

**Aus dem Zentrum für Neurologie  
Hertie Institut für klinische Hirnforschung  
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt  
Neurodegenerative Erkrankungen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. T. Gasser  
Sektion Klinische Neurogenetik  
Leiter: Professor Dr. Schöls**

**Störungen des axonalen Transports bei der  
hereditären spastischen  
Spinalparalyse im *Drosophila*-Modell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Vera Katharina Siegert  
aus  
Weinstadt

2011

**Aus dem Zentrum für Neurologie  
Hertie Institut für klinische Hirnforschung  
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt  
Neurodegenerative Erkrankungen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. T. Gasser  
Sektion Klinische Neurogenetik  
Leiter: Professor Dr. Schöls**

**Störungen des axonalen Transports bei der  
hereditären spastischen  
Spinalparalyse im *Drosophila*-Modell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Vera Katharina Siegert  
aus  
Weinstadt

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Schöls  
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Krschek



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Hereditäre Spastische Spinalparalyse .....	4
1.1.1 SPG10.....	5
1.2 Axonaler Transport.....	5
1.2.1 Axonaler Transport in Motoneuronen.....	5
1.2.2 Kinesine – Entdeckung und Nomenklatur .....	6
1.2.3 Kinesine und ihre Funktionen.....	7
1.2.4 Kinesin-1 .....	9
1.2.5 Axonaler Transport von Mitochondrien .....	12
1.3 Synapsen .....	13
1.4 Drosophila als Modellorganismus .....	14
1.4.1 Synaptogenese in <i>Drosophila</i> .....	15
1.5 Drosophila-Genetik .....	17
1.5.1 Grundlagen .....	17
1.5.2 Das UAS-Gal4-System .....	17
1.5.3 Gal4-Treiber im Motoneuron .....	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material .....	20
2.1.1 Chemikalien .....	20
2.1.2 Antikörper.....	20
2.1.3 Technische Geräte.....	20
2.1.4 Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.5 Software.....	23
2.1.6 Fliegenstämme.....	23
2.1.7 Khc-Mutanten.....	24
2.2 Methoden .....	24

2.2.1 Kreuzungen.....	24
2.2.2 Verhaltensexperimente .....	27
2.2.3 <i>In vivo</i> imaging .....	28
2.2.4 Bildbearbeitung .....	30
2.2.5 Analyse der FRAP-Daten.....	31
2.2.6 Schneller axonaler Transport von Mitochondrien.....	31
2.2.7 Antikörperfärbungen.....	32
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Verhalten von Larven mit Mutationen in der schweren Kette des Kinesins im Vergleich zu Wildtyp-Larven.....	35
3.1.1 Verhalten von Larven mit den Mutationen $Khc^8$ , und $Khc^8/Khc^{13314}$ ..	35
3.2 Verhalten von Larven mit der Mutation K253N.....	37
3.2.1 Verhalten von Larven mit $Khc^{wt}$ und $Khc^{wt}trunc$ .....	37
3.2.2 Verhalten von Larven mit $Khc^{wt}trunc$ , $Khc^{K253N}trunc$ .....	39
3.2.3 Verhalten von Larven mit $Khc^{wt}$ , $Khc^{K253N}$ .....	40
3.2.4 Verhalten von Larven mit $Khc^{K253N}$ und $Khc^{K253N}trunc$ .....	41
3.2.5 Verhalten von Larven mit $Khc^{K253N}$ und $Khc^8/Khc^{13314}$ .....	43
3.3 Störungen des axonalen Transports <i>in vivo</i> .....	44
3.3.1 Vergleich der von Mitochondrien bedeckten Fläche in Axonen von Khc-Mutanten und Kontrolltieren.....	44
3.3.2 Störungen des langsamen axonalen Transports.....	45
3.3.3 Störungen des schnellen axonalen Transports .....	48
3.4 Störungen des Synapsenaufbaus <i>in vitro</i> .....	49
4 Diskussion .....	51
4.1 Kinesinmutationen als Ursache der HSP .....	51
4.2 Verhaltensanalyse.....	51
4.2.1 $Khc^8/Khc^{13314}$ vs. $Khc^8/+$ vs. $+/+$ .....	51
4.2.2 $Khc^{wt}/elav-Gal4$ vs. $Khc^{wt}trunc/elav-Gal4$ vs. $+/elav-Gal4$ .....	52
4.2.3 $Khc^{K253N}/elav-Gal4$ vs. $Khc^{K253N}trunc/elav-Gal4$ vs. $+/elav-Gal4$ .....	52
4.2.4 $Khc^{K253N}/elav-Gal4$ vs. $Khc^8/Khc^{13314}$ .....	53

4.3	In vivo imaging .....	55
4.3.1	Mitochondrienmenge im Axon.....	55
4.3.2	FRAP – axonaler Transport.....	55
4.3.3	Schneller axonaler Transport .....	56
4.4	Störungen der Synaptogenese bei Kinesinmutationen .....	59
4.5	Andere Ursachen und Modelle der HSP .....	61
4.6	Ausblick.....	63
5	Zusammenfassung .....	65
6	Abkürzungsverzeichnis.....	66
7	Abbildungsverzeichnis.....	66
8	Tabellenverzeichnis.....	67
9	Literaturverzeichnis .....	68
10	Danksagung .....	78

# 1 Einleitung

## 1.1 Hereditäre Spastische Spinalparalyse

Die Hereditäre Spastische Spinalparalyse (HSP), auch Strümpell-Lorrain Syndrom genannt, ist eine klinisch und genetisch heterogene, neurologische Erkrankung, für die autosomal-dominante, autosomal-rezessive und X-chromosomal-rezessive Erbgänge beschrieben sind (Fink, 2003).

Sie wurde erstmals 1880 von Strümpell beschrieben (Strümpell, 1880). In den folgenden Jahren wurden weitere Fälle von Strümpell und Lorrain veröffentlicht (Lorrain, 1898; Strümpell, 1883). Bald darauf wurden auch Fälle mit zusätzlichen neurologischen Symptomen beschrieben, die nicht mehr der ursprünglichen Beschreibung der „reinen“ HSP von Strümpell entsprachen. Pratt bezeichnete diese Fälle als „HSP plus Syndrome“ (Pratt, 1967). Allerdings gab es keine einheitlichen Kriterien bis Harding 1981 (Harding, 1981) nach der klinischen Untersuchung von 22 Familien eine Einteilung in reine und komplizierte Formen vorschlug, die bis heute gültig ist (McDermott et al., 2000). Die Pathologie der HSP beruht auf der axonalen Degeneration von motorischen und sensorischen Neuronen und ist am distalen Ende der längsten Axone des ZNS am stärksten ausgeprägt (Reid et al., 1999).

Bislang wurden schon 41 Genloci (Salinas et al., 2008), genannt SPG (spastic paraplegia gene), der HSP beschrieben. So führen Mutationen in den Genen *spastin* (SPG 4) und *atlastin* (SPG 3A) zu bis zu 50% aller HSP Fälle; Mutationen in *hsp60* (MIM 118190) und *nipa1* (MIM 608145) zu < 1 % und Mutationen in *kif5a* (SPG 10, MIM 602821) zu 3 % der HSP Fälle (Schule et al., 2008; Züchner et al., 2006).

Hauptsymptom dieser langsam fortschreitenden neurodegenerativen Krankheit ist eine spastische Paraparese der unteren Extremitäten bedingt durch die Degeneration der Axone des Tractus corticospinalis. Klinisch unterscheidet man die reine Form, bei der die spastische Parese im Vordergrund steht, von den komplizierten Formen, bei denen noch weitere Symptome wie z.B.

Optikusatrophy, Epilepsie, zerebelläre Ataxie und kognitive Defizite auftreten (Züchner et al., 2006).

Bei der autosomal-dominanten Form gibt es innerhalb und zwischen den betroffenen Familien große Unterschiede hinsichtlich des Erkrankungsalters und dem Schweregrad der Erkrankung. Klassische Symptome der reinen Form sind spastische Gangstörungen, Tonuserhöhung und Hyperreflexie der unteren Extremitäten, Blasenstörungen, Klonus, positiver Babinskireflex und weitere Pyramidenbahnzeichen (Reid et al., 1999; Reid et al., 2002).

### **1.1.1 SPG10**

SPG10 zählt zu den autosomal-dominant vererbten, reinen Formen der HSP (AD HSP). Das spastic paraplegia gene 10 (SPG10) ist auf dem Chromosom 12q lokalisiert. Mutationen des *kif5a*-Gens, welches für die schweren Ketten des neuronalen Kinesins, dem Motor des anterograden axonalen Transports codiert, führen zum Krankheitsbild der AD HSP (Reid et al., 2002). Das Erkrankungsalter liegt hier zwischen der frühen Kindheit und der dritten Lebensdekade, die Krankheit schreitet nur langsam voran, so dass die Patienten auch nach über 50-jährigem Krankheitsverlauf noch laufen können. Da SPG10 eine seltene Ursache der HSP ist, wurden bis vor kurzem auch nur vier verschiedene Mutationen beschrieben, drei davon in der *kif5a* Motordomäne und eine in der benachbarten „coiled-coil“-Struktur (Blair et al., 2006). Drei weitere *kif5a*-Mutationen wurden in deutschen Familien entdeckt, eine „missense“-Mutation (c.759G>T, p.K253N), eine „in frame“-Deletion (c.768\_770delCAA,p.N256del) und eine „splice site“-Mutation (c.217G>A). Die sieben bekannten *kif5a*-Mutationen zeigen eine 100%ige Penetranz (Schule et al., 2008).

## **1.2 Axonaler Transport**

### **1.2.1 Axonaler Transport in Motoneuronen**

Die meisten für die Funktion einer Nervenzelle notwendigen Moleküle werden im Soma synthetisiert und müssen dann an ihre teilweise weit entfernten Wirkorte transportiert werden. Besonders bei den längsten Axonen des

Menschen, denen des corticospinalen Trakts, die bis zu einem Meter lang sind, werden Störungen des axonalen Transports sichtbar (Almenar-Queralt and Goldstein, 2001).

Der axonale Transport wird unterteilt in langsamen und schnellen, anterograden und retrograden Transport. Der schnelle Transport kann anterograd, also vom Soma zur Synapse, und retrograd, von der Synapse zum Soma, mit einer Geschwindigkeit von 0,5-10  $\mu\text{m/s}$  erfolgen. Der anterograde Transport benötigt als Motor Kinesin, der retrograde Transport Dynein. Es werden membrangebundene Organellen, Mitochondrien, Neurotransmitter, Kanalproteine, „multivesicular bodies“ und Endosomen transportiert. Der langsame Transport erfolgt kinesinabhängig nur anterograd mit einer Geschwindigkeit von 0,01-0,001  $\mu\text{m/s}$  (Duncan and Goldstein, 2006).

### **1.2.2 Kinesine – Entdeckung und Nomenklatur**

Kinesine sind die Motorproteine, die sich unter ATP-Verbrauch entlang der Mikrotubuli bewegen und dabei Frachten transportieren können (Brady, 1991).

Für die Funktion der Kinesine ist es wichtig, dass Mikrotubuli polar aufgebaut sind, das heißt ein „Plus-“ und ein „Minus-“ Ende haben. Dementsprechend werden sie auch in Zellen angeordnet, sei es bei der Mitose oder in einem Axon, wo das Minusende zum Zellkörper und das Plusende zum Zellende zeigt (Goldstein, 1993).

Die Entdeckung der Kinesine im Axoplasma des Tintenfisches (*Loligo pealii*) führte schon früh zur Annahme, dass die unterschiedliche Primärstruktur in der „Schwanzdomäne“ zur Bindung verschiedener Frachten dient. Nach Sequenzanalysen wurden die Kinesine in 5 „Superfamilien“ eingeteilt und es konnte gezeigt werden, dass sich das „Ur-Kinesin“ vom Minus- zum Plusende bewegt, also am anterograden Transport beteiligt ist (Goldstein, 1993).

Heute sind bei Säugetieren 45 verschiedene Mitglieder der „Kinesin-Superfamilie“, KIFs genannt, in 14 „Unterfamilien“ bekannt und einige Kinesine, die auch am retrograden Transport beteiligt sind, wurden identifiziert (Duncan and Goldstein, 2006).

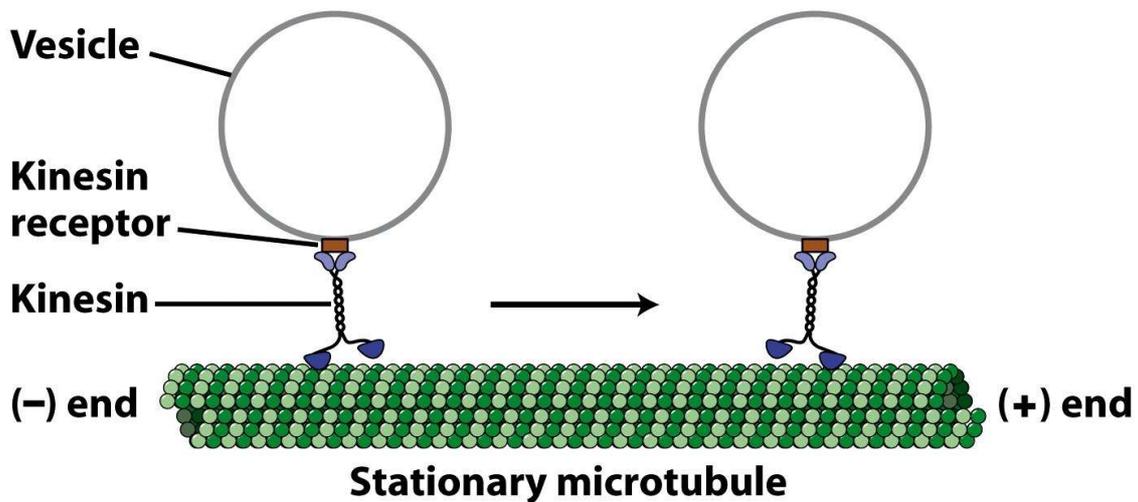


Figure 18-20  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W.H. Freeman and Company

**Abbildung 1: Das Kinesin, der Motor des schnellen anterograden axonalen Transports (schematisch)**

### 1.2.3 Kinesine und ihre Funktionen

Die Kinesine können nach der Lage ihrer Motordomäne in drei Gruppen eingeteilt werden: Kinesine mit N-terminaler Motordomäne wie KIF1A, KIF1B, KIF3A, KIF3B, KIF4 und KIF5; Kinesine mit zentraler Motordomäne wie KIF2 und Kinesine mit C-terminaler Motordomäne wie KIFC1, KIFC2 und KIFC3 (Hirokawa, 1996).

KIF1A ist ein monomeres oder dimeres (Tomishige et al., 2002), für Neuronen spezifisches KIF und hat mit  $1,5 \mu\text{m/s}$  die schnellste anterograde Geschwindigkeit. Es transportiert synaptische Vesikel, die z.B. Synaptotagmin, Synaptophysin und Rab3A enthalten (Okada et al., 1995).

KIF1B ist auch ein monomeres KIF und wird in verschiedenen Gewebearten einschließlich Neuronen exprimiert. Es bewegt sich mit einer Geschwindigkeit von  $0,6 \mu\text{m/s}$  fort und transportiert Mitochondrien (Nangaku et al., 1994).

KIF2 ist ein Dimer und wird hauptsächlich in juvenilen und weniger in adulten Neuronen exprimiert, in anderen Gewebearten seltener. Mit einer Geschwindigkeit von ca.  $0,5 \mu\text{m/s}$  transportiert es eine bestimmte Gruppe membranöser Organellen und wird entwicklungsabhängig exprimiert (Noda et al., 1995).

KIF3A und KIF3B bilden mit KAP3 ein Heterotrimer und werden hauptsächlich in Neuronen und Hoden, weniger in anderen Gewebearten gefunden. Sie

erreichen eine Geschwindigkeit von 0,3  $\mu\text{m/s}$  und transportieren Vesikel (90-160 nm) (Hirokawa, 1996).

KIF4 bildet ein Homodimer und wird entwicklungsabhängig hauptsächlich in jungem Gewebe, einschließlich junger, schon differenzierter Neurone exprimiert. Es transportiert Vesikel mit einer Geschwindigkeit von 0,2  $\mu\text{m/s}$ . Die Vielzahl der KIFs führte zu der Vermutung, dass für jedes Organell ein spezifischer Motor existiert, wobei Redundanz natürlich möglich ist (Howard et al., 1989).

**Tabelle 1: Übersicht über am axonalen Transport beteiligte Kinesine bei Mensch und Drosophila melanogaster**

Kinesin-familie	Gen	Organismus	Motordomäne/Struktur	Expression	Funktion/Fracht/assoziierte Krankheit	Referenz
Kinesin-1  (= konventionelles Kinesin)	<i>kif5a</i>	Homo sapiens	N-terminal	neuronal	anterograder Transport/	(Reid et al., 2002)
	<i>kif5b</i>		Heterotetramer mit KLC1 oder KLC2	Ubiquitär, besonders in Gliazellen	HSP	
	<i>kif5c</i>			neuronal		(Kanai et al., 2000)
	<i>khc</i>	Drosophila melanogaster	N-terminal Heterotetramer mit Klc		anterograder Transport	(Hurd and Saxton, 1996; Saxton et al., 1991b)
	<i>klc1</i>	Homo sapiens	Heterotetramer mit KIF5A, KIF5B oder KIF5C		anterograder Transport	(Diefenbach et al., 2002)
	<i>Klc2</i>				anterograder Transport	
	<i>klc</i>	Drosophila melanogaster	Heterotetramer mit KHC		anterograder Transport	(Hirokawa, 1996)
Kinesin-2	<i>kif3a</i>	Homo sapiens	N-terminal Heterotrimer aus KIF3A, KIF3B und KAP3	Neuronen, Hoden	Schneller anterograder Transport/ Vesikel (90-160 nm)	(Takeda et al., 2000; Yamazaki et al., 1995)
	<i>kif3b</i>					
	<i>klp64d</i> <i>klp68d</i>	Drosophila melanogaster	Heterotrimer	Cholinerge Neuronen	Anterograder Transport/ Acetylcholinesterase und Cholinacetyltransferase	(Ray et al., 1999)

Kinesin-3	<i>kif1a</i>	Homo sapiens	N-terminal Monomer oder Dimer	neuronal	Anterograder Transport/ synaptische Vesikel (Synaptotagmin, Synaptophysin, Rab3A)	(Okada et al., 1995; Tomishige et al., 2002)
	<i>kif1b</i> <i>kif1bβ</i>	Homo sapiens	N-terminal Monomer	ubiquitär	Transport/ Mitochondrien  Morbus Charcot-Marie-Tooth Typ 2A	(Zhao et al., 2001a)
	<i>imac</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	N-terminal Monomer oder Dimer	neuronal	Transport/ synaptische Vesikel	(Pack-Chung et al., 2007)
Kinesin-4	<i>kif4a</i>	Homo sapiens	N-terminal Homodimer	Ubiquitär, besonders in juvenilen Neuronen	Transport/ Vesikel	(Hirokawa, 1996)
Kinesin-13	<i>kif2</i>	Homo sapiens	zentrale Motordomäne Homodimer	Ubiquitär, besonders in juvenilen Neuronen	Anterograder Transport/ Vesikel (membranöse Organellen)	(Noda et al., 1995)
Kinesin-14	<i>kifc1</i>	Homo sapiens	C-terminal		Retrograder, axonaler Transport	(Diefenbach et al., 2002)
	<i>kifc2</i>		Dimer			
	<i>kifc3</i>					

### 1.2.4 Kinesin-1

Kinesin-1 (konventionelles Kinesin), das als erstes Mitglied der „Kinesin-Superfamilie“ entdeckt wurde, ist ein Heterotetramer und besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten (Diefenbach et al., 2002). Bei *Drosophila* enthalten die schweren Ketten (Khc, 115 kD) eine Motordomäne und sind verantwortlich für die Funktion des Kinesins als Motor des schnellen, anterograden Transports. Die leichten Ketten (Klc, 58 kD) spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Bindung der Fracht und der Regulation der Aktivität des Kinesins (Gindhart et al., 1998). Das Genom der Säugetiere enthält mindestens drei Gene für die schwere Kette des konventionellen Kinesins (*kif5a*, *kif5b* und *kif5c*) und drei Gene für die leichte

Kette (*klc1*, *klc2* und *klc3*). Sowohl KLC1 als auch KLC2 interagieren mit KIF5A und KIF5B (Diefenbach et al., 2002).

Die schwere Kette des Kinesins (KHC) in *Drosophila* weist große strukturelle Ähnlichkeiten zum menschlichen KIF5A auf. Die Mutation c.759G>T, K253N im menschlichen *kif5a*-Gen entspricht c.777G>T, p.K258N im *khc*-Gen von *Drosophila* (Schule et al., 2008) und die Mutation c.767A>G, p.N256S entspricht c.785A>G, p.N261S (Reid et al., 2002).

### Prozessivität des Kinesins

Die Prozessivität beschreibt eine Eigenschaft von Enzymen. Enzyme mit hoher Prozessivität können viele Katalysezyklen durchlaufen bevor sie von ihrem Substrat dissoziieren.

Elektronenmikroskopie, Proteasensensitivität und Analyse der Primärstruktur zeigten, dass die schwere Kette des Kinesins aus drei Domänen zusammengesetzt ist: der kugelförmigen N-terminalen Kopfdomäne, die Bindungsstellen für ATP und Mikrotubulus enthält, der helikalen Stieldomäne, welche bei Dimerisierung mit einer zweiten schweren Kette eine „coiled-coil“-Region bildet und der kugelförmigen C-terminalen Schwanzdomäne, die mit den leichten Ketten interagiert (Seog et al., 2004).

Die Prozessivität des Kinesins setzt voraus, dass der Motor einen fast ständigen Kontakt mit dem Mikrotubulus hält, da eine Dissoziation von nur 0,1% seines ATPase-Zyklus zu einer Abdiffusion des Motors führen würde. Mikrotubuli aktivieren die ATPase-Aktivität des Kinesins und steigern sie um ungefähr das Tausendfache (Woehlke et al., 1997b).

Das konventionelle Kinesin erreicht eine relativ hohe Prozessivität, es kann viele „Schritte“ an einem Mikrotubulus entlang machen (> 100 tubulin subunits) bevor es abdissoziiert. Diese Art der Fortbewegung bringt entscheidende Vorteile mit sich, da nur ein oder wenige Motorproteine ihre Fracht kontinuierlich über längere Zeitabschnitte transportieren können (Vale and Fletterick, 1997).

Ob sich das Kinesin jedoch „raupenförmig“ oder in einem „hand-over-hand“-Mechanismus am Mikrotubulus entlang bewegt, wurde lange kontrovers diskutiert. Für einen „hand-over-hand“-Mechanismus spricht, dass ein einzelner Kinesinkopf abwechselnd ca. 17 nm und 0 nm lange Schritte macht (Yildiz et

al., 2004) und dass sich das konventionelle Kinesin von einer „tubulin subunit“ zur nächsten (Distanz 80 Å) fortbewegt, was einer Strecke entspricht, die größer ist als die Motordomäne des Kinesins (Vale and Milligan, 2000).

Die Bewegungsrichtung und hohe Prozessivität des Kinesindimers kann durch Konformationsänderungen der sogenannten „neck-linker“-Region des Kinesins, einer ca. 15 Aminosäuren großen Region erklärt werden. Der „neck-linker“ ist beweglich solange das Kinesin an den Mikrotubulus und ADP oder kein Nukleotid bindet. Sobald das Kinesin ATP bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung. Der „neck-linker“ dockt am katalytischen Zentrum an, wobei sein COOH-Ende Richtung plus-Ende des Mikrotubulus zeigt und die freiwerdende Energie bei der Hydrolyse des ATP zu einer anterograden Bewegung führt (Rice et al., 1999). Dieser „neck-linker“ ist mit einer „coiled-coil“-Dimerisierungsdomäne verbunden, so dass eine Bewegung in einem Kopf auch auf den anderen übertragen wird und so die prozessive Bewegung ermöglicht wird (Vale and Milligan, 2000).

#### Transportstörungen

Mutationen in den schweren Ketten des Kinesins führen zu axonalen Schwellungen um mehr als das 10-fache des normalen Axondurchmessers, die mit Mitochondrien, kleinen Vesikeln, membrangebundenen Organellen und synaptischen Membranproteinen, also der Fracht sowohl des schnellen anterograden als auch des retrograden Transports gefüllt sind (Hurd and Saxton, 1996). Außerdem stören diese Mutationen das Wachstum und die weitere Entwicklung der Motoneuronen. Eine gestörte Funktion des Kinesins scheint eine generelle Unterbrechung des schnellen axonalen Transportes zu verursachen, was wiederum zur Dystrophie des Neurons, längenabhängigen Störungen der Neurotransmission und fortschreitender distaler Parese führt. Diese Effekte gleichen denen, die bei Motoneuron-assoziierten Krankheiten des Menschen beschrieben wurden (Hurd and Saxton, 1996) .

Bei Drosophila-Larven führen diese Mutationen in den schweren Ketten des Kinesins zu einem charakteristischen „tail-flipping“-Phänotyp. Hierbei führt ein früher Verlust der Motoneuronenaktivität in ventral-posterioren Segmenten zu einem Ungleichgewicht der Kontraktionen des Körpers, wodurch die Larve bei

Bewegung rhythmisch den Schwanz nach oben bewegt (Hurd and Saxton, 1996).

Mutationen der leichten Ketten des Kinesins führen zu einem ähnlichen Phänotyp, was darauf hindeutet, dass sowohl die leichten als auch die schweren Ketten für die Funktion des Kinesins notwendig sind und dass die leichten Ketten eher eine unterstützende Funktion, wie das Binden von Fracht haben, als die Aufgabe ein negativer Regulator der Kinesinaktivität zu sein (Gindhart et al., 1998).

### **1.2.5 Axonaler Transport von Mitochondrien**

Für die Entwicklung von Axonen ist der Transport von Organellen vom Ort der Biosynthese, dem Soma, zum Wirkort überlebenswichtig. Mitochondrien, die „Kraftwerke der Zelle“, produzieren ATP, puffern zytosolisches Calcium ab und geben Apoptosefaktoren ab. Sie sind unverzichtbar für das Funktionieren aller aeroben Zellen, besonders der Neuronen mit ihrem hohen Stoffwechselbedarf. Sie werden innerhalb von Zellen immer zur Stelle mit dem höchsten Energiebedarf transportiert und sind daher sehr gut geeignet, den Effekt eines gestörten axonalen Transports bei neurodegenerativen Erkrankungen zu studieren (Hollenbeck and Saxton, 2005).

Da Mitochondrien entlang der Mikrotubuli mit Hilfe von Kinesinen anterograd und Dynein retrograd transportiert werden, können sie hier als Modell für den axonalen Transport dienen. So zeigen *Drosophila*-Mutanten, bei denen Kinesin-1 spezifisch blockiert wird, einen gestörten Transport von Mitochondrien in den Motoaxonen (Hollenbeck and Saxton, 2005).

Mitochondrien bewegen sich mit Hilfe des schnellen axonalen Transports mit einer Geschwindigkeit von 0,1-2  $\mu\text{m/s}$  fort oder docken an Aktinfilamenten, Neurofilamenten und Mikrotubuli an (Chada and Hollenbeck, 2004; Hollenbeck and Saxton, 2005; Miller and Sheetz, 2004; Wagner et al., 2003).

Die angedockten Mitochondrien im distalen Bereich des Axons werden zusammen mit dem Cytoskelett langsam anterograd transportiert (Miller and Sheetz, 2006).

Mitochondrien können im Axon sowohl anterograd als auch retrograd transportiert werden und sind auch in der Lage sind, die Transportrichtung zu wechseln (Pilling et al., 2006).

Es gibt mehrere Adaptorproteine, die am Transport von Mitochondrien beteiligt sind, so ist Syntabulin nicht nur ein Adaptor für den Transport von Syntaxin-Vesikeln, die es an Khc bzw. KIF5B bindet, sondern auch am anterograden mitochondrialen Transport beteiligt (Cai et al., 2005). Auch das Adaptorprotein Milton ist am Transport von Mitochondrien in *Drosophila* beteiligt. Es bildet mit Miro, einer mitochondrialen Rho-ähnlichen GTPase einen Proteinkomplex, der wiederum Khc bindet und so den anterograden Transport ermöglichen und regulieren kann. Dieser Transport ist unabhängig von den leichten Ketten des Kinesin1-Tetramers, die aber die Bindung an Milton verhindern können (Glater et al., 2006).

Es ist unwahrscheinlich, dass Milton und Syntabulin den Transport von Mitochondrien auf die gleiche Art und Weise regulieren: Während Syntabulin direkt an die Cargo-bindende Domäne von KIF5B bindet, bindet Milton indirekt über eine Interaktion mit dem mitochondrialen Protein Miro (Cai and Sheng, 2009).

### **1.3 Synapsen**

Synapsen dienen der Erregungsübertragung von Nerven- oder Sinneszellen auf nachgeschaltete Zellen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen elektrischen und chemischen Synapsen.

Elektrische Synapsen (Nexus, gap junctions) sind aus Tunnelproteinen aufgebaut, durch die Ionen direkt von einer Zelle zur anderen diffundieren können, was zu einer sehr schnellen Erregungsübertragung führt. Man findet so eine elektrische Kopplung beispielsweise an Herzmuskelzellen, wo sie zur synchronen Kontraktion der Muskelzellen führt.

Chemische Synapsen sind in der Regel asymmetrisch gebaut, d.h. die prä- und postsynaptische Membran weisen unterschiedliche Eigenschaften auf, wodurch die Reizübertragung stets in eine Richtung, also unidirektional erfolgt. Sie befinden sich im zentralen und peripheren Nervensystem. Die Impulse werden

vom terminalen Axon der präsynaptischen Zelle auf die postsynaptische Zelle übertragen. Zwischen diesen Zellen befindet sich der ca. 20 nm große synaptische Spalt. Die präsynaptische Membran besteht aus einer Erweiterung eines hier endenden Axons, dem synaptischen Endknöpfchen (terminal bouton). Häufig spalten sich Axone auch kurz vor ihrem Ende in mehrere solcher Fortsätze auf, in denen sich Vesikel befinden, die einen Neurotransmitter z.B. Acetylcholin, Glutamat oder Serotonin enthalten. Die postsynaptische Zelle kann ein Dendrit, der Zellkörper eines anderen Neurons, eine Muskel- oder Drüsenzelle oder sogar ein anderes Axon sein. Die Erregung wird weitergegeben, indem Neurotransmitter von der präsynaptischen Zelle abgegeben werden, durch den synaptischen Spalt diffundieren und an postsynaptische Rezeptoren binden. Diese Form der Erregungsübertragung dauert ca. 0,5 ms. Auch die postsynaptische Zelle ist in der Lage Signale zur präsynaptischen Zelle zu senden. Als retrograde Signale dienen beispielsweise Gase wie NO und CO oder Peptidhormone. Dadurch wird die Fähigkeit der präsynaptischen Zelle zur Kommunikation beeinflusst, wovon man annimmt, dass es wichtig für viele Formen des Lernens ist (Lodish et al., 2000).

#### **1.4 *Drosophila* als Modellorganismus**

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist seit T.H. Morgan ein beliebtes Versuchstier (Rubin and Lewis, 2000). Sie ist klein und stellt geringe Ansprüche an ihr Futter, ist also im Labor leicht zu halten. Anatomie und Entwicklung sind gut erforscht und das Genom ist vollständig sequenziert (Adams et al., 2000). Durch die geringe Generationszeit von ca. 10 Tagen und die vielen Nachkommen, kann sie schnell in großen Mengen gezüchtet werden. Außerdem ist es oft möglich durch die Wahl geeigneter Marker wie z.B. Augenfarbe oder gebogene Flügel vom Phänotyp direkt auf den Genotyp zu schließen. Auch wenn die Fruchtfliege auf den ersten Blick wenig Gemeinsamkeiten mit dem Menschen zu haben scheint, so sind doch grundlegende Aspekte der Zellbiologie wie die Regulation der Genexpression, Transportvorgänge, Synaptogenese, Signalwege und Zelltod ähnlich. Deswegen wurden viele Gene und Signalwege, die ursprünglich bei der

Fruchtfliege untersucht worden waren, später auch in Säugetieren gefunden. So gewann beispielsweise Prof. Dr. Nüsslein-Vollhard grundlegende Erkenntnisse zur genetischen Steuerung der Embryogenese anhand von *Drosophila melanogaster*. In der Fliege wurde systematisch nach Mutanten gesucht und anhand ihres „loss-of-function“-Phänotyps, einzelne für die Embryogenese essentielle Gene identifiziert (Nusslein-Volhard, 1994). Dies war nur möglich, da wichtige Kontrollgene, oder zumindest deren wichtigsten Sequenzen, im Verlauf der Evolution erhalten blieben und die Ergebnisse so übertragbar sind.

Natürlich sollte bei der Interpretation von Fliegenmodellen aber nie vergessen werden, dass es auch wichtige Unterschiede zwischen Mensch und Fliege gibt. So sind z.B. das Herz-Kreislaufsystem und kognitive Prozesse bei der Fliege längst nicht so komplex wie beim Menschen. Dies kann jedoch auch von Vorteil sein: Während es beim Menschen im Laufe der Evolution zu Redundanz von Genen kam und mehrere Versionen von Genen vorliegen, ist bei der Fliege oft nur eine Kopie des Gens vorhanden, was die Analyse stark vereinfacht. Nach den großen Erfolgen bei der Entschlüsselung von Prozessen wie der Kontrolle des Zellzyklus und der Signaltransduktion ist es realistisch anzunehmen, dass ein ähnlicher Ansatz bei neurodegenerativen Erkrankungen zu wichtigen Erkenntnissen führen wird (Bernards and Hariharan, 2001; Driscoll and Gerstbrein, 2003; Sang and Jackson, 2005; Yoshihara et al., 2001). Eine Online-Datenbank (<http://superfly.ucsd.edu/homophila/>) ermöglicht die Suche nach *Drosophila*-Genen, welche homolog zu Genen sind, die für menschliche Erbkrankheiten verantwortlich sind. So wurden bei einer systematischen Analyse von 929 Genen, die an menschlichen Erbkrankheiten beteiligt sind, für dreiviertel davon eine eindeutig Verwandtschaft zu *Drosophila*-Genen entdeckt (Reiter et al., 2001).

#### **1.4.1 Synaptogenese in *Drosophila***

Die glutamatergen Synapsen sich entwickelnder neuromuskulärer Junctions (NMJs) in *Drosophila*-Larven sind leicht zugänglich, morphologisch einfach und physiologisch gut beschrieben (Schuster, 2006). Die Bauchdecke von

*Drosophila* Embryonen und Larven besteht aus 30 segmentweise wiederholten, bilateral symmetrischen Muskelfasern, wobei jede Faser das bevorzugte Ziel eines oder mehr Motoneuronen darstellt (Keshishian et al., 1996). Die Anordnung der Synapsen in den sich entwickelnden NMJs beginnt ca. 13 Stunden nach der Eiablage, wenn der Wachstumskegel des Motoneurons sogenannte „Myopodien“ berührt, spezialisierte Zellausstülpungen, die aus der Muskelfaser herausragen (Ritzenthaler and Chiba, 2001). Zu dieser Zeit sind Glutamatrezeptoren, deren Untereinheiten zu AMPA/Kainat-Säugetier-Glutamatrezeptoren homolog sind, gleichmäßig auf der Oberfläche der embryonalen Muskelfaser verteilt und beginnen sich, als Antwort auf Glutamat-Freisetzung von unreifen präsynaptischen Endigungen, in postsynaptischen Gebieten zusammenzuballen. Etwa eine Stunde nach dem ersten Kontakt zwischen Wachstumskegel und Myopodien können synaptische Ströme nachgewiesen werden und nur zwei Stunden später können koordinierte peristaltische Muskelkontraktionen beobachtet werden. Während dieser Zeit der funktionellen Reifung (16-18 Stunden nach der Eiablage) erscheinen synaptische Boutons mit den typischen aktiven Zonen (elektronendichte Gebiete), präsynaptischen T-bars und Vesikeln. Diese nun voll funktionsfähige embryonale NMJ hat nur wenige Verzweigungen und synaptische Endknöpfchen, aber am Ende der larvalen Entwicklung (4 Tage nach dem Schlüpfen aus der embryonalen Eierschale) ist die Muskelfaser um das 10-fache in der Länge und das 100-fache im Oberflächengebiet gewachsen und benötigt zusätzlichen synaptischen Input um eine angemessene Muskeldepolarisierung zu erreichen. Vermutlich besitzen NMJs von Larven im dritten Larvenstadium deshalb über 100 Boutons mit je bis zu 40 glutamatergen Synapsen mit einem komplexen subsynaptischen Netzwerk von Membranen, welches das subsynaptische Retikulum bildet. Die Koordination der synaptischen Partner ist kein triviales Problem, besonders in Hinblick auf das schnelle allgemeine Wachstum des Tieres und der andauernden Notwendigkeit die Anzahl der präsynaptischen Boutons und Transmitterabgabestellen mit der Ansprechempfindlichkeit des Muskels auf den Transmitter abzustimmen (Schuster, 2006).

## 1.5 Drosophila-Genetik

### 1.5.1 Grundlagen

*Drosophila melanogaster* hat vier verschiedene Chromosomen: ein Gonosomenpaar und drei Autosomen. Da das vierte Chromosom sehr klein ist und nur wenige Gene enthält wird es bei Kreuzungen meist nicht berücksichtigt. Wichtig bei jeder Kreuzung sind sogenannte Balancer-Chromosomen, die durch Umlagerungen von Chromosomenabschnitten eine Vielzahl von Inversionen besitzen und bei denen eine Rekombination mit homologen Chromosomen weitestgehend ausgeschlossen ist. Sollte dennoch ein cross-over stattfinden, so führt dies normalerweise zu fehlerhaften Chromosomen, in denen große Teile doppelt vorhanden oder deletiert sind, wodurch sie schon in der Keimbahn aussortiert werden. Um diese Balancer phänotypisch sichtbar zu machen tragen sie zusätzlich Allele, welche die äußeren Körpermerkmale betreffen. So steht z.B. „Curly“ für gebogene Flügel. Balancer können in der Regel nicht homozygot auftreten, da sie rezessiv letal sind, was man wiederum bei Kreuzungen nutzen kann, um die Anzahl der möglichen Nachkommen zu reduzieren. Es gibt Balancer für die Chromosomen X, 2 und 3 und auch Doppelbalancer, die die Rekombination zweier Chromosomen verhindern, wie z.B. *CyOTb* für die Chromosomen 2 und 3.

### 1.5.2 Das UAS-Gal4-System

Das UAS-Gal4-System (UAS = Upstream Activating Sequences) besteht aus zwei transgenen Fliegenlinien: der Gal4-Treiber-Linie und der UAS-Linie. Die Gal4-Treiber-Linie exprimiert unter Kontrolle eines spezifischen Promotors den Transkriptionsfaktor Gal4, ein 881 Aminosäuren langes Protein, das in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als durch Galaktose induzierbarer Genregulator entdeckt wurde. Dieser Transkriptionsfaktor ist normalerweise in *Drosophila melanogaster* nicht aktiv. Werden die beiden Linien gekreuzt, so bindet er aber in den Nachkommen an die UAS-Sequenz und induziert so – ähnlich wie ein Enhancer in Eukaryonten - die Expression bestimmter Gene oder RNAi-Konstrukte (Blanke, 2004; Joseph B. Duffy, 2002).

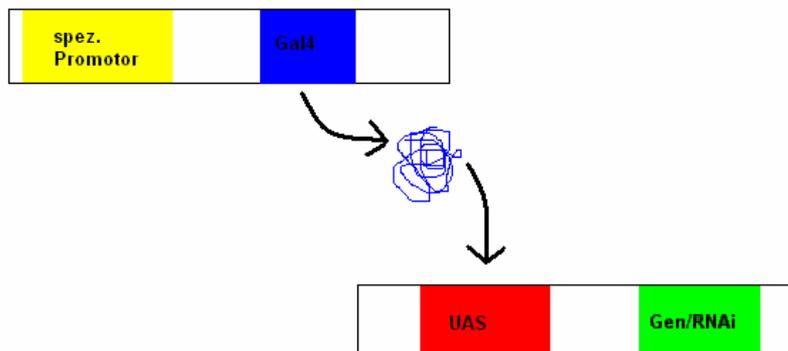


Abbildung 2: Das UAS-Gal4-System

### 1.5.3 Gal4-Treiber im Motoneuron

Eine große Stärke des UAS-Gal4-Systems sind sicherlich die vielen verschiedenen Gal4-Treiber, die heutzutage bei *Drosophila* bekannt und von denen viele in Stockzentren erhältlich sind (Joseph B. Duffy, 2002). So wird beispielsweise *elav-Gal4* in allen Neuronen und *GMR-Gal4* nur in Photorezeptorzellen exprimiert. Es gibt auch Gal4-Treiber, welche nur im Motoneuronen exprimiert werden und deshalb für diese Arbeit besonders interessant sind. Dies sind z.B. *D42*, *Rap7* und *Ok6*.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Aufklärung pathophysiologischer Prozesse, die der SPG10 zugrunde liegen, mit Hilfe eines *Drosophila* Modells. Das *khc-Gen* der Fruchtfliege ist das Homologon zum *KIF5A-Gen*, das bei Menschen die SPG10 verursacht. Es standen sowohl käufliche *khc*-Mutanten zur Verfügung als auch eigens für dieses Projekt generierte transgene Fliegen, die homologe Mutationen zu Patienten mit einer SPG10 tragen.

Zunächst sollte ein in der *AG Rasse* entwickeltes Bewegungsanalyseprogramm auf seine Eignung für Verhaltensexperimente mit Larven von *khc*-Mutanten getestet werden. Dann sollte überprüft werden, ob *KIF5A*-Mutationen, die beim Menschen mit 100%-iger Penetranz eine SPG10 hervorrufen, auch im *Drosophila* Modell einen Motoneuron-Phänotyp hervorrufen. Ferner sollte

untersucht werden, ob diesem ein dominant negativer Effekt oder ein Gendosisverlust zugrunde liegt.

Eine pathophysiologische Hypothese, die die weitgehend selektive Motoneuronschädigung bei der HSP erklären könnte, ist die Schädigung des axonalen Transports. Da Motoneurone die längsten Axone besitzen, sind sie in besonderer Weise auf einen intakten axonalen Transport angewiesen. Es sollte daher an lebenden Larven mittels *in vivo imaging* der axonale Transport quantitativ analysiert werden.

Da die extrem langen Motoneuronaxone eine besondere Herausforderung an den Energiestoffwechsel stellen, sollte insbesondere untersucht werden, ob sich die Zahl der Mitochondrien in den Axonen von Wildtypfliegen und Mutanten unterscheidet.

Die HSP kann, wie aus Autopsien von HSP-Patienten aber auch aus Tiermodellen der HSP bekannt ist, zu axonalen Schwellungen führen. Das Auftreten von Axonschwellungen in *khc*-Mutanten und ihre Zusammenhang mit axonalen Transportstörungen war daher eine weitere Frage.

Da letztendlich eine funktionstüchtige Synapse die einzig relevante Funktion eines Motoneurons darstellt, sollte ferner der Einfluß der *khc*-Mutationen auf die Synapsenbildung untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die Standard-Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich AG (Steinheim), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe) und AppliChem (Darmstadt) bezogen.

Lösungen: Alle Medien und Puffer wurden nach den Standard-Protokollen hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989; Mülhardt, 2000).

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

NGS	Natural Goat Serum; Stock Hertie, bei -20°C lagern
PBS	Phosphate Buffered Saline, 1 Tablette PBS (Invitrogen) auf 500 ml H <sub>2</sub> O, bei RT lagern
PBT	1 Tablette PBS auf 500 ml H <sub>2</sub> O 0,3% Triton X – 100, bei RT lagern
PFA	Paraformaldehyd 4%ig, gelöst in PBS, bei 4°C lagern
Ca <sup>2+</sup> -freies HL3	70 mM NaCl, 5 mM KCL, 20mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM NaHCO <sub>3</sub> , 5mM Trehalose, 115 mM Sucrose, 5 mM HEPES, pH auf 7,2 eingestellt

#### 2.1.2 Antikörper

**Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper**

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller
Rabbit-α-GFP IgG 2 mg/ml	A11122	Invitrogen (Karlsruhe)
Goat-α-rb-Alexa488 F(ab) <sub>2</sub> -Fragment 2 mg/ml	A11070	Invitrogen (Karlsruhe)
Goat-α -HRP-Cy3 1,5 mg/ml	123-165-021	Jackson Immunoresearch (West Grove, USA)

#### 2.1.3 Technische Geräte

**Tabelle 4: Technische Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	KB 720	Binder GmbH, Tuttlingen
	Vinothek	Liebherr, Ochsenhausen
Confocal Laser Scanning	LSM 510	Zeiss, Göttingen

Microscope		
Federschere	15005-08	Fine Science Tools, Dumont, Switzerland
Fluoreszenzlampe	ebq 100 isolated	Leistungselektronik Jena
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2	Zeiss, Göttingen
Fluoreszenz Stereomikroskop	MZ16FA	Leica Microsystems AG, Heerbrugg
Kaltlichtquelle	KL1500LCD	Schott AG, Mainz
Kamera für Fluoreszenzmikroskop	Axio Cam Color	Zeiss, Göttingen
Kamera für Lichtmikroskop	AxioCam HRc	Zeiss, Göttingen
Kamera für konfokales Mikroskop	HAL 100	Zeiss, Göttingen
Kühlgerät	Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
	GTS 3012	Liebherr, Ochsenhausen
Lichtmikroskop	Axioplan 2	Zeiss, Göttingen
	Stemi 2000	Zeiss, Göttingen
Lichtschlauch	PenLight® 230 Volt 10m	Pen-Light, Pforzheim
Pipette	Reference 0,5-10 µl	Eppendorf, Deutschland
	Reference 10-100 µl	
	Reference 100-1000 µl	
Pipettenkarussell	Pipettenkarussell für 6 Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Präparationspinzette	3c inox	Fine Science Tools, Dumont, Switzerland
Test Tube Rotator	Modell 28	Mikro-Bio-Tec Brand, Gießen
Timer	2 Channel Jumbo Display Clock Timer TR118	Oregon Scientific
Webcam	Conceptronic	Soorts, Frankreich

	Lounge'n'LOOK	
Schüttler	Polymax 120	Heidolph, Schwabach
Stereomikroskop	Stemi 2000	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Zentrifuge	5417 R	Eppendorf, Deutschland

## 2.1.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Eppendorfcup	Reaktionsgefäß	Eppendorf, Deutschland
Filtrierpapiere	Ø 55 mm	Macherey-Nagel GmbH, Deutschland
	Ø 90 mm	
Fliegenfutter	6,4 x 2,6 cm	MPI für Entwicklungsbiologie
	10 x 5,3 cm	
Hefe	Trockenhefe	RUF Lebensmittelwerk KG, Quakenbrück
	Frische Hefe	Hefewerk Nürnberg
Deckgläser	24 x 60 mm	R. Langenbrinck, Teningen
Objektträger	SuperFrost® Plus 25x75x1 mm	R. Langenbrinck, Teningen
Parafilm	PM-996	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Petrischalen	100x20mm Style	Greiner Bio One
Pipettenspitzen	Tip-One Standard 0,5-10 µl	Starlab GmbH, Ahrensburg
	Tip-One Standard 1-200 µl	
	Tip-One Standard 101-1000 µl	
Sterilfilter für Spritzen	Millipore 0,2 µm	Carl Roth, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium		Vector Laboratories, Burlingame, USA
Voltalef Öl	H10A	Lehmann & Voss, Hamburg

## 2.1.5 Software

Carl Zeiss AxioVision Release 4.5. (Jena)

Carl Zeiss LSM 510 Version 3.2 SP2 (Jena)

ImageJ, NIH (Rockville Pike, USA); <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>

Microsoft Excel

Statistiksoftware R, <http://www.r-project.org/>

TrackAnalyzer, Junior Research Group Neuroplasticity, Hertie Institut Tübingen

## 2.1.6 Fliegenstämme

Tabelle 6: Verwendete Fliegenstämme

HIH #	Bloomington #	Genotyp	Referenz
7	-	w <sup>-</sup> ; +/+; D42-Gal4/Tm3	(Miller et al., 2005)
51	-	w <sup>-</sup> /y; Sp/CyO-GFP; MKRS/TM2	(Horn et al., 2000)
80	-	w <sup>-</sup> /y; GIBc;+/CyOTb	S. Sigrist, Göttingen
201	8443	w <sup>1118</sup> ; P{UAS-mitoGFP.AP}3	(Pilling et al., 2006)
246	3605	w <sup>1118</sup> ; +/+; +/+	(Kurkulos et al., 1991)
412	11084	y <sup>1</sup> w <sup>67c23</sup> ; P{lacW}Khc <sup>k13314</sup> /CyO	(Spradling et al., 1999a)
416	1607	b <sup>1</sup> pr <sup>1</sup> ; Khc <sup>8</sup> /CyO	(Saxton et al., 1991b)
467	-	b <sup>1</sup> pr <sup>1</sup> ; Khc <sup>8</sup> /CyO-GFP; MKRS/+	diese Arbeit
468	-	y <sup>1</sup> w <sup>67c23</sup> ; P{lacW}Khc <sup>k13314</sup> /CyO-GFP; MKRS/+	diese Arbeit
469	-	D42-Gal4, P{UAS-mitoGFP.AP-3/MKRS	diese Arbeit
536	-	D42-Gal4, P{UAS-mitoGFP.AP}3/ D42-Gal4, P{UAS-mitoGFP.AP}3	diese Arbeit
555	-	Khc <sup>8</sup> /CyO-GFP; D42-Gal4, P{UAS-mitoGFP.AP}3/ D42-Gal4, P{UAS-mitoGFP.AP}3	diese Arbeit
556	-	Khc <sup>8</sup> /CyO-GFP; D42-Gal4, P{UAS-mitoGFP.AP}3/MKRS	diese Arbeit

### 2.1.7 Khc-Mutanten

Die Khc-Mutanten Khc<sup>8</sup> und Khc<sup>13314</sup> wurden beim Bloomington Drosophila Stock Center, Indiana University (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) bestellt und in verschiedenen Kreuzungsschritten (siehe 1.2.1) die für die Versuche notwendigen Tiere erzeugt. Khc<sup>8</sup> enthält eine durch Ethylmethansulfonat induzierte Punktmutation die zu einem Basenaustausch (C948T) und einer Stoppstelle (R210STOP) im *khc*-Gen führt (Brendza, 2000; Brendza et al., 1999; Saxton et al., 1991a). Khc<sup>13314</sup> enthält eine über das Transposon *P{lacW}Khc<sup>k13314</sup>* eingebrachte Mutation und ist im Berkeley Drosophila Gene Disruption Project entstanden (Spradling et al., 1999a).

Um die Mutation, welche bei an HSP erkrankten Menschen gefunden wurde, im *Drosophila*-Modell zu untersuchen, wurde die zu der bekannten menschlichen Mutation c.759G>T, p.K253N homologe Mutation ins *khc*-Gen von *Drosophila* einkloniert. Dazu sind zuerst die Konstrukte *pUAST khc<sup>K253N</sup>* und *pUAST khc<sup>K253N</sup>trunc*, sowie die Konstrukte *pUAST khc<sup>wt</sup>* und *pUAST khc<sup>wt</sup>trunc* mit Wildtyp-*khc* in der Abteilung für Neurodegeneration des Hertie-Instituts für Klinische Hirnforschung, Tübingen hergestellt worden. Diese wurden dann von BestGene Inc, USA in *w*-*Drosophila* Embryonen injiziert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kreuzungen

Die Fliegen wurden in Brutschränken von 18°C und 25°C gehalten. Sie befanden sich in kleinen (6,4 x 2,6 cm) und großen (10 x 5,3 cm) Plastikröhrchen, die mit einer Standardfuttermischung und etwas Hefe gefüllt und mit Wattestopfen aus Baumwolle verschlossen waren. Kreuzungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

Da sich weibliche Fruchtfliegen mit mehreren Männchen paaren und die Spermien speichern können, ist es wichtig bei Kreuzungen Jungfrauen zu verwenden, um die gewünschten Nachkommen zu erhalten. Frisch geschlüpfte Weibchen sind bei 25°C nach 6 Stunden, bei 21-22°C nach 12 Stunden und bei 18°C nach 18 Stunden geschlechtsreif (Socolich, 2003).

Es wurden jeweils mehrere Jungfrauen bei 25°C mit einem Männchen gekreuzt und die Nachkommen nach bestimmten Merkmalen sortiert (siehe Tabelle 7). Außerdem wurden die beiden Mutationen  $P\{UAS-mitoGFP.AP\}3$  und  $D42-Gal4$  rekombiniert und so ein Chromosom erzeugt, welches beide Mutationen enthält. Hierbei ist es wichtig zu wissen, dass Rekombination von Chromosomen bei *Drosophila* hauptsächlich in der weiblichen Keimbahn stattfindet.

**Tabelle 7: Verwendete Marker und Balancer**

Marker	Phänotyp	Referenz
CyO = Curly of Oster	gebogene Flügel	(Lindsley and Zimm, 1992)
CyO-GFP	Larve leuchtet unter Fluoreszenzmikroskop grün und adulte Fliege hat gebogene Flügel	(Horn et al., 2000)
MKRS = Stubble	kurze Borsten	(Lindsley and Zimm, 1992)
Tb = Tubby	kurzer, dicker Körper	(Craymer, 1980)
GIBc	schlitzförmige Augen	S. Sigrist, Göttingen
D42-Gal4, UAS-mito-GFP	Mitochondrien in Hirn und Motoaxonen leuchten unter Fluoreszenzmikroskop grün	(Barkus et al., 2007)
w <sup>-</sup> = white	weiße Augen	

Kreuzungsschemata

♀	<u>Sp</u> ; CyO-GFP	<u>MKRS</u> TM2	x	<u>Khc<sup>8</sup></u> ; <u>±</u> CyO +	♂
			↓	<u>Khc<sup>8</sup></u> ; CyO-GFP	<u>MKRS</u> +
					→ <i>HIH-Stock 467</i>

♀	<u>Khc<sup>8</sup></u> ; CyO-GFP	<u>MKRS</u> +	x	<u>Khc<sup>8</sup></u> ; CyO-GFP	<u>MKRS</u> ♂ +
			↓	<u>Khc<sup>8</sup></u> ; CyO-GFP	<u>±</u> +

♀	<u>Sp</u> ; CyO-GFP	<u>MKRS</u> TM2	x	<u>Khc<sup>13314</sup></u> ; CyO	<u>±</u> +	♂
			↓	<u>Khc<sup>13314</sup></u> ; CyO-GFP	<u>MKRS</u> +	
					→ <i>HIH-Stock 468</i>	

♀	<u>Khc<sup>8</sup></u> ;	<u>±</u>	x	<u>Khc<sup>13314</sup></u> ;	<u>±</u>	♂
---	--------------------------	----------	---	------------------------------	----------	---

	CyO-GFP +	↓	CyO-GFP +	
		$\frac{Khc^8}{Khc^{13314}}$ ; ±		→ <i>Verhaltensexperimente</i>
		+		

♀	$\frac{Khc^8}{CyO-GFP}$	±	+	X	W <sup>-</sup> ;	±;	±	+	+	♂
				↓						
				$\frac{Khc^8}{+}$						→ <i>Verhaltensexperimente</i>
				+						

♀	±;	+	$\frac{UAS-mito-GFP}{UAS-mito-GFP}$	X	±;	+	$\frac{D42-Gal4}{D42-Gal4}$	♂
				↓				
			$\frac{±}{+}$				$\frac{UAS-mito-GFP}{D42-Gal4}$	

♀	±;	+	$\frac{UAS-mito-GFP}{D42-Gal4}$	X	Sp;	CyO-GFP	$\frac{MKRS}{TM2}$	♂
				↓	Rekombination			
					$\frac{Sp; D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{+ MKRS}$			

♀	±;	+	$\frac{Sp; D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{MKRS}$	X	±;	+	$\frac{Sp; D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{MKRS}$	♂
				↓				
							$\frac{±; D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{+ D42-Gal4, UAS-mito-GFP}$	→ <i>HH-Stock 469</i>

♀	W <sup>-</sup> ;	±;	+	+	X	±;	+	$\frac{D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{D42-Gal4, UAS-mito-GFP}$	♂
					↓				
							$\frac{±; D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{+ +}$	→ <i>in vivo imaging</i>	

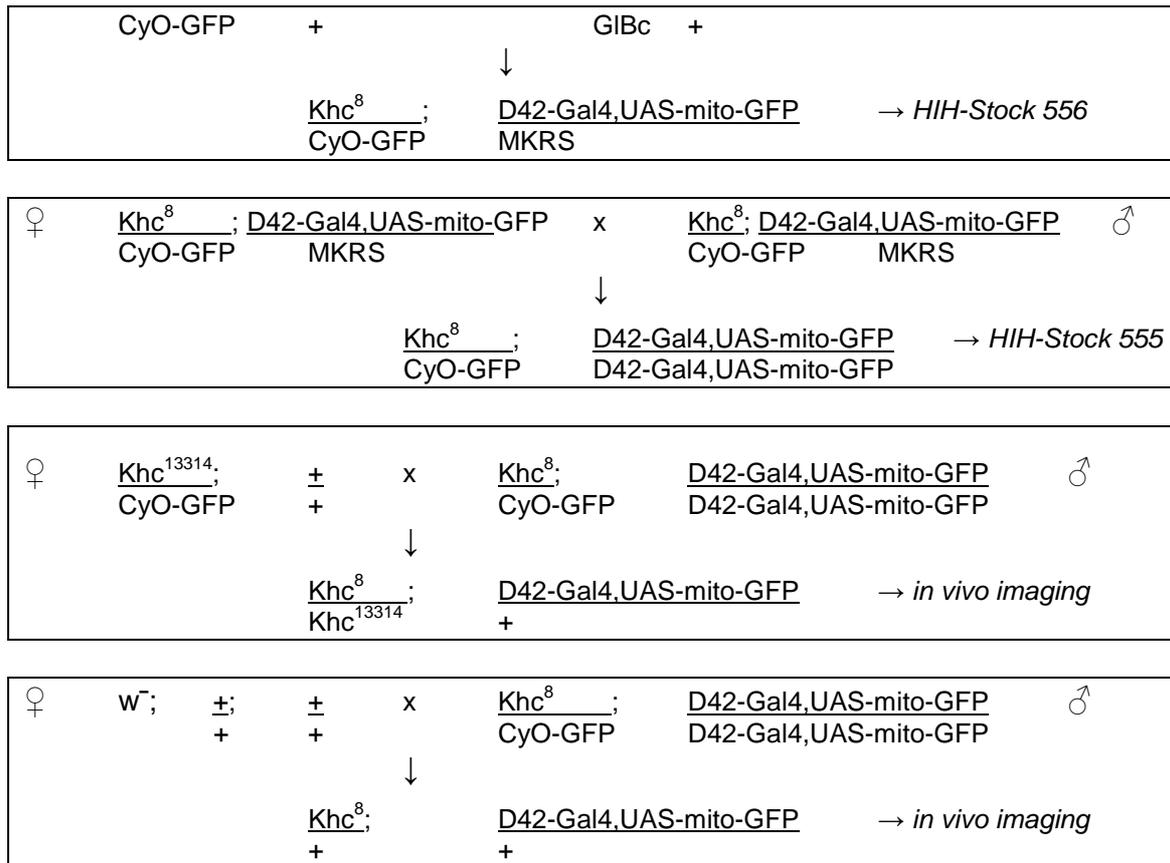
♀	$\frac{Khc^8}{CyO-GFP}$	MKRS;	+	X	±;	+	$\frac{D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{D42-Gal4, UAS-mito-GFP}$	♂
				↓				
					$\frac{Khc^8}{+}$		$\frac{D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{MKRS}$	

♀	$\frac{GIBc; +}{CyOTb}$	X	$\frac{Khc^8; D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{+ MKRS}$	♂
		↓		
			$\frac{Khc^8; GIBc}{+}$	$\frac{D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{+}$

♀	$\frac{Khc^8}{+}$	MKRS	X	$\frac{Khc^8; D42-Gal4, UAS-mito-GFP}{+}$	♂



**Abbildung 3: Kreuzungsschemata**

Sp = speck, TM2 = tropomyosin 2, + = Wildtyp, Marker siehe Tabelle 7.

### 2.2.2 Verhaltensexperimente

Um das Verhalten von Larven, die eine oder zwei Mutationen in der schweren Kette des Kinesins haben, zu untersuchen wurden sie zuerst gewaschen, dann unter einem Fluoreszenzmikroskop nach GFP sortiert, 40 min auf einer Apfelagarplatte stengelassen und anschließend gefilmt und ihre Geschwindigkeit mit der Geschwindigkeit von Kontrolltieren verglichen. Die verwendete Web-Cam befand sich in 16 cm Entfernung zu einer Agar-Platte. Zur Verbesserung des Kontrastes wurde dem verwendeten Agar Aktiv-Kohle beigesezt. Dadurch wurde gewährleistet, dass sich die weißlichen Larven vom schwarzen Hintergrund abheben. Um eine diffuse Beleuchtung der Larven von allen Seiten zu ermöglichen, wurde das Detektionsfeld abgedunkelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms *TrackAnalyzer* aus der AG Rasse, bei der der 10-minütige Film analysiert wird, indem die Position jeder Larve eines Frames mit dem vorherigen Frame verglichen wird. Sich kreuzende

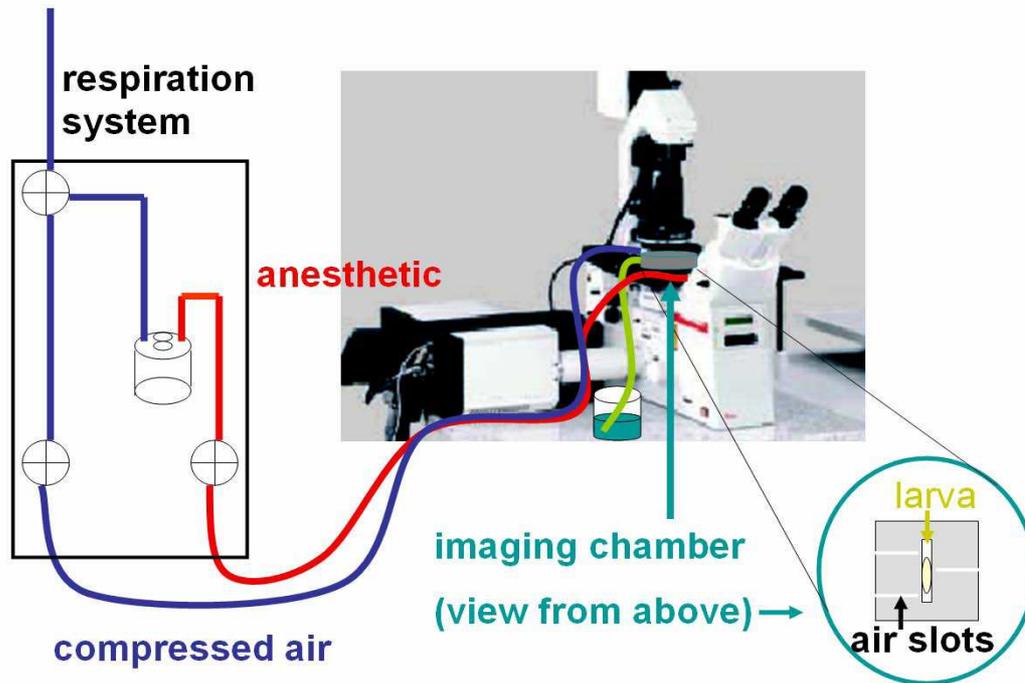
Larven werden herausgefiltert. Somit lässt sich die zurückgelegte Distanz und auf dieser Basis die Geschwindigkeit jeder Larve bestimmen. Dabei wird die Größe der Larve (in Pixel) und die Geschwindigkeit der Larve (in Pixel/s) ausgegeben. Da die Kamera sich immer in demselben Abstand von den Larven befand, konnten unter der Annahme, dass die Larven 3,5 mal so lang wie breit sind, mit Hilfe der Formeln  $Länge\ der\ Larve\ [mm] = (\sqrt[3]{Größe\ der\ Larve\ [pixel] / 3,5}) \times 3,5 \times 0,078$  und  $Geschwindigkeit\ der\ Larve\ [mm/s] = Geschwindigkeit\ [pixel/s] \times 0,078$  aus Pixel in mm umgerechnet werden. Die Larven wurden dann in 3 Gruppen (1-2 mm, 2-3 mm und 3-4 mm) aufgeteilt und diejenigen herausgefiltert, welche weniger als 10% der Durchschnittsgeschwindigkeit ihrer Gruppe erreichten.

### **2.2.3 *In vivo* imaging**

Um einen direkten Einblick in die Störungen des axonalen Transports bei Kinesin-mutanten Larven zu bekommen, wurde das *in vivo* imaging gewählt. Mit dieser Methode können Transportvorgänge im lebenden Organismus beobachtet und quantifiziert werden: So kann beispielsweise die Verteilung von Glutamatrezeptoren an neuromuskulären Junctions von *Drosophila* im Zeitverlauf beobachtet werden (Fuger et al., 2007; Rasse et al., 2005).

*Drosophila*-Larven haben einen durchsichtigen Körper, so dass es möglich ist, mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops Axone und axonalen Transport im lebenden Tier zu beobachten.

Ein grundlegendes Problem beim *in vivo* imaging stellen Bewegungen der Larven dar, da diese zu qualitativ schlechten Bildern führen. Deshalb ist eine ausreichende Anästhesie unverzichtbar. Kontrollexperimente wiesen nach, dass die Narkose keinen Einfluss auf die Entwicklung und Überlebensrate der Larven hat (Rasse, 2004), so dass diese auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die hierfür benötigte Betäubungsanlage, in der die Larve ausreichend tief, aber jederzeit wieder erweckbar betäubt wird, zeigt Abbildung 4.



**Abbildung 4: Betäubungsanlage für *In vivo* Imaging von *Drosophila*-Larven**

Die Larve befindet sich in einem Schlitz eines Plastik-Objektträgers. Der Objektträger wird in eine Bildgebungskammer gegeben, welche an einen Luftkreislauf angeschlossen ist. Es kann fakultativ Sauerstoff oder Betäubungsmittel in die Kammer gepumpt werden. Aus: (Rasse, 2004)

Die saubere Larve wird mit den Tracheen nach oben in eine mit etwas Öl (Votalef 10S) bestrichene Kammer gelegt, dann mit Hilfe eines mit einer Ausparung und Luftschlitzen versehenen Plastik-Objektträgers, eines Deckglases und eines ringförmigen Gewichts „eingesperrt“ und in eine wie in Abbildung 4 gezeigte Betäubungsanlage gebracht. Hier wird sie mit 15% (v/v) Desfluran betäubt und mit einem konfokalen Mikroskop Axone oder Synapsen aufgenommen (Fuger et al., 2007; Zhang et al., 2010). Es wurde ein Carl Zeiss Confocal Laser Scanning Microscope LSM 510, das mit einem Zeiss Scanhead Axiovert 200M versehen war, verwendet. Die *in vivo* Aufnahmen wurde mittels eines Zeiss Objektivs PLAN-Neofluor 63x 1,4 Oil gescannt, wobei der Detector Gain bei den mutanten Tieren auf Grund des schwachen Signals gelegentlich angepaßt werden musste.

Settings:     Frame Size: 512 x 512 Pixel  
                   Pixel Size: 0,15 µm  
                   Pixel Time: 2,56 µs

Als Methode wurde die für Synapsen von Füger et al. beschriebene FRAP = Fluorescence recovery after photobleaching (Füger et al., 2007) gewählt und für die Analyse von Axonen angepasst: Es wurden zwei oder drei parallel verlaufende Motoaxone in der Nähe des Hirns aufgesucht und ein Z-Stapel aufgenommen. Dann wurde ein Ausschnitt in der Mitte des Bildes vergrößert (Scan Zoom 6) und das mittlere Drittel der Axone gebleicht (Laser 488nm, Output 100%). Es wurden Z-Stapel direkt vor dem Bleichen, 0 min, 5 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min danach aufgenommen. Die Bilder wurden als tif-Dateien exportiert und mit *ImageJ* weiterbearbeitet.

#### **2.2.4 Bildbearbeitung**

Verwendetes Programm

*ImageJ*

Voreinstellungen

*Analyze: Set Measurements: Area, Decimal Places: 3*

Importieren der Bildsequenz

*File: Import: Image Sequence*

Entfernen des beim Scannen entstandenen Rauschens

*Process: Noise: Despeckle*

Projizieren eines Z-Stapels mit maximaler Intensität

*Image: Stacks: Z Project: Max Intensity*

Skalierung

*Image: Scale: 2*

Bei Bedarf drehen des Bildes, so dass die Axone horizontal im Bild liegen

*Image: Rotate: Arbitrarily*

Langsamer axonaler Transport

Messung der Intensität im gebleichten Bereich

*Analyse: Measure*

Menge mito-GFP im Axon

Öffnen eines vorbereiteten Bildes

*File: Open*

Ausschneiden einzelner Axone

*Plugin: TransformJ: TJ Crop*

Markierung der mit Mitochondrien bedeckten Fläche

*Image: Adjust: Threshold: Apply*

Messung der mit Mitochondrien bedeckten Fläche

*Analyze: Analyze Particles: Size 5-Infinity, Show: Outlines, Summarize*

### 2.2.5 Analyse der FRAP-Daten

Bei der Analyse der FRAP-Daten ist es wichtig zu beachten, dass es auf Grund einer immobilen Fraktion normalerweise nicht zu einer vollständigen Erholung (Max Recovery = A) des gebleichten Areals kommt (Fuger et al., 2007). In dieser Arbeit wurde eine immobile Fraktion von 20 % und damit eine Max Recovery von 80 % angenommen. Die medium recovery time (m) ist die durchschnittliche recovery time pro Minute und Genotyp. Die Halbwertszeit wurde mit der Formel  $t_{1/2} = 0,5 \cdot A/m$  berechnet. Die recovery time constant ist definitionsgemäß  $\tau = -\ln(0,5) / t_{1/2}$ . Mit der Formel  $f(t) = A \cdot (1 - e^{-t/\tau})$  können die Daten in einem Diagramm dargestellt und der weitere Verlauf abgeschätzt werden (Fuger et al., 2007).

### 2.2.6 Schneller axonaler Transport von Mitochondrien

Um auch den schnellen Transport erfassen zu können, wurde 10 min nach dem Bleichen eine ca. 11-minütige Zeitserie mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Dabei wurden 10 Schichten in der Z-Ebene im Abstand von 1,5  $\mu\text{m}$  gescannt, Frame Size: 256 x 256 Pixel, Pixel Size: 0,3  $\mu\text{m}$ .

Dann wurden einzelne Mitochondrien verfolgt und deren Geschwindigkeit, Pausen in der Bewegung und die Bewegungsrichtung bestimmt.

Importieren der Bildsequenz

*File: Import: Image Sequence*

Entfernen des beim Scannen entstandenen Rauschens

*Process: Noise: Despeckle*

Projizieren eines Z-Stapels mit maximaler Intensität

*Plugins: Grouped Zprojector: Group Size: 10, Projection Type: Max Intensity*

Skalierung

*Image: Scale: 2*

Bei Bedarf drehen des Bildes, so dass die Axone horizontal im Bild liegen

*Image: Transform: Rotate: Arbitrarily*

Analyse einzelner Mitochondrien mit Hilfe eines Plugins

*Plugins: MTrackJ*

Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in *Excel* kopiert und die durchschnittliche und maximale Geschwindigkeit der Mitochondrien sowie der Anteil von Pausen berechnet.

### 2.2.7 Antikörperfärbungen

Es wurden Larven mit den Genotypen  $Khc^8/Khc^{13314};D42-Gal4,UAS-mito-GFP/+$ ,  $Khc^8/+;D42-Gal4,UAS-mito-GFP/+$  und  $+/+;D42-Gal4,UAS-mito-GFP/+$  im frühen dritten Larvenstadium präpariert. Hierzu wurden die Larven zuerst mit Pins immobilisiert, dann dorsal aufgeschnitten, aufgespannt und die inneren Organe entfernt. Hirn und anhängende Axone verblieben in der präparierten Larve, die dann 10 min mit PFA fixiert, mit PBT gewaschen und nach Standardprotokollen (Schuster et al., 1996) gefärbt wurde.



**Abbildung 5: Präparation einer Drosophila-Larve**

Eine Larve (links anterior, rechts posterior) wurde dorsal aufgeschnitten, die Cuticula aufgeklappt und mittels Nadeln befestigt. Die inneren Organe wurden entfernt und das Hirn mit Hirnlappen, Neuropili und efferenten Axonen wurde behalten. Aus: (Beck, 2007)

Als primärer Antikörper wurde mit Rabbit- $\alpha$ -GFP in einer Konzentration von 1:500 in 250 $\mu$ l PBS gefärbt. Als sekundäre Antikörper wurden Goat- $\alpha$ -Rabbit-Alexa488 und HRP-Cy3 (zur Färbung der Motoneuronen) in einer Konzentration von 1:500 in 250  $\mu$ l PBS und zum Blockieren unspezifischer Bindungen NGS 1:20 verwendet. Die gefärbten Larven-Präparate wurden mit Vectashield versiegelt und auf einen Objektträger gebracht, wo noch die Mundwerkzeuge entfernt und das Präparat luftdicht versiegelt wurde.

Die Präparate wurden mit einem konfokalen Mikroskop gescannt, wobei in den Segmenten A2/A3, die Muskeln 6/7 und deren neuromuskuläre Junctions aufgesucht wurden. Es wurde ein Carl Zeiss Confocal Laser Scanning Microscope LSM 510, das mit einem Zeiss Scanhead Axiovert 200M versehen war, verwendet. Die *in vitro* Aufnahmen wurde mittels eines Zeiss Objektivs PLAN-Neofluor 63x 1,4 Oil gescannt.

Settings:     Frame Size: 1024 x 1024 Pixel  
                  Pixel Size: 0,1  $\mu$ m x 0,1  $\mu$ m  
                  Pixel Time: 1,28  $\mu$ s  
                  Laser: 488nm 25% Output 1%, 543nm 1%

Die Bilder wurden als tif-Dateien exportiert und mit *ImageJ* weiterbearbeitet.

In *ImageJ* wurde die Bildsequenz importiert, zuerst *Filters: Gaussian Blur=1* gewählt, ein Z-Stapel mit maximaler Intensität projiziert, das Bild mit *Image: Scale=2* vergrößert und die Kanäle mit *Color: RGB split* getrennt. Das Bild des blauen Kanals wurde verworfen.

Roter Kanal (gesamte Synapsenfläche):  
    *Filters: Gaussian Blur=3*  
    *Threshold*  
    *Invert LUT*  
    *Edit Invert*  
    *Analyse Particles 5-Infinity, Show Outlines*  
Grüner Kanal (angefärbte Mitochondrien):  
    *Threshold*  
    *Invert LUT*  
    *Edit Invert*  
    *Analyse Particles 5-Infinity, Show Outlines*

Die Ergebnisse dieser Analyse wurden in *Excel* kopiert und die Mitochondriencluster manuell ausgezählt. Dann wurde der Anteil der von Mitochondrien bedeckten Fläche an der Gesamtfläche berechnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Verhalten von Larven mit Mutationen in der schweren Kette des Kinesins im Vergleich zu Wildtyp-Larven

Bei der Hereditären Spastischen Spinalparalyse (HSP) kommt es zu einer axonalen Degeneration motorischer und in geringerer Ausprägung auch sensibler Neurone. Die Degeneration der Axone des Tractus corticospinalis führt zum Hauptsymptom dieser Erkrankung, einer spastischen Paraparese der unteren Extremitäten.

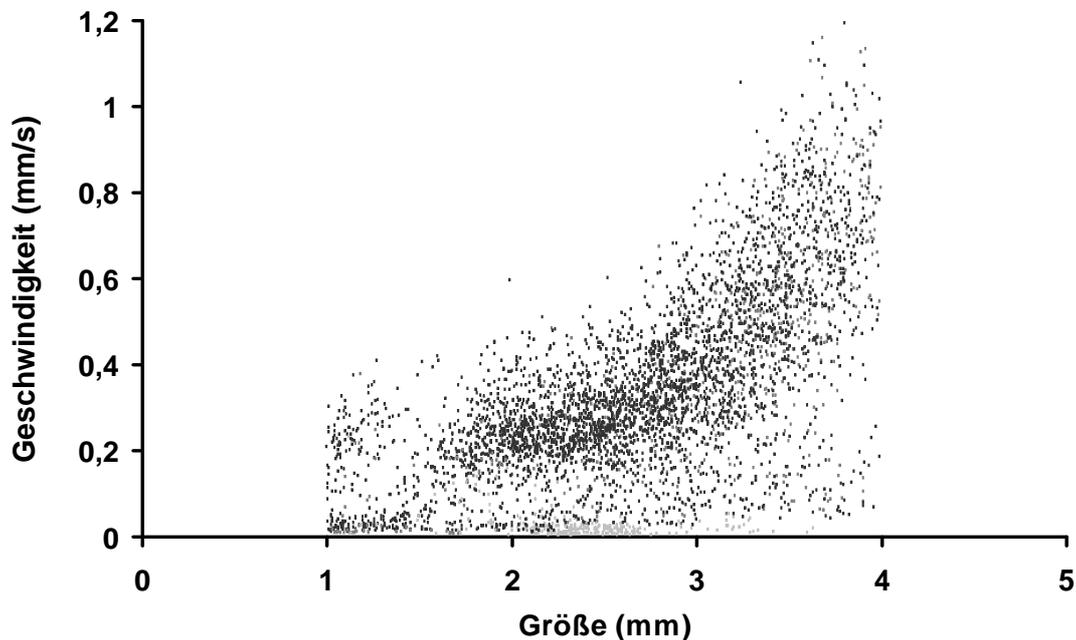
Die in dieser Arbeit untersuchte Form der HSP, SPG10 (=spastic paraplegia gene 10), beruht auf Mutationen im *kif5a*-Gen, welches für eine schwere Kette des Kinesintetramers codiert und große strukturelle Ähnlichkeiten zum *khc* (= kinesin heavy chain) -Gen in *Drosophila melanogaster* aufweist.

Es sollte zuerst das Verhalten von Larven mit Punktmutationen im *khc*-Gen untersucht werden, um festzustellen inwieweit der im Methodenteil beschriebene Verhaltensversuch geeignet ist, das veränderte Kriechverhalten von Larven mit Mutationen in der schweren Kette des Kinesins zu objektivieren. Danach sollten Larven untersucht werden, welche eine *Khc*-Mutation in sich trugen, welche homolog zur Mutation in *kif5a* ist, die bei Menschen mit SPG10 nachgewiesen wurde. Diese Mutation wurde über ein P-Element eingebracht, das in *Drosophila*-Embryonen injiziert wurde. Es wird über eine UAS-Region reguliert, welche erst durch die Kreuzung mit Fliegen der Treiberlinie *elav-Gal4* aktiviert wird, was dann zur Expression des veränderten *khc*-Gens führt. Als Kontrolle wurden Tiere der Treiberlinie *elav-Gal4* gekreuzt mit dem Wildtyp *white*<sup>1118</sup> verwendet.

#### 3.1.1 Verhalten von Larven mit den Mutationen *Khc*<sup>8</sup>, und *Khc*<sup>8</sup>/*Khc*<sup>13314</sup>

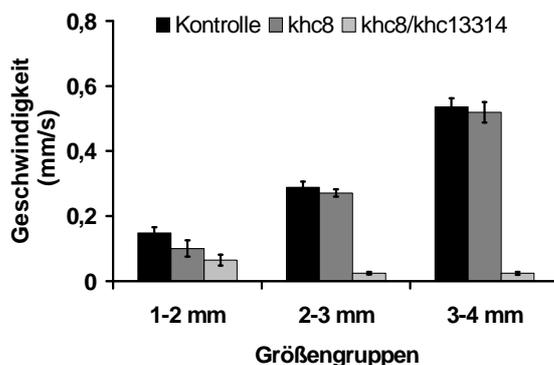
In diesem Versuch sollte untersucht werden, inwieweit sich Mutationen im *khc*-Gen von *Drosophila melanogaster* auf das Kriechverhalten heterozygoter und compound-heterozygoter Mutanten auswirken. Als Kontrolle wurden *white*<sup>1118</sup>-

Tiere (w-;+/+) verwendet. Um Fehlerquellen zu vermeiden wurden 8 Filme pro Genotyp mit verschiedenen Larven aufgenommen und analysiert.



**Abbildung 6: Kriechgeschwindigkeiten von Khc-Mutanten und Kontrolltieren.**

Aufgetragen sind die Geschwindigkeiten der Larven in Millimeter/Sekunde (mm/s) gegen die Größe der Larven (mm). Genotypen: ■ Kontrolllarven (+/+), ■  $khc^8/+$ , ■  $khc^8/khc^{13314}$ . Messungen der Geschwindigkeiten erfolgten in Zeiträumen > 10 s, Larven < 1mm und > 4mm wurden ausgeschlossen.



**Abbildung 7: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Khc-Mutanten und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].**

Genotypen: ■ Kontrolllarven (+/+), ■  $khc^8/+$ , ■  $khc^8/khc^{13314}$ .

Mittelwerte der Kriechgeschwindigkeiten sind in Reihenfolge der Genotypen: Größengruppe 1-2 mm: 0,15; 0,10; 0,06 mm/s, Größengruppe 2-3 mm: 0,29; 0,27; 0,02 mm/s, Größengruppe 3-4 mm: 0,54; 0,52; 0,02 mm/s. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte der Filme.

Für die Analyse wurden die Larven nach ihrer Größe in drei Gruppen (1-2 mm, 2-3 mm und 3-4 mm) eingeteilt. Larven, die kleiner als 1 mm oder größer als 4 mm waren, wurden nicht berücksichtigt. In jeder Größengruppe wurden die

Mittelwerte der 8 Filme mittels eines t-Tests verglichen: In der Gruppe 1-2 mm ist die Doppelmutante  $Khc^8/khc^{13314}$  signifikant langsamer als die Kontrolltiere ( $p < 0,01$ ). In den Gruppen 2-3 mm und 3-4 mm ist die Doppelmutante  $Khc^8/khc^{13314}$  signifikant langsamer als die Einfachmutante  $Khc^8/+$  und die Kontrolltiere ( $p < 0,01$ ). Die Einfachmutante  $Khc^8/+$  ist nicht signifikant langsamer oder schneller als die Kontrolltiere ( $p \geq 0,01$ ).

Dieser Versuch zeigt, dass sich die Doppelmutante  $khc8/khc13314$  signifikant langsamer bewegt als die Einfachmutanten  $khc8/+$  und die Kontrolltiere (+/+). Während die Geschwindigkeit der Kontrolltiere und der heterozygoten Mutanten bei zunehmender Körpergröße steigt, werden die Doppelmutanten langsamer und sterben spätestens im frühen dritten Larvenstadium.

Die hier eindeutig ersichtliche Beeinträchtigung des Kriechverhaltens der Doppelmutante deutet darauf hin, dass dieser Versuch auch für die Untersuchung der KIF5A mutanten Larven geeignet ist.

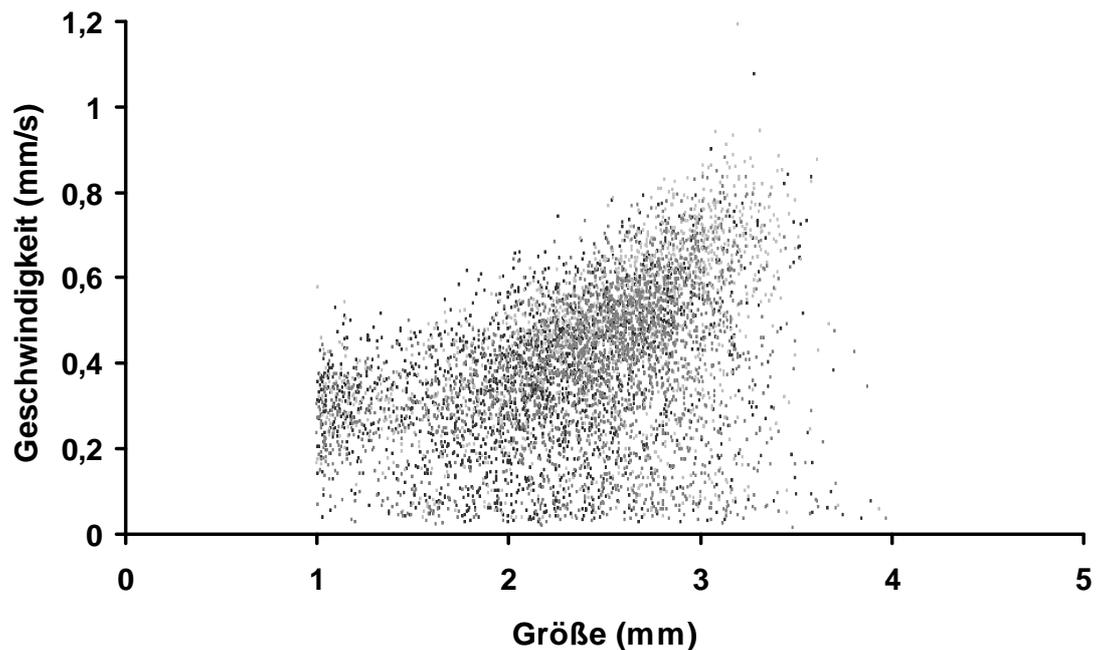
### 3.2 Verhalten von Larven mit der Mutation K253N

Für diesen Versuch waren *Drosophila*-Stämme, mit den über P-Elemente eingebrachten Konstrukten  $pUAST\ Khc^{K253N}$ ,  $pUAST\ Khc^{wt}$ ,  $pUAST\ Khc^{K253N}trunc$  und  $pUAST\ Khc^{wt}trunc$ , etabliert worden. Die trunkierten Konstrukte sind völlig funktionsfähige Motoren, allerdings ohne die Domänen, welche die leichten Ketten und die Fracht binden.

Die Expression der zusätzlichen schweren Kinesinkette wurde mittels einer UAS-Region (siehe 1.4.2) reguliert und durch die Kreuzung mit *elav-Gal4*-Tieren aktiviert. Als Kontrolle wurden Tiere, die eine Kopie des *elav-Gal4*-Treibers in sich trugen, verwendet. Um Fehlerquellen zu vermeiden, wurde dieser Versuch 8 mal mit verschiedenen Larven unter standardisierten Bedingungen wiederholt.

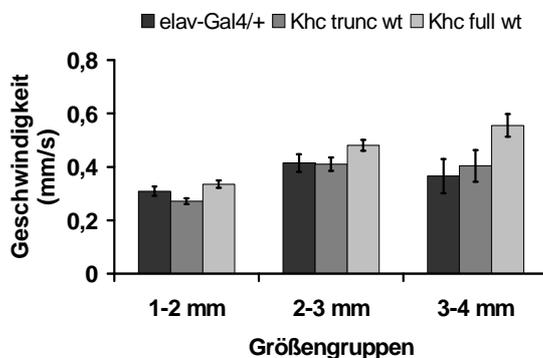
#### 3.2.1 Verhalten von Larven mit $Khc^{wt}$ und $Khc^{wt}trunc$

Hier sollte untersucht werden, ob die Überexpression von (Wildtyp-) KHC in *Drosophila* einen Effekt auf das Kriechverhalten hat und, ob es eine Rolle spielt ob es trunkiert oder vollständig vorliegt. Als Kontrolle wurden Tiere, die nur eine Kopie des inaktiven *elav-Gal4*-Treibers in sich trugen, verwendet.



**Abbildung 8: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem trunkiertem und full length Wildtyp-Kinesin und Kontrolltieren.**

Aufgetragen sind die Geschwindigkeiten der Larven in Millimeter/Sekunde (mm/s) gegen die Größe der Larven (mm). Genotypen: ■ Kontrolllarven (elav-Gal4/+), ■ pUAST  $Khc^{wt}trunc/elav-Gal4$ , ■ pUAST  $Khc^{wt}/elav-Gal4$ . Messungen der Geschwindigkeiten erfolgten in Zeiträumen >10 s, Larven < 1mm und > 4mm wurden ausgeschlossen.



**Abbildung 9: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem trunkiertem und full length Wildtyp-Kinesin und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].**

Genotypen: ■ Kontrolllarven (elav-Gal4/+), ■ pUAST  $Khc^{wt}trunc/elav-Gal4$ , ■ pUAST  $Khc^{wt}/elav-Gal4$ .

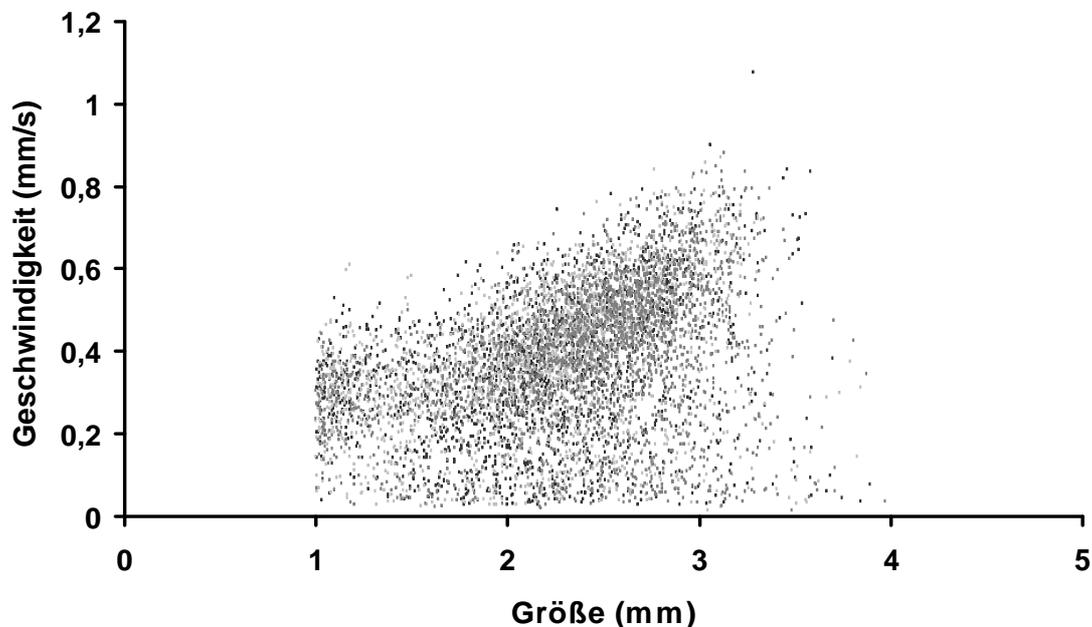
Mittelwerte der Kriechgeschwindigkeiten sind in Reihenfolge der Genotypen: Größengruppe 1-2 mm: 0,31; 0,27; 0,34 mm/s, Größengruppe 2-3 mm: 0,41; 0,41; 0,48 mm/s, Größengruppe 3-4 mm: 0,37; 0,40; 0,55 mm/s. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte der Filme.

In jeder Größengruppe wurden die Mittelwerte der Filme mittels eines t-tests verglichen: Dabei zeigten sich nur in der Gruppe 1-2 mm ein signifikanter Unterschied zwischen  $Khc^{wt}$  und  $Khc^{wt}trunc$  ( $p < 0,01$ ). Ansonsten gab es keine

signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,01$ ) zwischen Kontrolltieren,  $Khc^{wt}$  und  $Khc^{wt}trunc$ . Hier zeigt sich, dass das zusätzliche P-Element keinen messbaren Effekt auf das Kriechverhalten der Larven hat, unabhängig davon ob das Kinesin darin trunziert oder full length vorliegt.

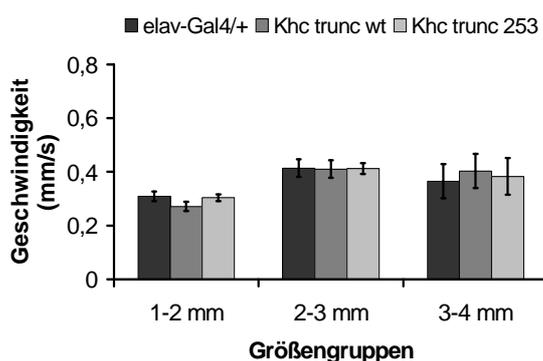
### 3.2.2 Verhalten von Larven mit $Khc^{wt}trunc$ , $Khc^{K253N}trunc$

Hier sollte das Kriechverhalten von Larven verglichen werden, die eine Kopie des trunzierten *Khc*-Gens mit den - zu der bekannten menschlichen Mutation K253N - homologen Mutationen von *Drosophila* oder des unmutierten trunzierten Gens exprimierten. Als Kontrolle wurden Tiere, die nur eine Kopie des inaktiven *elav-Gal4*-Treibers in sich trugen, verwendet.



**Abbildung 10: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem trunziertem Wildtyp- und mutantern Kinesin und Kontrolltieren.**

Aufgetragen sind die Geschwindigkeiten der Larven in Millimeter/Sekunde (mm/s) gegen die Größe der Larven (mm). Genotypen: ■ Kontrolllarven (*elav-Gal4/+*), ■ pUAST  $Khc^{wt}trunc/elav-Gal4$ , ■ pUAST  $Khc^{K253N}trunc/elav-Gal4$ . Messungen der Geschwindigkeiten erfolgten in Zeiträumen  $>10$  s, Larven  $< 1$ mm und  $> 4$ mm wurden ausgeschlossen.



**Abbildung 11: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem trunkiertem Wildtyp- und mutantern Kinesin und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].**

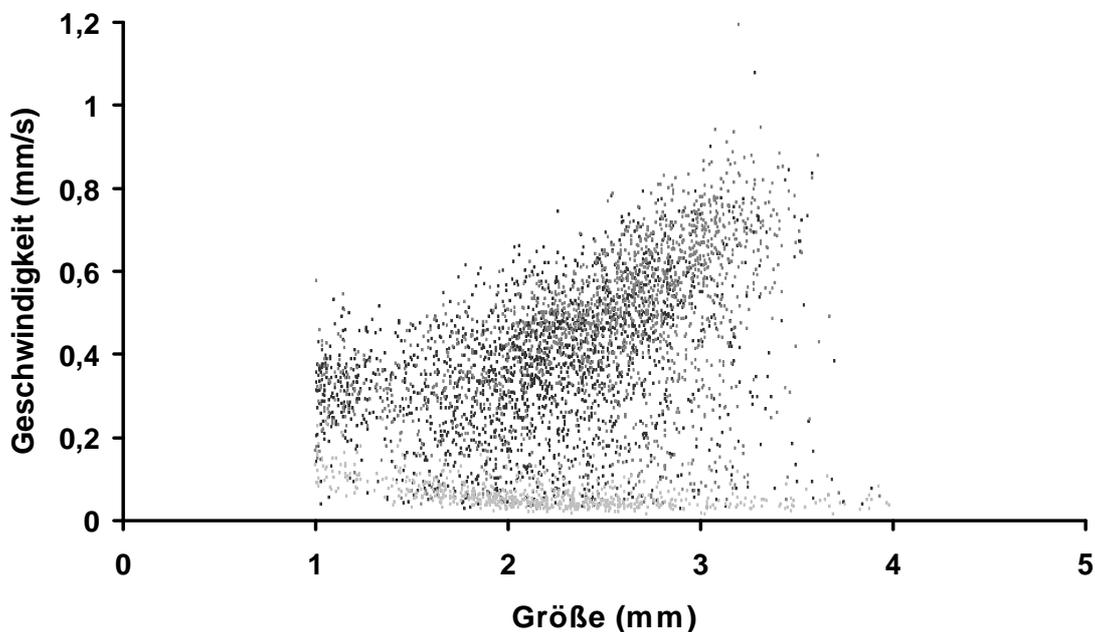
Genotypen: ■ Kontrolllarven (elav-Gal4/+), ■ pUAST  $Khc^{wt}/trunc/elav-Gal4$ , ■ pUAST  $Khc^{K253N}/trunc/elav-Gal4$ .

Mittelwerte der Kriechgeschwindigkeiten sind in Reihenfolge der Genotypen: Größengruppe 1-2 mm: 0,31; 0,27; 0,30 mm/s, Größengruppe 2-3 mm: 0,41; 0,41; 0,41 mm/s, Größengruppe 3-4 mm: 0,37; 0,40; 0,38 mm/s. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte der Filme.

In jeder Größengruppe wurden die Mittelwerte der Filme mittels eines t-tests verglichen: In keiner Gruppe gab es signifikante Unterschiede ( $p \geq 0,01$ ) zwischen Kontrolltieren,  $Khc^{wt}/trunc$  und  $Khc^{K253N}/trunc$ . Das Einbringen des trunkierten Kinesins mit der Mutation K253N hat keinen meßbaren Effekt auf das Kriechverhalten der Larven.

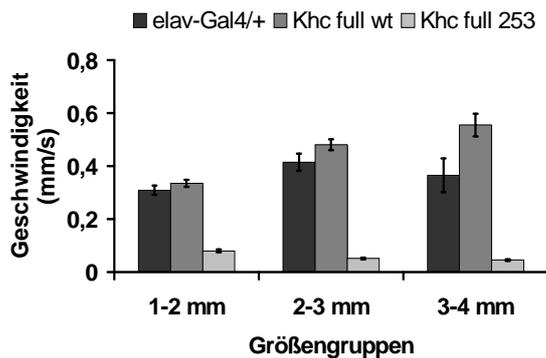
### 3.2.3 Verhalten von Larven mit $Khc^{wt}$ , $Khc^{K253N}$

Hier sollte das Kriechverhalten von Larven verglichen werden, die eine Kopie des *Khc*-Gens mit der Mutation  $Khc^{K253N}$  oder des unmutierten Gens exprimierten. Als Kontrolle wurden Tiere, die nur den inaktiven *elav-Gal4*-Treiber in sich trugen, verwendet.



**Abbildung 12: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem full length Wildtyp- und mutantern Kinesin und Kontrolltieren.**

Aufgetragen sind die Geschwindigkeiten der Larven in Millimeter/Sekunde (mm/s) gegen die Größe der Larven (mm). Genotypen: ■ Kontrolllarven (elav-Gal4/+), ■ pUAST  $Khc^{wt}/elav-Gal4$ , ■ pUAST  $Khc^{K253N}/elav-Gal4$ . Messungen der Geschwindigkeiten erfolgten in Zeiträumen  $>10$  s, Larven  $<1$  mm und  $>4$  mm wurden ausgeschlossen.



**Abbildung 13: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem full length Wildtyp- und mutantern Kinesin und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].**

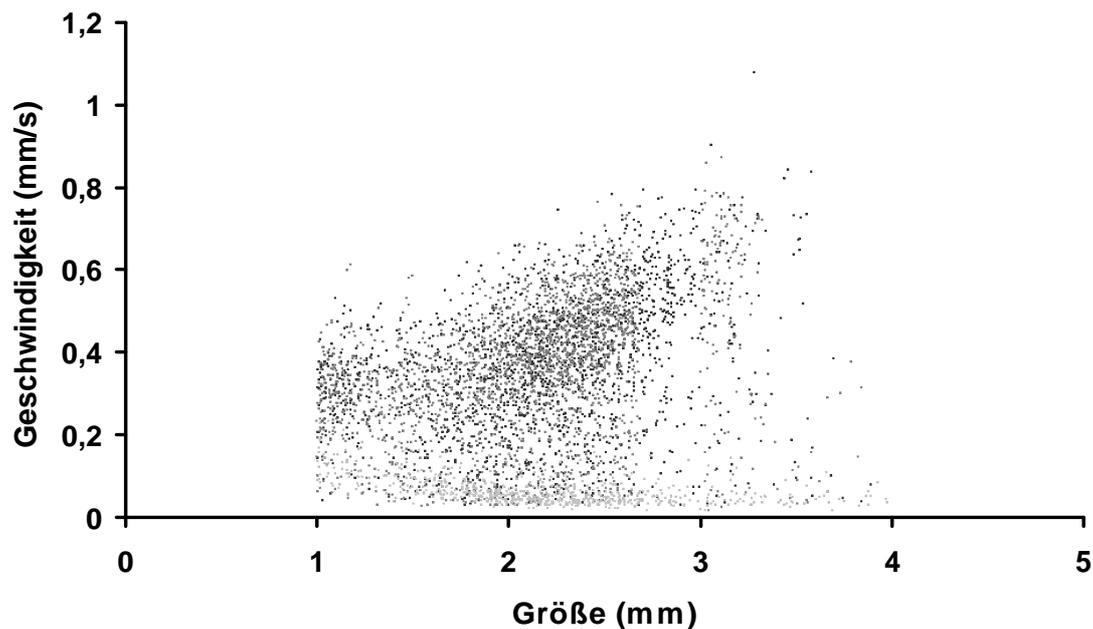
Genotypen: ■ Kontrolllarven (elav-Gal4/+), ■ pUAST  $Khc^{wt}$ /elav-Gal4, ■ pUAST  $Khc^{K253N}$ /elav-Gal4.

Mittelwerte der Kriechgeschwindigkeiten sind in Reihenfolge der Genotypen: Größengruppe 1-2 mm: 0,31; 0,34; 0,08 mm/s Größengruppe 2-3 mm: 0,41; 0,48; 0,05 mm/s Größengruppe 3-4 mm: 0,37; 0,55; 0,05 mm/s. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte der Filme.

In jeder Größengruppe wurden die Mittelwerte der Filme mittels eines t-tests verglichen: In allen Gruppen ist  $Khc^{K253N}$  signifikant langsamer als  $Khc^{wt}$  und die Kontrolltiere ( $p < 0,01$ ). Das Einbringen des mutanten Kinesins in voller Länge führt zu einem deutlichen Phänotyp.

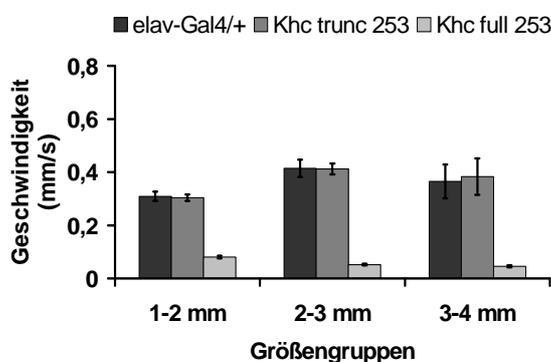
### 3.2.4 Verhalten von Larven mit $Khc^{K253N}$ und $Khc^{K253N}$ trunc

Hier sollte das Kriechverhalten von Larven verglichen werden, die eine Kopie des trunkeierten oder „full-length“ *Khc*-Gens mit der Mutationen K253N exprimierten. Als Kontrolle wurden Tiere, die nur den *elav-Gal4*-Treiber in sich trugen, verwendet.



**Abbildung 14: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem trunkiertem und full length mutantem Kinesin K253N und Kontrolltieren.**

Aufgetragen sind die Geschwindigkeiten der Larven in Millimeter/Sekunde (mm/s) gegen die Größe der Larven (mm). Genotypen: ■ Kontrolllarven (elav-Gal4/+), ■ pUAST Khc<sup>K253N</sup>trunc/elav-Gal4, ■ pUAST Khc<sup>K253N</sup>/elav-Gal4. Messungen der Geschwindigkeiten erfolgten in Zeiträumen >10 s, Larven < 1mm und > 4 mm wurden ausgeschlossen.



**Abbildung 15: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem trunkiertem und full length mutantem Kinesin K253N und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].**

Genotypen: ■ Kontrolllarven (elav-Gal4/+), ■ pUAST Khc<sup>K253N</sup>trunc/elav-Gal4, ■ pUAST Khc<sup>K253N</sup>/elav-Gal4.

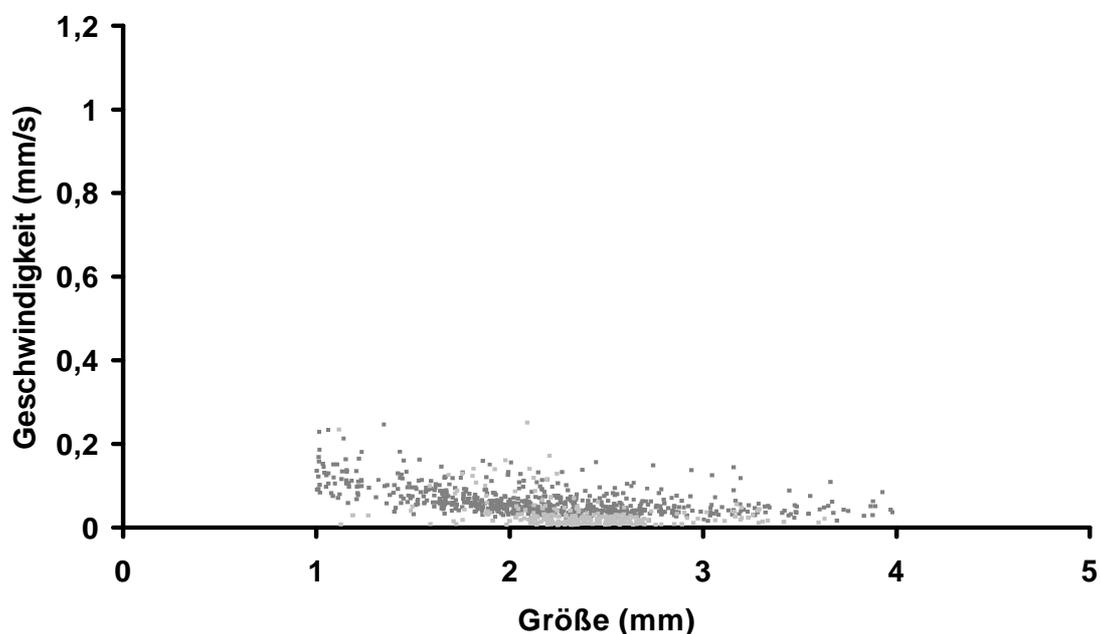
Mittelwerte der Kriechgeschwindigkeiten sind in Reihenfolge der Genotypen: Größengruppe 1-2 mm: 0,31; 0,30; 0,08 mm/s Größengruppe 2-3 mm: 0,41; 0,41; 0,05 mm/s Größengruppe 3-4 mm: 0,37; 0,38; 0,05 mm/s. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte der Filme.

In jeder Größengruppe wurden die Mittelwerte der Filme mittels eines t-tests verglichen: In allen Gruppen ist Khc<sup>K253N</sup> signifikant langsamer als Khc<sup>K253N</sup>trunc und die Kontrolltiere ( $p < 0,01$ ). Zwischen Khc<sup>K253N</sup>trunc und den Kontrolltieren

gibt es keine signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,01$ ). Hier wird noch einmal deutlich, dass die Mutation K253N nur wenn auch die Domänen, welche die leichten Ketten und die Fracht binden, vorhanden sind zu einer Beeinträchtigung des Kriechverhaltens führt.

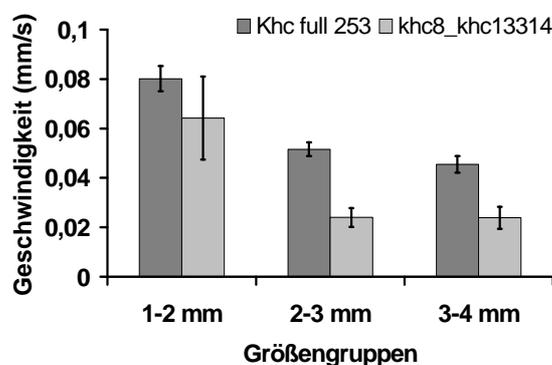
### 3.2.5 Verhalten von Larven mit $\text{Khc}^{\text{K253N}}$ und $\text{Khc}^8/\text{Khc}^{13314}$

Hier sollten nun die Larven verglichen werden, die K253N zusätzlich zu ihren zwei normalen schweren Kinesinketten exprimieren mit der compound-heterozygoten Mutante  $\text{Khc}^8/\text{Khc}^{13314}$ , welche kein normales Khc bilden kann.



**Abbildung 16: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem full length mutantern Kinesin K253N und der Doppelmutante  $\text{Khc}^8/\text{Khc}^{13314}$ .**

Aufgetragen sind die Geschwindigkeiten der Larven in Millimeter/Sekunde (mm/s) gegen die Größe der Larven (mm). Genotypen: ■ pUAST  $\text{Khc}^{\text{K253N}}/\text{elav-Gal4}$ , ■  $\text{Khc}^8/\text{Khc}^{13314}$ . Messungen der Geschwindigkeiten erfolgten in Zeiträumen  $>10$  s, Larven  $<1$  mm und  $>4$  mm wurden ausgeschlossen.



**Abbildung 17: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem full length mutantern**

### Kinesin K253N und der Doppelmutante $Khc^8/Khc^{13314}$ unterschiedlicher Größengruppen [mm].

Genotypen: ■ pUAST  $Khc^{K253N}/elav-Gal4$ , ■  $Khc^8/Khc^{13314}$ .

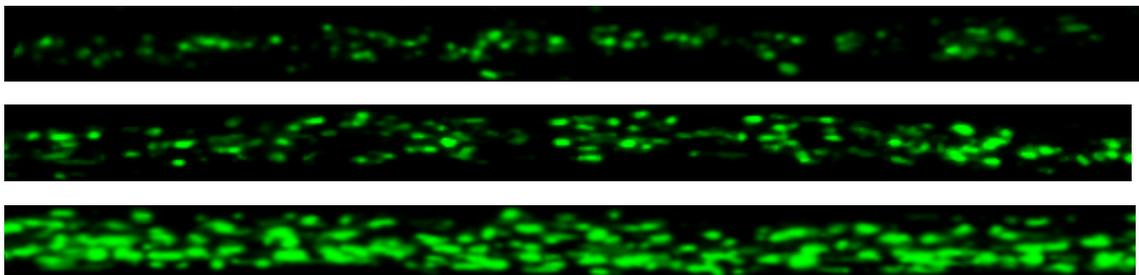
Mittelwerte der Kriechgeschwindigkeiten sind in Reihenfolge der Genotypen: Größengruppe 1-2 mm: 0,08; 0,06 mm/s Größengruppe 2-3 mm: 0,05; 0,02 mm/s Größengruppe 3-4 mm: 0,05; 0,02 mm/s. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte der Filme.

In jeder Größengruppe wurden die Mittelwerte der Filme mittels eines t-tests verglichen: In den Gruppen 2-3 mm und 4-5 mm ist  $Khc^8/Khc^{13314}$  signifikant langsamer als  $Khc^{K253N}$  ( $p < 0,01$ ). Der dominant-negative Effekt der Mutation K253N führt zu einem schwächeren Phänotyp als die Doppelmutante.

## 3.3 Störungen des axonalen Transports *in vivo*

### 3.3.1 Vergleich der von Mitochondrien bedeckten Fläche in Axonen von $Khc$ -Mutanten und Kontrolltieren

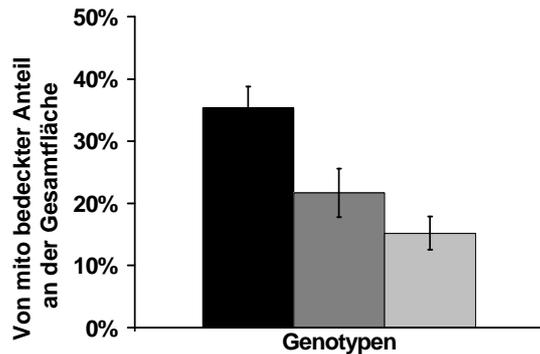
Es wurde untersucht, ob in Axonen von Larven mit Mutationen in der schweren Kette des Kinesins weniger Mitochondrien als in den Axonen von Kontrolltieren vorhanden sind. Hierfür wurden D42-Gal4, UAS-mito-GFP-Mutanten verwendet, die in den Mitochondrien der Motoaxone GFP (grünes fluoreszierendes Protein) exprimieren.



**Abbildung 18: *In vivo* Bilder larvaler Motoaxone, die mito-GFP exprimieren**

Die Doppelmutante  $khc^8/khc^{13314}$ ; D42-Gal4, UAS-mito-GFP (oben) exprimiert signifikant weniger mito-GFP als die Kontrolltiere +/+; D42-Gal4, UAS-mito-GFP (unten). Die Einfachmutante  $khc^8/+$ ; D42-Gal4, UAS-mito-GFP (Mitte) exprimiert auch weniger mito-GFP (40x5  $\mu$ m).

Zur quantitativen Analyse wurde bei 14 Axonen von jeweils 5-6 Tieren pro Genotyp die mit Mitochondrien bedeckte Fläche im Verhältnis zur Gesamtaxonfläche bestimmt.



**Abbildung 19: Von Mitochondrien bedeckte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche des Axons.**

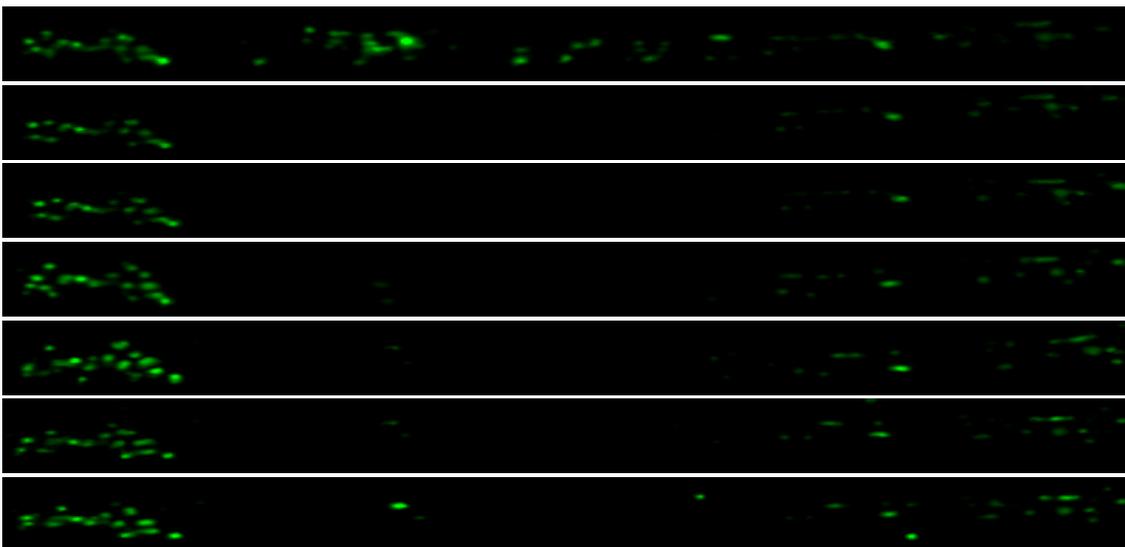
Genotypen: ■ Kontrolllarven (+/+), ■ khc<sup>8</sup>/+, ■ khc<sup>8</sup>/khc<sup>13314</sup>.

Mittelwerte des Anteils von mito-GFP bedeckter Fläche an der Gesamtaxonfläche sind in Reihenfolge der Genotypen: 35,3%; 21,7%; 15,2%. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Stichprobenmittelwertes. Ein Mann-Whitney-U-Test ergab, dass in der Doppelmutante khc<sup>8</sup>/khc<sup>13314</sup> und in den Einfachmutanten khc<sup>8</sup>/+ signifikant weniger mito-GFP vorhanden ist als in den Kontrolltieren ( $p < 0,0001$  bzw.  $p < 0,05$ ). Eine einfach-blinde Nachkontrolle ergab ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen der Doppelmutante und den Kontrolltieren ( $p < 0,01$ ).

In den Axonen der Khc-Mutanten befinden sich signifikant weniger Mitochondrien als in denen der Kontrolltiere.

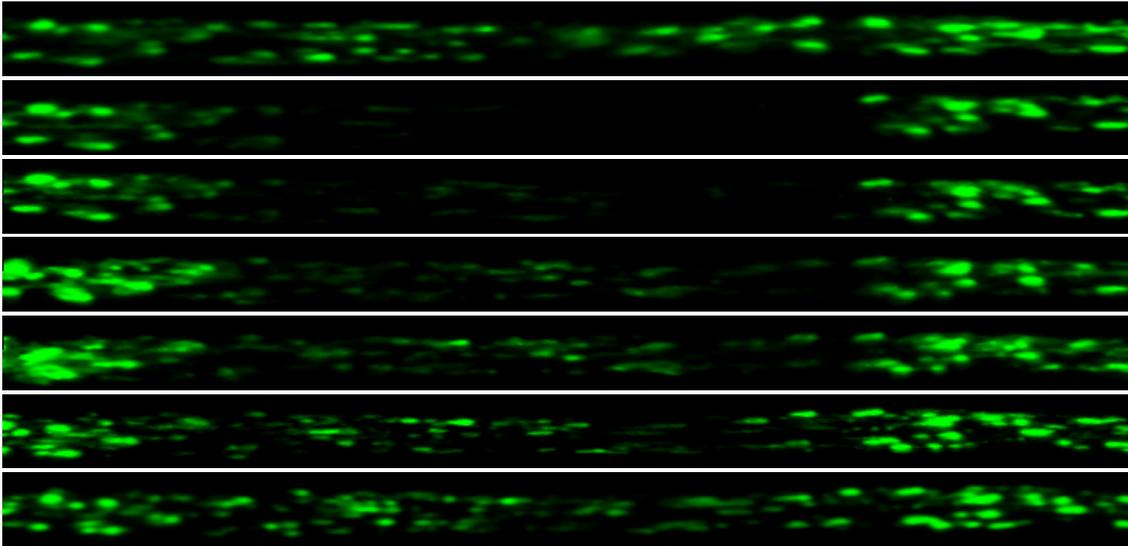
### 3.3.2 Störungen des langsamen axonalen Transports

Zur Untersuchung des langsamen axonalen Transports wurde in einem ca. 20  $\mu\text{m}$  großem Axonstück das von den Mitochondrien exprimierte GFP ausgebleicht. Dann wurde die Intensitätszunahme als Maß für den axonalen Transport von Mitochondrien in dem gebleichten Bereich gemessen.



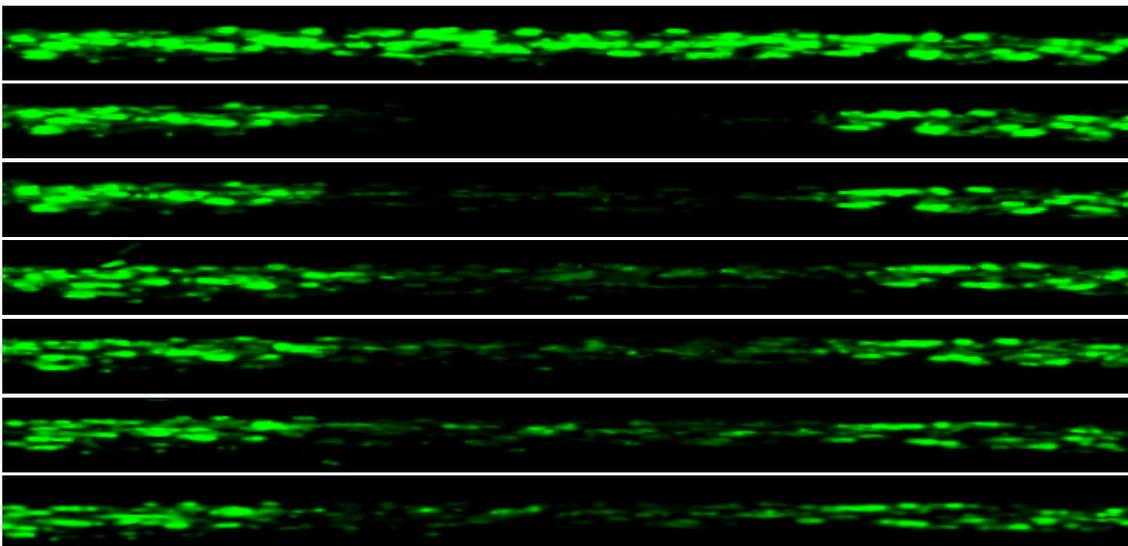
**Abbildung 20: Ausschnitt aus einem Axon der khc8/khck13314-Mutante.**

Vor Bleaching und 0, 5, 30, 60, 90, 120 min danach (40x5  $\mu\text{m}$ ).



**Abbildung 21: Ausschnitt aus einem Axon der khc8/+-Mutante.**

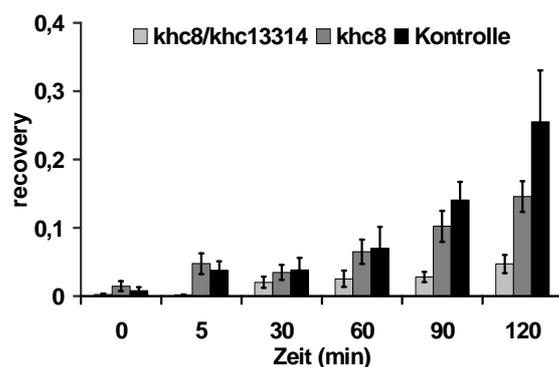
Vor Bleaching und 0, 5, 30, 60, 90, 120 min danach (40x5 µm)



**Abbildung 22: Axon der Wildtyp-Kontrolle.**

Vor Bleaching und 0, 5, 30, 60, 90, 120 min danach (40x5 µm)

Die Intensität im gebleichten Bereich wurde direkt nach dem Bleichen, 5, 30, 60, 90 und 120 min danach gemessen. Abbildung 23 zeigt die Mittelwerte der Intensität im Verhältnis zur Ursprungsintensität im Axon für die verschiedenen Genotypen.



**Abbildung 23: Mittelwerte des Recovery als Maß für den langsamen axonalen Transport nach Photobleaching.**

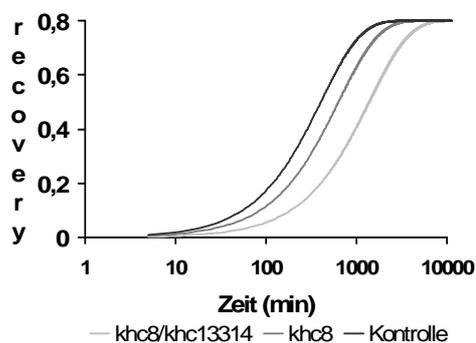
Genotypen: ■ Kontrolllarven (+/+), ■  $khc^8/+$ , ■  $khc^8/khc^{13314}$ .

Mittelwerte der Meßwerte nach 0, 5, 30, 60, 90 und 120 Minuten. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Stichprobenmittelwertes. Werte siehe Tabelle 8. Ein Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Doppelmutante  $Khc^8/Khc^{13314}$  und dem Wildtyp ( $p < 0,001$ ), und keine signifikanten Unterschiede zwischen  $Khc^8$  und  $Khc^8/Khc^{13314}$ , sowie zwischen  $Khc^8$  und dem Wildtyp ( $p > 0,05$ ).

Der langsame axonale Transport ist bei der Doppelmutante verlangsamt. Zwischen der Einfachmutante und der Doppelmutante oder dem Wildtyp sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

**Tabelle 8: Medium Recovery nach Bleaching bei Kontrolltieren und Khc-Mutanten.**

Zeit in min	Medium recovery		
	+/+ n = 8(4)	Khc8/+ n = 7(4)	Khc8/ Khc13314 n = 8(6)
<b>0</b>	0,008	0,015	0,002
<b>5</b>	0,038	0,048	0,002
<b>30</b>	0,039	0,035	0,020
<b>60</b>	0,070	0,065	0,026
<b>90</b>	0,140	0,102	0,028
<b>120</b>	0,255	0,146	0,047
<b>t ½</b>	290 min	450 min	970 min
<b>r</b>	0,002424	0,001547	0,000712



**Abbildung 24: FRAP-Daten im weiteren Verlauf mit der Formel  $f(t) = A \cdot (1 - e^{-r \cdot t})$  extrapoliert.**

Genotypen: ■ Kontrolllarven (+/+), ■  $khc8/+$ , ■  $khc8/khc13314$

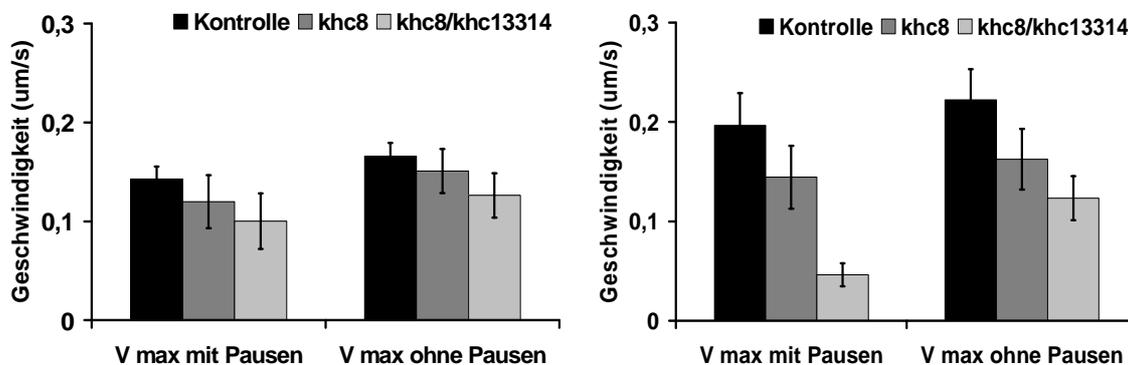
### 3.3.3 Störungen des schnellen axonalen Transports

Zur Untersuchung des schnellen axonalen Transports wurde in einem ca. 20  $\mu\text{m}$  großem Axonstück das von den Mitochondrien exprimierte GFP ausgebleicht. Nach 10 min wurde eine Zeitserie von 100 Bildern aufgenommen und die Transportrichtung und Geschwindigkeit der einzelnen Mitochondrien in diesem Abschnitt analysiert.

**Tabelle 9: Maximale und mittlere Geschwindigkeit V (mit und ohne Pausen) in  $\mu\text{m}/\text{s}$  und prozentualer Anteil der Pausen bei Khc-Mutanten und Kontrolltieren.**

Ein t-test ergab signifikante Unterschiede zwischen den retrograden Durchschnittsgeschwindigkeiten und dem Pausenanteil von  $\text{khc}^8/\text{khc}^{13314}$  und  $\text{khc}^8$ , sowie zwischen  $\text{khc}^8/\text{khc}^{13314}$  und der Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

Genotyp	Anterograd				Retrograd			
	$V_{\text{maximal}}$	$V_{\text{mittel}}$	$V_{\text{mittel ohne Pausen}}$	Anteil Pausen	$V_{\text{maximal}}$	$V_{\text{mittel}}$	$V_{\text{mittel ohne Pausen}}$	Anteil Pausen
+/+	0,591	0,143 +/- 0,01	0,166 +/- 0,01	13,83%	0,818	0,197 +/- 0,03	0,222 +/- 0,03	17,10 %
Khc8/+	0,443	0,120 +/- 0,03	0,151 +/- 0,02	28,56 %	0,469	0,145 +/- 0,03	0,163 +/- 0,03	17,18 %
Khc8/Khc 13314	0,318	0,100 +/- 0,03	0,126 +/- 0,02	23,65 %	0,386	0,046 +/- 0,01	0,123 +/- 0,02	61,91 %



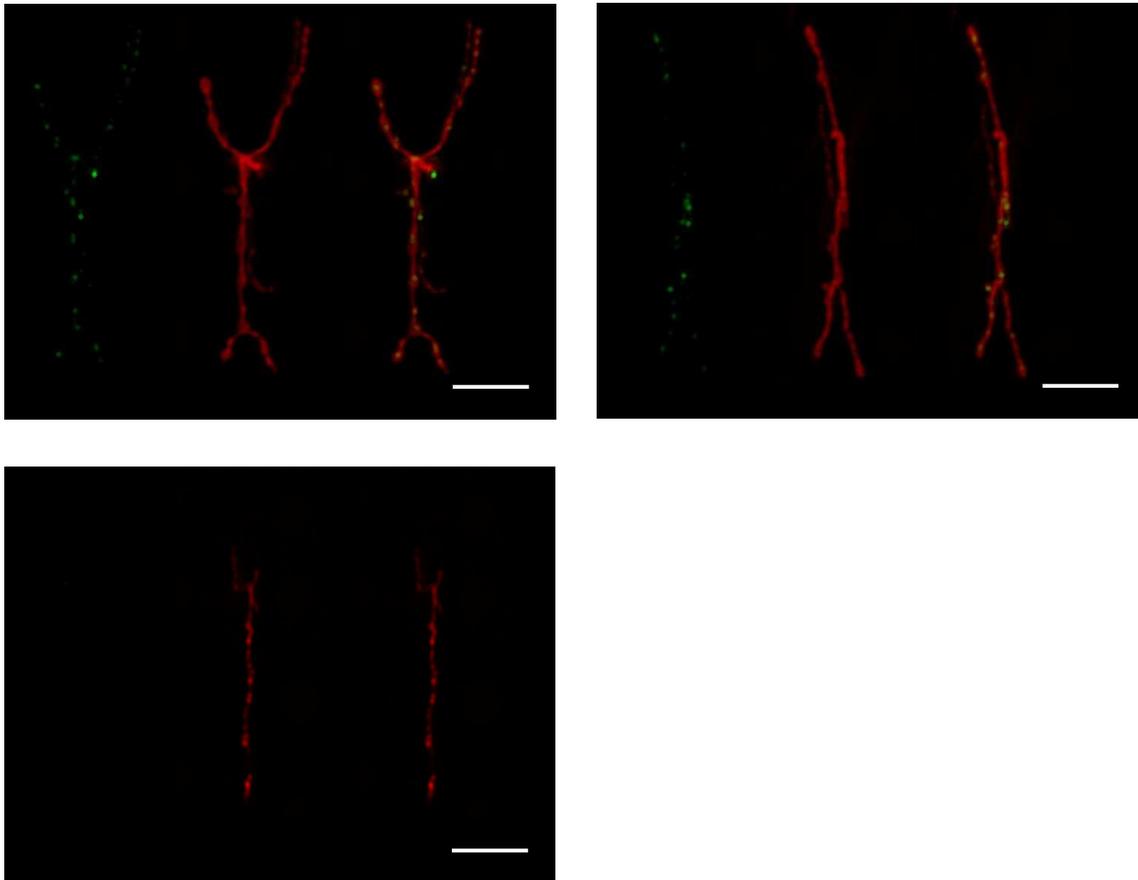
**Abbildung 25: Mittlere Geschwindigkeit des anterograden und retrograden axonalen Transports einzelner Mitochondrien.**

Genotypen: ■ Kontrolllarven (+/+), ■  $\text{khc}^8/+$ , ■  $\text{khc}^8/\text{khc}^{13314}$ . Werte siehe  $V_{\text{mittel}}$  Tabelle 9. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Stichprobenmittelwertes.

Der anterograde und mehr noch der retrograde schnelle axonale Transport sind bei Kinesinmutanten beeinträchtigt.

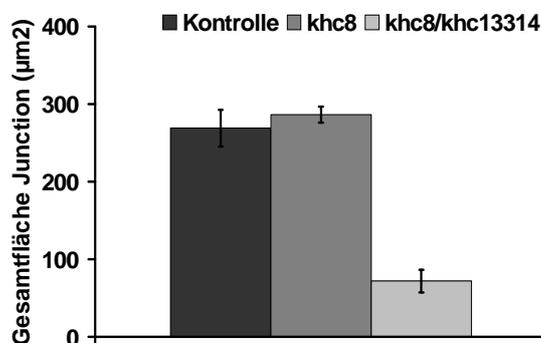
### 3.4 Störungen des Synapsenaufbaus in vitro

Um die Auswirkungen des gestörten axonalen Transports auf die Synaptogenese in *Drosophila* zu untersuchen, wurden Larven im 3. Stadium (4-5 Tage alt) der drei Genotypen präpariert und angefärbt.



**Abbildung 26: Neuromuskuläre Junctions des Wildtyps +/+ (links), der Einfachmutante khc8/+ (rechts) und der Doppelmutante khc8/khc13314 (unten).**

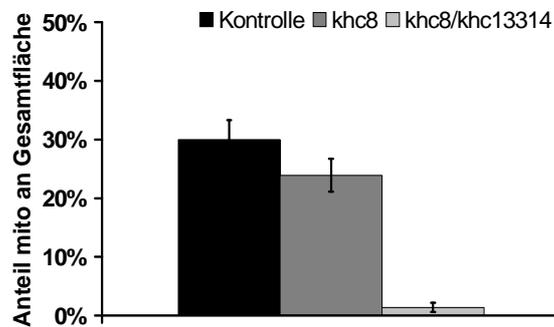
Immunfärbung larvaler Neuromuskulärer Junctions. Gefärbt wurde gegen einen Marker neuronaler Membranen (HRP, rot, Mitte) und gegen mito-GFP ( $\alpha$ -GFP, grün, links). Rechts im Bild die Projektion beider Färbungen. Scale bar = 10  $\mu$ m.



**Abbildung 27: Gesamtfläche Junction.**

Genotypen: ■ Kontrolllarven (+/+), ■ khc<sup>8</sup>/+, ■ khc<sup>8</sup>/khc<sup>13314</sup>.

Mittelwerte sind in Reihenfolge der Genotypen:  $269 \mu\text{m}^2$ ;  $286 \mu\text{m}^2$ ;  $85 \mu\text{m}^2$ . Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Stichprobenmittelwertes. Ein t-test ergab signifikante Unterschiede zwischen  $\text{khc}^8/\text{khc}^{13314}$  und  $\text{khc}^8/+$ , sowie zwischen  $\text{khc}^8/\text{khc}^{13314}$  und dem Wildtyp ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 28: Anteil der von Mitochondrien bedeckten Fläche an der Gesamtfläche.**

Genotypen: ■ Kontrolllarven (+/+), ■  $\text{khc}^8/+$ , ■  $\text{khc}^8/\text{khc}^{13314}$ .

Mittelwerte sind in Reihenfolge der Genotypen: 30,0 %; 23,9 %; 1,4 %. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Stichprobenmittelwertes. Ein t-test ergab signifikante Unterschiede zwischen  $\text{khc}^8/\text{khc}^{13314}$  und  $\text{khc}^8/+$ , sowie zwischen  $\text{khc}^8/\text{khc}^{13314}$  und dem Wildtyp ( $p < 0,01$ ).

Die Synapsen der Doppelmutante sind kleiner und anteilmäßig von weniger Mitochondrien bedeckt als die der Einfachmutante und des Wildtyps.

## 4 Diskussion

### 4.1 Kinesinmutationen als Ursache der HSP

In dieser Arbeit wurde zuerst ein Modell mit zwei Mutationen in der schweren Kinesinkette von *Drosophila melanogaster* untersucht.  $Khc^8$  war bereits vorbeschrieben (Saxton et al., 1991a).  $Khc^{13314}$  entstammt dem Berkeley Drosophila Genome Gene Disruption Project, bei dem über P-Elemente Mutationen in 25% der vitalen Gene von *Drosophila melanogaster* erzeugt wurden (Spradling et al., 1999b). Eine Kreuzung dieser beiden Linien ergibt die compound-heterozygote Mutante  $Khc^8/Khc^{13314}$ , die im frühen dritten Larvenstadium stirbt.

Durch die Untersuchung dieser  $Khc$ -mutanten Larven sollten Methoden etabliert und Vergleichsdaten geliefert werden, welche dann auch für die Untersuchung der HSP-Mutanten genutzt werden können. Hierfür wurde die, zu der bekannten menschlichen Mutation homologe Mutation  $c.759G>T$ ,  $p.K253N$  ins  $khc$ -Gen von *Drosophila melanogaster* einkloniert (siehe 1.1.7).

### 4.2 Verhaltensanalyse

#### 4.2.1 $Khc^8/Khc^{13314}$ vs. $Khc^8/+$ vs. $+/+$

Die Einfachmutante  $Khc^8/+$  zeigte keine signifikanten Verhaltensunterschiede gegenüber den Kontrolltieren ( $p \geq 0,01$ ). Die Doppelmutante  $Khc^8/Khc^{13314}$  war jedoch in den Gruppen 2-3 mm und 3-4 mm signifikant langsamer als die Einfachmutante  $Khc^8/+$  und die Kontrolltiere ( $+/+$ ). In der Gruppe 1-2 mm war die Doppelmutante  $Khc^8/Khc^{13314}$  signifikant langsamer als die Kontrolltiere ( $p < 0,01$ ), allerdings waren in dieser Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen  $Khc^8/+$  und  $Khc^8/Khc^{13314}$  messbar. Der Versuch zeigt also Schwächen bei den besonders kleinen Larven und ist in dieser Gruppe nur bedingt aussagefähig.

Während die Geschwindigkeit der Kontrolltiere und der heterozygoten Mutante bei zunehmender Körpergröße stieg, wurden die compound-heterozygoten Tiere bei zunehmender Körpergröße langsamer und starben spätestens im

frühen dritten Larvenstadium. Trotzdem spricht die hier nachgewiesene signifikante Beeinträchtigung des Kriechverhaltens der compound-heterozygoten Mutante  $Khc^8/Khc^{13314}$  dafür, dass dieser Versuch auch für die Untersuchung der Larven, welche eine homologe Mutation zu der im Menschen autosomal-dominant vererbten *kif5a*-Mutation K253N in sich tragen, geeignet ist.

#### 4.2.2 $Khc^{wt}/elav-Gal4$ vs. $Khc^{wt}trunc/elav-Gal4$ vs. $+/elav-Gal4$

Um die Frage zu beantworten, ob schon das Einbringen eines P-Elements mit einer Kopie von nicht mutiertem (Wildtyp-) *Khc* in *Drosophila* einen Effekt auf das Kriechverhalten hat und ob es eine Rolle spielt, ob es trunkiert oder vollständig vorliegt, wurden  $Khc^{wt}$  und  $Khc^{wt}trunc$  mit Kontrolltieren verglichen. Als Kontrolle wurden Tiere, die nur eine Kopie des inaktiven *elav-Gal4*-Treibers in sich trugen verwendet, um sicherzustellen, dass nicht schon der Treiber das Verhalten beeinflusst. Hierbei zeigten sich nur in der Gruppe 1-2 mm, die , schon in den vorherigen Versuchen als nur bedingt aussagekräftig identifiziert worden war, signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) zwischen  $Khc^{wt}$  und  $Khc^{wt}trunc$ . Ansonsten gab es keine signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,01$ ) zwischen Kontrolltieren,  $Khc^{wt}$  und  $Khc^{wt}trunc$ , so dass die Schlußfolgerung gezogen werden kann, dass das Einbringen des Wildtyp-Kinesins mittels eines P-Elements keine Auswirkungen auf das Laufverhalten der Larven hat.

#### 4.2.3 $Khc^{K253N}/elav-Gal4$ vs. $Khc^{K253N}trunc/elav-Gal4$ vs. $+/elav-Gal4$

Da das Einbringen von Wildtyp-Motoren (trunkiert oder „full-length“) keinen Einfluß auf das Verhalten zeigte, wurde nun die trunkierte mit der nicht-trunkierten Version des mutierten Motors verglichen: Dabei wurde deutlich, dass nur die vollständig vorliegende schwere Kette, also inklusive der Bindungsstellen für die leichten Ketten und die Fracht, zu signifikanten Verhaltensunterschieden führt ( $p < 0,01$ ), während die trunkierte Kette keine meßbaren Veränderungen hervorruft.

#### 4.2.4 Khc<sup>K253N</sup>/elav-Gal4 vs. Khc<sup>8</sup>/Khc<sup>13314</sup>

Beim Vergleich der Doppelmutante Khc<sup>8</sup>/Khc<sup>13314</sup>, die kein funktionsfähiges Khc mehr bilden kann, mit Khc<sup>K253N</sup>, also der Mutante, die zusätzlich zu den beiden normalen Khc-Kopien die Mutation K253N enthält, zeigen sich signifikante Unterschiede in den Größengruppen 2-3 mm und 4-5 mm ( $p < 0,01$ ). Der dominant-negative Effekt ist also im Vergleich zum Wildtyp gravierend, führt aber zu einem schwächer ausgeprägten Phänotyp bei der HSP-Mutante als bei der compound-heterozygoten Mutante. Allerdings erreicht keine der beiden Mutanten das adulte Stadium.

Zur Interpretation der Daten ist es wichtig, zu wissen, dass die menschliche *kif5a*-Mutation K253N, genau wie N256S und drei weitere der heute bekannten sieben SPG10 auslösenden Mutationen, im sogenannten „switch-cluster“, das von den Exons 9 und 10 des *kif5a*-Gens codiert wird, zu finden ist (Schule et al., 2008). Dieses „switch-cluster“ wurde beim monomeren Kinesinmotor KIF1A mittels Röntgen-Kristallographie und Kryoelektronenmikroskopie untersucht: In diesem Bereich finden die Bindung und Hydrolyse von ATP statt, die zu den Bewegung generierenden Konformationsänderungen führen, ähnlich wie bei Myosin und G-Proteinen (Kikkawa et al., 2001). Mittels *in vitro* Versuchen konnte von Woehlke et al. gezeigt werden, dass ein Austausch des KIF5B Homologons K253 (K252) mit Alanin zu Beeinträchtigungen der Mikrotubuli-abhängigen ATPase-Aktivierung und Verstoffwechslungsrate („turnover rate“) führt (Woehlke et al., 1997a). *In vitro* Versuche mit K253N zeigten eine signifikante Geschwindigkeitsreduktion und eine reduzierte Bindungsaffinität zu den Mikrotubuli (Ebbing et al., 2008).

Die Analyse des Laufverhaltens erwies, dass die Mutation K253N nur zu einer Verhaltensstörung führt, wenn sie im Rahmen einer vollständigen schweren Kinesinkette auftritt. Außerdem erreichte keine der Larven, die pUAST Khc fullK253N exprimierten das adulte Stadium. Im Vergleich zur compound-heterozygoten Mutante Khc<sup>8</sup>/Khc<sup>13314</sup>, welche gar kein voll funktionsfähiges Kinesin mehr produzieren kann und im frühen dritten Larvenstadium stirbt, zeigt die untersuchte SPG10-Mutante also einen etwas schwächeren Phänotyp. Hier

liegt eher eine Beeinträchtigung der Funktion der normalen Kinesinketten durch die mutierten Ketten, also ein dominant-negativer Effekt, vor. Dies führt zu der Hypothese, dass ein Heterodimer aus normalem und mutiertem Kinesin gebildet wird, der dann entweder Bindungsstellen am Mikrotubulus blockiert, gar keine Fracht binden kann oder zwar Motor-Cargo-Komplexe bildet, die dann aber vom Mikrotubulus abfallen und so den axonalen Transport behindern.

Das erklärt auch den fehlenden Effekt der trunkierten Konstrukte:

Die trunkierten Konstrukte zeigten keinen dominant-negativen Effekt. Dabei handelt es sich um völlig funktionsfähige Motoren ohne die Domänen, welche die leichten Ketten und die Fracht binden. Sie können also keine Fracht blockieren oder Motor-Cargo-Komplexe bilden und stellen nur durch Blockade von Bindungsstellen am Mikrotubulus eine unwesentliche Beeinträchtigung des axonalen Transports dar. Insofern wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass für den dominant-negativen Effekt der Mutation K253N eine Bindung der Fracht nötig ist.

Zur Erklärung des Phänomens, dass die compound-heterozygoten Larven, die kein funktionsfähiges Khc bilden können, anfangs noch recht aktiv sind und erst im Laufe ihrer Entwicklung an Beweglichkeit verlieren und sterben, bietet sich maternales Protein bzw. maternale m-RNA an: In vielen Organismen werden die ersten Stunden der Entwicklung von maternalen Proteinen und m-RNAs gesteuert, die während der Oogenese im Ei deponiert wurden. Nach der Befruchtung ermöglichen sie primär die zygotische Transkription und den Aufbau des Grundgerüsts des Körpers. Die Mutter transferiert eine große Menge von geschätzt 7000 Transkripten m-RNA in die Oozyte, wovon zwar ein Großteil abgebaut wird, aber die für die Entwicklung des Embryos benötigten Transkripte erhalten bleiben (Gouw et al., 2009). Das Kinesin, das für die Entwicklung und den axonalen Transport wichtig ist, könnte also in Form von maternalen Proteinen oder m-RNA in den jungen Larven noch vorhanden sein, im Laufe der Entwicklung verbraucht und abgebaut werden und so den sich verschlechternden Zustand der Larven erklären.

## 4.3 *In vivo* imaging

### 4.3.1 Mitochondrienmenge im Axon

Um festzustellen, ob es Unterschiede zwischen den Kinesin-Mutanten und den Kontrolltieren bezüglich der Anzahl der im Axon befindlichen Mitochondrien gibt, wurde zuerst die mit Mitochondrien bedeckte Axonfläche bestimmt. Beim Wildtyp waren 35,3 +/- 6,8 %, bei der heterozygoten Mutante  $Khc^8/+$  21,7 +/- 7,7 % und bei der Doppelmutante  $Khc^8/Khc^{13314}$  15,2 +/- 5,2 % der untersuchten Axonfläche mit Mitochondrien bedeckt. Dies zeigt, dass bei den  $Khc$ -Mutanten signifikant weniger Mitochondrien ins Axon transportiert wurden als bei den Kontrolltieren ( $p < 0,01$  bei  $Khc^8/Khc^{13314}$  und  $p < 0,05$  bei  $Khc^8$ ) und dass hier auch Unterschiede zwischen Wildtyp und Einfachmutante sichtbar sind, die im Verhaltenstest noch nicht nachweisbar waren.

### 4.3.2 FRAP – axonaler Transport

Um die in 4.3.1 angesprochenen Transportstörungen genauer zu untersuchen, wurden bleaching Experimente durchgeführt. Hierfür wurde in dieser Studie eine standardisierte Vorgehensweise für die Aufnahme und Auswertung der Bilder etabliert: Es wurden in definierten Zeitabständen (0, 5, 10, 30, 60, 90, 120 min) Aufnahmen eines im mittleren Drittel des Bildausschnitts gebleichten Axons gemacht. Beim Vergleich der Intensitätszunahme im Zeitverlauf zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Doppelmutante  $Khc^8/Khc^{13314}$  und dem Wildtyp ( $p < 0,001$ ), und keine signifikanten Unterschiede zwischen der Einfachmutante  $Khc^8/+$  und  $Khc^8/Khc^{13314}$ , sowie zwischen  $Khc^8/+$  und dem Wildtyp ( $p > 0,05$ ).

Die signifikanten Unterschiede zwischen Doppelmutante und Kontrolle beweisen den eingeschränkten axonalen Transport. Dass die Unterschiede zwischen der Einfachmutante und dem Wildtyp nicht signifikant sind, kann an den gewählten Zeitintervallen liegen. Möglicherweise sind bei noch längerer Beobachtung signifikante Unterschiede messbar, allerdings wird dann auch das Aufsuchen der gebleichten Axonstelle immer schwieriger und eine zu lange Untersuchung der Larve erhöht das Risiko für deren Tod während des Versuchs.

### 4.3.3 Schneller axonaler Transport

Der schnelle axonale Transport ist Gegenstand intensiver Forschung, verschiedene möglichst nervenschonende Vorgehensweisen wurden schon getestet: So induzierten beispielsweise Tsukita und Ishikawa 1980 durch lokales Kühlen des Nervus saphenus bei der Maus eine Unterbrechung des axonalen Transports und konnten mit Hilfe radioaktiv markierter Tracer anterograd und retrograd transportierte Organellen elektronenmikroskopisch identifizieren (Tsukita and Ishikawa, 1980).

Andere Ansätze bei *Drosophila*-Larven waren die Applikation einer physikalischen Blockade des axonalen Transports mittels eines dünnen Nylonfadens für mehrere Stunden und anschließender Präparation und Immunofärbung der Larven (Barkus et al., 2008), sowie eine schnelle Präparation der Larven gefolgt von der Aufnahme einer Zeitserie an einem konfokalen Mikroskop (Pilling et al., 2006).

Da alle diese Methoden zum baldigen Tod der Versuchstiere führten und dadurch möglicherweise den axonalen Transport beeinflussten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in vivo* Ansatz favorisiert.

Pilling et al. zeigten, dass das Photobleaching der Axone keinen signifikanten Einfluß auf den Transport von Mitochondrien hat (Pilling et al., 2006). Daher wurde in der vorliegenden Studie 10 min nach dem Bleichen eine ca. 11-minütige Zeitserie mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Diese Methode ermöglichte es, einzelne Mitochondrien zu verfolgen und deren Geschwindigkeit, Pausen in der Bewegung und die Bewegungsrichtung zu bestimmen. Daraus wurde die durchschnittliche und maximale Geschwindigkeit der Mitochondrien sowie der Anteil von Pausen berechnet. Hierbei zeigte sich eine Beeinträchtigung des anterograden und retrograden Transports von Mitochondrien bei der Mutante  $Khc^8/Khc^{13314}$ . Allerdings waren nur beim retrograden Transport signifikante Unterschiede zwischen den Durchschnittsgeschwindigkeiten und dem Pausenanteil bei  $Khc^8/Khc^{13314}$  und  $Khc^8$ , sowie bei  $Khc^8/Khc^{13314}$  und der Kontrolle nachweisbar ( $p < 0,05$ ).

Diese Beeinträchtigung des retrograden Transports bei Kinesinmutanten spricht für die von Martin et al. diskutierte Theorie, dass Kinesin und Dynein während

des schnellen axonalen Transports voneinander abhängig sind und dass Khc für die normale retrograde Dyneinaktivität genauso gebraucht wird wie für die anterograde Kinesin-1 Aktivität (Horiuchi et al., 2005; Ligon et al., 2004; Martin et al., 1999a). Hierfür spricht auch die Tatsache, dass in den axonalen Schwellungen, welche charakteristisch für Transportstörungen bei *Drosophila* sind, Organellen, die schnell anterograd und retrograd transportiert werden, zu finden sind. Außerdem findet man den für Khc-Mutanten typischen Phänotyp mit posteriorer Lähmung auch bei Dynein-Mutanten, was darauf hindeutet, dass Kinesin und Dynein während des schnellen axonalen Transports voneinander abhängig sind (Martin et al., 1999a).

„Dynein heavy chain“-Mutationen führen bei Mäusen zu einer progressiven Degeneration von Motoneuronen und bei homozygoten und compound-heterozygoten Tieren zu Einschlusskörperchen ähnlich den menschlichen Lewy-Körperchen. Diese Charakteristika erinnern stark an spezifische Merkmale der menschlichen Pathologie von Motoneuronenkrankheiten wie der Amyotrophen Lateralsklerose und der Spinalen Muskulären Atrophie (Hafezparast et al., 2003).

Martin et al. ziehen 3 mögliche Modelle in Betracht, um die Kinesin-Dynein-Abhängigkeit zu erklären: Ihr erstes Modell geht davon aus, dass alle bekannten Motoren einseitig gerichtet sind und mehr als 90% der Mikrotubuli eine einheitliche Polarität haben. Deswegen müssen die im Zellkörper synthetisierten retrograden Motoren wie Dynein zuerst anterograd transportiert werden, bevor sie den retrograden Transport antreiben können. Somit würden Kinesinmutationen zu weniger Dynein im Axon und damit auch zu Beeinträchtigungen des retrograden Transports führen. Allerdings liefert dieses Modell keine Erklärung für eine Beeinträchtigung des anterograden Transportes durch Dyneinmutationen (Martin et al., 1999b).

Das zweite Modell wurde 1996 von Hurd und Saxton vorgeschlagen. Es geht davon aus, dass die fehlerhafte Kinesinfunktion zum Abfallen einzelner Organellen führt. Diese Organellen könnten ein mechanisches Hindernis für den bidirektionalen axonalen Transport darstellen und so zur Ablösung und Akkumulation weiterer Motor-Cargo Komplexe an dieser Stelle führen, wodurch

axonale Schwellungen entstehen. Dieses Modell könnte auch den ähnlichen Phänotyp bei fehlerhafter Kinesin- und Dyneinfunktion erklären .

Das dritte Modell setzt voraus, dass ein physikalischer Kontakt zwischen Kinesin und Dynein besteht und beide für den bidirektionalen Transport unverzichtbar sind. So könnten die Aktivitäten der beiden Motoren koordiniert und eine gleichmäßige Verteilung von Motoren im Axon gewährleistet werden. Allerdings gibt es bislang keinen biochemischen Nachweis einer direkten Interaktion von Kinesin und Dynein (Martin et al., 1999a).

Kural et al. zeigten für Peroxisomen, dass Kinesin und Dynein ihre Fracht mit 8 nm großen Schritten *in vivo* transportieren und dass dabei bis zu 11 Kinesine oder Dyneine zusammenarbeiten können und schlugen deshalb drei mögliche Modelle vor: Ein kleines Molekül könnte wahlweise Kinesin oder Dynein abschalten, müsste aber sehr schnell agieren, um eine Überleitungszeit von weniger als einer Millisekunde zu erreichen; Kinesin und Dynein könnten gegeneinander ziehen, bis der stärkere gewinnt und der schwächere schnell abgekoppelt wird, um keine zusätzliche Last zu generieren oder die Bindung der Motorproteine an die Peroxisomen könnte die Dichte und/ oder Flexibilität der Lipidmembran so verändern, dass zwei Motoren unterschiedlicher Polarität nicht gleichzeitig an den Mikrotubulus binden können. Ihre Experimente weisen auf einen Mechanismus hin, der es den Peroxisomen erlaubt, mittels mehrerer Motoren deutlich schneller transportiert zu werden als mit voneinander unabhängigen, abgekoppelten Kinesinen und Dyneinen (Kural et al., 2005).

Eine mögliche physikalische Verbindung zwischen Kinesin-1 und seiner Fracht stellt Aplip1 dar, ein neuronal exprimiertes *Drosophila*-Homologon von JIP-1 (= JNK-interacting protein), einem JNK (c-Jun N-terminale Kinase) Scaffold-Protein. Auch Mutationen von Aplip1 führen bei *Drosophila*-Larven zu axonalen Schwellungen, Paralyse und reduziertem anterograden und retrograden Transport. Allerdings ist bei Aplip1-Mutanten nur der retrograde Transport von Mitochondrien gestört, während der anterograde Transport von Mitochondrien unbeeinflusst bleibt (Horiuchi et al., 2005).

Die vorliegende Studie konnte bei Khc-Mutanten signifikante Störungen des retrograden axonalen Transports nachweisen, jedoch keine eindeutigen neuen Daten liefern, die für das eine oder das andere Modell sprächen.

#### 4.4 Störungen der Synaptogenese bei Kinesinmutationen

Für die Funktion von Synapsen ist der axonale Transport unverzichtbar und auch für die Synaptogenese spielt er eine wichtige Rolle: die für die Entwicklung und Funktion der Synapse notwendigen Moleküle und Organellen müssen transportiert werden. Das zum menschlichen Kinesin paraloge *unc-104* transportiert synaptische Vesikel in *Caenorhabditis elegans* anterograd, Mutationen führen zu Störungen der Synaptogenese bei normaler Axogenese (Hall and Hedgecock, 1991). Auch bei *Drosophila* haben Kinesinmutationen einen Einfluss auf die Synaptogenese. Hier findet man an den terminalen Endigungen weniger Boutons und weniger Verzweigungen (Hurd and Saxton, 1996). Mutationen in *imac* (= immaculate connections), einem Mitglied der Kinesin-3 Familie stören den Transport von Vorläufern synaptischer Vesikel und Bauteilen, die für die Reifung der Synapsen wichtig sind, was zum Ausbleiben der Bildung synaptischer Boutons führt (Pack-Chung et al., 2007).

In dieser Arbeit wurden speziell Mitochondrien beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass die Synapsen der untersuchten Mutante  $Khc^8/Khc^{13314}$  kleiner sind ( $85 \pm 26 \mu m^2$ ) als die der Einfachmutante  $Khc^8/+$  ( $286 \pm 18 \mu m^2$ ) und der Kontrolltiere ( $269 \pm 44 \mu m^2$ ) ( $p < 0,01$ ). Die Menge der in den Synapsen vorhandenen Mitochondrien ist ebenfalls verringert und ihr Anteil an der Gesamtfläche mit  $1,4 \pm 1,4 \%$  signifikant kleiner als bei der Einfachmutante  $Khc^8/+$  ( $23,9 \pm 5,1 \%$ ) und den Kontrolltieren ( $30,0 \pm 6,0 \%$ ) ( $p < 0,01$ ). Dieses Ergebnis spricht für eine relevante Störung des axonalen Transports, die eine gestörte Synaptogenese bei Khc-Mutanten zur Folge hat. Bei der Einfachmutante  $Khc^8/+$  zeigten sich im Vergleich zu den Kontrolltieren gleich große Synapsen und der Anteil von Mitochondrien an der Gesamtfläche war nicht signifikant verringert ( $p \geq 0,01$ ). Das spricht dafür, dass die zuvor nachgewiesene verringerte Menge an Mitochondrien im Axon (siehe 4.3.1), nicht zu einer stark verminderten Anzahl von Mitochondrien an der Synapse

und so zu Störung der Synaptogenese führt. Es ist anzunehmen, dass noch ausreichend Mitochondrien zur Synapse transportiert werden und dann dort verbleiben, während im Axon aufgrund der Transportstörung weniger Mitochondrien vorhanden sind.

Bei der HSP kommt es zu einer axonalen Degeneration motorischer und sensorischer Neuronen besonders am distalen Ende langer Axone, was zur Vermutung eines „dying-back“-Prozesses führte, bei dem die Degeneration distal beginnt und dann in Richtung Zellkörper fortschreitet (McDermott et al., 2000). Interessant ist auch, wie die verschiedenen zu HSP führenden Gene zu ähnlichen pathologischen Veränderungen und demselben Phänotyp führen können. So spricht inzwischen einiges für Zusammenhänge zwischen Glia-Myelinisierung und axonalem Transport: Sobald Axone mit myelinisierenden Gliazellen interagieren, beeinflussen die Gliazellen den axonalen Transport und damit auch retrograde Signale zum Neuron, was wiederum die Fähigkeit des Neurons funktionelle Verbindungen aufrechtzuerhalten beeinflusst. Veränderungen in diesen Signalwegen können, unabhängig davon, ob sie durch Veränderungen in den Motorproteinen, dem Cytoskelett oder den sie regulierenden Signalwegen entstanden sind, synaptische Degeneration und die für HSP typischen „dying-back“-Neuropathie hervorrufen (Gould and Brady, 2004).

Mehr als die Hälfte der HSP-Formen sind mit Mikrotubuli-abhängigen Motorproteinen wie KIF5A und anderen Proteinen, die mit Mikrotubuli interagieren (z.B. Spartin, Paraplegin, Spastin) assoziiert (Casari et al., 1998; Ciccarelli et al., 2003; De Michele et al., 1998; Reid et al., 2002; Zhao et al., 2001b). Das am häufigsten mutierte Gen codiert für Spastin (*SPG4*, >40% aller HSP-Fälle), eine ATPase aus der AAA-Familie (= ATPasen assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten), die Domänen zur Interaktion mit Mikrotubuli und zum Transport von Organellen enthält und an der Regulation von Mikrotubuli beteiligt ist. Verlust von D-spastin in *Drosophila* führt zu einem anormal stabilisierten Mikrotubulus-Cytoskelett in Neuronen und Störungen im Wachstum von Synapsen und Neurotransmission (Trotta et al., 2004).

Bei erblichen Störungen der Myelinfunktion ist die axonale Degeneration ebenfalls die Hauptursache bleibender neurologischer Störungen: In diesem Fall ziehen sich demyelinisierte Motoneuronen zurück, was zu dysfunktionellen präsynaptischen Terminals und schweren neurologischen Störungen noch vor der axonalen Degeneration führt. Dies wird auf eine Störung von noch nicht identifizierten Molekülen oder Signalen zurückgeführt, welche für das Aufrechterhalten des Axon-Muskel-Kontakts nach der Bildung Neuromuskulärer Junctions verantwortlich sind. Allerdings stimmt diese Denervierung Neuromuskulärer Junctions im Mausmodell nicht mit einem gewöhnlichen „dying-back“-Mechanismus bei distaler Axonopathie überein: Während bei distaler Axonopathie zunächst die längsten Fasern betroffen sind, beginnt im Mausmodell die Degeneration proximal (Yin et al., 2004). Es konnten jedoch bei Mäusen mit gestörter Myelinfunktion auch axonale Schwellungen und Degeneration, also die Charakteristika eines gestörten axonalen Transport nachgewiesen werden (Griffiths et al., 1998).

#### **4.5 Andere Ursachen und Modelle der HSP**

Die molekularen Mechanismen, die zur axonalen Degeneration bei der HSP führen, sind wahrscheinlich genauso unterschiedlich und komplex wie ihre Genetik. Zellulärer Transport, insbesondere axonaler Transport, scheint bei Spastin-Mutationen (SPG4) (McDermott et al., 2003), *kif5a*-Mutationen (SPG10) (Xia et al., 2003) und womöglich auch bei SPG3A (Namekawa et al., 2007), SPG20, SPG8, SPG31 und SPG33 gestört zu sein (Depienne et al., 2007). Bei SPG7 nimmt man an, dass die Substrat-Bindungsstelle der mitochondrialen AAA-Protease, welche den Aufbau von Ribosomen und die Qualität von Proteinen kontrolliert, verändert wird (Koppen et al., 2007). Defekte in Paraplegin, einem Teil dieser Protease, führen bei Mäusen ebenfalls zu axonalen Schwellungen durch Akkumulation von Organellen und Neurofilamenten (Ferreirinha et al., 2004), was einen engen Zusammenhang zwischen gestörtem axonalen Transport und mitochondrialen Defekten wahrscheinlich macht (Depienne et al., 2007).

Es wird angenommen, dass der Pathomechanismus der häufigsten HSP-Formen (SPG3A, SPG4, SPG31) hauptsächlich auf Unterbrechungen im System des Endoplasmatischen Retikulums beruht, insbesondere dessen Beziehung zum Mikrotubuli-Zytoskelett. Ein Zusammenspiel dieser Proteine scheint normalerweise eine Regulation von Membranen und den Transport von Proteinen entlang der Mikrotubuli zu weit entfernten Zellteilen zu bewirken. Störungen dieses Systems betreffen besonders die kortikospinalen, also die längsten Axone des Menschen (Park et al., 2010). Dies würde erklären, dass auch diese HSP-Mutationen zu demselben HSP-Phänotyp wie die *kif5a*-Mutationen bei SPG10 führen, bei denen eine direkte Beeinträchtigung des axonalen Transports durch fehlerhafte Kinesine vorliegt.

Da bislang schon 41 HSP-Genloci beschrieben wurden (Salinas et al., 2008), überrascht es nicht, dass auch weitere HSP-Modelle entwickelt wurden: Eine Ursache von AD-HSP sind Mutationen im *spastin*-Gen (SPG 4). Spastin-Monomere bilden hexamere, ringförmige ATPasen, welche Mikrotubuli spalten können, und defektes Spastin beeinträchtigt die einwandfreie Bildung und Instandhaltung des Mikrotubuli-Zytoskeletts und damit neuronale Funktionen. Menschliches und *Drosophila*-Spastin sind so nah miteinander verwandt, dass *Drosophila melanogaster* auch hier als Modellorganismus genutzt wird und wiederum einen charakteristischen Phänotyp, ähnlich dem Krankheitsbild des Menschen zeigt. Ein rescue der Nullmutante ist sowohl mit menschlichem, als auch mit *Drosophila*-Spastin möglich und die Koexpression von menschlichem Wildtyp-Spastin und der HSP-typischen Mutation K388R führt zu einer anomalen Morphologie distaler Synapsen und der Verteilung von Mikrotubuli, ähnlich, aber weniger stark ausgeprägt, als in der Nullmutante (Du et al., 2010). Spastin interagiert mit Mikrotubuli und führt zu deren Abbau. Funktioniert dieser Abbau nicht, kommt es zu anomalen Ansammlungen von zellulären Organellen und Bestandteilen des Zytoskeletts und dadurch zu axonalen Schwellungen im Mäusemodell (Tarrade et al., 2006). Spastin und Atlastin interagieren direkt auf dem Proteinlevel, was darauf hindeutet, dass Defekte in jedem dieser Proteine zu identischen pathophysiologischen Prozessen führen (Evans et al., 2006; Sanderson et al., 2006). Orso et al. konnten in ihrem *Drosophila*-Modell für SPG

4 zeigen, dass Vinblastin, ein Mikrotubuli destabilisierendes Chemotherapeutikum, einen positiven Effekt auf krankheitstypische Anomalien hat. Hierfür wird ein modulierender Effekt des niedrig dosierten Vinblastins auf die Mikrotubuli-Stabilität verantwortlich gemacht: Das gestörte Gleichgewicht beim Auf- und Abbau von Mikrotubuli wird verbessert (Orso et al., 2005).

Mutationen in *atlastin-1* (*atl-1*, SPG3A) führen zu einer HSP-Form mit sehr frühem Krankheitsbeginn. Atlastin ist eine GTPase aus der Dynamin-Familie und an der Morphogenese des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates beteiligt. Mit Hilfe eines *Drosophila*-Modells demonstrierten Lee et al., dass der Verlust von *atl-1* bei der Fliege zu Bewegungsbeeinträchtigungen vom frühesten adulten Stadium an führt, da *atl-1* für das normale Wachstum von Muskeln und Synapsen an der NMJ benötigt wird. Außerdem führt Vinblastin auch hier zu einer Abmilderung der synaptischen und muskulären Defekte in den *Atl*-Mutanten (Lee et al., 2009).

#### 4.6 Ausblick

Nachdem die Verhaltensexperimente eine signifikante Verlangsamung der HSP-Mutanten zeigten, sollten nun auch bei diesen Tieren genauere Untersuchungen der axonalen Transportstörung vorgenommen werden. Dies kann beispielsweise, wie auch in dieser Arbeit für die *Khc*-Mutanten beschrieben, mittels FRAP und *in vivo* imaging geschehen. Verschiedene mit GFP (oder ähnlichen Markern) markierte Cargos können eingekreuzt werden und in motorischen und sensiblen Axonen untersucht werden.

Als ein Problem bei der Analyse der Daten könnte sich die Tatsache herausstellen, dass die HSP-Konstrukte mit Hilfe von P-Elementen als Vektoren zufällig ins Genom von *Drosophila melanogaster* integriert wurden und die unterschiedlichen Positionen einen Einfluss auf den Phänotyp haben könnten. Zur besseren Vergleichbarkeit der Mutanten untereinander sollten die Konstrukte so umklontiert werden, dass sie anschließend an einer definierten Stelle ins Genom integriert werden.

Es bleibt zu klären, ob es Unterschiede in der Stärke der Ausprägung des Phänotyps zwischen den „missense“ Mutationen K253N und N256S gibt. Beim

Menschen sind solche Unterschiede auf Grund der großen Variabilität der HSP bezüglich des Ersterkrankungsalters (frühe Kindheit bis dritte Lebensdekade), der langen Krankheitsdauer und der möglichen subklinisch vorhandenen, zusätzlichen Symptome schwer feststellbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass für den pathologischen Effekt der Mutation K253N eine Bindung an die Fracht notwendig ist. Es bleibt zu klären, ob dies bei N256S auch der Fall ist.

An dieser Thematik und dem direkten experimentellen Vergleich dieser beiden Mutationen wird derzeit in unserer Arbeitsgruppe geforscht.

## 5 Zusammenfassung

Ausgehend von den humanen Mutationen im KIF5A, die eine HSP verursachen haben wir ein Drosophilamodell entwickelt, um den Pathomechanismus zu untersuchen. Hierzu wurden Bewegungsanalysen, *in vivo* Messungen des axonalen Transports von Mitochondrien und Effekte der Mutationen auf die Synaptogenese untersucht. Mit Hilfe einer automatisierten Untersuchung des Laufverhaltens von Drosophilalarven zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Khc-Doppelmutanten  $Khc^8/Khc^{13314}$  und den gesunden Tieren, die in Abhängigkeit von der Größe (dem Alter) der Tiere zunahm. Auch bei den Larven mit einer für die HSP typischen Mutation (K253N) waren signifikante Unterschiede messbar, wenn die Mutation „full-length“ vorlag. Daraus folgt, dass für die Pathologie dieser Mutation die Bindung der Fracht notwendig ist.

Bei den *in vivo* Messungen des axonalen Transports von Mitochondrien wurde sichtbar, dass in den Axonen Khc-mutanter Larven signifikant weniger Mitochondrien vorhanden sind als bei gesunden Kontrolltieren. Bei der folgenden Beobachtung der Mitochondrien im Zeitverlauf mittels FRAP (= Fluorescence Recovery after Photobleaching) zeigte sich eine Störung des langsamen und schnellen axonalen Transports, wobei sowohl der anterograde als auch der retrograde Transport beeinträchtigt war.

Die Untersuchung des Effekts der Mutationen auf die Synaptogenese ergab kleinere NMJs bei der compound-heterozygoten Khc-Mutante, die absolut und anteilmäßig weniger Mitochondrien enthalten. Die Synapsen der Einfachmutante enthielten im Gegensatz zu ihren Axonen nicht signifikant weniger Mitochondrien. Das erklärt sich wahrscheinlich mit einem noch ausreichenden Transport von Mitochondrien zur Synapse, wo diese dann verbleiben.

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit eine deutliche Beeinträchtigung des axonalen Transports und der Synapsenbildung als Folge der Mutation. Diese erklären auch die eingeschränkte Mobilität mutierter Larven. Damit imitiert das Drosophilamodell wesentliche Aspekte der humanen Erkrankung und legt nahe, dass dieser ähnliche Pathomechanismen zugrunde liegen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AAA	=	ATPasen assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten
AD HSP	=	autosomal-dominante HSP
FRAP	=	Fluorescence Recovery after Photobleaching
GFP	=	Grün fluoreszierendes Protein
HSP	=	Hereditäre Spastische Spinalparalyse
Imac	=	immaculate connection
JIP	=	JNK interacting protein
JNK	=	c-Jun N-terminale Kinase
KIF	=	Kinesin family
Khc	=	Kinesin heavy chain
Klc	=	Kinesin light chain
NMJ	=	Neuromuskuläre Junction
Sp	=	speck
SPG	=	spastic paraplegia gene
TM2	=	tropomyosin 2
+	=	Wildtyp

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Kinesin, der Motor des schnellen anterograden axonalen Transports (schematisch).....	7
Abbildung 2: Das UAS-Gal4-System.....	18
Abbildung 3: Kreuzungsschemata.....	27
Abbildung 4: Betäubungsanlage für In vivo Imaging von Drosophila-Larven ...	29
Abbildung 5: Präparation einer Drosophila-Larve.....	32
Abbildung 6: Kriechgeschwindigkeiten von Khc-Mutanten und Kontrolltieren. .	36
Abbildung 7: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Khc-Mutanten und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].....	36
Abbildung 8: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem trunkiertem und full length Wildtyp-Kinesin und Kontrolltieren. ....	38
Abbildung 9: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem trunkiertem und full length Wildtyp-Kinesin und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].....	38
Abbildung 10: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem trunkiertem Wildtyp- und mutantern Kinesin und Kontrolltieren.....	39
Abbildung 11: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem trunkiertem Wildtyp- und mutantern Kinesin und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].....	40
Abbildung 12: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem full length Wildtyp- und mutantern Kinesin und Kontrolltieren.....	40
Abbildung 13: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem full length Wildtyp- und mutantern Kinesin und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].....	41
Abbildung 14: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem trunkiertem und full length mutantern Kinesin K253N und Kontrolltieren. .	42

Abbildung 15: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem trunkiertem und full length mutantem Kinesin K253N und Kontrolltieren unterschiedlicher Größengruppen [mm].....	42
Abbildung 16: Kriechgeschwindigkeiten von Larven mit zusätzlichem full length mutantem Kinesin K253N und der Doppelmutante Khc <sup>8</sup> /Khc <sup>13314</sup> .....	43
Abbildung 17: Mittlere Kriechgeschwindigkeiten [mm/s] von Larven mit zusätzlichem full length mutantem Kinesin K253N und der Doppelmutante Khc <sup>8</sup> /Khc <sup>13314</sup> unterschiedlicher Größengruppen [mm].....	43
Abbildung 18: In vivo Bilder larvaler Motoaxone, die mito-GFP exprimieren....	44
Abbildung 19: Von Mitochondrien bedeckte Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche des Axons. ....	45
Abbildung 20: Ausschnitt aus einem Axon der khc8/khck13314-Mutante. ....	45
Abbildung 21: Ausschnitt aus einem Axon der khc8/+ -Mutante. ....	46
Abbildung 22: Axon der Wildtyp-Kontrolle. ....	46
Abbildung 23: Mittelwerte des Recovery als Maß für den langsamen axonalen Transport nach Photobleaching. ....	47
Abbildung 24: FRAP-Daten im weiteren Verlauf mit der Formel $f(t) = A \cdot (1 - e^{-r \cdot t})$ extrapoliert. ....	47
Abbildung 25: Mittlere Geschwindigkeit des anterograden und retrograden axonalen Transports einzelner Mitochondrien.....	48
Abbildung 26: Neuromuskuläre Junctions des Wildtyps +/+ (links), der Einfachmutante khc8/+ (rechts) und der Doppelmutante khc8/khc13314 (unten).....	49
Abbildung 27: Gesamtfläche Junction. ....	49
Abbildung 28: Anteil der von Mitochondrien bedeckten Fläche an der Gesamtfläche.....	50

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über am axonalen Transport beteiligte Kinesine bei Mensch und Drosophila melanogaster.....	8
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.....	20
Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper .....	20
Tabelle 4: Technische Geräte .....	20
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial.....	22
Tabelle 6: Verwendete Fliegenstämme .....	23
Tabelle 7: Verwendete Marker und Balancer .....	25
Tabelle 8: Medium Recovery nach Bleaching bei Kontrolltieren und Khc-Mutanten. ....	47
Tabelle 9: Maximale und mittlere Geschwindigkeit V (mit und ohne Pausen) in mm/s und prozentualer Anteil der Pausen bei Khc-Mutanten und Kontrolltieren.....	48

## 9 Literaturverzeichnis

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.

Almenar-Queralt, A., and Goldstein, L.S.B. (2001). Linkers, packages and pathways: new concepts in axonal transport. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 550-57.

Barkus, R.V., Klyachko, O., Horiuchi, D., Dickson, B.J., and Saxton, W.M. (2007). Identification of an Axonal Kinesin-3 Motor for Fast Anterograde Vesicle Transport that Facilitates Retrograde Transport of Neuropeptides. *Mol Biol Cell*, E07-03-0261.

Barkus, R.V., Klyachko, O., Horiuchi, D., Dickson, B.J., and Saxton, W.M. (2008). Identification of an axonal kinesin-3 motor for fast anterograde vesicle transport that facilitates retrograde transport of neuropeptides. *Mol Biol Cell* 19, 274-83.

Beck, R. (2007). Untersuchung des Einflusses axonaler Transportstörungen auf synaptische Defekte in *Drosophila melanogaster*. In Fakultät für Biologie (Tübingen, Eberhard Karls Universität).

Bernards, A., and Hariharan, I.K. (2001). Of flies and men - studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 11, 274-78.

Blair, M., Ma, S., and Hedera, P. (2006). Mutation in KIF5A can also cause adult-onset hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics* 7, 47-50.

Blanke, S. (2004). Kleine GTPasen als molekulare Schalter. *MPIbpc News* 4.

Brady, S.T. (1991). Molecular motors in the nervous system. *Neuron* 7, 521-33.

Brendza, K. (2000). Khc gene annotation.

Brendza, K., Rose, D., Gilbert, S.P., and Saxton, W.M. (1999). Lethal Kinesin Mutations Reveal Amino Acids Important for ATPase Activation and Structural Coupling. *J Biol Chem* 274, 31506-14.

Cai, Q., Gerwin, C., and Sheng, Z.-H. (2005). Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *J Cell Biol* 170, 959-69.

Cai, Q., and Sheng, Z.H. (2009). Mitochondrial transport and docking in axons. *Exp Neurol* 218, 257-67.

Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., *et al.* (1998). Spastic

paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93, 973-83.

Chada, S.R., and Hollenbeck, P.J. (2004). Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol* 14, 1272-76.

Ciccarelli, F.D., Proukakis, C., Patel, H., Cross, H., Azam, S., Patton, M.A., Bork, P., and Crosby, A.H. (2003). The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia. *Genomics* 81, 437-41.

Craymer, L. (1980). New mutants report. *D I S* 55, 197-200.

De Michele, G., De Fusco, M., Cavalcanti, F., Filla, A., Marconi, R., Volpe, G., Monticelli, A., Ballabio, A., Casari, G., and Coccozza, S. (1998). A new locus for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 16q24.3. *Am J Hum Genet* 63, 135-9.

Depienne, C., Stevanin, G., Brice, A., and Durr, A. (2007). Hereditary spastic paraplegias: an update. *Curr Opin Neurol* 20, 674-80.

Diefenbach, R.J., Diefenbach, E., Douglas, M.W., and Cunningham, A.L. (2002). The Heavy Chain of Conventional Kinesin Interacts with the SNARE Proteins SNAP25 and SNAP23. *Biochemistry* 41, 14906-15.

Driscoll, M., and Gerstbrein, B. (2003). Dying for a cause: Invertebrate genetics takes on human neurodegeneration. *Nature* 4, 181-94.

Du, F., Ozdowski, E.F., Kotowski, I.K., Marchuk, D.A., and Sherwood, N.T. (2010). Functional conservation of human Spastin in a *Drosophila* model of autosomal dominant-hereditary spastic paraplegia. *Hum Mol Genet* 19, 1883-96.

Duncan, J.E., and Goldstein, L.S.B. (2006). The Genetics of Axonal Transport and Axonal Transport Disorders. *PLoS Genetics* 2, e124.

Ebbing, B., Mann, K., Starosta, A., Jaud, J., Schols, L., Schule, R., and Woehlke, G. (2008). Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity. *Hum Mol Genet* 17, 1245-52.

Evans, K., Keller, C., Pavur, K., Glasgow, K., Conn, B., and Luring, B. (2006). Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggests a common pathway for axonal maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10666-71.

Ferreirinha, F., Quattrini, A., Pirozzi, M., Valsecchi, V., Dina, G., Broccoli, V., Auricchio, A., Piemonte, F., Tozzi, G., Gaeta, L., *et al.* (2004). Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J Clin Invest* 113, 231-42.

Fink, J.K. (2003). Advances in the hereditary spastic paraplegias. *Experimental Neurology* 184, 106-10.

Fuger, P., Behrends, L.B., Mertel, S., Sigrist, S.J., and Rasse, T.M. (2007). Live imaging of synapse development and measuring protein dynamics using two-color fluorescence recovery after photo-bleaching at *Drosophila* synapses. *Nat Protoc* 2, 3285-98.

Gindhart, J.G., Jr., Desai, C.J., Beushausen, S., Zinn, K., and Goldstein, L.S.B. (1998). Kinesin Light Chains Are Essential for Axonal Transport in *Drosophila*. *J Cell Biol* 141, 443-54.

Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S., and Schwarz, T.L. (2006). Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 173, 545-57.

Goldstein, L.S.B. (1993). With Apologies to Scheherazade: Tails of 1001 Kinesin Motors. *Annual Review of Genetics* 27, 319-51.

Gould, R.M., and Brady, S.T. (2004). Neuropathology: Many Paths Lead to Hereditary Spastic Paraplegia. *Curr Biol* 14, R903-R04.

Gouw, J.W., Pinkse, M.W., Vos, H.R., Moshkin, Y., Verrijzer, C.P., Heck, A.J., and Krijgsveld, J. (2009). In vivo stable isotope labeling of fruit flies reveals post-transcriptional regulation in the maternal-to-zygotic transition. *Mol Cell Proteomics* 8, 1566-78.

Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M.H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N., *et al.* (1998). Axonal Swellings and Degeneration in Mice Lacking the Major Proteolipid of Myelin. *Science* 280, 1610-13.

Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annuar, A., Bowen, S., Lalli, G., Witherden, A.S., Hummerich, H., Nicholson, S., *et al.* (2003). Mutations in Dynein Link Motor Neuron Degeneration to Defects in Retrograde Transport. *Science* 300, 808-12.

Hall, D.H., and Hedgecock, E.M. (1991). Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* 65, 837-47.

Harding, A. (1981). Hereditary "pure" spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44, 871-83.

Hirokawa, N. (1996). The Molecular Mechanism of Organelle Transport along Microtubules: The Identification and Characterization of Kifs (Kinesin Superfamily Proteins). *Cell Struct Funct* 21, 357-67.

Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118, 5411-19.

- Horiuchi, D., Barkus, R.V., Pilling, A.D., Gassman, A., and Saxton, W.M. (2005). APLIP1, a Kinesin Binding JIP-1/JNK Scaffold Protein, Influences the Axonal Transport of Both Vesicles and Mitochondria in *Drosophila*. *Curr Biol* 15, 2137-41.
- Horn, C., Jaunich, B., and Wimmer, E.A. (2000). Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev Genes Evol* 210, 623-29.
- Howard, J., Hudspeth, A.J., and Vale, R.D. (1989). Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342, 154-8.
- Hurd, D.D., and Saxton, W.M. (1996). Kinesin Mutations Cause Motor Neuron Disease Phenotypes by Disrupting Fast Axonal Transport in *Drosophila*. *Genetics* 144, 1075-85.
- Joseph B. Duffy (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *genesis* 34, 1-15.
- Kanai, Y., Okada, Y., Tanaka, Y., Harada, A., Terada, S., and Hirokawa, N. (2000). KIF5C, a Novel Neuronal Kinesin Enriched in Motor Neurons. *J Neurosci* 20, 6374-84.
- Keshishian, H., Broadie, K., Chiba, A., and Bate, M. (1996). The *Drosophila* Neuromuscular Junction: A Model System for Studying Synaptic Development and Function. *Annu Rev Neurosci* 19, 545-75.
- Kikkawa, S., Matsumoto, M., Shida, K., Fukumori, Y., Toyoshima, K., and Seya, T. (2001). Human macrophages produce dimeric forms of IL-18 which can be detected with monoclonal antibodies specific for inactive IL-18. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 461-7.
- Koppen, M., Metodiev, M.D., Casari, G., Rugarli, E.I., and Langer, T. (2007). Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Biol* 27, 758-67.
- Kural, C., Kim, H., Syed, S., Goshima, G., Gelfand, V.I., and Selvin, P.R. (2005). Kinesin and Dynein Move a Peroxisome in Vivo: A Tug-of-War or Coordinated Movement? *Science* 308, 1469-72.
- Kurkulos, M., Weinberg, J.M., Pepling, M.E., and Mount, S.M. (1991). Polyadenylation in copia requires unusually distant upstream sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3038-42.
- Lee, M., Paik, S.K., Lee, M.J., Kim, Y.J., Kim, S., Nahm, M., Oh, S.J., Kim, H.M., Yim, J., Lee, C.J., *et al.* (2009). *Drosophila* Atlastin regulates the stability of muscle microtubules and is required for synapse development. *Dev Biol* 330, 250-62.

Ligon, L.A., Tokito, M., Finklestein, J.M., Grossman, F.E., and Holzbaur, E.L.F. (2004). A Direct Interaction between Cytoplasmic Dynein and Kinesin I May Coordinate Motor Activity. *J Biol Chem* 279, 19201-08.

Lindsley, D.L., and Zimm, G.G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J.E. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4 edn (W. H. Freeman and Company).

Lorrain, M. (1898). *Contribution a l'étude de la paraplégie spasmodique familiale*. Paris: Steinheil.

Martin, M., Iyadurai, S.J., Gassman, A., Gindhart, J.G., Jr., Hays, T.S., and Saxton, W.M. (1999a). Cytoplasmic Dynein, the Dynactin Complex, and Kinesin Are Interdependent and Essential for Fast Axonal Transport. *Mol Biol Cell* 10, 3717-28.

Martin, M., Iyadurai, S.J., Gassman, A., Gindhart, J.G., Jr., Hays, T.S., and Saxton, W.M. (1999b). Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport. *Mol Biol Cell* 10, 3717-28.

McDermott, C., White, K., Bushby, K., and Shaw, P. (2000). Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69, 150-60.

McDermott, C.J., Grierson, A.J., Wood, J.D., Bingley, M., Wharton, S.B., Bushby, K.M., and Shaw, P.J. (2003). Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann Neurol* 54, 748-59.

Miller, K.E., DeProto, J., Kaufmann, N., Patel, B.N., Duckworth, A., and Van Vactor, D. (2005). Direct Observation Demonstrates that Liprin-± Is Required for Trafficking of Synaptic Vesicles. *Curr Biol* 15, 684-89.

Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* 117, 2791-804.

Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2006). Direct evidence for coherent low velocity axonal transport of mitochondria. *J Cell Biol* 173, 373-81.

Namekawa, M., Muriel, M.P., Janer, A., Latouche, M., Dauphin, A., Debeir, T., Martin, E., Duyckaerts, C., Prigent, A., Depienne, C., *et al.* (2007). Mutations in the SPG3A gene encoding the GTPase atlastin interfere with vesicle trafficking in the ER/Golgi interface and Golgi morphogenesis. *Mol Cell Neurosci* 35, 1-13.

Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., and Hirokawa, N. (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79, 1209-20.

- Noda, Y., Sato-Yoshitake, R., Kondo, S., Nangaku, M., and Hirokawa, N. (1995). KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J Cell Biol* 129, 157-67.
- Nusslein-Volhard, C. (1994). Of flies and fishes. *Science* 266, 572-4.
- Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y., and Hirokawa, N. (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* 81, 769-80.
- Orso, G., Martinuzzi, A., Rossetto, M.G., Sartori, E., Feany, M., and Daga, A. (2005). Disease-related phenotypes in a *Drosophila* model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine. *J Clin Invest* 115, 3026-34.
- Pack-Chung, E., Kurshan, P.T., Dickman, D.K., and Schwarz, T.L. (2007). A *Drosophila* kinesin required for synaptic bouton formation and synaptic vesicle transport. *Nature Neurosci* 10, 980-89.
- Park, S.H., Zhu, P.-P., Parker, R.L., and Blackstone, C. (2010). Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network. *The Journal of Clinical Investigation* 120, 1097-110.
- Pilling, A.D., Horiuchi, D., Lively, C.M., and Saxton, W.M. (2006). Kinesin-1 and Dynein Are the Primary Motors for Fast Transport of Mitochondria in *Drosophila* Motor Axons. *Mol Biol Cell* 17, 2057-68.
- Pratt, R. (1967). *The genetics of neurological disorders*. Oxford University Press 44.
- Rasse, T.M. (2004). *In vivo* imaging of long-term changes in the *Drosophila* neuromuscular system. In *Neuroscience Program, Faculty of Biology (Göttingen, Georg August University)*.
- Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmid, A., Kittel, R.J., Mertel, S., Sigrist, C.B., Schmidt, M., Guzman, A., Merino, C., Qin, G., *et al.* (2005). Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation *in vivo*. *Nat Neurosci* 8, 898-905.
- Ray, K., Perez, S.E., Yang, Z., Xu, J., Ritchings, B.W., Steller, H., and Goldstein, L.S.B. (1999). Kinesin-II Is Required for Axonal Transport of Choline Acetyltransferase in *Drosophila*. *J Cell Biol* 147, 507-18.
- Reid, E., Dearlove, A.M., Rhodes, M., and Rubinsztein, D.C. (1999). A New Locus for Autosomal Dominant "Pure" Hereditary Spastic Paraplegia Mapping to Chromosome 12q13, and Evidence for Further Genetic Heterogeneity. *Am J Hum Genet* 65, 757-63.

- Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S., Svenson, I., Graham, F., Gaskell, P., Dearlove, A., Pericak-Vance, M., *et al.* (2002). A Kinesin Heavy Chain (KIF5A) Mutation in Hereditary Spastic Paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet* 71, 1189-94.
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., and Bier, E. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11, 1114-25.
- Rice, S., Lin, A.W., Safer, D., Hart, C.L., Naber, N., Carragher, B.O., Cain, S.M., Pechatnikova, E., Wilson-Kubalek, E.M., Whittaker, M., *et al.* (1999). A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402, 778-84.
- Ritzenthaler, S., and Chiba, A. (2001). Multiple personalities: Synaptic target cells as introverts and extroverts. *Dev Growth Differ* 43, 503-08.
- Rubin, G.M., and Lewis, E.B. (2000). A Brief History of *Drosophila*'s Contributions to Genome Research. *Science* 287, 2216-18.
- Salinas, S., Proukakis, C., Crosby, A., and Warner, T.T. (2008). Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *The Lancet Neurology* 7, 1127-38.
- Sanderson, C.M., Connell, J.W., Edwards, T.L., Bright, N.A., Duley, S., Thompson, A., Luzio, J.P., and Reid, E. (2006). Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Hum Mol Genet* 15, 307-18.
- Sang, T.-K., and Jackson, G.R. (2005). *Drosophila* Models of Neurodegenerative Disease. *NeuroRx* 2, 438-46.
- Saxton, W.M., Hicks, J., Goldstein, L.S., and Raff, E.C. (1991a). Kinesin heavy chain is essential for viability and neuromuscular functions in *Drosophila*, but mutants show no defects in mitosis. *Cell* 64, 1093-102.
- Saxton, W.M., Hicks, J., Goldstein, L.S.B., and Raff, E.C. (1991b). Kinesin heavy chain is essential for viability and neuromuscular functions in *Drosophila*, but mutants show no defects in mitosis. *Cell* 64, 1093-102.
- Schule, R., Kremer, B.P.H., Kassubek, J., Auer-Grumbach, M., Kostic, V., Klopstock, T., Klimpe, S., Otto, S., Boesch, S., van de Warrenburg, B.P., *et al.* (2008). SPG10 is a rare cause of spastic paraplegia in European families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 584-87.
- Schuster, C.M. (2006). Glutamatergic synapses of *Drosophila* neuromuscular junctions: a high-resolution model for the analysis of experience-dependent potentiation. *Cell Tissue Res* 326, 287-99.

- Schuster, C.M., Graeme W. Davis, Richard D. Fetter, and Goodman, C.S. (1996). Genetic Dissection of Structural and Functional Components of Synaptic Plasticity. II. Fasciclin II Controls Presynaptic Structural Plasticity. *Neuron* 17, 655–67.
- Seog, D., Lee, D., and Lee, S. (2004). Molecular motor proteins of the kinesin superfamily proteins (KIFs): structure, cargo and disease. *J Korean Med Sci* 19(1), 1-7.
- Socolich, M. (2003). *Drosophila Genetics*.
- Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rehm, E.J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S., and Rubin, G.M. (1999a). The Berkeley Drosophila Genome Project Gene Disruption Project: Single P-Element Insertions Mutating 25% of Vital Drosophila Genes. *Genetics* 153, 135-77.
- Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Lavery, T., Mozden, N., Misra, S., and Rubin, G.M. (1999b). The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. *Genetics* 153, 135-77.
- Strümpell, A. (1880). Beiträge zur Pathologie des Rückenmarks. I. Spastische Spinalparalysen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 10, 676-717.
- Strümpell, A. (1883). Über die hereditäre spastische Spinalparalyse. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 4, 173–88.
- Takeda, S., Yamazaki, H., Seog, D.-H., Kanai, Y., Terada, S., and Hirokawa, N. (2000). Kinesin Superfamily Protein 3 (KIF3) Motor Transports Fodrin-associating Vesicles Important for Neurite Building. *J Cell Biol* 148, 1255-66.
- Tarrade, A., Fassier, C., Courageot, S., Charvin, D., Vitte, J., Peris, L., Thorel, A., Mouisel, E., Fonknechten, N., Roblot, N., *et al.* (2006). A mutation of spastin is responsible for swellings and impairment of transport in a region of axon characterized by changes in microtubule composition. *Hum Mol Genet* 15, 3544-58.
- Tomishige, M., Klopfenstein, D.R., and Vale, R.D. (2002). Conversion of Unc104/KIF1A Kinesin into a Processive Motor After Dimerization. *Science* 297, 2263-67.
- Trotta, N., Orso, G., Rossetto, M.G., Daga, A., and Broadie, K. (2004). The Hereditary Spastic Paraplegia Gene, spastin, Regulates Microtubule Stability to Modulate Synaptic Structure and Function. *Curr Biol* 14, 1135-47.
- Tsukita, S., and Ishikawa, H. (1980). The movement of membranous organelles in axons. Electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles. *J Cell Biol* 84, 513-30.

- Vale, R.D., and Fletterick, R.J. (1997). The design plan of kinesin motors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13, 745-77.
- Vale, R.D., and Milligan, R.A. (2000). The Way Things Move: Looking Under the Hood of Molecular Motor Proteins. *Science* 288, 88-95.
- Wagner, O.I., J. Lifshitz, P.A. Janmey, M. Linden, T.K. McIntosh, and Leterrier, J.F. (2003). Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. *J Neurosci* 23, 9046-58.
- Woehlke, G., Ruby, A.K., Hart, C.L., Ly, B., Hom-Booher, N., and Vale, R.D. (1997a). Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell* 90, 207-16.
- Woehlke, G., Ruby, A.K., Hart, C.L., Ly, B., Hom-Booher, N., and Vale, R.D. (1997b). Microtubule Interaction Site of the Kinesin Motor. *Cell* 90, 207-16.
- Xia, C.H., Roberts, E.A., Her, L.S., Liu, X., Williams, D.S., Cleveland, D.W., and Goldstein, L.S. (2003). Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *J Cell Biol* 161, 55-66.
- Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y., and Hirokawa, N. (1995). KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J Cell Biol* 130, 1387-99.
- Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R.D., and Selvin, P.R. (2004). Kinesin Walks Hand-Over-Hand. *Science* 303, 676-78.
- Yin, X., Kidd, G.J., Piro, E.P., McDonough, J., Dutta, R., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Messing, A., Wyatt, R.M., Balice-Gordon, R.J., *et al.* (2004). Dysmyelinated Lower Motor Neurons Retract and Regenerate Dysfunctional Synaptic Terminals. *J Neurosci* 24, 3890-98.
- Yoshihara, M., Ensminger, A.W., and Littleton, J.T. (2001). Neurobiology and the *Drosophila* genome. *Funct Integ Genomics* 1, 235-40.
- Zhang, Y., Fügler, P., Hannan, S., Kern, J., Lasky, B., and Rasse, T. (2010). In vivo Imaging of Intact *Drosophila* Larvae at Sub-cellular Resolution. *J Vis Exp* 43.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., *et al.* (2001a). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bb. *Cell* 105, 587-97.
- Zhao, X., Alvarado, D., Rainier, S., Lemons, R., Hedera, P., Weber, C.H., Tukul, T., Apak, M., Heiman-Patterson, T., Ming, L., *et al.* (2001b). Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet* 29, 326-31.

Züchner, S., Wang, G., Tran-Viet, K., Nance, M., Gaskell, P., Vance, J., Ashley-Koch, A., and Pericak-Vance, M. (2006). Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31. *Am J Hum Genet* 79(2), 365-9.

## 10 Danksagung

Prof. Dr. Schöls gilt mein besonderer Dank für die Möglichkeit am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung promovieren zu dürfen. In einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre verstand er es stets, mich mit seinem großen fachlichen Wissen und menschlicher Kompetenz zu unterstützen.

Dr. Rasse danke ich für die hervorragende, geduldige Betreuung in den manchmal zäheren Phasen der Arbeit.

Besonderer Dank gebührt dem gesamten Drosophila-Team des Hertie-Instituts, das mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Petra Füger und Raphael Zinser danke ich für ihre Hilfe bei den Verhaltensfilmen und den Präparaten.

Jeannine Kern danke ich für ihre Hilfe mit den HSP-Mutanten.

Yao Zhang danke ich für seine Hilfe beim *in vivo* imaging.

Katharina Koczik und Daniel Kautman möchte ich für die konstruktive Kritik und Geduld während der Entstehung dieser Arbeit herzlich danken.

Besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern, Elisabeth Biller-Siegert und Hermann Siegert, bedanken, die mir mein Studium erst ermöglichten.

