1.1 und 1.2, Catterall 2011). Es wurde gezeigt, dass Synapsen mit verschiedenen funktionellen Eigenschaften unterschiedliche Kopplungsdistanzen zwischen Calciumsensor und -kanälen aufweisen, was bei loser Kopplung zur Definition von Mikro- und bei enger Kopplung zu Nanodomänen der lokalen Calciumkonzentration führt (Vyleta & Jonas, 2014; Schmidt et al., 2013). Die Komponenten der AZ sind entscheidend bei der räumlichen Organisation der Calciumkanäle involviert (Kittel et al., 2006; Kaeser et al., 2011). Die detaillierte Analyse der räumlichen Anordnung der VGCCs spielt daher eine große Rolle für das Verständnis der Funktion verschiedener Synapsen und aktiver Zonen (Indriati et al., 2013; Miki et al., 2017; Rebola et al., 2019). Die α_1 -Untereinheit der VGCCs bei *Drosophila* wird vom Gen *cacophony* kodiert. Die Visualisierung des Verteilungsmusters von Cacophony (*cac*) in der Präsynapse wurde erstmals durch ein GFP-fusioniertes Überexpressionskonstrukt ermöglicht, das gemeinhin als *cac::GFP* bezeichnet wird (Kawasaki et al., 2004). Nachteile dieser Strategie sind eine Hintergrundexpression des Gens, je nach genetischer Umgebung, in der exprimiert wird, sowie eine unphysiologische Regulation der Gendosis und des Expressionsmusters, abhängig von der verwendeten Gal4-Treiberlinie. Direkte Modifikationen des endogenen, genomischen Locus umgehen diese Probleme und mit CRISPR/Cas9 liegt eine effiziente und vergleichsweise schnelle Methode vor, um entsprechende Linien zu erzeugen. Analog zu *cac::GFP* wurden im Rahmen dieser Arbeit endogen getaggte *cac*-Konstrukte erstellt, bei denen ein EGFP bzw. ein V5-Tag (Vgl. Abschnitt 4.3) C-terminal der PDZ-Domäne eingefügt wurde. Biochemische Tags wie das V5-Tag haben, verglichen mit GFP, den Vorteil einer viel geringeren Größe (in

Ergebnisse

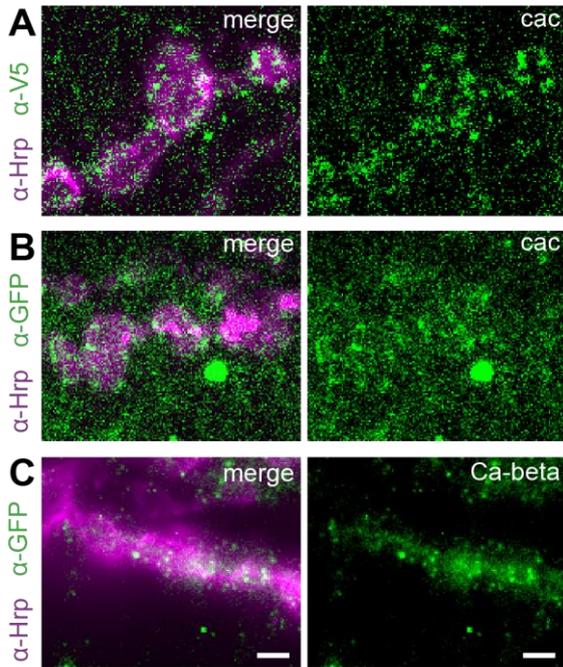


Abb. 25: Nachweis markierter Calciumkanäle

A Die α_1 -Untereinheit der VGCCs wurde an ihrem C-Terminus mit einem V5-Tag markiert und mit einem Maus Anti-V5-Antikörper sowie einem Alexa Fluor 488-konjugierten Ziege Anti-Maus Sekundärantikörper an Ib-Boutons der Muskeln 6/7 dargestellt. Die präsynaptische Membran wurde mit einem Cy3-konjugierten Ziege α -hrp Antikörper gefärbt.

B Die Markierung erfolgte analog der Position in **A** mit EGFP. Färbung wie in **A** aber mit einem Maus Anti-GFP-Primärantikörper.

C Ca-beta wurde C-terminal der Aminosäuren WKATH mit EGFP markiert. Färbung wie in **B**. Skala für **A-C** 2 μ m.

diesem Fall 14 Aminosäuren). Somit sind Störungen der Proteinfunktion unwahrscheinlicher und es ergibt sich eine bessere Ortsauflösung bspw. beim Markieren bestimmter Proteindomänen. Wie andere Ionenkanäle verfügen auch VGCCs über auxiliäre Untereinheiten. Zu diesen zählt die intrazelluläre β -Untereinheit Ca-beta, die die Lokalisierung und Kinetik des Kanals beeinflusst (Dolphin 2003). Auch für dieses Gen wurde eine endogen getaggte Linie erstellt, bei der EGFP C-terminal der konservierten Aminosäuren WKATH eingefügt wurde. Die erfolgreiche Darstellung der Tags an der NMJ an den Muskeln 6/7 zeigt Abbildung 25. Die erzeugten Linien stehen nun als Werkzeuge u. a. für lokalisationsmikroskopische Studien zur Verfügung.

Neben der Größe des Tags spielt die Größe des Antikörperkomplexes für den Nachweis eine wichtige Rolle für die Lokalisationspräzision. Von großem Vorteil ist hierbei die Verwendung von Einzeldomänenantikörpern bzw. Nanobodies. Deren kommerzielle Verfügbarkeit beschränkt sich in erster Linie auf den Nachweis von GFP und dessen Derivate. Anhand zweier Beispiele wird im Folgenden die Verwendung des V5-Tags und eines Anti-GFP-Nanobodies für die Lokalisationsmikroskopie der AZ bei *Drosophila* vorgestellt. Auf die Vor- und

Ergebnisse

Nachteile verschiedener Tagging-Strategien und Nachweismethoden wird in Abschnitt 4.3 weiter eingegangen.

N-Terminus von RIM bildet Nanocluster

RIM ist ein integraler Bestandteil aktiver Zonen und spielt eine wichtige Rolle bei ihrer räumlichen Organisation, der Regulation der Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel sowie synaptischer Kurzzeitplastizität (Schoch et al., 2002; Südhof et al., 2012). In Säugern bildet es über seine PDZ-Domäne einen Komplex mit Munc13 und ELKS/CAST (Ohtsuka et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass es über Interaktion mit der GTPase Rab3 die Positionierung präsynaptischer Vesikel kontrolliert sowie entscheidend an der Lokalisierung von Calciumkanälen beteiligt ist (Gracheva et al., 2008; Kaeser et al., 2011). Die Bindung an Rab3 erfolgt mit hoher Wahrscheinlichkeit über die N-terminale Zinkfinger-Domäne von RIM (Wang et al., 1997). In einer neueren Arbeit wurde demonstriert, dass RIM Nanocluster in der AZ bildet und evozierte Vesikelfreisetzung bevorzugt an Orten hoher RIM-Dichte erfolgt (Tang et al., 2016). Zur Darstellung von RIM an der NMJ von *Drosophila melanogaster* wurde eine mittels CRISPR/Cas9 generierte Linie verwendet, bei der N-terminal der Zinkfingerdomäne ein V5-Tag eingefügt wurde. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen Anti-V5-Antikörper und, analog zur Brp-Bildgebung, einem Ziege Anti-Maus F(ab')₂-Fragment (Abb. 26A). Es zeigte sich ein geclustertes Muster mit einer ringförmigen Anordnung und einem zentralen Loch (Abb. 26B). Das Epitop deckt circa ein Fünftel der Fläche im Vergleich zu Brp ab, also etwa 0,02 μm^2 (Paul et al., in preparation).

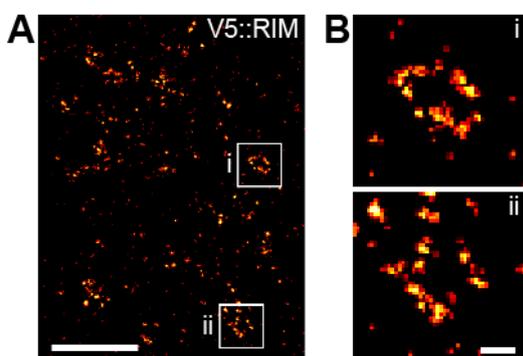


Abb. 26: d STORM-Bildgebung zeigt Nanocluster des RIM-Zinkfingers

A d STORM-Aufnahme von RIM, das N-Terminus mit einem V5-Tag markiert und mit einem Maus Anti-V5-Antikörper sowie Alexa Fluor647-gekoppelten F(ab')₂-Fragmenten angefärbt wurde, in einem Ib-Bouton an Muskel 6/7. Skala 1 μm .

B Vergrößerungen der in **A** mit weißen Boxen (i, ii) markierten RIM-AZs. Skala 100 nm.

Der mittlere Teil von Bruchpilot verteilt sich auf eine kleinere Fläche

Der in dieser Arbeit zur *d*STORM-Bildgebung von Brp verwendete monoklonale Antikörper Brp^{Nc82} bindet an den C-Terminus des Proteins und die Position des Epitops konnte auf den Bereich der Aminosäuren 1227-1740, bezogen auf die 1740 Aminosäuren lange Splicevariante, eingengt werden (Fouquet et al., 2009). Die Darstellung eines N-terminal lokalisierten Epitops mittels STED-Mikroskopie konnte eine Verjüngung der Brp-Filamente von C- nach N-terminal, entsprechend der T-bar-Formation in der elektronenmikroskopischen Darstellung, belegen (Fouquet et al., 2009, Vgl. Abb. 3 und 4A). In dieser Arbeit wurde für die Darstellung von Brp mit einem direkt Cy5-konjugierten Anti-GFP-Nanobody eine im Rahmen des MiMIC-Projektes von Hugo Bellen (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015a) erstellte Linie verwendet. Etwa auf Höhe der Aminosäure 600 wurde ein GFSTF (EGFP-FIAsH-StrepII-TEVcs-3xFlag)-Tag (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015b) eingefügt. Abbildung 27 zeigt eine *d*STORM-Aufnahme eines entsprechenden Ib-Boutons sowie ausgewählte, vergrößerte AZs. Das Epitop erscheint im Vergleich zu Nc82 weniger distinkt geclustert und bedeckt eine ähnliche Fläche wie der N-Terminus von RIM (Vgl. Abb. 26B). Die Brp-Filamente scheinen sich also schon zur Mitte hin deutlich zu verjüngen. Die Funktionalität des Anti-GFP-Nanobodies für *d*STORM-Bildgebung ist damit nachgewiesen und dieses Werkzeug kann zukünftig für detaillierte Vermessungen verwendet werden.

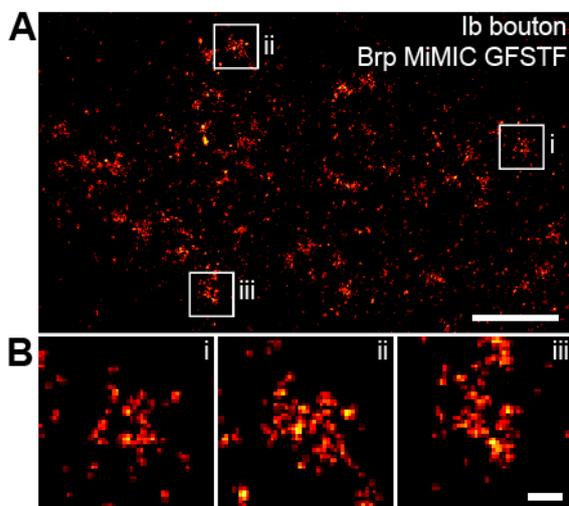


Abb. 27: Darstellung eines membrannäheren Brp-Epitops mit Nanobodies

A *d*STORM-Aufnahme von Brp, das mit einem sulfoCyanin 5-gekoppelten Anti-GFP-Nanobody gegen das GFSTF-Tag dargestellt wurde. Skala 1 µm.

B Vergrößerungen der in **A** mit weißen Boxen (i, ii, iii) markierten AZs. Skala 100 nm.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der strukturellen Differenzierung aktiver Zonen, im Speziellen des AZ-Proteins Bruchpilot, am Beispiel phasischer und tonischer Synapsen an der NMJ von *Drosophila melanogaster* sowie die Analyse akuter, struktureller Plastizität im Rahmen präsynaptischer Homöostase. Hierzu wurden neue Auswertalgorithmen basierend auf HDBSCAN zur Analyse lokalisationsmikroskopischer Daten erarbeitet. Als Kernbefunde zeigten sich an Synapsen phasischer Is-Neurone kleinere, dichtere und damit kompaktere AZs. Diese Gesamtverdichtung war auch in der Substruktur der AZ auf Ebene einzelner Brp-Cluster zu finden, die bei insgesamt niedrigerer Zahl eine ebenfalls kleinere Fläche und höhere Moleküldichte aufwiesen. Ein ähnliches Muster der Verdichtung der gesamten AZ und ihrer Substruktur fand sich interessanterweise bei Induktion präsynaptischer Homöostase, die funktionell mit einer kompensatorisch erhöhten Neurotransmitterfreisetzung einhergeht. Weiter konnte gezeigt werden, dass sich diese Form der akuten Plastizität auf tonische Ib-Synapsen beschränkt und dass sie homogen entlang der Boutonkette erfolgt. Die Simulation konfokaler und STED-Auflösung in Lokalisationsdaten sowie korrelative konfokale und *d*STORM-Bildgebung konnten den Zusammenhang zu Befunden aus früheren Arbeiten herstellen. Die vorliegenden Ergebnisse liefern einen Beitrag zum besseren Verständnis von Struktur-Funktions-Beziehungen an Synapsen und den molekularen Mechanismen ihrer funktionellen Feinregulation. Die hier eingeführten Werkzeuge zur Quantifizierung lokalisationsmikroskopischer Daten dienen als Grundlage für weiterführende Studien, z. B. zur Analyse der molekularen Konfiguration in anderen funktionellen Zusammenhängen und zur Charakterisierung weiterer Epitope. Letzteres kann durch die Anwendung der in dieser Arbeit genutzten CRISPR/Cas9-Strategie erreicht werden. Erste Konstrukte wurden hier eingeführt und stehen für lokalisationsmikroskopische Untersuchungen zur Verfügung. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse im Kontext der wissenschaftlichen Literatur diskutiert.

4.1 AZ-Differenzierung phasischer und tonischer Synapsen

Die strukturelle Untersuchung von Synapsen unterschiedlicher Funktion dient der Identifikation von Struktur-Funktions-Beziehungen, die der synaptischen Differenzierung zugrunde liegen (Atwood & Karunanithi, 2002). Brp gehört zu den häufigsten Proteinen der AZ bei *Drosophila* und wird als Hauptgerüst der AZ-Struktur angesehen. In dieser Arbeit wurden an AZs phasischer Is-Synapsen etwa 17 % kleinere Brp-Flächen als an den tonischen Ib-Synapsen gefunden. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel ist an Is höher als an Ib-Synapsen (Kurdyak et al., 1994; Lu et al., 2016). Eine wichtige Stellgröße der Freisetzungswahrscheinlichkeit ist die Kopplungsdistanz zwischen Calciumsensor und VGCCs (Vgl. Abschnitte 1.1 und 1.2), wobei enge Kopplung mit hoher und lose Kopplung mit niedrigerer Wahrscheinlichkeit einhergeht (Eggermann et al., 2011). Man geht davon aus, dass Brp an seinem C-Terminus mit den synaptischen Vesikeln mittelbar oder unmittelbar in Verbindung steht (Scholz et al., 2019) und mit seinem N-Terminus mit den Calciumkanälen (Vgl. Abb. 4A, B, Hallermann et al., 2010b). Die kleinere Fläche und dichtere Konfiguration der Is-AZs könnte demnach zur Verringerung des Abstands zwischen Vesikeln und Calciumkanälen beitragen. Damit in Einklang steht der geringere Abstand der einzelnen Brp-Subcluster zum Zentrum der AZ (Abb. 15G). Dem entgegen steht der Befund, dass die Menge an Brp mit der individuellen Freisetzungswahrscheinlichkeit einer AZ korreliert (Akbergenova et al., 2018). In der zitierten Studie ist allerdings mit srSIM gearbeitet worden, also mit einer etwa 5-fach geringeren Auflösung im Vergleich zu dSTORM (Vgl. Abschnitt 1.3). Weiterhin sind in der vorliegenden Arbeit Probleme der intensitätsbasierten Quantifizierung fluoreszenzmikroskopischer Daten gezeigt worden (Vgl. Abb. 21, 22), die der Diskrepanz ebenfalls zugrunde liegen können. Es wurde demonstriert, dass sich eine höhere molekulare Dichte bei kleinerer Fläche von Objekten in der Lokalisationsmikroskopie in eine höhere Fluoreszenzintensität und scheinbar größere Fläche bei konfokaler und auch bei STED-Auflösung übersetzen kann. Es erscheint daher denkbar, statt von Proteinmenge, die mit der Freisetzungswahrscheinlichkeit korreliert, in bestimmten Fällen besser von Proteinkonzentration zu sprechen. Auch in anderen experimentellen Modellen ist eine kompaktere Anordnung des AZ-

Materials im Zusammenhang mit einer höheren Freisetzungswahrscheinlichkeit an phasischen Synapsen beschrieben worden (Éltes et al., 2017). Zur weiteren Klärung der offenen Fragen wäre die Vermessung der Kopplungsdistanz an Ib- und Is-Neuronen in Kombination mit der lokalisationsmikroskopischen Vermessung der räumlichen Anordnung weiterer AZ-Komponenten hilfreich. Die in dieser Arbeit eingeführten Analysewerkzeuge zur schnellen und objektiven Quantifizierung, basierend auf HDBSCAN, können hierzu einen Beitrag leisten.

4.2 Strukturelles Korrelat akuter Plastizität

Frühere Studien zum strukturellen Korrelat PhTx-induzierter, präsynaptischer Homöostase zeigten einen Anstieg der Fluoreszenzintensität des Proteins Brp (Weyhermüller et al., 2011; Böhme et al., 2019) sowie eine Zunahme seiner Fläche (Goel et al., 2017) in der konfokalen Mikroskopie. Untersuchungen an der genetisch, durch das Fehlen der postsynaptischen GluRIIA-Glutamatrezeptoruntereinheit induzierten Form der Homöostase mit STED-Mikroskopie zeigten eine Vergrößerung der CAZ bzw. eine Rekrutierung von Brp-Modulen (Weyhermüller et al., 2011; Böhme et al., 2019). Die Analysen der vorliegenden Arbeit unter Anwendung von *d*STORM zeigten eine Verkleinerung der Brp-Fläche sowie eine Zunahme der molekularen Dichte, die sich auch in den individuellen Brp-Subclustern wiederfindet, ohne Rekrutierung weiterer Brp-Moleküle. Wie sind diese Befunde in Einklang zu bringen? Mögliche Erklärungen und Lösungsansätze werden im Folgenden diskutiert.

In dieser Arbeit wurde ein objektives, transparentes Vorgehen bzgl. der Selektion des zu analysierenden Signals gewählt. Einzige Auswahlkriterien waren die Position der ausgewerteten Boutons innerhalb der NMJ (nur die distalen Boutons 1-6) sowie feste Grenzwerte zur Identifikation von Ausreißern (siehe Abschnitt **2.2**). Die Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel individueller AZs innerhalb einer NMJ ist heterogen (Melom et al., 2013; Akbergenova et al., 2018). Diese funktionellen Eigenschaften der einzelnen AZs sind in den Bildgebungsdaten nicht ersichtlich. Daher wurde keine Selektion vorgenommen, um eine unkontrollierte Gewichtung zu vermeiden. Die räumliche Orientierung Brp-positiver AZs in der 2D-Projektion ist unter-

Diskussion

schiedlich. So findet man seitlich getroffene AZs, planar (in der Aufsicht) getroffene AZs in der typischen ringartigen Brp-Anordnung mit zentralem Loch sowie diverse Übergangsformen (Kittel et al., 2006, Vgl. Abb. 8A, B). Hierbei besteht das Risiko, dass sich verschiedene experimentelle Gruppen zufällig in der Zusammensetzung der verschiedenen Orientierungen unterscheiden, was zu Fehlern insbesondere bei der Vermessung subtiler Flächenunterschiede führen kann. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde die Zirkularität der AZs vermessen unter der Annahme, dass eine annähernd kreisrunde Form auf planar getroffene AZs hindeutet. Es wurden keine Unterschiede zwischen Kontrollen und PhTx-behandelten Tieren gefunden (Abb. 19A), woraus geschlossen wird, dass dieser mögliche Fehler nicht zu den oben geschilderten Abweichungen der Ergebnisse beiträgt. Auch wenn nur die eher kreisrunden AZs ausgewählt werden, ist die Abnahme der Fläche nach Induktion von PHP zu sehen (Abb. 19C). Bei der Analyse des Einflusses genetischer Veränderungen, wie bspw. bei der genetisch induzierten Form der PHP, kommen mutationsbedingte Entwicklungsverzögerungen als Ursache funktioneller und struktureller Unterschiede in Frage. Dieses Problem spielt in dieser Arbeit jedoch eine untergeordnete Rolle, da keine genetischen Modelle untersucht wurden. In einigen der zitierten Studien wurde die Bildgebung im Gegensatz zu elektrophysiologischen Messungen an Muskel 4 statt an den Muskeln 6/7 durchgeführt (Goel et al., 2017; Böhme et al., 2019). Der Rumpfwandmuskel 4 unterscheidet sich bei *Drosophila* zum Beispiel dadurch von Muskel 6 und 7, dass keine Differenzierung in Ib- und Is-Boutons vorliegt (Hoang & Chiba, 2001). Es ist denkbar, dass sich strukturelle Anpassungen der AZs an den verschiedenen NMJs unterschiedlich manifestieren. Die Analyse struktureller Änderungen des Brp-Signals nach PhTx-Behandlung an Muskel 4 lieferte hierfür jedoch keinen Hinweis (Abb. 20).

Ein weiterer Unterschied zu einigen früheren Studien zu homöostatischer Plastizität ist die Anwendung einer anderen Technik, sowohl im Hinblick auf die bildgebende Methode als auch die Quantifizierung der Daten (Vgl. Böhme et al., 2019; Weyhermüller et al., 2011). Zum besseren Verständnis des Zusammenhangs des in dieser Arbeit gefundenen molekularen Dichteanstiegs nach Induktion von PHP und früheren Befunden wurde konfokale Auflösung in

Diskussion

den Lokalisationsdaten simuliert (Vgl. Abschnitte **2.2** und **3.4**) und es wurde gezeigt, dass sich die gemessene AZ-Fläche beim Vergleich der Auflösungen gegensätzlich verhält (Abb. 21D, E). Gleiches gilt auch für die Simulation von STED-Auflösung in den Lokalisationsdaten (Abb. 21F, G). Böhme et al., 2019 beschrieben eine Rekrutierung von Brp-Modulen bei akuter Homöostase bei positiver Korrelation der Modulanzahl und AZ-Fläche in der STED-Mikroskopie, während in der vorliegenden Arbeit keine Änderung der Anzahl an Brp-Subclustern sowie keine Evidenz für Rekrutierung von Material in die AZ gefunden wurde. Dass die Lokalisationsdaten bei Simulation von STED-Auflösung und entsprechender Selektion planarer AZs und intensitätsgrenzwertbasierter Auswertung deckungsgleiche Ergebnisse im Vergleich zu den original beschriebenen STED-Befunden liefern, macht deutlich, dass schon kleine Unterschiede in der räumlichen Auflösung hochauflösender Verfahren zu großen Differenzen bei der Vermessung subtiler Unterschiede und bei der Interpretation von Daten führen können. Neben den Simulationen liefert die korrelative konfokale und *d*STORM-Bildgebung in dieser Arbeit auch einen experimentellen Beleg dafür, dass sich eine höhere Molekülkonzentration in eine größere Fläche und Signalintensität in der konfokalen Quantifizierung übersetzt (Abb. 22E, F). Bisher gibt es keine publizierten Daten zur direkten Korrelation der beiden Methoden bei der Bildgebung von AZs und somit liefert die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis unterschiedlicher Befunde in der Lokalisationsmikroskopie im Vergleich zu anderen bildgebenden Methoden.

Was ist die funktionelle Bedeutung der Verdichtung und Verkleinerung der AZ bei akuter Homöostase? Wentzel et al., 2018 konnten demonstrieren, dass der Anstieg der Neurotransmitterfreisetzung bei PHP von einem lose gekoppelten Vesikelpool abhängt. Es ist vorstellbar, dass die Verdichtung der AZ zu einem verringerten Abstand zwischen Vesikeln und Calciumkanälen führt und damit die Freisetzung effizienter macht. Dafür spricht, dass an den bereits dichter konfigurierten und mutmaßlich enger gekoppelten Is-AZs keine weitere Verdichtung bzw. Verkleinerung nach PhTx-Behandlung sichtbar ist (Abb. 23). Die Beschränkung auf Ib-Neurone wurde bereits für das chronische Modell der PHP beschrieben (Newman et al., 2017; Li et al., 2018). In einer früheren Arbeit

Diskussion

konnte gezeigt werden, dass lose Kopplung entscheidend für die Plastizität einer Synapse ist (Vyleta & Jonas, 2014). Eine losere Kopplung an Ib-Synapsen würde erklären, warum die Verdichtung nur hier und nicht an Is-Synapsen stattfindet. Es gibt Hinweise dafür, dass es auch funktionelle Anpassungen bei Homöostase ohne strukturelle Veränderung der AZ zumindest auf Ebene der konfokalen Mikroskopie gibt (Böhme et al., 2019). Damit steht die Frage im Raum, ob es generell funktionelle Änderungen ohne ein strukturelles Korrelat geben kann. Betrachtet man auch Konformationsänderungen auf Molekülebene als strukturelle Anpassung, ist dies jedoch unwahrscheinlich. Bei fehlender Nachweisbarkeit in der Lichtmikroskopie könnten hier auch andere Methoden zur Strukturanalyse in Betracht gezogen werden (z. B. Röntgenstrukturanalyse, Kryoelektronenmikroskopie). Eine weitere offene Frage ist der molekulare Ablauf, der der Verdichtung zugrunde liegt. Die Bindung synaptischer Vesikel hängt von der Separation zwischen flüssigen Phasen ab (liquid-liquid phase separation), die wiederum durch intrinsisch unstrukturierte Proteinregionen (intrinsically disordered regions, IDR) hervorgerufen wird, die keine stabile Sekundär- oder Tertiärstruktur ausbilden (Milovanovic et al., 2018). Glutaminreiche IDRs scheinen eine wichtige Rolle bei der Bildung von coiled-coils und Proteinagglomeraten zu spielen (Fiumara et al., 2010) und Glutamin bewirkt bei Liquid-liquid Phase Separation eher eine Verhärtung der Phase (Wang et al., 2018). Der C-Terminus von Brp vermittelt die Bindung der Vesikel an den T-bar und ist ebenfalls glutaminreich (Hallermann et al., 2010b, Abb. 4A). Die Verdichtung der AZ bei akuter PHP könnte also daraus resultieren, dass Vesikel bei erhöhtem Vesikelverkehr mit Brp C-Termini in Liquid-liquid Phase Separation treten.

An der *Drosophila* NMJ ist eine proximal-zu-distale Differenzierung der Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel entlang der Boutonkette beschrieben worden (Guerrero et al., 2005; Peled & Isacoff, 2011). Distale Boutons zeigen größere postsynaptische Ströme (Paul et al., 2015) und haben größere AZs mit mehr Brp-Molekülen (Ehmann et al., 2014). Diese Differenzierungsmuster beschränken sich auf die größeren Ib-Boutons und fehlen an Is-Boutons. In dieser Arbeit wurde die räumliche Differenzierung der strukturellen präsynaptischen Plastizität daher an Ib-Boutons untersucht (Abb.

17E). Sowohl in Kontrollen als auch in PhTx-behandelten Larven zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Brp-Lokalisationsdichte und der Boutonposition entlang der Kette. Die strukturelle Verdichtung bei akuter PHP scheint daher unabhängig von der Freisetzungswahrscheinlichkeit an den einzelnen Boutons zu sein.

4.3 Nanoskopie der aktiven Zone

Molekulare Verteilungsmuster in aktiven Zonen

Der in dieser Arbeit verwendete Clusteralgorithmus HDBSCAN hat seine Stärke in der Erkennung stabiler Cluster in Daten mit variabler Dichte. Allerdings ist er weniger hilfreich bei der Entscheidung, ob überhaupt Clustering vorhanden ist oder die Daten eher zufällig verteilt sind. Besonders bei VGCCs zeigte sich, dass ein geclustertes Muster nur in einigen Fällen die funktionellen Eigenschaften bestimmter Synapsen erklären kann. So demonstrierten Rebola et al., 2019, dass an eng gekoppelten Sternzellsynapsen im Cerebellum zwar ein geclustertes Modell der VGCCs funktionelle Eigenschaften erklären kann, dass jedoch an eher lose gekoppelten Körnerzellsynapsen das sogenannte Exklusionszonenmodell (exclusion zone model, EZM) wahrscheinlicher ist. Dieses geht von Aussparungen in der Verteilung der VGCCs im Bereich des Vesikeldockings aus. Um zu analysieren, ob geclustertes Signal vorliegt, gibt es zahlreiche Strategien zu denen die Nächste-Nachbarn-Analyse, die räumliche Autokorrelation sowie Ableitungen von Ripleys K-Funktion zählen (Szoboszlai et al., 2017; Rebola et al., 2019; Tang et al., 2016, Vgl. Abb. 12, 15A, 18A, B). Typischerweise vergleicht man experimentelle Daten mit der Verteilung simulierter Daten. Für die Analyse mittels Ripleys H-Funktion wurde in dieser Arbeit dazu eine zufällige Poisson-Verteilung gewählt. Die genannten Ansätze sind hilfreich, um grundlegende Aussagen zur Verteilung von Lokalisationsdaten zu machen. Um bedeutungsvolle Cluster zu identifizieren, sind jedoch nachgeschaltete Clusteralgorithmen notwendig.

Welche Bedeutung haben die Brp-Subcluster? Es wurden an Ib-AZs 14-15 und an Is-AZs 13 Cluster mit einer Fläche von etwa $1,5-1,7 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ gefunden, was einem Kreis mit circa 23 nm Radius entspricht (Abb. 15C, D, Abb. 17F, G).

Zum einen entspricht das dem Bereich maximalen Clusterings in Ripleys H-Funktion (Abb. 15A, 18A) und zum anderen fast genau den experimentellen Werten aus Ehmann et al., 2014. Die gefundene Anzahl der Brp-Subcluster entspricht der Anzahl der an den T-bar gebundenen Vesikel in der Elektronenmikroskopie, während die Zahl der gedockten Vesikel der Anzahl der Unc13A-Cluster entspricht (Böhme et al., 2016). Denkbar ist ein funktionelles Zusammenspiel der beiden Proteine in konsekutiven Schritten des Vesikelflusses. Während in der vorliegenden Arbeit und in Ehmann et al., 2014 etwa 14 Brp-Subcluster pro AZ gefunden wurden, sind in Böhme et al., 2019 nur circa 6-7 Brp-Module beschrieben worden. Die geringere Zahl in der STED-Mikroskopie hängt vermutlich mit dem niedrigeren räumlichen Auflösungsvermögen im Vergleich zu *d*STORM zusammen und beschreibt möglicherweise eine übergeordnete Ebene des Filament-Clusterings.

Vorteile und Nachteile verschiedener Tagging-Strategien

Die Lokalisationspräzision in dieser und vergleichbaren Arbeiten mit *d*STORM liegt bei etwa 7 nm (Abb. 13A, Ehmann et al., 2014). Die tatsächlich erreichbare räumliche Auflösung hängt allerdings von weiteren Faktoren ab. Die Messungen zur Differenzierung zwischen Ib- und Is-AZs und zu akuter Plastizität wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt, also mit einer Kombination aus Primär- und Sekundärantikörper. Statt eines vollständigen IgG, dessen Größe bei 8-10 nm liegt, wurden Fluorophor-gekoppelte F(ab')₂-Fragmente mit einer Größe von etwa 4 nm als Sekundärantikörper verwendet (Weber et al., 1978; Amiry-Moghaddam & Ottersen, 2013). Damit ist eine Reduktion der Größe des Primär-/Sekundärantikörperkomplexes auf circa 13 nm möglich (Ehmann et al., 2014) und mit der o. g. Lokalisationspräzision ergibt sich eine Auflösung von ungefähr 20 nm. Daraus ist ersichtlich, dass die räumlichen Ausmaße der Markierung die erreichbare Auflösung bei der Lokalisationsmikroskopie limitieren und möglichst kleine Markierungen wünschenswert sind. Die Fläche der Brp-Subcluster in dieser Arbeit könnte dementsprechend überschätzt und ihre Dichte unterschätzt sein. Ein möglicher Verbesserungsansatz sind Einzeldomänenantikörper aus Kameliden, die man auch als Nanobodies bezeichnet und die bereits erfolgreich für hochauflösende Lichtmikroskopie angewendet wurden (Ries et al., 2012;

Diskussion

Platonova et al., 2015; Wagner et al., 2019). Allerdings sind bisher in erster Linie Nanobodies gegen GFP und dessen Derivate kommerziell erhältlich und damit die Darstellungsmöglichkeit verschiedener Epitope von der Verfügbarkeit von genetischen Fusionskonstrukten abhängig. Mit dem vom Hersteller des in dieser Arbeit verwendeten GFP-Nanobodies (Vgl. Abschnitt **2.2**, Abb. 27) angegebenen Abstand von circa 1,5 nm zwischen Farbstoff und Epitop (<https://nano-tag.com/products/fluotag-q-anti-gfp>) und den räumlichen Dimensionen des GFP-Moleküls von 2-5 nm (Örmo et al., 1996) ergibt sich ein tatsächlicher Präzisionsverlust von etwa 6 nm und damit ein deutlicher Vorteil gegenüber der konventionellen Verwendung eines Primär-/Sekundärantikörper-Pärchens. Zu bedenken ist, dass bei dieser Art der Markierung ein Amplifikationsschritt des Signals in Form des Sekundärantikörpers verloren geht, was bei seltenen Epitopen zu einem schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis führen kann. Dennoch könnte die Anwendung von Nanobodies das Verständnis der Größe- und Dichteverhältnisse der Brp-Subcluster verbessern.

Lokalisationsmikroskopische Verfahren bieten prinzipiell die Möglichkeit der Molekülquantifizierung (Löschberger et al., 2012; Ehmman et al., 2014). Allerdings sind diesbezüglich viele Fragen offen. Das Verhältnis zwischen tatsächlicher Anzahl an Molekülen und beobachteten Blinkereignissen hängt von der Stöchiometrie zwischen Epitop und Antikörper ab. Dabei ist unklar, wie viele Sekundärantikörper bei Verwendung eines polyklonalen Serums an den Primärantikörper binden. Weiterhin ist nicht geklärt, wie häufig die verwendeten Farbstoffe wie z. B. Alexa Fluor647 während einer Aufnahme blinken können oder wie viele Farbstoffe optimalerweise an einen Antikörper gebunden sein sollten (van de Linde et al., 2013). Ein wichtiger Punkt zur Beschränkung der Unsicherheit bei der Quantifizierung ist die Verwendung monoklonaler Antikörper als Primärantikörper, um zumindest in diesem Schritt eine 1-zu-1-Stöchiometrie zu gewährleisten. Die Bindungscharakteristik und damit die Qualität der resultierenden Aufnahmen unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Antikörpern. Eine sinnvolle Strategie zum standardisierten Nachweis einer großen Zahl verschiedener Epitope ist daher die Verwendung gut charakterisierter Tag-Antikörper-Kombinationen, wobei das verwendete Tag idealerweise klein sein sollte. Beispiele hierfür sind das biochemische V5-Tag

mit 14 Aminosäuren (Vgl. Abschnitte **2.3** und **3.5**, Abb. 26) oder das HA (human influenza hemagglutinin)-Tag mit 9 Aminosäuren. Zur Identifizierung der besten Kombinationen sind qualitativ hochwertige Kontrollexperimente sowohl an synthetischen als auch an Gewebeproben notwendig. Idealerweise werden die Vorteile von Nanobodies und kleinen Tags zukünftig kombiniert, z. B. in Form von Nanobodies gegen das V5- oder das HA-Tag.

4.4 Ausblick

Die Stärke einer synaptischen Verbindung ist in klassischer Sichtweise das Produkt dreier Kenngrößen: (i) der Freisetzungswahrscheinlichkeit der prä-synaptischen Vesikel (P_v), (ii) der Größe der quantalen Antwort (q) und (iii) der Anzahl der Freisetzungsorte für Vesikel (release sites, N , Katz 1969). Während P_v von der Kopplungsdistanz und der Calciumkonzentration und q in erster Linie von der Anzahl und Sättigung der postsynaptischen Rezeptoren abhängt, ist bis heute nicht eindeutig geklärt, was die molekularen Determinanten von N sind (Neher 2010). Eine Möglichkeit wäre eine Entsprechung von Anzahl der Release Sites und Zahl der AZs an einer synaptischen Verbindung oder alternativ der Anzahl der Boutons pro Synapse (Korn et al., 1981; Silver et al., 2003). An der Held'schen Calyx konnte jedoch demonstriert werden, dass den dort vorhandenen etwa 500 AZs mindestens 1500 kurzfristig freisetzbare Vesikel gegenüberstehen, sodass der Schluss naheliegt, dass es mehrere Release Sites pro AZ geben kann und N in ihrer Substruktur zu finden sein muss (Sakaba & Neher, 2001). Ein viel diskutierter Kandidat mit zahlreichen experimentellen Evidenzen ist dabei Munc13 bei Säugern bzw. Dunc-13 bei *Drosophila* (Sakamoto et al., 2018; Rebola et al., 2019; Böhme et al., 2016; Reddy-Ala et al., 2017). Aber auch RIM in einem Komplex mit Munc13 und Rab3 kommt in Betracht (Dulubova et al., 2005). Die in dieser Arbeit eingeführten genetischen Werkzeuge zur molekularen Bildgebung aktiver Zonen mit dSTORM und die neuen Auswertalgorithmen können zukünftig zur Klärung dieses Punktes beitragen.

Eine Hürde bei der Quantifizierung seltener Epitope ist die Orientierung und das räumliche Verhältnis zu übergeordneten Strukturen als Referenz, was in

Diskussion

Abbildung 26A an der heterogenen Struktur des RIM-Epitops exemplarisch nachzuvollziehen ist. Die Charakterisierung des Brp^{Nc82}-Epitops gelang in dieser Arbeit bis auf Ebene einzelner Subcluster und deren relativer Position. Somit kann es zukünftig als Maske zur Vermessung seltenerer Proteine mit weniger prominenter Struktur dienen. Wünschenswert ist diesbezüglich die Erzeugung weiterer transgener *Drosophila*-Linien mit gezielt eingefügten Tags und die Vermessung bereits vorhandener Konstrukte (Gratz et al., 2019; Bruckner et al., 2016). Insbesondere die Kartierung präsynaptischer Calciumkanäle im räumlichen Verhältnis zu RIM-, RBP-, Dunc-13- und Brp-Clustern in Kombination mit weiteren funktionellen Experimenten wie der Ermittlung der Kopplungsdistanz an den unterschiedlichen Synapsen der *Drosophila* NMJ sowie korrelative Elektronen- und Lichtmikroskopie (correlative electron and light microscopy, CLEM) werden hierbei wichtige Erkenntnisse liefern.

Ein besseres Verständnis der Nanoarchitektur und strukturellen Dynamik der AZ könnte es in Zukunft ermöglichen, gezielt in die molekularen Abläufe einzugreifen und die synaptische Transmission therapeutisch zu beeinflussen. Denkbar wäre z. B. der Einsatz von rekombinanten F(ab')₂-Fragmenten, um Proteininteraktionen gezielt zu modellieren. Die Untersuchung der strukturellen Differenzierung und Plastizität von AZs wird letztlich auch beim Verständnis der molekularen Mechanismen von Lernen und Gedächtnis (Bailey & Kandel, 1993; Bailey & Chen, 1983) und Informationsspeicherung an Synapsen im Allgemeinen einen wichtigen Beitrag leisten.

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die nanoskopische Analyse struktureller Differenzierung und Plastizität präsynaptischer aktiver Zonen an der NMJ von *Drosophila melanogaster* mittels hochauflösender, lichtmikroskopischer Bildgebung von Brp. In erster Linie wurde das lokalisationsmikroskopische Verfahren dSTORM angewendet. Es wurden neue Analyse-Algorithmen auf der Basis von HDBSCAN entwickelt, um eine objektive, in weiten Teilen automatisierte Quantifizierung bis auf Ebene der Substruktur der AZ zu ermöglichen. Die Differenzierung wurde am Beispiel phasischer und tonischer Synapsen, die an dieser NMJ durch Is- und Ib-Neurone gebildet werden, untersucht. Phasische Is-Synapsen mit hoher Freisetzungswahrscheinlichkeit zeigten kleinere, kompaktere AZs mit weniger Molekülen und höherer molekularer Dichte mit ebenfalls kleineren, kompakteren Brp-Subclustern. Akute strukturelle Plastizität wurde am Beispiel präsynaptischer Homöostase, bei der es zu einer kompensatorisch erhöhten Neurotransmitterfreisetzung kommt, analysiert. Interessanterweise zeigte sich hier ebenfalls eine kompaktere Konfiguration der AZ, die sich auch auf Ebene der Subcluster widerspiegelte, ohne Rekrutierung von Molekülen. Es konnte demonstriert werden, dass sich eine höhere Moleküldichte in der Lokalisationsmikroskopie in eine höhere Intensität und größere Fläche in der konfokalen Mikroskopie übersetzt, und damit der Zusammenhang zu scheinbar gegensätzlichen Vorbefunden hergestellt werden. Die Verdichtung bzw. Kompaktierung erscheint im Zusammenhang mit der Kopplungsdistanz zwischen VGCCs und präsynaptischen Vesikeln als plausibles Muster der effizienten Anordnung molekularer Komponenten der AZ. Die hier eingeführten Analysewerkzeuge und molekularbiologischen Strategien, basierend auf dem CRISPR/Cas9-System, zur Markierung von AZ-Komponenten können zukünftig zur weiteren Klärung der Bedeutung der molekularen Verdichtung als allgemeines Konzept der AZ-Differenzierung beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Abbe E. 1873. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der Mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9:413–468.

Ackermann F, Waites CL, Garner CC. 2015. Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. *EMBO Rep* 16:923-38.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirska R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.

Akbergenova Y, Cunningham KL, Zhang YV, Weiss S, Littleton JT. 2018. Characterization of developmental and molecular factors underlying release heterogeneity at *Drosophila* synapses. *Elife* 10:7.

Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. 2013. Immunogold cytochemistry in neuroscience. *Nat Neurosci* 16:798-804.

Atwood HL. 2006. Gatekeeper at the synapse. *Science* 312:1008-9.

Literaturverzeichnis

- Atwood HL, Govind CK, Wu CF. 1993. Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *Journal of Neurobiology* 24:1008-1024.
- Atwood HL, Karunanithi S. 2002. Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nature Reviews Neuroscience* 3:497-516.
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513:532-41.
- Bailey CH, Chen M. 1983. Morphological basis of long-term habituation and sensitization in *Aplysia*. *Science* 220:91-3.
- Bailey CH, Kandel ER. 1993. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55:397-426.
- Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X. 2007. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* 317:1749-53.
- Bellen HJ, Tong C, Tsuda H. 2010. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nat Rev Neurosci* 11:514-22.
- Benzer S. 1973. Genetic dissection of behavior. *Sci Am* 229:24-37.
- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313:1642-1645.
- Blanco-Redondo B, Langenhan T. 2018. Parallel Genomic Engineering of Two *Drosophila* Genes Using Orthogonal attB/attP Sites. *G3 (Bethesda)* 8:3109-3118.
- Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-56.
- Böhme MA, Beis C, Reddy-Alla S, Reynolds E, Mampell MM, Grasskamp AT, Lützkendorf J, Bergeron DD, Driller JH, Babikir H, Göttfert F, Robinson IM, O'Kane CJ, Hell SW, Wahl MC, Stelzl U, Loll B, Walter AM, Sigrist SJ. 2016. Active zone scaffolds differentially accumulate Unc13 isoforms to tune Ca²⁺ channel-vesicle coupling. *Nature Neuroscience* 19:1311-1320.
- Böhme MA, McCarthy AW, Grasskamp AT, Beuschel CB, Goel P, Jusyte M, Laber D, Huang S, Rey U, Petzoldt AG, Lehmann M, Göttfert F, Haghghi P, Hell SW, Oswald D, Dickman D, Sigrist SJ, Walter AM. 2019. Rapid active zone remodeling consolidates presynaptic potentiation. *Nat Commun* 10:1085.

Literaturverzeichnis

- Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R. 1992. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256:1021-1025.
- Bruckner JJ, Zhan H, Gratz SJ, Rao M, Ukken F, Zilberg G, O'Connor-Giles KM. 2016. Fife organizes synaptic vesicles and calcium channels for high-probability neurotransmitter release. *J Cell Biol* 216:231-246.
- Cajal SR. 1894. La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc Lond* 55:444–468.
- Campello RJ, Moulavi D, Sander J. 2013. Density-based clustering based on hierarchical density estimates. In *Pacific-Asia Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*. pp. 160-172. Springer Berlin Heidelberg.
- Catterall WA. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947.
- Chen YA, Scheller RH. 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:98-106.
- Couteaux R, Pecot-Dechavassine M. 1970. Synaptic vesicles and pouches at the level of “active zones” of the neuromuscular junction. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 271:2346–2349.
- Davis GW, Müller M. 2015. Homeostatic control of presynaptic neurotransmitter release. *Annual Review of Physiology* 77:251-270.
- del Castillo J, Katz B. 1954. Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* 124:560-573.
- Dittman JS, Kreitzer AC, Regehr WG. 2000. Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci* 20:1374-85.
- DiAntonio A, Petersen SA, Heckmann M, Goodman CS. 1999. Glutamate receptor expression regulates quantal size and quantal content at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:3023-32.
- Dolphin AC. 2003. Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:599-620.
- Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, Schneggenburger R, Südhof TC, Rizo J. 2005. A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J* 24:2839-50.
- Eccles JC. 1964. *The Physiology of Synapses*. Academic Press Inc., New York.

- Edelsbrunner H, Mücke EP. 1994. Three-dimensional alpha shapes. *ACM Transactions on Graphics* 13:43–72.
- Eggermann E, Bucurenciu I, Goswami SP, Jonas P. 2011. Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat Rev Neurosci* 13:7-21.
- Ehmann N, van de Linde S, Alon A, Ljaschenko D, Keung XZ, Holm T, Rings A, DiAntonio A, Hallermann S, Ashery U, Heckmann M, Sauer M, Kittel RJ. 2014. Quantitative super-resolution imaging of Bruchpilot distinguishes active zone states. *Nature Communications* 5:4650.
- Éltes T, Kirizs T, Nusser Z, Holderith N. 2017. Target Cell Type-Dependent Differences in Ca^{2+} Channel Function Underlie Distinct Release Probabilities at Hippocampal Glutamatergic Terminals. *J Neurosci* 37:1910-1924.
- Endesfelder U, Malkusch S, Fricke F, Heilemann M. 2014. A simple method to estimate the average localization precision of a single-molecule localization microscopy experiment. *Histochemistry and Cell Biology* 141:629-38.
- Ester M, Kriegel HP, Sander J, Xu X. 1996. A Density-Based Algorithm for Discovering Clusters in Large Spatial Databases with Noise. *Proc. 2nd Int. Conf. on Knowledge Discovery and Data Mining*. Portland OR:226-231.
- Fatt P, Katz B. 1952. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* 117:109-28.
- Fekete A, Nakamura Y, Yang YM, Herlitze S, Mark MD, DiGregorio DA, Wang LY. 2019. Underpinning heterogeneity in synaptic transmission by presynaptic ensembles of distinct morphological modules. *Nat Commun* 10:826.
- Fiumara F, Fioriti L, Kandel ER, Hendrickson WA. 2010. Essential role of coiled coils for aggregation and activity of Q/N-rich prions and PolyQ proteins. *Cell* 143:1121-35.
- Foster M, Sherrington CS. 1897. *A Textbook of Physiology* (7th ed.). Part III. The Central Nervous System. Macmillan, London. p. 929.
- Fouquet W, Oswald D, Wichmann C, Mertel S, Depner H, Dyba M, Hallermann S, Kittel RJ, Eimer S, Sigrist SJ. 2009. Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *Journal of Cell Biology* 186:129-145.
- Frank CA, Kennedy MJ, Goold CP, Marek KW, Davis GW. 2006. Mechanisms underlying the rapid induction and sustained expression of synaptic homeostasis. *Neuron* 52:663-677.
- Frank CA. 2014. Homeostatic plasticity at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuropharmacology* 78:63-74.
- Ghelani T, Sigrist SJ. 2018. Coupling the Structural and Functional Assembly of Synaptic Release Sites. *Frontiers in Neuroanatomy* 12:81.

Literaturverzeichnis

- Glebov OO, Jackson RE, Winterflood CM, Owen DM, Barker EA, Doherty P, Ewers H, Burrone J. 2017. Nanoscale Structural Plasticity of the Active Zone Matrix Modulates Presynaptic Function. *Cell Rep* 18:2715-2728.
- Goel P, Li X, Dickman D. 2017. Disparate Postsynaptic Induction Mechanisms Ultimately Converge to Drive the Retrograde Enhancement of Presynaptic Efficacy. *Cell Reports* 21:2339-2347.
- Gracheva EO, Hadwiger G, Nonet ML, Richmond JE. 2008. Direct interactions between *C. elegans* RAB-3 and Rim provide a mechanism to target vesicles to the presynaptic density. *Neurosci Lett* 444:137-42.
- Graf ER, Daniels RW, Burgess RW, Schwarz TL, DiAntonio A. 2009. Rab3 dynamically controls protein composition at active zones. *Neuron* 64:663-77.
- Gratz SJ, Wildonger J, Harrison MM, O'Connor-Giles KM. 2013. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the promise of designer flies on demand. *Fly (Austin)* 7:249-55.
- Gratz SJ, Rubinstein CD, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. 2015. CRISPR-Cas9 genome editing in *Drosophila*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 111:31.2.1-31.2.20.
- Gratz SJ, Goel P, Bruckner JJ, Hernandez RX, Khateeb K, Macleod GT, Dickman D, O'Connor-Giles KM. 2019. Endogenous Tagging Reveals Differential Regulation of Ca²⁺ Channels at Single Active Zones during Presynaptic Homeostatic Potentiation and Depression. *J Neurosci* 39:2416-2429.
- Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP. 2004. Construction of Transgenic *Drosophila* by Using the Site-Specific Integrase from Phage ϕ C31. *Genetics* 166, 1775–1782.
- Guerrero G, Reiff DF, Agarwal G, Ball RW, Borst A, Goodman CS, Isacoff EY. 2005. Heterogeneity in synaptic transmission along a *Drosophila* larval motor axon. *Nature Neuroscience* 8:1188–1196.
- Gustafsson MG. 2005. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13081-6.
- Gustafsson MG, Shao L, Carlton PM, Wang CJ, Golubovskaya IN, Cande WZ, Agard DA, Sedat JW. 2008. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J* 94:4957-70.
- Hallermann S, Heckmann M, Kittel RJ. 2010a. Mechanisms of short-term plasticity at neuromuscular active zones of *Drosophila*. *HFSP J* 4:72-84.
- Hallermann S, Kittel RJ, Wichmann C, Weyhersmüller A, Fouquet W, Mertel S, Oswald D, Eimer S, Depner H, Schwärzel M, Sigrist SJ, Heckmann M. 2010b.

Literaturverzeichnis

- Naked dense bodies provoke depression. *Journal of Neuroscience* 30:14340-14345.
- Hebb, DO. 1949. *The Organization of Behavior*. John Wiley & Sons, New York.
- Heckmann M, Dudel J. 1995. Recordings of glutamate-gated ion channels in outside-out patches from *Drosophila* larval muscle. *Neurosci Lett* 196:53-6.
- Heckmann M, Adelsberger H, Dudel J. 1997. Evoked transmitter release at neuromuscular junctions in wild type and cysteine string protein null mutant larvae of *Drosophila*. *Neurosci Lett* 228:167-70.
- Heilemann M, van de Linde S, Schüttpeiz M, Kasper R, Seefeldt B, Mukherjee A, Tinnefeld P, Sauer M. 2008. Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angewandte Chemie International Edition* 33:6172-6176.
- Heisenberg M. 2015. Outcome learning, outcome expectations, and intentionality in *Drosophila*. *Learn Mem* 22:294-8.
- Held RG, Kaeser PS. 2018. ELKS active zone proteins as multitasking scaffolds for secretion. *Open Biology* 8:170258.
- Hell SW. 2007. Far-field optical nanoscopy. *Science* 316:1153-8.
- Hell SW, Wichmann J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19:780-2.
- Heuser JE, Reese TS. 1981. Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 88:564-80.
- Heuser JE, Reese TS, Dennis MJ, Jan Y, Jan L, Evans L. 1979. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol* 81:275-300.
- Hoang B, Chiba A. 2001. Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Developmental Biology* 229:55-70.
- Hodgkin AL, Huxley AF. 1939. Action Potentials Recorded from Inside a Nerve Fibre. *Nature* 144:710-711.
- Hodgkin AL, Huxley AF. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-44.
- Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rózsa B, Kulik A, Watanabe M, Nusser Z. 2012. Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nature Neuroscience* 15:988-997.
- Huang B, Wang W, Bates M, Zhuang X. 2008. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*

Literaturverzeichnis

319:810-3.

Indriati DW, Kamasawa N, Matsui K, Meredith AL, Watanabe M, Shigemoto R. 2013. Quantitative localization of Cav2.1 (P/Q-type) voltage-dependent calcium channels in Purkinje cells: somatodendritic gradient and distinct somatic coclustering with calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* 33:3668-3678.

Jahn R, Lang T, Südhof TC. 2003. Membrane fusion. *Cell* 112:519-33.

Jan LY, Jan YN. 1976a. Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol* 262:189-214.

Jan LY, Jan YN. 1976b. L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *J Physiol* 262:215-36.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-21.

Kaesler PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC. 2011. RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144:282-95.

Kandel ER. 2009. The biology of memory: a forty-year perspective. *J Neurosci* 29:12748-56.

Kandel ER. 2012. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain* 5:14.

Karunanithi S, Marin L, Wong K, Atwood HL. 2002. Quantal size and variation determined by vesicle size in normal and mutant *Drosophila* glutamatergic synapses. *Journal of Neuroscience* 22:10267-10276.

Katz B. 1969. *The Release of Neural Transmitter Substances*. Liverpool University Press, Liverpool.

Katz B, Miledi R. 1965a. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161:496-503.

Katz B, Miledi R. 1965b. The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 161:483-495.

Katz B, Miledi R. 1967. Tetrodotoxin and neuromuscular transmission. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 167:8-22.

Kawasaki F, Zou B, Xu X, Ordway RW. 2004. Active zone localization of presynaptic calcium channels encoded by the cacophony locus of *Drosophila*. *J Neurosci* 24:282-5.

Literaturverzeichnis

- Keleman K, Krüttner S, Alenius M, Dickson BJ. 2007. Function of the *Drosophila* CPEB protein Orb2 in long-term courtship memory. *Nat Neurosci* 10:1587-93.
- Kiskowski MA, Hancock JF, Kenworthy AK. 2009. On the use of Ripley's K-function and its derivatives to analyze domain size. *Biophysical Journal* 97:1095-103.
- Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ. 2006. Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* 312:1051-1054.
- Kittel RJ, Heckmann M. 2016. Synaptic Vesicle Proteins and Active Zone Plasticity. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 8:8.
- Korn H, Triller A, Mallet A, Faber DS. 1981. Fluctuating responses at a central synapse: n of binomial fit predicts number of stained presynaptic boutons. *Science* 213(4510):898-901.
- Kurdyak P, Atwood HL, Stewart BA, Wu CF. 1994. Differential physiology and morphology of motor axons to ventral longitudinal muscles in larval *Drosophila*. *Journal of Comparative Neurology* 350:463-472.
- Li X, Goel P, Wondolowski J, Paluch J, Dickman D. 2018. A Glutamate Homeostat Controls the Presynaptic Inhibition of Neurotransmitter Release. *Cell Reports* 23:1716-1727.
- Littleton JT, Stern M, Schulze K, Perin M, Bellen HJ. 1993. Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca²⁺-activated neurotransmitter release. *Cell* 74:1125-1134.
- Liu KS, Siebert M, Mertel S, Knoche E, Wegener S, Wichmann C, Matkovic T, Muhammad K, Depner H, Mettke C, Bückers J, Hell SW, Müller M, Davis GW, Schmitz D, Sigrist SJ. 2011. RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science* 334:1565-9.
- Lnenicka GA, Keshishian H. 2000. Identified motor terminals in *Drosophila* larvae show distinct differences in morphology and physiology. *Journal of Neurobiology* 43:186-197.
- Löschberger A, van de Linde S, Dabauvalle MC, Rieger B, Heilemann M, Krohne G, Sauer M. 2012. Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *Journal of Cell Science* 125:570-575.
- Loewi O. 1921. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 189:239-242.

Literaturverzeichnis

- Lu Z, Chouhan AK, Borycz JA, Lu Z, Rossano AJ, Brain KL, Zhou Y, Meinertzhagen IA, Macleod GT. 2016. High-Probability Neurotransmitter Release Sites Represent an Energy-Efficient Design. *Current Biology* 26:2562-2571.
- Malkusch S, Heilemann M. 2016. Extracting quantitative information from single-molecule super-resolution imaging data with LAMA - Localization Microscopy Analyzer. *Science Reports* 6:34486.
- McInnes L, Healy J, Astels S. 2017. hdbscan: Hierarchical density based clustering. *Journal of Open Source Software* 2:205.
- Meinrenken CJ, Borst JG, Sakmann B. 2003. Local routes revisited: the space and time dependence of the Ca²⁺ signal for phasic transmitter release at the rat calyx of Held. *J Physiol* 547:665-689.
- Melom JE, Akbergenova Y, Gavornik JP, Littleton JT. 2013. Spontaneous and evoked release are independently regulated at individual active zones. *J Neurosci* 33:17253-63.
- Miki T, Kaufmann WA, Malagon G, Gomez L, Tabuchi K, Watanabe M, Shigemoto R, Marty A. 2017. Numbers of presynaptic Ca²⁺ channel clusters match those of functionally defined vesicular docking sites in single central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E5246-E5255.
- Milovanovic D, Wu Y, Bian X, De Camilli P. 2018. A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science* 361:604-607.
- Msghina M, Millar AG, Charlton MP, Govind CK, Atwood HL. 1999. Calcium entry related to active zones and differences in transmitter release at phasic and tonic synapses. *J Neurosci* 19:8419-34.
- Nagarkar-Jaiswal S, Lee PT, Campbell ME, Chen K, Anguiano-Zarate S1, Gutierrez MC, Busby T, Lin WW, He Y, Schulze KL, Booth BW, Evans-Holm M, Venken KJ, Levis RW, Spradling AC, Hoskins RA, Bellen HJ. 2015a. A library of MiMICs allows tagging of genes and reversible, spatial and temporal knockdown of proteins in *Drosophila*. *Elife* 4.
- Nagarkar-Jaiswal S, DeLuca SZ, Lee PT, Lin WW, Pan H, Zuo Z, Lv J, Spradling AC, Bellen HJ. 2015b. A genetic toolkit for tagging intronic MiMIC containing genes. *Elife* 4.
- Neher E. 2010. What is Rate-Limiting during Sustained Synaptic Activity: Vesicle Supply or the Availability of Release Sites. *Front Synaptic Neurosci* 2:144.
- Neher E, Sakaba T. 2008. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59:861-872.
- Newman ZL, Hoagland A, Aghi K, Worden K, Levy SL, Lee LP, Isacoff EY. 2017. Input-Specific Plasticity and Homeostasis at the *Drosophila* Larval

Literaturverzeichnis

- Neuromuscular Junction. *Neuron* 93:1388-1404.
- Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsubara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai Y. 2002. Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc13-1. *J Cell Biol* 158:577-90.
- Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273:1392-5.
- Paul MM, Pauli M, Ehmann N, Hallermann S, Sauer M, Kittel RJ, Heckmann M. 2015. Bruchpilot and Synaptotagmin collaborate to drive rapid glutamate release and active zone differentiation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9:29.
- Pauli M, Paul MM, Proppert S, Sharifi M, Repp F, Kollmannsberger P, Sauer M, Heckmann M, Sirén AL. 2019. Targeted volumetric single-molecule localization microscopy of defined presynaptic structures in brain sections. *bioRxiv* March 05, 2019.
- Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, Blondel M, Prettenhofer P, Weiss R, Dubourg V, Vanderplas J, Passos A, Cournapeau D, Brucher M, Perrot M, Duchesnay E. 2011. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research* 12:2825–2830.
- Peled ES, Newman ZL, Isacoff EY. 2014. Evoked and spontaneous transmission favored by distinct sets of synapses. *Current Biology* 24:484-493.
- Peled ES, Isacoff EY. 2011. Optical quantal analysis of synaptic transmission in wild-type and rab3-mutant *Drosophila* motor axons. *Nature Neuroscience* 14:519-526.
- Petersen SA, Fetter RD, Noordermeer JN, Goodman CS, DiAntonio A. 1997. Genetic analysis of glutamate receptors in *Drosophila* reveals a retrograde signal regulating presynaptic transmitter release. *Neuron* 19:1237-1248.
- Platonova E, Winterflood CM, Junemann A, Albrecht D, Faix J, Ewers H. 2015. Single-molecule microscopy of molecules tagged with GFP or RFP derivatives in mammalian cells using nanobody binders. *Methods* 88:89-97.
- Proppert S, Wolter S, Holm T, Klein T, van de Linde S, Sauer M. 2014. Cubic B-spline calibration for 3D super-resolution measurements using astigmatic imaging. *Opt Express* 22:10304-16.
- Qin G, Schwarz T, Kittel RJ, Schmid A, Rasse TM, Kappei D, Ponimaskin E, Heckmann M, Sigrist SJ. 2005. Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *J Neurosci* 25:3209-18.

Literaturverzeichnis

- Rahbek-Clemmensen T, Lycas MD, Erlendsson S, Eriksen J, Apuschkin M, Vilhardt F, Jørgensen TN, Hansen FH, Gether U. 2017. Super-resolution microscopy reveals functional organization of dopamine transporters into cholesterol and neuronal activity-dependent nanodomains. *Nat Commun* 8:740.
- Rasse TM, Fouquet W, Schmid A, Kittel RJ, Mertel S, Sigrist CB, Schmidt M, Guzman A, Merino C, Qin G, Quentin C, Madeo FF, Heckmann M, Sigrist SJ. 2005. Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat Neurosci* 8:898-905.
- Rayman JB, Kandel ER. 2017. Functional Prions in the Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9. pii: a023671.
- Rebola N, Reva M, Kirizis T, Szoboszlay M, Lőrincz A, Moneron G, Nusser Z, DiGregorio DA. 2019. Distinct Nanoscale Calcium Channel and Synaptic Vesicle Topographies Contribute to the Diversity of Synaptic Function. *Neuron* doi: 10.1016/j.neuron.2019.08.014. [Epub ahead of print]
- Reddy-Alla S, Böhme MA, Reynolds E, Beis C, Grasskamp AT, Mampell MM, Maglione M, Jusyte M, Rey U, Babikir H, McCarthy AW, Quentin C, Matkovic T, Bergeron DD, Mushtaq Z, Göttfert F, Oswald D, Mielke T, Hell SW, Sigrist SJ, Walter AM. 2017. Stable Positioning of Unc13 Restricts Synaptic Vesicle Fusion to Defined Release Sites to Promote Synchronous Neurotransmission. *Neuron* 95:1350-1364.e12.
- Ries J, Kaplan C, Platonova E, Eghlidi H, Ewers H. 2012. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat Methods* 9:582-4.
- Rong YS, Titen SW, Xie HB, Golic MM, Bastiani M, Bandyopadhyay P, Olivera BM, Brodsky M, Rubin GM, Golic KG. 2002. Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev* 16:1568-81.
- Robitaille TP, Tollerud EJ, Greenfield P, Droettboom M, Bray E, Aldcroft T, Davis M, Ginsburg A, Price-Whelan AM, Kerzendorf WE, Conley A, Crighton N, Barbary K, Muna D, Ferguson H, Grollier F, Parikh MM, Nair PH, Günther HM, Deil C, Woillez J, Conseil S, Kramer R, Turner JEH, Singer L, Fox R, Weaver BA, Zabalza V, Edwards ZI, Bostroem KA, Burke DJ, Casey AR, Crawford SM, Dencheva N, Ely J, Jenness T, Labrie K, Lim PL, Pierfederici F, Pontzen A, Ptak A, Refsdal B, Servillat M, Streicher O. 2013. Astropy: A community Python package for astronomy. *Astronomy & Astrophysics* 558:A33.
- Rozov A, Burnashev N, Sakmann B, Neher E. 2001. Transmitter release modulation by intracellular Ca²⁺ buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics. *J Physiol* 531:807-826.
- Rust MJ, Bates M, Zhuang X. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic

Literaturverzeichnis

- optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 3:793-5.
- Sakaba T, Neher E. 2001. Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron* 32:1119-31.
- Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Hirose K. 2018. Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. *Nat Neurosci* 21:41-49.
- Schmid A, Hallermann S, Kittel RJ, Khorramshahi O, Frölich AM, Quentin C, Rasse TM, Mertel S, Heckmann M, Sigrist SJ. 2008. Activity-dependent site-specific changes of glutamate receptor composition in vivo. *Nat Neurosci* 11:659-66.
- Schmidt H, Brachtendorf S, Arendt O, Hallermann S, Ishiyama S, Bornschein G, Gall D, Schiffmann SN, Heckmann M, Eilers J. 2013. Nanodomain coupling at an excitatory cortical synapse. *Curr Biol* 23:244-9.
- Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC, Südhof TC. 2002. RIM1alpha forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* 415:321-6.
- Scholz N, Gehring J, Guan C, Ljaschenko D, Fischer R, Lakshmanan V, Kittel RJ, Langenhan T. 2015. The adhesion GPCR latrophilin/CIRL shapes mechanosensation. *Cell Rep* 11:866-874.
- Scholz N, Ehmann N, Sachidanandan D, Imig C, Cooper BH, Jahn O, Reim K, Brose N, Meyer J, Lamberty M, Altrichter S, Bormann A, Hallermann S, Pauli M, Heckmann M, Stigloher C, Langenhan T, Kittel RJ. 2019. Complexin cooperates with Bruchpilot to tether synaptic vesicles to the active zone cytomatrix. *J Cell Biol* 218:1011-1026.
- Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Si K, Lindquist S, Kandel ER. 2003a. A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell* 115:879-91.
- Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz AM, Miniaci MC, Kim JH, Zhu H, Kandel ER. 2003b. A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia. *Cell* 115:893-904.
- Silver RA, Lubke J, Sakmann B, Feldmeyer D. 2003. High-probability unquantal transmission at excitatory synapses in barrel cortex. *Science* 302:1981-4.
- Stewart BA, Atwood HL, Renger JJ, Wang J, Wu CF. 1994. Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *Journal of Comparative Physiology* 175:179-191.
- Squire LR. 2009. Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci* 29:12711-

6.

Südhof TC. 2002. Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem* 277:7629-32.

Südhof TC. 2004. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509–547.

Südhof TC. 2012. The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11-25.

Szoboszlay M, Kirizs T, Nusser Z. 2017. Objective quantification of nanoscale protein distributions. *Science Reports* 7:15240.

Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R. 2006. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127:831-846.

Tang AH, Chen H, Li TP, Metzbower SR, MacGillavry HD, Blanpied TA. 2016. A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature* 536:210-4.

Taschenberger H, Leão RM, Rowland KC, Spirou GA, von Gersdorff H. 2002. Optimizing synaptic architecture and efficiency for high-frequency transmission. *Neuron* 36:1127-43.

van de Linde S, Kasper R, Heilemann M, Sauer M. 2008. Photoswitching microscopy with standard fluorophores. *Appl Phys B* 93:725-731.

van de Linde S, Endesfelder U, Mukherjee A, Schüttpelz M, Wiebusch G, Wolter S, Heilemann M, Sauer M. 2009. Multicolor photoswitching microscopy for subdiffraction-resolution fluorescence imaging. *Photochem Photobiol Sci* 8:465-9.

van de Linde S, Löscherberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M. 2011. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocols* 7:991–1009.

van de Linde S, Aufmkolk S, Franke C, Holm T, Klein T, Löscherberger A, Proppert S, Wolter S, Sauer M. 2013. Investigating cellular structures at the nanoscale with organic fluorophores. *Chem Biol* 20:8-18.

von Gersdorff H, Borst JG. 2002. Short-term plasticity at the calyx of Held. *Nat Rev Neurosci* 3:53-64.

Vyleta NP, Jonas P. 2014. Loose coupling between Ca²⁺ channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science* 343:665-70.

Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck H, Buchner S, Dabauvalle MC, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E. 2006. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is

Literaturverzeichnis

- required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* 49:833-44.
- Wagner W, Lippmann K, Heisler FF, Gromova KV, Lombino FL, Roesler MK, Pechmann Y, Hornig S, Schweizer M, Polo S, Schwarz JR, Eilers J, Kneussel M. 2019. Myosin VI Drives Clathrin-Mediated AMPA Receptor Endocytosis to Facilitate Cerebellar Long-Term Depression. *Cell Rep* 28:11-20.e9.
- Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153:910-8.
- Wang J, Choi JM, Holehouse AS, Lee HO, Zhang X, Jahnel M, Maharana S, Lemaitre R, Pozniakovskiy A, Drechsel D, Poser I, Pappu RV, Alberti S, Hyman AA. 2018. A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins. *Cell* 174:688-699.e16.
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC. 1997. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593-8.
- Weber K, Rathke PC, Osborn M. 1978. Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1820-4.
- Wentzel C, Delvendahl I, Sydlik S, Georgiev O, Müller M. 2018. Dysbindin links presynaptic proteasome function to homeostatic recruitment of low release probability vesicles. *Nature Communications* 9:267.
- Weyhersmüller A, Hallermann S, Wagner N, Eilers J. 2011. Rapid active zone remodeling during synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience* 31:6041-6052.
- Wolter S, Löscherberger A, Holm T, Aufmkolk S, Dabauvalle MC, van de Linde S, Sauer M. 2012. rapidSTORM: Accurate, fast and open-source software for localization microscopy. *Nature Methods* 9:1040-1041.
- Xue Z, Wu M, Wen K, Ren M, Long L, Zhang X, Gao G. 2014. CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in *Drosophila*. *G3 (Bethesda)* 4:2167-73.
- Xu-Friedman MA, Harris KM, Regehr WG. 2001. Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 21:6666-72.
- Zhai RG, Bellen HJ. 2004. The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology Bethesda* 19:262-270.
- Zucker RS, Regehr WG. 2002. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64:355-405.

7 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| Abb. 1: | Aufbau und Funktion von Synapsen | 2 |
| Abb. 2: | Funktionelle Differenzierung phasischer und tonischer Synapsen | 6 |
| Abb. 3: | Phasische Is-Boutons haben größere präsynaptische Vesikel | 8 |
| Abb. 4: | Struktur aktiver Zonen in <i>Drosophila melanogaster</i> | 10 |
| Abb. 5: | Präsynaptische homöostatische Plastizität | 12 |
| Abb. 6: | Grundsätzliches Prinzip von <i>d</i> STORM | 14 |
| Abb. 7: | Hochaufgelöste strukturierte Beleuchtungsmikroskopie an der <i>Drosophila</i> NMJ | 29 |
| Abb. 8: | Darstellung der Substruktur aktiver Zonen mit <i>d</i> STORM | 30 |
| Abb. 9: | Arbeitsweise von DBSCAN | 31 |
| Abb. 10: | HDBSCAN Prinzip und Robustheit | 33 |
| Abb. 11: | Erkennung aktiver Zonen mit verschiedenen HDBSCAN-Parametern | 35 |
| Abb. 12: | Ripleys K-Funktion und ihre Ableitungen für Lokalisationsdaten | 36 |
| Abb. 13: | Bestimmung der Lokalisationspräzision und Ausleuchtung | 38 |
| Abb. 14: | Kompaktere Brp-Anordnung in Is-AZs | 40 |
| Abb. 15: | Differenzierte Brp-Subcluster-Organisation in Ib- und Is-Boutons | 41 |
| Abb. 16: | Unveränderte NMJ-Morphologie nach PhTx-Behandlung | 45 |
| Abb. 17: | Akute homöostatische Plastizität verringert die AZ-Größe, erhöht die Brp-Lokalisationsdichte und verändert die Subcluster-Organisation in Ib-Boutons | 46 |
| Abb. 18: | H-Funktionen und Nächste-Nachbarn-Analyse von AZs bei akuter Homöostase | 48 |
| Abb. 19: | AZ-Zirkularität in Ib-Boutons nach PhTx-Behandlung | 50 |
| Abb. 20: | AZ-Nanoarchitektur in Ib-Boutons von NMJs des abdominalen Muskels 4 | 51 |
| Abb. 21: | Verdichtung auf der Nanoskala erscheint als Flächen- und Intensitätszunahme in konfokaler Simulation und als Zunahme der Brp-Cluster in STED-Simulation | 53 |
| Abb. 22: | Korrelative konfokale und <i>d</i> STORM-Bildgebung | 56 |
| Abb. 23: | PhTx-Stimulation bewirkt keine weitere AZ-Verdichtung in Is-Boutons | 58 |
| Abb. 24: | CRISPR/Cas9-Strategie zur Erstellung transgener Fliegen | 60 |
| Abb. 25: | Nachweis markierter Calciumkanäle | 62 |
| Abb. 26: | <i>d</i> STORM-Bildgebung zeigt Nanocluster des RIM-Zinkfingers | 63 |
| Abb. 27: | Darstellung eines membrannäheren Brp-Epitops mit Nanobodies | 64 |

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| A | Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| A/D | analog-zu-digital |
| α -Liprin | Lar-interacting-protein-related-protein α |
| AP | Aktionspotential |
| a. u. | arbitrary units |
| AZ | Aktive Zone |
| Bit | binary digit |
| Brp | Bruchpilot |
| CA3 | Cornu Ammonis 3 |
| cac | Cacophony |
| Cas9 | CRISPR-associated 9 Endonuklease |
| CAZ | cytomatrix at the active zone |
| CF | climbing fiber |
| CGAL | The Computational Geometry Algorithms Library |
| CLEM | correlative electron and light microscopy |
| c. o. m. | center of mass |
| CRISPR | clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| crRNA | CRISPR RNA |
| C-Terminus | Carboxy-Terminus |
| ctrl | control, DMSO-behandelte Gruppe |
| DBSCAN | density-based spatial clustering of application with noise |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| <i>d</i> STORM | <i>direct</i> stochastic optical reconstruction microscopy |
| Dunc-13 | <i>Drosophila</i> uncoordinated homology 13 |
| EGFP | enhanced GFP |
| EPSC | excitatory postsynaptic current |
| EZM | exclusion zone model |
| GFP | green fluorescent protein |
| GFSTF | EGFP-FIAsH-StrepII-TEVcs-3xFlag |
| GTP | Guanosintriphosphat |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| gRNA | guidance RNA |
| HA | human influenza hemagglutinin |
| HDBSCAN | hierarchical density-based spatial clustering of applications with noise |
| HDR | homology directed repair |
| HL-3 | haemolymph-like solution 3 |
| HPLC | high pressure liquid chromatography |
| hrp | horseradish-peroxidase |
| Hz | Hertz |
| IDR | intrinsically disordered regions |
| kb | Kilobase |
| l | Liter |
| LAMA | LocAlization Microscopy Analyzer |
| locs. | Brp-Lokalisationen |
| LTP | long-term potentiation |
| m | Meter |
| M | molar = Mol/Liter |
| MEA | Mercaptoethylamin |
| MiMIC | Minos Mediated Integration Cassette |
| min | Minute |
| MN | Motoneuron |
| Munc13 | mammalian uncoordinated homology 13 |
| n | Stichprobengröße |
| N | Äquivalentkonzentration, Mol/Liter |
| <i>N</i> | Anzahl der Release Sites |
| NA | numerische Apertur |
| NeNa | Nearest Neighbor Based Analysis |
| NGS | normal goat serum |
| NMJ | neuromuscular junction |
| NND | nearest neighbor distance |
| N-Terminus | Amino-Terminus |
| PALM | photoactivated light microscopy |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PBT | PBS mit 0,05 % Triton |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| PDZ | post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1) |
| PF | parallel fiber |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PHP | presynaptic homeostatic plasticity |
| phtx | PhTx-behandelte Gruppe |
| PhTx | Philanthotoxin |
| PSD | postsynaptic density |
| PSF | point spread function |
| P _v | Freisetzungswahrscheinlichkeit präsynaptischer Vesikel |
| q | quantale Antwort |
| Rab3 | Ras-related protein Rab3 |
| RIM | Rab3-interacting molecule |
| RIM-BP | RIM-binding protein |
| RMCE | recombinase mediated cassette exchange |
| RNA | ribonucleic acid |
| ROI | region of interest |
| s | Sekunde |
| sc. | Subcluster |
| SEM | standard error of the mean |
| SIM | structured illumination microscopy |
| SNARE | soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor |
| sr | superresolution |
| STED | stimulated emission depletion |
| STORM | stochastic optical reconstruction microscopy |
| TIRF | total internal reflection |
| tracrRNA | transactivating crRNA |
| UAS | upstream activating sequence |
| V | Volt |
| VGCC | voltage-gated calcium channel |

9 Anhang

9.1 Python-Code

Der zur Auswertung lokalisationsmikroskopischer Daten in der vorliegenden Arbeit verwendete Python-Code wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Philip Kollmannsberger, Herrn Priv.-Doz. Dr. Sören Doose und Herrn Dr. Felix Repp erstellt und ist mit Beispieldaten und einer kurzen Erläuterung auf der Plattform Github hinterlegt (<https://github.com/AchmedM/Dissertation-Achmed-Mrestani-Python-Code>). Zum Zeitpunkt des Einreichens dieser Arbeit kann der Zugang auf Nachfrage beim Author jederzeit freigeschaltet werden. Sobald die mit der vorliegenden Arbeit im Zusammenhang stehende Publikation angenommen ist, wird der Link öffentlich ohne weitere Beschränkungen freigeschaltet werden.

9.2 Plasmidsequenzen

Im Folgenden sind Übersichten der in dieser Arbeit erstellten Plasmide aufgeführt. Neu erstellte Abschnitte sind als DNA-Sequenzen dargestellt. Backbone-Sequenzen und generische Abschnitte zwischen den neu erstellten Inserts sind ausgespart bzw. abgekürzt dargestellt. Die Orientierung der dargestellten Sequenzen erfolgte vom 5'- zum 3'-Ende. Die vollständigen, annotierten Plasmidsequenzen sind frei zugänglich auf der Plattform des Online-Speicherdienstes Zenodo hinterlegt (<https://zenodo.org/record/3387187#.XXD-XGbgo2z>).

Reparaturkonstrukte

Farbkodierung:

5'- und 3'-Homologiearme für HDR

generische Abschnitte

Tagsequenzen

Anhang

gttaccacaactggcctcccgaagagccggaatcggaagacgccttcctccgactccc
agtaaaccatcaacactgcagctcaagccaaccaatatcaatttcccgaagctgaatgc
cagtcccacacatgtaagtgaactatccatcgagggtaactgcatcagagcaactgtttg
ctcataatgaggatgagaactaatattcataggaaaacaaatagaacaagtacagaaaa
tgaccataattaataatgtttaatTTTTCCGACAGACACACCCTCAACGCCCCACAGT
gttcaactcgctaccacaccaccgcgacctgctgcgagatccaagggatatgtactatag
tagtagagaacgcgagcgggatcgcgaaacgccttagggatcgggatcgtgatagggatc
gcatcgctgcacgagtagcactgcggtacgagtagcgggatcgggaacgagagttg
tacgaacgcgaaagagatcgcgagcgggaggtcgaaagagaaaggtgagttggtgctat
atagtattaggagcactcaagtaatacatatatgtccttatgtaccgcagactggaata
tatagcaccgctgtcgtttgaacaagcgtggctatgggcccgaacaggctcgtgtactgc
catctccagttctaaccggttttaagccaaagagtggtctgaaccctcgacactccgat
tcggatgaggaggattggtgcatggctcataggagtaaaggagaagaacttttcaactgg
agttgtcccaattcttgttgaattagatggtgatgtaaatgggacaaaatTTTTCTGTCA
gtggagaggggtgaaggatgcaacatacggaaaacttacccttaaatttatttgcact
actggaaaactacctgttccatggccaacacttgtcactactttgacttatggtgttca
atgcttttcaagatacccagatcacatgaaacagcatgactttttcaagagtgccatgc
ccgaaggttatgtacaggaaagaactatTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACA
cgtgctgaagtcaagtttgaaggatgataccttgttaatagaatcgagttaaaaggat
tgattttaagaagatggaaacattcttggacacaaattggaatacaactataactcac
acaatgtatacatcatggcagacaaaacaaaagaatggaatcaaagttaacttcaaaatt
agacacaacattgaagatggaagcgttcaactagcagaccattatcaacaaaactcc
aattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattacctgtccacacaatctgcc
tttcgaaagatcccacgaaaagagagaccacatggtccttcttgagtttgaacagct
gctgggattacacatggcatggatgaaactatacaaatagcaaaggctttgattgcatc
gcgtaatcgaaaggatctgatctgggtatagcatcaggccatttgctcctctttgtcag
caccaaacttagatcacaattttgatagcagacacagctatcagatacccgaacat
ctgcaaaaccttccatacctttgtccaccagtagaccaacaccaacaccaaccaaac
ccaaacccaaaaccaacgacaacaccaagatcagcacctatatcaaaggatggcagca
acgtatcgacaccgaaactaggaacaactatatctgatatacaattggctggagttagc
ttacaggagtttaagcccgaatcgacaaccgcaatcgcaacagaagcaggagcaacaatt
gcatcaggatggatggctcagatggtaccggcaatcgggtccatacggatcccagtg
tgcatcattgcccggagaccagagcaacatcgccccactccgatatcgaattcattaga
actatgaagagaagtgaaccggaacaactgcaataacaccaaggacaactaaaactga
agcaatgatattaagcgtaccaattacaataacgtccccattagctattaaaagatat
attcagatagtgacattaattataataccgaacgaggaactgataatgacagagtgga
gaagcaccagctcatcattatcaccagccagaactaactacaccagatctacaagacga
gccaccactgcagcagcatcaccagcactatccacagtagctatcagctcctaag
gaggataggatcaagaacgagcaaccattatgcagacgccacaatccatagttcatagt
ccagaaactagtagatccagaatctagaaactagaaaccagaaaccagaaaccagatccac
taaaagtgaactttaattgaaactcaaactgaaactgaaacgaggtgtaagaatgtg
agagtgattctattccacgcaattggattgggagtaaacgtggggagattgtaaacaga
ttagagctactatttgcttagaaataggagtagacaacataatttttagatatgaatag
atcaagtgtattgtactTTTTTTTTAATGTAAGGGCAAGTCTAGACGAAGAGCACATCA
aatgaagctaacgataacagaactcttttcaagcagaacacacatagatctagatcga
aatatataatataataggaaataaagattgtaggtactcgcatacattgtaagttatcta
gaatttagctcgaggaatcggtagcgtaatctgcaagcgtttttgacttgtttatatta
aaagttagtacttcaattatgtgtatttaaatgctcatttatttactcaatgta
cataccagataattgtagatatgaaattgttatttatttatttcttttgtatgtaaaat
atctacctacgactactattataaataccttcatcagaccgaatccctatagcgaatat
aagcaaaaattcagcgaatttagtctctacggttttaacattcagttgtgtatttat
actcgagcggataactTTTTTTCCACGATTAGTAGAAGTCCACGCAACATGGCAAGTCCA

Anhang

tacttccagaattcaatagtccttactgagacttaacaaaatcccactaaatgtcgcac
aataaaattcatcataaatctggttacgataaagtctgtctgattgtcttcagttatta
gatagttagtccataatctaatacctcaaatgaacatgtcccattctatattatgtttc
atattgtatgtatgttttaagtcctatgttaatgtcaatgaagaacgacttaggtac
acttgtttcagtatcataacagcagagatatttttgcaacgacttatgccctaaactg
cacttgttcagcacacaggggaagtaatttttcgatttcccgcaggtgtaacgcatgt
acagcatagttacccaacactggcctcccgaagagccggaatcgggaagacgccttc
ctccgactcccagtaaaccatcaacactgcagctcaagccaaccaatatcaatttccc
gaagctgaatgacagtcccacacatgtaagtgactatccatcgagggtaactgcatc
agagcaactgtttgcataatgaggatgagaactaatattcataggaaaacaaataga
acaagtacagaaaaagaccataattaataatgttttaatttttccgacagacacac
cactcaacgccccacagtggtcactcgctaccacaccaccgcgacctgctgagatcc
aagggatagtactatagtagtagagaacgcgagcgggatcgcgaacgccttagggat
cgggatcgtgatagggatcgcgatcgcctgacaggtacgacctgcggtacgagtac
cgggatcgggaacgagagttgtacgaacgcgaaagagatcgcgagcgggaggtcga
aagagaaagggtgagttgggtgctatagtagtattaggagcactcaagtaatacata
tatgtccttatgtaccgcagactggaataatagcaccgctgtcgtttgaacaagcgt
ggtatgggcccgaacaggtcgtgtactgcatctccagttctaaacgggttttaagcc
aaagagtggtctgaaccctcgacactccgatcgggatgaggaggattgggtgcggta
agcctatccctaaccctctcctcgggtctcgattctacgtagcaaaaggcctttgat
tgcgatcgcgtaatcgaaggatctgatctgggtatagc atcaggccatttgctcctc
ctttgtcagcaccaaacttagatcacaattttgatagcgcacacagctatcagatac
ccgaacatctgcaaaccttcatacctttgtccaccagtacaccaacaccaacaccaac
caaaccccaaaccccaaaccaacgacaacaccaagatcagcacctatatcaaaggta
tggcacgaacgatatcgacaccgaaactaggaacaactatacttgatatacaaattg
gctggagttagcttacaggagtttaagcccgaatcgacaaccgcaatcgcacaagag
caggagcaacaattgcatcaggatggatggctcagatgggtaccggcaatcgggtcc
atacggatcccagtgatggcatcattgccggagaccagagcaacatcgcccactccg
atatcgaattcattagaactatgaagagaagtgaaccggaacaactgcaataacacca
aggacaactaaaactgaagcaatgatattaagcgtaccaattacaataacgtccccat
tagctattaaaaagatatattcagatagtgacattaattataataccgaaacgagga
actgataatgacagagtgagcgaagcaccagctcatcattatcaccagccagaacta
actacaccagatctacaagacgagccaccactgcagcagcatcaccagcactatcac
agtatctcgatcatacgcctctaaggaggataggatcaagaacgagcaaccattatg
cagacgccacaatccatagttcatagtcagaaaactagtatccagaatctagaaactag
aaaccagaaaccagaaaccagatccactaaaagtgcaactttaattgaaactcaaactg
aaactgaaacgaggtgtaagaatgtgagagtgattctattccacgcaattggattggg
agtaaacgtggggagattgtaaacagattagagctactatttgcttagaaataggag
tagacaacataatttttagatatgaatatgatcaagtgtattgtacttttttttaagt
aaagggcaagtctagacgaagagcacatcaaaatgaagctaacgataacagaactctt
ttcagcagaacacacatagatctagatcgaaaatatatatataggaataaagattgt
agtactcgatacattgtaagttatctagaatttagctcgaggaatcgggtacggtaat
ctgcaagcgtttttgacttgtttatattaaaagttagtacttcaattatgtgtatttaa
aatgcgctattttattttactcaatgtacataaccagataattgtagatatgaaattgt
tatttttattcttttgatgtaaaatatttacctacgactactattataaataccttc
atcagaccgaatccctatagcgaatataagcaaaaattcagcgcgaatttagtcctct
acggttttaacattcagttgtgtattttatactcgagcgggatacttttttccacgat
tagtagaagtcacgcaacatggcaagtcagcatattgaattcaatccaagtccaaaact
gatccaaataactcaattatgaccaaagcatgtatctgtgtaagtaagcatcattca
gtgccatttgtttatacagactctagctaacttacaatagcttgtttatcatacatatt
tgcttagcgaatgaaacggtgttctcatagttactctgtaatctgcaatcgacgagag
gtttatgcttctattaatgcggtttcgtatgctgaaattagctcctcgcaaacctttccg
atc...

Anhang

pAM53 (Ca-beta::EGFP)

...ctcggaggccattatatcggccatgtacttgccaccaactgttgcttcatgtgcggc
agaagaatattgaaaactatatacattttactgcattgtttgatatttgagttggg
atgggattttggcagcgggccaattaaatttgttatgattttcagatggccggtccaat
tcatttgtctttacttttaaggcagattaaagtctattctgatcccatttattttgaaa
atccaggggtctgccgactcgaactactcacaaccgtcatccgatctgtcgctagac
gaggaaaaggaatcgcttcggcgagaaaaggaacgtcaggccttaagccagttggataa
agcgagggtaagtgtgttgcattctaaaaatgaaaatccaacctgtaataacctgt
aatttcagagcaaaccagtggtcgctgtgccaaccaacgtagcatacgatggcgcc
atcgacgacgattcgccggtgcagggcgagcagtttcgcttcgagatccgggaattcct
gcacatcaaagagaagtagacaataactggtggatcggccggctggtcaaggagggct
gtgatgtgggcttcatacccagccccgctaagctagacaacattcgcatgcaggttggg
tatgatagaaccaattcacacatcttccaagtgtgatctataacgacctctctatcgta
gaaccaaccagaccctcaagactgtatggcacaagggtcgtcgagcgggaatcttg
gtgccccgggacaagcaggtgcggagccatctcgaggtagcacacccccacacctggt
atgacacacatttcatctcctgatttcttttgggagaggttttatttcgatatctgttc
aattctgtgaatcgaattaatttcaatctatataatattttcgtctctctatgtaaat
gtgtttacttttgtaaatcacaaaagaggtactcccttcgaggagccaatatgatta
tgagcatccataggtccgacagatggatgccgagcccgactcgagctcatcgatgtcta
ttgtaattggacgcgtgttttatgattttcatttcaaagcgaaccaaatcagattccag
accatattgaaaaaaaaagaaaaaaaaagaaaatgtgggccaagctaaattcccgtaat
tgtacttttgtgtttgatctaattatataatcatgtgacattcatataaacggagtgcaa
gttaatgcttacttatatacaacgacttcacccggcaatccgatgcaaatccgtccctag
ttatgcaaacggcccatttatcggcctagagctagccctagatcccagcatgaaagccg
aatccaccagcagatcg-*LoxP-3xP3 enhancer/hsp70 promoter-DsRed-SV40 3'-*
UTR-LoxP-gtctagactgcttgatattcccgttttagacccaaattcaccactgtaaa
cacactaaagtacacaccttaccagcttcaatagccacgattttctccgttcctagttt
gtctaaatcaaagctcctcgttcatggtctgcttgtaaaactaaccaattagccgatgtg
aacactattaaatgcactcaaactctcttttatctaacacaaaactggtgacaacacta
accaaatgaacaaccacaacgcgacccaagatccctacagtacaacaccgcgcaagaaa
aaciaagggttgtccacgtctctcatcagaatctcagaaatccatttcaatcgcaaaaa
tatcgctagctctttcagggagtttcaggaattttcaaaacaaaacaaatctactcaaa
acaaaaaagttcttaaaaagtttagtactcagctgtagttgataaagcttaatacattc
ttaaattaactttacaactttatcagaacagatctaatcagttattatattttcaacttt
ttaactgaatctcttcaattttcgtaagtaaaatattctataaactgaatcaatcagac
aaactcattccaaaattcgtatcatctgtccgtaaaactctgttttttggtcaatttgt
aatgtcctgctaaccgaaaccgtaacttagttatagaaatctgtgtaaatgaaagcaa
acagaacacttcatatacgagtggaaataagttagatagttatattttggaagaaacct
caccctcgagttggcattttaaacagcattaaatgggtgcgtagaccggttttaaaggaa
aaaagcaaaaaaaaaacgagatgaaaattcaaatcaacctgatattgcgaacctgcccgt
agaccgacacaattgccagcacaacacgagcacaccgaaatccacggatcagatca
attcgaaaacactgtatataactaactaaccacaagcgtcttacgtatttacgataata
tcttaaatggcctagcaattcgtactgatcgatcgactggctcgtaccaatcataag
ctcgctcatcctttgccattatttcgtcctgtttgccatgataactaacgctcaggtgac
gaatcagattccatgggaccaggacgacacggcaagacaccggcgggcgggccaacaa
ggagaagcgaaagccattcttcaagaaacaggagacggccagtcctacgacgtggtgc
cctcgatgcgtcccgtcgtcctgggtggggcccagtttgaagggtacgaggtgaccgac
atgatgcagaaagccctcttcgacttctcaagcaccgcttcgagggccgcatcatcat
caccgggtgatggccgacatctcgctggccaagcgtccatcatgaacaatccctcga
agcgggcatcatggagcgcctccagccggagcgcattgcctcggcaagggtgcaggag
gagatcgagcgcctctcgagctggcccgtcgtcctccagctgggtcgtgctcgattgtga

Anhang

tacaatcaatcatccgtcacaactagcgaacttcattagcgcacaacaatagtgtact
taaagattagtagtagtaaggtgagctatacaatggttattccttggatactcacttta
ctataaataatattttttgaggttttacagcgtttgatcaaatcacgtggcaagtc
gcaggcgaaaaacctctccgttcaaattgggtgcccgcgagaagctagcccaatgtccac
cggatatgttcgatgtaatcctagacgagaatcagctggaagacgcctgagcagcatt
gccgagtacttggaggtgggttaaaggacatatgggttagattcgcaaatatattatat
attaaaatattacgtatacgcacattgggacttaggatttatcatgcatgtatctaaac
taatctattatgtcttgcagacgtattggaaggccaccacatgggtcataggagtaaa
ggagaagaacttttctggtgagttgtcccaattccttgttgaattagatgggtgatgttaa
tgggcacaaaattttctgtcagtgaggaggggtgaaggtgatgcaacatacggaaaactta
cccttaaattttatgtcactactggaaaactacctgttccatggccaacacttgtcact
actttgacttatgggtgttcaatgcttttcaagatacccagatcacatgaaacagcatga
ctttttcaagagtgcctatgcccgaaggttatgtacaggaaagaactatatttttcaaag
atgacgggaactacaagacacgtgctgaagtcaagtttgaaggtgatacccttggtta
agaatcgagttaaaagggtattgattttaagaagatggaaacattcttggacacaaaatt
ggaatacaactataactcacacaatgtatacatcatggcagacaaaacaaaagaatggaa
tcaaagttaacttcaaaaattagacacacacattgaagatggaagcgttcaactagcagac
cattatcaacaaaataactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccatta
cctgtccacacaatctgccccttgcgaaagatcccaacgaaaagagagaccacatgggtcc
ttcttgagtttgtaacagctgctgggattacacatggcatggatgaaactatacaaacgg
gacattcgagcagtgccgcccacgcccgccttgcgcgaggaggcctcaccctccgc
agatcccgcgctctgggaccgacgcctccaggtaaaggaacacctgcccgcctcgttcg
ggctcatctacgggtcgcattgcccattttcatacagcagattccaccaaagtcctcgc
atgccaagcagctgcgaaatttcaatcaaaccaatatcaatatcaatatcgatatcga
aatcagagtcacccattattgcctctcaccttcccaattcaaacgaaatcgatccgacg
accattaagaatacatatcagcatgtgtgtacatagcagatggatattgttatgtatgca
catcagatcagcagtaaaataattttcatttgccttctcaacatactcaacacacttata
caaaatacaattctaaaatttgcctttttcaaatttaaattcccatgactgtaccaa
aaaaccaatcgattctccttctggctctctctcccccgatttccaacgcgtgggtgg
gcacgggtgtgatgagcagtagatggcgaggagtttgcgatgagcaggatcccaggatg
ggcatgtccggcgagatcgcgagggaagtcgggagcagaccgcatagcagggaaag
ggagagggagcgcgaacgggagcgggattactgggatcgggaattcaacagagatcgca
gctccaaggatcgcgaaaggatctcgagtgggagcgggaacgggctcgcgagtgaggag
agagagcgggaacgagattgggataggagttcgattgggaccaaggtaaatctcgttt
atactgtttcttttcgtttcttttacttttgtaccgataatataatatacgtaaactcat
taagtatcacttgccccagaaatcgaattaaatcggtttctactgaaagtttagctaga
attacctcgtcccaagttagaagtcacatgaagttgtagcctattgtatctctcttat
acatagattgtacatagactaagggtgaaaagtagcttcggcaccggctcacatctccac
ccatctcgattgtatgtagctgcagctcatggcatttacttagaactttcccg...

gRNA-Plasmide

Farbkodierung:

spezifischer Abschnitt der gRNA

crRNA

tracrRNA

pAM48 (cac gRNA #1)

...Dm snRNA:U6:96Ab promoter-
cttcgtatacatggttaagcatggtgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggc
tagtccggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc-U6 terminator...

pAM49 (cac gRNA #2)

...Dm snRNA:U6:96Ab promoter-
cttcggattgtggagctctgcataagtttagagctagaaatagcaagttaaaataaggc
tagtccggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc-U6 terminator...

pAM54 (Ca-beta gRNA #1)

...Dm snRNA:U6:96Ab promoter-
cttcgcatccataggtccgacagagtttagagctagaaatagcaagttaaaataaggc
tagtccggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc-U6 terminator...

pAM55 (Ca-beta gRNA #2)

...Dm snRNA:U6:96Ab promoter-
cttcgaacacctgcccgcctcgttcgttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggc
tagtccggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgc-U6 terminator...

9.3 Anmerkung zu den Abbildungen

In den Abbildungen 1-6 und 24 sind Inhalte aus bereits publizierten Arbeiten dargestellt. Die ausführlichen Quellenangaben können den jeweiligen Legenden und dem Literaturverzeichnis entnommen werden. Die vollständigen Lizenzen bzw. Genehmigungen zur Darstellung der Inhalte in den Abbildungen 1B, 5, 6 und 24 der vorliegenden Arbeit sind auf der Plattform des Online-Speicherdienstes Zenodo hinterlegt (https://zenodo.org/record/4414811#.X_JE_HRYxmUk). Die Inhalte der Abbildungen 2, 3, 4A und 4B sind entsprechend den Vorgaben des Verlages (<https://www.jneurosci.org/content/rights-permissions>) gekennzeichnet. Die Inhalte der Abbildungen 4C und 4D sind entsprechend der vorhandenen Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0) gekennzeichnet. Der Link zur gültigen Lizenz kann der Legende der Abbildung entnommen werden.

10 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Manfred Heckmann für die Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit, aber noch viel mehr dafür, dass er mir den Weg in die Wissenschaft eröffnet und in mir die Faszination für wissenschaftliches Denken und Arbeiten geweckt hat. Mein Dank gilt auch der Korreferentin/dem Korreferenten für die Begutachtung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Dr. Tobias Langenhan möchte ich für die Einarbeitung in die Molekularbiologie und die Genetik von *Drosophila* danken. Unsere gemeinsame Arbeit hat mein Interesse an der Neurowissenschaft und die Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen nachhaltig geprägt. Frau Dr. Mila Paul danke ich herzlich für die Einführung in das experimentelle Arbeiten und die Zusammenarbeit bei der Erstellung der Publikation und meiner Dissertation.

Außerdem gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Anna-Leena Sirén für die Unterstützung bei der Aufnahme in das Projekt B6 des TRR 166: Hochleistungs-Lichtmikroskopie zur Aufklärung der Funktion von Membranrezeptoren - ReceptorLight und ihre persönliche Betreuung, Herrn Prof. Dr. Jens Eilers und Herrn Prof. Dr. Robert Kittel für die Hilfe bei der Analyse und Interpretation der Bildgebungsdaten sowie Herrn Prof. Dr. Markus Sauer und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe für die Begleitung bei *d*STORM und der Erhebung und Auswertung hochaufgelöster Bildgebungsdaten.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Philip Kollmannsberger, Herrn Priv.-Doz. Dr. Sören Doose und Herrn Dr. Felix Repp für die Einarbeitung in Python und die Zusammenarbeit bei der Implementierung der Auswertalgorithmen, Herrn Prof. Dr. Stephan Sigrist für den Austausch über die Bildgebungsdaten und zur Verfügung gestellte Reagenzien, Herrn Dr. Martin Pauli und Herrn Dr. Sven Proppert für die Etablierung der bildgebenden Methoden und ihre Hilfsbereitschaft bei technischen und experimentellen Problemen, Herrn Dr. Dmitrij Ljaschenko für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Anleitung in der Präparationstechnik und den Färbungen, Maria Oppmann, Frauke Köhler, Claudia Wirth und Uta Strobel für ihre technische Unterstützung bei

Danksagung

Experimenten und bei der Fliegenaufzucht, Frau Dr. Nicole Scholz und Frau Dr. Nadine Ehmann für die Hilfe bei der Einarbeitung in *Drosophila* sowie allen anderen Kollegen des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind und mich auf allen Wegen begleiten. Meiner lieben Hedda danke ich von Herzen für das gemeinsame Erleben aller schönen und das Meistern aller schwierigen Momente im Leben. Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern. Meiner Mutter danke ich für ihre Kraft und ihre liebevolle Unterstützung bis zum Schluss. Meinem Vater danke ich für seine Hilfe bei der Lösung aller denkbaren Probleme und seine ungebrochene Zuversicht.

Lebenslauf

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Achmed Mrestani

geboren am 06. August 1991 in Halle (Saale), Deutschland

Schulbildung und Studium

| | |
|-----------------|---|
| 10/2018 | Approbation als Arzt |
| 05/2018 | Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 1,66) |
| 10/2011-05/2018 | Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (PJ-Tertial 12/2017-04/2018) |
| 06/2010 | Abitur (Note 1,0), Landesgymnasium und Europaschule Latina August Hermann Francke, Halle (Saale) |

Klinische Ausbildung

| | |
|-----------------|--|
| 12/2017-04/2018 | Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg, Leitung: Prof. Dr. med. Jens Volkmann (PJ-Tertial) |
| 08/2017-12/2017 | Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Halle, Leitung: Prof. Dr. med. Jörg Kleef, Rotation: Unfallchirurgie (PJ-Tertial) |
| 05/2017-08/2017 | Klinik für Innere Medizin IV (Hämatologie und Onkologie) des Universitätsklinikums Halle, Leitung: PD Dr. med Lutz Müller, Rotation: Zentrale Notaufnahme (PJ-Tertial) |
| 2013-2016 | Famulaturen: Klinik für Kardiologie und Angiologie und Zentrale Notaufnahme des Universitätsklinikums Halle, Zentrale Notaufnahme des Klinikums Martha-Maria Halle-Dölau, Ampipal Hospital Nepal |

Wissenschaftliche Arbeit

| | |
|--------------|---|
| seit 06/2018 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Physiologischen Institut, Lehrstuhl für Physiologie - Schwerpunkt |
|--------------|---|

Lebenslauf

Neurophysiologie der Universität Würzburg,
Vorstand: Prof. Dr. med. Manfred Heckmann

10/2014-11/2016 Studentische Hilfskraft am Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Physiologie - Schwerpunkt
Neurophysiologie der Universität Würzburg

9/2013-3/2015 Lebenswissenschaftliches Kolleg (Studienstiftung
des deutschen Volkes), Gruppe: Molekulare und
zelluläre Neurobiologie, Leitung: Prof. Dr. med.
Manfred Heckmann (Universität Würzburg) und Dr.
med. Tobias Langenhan, D.Phil. (Universität
Würzburg)

Lehre

seit 06/2018 Praktikum der Physiologie für Studenten der Human-
und Zahnmedizin (3. und 4. Semester) und
Biomedizin (Bachelor), Seminar der Physiologie für
Studenten der Humanmedizin (4. Semester)

Stipendien

03/2012-05/2018 Studienstiftung des deutschen Volkes

10/2011-09/2012 Deutschlandstipendium

Wissenschaftliche Präsentationen

Mrestani A. 2019. Compaction of the active zone scaffold in presynaptic
plasticity. Biomed Colloquium, Rudolf-Schönheimer-Institut für Biochemie,
Universität Leipzig (Vortrag).

Mrestani A, Heckmann M, Paul MM. 2017. Structural plasticity of active zones
in presynaptic homeostasis. Neurobiology of Drosophila Meeting, Cold Spring
Harbor Laboratory (Posterpräsentation).

Mrestani A, Heckmann M, Paul MM. 2016. A structural correlate for presynaptic
homeostasis. Neurologisches Kolloquium der Studienstiftung des deutschen
Volkes, Köln (Posterpräsentation).

Mrestani A, Heckmann M, Paul MM. 2016. A structural correlate for presynaptic
homeostasis. Young Scientist Retreat FOR 2149, Eisenach
(Posterpräsentation).

Mrestani A, Heckmann M, Paul MM. 2016. A structural correlate for presynaptic
homeostasis. 95. jährliches Treffen der Deutschen Physiologischen
Gesellschaft, Lübeck (Posterpräsentation).

Lebenslauf

Mrestani A. 2015. Mitochondrien als Schlüsselfaktor der biologischen Stressantwort. Sommerakademie der Studienstiftung des deutschen Volkes, St. Johann in Tirol (Vortrag).

Publikation

Mrestani A, Kollmannsberger P, Pauli M, Repp F, Kittel RJ, Eilers J, Doose S, Sauer M, Sirén AL, Heckmann M, Paul MM. 2019. Active zone compaction for presynaptic strength. bioRxiv October 13, 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/802843>. (in preparation)