

Ein *Drosophila*- Modell der
Amyotrophen Lateralsklerose zur Identifizierung
pathogener *DCTN1*-Mutationen



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III –
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Cornelia Bleyl
aus Rodewisch im Vogtland
im Jahr 2013

Promotionsgesuch eingereicht am: 25.06.2013
Die Arbeit wurde angeleitet von: **Prof. Dr. Stephan Schneuwly**

Cornelia Bleyl

"The great tragedy of Science - the slaying of a beautiful hypothesis by an ugly fact."

Thomas Henry Huxley

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Zusammenfassung.....	5
Kapitel I: Einleitung.....	7
Einleitung	8
1 Die Motoneuronerkrankung Amyotrophe Lateralsklerose	9
1.1 Pathogenese	11
1.1.1 Genetische Faktoren	11
1.1.2 Weitere Risikofaktoren.....	13
2 Dynaktin und seine Untereinheit p150 ^{Glued}	14
2.1 Aufbau des Multiproteinkomplexes Dynaktin.....	14
2.2 Struktur der Untereinheit p150 ^{Glued}	15
2.3 Die Bedeutung des Multiproteinkomplexes Dynaktin.....	16
2.3.1 Die Bedeutung von Dynaktin in der Entwicklung.....	16
2.3.2 Die Funktion von Dynaktin beim axonalen Transport	17
3 Mutationen im Gen <i>DCTN1</i>	19
3.1 Die <i>DCTN1</i> -Mutation G59S und die Distale Hereditäre Motoneuropathie TypVII....	19
3.2 Weitere potentiell pathogene <i>DCTN1</i> -Mutationen.....	20
4 Ein <i>Drosophila melanogaster</i> -Modell für ALS.....	21
5 Zielsetzung der Arbeit	23
Kapitel II: Material und Methoden	24
Material und Methoden	25
1 Material	25
1.1 Organismen	25
1.1.1 Bakterien	25
1.1.2 Fliegen.....	25
1.2 Puffer und Lösungen	27
1.3 Oligonukleotide	28
1.4 Enzyme und Kits	29
1.5 Farbstoffe.....	29
1.6 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	29
1.7 Antikörper	30
1.8 Geräte	30
1.9 Software.....	31

2	Methoden.....	32
2.1	Statistische Auswertungen.....	32
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1	Nukleinsäuren.....	33
2.2.1.1	Extraktion genomischer DNA.....	33
2.2.1.2	Sequenzierung.....	33
2.2.1.3	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	33
2.2.1.4	Hitzeschocktransformation	34
2.2.1.5	Mini-Präparation.....	34
2.2.2	Proteine.....	35
2.2.2.1	Immunoblot-Verfahren	35
2.3	Histologische Methoden	37
2.3.1	Antikörperfärbungen von Ganzpräparaten	37
2.3.1.1	Anfertigung von Ganzpräparaten (<i>whole mounts</i>)	37
2.3.1.2	Färbeprotokolle und Auswertung	37
2.3.2	Axonaler Mitochondrientransport	39
2.3.2.1	Anästhesierung der Larven	39
2.3.2.2	Einbettung.....	39
2.3.2.3	<i>Life Imaging</i>	40
2.3.2.4	Auswertung.....	41
2.4	Fliegenzucht, Keimbahntransformation und genetische Methoden.....	42
2.4.1	Fliegenzucht	42
2.4.2	Keimbahntransformation	42
2.4.2.1	Mikroinjektion	42
2.4.2.2	Selektion der Transformanten.....	43
2.4.2.3	Etablierung stabiler Linien.....	43
2.4.3	Genetische Methoden	44
2.4.3.1	Zeit- und gewebespezifische Expression von humanen und <i>Drosophila</i> Genen	44
2.4.3.2	„Jump-out“-Kreuzungen	44
2.4.3.3	Rekombinationskreuzungen.....	44
2.5	Verhaltensversuche.....	45
2.5.1	Beobachtung des Krabbelverhaltens (<i>tail-flipping</i>)	45
2.5.2	Negative-Geotaxis-Tests	45
2.5.3	Lokomotor-Aktivitäts-Analyse.....	45
2.5.3.1	Aufnahme der Lokomotor-Aktivität	45
2.5.3.2	Analyse der Lokomotor-Aktivität.....	46

Kapitel III: Ergebnisse	47
Ergebnisse	48
1 Expression von humanem <i>DCTN1</i> in <i>Drosophila</i>	48
1.1 Etablierung stabiler transgener UAS-DCTN1-Linien	49
1.2 Validierung der transgenen UAS-DCTN1-Linien	50
1.2.1 Bestimmung der relativen <i>DCTN1</i> -mRNA-Expression der Linien	50
1.2.2 Relative Proteinexpression der UAS-DCTN1-Linien	51
2 <i>DCTN1</i> -Überexpression führt zu Entwicklungsstörungen	53
2.1 Ubiquitäre Überexpression der UAS-DCTN1-Konstrukte	54
2.2 Augenspezifische Überexpression der UAS-DCTN1-Konstrukte	55
3 <i>DCTN1</i> beeinträchtigt die motorischen Fähigkeiten von <i>Drosophila</i>	57
3.1 Analyse des Negativen-Geotaxis-Verhaltens	58
3.2 Lokomotor-Aktivitäts-Analyse	60
4 <i>DCTN1</i> -Überexpression führt zu schwachen neurodegenerativen Phänotypen	63
4.1 <i>DCTN1</i> -Expression in dopaminergen Neuronen	64
4.2 <i>DCTN1</i> -Expression in neuropeptidergen Neuronen	66
5 G59S führt zu p150 ^{Glued} -Aggregation in <i>Drosophila</i>	70
5.1 <i>DCTN1</i> -Expression in larvalen Muskeln	70
5.2 Spezifische <i>DCTN1</i> -Expression in Motoneuronen	73
5.2.1 G59S aggregiert in Axonen der Motoneuronen	73
5.2.2 P150 ^{Glued} -Verteilung in larvalen Axonen	75
6 Überexpression von <i>DCTN1</i> führt zu Störungen des axonalen Transports	78
6.1 <i>DCTN1</i> -Überexpression beeinträchtigt den axonalen Vesikeltransport	79
6.2 <i>DCTN1</i> -Überexpression beeinträchtigt den axonalen Organellentransport	82
6.2.1 Etablierung des Mitochondrien-Trackings zur <i>in-vivo</i> -Untersuchung des axonalen Transports	82
6.2.2 <i>DCTN1</i> -Überexpression beeinträchtigt den axonalen Mitochondrientransport	83
6.2.2.1 P150 ^{Glued} beim anterograden Mitochondrientransport	83
6.2.2.2 P150 ^{Glued} beim retrograden Mitochondrientransport	85
6.3 <i>DCTN1</i> -Überexpression führt zu posteriorer Paralyse	88
6.4 P150 ^{Glued} -Akkumulation in axonalen Organellen- und Vesikelstaus	89
6.4.1 Mitochondrien akkumulieren in Segmentalnerven nach motoneuronspezifischer p150 ^{Glued} -Expression	90
6.4.2 P150 ^{Glued} akkumuliert in larvalen Axonen nach motoneuronspezifischer Expression ..	93
6.4.3 Die p150 ^{Glued} -, Vesikel- und Organellenanhäufungen in larvalen Segmentalnerven sind koinzident	95

Kapitel IV: Diskussion.....	98
Diskussion.....	99
1 Ein <i>Drosophila</i> -Modell für ALS assoziierte Motoneuronerkrankungen	99
1.1 Überexpression von humanem <i>DCTN1</i> in <i>Drosophila</i>	99
1.2 Die Überexpression funktioneller <i>DCTN1</i> -Konstrukte führt zu schweren Entwicklungsstörungen in <i>Drosophila</i>	102
1.3 <i>DCTN1</i> -Mutationen beeinträchtigten die motorischen Fähigkeiten von <i>Drosophila</i> .	105
1.4 Die Überexpression von <i>DCTN1</i> verursacht eine schwache Neurodegeneration	107
1.5 <i>DCTN1</i> -Überexpression führt zur Aggregatbildungen und verändert die zelluläre p150 ^{Glued} -Verteilung	109
1.5.1 P150 ^{Glued} -Aggregation in <i>Drosophila</i>	109
1.5.2 G59S und E34Q beeinträchtigen die Assoziation von p150 ^{Glued} mit den Mikrotubuli	111
1.6 <i>DCTN1</i> -Überexpression beeinträchtigt den axonalen Transport	113
2 Charakterisierung der neu identifizierten <i>DCTN1</i> -Sequenzvarianten	118
2.1 Die stillen Mutationen: R149Q, M571T, Y878C und T1249I.....	118
2.2 Die potentiell pathogenen Kandidaten: D63Y, R148W, I196V und R1049Q	118
2.3 Die Mutation E34Q- ein pathogener Risikofaktor.....	120
Kapitel V: Anhang	122
Anhang	123
1 Ergänzende Daten.....	123
1.1 Fliegenlinien	123
1.1.1 Neu etablierte p{w[+] UAS- DCTN1-Flag}- Linien	123
1.1.2 Weitere p{w[+] UAS- DCTN1-Flag}- Linien.....	125
1.2 Entwicklungsstörungen	126
1.3 <i>DCTN1</i> beeinträchtigt die motorischen Fähigkeiten.....	129
1.3.1 Negative-Geotaxis	129
1.3.2 Lokomotor-Aktivität.....	132
1.4 Mitochondrientransport	134
2 Abkürzungen	135
3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnisse.....	137
3.1 Tabellenverzeichnis	137
3.2 Abbildungsverzeichnis	138
4 Literaturverzeichnis.....	140

Zusammenfassung

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine degenerative Erkrankung der Motoneuronen. ALS tritt zumeist sporadisch auf, dennoch sind auch genetisch bedingte Erkrankungen bekannt. Zu den genetischen Risikofaktoren zählen unter anderem Mutationen im Gen *DCTN1*. Das Gen *DCTN1* kodiert für die Untereinheit p150^{Glued} des Multiproteinkomplexes Dynaktin. Dynaktin interagiert mit dem Motorprotein Dynein und wird für einen koordinierten axonalen Transport benötigt. Darüber hinaus spielt der Multiproteinkomplex eine wesentliche Rolle in der Entwicklung. Für den Aminosäureaustausch G59S in p150^{Glued} konnte Kosegregation mit der ALS assoziierten Distalen Hereditären Motoneuropathie TypVII nachgewiesen werden. In den letzten Jahren wurden noch weitere potentielle *DCTN1*-Mutationen identifiziert. Jedoch konnte für keine dieser allelischen Varianten Kosegregation nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde ein auf Überexpressionsanalysen basierendes *Drosophila melanogaster*-Modell für ALS entwickelt. Im *Drosophila*-Modell führt die Überexpression der dHMN7B verursachenden Mutation G59S zu einem altersabhängigen Verlust der motorischen Fähigkeiten. Des Weiteren aggregiert das mutante Protein in den Zellen und dissoziert von den Mikrotubuli. Sowohl Tiere, die das wildtypische Protein als auch die mutante Version exprimieren zeigen Neurodegeneration. Es konnte aber kein erhöhter Zellverlust in G59S-Tieren beobachtet werden. Die Überexpression des wildtypischen Proteins führt zu schweren Entwicklungsstörungen, wohingegen die mutante Version p150^{Glued}-G59S kaum Probleme in der Entwicklung verursacht. Ein ähnliches Phänomen konnte auch in den Untersuchungen zum axonalen Transport beobachtet werden. Auch hier resultiert die Überexpression des wildtypischen *DCTN1* in gravierenden Beeinträchtigungen des axonalen Transports. Die Mutation G59S führt hingegen nur zu milden Transportdefekten. Möglicherweise führt die Überexpression des funktionellen Proteins zu Störungen bei der Komplexbildung, wohingegen die mutante Version die Integrität des Dynaktinkomplexes nicht beeinträchtigt. Das *Drosophila*-Modell ermöglicht es also Untersuchungen zur Funktion des Multiproteinkomplexes Dynaktin vorzunehmen und zeigt in der Tat nach Überexpression der *DCTN1*-Variante G59S Phänotypen einer

Motoneuronerkrankung. Mit Hilfe dieses ALS-Modells wurden dann neue potentiell pathogene Mutationen im Gen *DCTN1* hinsichtlich ihrer funktionellen Auswirkungen in *Drosophila* charakterisiert und in pathogene Risikofaktoren bzw. benigne Polymorphismen eingeteilt. Die Charakterisierung der verschiedenen neu identifizierten *DCTN1*-Sequenzvarianten zeigte, dass sich einige der Mutationen (R149Q, M571T, Y878C und T1249I) in allen Analysen wie die Überexpression des wildtypischen Proteins verhalten. Diese allelischen *DCTN1*-Varianten können als pathogene Risikofaktoren für ALS ausgeschlossen werden. Eine Reihe der *DCTN1*-Varianten (D63Y, R148W, I196V und R1049Q) zeigten ebenfalls in den meisten Untersuchungen die gleichen Eigenschaften bzw. Phänotypen wie das wildtypische Protein. Dennoch konnten in all diesen Mutationen auch starke Beeinträchtigungen der motorischen Fähigkeiten bzw. der Lokomotoraktivität nachgewiesen werden. Ebenso resultierte die Überexpression dieser Mutationen in einer veränderten zellulären Verteilung des Proteins. Dies legt nahe, dass es sich bei diesen *DCTN1*-Formen wahrscheinlich eher um Risikofaktoren handelt, die Teil eines polygenetischen Erbgangs sind oder die Prädisposition für ALS erhöhen. Die Überexpression, der in derselben Domäne wie G59S liegenden Mutation E34Q, zeigt in fast jedem Parameter ein vom wildtypischen Protein abweichendes Verhalten. Bemerkenswert ist zudem, dass E34Q häufig zu den gleichen Effekten bzw. Defekten führt wie die Mutation G59S. Die Mutation E34Q ist damit ein viel versprechender Kandidat für eine tatsächlich ALS verursachende Mutation und sollte im Säugermodell weiter untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein verlässliches neues Tiermodell für ALS etabliert werden, das es ermöglicht die Pathogenese der selektiven Erkrankung der Motoneurone besser verstehen zu können. Zudem ist es gelungen, anhand dieses Modells für die Krankheitsentstehung wichtige Mutationen beziehungsweise Risikofaktoren zu identifizieren.

Kapitel I: Einleitung

Einleitung

Von der Drosophila-Mutante bis zum Risikofaktor für neuronale Erkrankungen

Im Jahr 1934 beschrieben Plough und Ives ein Allel (Gl^l) auf dem dritten Chromosom von *Drosophila*, welches zu schweren Störungen der Augenentwicklung führt. Da die Augen der Fliegen aussahen, als wären sie mit einer Schicht getrockneten Leims überzogen, nannten sie das betroffene Gen **glued** (Plough & Ives 1934). Mehr als 60 Jahre später wurde dieser Entwicklungsphänotyp weiter charakterisiert. Gl^l beeinflusst unter anderem die Zellkernwanderung, die Mitose, die Rhabdomermorphogenese und die Festlegung des Zellschicksals während der Retinaentwicklung in der Augenscheibe (Fan & Ready 1997). 1996 wurde Glued als funktionelles Homolog eines 150 kDa großen Proteins in Vertebraten identifiziert. Da dieses als Dynein-Aktivator galt, wurde das Vertebraten-Homolog zunächst Dynakin genannt (Gill et al. 1991; Holzbaur et al. 1991; Waterman-Storer & Holzbaur 1996). Paschal et al. zeigten 1993, dass Dynakin nur eine Untereinheit eines größeren Dynein aktivierenden Multiproteinkomplexes ist. Sie nannten es folglich nach seiner Größe und seinem *Drosophila* Verwandten **p150^{Glued}**, eine Untereinheit des Dynein-Aktivators **Dynakin** (Paschal et al. 1993). 1997 konnte nachgewiesen werden, dass die Interaktion zwischen Dynein und Dynakin eine bedeutende Rolle beim axonalen Transport innehat (Waterman-Storer et al. 1997). Im Jahr 2003 wurden erstmals Mutationen im $p150^{Glued}$ kodierenden Gen **DCTN1** als Risikofaktor für eine seltene Form der Motoneuronerkrankung Amyotrophe Lateralsklerose identifiziert (Puls et al. 2003). Bis heute wurden noch viele weitere Mutationen im Gen *DCTN1* entdeckt, die als potentielle Risikofaktoren für neuronale Erkrankungen diskutiert werden (Munch et al. 2004; Farrer et al. 2009; Vilarino-Guell et al. 2009; Stockmann et al. 2012).

1 Die Motoneuronerkrankung Amyotrophe Lateral-sklerose

Unter dem Begriff Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) versteht man eine heterogene Gruppe verschiedener schwerer Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems. Sie ist gekennzeichnet durch ein breites Spektrum an unterschiedlichen Symptomen und Ursachen. Dennoch verbindet die in dieser Gruppe zusammengefassten Erkrankungen, dass vor allem das motorische Nervensystem und somit die willkürliche Steuerung der Muskeln betroffen ist. Charakteristisch ist dabei eine chronisch progrediente Degeneration des ersten und/oder des zweiten Motoneurons (Abbildung 1), die sich in zentralen und peripheren Lähmungen manifestiert (Almer 2003; Shaw 2005; Dengler 2011).

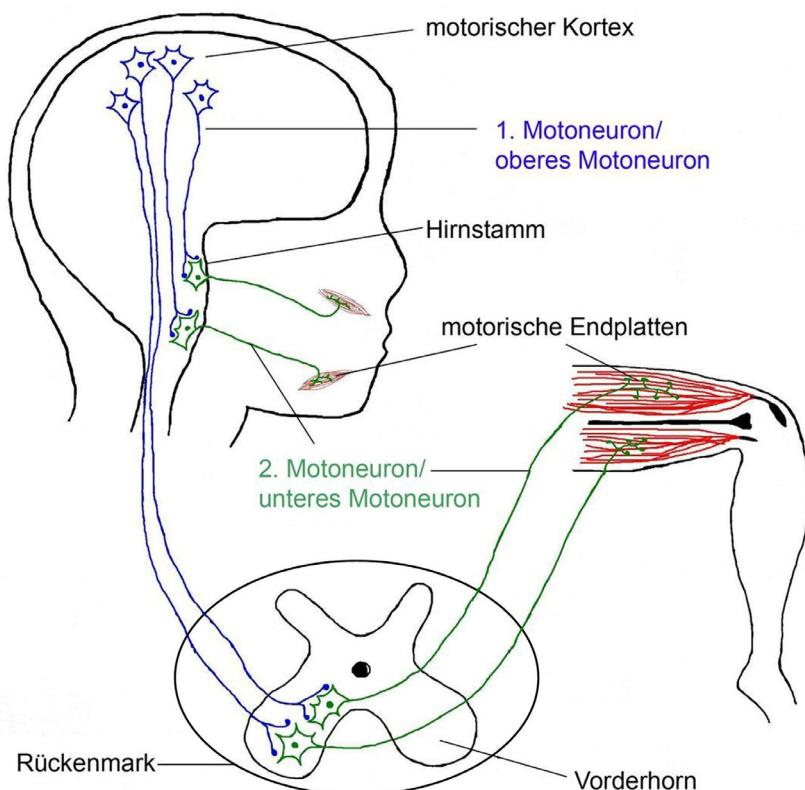


Abbildung 1: Schematische Darstellung des motorischen Systems. Das motorische System steuert willkürliche Muskelbewegungen wie z.B. das Kauen und das Gehen. Die oberen Motoneuronen ziehen als Pyramidenbahn in den Hirnstamm oder in das Vorderhorn des Rückenmarks. Dort findet eine Umschaltung auf die unteren Motoneuronen statt. Diese ziehen zu den Muskeln und über die motorischen Endplatten wird die Erregung auf den Muskel übertragen.

Der Verlust der oberen Motoneuronen äußert sich in Muskelschwäche, spastischen Lähmungen sowie hyperaktiven Reflexen. Typische Symptome für die Degeneration der unteren Motoneuronen sind reduzierte Reflexe, Muskelschwund (Atrophie), Muskelschwäche (Parese) und unwillkürliches Muskelzucken (Faszikulationen). Sind dabei die motorischen Nerven im Hirnstamm betroffen, kommt es zu einer Schwächung der Sprach-, Kau- und Schluckmuskulatur. Die Erkrankung der vom Rückenmark zum Muskel verlaufenden Vorderhornzellen führt zur Beeinträchtigung der Atemmuskulatur sowie der Extremitäten. Die Sensorik sowie die Kontrolle von Blase und Darm bleiben zumeist unverändert (Almer 2003; Shaw 2005; Dengler 2011; Pratt *et al.* 2012; Rossor *et al.* 2012). In post-mortem Untersuchungen von Patientengehirnen und deren Rückenmarke zeigte sich, dass neuronale Atrophie und zelluläre Einschlüsse charakteristische pathophysiologische Merkmale der Erkrankung sind. Weitere typische Kennzeichen sind: Beeinträchtigungen des Zytoskeletts, des axonalen Transports und der Mitochondrien sowie eine p53 vermittelte Apoptose, oxidativer Stress und Proliferation aktiver Mikrogliazellen (Kawamata *et al.* 1992; Barbosa *et al.* 2010; Bilsland *et al.* 2010; Shi *et al.* 2010; Miana-Mena *et al.* 2011; Pratt *et al.* 2012). Viele Patienten haben außerdem einen unregelmäßigen Glutamatmetabolismus. Das bisher einzige erfolgreich eingesetzte Medikament Riluzol zielt darauf ab, die damit einhergehenden Nervenzellschädigungen durch die exzessive Stimulation der Glutamatrezeptoren zu verringern bzw. zu verlangsamen (Plaitakis & Caroscio 1987).

Der Krankheitsverlauf endet in 80% aller Fälle ein bis fünf Jahre nach Auftreten der ersten Symptome tödlich, meist durch respiratorisches Versagen. Obwohl ALS in allen Alterstufen ausbrechen kann, steigt das Erkrankungsrisiko ab einem Alter von 60 Jahren an. Mit einer Inzidenz von 0,5 bis zwei Neuerkrankungen pro 100.000 Menschen und einer Prävalenz von ca. zwei bis drei Patienten pro 100.000 Personen handelt es sich um die häufigste Motoneuronerkrankung (MND) im Erwachsenenalter. ALS tritt weltweit mit einer weitestgehend konstanten geographischen und ethnischen Inzidenz auf (Almer 2003). Eine Ausnahme bildet dabei ein gehäuftes Auftreten der Krankheit auf der Westpazifik-Insel Guam. Die einheimischen Chamorros leiden an einer besonderen endemischen Form der ALS, die sich auch in Parkinson ähnlichen Symptomen und Demenz äußert. Obwohl familiäre Häufungen beschrieben wurden, ist es nicht gelungen einen Einfluss

genetischer Faktoren nachzuweisen (Bailey-Wilson *et al.* 1993; McGeer *et al.* 1997). Ebenso konnte ein Einfluss äußerer Faktoren nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (Dastur 1964; Spencer 1987; Spencer *et al.* 1987; Kurland 1988; Perry *et al.* 1989; Duncan *et al.* 1990). Es ist also trotz intensiver Bemühungen nicht gelungen die pathogenen Mechanismen der endemischen Erkrankung aufzuklären (Almer 2003).

1.1 Pathogenese

Etwa 90 bis 95 Prozent aller ALS-Fälle erscheinen ohne genetische Komponente und werden als sporadische ALS (sALS) bezeichnet. Bei den verbleibenden fünf bis zehn Prozent handelt es sich um die so genannte familiäre Form der Amyotrophen Lateralsklerose (fALS), welche häufig dominant vererbt wird. Interessanterweise konnten weder klinische noch neuropathologische Unterschiede zwischen sporadischer und familiärer ALS nachgewiesen werden (Shaw 2005; Pratt *et al.* 2012).

Bisher wurden bereits verschiedene genetische Risikofaktoren identifiziert, dennoch scheint es sich bei ALS in den meisten Fällen um keine monogenetische Erkrankung zu handeln. Vielmehr wird angenommen, dass ein komplexes Zusammenspiel verschiedener genetischer Faktoren und äußerer Einflüsse für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich ist (Shaw 2005; Pratt *et al.* 2012).

1.1.1 Genetische Faktoren

Die genetischen Ursachen für ALS erscheinen so mannigfaltig wie die Ausprägungen bzw. Formen der Motoneuronerkrankung selbst (Tabelle 1). Eine der häufigsten genetischen Ursachen sind Mutationen im Gen *Superoxid-Dismutase1* (*SOD1*), welches für das Enzym Superoxid-Dismutase1 kodiert. Um die zwanzig Prozent aller dominant vererbten fALS-Fälle sind auf über 150 Mutationen in *SOD1* zurückzuführen. Das Enzym SOD1 wandelt bei der Zellatmung entstehende freie Superoxid-Radikale in Wasserstoffperoxid um. SOD1 ist kein motoneuronspezifisches Protein, sondern wird ubiquitär exprimiert. Es bleibt bis heute ungeklärt, warum gerade Motoneuronen so spezifisch auf Mutationen in *SOD1* reagieren. Neuste Studien zeigten, dass verschiedene am RNA-Metabolismus beteiligte Gene, wie zum Beispiel *TDP-43* (*TAR DNA Binding Protein-43*), *FUS*

(*Fused in sarcoma*), *OPTN* (Optineurin) und *ANG* (Angiogenin), ebenfalls im Zusammenhang mit fALS stehen. Ein weiterer Risikofaktor sind Mutationen im Gen *DCTN1*, welches für die Untereinheit p150^{Glued} des Proteinkomplexes Dynaktin kodiert. Dynaktin interagiert mit dem Motorprotein Dynein und ist direkt an intrazellulären Transportprozessen beteiligt (Gill *et al.* 1991; King & Schroer 2000; Shaw 2005; Pratt *et al.* 2012). Mutationen in einigen der hier aufgeführten Gene wurden jedoch nicht nur in fALS gefunden, sondern konnten auch in Patienten mit sporadisch auftretender ALS nachgewiesen werden (Tabelle 1).

Gen	Locus	Protein	ALS-Typ	Erbgang
<i>SOD1</i> *	21q22.1	Cu, Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1)	ALS1	autosomal-dominant
<i>FUS</i> *	16p11.2	Fused in sarcoma (FUS)	ALS6	autosomal-dominant
<i>ANG</i> *	14q11.1	Angiogenin (ANG)	ALS9	autosomal-dominant
<i>TARDBP</i> *	1p36.22	TAR DNA binding protein-43 (TDP-43)	ALS10	autosomal-dominant
<i>OPTN</i> *	10p13	Optineurin	ALS12	autosomal-dominant
<i>C9ORF72</i> *	9p21	C9ORF72	ALS-FTD	autosomal-dominant
<i>SETX</i>	9q34.13	Senataxin	ALS4	autosomal-dominant
<i>ALS3</i>	18q21	ALS3	ALS3	autosomal-dominant
<i>ALS7</i>	20p13	ALS7	ALS7	autosomal-dominant
<i>VAPB</i>	20q13.33	VAMP-associated protein B	ALS8	autosomal-dominant
<i>FIG4</i>	6q21	Phosphoinositide5-Phosphatase	ALS11	autosomal-dominant
<i>VCP</i>	9p13.3	Valosin-containing protein	ALS14	autosomal-dominant
<i>DCTN1</i>	2p13	p150 ^{Glued} (Dynaktin)	ALS-LMD dHMN7B	autosomal-dominant
<i>ALS2</i>	2q33.1	Alsin	ALS2	autosomal-rezessiv
<i>SPG11</i>	15q15.1	Spatacsin	ALS5	autosomal-rezessiv
<i>UBQLN2</i>	Xp11.2	Ubiquilin-2	ALS15	X-chromosomal-dominant

Tabelle 1: Übersicht über die häufigsten bekannten genetischen Risikofaktoren für ALS. LMD: Lower Motoneuron Disease, dHMN7B: Distale Hereditäre Motoneuropathie Typ VII, *: auch in sALS dokumentiert (Pratt *et al.* 2012).

Ein bemerkenswerter Fall von sporadisch auftretender ALS ist der vierfach erhöhte Anstieg der ALS-Inzidenz unter den Golfkriegsveteranen mit einem erheblich jüngeren Erkrankungsalter (Horner *et al.* 2003). Bis heute sind die Ursachen der höheren Erkrankungsrate unter den Veteranen nicht aufgeklärt, obgleich es Hinweise darauf gibt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Einsatzgebiet der Soldaten und dem Anstieg der Inzidenz besteht (Miranda *et al.* 2008). Dieses Phänomen der Golfkriegs-ALS zeigt deutlich, dass neben den genetischen Faktoren auch

Umwelteinflüsse von besonderer Bedeutung bei der Entstehung der Krankheit sein können.

1.1.2 Weitere Risikofaktoren

Als nicht genetische, potentiell pathogene Ursachen werden unter anderem oxidativer Stress, Exotoxizität, Proteinaggregation und geschädigte Organellen, wie zum Beispiel Mitochondrien, diskutiert (Barbosa *et al.* 2010; Bilsland *et al.* 2010; Shi *et al.* 2010; Miana-Mena *et al.* 2011; Pratt *et al.* 2012). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Schädigung der nicht-neuronalen Zellen, die die Motoneuronen umgeben, die Integrität der Nervenzellen negativ beeinflussen kann (Kawamata *et al.* 1992; Alexianu *et al.* 2001; Clement *et al.* 2003). Keine der genannten Risikofaktoren erklärt den spezifischen Verlust der Motoneuronen. Das besondere Merkmal aller Motoneuronen ist jedoch ihre außergewöhnliche Größe und enorme Länge ihrer Axone. Aus diesem Grund sind sie wahrscheinlich mehr als alle anderen Neuronen auf einen koordinierten axonalen Transport angewiesen. Dies führte zu Überlegungen, dass der axonale Transport die Achillesverse der Motoneuronen sein könnte (Holzbaur 2009). Die axonale Transportmaschinerie transportiert aktiv zelluläre Bestandteile über lange Distanzen entlang der Mikrotubuli. Motorproteine der Kinesinfamilie bringen dabei neu synthetisierte Proteine, Organelle und Vesikel vom Zellkörper zu den Synapsen. Zytoplasmatisches Dynein agiert hingegen in Interaktion mit dem Multiproteinkomplex Dynaktin als retrograder Motor. Beschädigte Proteine und Organelle, wie zum Beispiel Mitochondrien, werden über diesen Weg wieder in Richtung der Minus-Enden der Mikrotubuli zum Zellkörper zurückgeführt und können dort degradiert und wiederverwertet werden (Schnapp & Reese 1989; Brady 1991; Hirokawa *et al.* 1991; Vallee & Bloom 1991; Hirokawa 1996). Mäuse, die Mutationen im Motorprotein Dynein tragen, entwickeln ALS ähnliche Symptome, einschließlich des spezifischen Verlusts der Motoneuronen (LaMonte *et al.* 2002; Hafezparast *et al.* 2003). Darüber hinaus konnten in verschiedenen ALS-SOD1-Mausmodellen Beeinträchtigungen des axonalen Transports nachgewiesen werden (Zhang *et al.* 1997; Williamson & Cleveland 1999; Sasaki *et al.* 2005). Betrachtet man diese Erkenntnisse, scheint die Funktionalität des axonalen Transports tatsächlich ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese der Motoneuronerkrankungen zu sein. Nicht zu vergessen ist dabei, dass

Mutationen der Dynaktin-Untereinheit p150^{Glued} ALS verursachen können (Puls *et al.* 2003; Puls *et al.* 2005). Um die Bedeutung des Multiproteinkomplexes Dynaktin beim axonalen Transport verstehen zu können, ist es wichtig seine Struktur und den Aufbau seiner Untereinheiten zu kennen.

2 Dynaktin und seine Untereinheit p150^{Glued}

2.1 Aufbau des Multiproteinkomplexes Dynaktin

Der asymmetrische Multiproteinkomplex Dynaktin besteht aus elf verschiedenen Untereinheiten und erreicht insgesamt ein Molekulargewicht von ca. 1,2 MDa. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine Unterteilung in zwei auffällige Strukturen: eine stabförmige Basis und ein davon abgehender Arm mit globulären Köpfen an den Terminalen (Abbildung 2). Die stabförmige Basis ist ein Polymer des Aktin verwandten Proteins Arp1 (*actin related protein1*). Arp1 kann ATP hydrolysieren und Filamente bilden. Die Interaktion von Arp1 mit dem Protein βIII-Spektrin ist wichtig für die Bindung des Transportguts. Das Plus-Ende des Arp1-Filaments (stumpfes Ende) wird von einem CaP-Z (*capping protein-Z*)-Heterodimer abgeschlossen, welches wahrscheinlich das Arp1-Filament stabilisiert. Am Minus-Ende, dem so genannten spitzen Ende, sind die Untereinheiten Arp11, p62 (*DCTN4*), p25 (*DCTN5*) und p27 (*DCTN6*) lokalisiert. Arp11 dient der Stabilisierung des spitzen Endes. Die Untereinheiten p62, p25 und p27 enthalten Cargo-Binde-Motive (Eckley *et al.* 1999; Schroer 2004; Hodgkinson *et al.* 2005; Imai *et al.* 2006).

Die Schulter und der Arm des Komplexes bilden eine flexible Struktur bestehend aus drei Untereinheiten: p50 (Dynamitin), p24/p22 und p150^{Glued}. P50 verbindet die beiden großen Subdomänen des Dynaktinkomplexes und ist somit entscheidend für seine strukturelle Integrität. Die Untereinheit p150^{Glued} interagiert unter anderem mit dem Motorprotein Dynein und den Mikrotubuli (Schroer 2004; Hodgkinson *et al.* 2005; Imai *et al.* 2006).

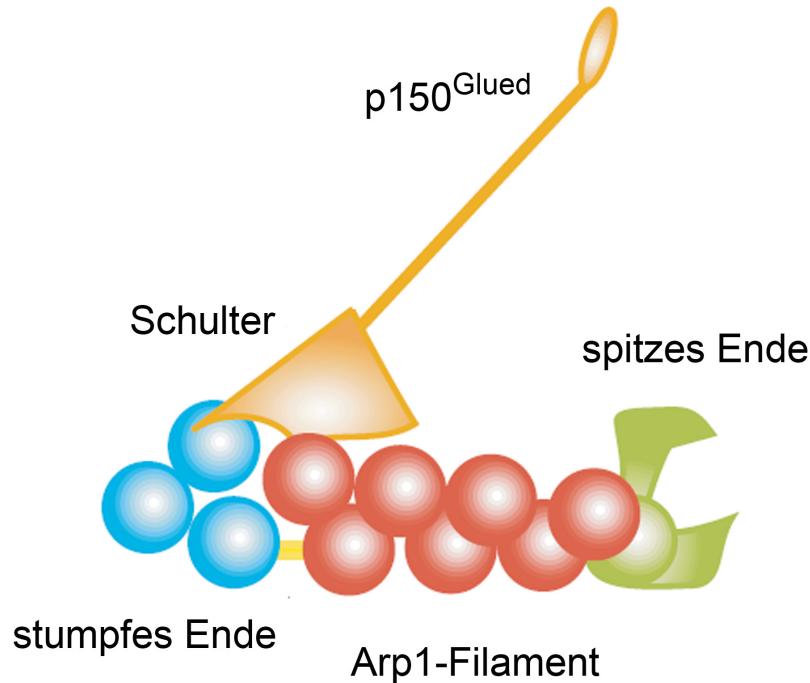


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Multiproteinkomplexes Dynaktin. Das Arp1-Filament bildet zusammen mit den im spitzen und stumpfen Ende des Polymers gebundenen Untereinheiten die Basis des Multiproteinkomplexes. Über die Schulter (p50, p24/p22) ist der bewegliche Arm p150^{Glued} mit der stabförmigen Grundeinheit verbunden (nach Imai *et al.* 2006).

2.2 Struktur der Untereinheit p150^{Glued}

Die größte Untereinheit p150^{Glued} des Dynaktinkomplexes wird von dem 4kb umspannenden Gen *DCTN1* kodiert. Sie liegt als Dimer im Komplex vor. Der N-Terminus des Proteins bildet den globulären Kopf. Diese hoch konservierte Domäne kann an Mikrotubuli binden und ist wichtig für die Funktionalität des Proteins (Abbildung 3). Das in der Mikrotubulibindedomäne (MBD) liegende Cap-Gly-Motiv (zytoskelettassoziiertes Protein, glyzinreich, Aminosäuren 29 bis 95) kann darüber hinaus mit anderen Mikrotubuli bindenden Proteinen wie EB1 (*end binding protein1*) und CLIP-170 (*cytoplasmic linker protein170*) interagieren. P150^{Glued} hat zwei *coiled-coil*-Domänen (CCD). Die erste CCD ist Bestandteil sowohl der Dyneinbindedomäne (DBD) als auch der Kinesinbindedomäne (KBD) des Proteins. Die zweite CCD liegt im C-Terminus und enthält ein konserviertes Aktin bindendes Motiv. Über diese Arp1-BD (Arp1-Bindedomäne), kann p150^{Glued} direkt mit der Dynaktin-Untereinheit Arp1 interagieren (Schroer 2004; Stockmann *et al.* 2012).

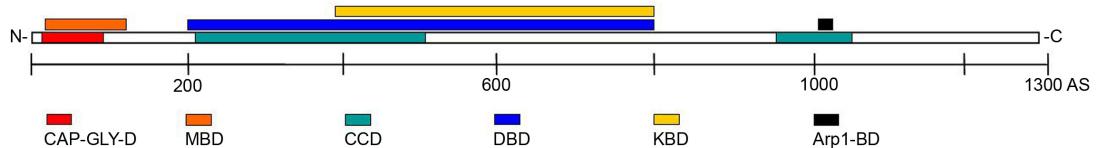


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Untereinheit p150^{Glued} des Multiproteinkomplexes Dynaktin. CAP-GLY-D: Cap-Gly-Motiv, MBD: Mikrotubulibindedomäne, CCD: *coiled-coil*-Domäne, DBD: Dyneinbindedomäne, KBD: Kinesinbindedomäne, Arp1-BD: Arp1-Bindedomäne, AS: Aminosäuren.

Die genaue Kenntnis der Dynaktin- bzw. p150^{Glued}-Struktur ermöglichen es z.B. über Deletionsmutanten gezielt Studien zur biologischen Funktion und Bedeutung des Komplexes und seiner Untereinheiten vorzunehmen.

2.3 Die Bedeutung des Multiproteinkomplexes Dynaktin

2.3.1 Die Bedeutung von Dynaktin in der Entwicklung

Bereits die Entdeckung der dominant-negativen Version der Untereinheit p150^{Glued} *Gl^l* in *Drosophila* zeigte, dass Dynaktin eine entscheidende Rolle während der Entwicklung spielt (Plough & Ives 1934). Das *Drosophila* Homolog Glued wird während der kompletten Entwicklung exprimiert (Swaroop *et al.* 1986), ist ebenfalls Teil eines Multiproteinkomplexes und interagiert mit Dynein (McGrail *et al.* 1995). Heterozygote *Gl^l*-Fliegen entwickeln den so genannten *rough-eye*-Phänotyp mit einer gestörten Organisation der Retina und ihrer Projektionen (Plough & Ives 1934; Meyerowitz & Kankel 1978). Fan und Ready (1997) wiesen nach, dass *Gl^l* in den Augenimaginalscheiben unter anderem zu einer verzögerten zweiten Mitosewelle, veränderter Photorezeptordifferenzierung, misslokalisierten Zellkernen und erhöhtem Zelltod posterior der morphogenetischen Furche führt. Homozygot führt das *Gl^l-Allel* zu früher Letalität der Fliegen (Harte & Kankel 1982). Später konnte nachgewiesen werden, dass Dynaktin an der Verankerung der Mikrotubuli am Zentrosom beteiligt ist (Quintyne *et al.* 1999) und unter anderem die Spindelorientierung in Neuroblasten reguliert (Siller & Doe 2008). In *Drosophila* S2-Zellen führt die Deletion der Mikrotubulibindedomäne der Dynaktinuntereinheit p150^{Glued} zu Defekten in der Organisation der mitotischen Spindeln, einhergehend mit der Bildung multipolarer Spindelapparate (Kim *et al.* 2007). Als Interaktionspartner des Motorproteins Dynein ist Dynaktin aber nicht nur für

entwicklungsbiologische Prozesse wichtig, sondern wird ebenfalls für den koordinierten axonalen Transport benötigt.

2.3.2 Die Funktion von Dynaktin beim axonalen Transport

Über *in-vitro*-Studien konnte nachgewiesen werden, dass Dynaktin den Dynein abhängigen Vesikeltransport stimuliert (Gill *et al.* 1991) und die Prozessivität des Motors Dynein verstärkt (King & Schroer 2000). Untersuchungen von Kalmar-Axoplasma zeigten außerdem, dass beim schnellen axonalen Transport die Interaktion des Dynaktinkomplexes mit zytoplasmatischem Dynein unabdingbar ist (Waterman-Storer *et al.* 1997). Die Überexpression der Dynaktin-Untereinheit p50 hemmt spezifisch die Dynaktinfunktion in Motoneuronen von Mäusen. Dies führt zu Akkumulationen von Vesikelproteinen, Aggregation von Neurofilamenten in den Axonen und Degeneration der Motoneuronen (LaMonte *et al.* 2002). Interaktionsstudien zeigen, dass Mutationen in der Dynaktin-Untereinheit Arp1 sowohl den anterograden als auch den retrograden Transport in *Drosophila* hemmen (Haghnia *et al.* 2007). Die Larven entwickeln eine posteriore Paralyse und axonale Verdickungen mit Vesikelansammlungen, welches typische Merkmale eines gestörten axonalen Transports sind. Die Lähmung der distalen Bereiche äußert sich beim Kriechen in einem Aufbiegen der letzten Segmente (Hurd & Saxton 1996). Interessanterweise zeigt weder das dominant-negative Allel *Gl*¹ noch eine Reduktion der endogenen Glued Expression über RNAi diese Phänotypen. Erst die Kombination von *Gl*¹ mit Kinesin- bzw. Dyneinmutationen führt zu distalen Lähmungen und Vesikelansammlungen in den Segmentalnerven der Larven. Überraschenderweise ist nur eine milde Interaktion zwischen Glued und Dynein im Vergleich zur Kombination von Kinesin und Glued zu beobachten (Abbildung 4). Dies macht deutlich, dass die Motorproteine Kinesin, Dynein und Dynaktin voneinander abhängig sind und Dynaktin nicht nur als Dynein-Aktivator gesehen werden kann (Martin *et al.* 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass Dynaktin und insbesondere die Funktionalität seiner Untereinheit p150^{Glued} wichtig sind für eine effiziente Initiation des retrograden Transports an den Synapsen (Lloyd *et al.* 2012; Moughamian & Holzbaur 2012).

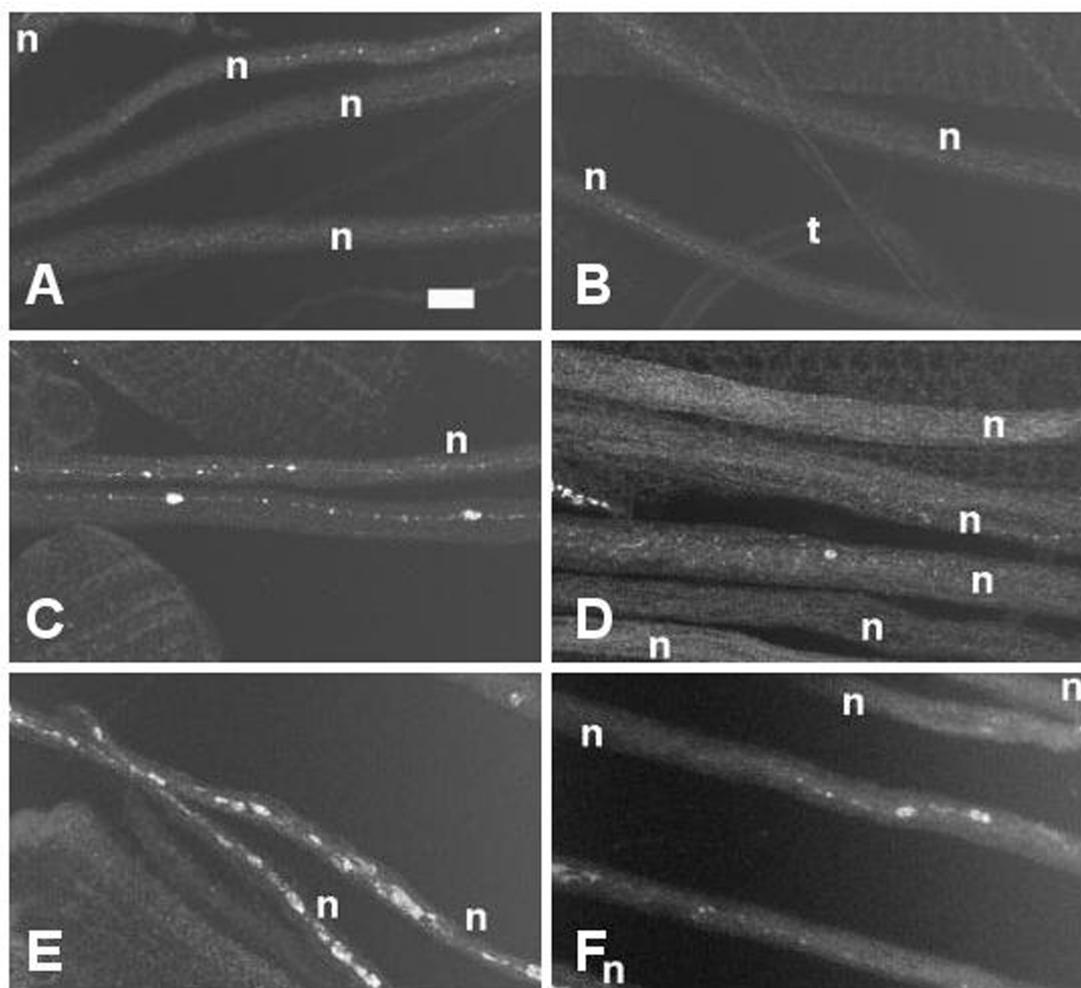


Abbildung 4: Interaktion von Gl^1 mit mutierten Versionen der Motorproteine Kinesin und zytoplasmatisches Dynein. Synaptotagminfärbung der Segmentalnerven. Genotypen: A: Wildtyp, B: $\text{Gl}^1/+$, C: $\text{Khc}^-/+$, D: $\text{cDhc}^{\text{ekl}}/+$, E: Gl^1/Khc^- , F: $\text{Gl}^1/\text{cDhc}^{\text{ekl}}$. Khc^- : Mutation in der schweren Kinesinkette, cDhc^{ekl} : Mutation in der schweren Kette des zytoplasmatischen Dyneins. B, C, D: Die Mutationen Gl^1 , Khc^- und cDhc^{ekl} verursachen kaum axonale Verdickungen und Synaptotagminansammlungen. F: Die Kombination von Gl^1 und cDhc^{ekl} zeigt eine leicht erhöhte Anzahl von Vesikelansammlungen. E: Die Allele Gl^1 und Khc^- führen in Kombination zu einem starken Anstieg an axonalen Schwellungen. n: Segmentalnerven, t: Trachea. Abbildung modifiziert nach Martin *et al.* (1999).

Wie bereits erwähnt, ist ein koordinierter axonaler Transport von zentraler Bedeutung für die Überlebensfähigkeit von Motoneuronen. Dies macht Mutationen in den Proteinen der Transportmaschinerie zu wesentlichen Risikofaktoren für degenerative Erkrankungen der Motoneuronen. Tatsächlich konnte in ALS-Patienten ein pathogener Basenaustausch im $\text{p}150^{\text{Glued}}$ kodierenden Gen *DCTN1* identifiziert werden (Puls *et al.* 2003).

3 Mutationen im Gen *DCTN1*

3.1 Die *DCTN1*-Mutation G59S und die Distale Hereditäre Motoneuropathie TypVII

Im Jahr 2003 konnte in einer Familie Kosegregation einer Punktmutation im Gen *DCTN1* (G59S) mit einer Distalen Spinalen und Bulbären Muskelatrophie (auch Distale Hereditäre Motoneuropathie TypVII, dHMN7B) nachgewiesen werden (Puls *et al.* 2003). Diese seltene ALS-assoziierte Motoneuronerkrankung ist eine langsam fortschreitende Erkrankung der unteren Motoneuronen und bricht in der zweiten bis dritten Lebensdekade aus. Die Patienten leiden zu Beginn unter einer bilateralen Stimmbänderlähmung, später kommt es zunächst zu Muskelschwäche im Gesicht und im weiteren Verlauf sind dann die Extremitäten betroffen. Die sensorische Wahrnehmungsfähigkeit der Patienten erscheint normal. Autopsie-Studien eines Betroffenen zeigten Motoneurondegeneration und Verlust der Axone im Ventralhorn des Rückenmarks sowie in der Medulla. Des Weiteren wurden abnormale Dynaktin- und Dyneinaggregate in den Motoneuronen identifiziert (Puls *et al.* 2005). *In vitro* beeinträchtigt die Mutation G59S die Bindung von Dynaktin an die Mikrotubuli, führt zu p150^{Glued}-Aggregation und induziert neuronalen Zelltod (Puls *et al.* 2003; Levy *et al.* 2006). Transgene p150^{Glued}-G59S-Mäuse entwickeln eine fortschreitende Motoneuronerkrankung. Neben reduzierten motorischen Fähigkeiten der Tiere und dem Verlust von Motoneuronen wurden in histologischen Untersuchungen außerdem Ubiquitin und Dynaktin enthaltende Einschlüsse bzw. Aggregate in den Motoneuronen nachgewiesen (Lai *et al.* 2007; Chevalier-Larsen *et al.* 2008; Laird *et al.* 2008).

Zusätzlich wurden Mutationen in p150^{Glued} als genetische Ursache für das sehr seltene Perry-Syndrom, einer autosomal-dominanten Parkinson-ähnlichen Erkrankung identifiziert (Farrer *et al.* 2009). Mutationen im Gen *DCTN1* scheinen demnach nicht nur bei Motoneuronerkrankungen einen Rolle zu spielen, sondern können je nachdem in welcher Domäne sie liegen, verschiedene neurodegenerative Erkrankungen auslösen. In den letzten Jahren wurden noch weitere Mutation im kodierenden Bereich von *DCTN1* in ALS Patienten identifiziert. Es konnte jedoch

noch nicht nachgewiesen werden, ob diese Punktmutationen tatsächlich im Zusammenhang mit ALS stehen oder ob es sich lediglich um allelische Varianten handelt (Munch *et al.* 2004; Munch *et al.* 2005; Vilarino-Guell *et al.* 2009).

3.2 Weitere potentiell pathogene *DCTN1*-Mutationen

Da *DCTN1* geradezu ein „hotspot“ für pathogene Mutationen zu sein scheint, wurden in einer groß angelegten Patientenstudie 1708 sporadische ALS Patienten und 778 gesunde Kontrollpersonen auf Mutationen im Gen *DCTN1* überprüft. Als neurologische Kontrollen wurden außerdem 218 Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen untersucht. Dabei wurden alle 32 Exons des Gens analysiert und 24 verschiedene *DCTN1*-Varianten in den ALS Patienten identifiziert. Allerdings wurden acht dieser 22 Exonvarianten auch in gesunden Kontrollen und sechs in den neurologischen Kontrollen nachgewiesen. Für keine der Mutationen war eine eindeutige Kosegregation nachweisbar (Stockmann *et al.* 2012).

In Abbildung 5 sind neun der neu identifizierten Mutationen und ihre Position innerhalb der Untereinheit p150^{Glued} dargestellt. Die Mutationen E34Q, D63Y, R148W und R149Q sind alle innerhalb der Mikrotubulibindedomäne des Proteins lokalisiert. Besonders interessant sind dabei E34Q und D63Y, da sie wie die dHMN7B verursachende Mutation G59S in der konservierten Cap-Gly-Domäne liegen. Die Mutation I196V befindet sich sehr nah an der Dyneinbindedomäne, M571T ist innerhalb der Kinesinbindedomäne lokalisiert. Die Mutationen Y878C, R1049Q und T1249I liegen alle im C-terminalen Bereich des Proteins.

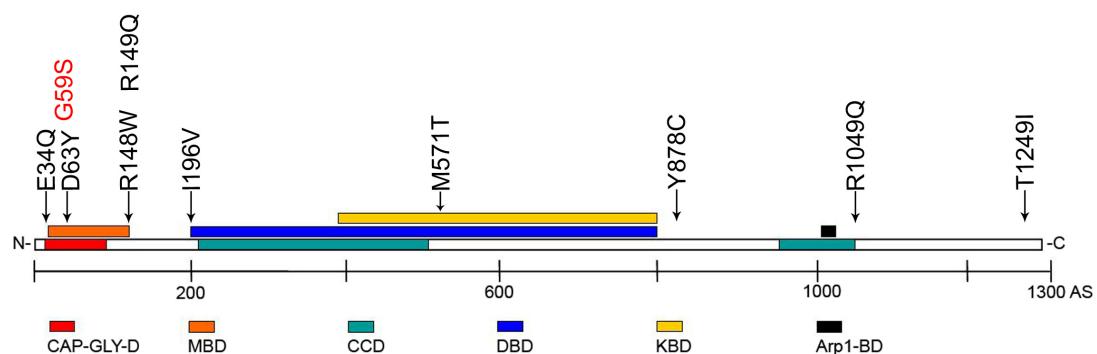


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lage der zu untersuchenden Mutationen in p150^{Glued}. CAP-GLY-D: Cap-Gly-Motiv, MBD: Mikrotubulibindedomäne, CCD: *coiled-coil*-Domäne, DBD: Dyneinbindedomäne, KBD: Kinesinbindedomäne, Arp1-BD: Arp1-Bindedomäne, AS: Aminosäuren.

Die Expression der neu identifizierten *DCTN1*-Mutationen in COS7-Zellen bzw. primären Motoneuronkulturen führt in vier Fällen (E34Q, D63Y, I196V, R1049Q) zu morphologischen Veränderungen. Diese Mutationen sind entweder nur sehr selten in Patienten gefunden worden oder konnten auch in gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass es sich hier wahrscheinlich nicht um *per se* pathogene Polymorphismen handelt. Dennoch können die beschriebenen Mutationen Risikofaktoren oder Teil eines polygenetischen Vererbungsmusters der ALS sein (Stockmann *et al.* 2012). Für weitergehende Untersuchungen der Auswirkungen bzw. pathogenen Eigenschaften der Mutationen sollten diese *in vivo* charakterisiert werden. In den letzten Jahren zeigte eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten, dass der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* ein hervorragendes und verlässliches System für die Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen bietet (Muqit & Feany 2002; Bonini & Fortini 2003; Driscoll & Gerstbrein 2003; Lu & Vogel 2009).

4 Ein *Drosophila melanogaster*-Modell für ALS

Im Rahmen eines Pilotprojektes wurde ein auf *DCTN1*-Überexpressionsanalysen basierendes *Drosophila*-Modell für ALS etabliert. Hierfür wurden transgene Linien für das humane wildtypische Konstrukt, die „Goldstandard“-Mutation G59S sowie eine der neu identifizierten *DCTN1*-Varianten (R149Q) generiert (Stribl 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die ubiquitäre Expression mit actin-Gal4 des humanen wildtypischen Konstrukts als auch der Mutation R149Q zu schweren Entwicklungsstörungen führt. Fliegen, die die Mutation G59S exprimieren entwickeln sich interessanterweise normal. Dieser Effekt konnte auch nach augenspezifischer ektopischer Expression mit GMR-Gal4 bestätigt werden. Während das humane wildtypische Protein und R149Q zu schweren Störungen in der Augenentwicklung führen, zeigen Fliegen mit einer spezifischen Expression von p150^{Glued}-G59S im Auge nur einen sehr milden Phänotyp (Abbildung 6).

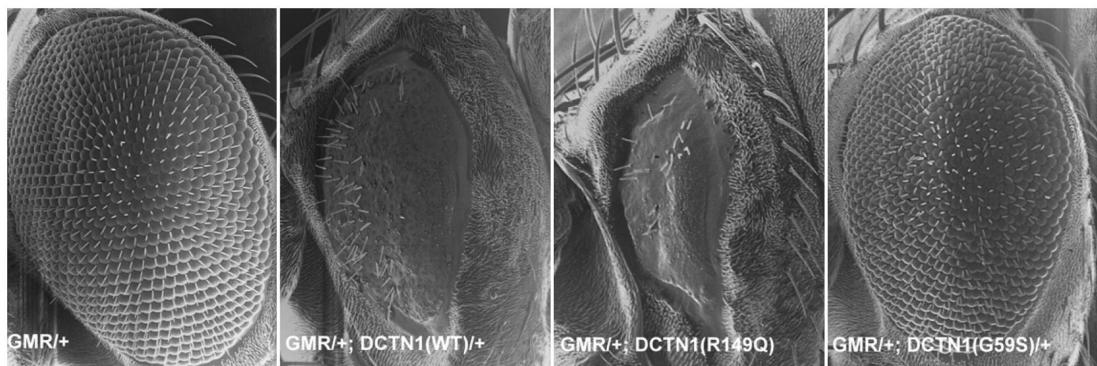


Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der augenspezifischen Überexpression der *DCTN1*-Konstrukte. Die Überexpression des humanen wildtypischen *DCTN1* sowie der mutanten Variante R149Q mit GMR-Gal4 führt zu Störungen der Augenentwicklung. G59S exprimierende Fliegen zeigen nur einen sehr milden Phänotyp (nach Stribl 2008).

Die neuronale Expression der humanen Konstrukte mit *appl*-Gal4 hatte eine stark verkürzte Lebensdauer der Fliegen zur Folge. Dabei starben jedoch Fliegen, die das wildtypische p150^{Glued} exprimierten noch früher als Fliegen, die G59S bzw. R149Q neuronal exprimierten.

Eine spezifische Überexpression der mutanten Konstrukte in Motoneuronen mit D42-Gal4 führte zu einer altersabhängigen Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten der Fliegen im Vergleich zur Überexpression des humanen wildtypischen Proteins. Dieser motorische Phänotyp konnte über eine gleichzeitige Expression von Chaperonen gerettet werden.

Mit Hilfe einer gewebespezifischen Expression der Konstrukte mit dem UAS/Gal4-System war es also möglich die Mutationen nach entwicklungsbiologischen Effekten gegenüber motoneuronspezifischen Störungen zu klassifizieren (Stribl 2008).

5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe eines *Drosophila melanogaster*-Modells, eine Einteilung der neu identifizierten *DCTN1*-Varianten in pathogene Risikofaktoren bzw. benigne Polymorphismen vorzunehmen. Hierfür soll mittels Überexpressionsanalysen eine Klassifizierung der Mutationen nach Entwicklungsphänotypen gegenüber motoneuronspezifischen Defekten erfolgen. Dabei sind vor allem die *DCTN1*-Varianten, die sich abweichend von der Überexpression des humanen wildtypischen Proteins verhalten von besonderem Interesse.

Zu diesem Zweck sollen zunächst transgene *Drosophila*-Stämme mit den jeweiligen *DCTN1*-Konstrukten etabliert werden. Für die Überexpressionsanalysen sollen dann Linien ausgewählt werden, die *DCTN1* ungefähr gleich stark exprimieren. Hierfür wird eine Analyse der Expressionsstärke über quantitative *real-time PCRs* und Western-BLOTS durchgeführt.

Anschließend soll zunächst eine allgemeine entwicklungsbiologische Analyse durchgeführt werden. Die Überprüfung der Auswirkungen der verschiedenen Mutationen spezifisch auf Motoneuronen soll vor allem über verhaltensbiologische Studien erfolgen. Außerdem soll untersucht werden, ob die Expression der verschiedenen *DCTN1*-Varianten zu einer altersabhängigen Degeneration der Nervenzellen führt.

Über die genannten Experimente hinausgehend, sollen weitere funktionelle Analysen erfolgen. Zum einen soll untersucht werden, inwiefern die Mutationen die subzelluläre Verteilung des Proteins beeinflussen. Zum anderen sollen weitere Prozesse, die an der Entstehung von Motoneuronenerkrankungen beteiligt sind, identifiziert werden. Da Dynaktin ein entscheidender Faktor innerhalb der Transportprozesse in den Neuronen ist, werden dabei vor allem Analysen des axonalen Transports vorgenommen. Dies soll sowohl über histologische Untersuchungen als auch über *in-vivo*-Messungen der Transportgeschwindigkeiten erreicht werden.

Kapitel II: Material und Methoden

Material und Methoden

1 Material

1.1 Organismen

1.1.1 Bakterien

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft
XL1-Blue Hitzeschock-kompetente Zellen	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene

1.1.2 Fliegen

Genotyp	Kürzel/Bemerkung	Chromosom	Herkunft
Balancer			
w*; Sp/CyO; D3/ TM6B, Tb ¹	Sp/CyO; D3/TM6B		Stammsammlung des Lehrstuhls
w*; Sco/CyO; D3/TM3, Sb ¹	Sco/CyO; D3/TM3		Stammsammlung des Lehrstuhls
w*; Sco/CyO	Sco/CyO		Stammsammlung des Lehrstuhls
w*; D3/TM3, Sb ¹	D3/TM3		Stammsammlung des Lehrstuhls
Treiberlinien			
w*; P{GawB}D42	D42-Gal4	III	BSC # 8816
w*; P{GawB}dimm ⁹²⁹ crc ⁹²⁹	c929-Gal4	II	BSC # 25373
w*; P{GawB}how24B	24B-Gal4	III	BSC # 1767
w*; P{ple-GAL4.F}3	Th-Gal4	III	BSC # 8848
w*; P{GAL4-ninaE.GMR}12	GMR-Gal4	II	BSC # 1104
w*; P{actin-Gal4}/CyO	actin-Gal4/CyO	II	Stammsammlung des Lehrstuhls
y ¹ w*; P{Act5C-GAL4}17bFO1/TM6B, Tb ¹	actin-Gal4/TM6B	III	BSC # 3954
w*; Sp/CyO; P{GawB}how24B	Sp/CyO; 24B-Gal4	III	diese Arbeit
w*; Sco/CyO; P{GawB}D42	Sco/CyO; D42-Gal4	III	Stribl (2008)
w*; P{GawB}dimm ⁹²⁹ crc ⁹²⁹ ; TM6B, Tb ¹ /D3	c929-Gal4/Cyo; D3/TM6B	II	diese Arbeit

w*; Sco/CyO; P{ple-GAL4.F}3 w*; P{actin-Gal4}/ TM6B, Tb ¹ Gal80 w ⁻ ; P{tubP-GAL80 ^{ts} }10/20; P{UAS-DCTN1-Flag} G59S line 1/ TM3, Sb ¹ w ⁻ ; P{tubP-GAL80 ^{ts} }10/20; P{UAS-DCTN1-Flag} human WT line 7/ TM3, Sb ¹ w ⁻ ; P{tubP-GAL80 ^{ts} }10/20; TM2/TM6B, Tb ¹	Sco/CyO; Th-Gal4 actin-Gal4/TM6B- Gal80 tub-Gal80 ^{ts} ; UAS-G59S/1/TM6B tub-Gal80 ^{ts} ; UAS-hWT/7/TM6B tub-Gal80 ^{ts} ; TM2/TM6B	III III II+III II+III II	Bayersdorfer (2009) Stammsammlung des Lehrstuhls diese Arbeit diese Arbeit BSC # 7019/7108
Responderlinien			
w*; P{UAS-GFP.Y} w*; P{UAS-GFP.S65T}egT10 w*; P{UAS-Stinger}2 w*; P{UAS-GFP.Y}/ CyO; D3/ TM6B, Tb ¹ w ¹¹¹⁸ ; P{UAS-mito-HA-GFP.AP}3, e ¹ w*; P{UAS-Stinger}2/CyO; D3/ TM3 Sb ¹ w ¹¹¹⁸ ; Sp/CyO; P{UAS-mito-HA- GFP.AP}3, e ¹ /TM6B, Tb ¹ w ¹¹¹⁸ ; P{UAS- DCTN1-Flag} w ¹¹¹⁸ ; P{UAS- glued}	UAS-GFP UAS-GFP UAS-Stinger UAS-GFP/CyO; D3/TM6B UAS-mitoGFP UAS-Stinger/CyO; D3/TM3 Sp/CyO; UAS-mito- GFP/TM6B UAS-DCTN1 UAS-glued	II III II II III II III	Stammsammlung des Lehrstuhls BSC # 1522 Stammsammlung des Lehrstuhls diese Arbeit BSC # 8443 Bayersdorfer (2009) diese Arbeit diese Arbeit diese Arbeit
	weitere Linien		
CantonS y*w*; Δ2-3 Ki w [*] ; P{GawB}dimm ⁹²⁹ crc ⁹²⁹ /CyO; P{UAS-GFP.S65T}egT10/ TM6B, Tb ¹ w*; P{UAS-GFP.Y}/ CyO; P{GawB}D42/ TM6B, Tb ¹ w*; P{UAS-Stinger}2/ CyO; P{GawB}D42/ TM6B, Tb ¹ w*; P{UAS-Stinger}2/ CyO; P{ple-GAL4.F}3/TM3, Sb ¹ w*; P{GawB}D42, P{UAS-mito-HA- GFP.AP}3/ TM6B, Tb ¹ -Gal80 line 2	CantonS y*w*; Δ2-3 Ki c929-Gal4/Cyo; UAS- GFP/TM6B UAS-GFP/CyO; D42- Gal4/TM6B UAS-Stinger/CyO; D42-Gal4/TM6B UAS-Stinger/CyO; Th-Gal4/TM3 D42-Gal4, UAS- mitoGFP/TM6B- Gal80/2	III II+III II+III II+III II+III III	Stammsammlung des Lehrstuhls Stammsammlung des Lehrstuhls Schilling (2011) diese Arbeit diese Arbeit Bayersdorfer (2009) diese Arbeit

Tabelle 2: Liste der verwendeten Fliegenstämme. Eine genaue Auflistung der in dieser Arbeit etablierten w¹¹¹⁸; P{UAS- DCTN1-Flag}- und w¹¹¹⁸; P{UAS- glued}-Linien ist im Anhang Tabelle 18 zu finden. BSC: Bloomington Drosophila Stock Center.

1.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
4 % PFA	4 % PFA in PBST(0,2 %) pH 7,4	<i>whole mount</i> -Fixierung
Apfelsaftagarplatten	1,75 % Agar; 25 % Apfelsaft; 2,5 % Zucker; 1 % Nipagin in Ethanol	Keimbahntransformation, Verhaltensversuche
APS	10 % APS	Western-Blot
DGLP (5x)	0,375 g Tris; 1,0 g SDS; 5,0 mL Glycerol; 2,5 mL β -Mercaptoethanol a.d. 10 mL mit ddH ₂ O	Ladepuffer für Western-Blots
Einbettmedium	VectaShield H 1000 von Vector Laboratories	<i>whole mount</i> -Einbettung
Eindeckmedium	DPX mountant for histology von Fluka	Objektträger für <i>Life Imaging</i>
Elektrophoresepuffer-Western-Blot (5x)	44,8 g/l Tricine; 30,3 g/l Tris; 5 g/l SDS (pH 8,2)	Western-Blot
Formaldehyd-Fixans	4% Paraformaldehyd in PBS; (pH 7,4)	<i>whole mount</i>
GTE	50 mM Glukose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA	Plasmid- Minipräparation
H ₂ O ^{DEPC}	1 ml DEPC auf 1 l dd H ₂ O (ü.N. auf 37 °C schütteln)	RNA-Extraktion
Injectionspuffer (10x)	5 mM KCL; 0,1 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,8)	Keimbahntransformation
KAc	5 M KAc	Plasmid- Minipräparation
LB _{Amp} (Miniprep)	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 3 ml/l 1 N NaOH; 50 μ g/ml Ampicillin	selektive <i>E. coli</i> Flüssigkultur
LB-Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; 3 ml/l 1 N NaOH	<i>E. coli</i> Flüssigkultur
Nagellack	farblos, schnell trocknend	<i>whole mount</i>
NaOH/SDS	0,2 M NaOH; 1 % SDS	Plasmid- Minipräparation
Natriumazid	10 % Natriumazid	Fungizid für Antikörperlösungen
PBS	130 mM NaCl; 7 mM Na ₂ PO ₄ ; pH 7,2	<i>whole mount</i>
PBST	PBS mit Triton-X 100; pH 7,4	<i>whole mount</i>
PCB	6M Harnstoff, 10% DDT, 0,01 % Bromphenolblau, 10 mM NaPO ₄ pH 7,2, 210 μ l Mercaptoethanol	Proteinextraktion
<i>Squishing buffer</i>	10 mM Tris-Cl (pH 8,2); 1 mM EDTA; 25mM NaCl	gDNA-Extraktion
TAE	0,04 M Tris-Aacetat; 0,001 M EDTA	Agarose-Gelelektrophorese

TBS	140 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5	Western-Blot
TBST	TBS, 0,2 % Tween-20	Western-Blot
Transferpuffer	2,9 g/l Tris; 14,5 g/l Glycin; 2,5 g/l SDS; 200 ml/l MeOH	Wet-Blot
Tris-Aacetat-Puffer	1,5 M Tris auf pH 8,1 mit Essigsäure einstellen	Western-Blot Acetatgele

Tabelle 3: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

1.3 Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	T _a	Verwendung
Rp49 (s)	GCGGGTGCGCTTGTTCGATCC	55 °C	qRT-PCR <i>housekeeping gene</i>
Rp49 (as)	CCAAGGACTTCATCCGCCACC	55 °C	qRT-PCR <i>housekeeping gene</i>
Dyn 3' (s)	GAA GGT CAC TTT GCC CAT GT	55 °C	qRT-PCR <i>DCTN1</i>
Dyn 5'(as)	CCC TTC ATC AGC CTT CCT C	55 °C	qRT-PCR <i>DCTN1</i>
Glued Dm (s)	GCG TCT GAG GGA TCT ATC TGC	55 °C	qRT-PCR <i>glued</i>
Glued Dm (as)	GCT CCA CCA TTT CCT CGG	55 °C	qRT-PCR <i>glued</i>
Dynaktin 01 (s)	ATG GCA CAG AGC AAG AGG C	53 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 992 (s)	GGG TGG ACG AGC TCA CTAC	55 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 1118 (as)	GCA TCC TTC AGG CGG GC	54 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 1128 (s)	GAT GCG GAT CTT TCT TC	55 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 1351 (as)	CCA GAT TCA GGT TCC GAT	55 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 1806 (s)	CCA TGA CTG CGT TCT GGT G	53 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 1879 (as)	GGG CCT GCT TCC GGA TC	54 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 2458 (s)	GGA CCA CAG GTA TCT GAC	54 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 2481 (as)	GAG CGT GTC AGA TAC CTG TG	55 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 2770 (s)	GCC TCC ACC GGT TGA ACT G	55 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
Dynaktin 2825 (s)	CCC AGG CCT TCA GCA TCT G	55 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>

Dynaktin 3861 (as)	CCG TTA CTT ATC GTC ATC C	55 °C	Sequenzierung von <i>DCTN1</i>
--------------------	---------------------------	-------	--------------------------------

Tabelle 4: Liste der verwendeten Oligonukleotide. T_a : annealing-Temperatur.

1.4 Enzyme und Kits

Enzym	Hersteller	Verwendung
Restriktionsenzyme	NEB	Testverdau, Minipräparation
<i>Quantitect™ Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen	Reverse Transkription
<i>SYBR Green PCR Kit</i>	Qiagen	quantitative <i>real-time</i> PCR
<i>iQ™ SYBR® Green Supermix</i>	Bio-Rad	quantitative <i>real-time</i> PCR
<i>PeqGOLD TriFast™</i>	Peqlab	RNA-Extraktion
<i>QIAprep®-Miniprep</i>	Qiagen	Plasmid-Minipräparation für Mikroinjektion

Tabelle 5: Liste der verwendeten Enzyme.

1.5 Farbstoffe

Farbstoff	Hersteller	Verwendung
Ethidiumbromid	Roth	Agarosegel-DNA-Färbung
DAPI		Zellkernmarkierung (<i>whole mount</i>)
GFP-Booster	ChromoTek	GFP-Färbung, (<i>whole mount</i>)
Acridinorange		Apoptosemarker

Tabelle 6: Liste der verwendeten Farbstoffe.

1.6 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Sonstige Chemikalien, Enzyme, und Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

ATOFINA, BioRad, Biozym, Braun, Corning, Fermentas, Fluka, Intenso, Balur, Hartenstein, Kimberley-Clark, Li-Cor, Marienfeld, Menzel, Merck, New England Biolabs, Pall, Pierce, Pharmacia, PeqLab, Polysciences, Qiagen, Roche, Roth, Sarstedt, Schleicher & Schuell, SemperMed, Serva, Sigma, TPP, USB und Verbatim.

1.7 Antikörper

Antikörper	Antigen	Markierung	Wirt	Eigenschaften	Herkunft
ab049	Cystein String Protein (CSP)		Maus	Monoklonal, Überstand	Hofbauer (2009)
22C10	Futsch		Maus	Monoklonal, Überstand	Fujita (1982)
anti-GFP	GFP		Kaninchen	polyklonal	Invitrogen (A6455)
anti-Flag® M2	Flag-Tag		Maus	monoklonal	SIGMA-Aldrich
anti-actin AA20-33	Aktin		Kaninchen	monoklonal	SIGMA-Aldrich
anti-p150 (Dynactin1, H300)	p150 ^{Glued} (human)		Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz
GAM-Cy3	MausIgG (H+L)	Cy3	Ziege	polyklonal, affinitätsgereinigt	Jackson (Dianova)
GAR-AF488	KaninchenIgG (H+L)	Alexa Fluor 488	Ziege	polyklonal, kreuzabsorbier	Molecular Probes
GAR-AF555	KaninchenIgG (H+L)	Alexa Fluor 555	Ziege	polyklonal, kreuzabsorbier	Molecular Probes
GAM-AF647	MausIgG (H+L)	Alexa Fluor 647	Ziege	polyklonal, kreuzabsorbier	Molecular Probes
GAM-680	MausIgG (H+L)	IRDye® 680LT	Ziege	polyklonal, kreuzabsorbier	Li-Cor
DAR-800	KaninchenIgG (H+L)	IRDye® 800CW	Esel	polyklonal, kreuzabsorbier	Rockland

Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper.

1.8 Geräte

Gerät	Hersteller/Distributor	Verwendungszweck
Digitales Stereomikroskop VHX-500	Keyence	Aufnahme von Fliegenaugen
Digital-Mikroskopkamera DigiMicro 2.0 Scale	dnt®	Film- und Photoaufnahme der Kletterlarven
Axiophot	Zeiss	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie
Centrifuge 5415D	Eppendorf	Tischzentrifuge
Colibri	Zeiss	LED-Lichtquelle für Fluoreszenzmikroskopie
digital pH/millivolt meter 611	Orion Research	pH-Meter
Fresco 21 Centrifuge	Heraeus	Kühlzentrifuge

Leica M2 Fl III	Leica	Fluoreszenzstereomikroskop, Selektion rekombinanter Larven
LSM510	Zeiss	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
TCS SP8	Leica	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
NanoDrop1000	PeqLab	DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung
Odyssey ® Imaging System	LI-COR Biosciences	Detektion und Quantifizierung Westernblot
SE600 Cooled Vertical Electrophoresis Unit, 18 x 16 cm, Basic	Hoefer	Protein-Gelelektrophorese
Stereomikroskop Stemi 2000	Zeiss	Fliegenarbeit, Präparation
T3 Thermocycler	Biometra	PCR
Transphor Electrophoresis Unit TE Series	Hoefer	Wet-Blot
Transphor Power Lid TE50X	Hoefer	Power Supply, Wet-Blot
Lightcycler™ System	Roche	quantitative <i>real-time</i> -PCR
MiniOpticon™System	BioRad	quantitative <i>real-time</i> -PCR

Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte.

1.9 Software

Programm	Hersteller/Distributor	Version(en)	Verwendungszweck
Alphamanager	Alpha Innotech	2.0	Steuerungssoftware des Geldokumentationssystems
BioEdit	Ibis Biosciences	7.09	Sequenzanalyse für Sequenzdaten im ab1 Dateiformat
CFX Manager™ Software	BioRad		Steuerungssoftware für MiniOpticon™System
EditSeq	DNAStar	5.03	Sequenz- und Restriktionsanalyse
ImageJ	Wayne Rasband National Institutes of Health, USA	1.44-1.47	Bildbearbeitung, Mitochondrien-Tracking, Signalquantifizierung
Jmol	Jmol Development Team	13.0.12	Bearbeitung von *.pdb-Dateien, Visualisierung von Proteinstrukturen
KamCon	Linthaler & Co.	2.0.5	Steuerungssoftware der Kamera am Axiophot-Fluoreszenzmikroskop
Lichtorgel Software	Stöckel (2005)		Steuerung des Systems zur Aktivitätsanalyse, Aufzeichnung der Daten

Lightcycler™ System-Software	Roche		Steuerungssoftware für Lightcycler™ System
LSM 510	Zeiss	3.2	Steuerungssoftware für Zeiss LSM 510 Konfokalmikroskop
LSM Image Browser	Zeiss	3.2.0.115	Bildbetrachter für Zeiss *.lsm Dateiformat
Microsystems microscope software LAS AF 3	Leica		Steuerungssoftware für Leica TCS SP8 Konfokalmikroskop
NanoDrop1000	peqLab		Steuerungssoftware NanoDrop1000
Odyssey	Li-Cor	1.2	Steuerungssoftware für LiCor Infrarotskaner, Quantifizierung Western-Blot
Office Excel	Microsoft		Auswertung-Lokomotor-Aktivität
Office Word	Microsoft		Erstellen dieses Textes
pDRAW32	AcaClone	1.1.96	Analyse von Vektorkarten im *.pdw Dateiformat
Photoshop	Adobe	CS 3	Bildbearbeitung, Bildaufnahmen mit der Digital-Mikroskopkamera
PrimerPremiere	Premier Biosoft International	5.0	Primerdesign
SigmaPlot	Sysstat Software	11.0	Erstellen der Grafiken in dieser Arbeit, statistische Berechnungen
Ulead Video Studio9	Ulead Systems, Inc.		Filmaufnahmen mit der Digital-Mikroskopkamera
VHX-500 Software	Keyence		Steuerungssoftware Digitales Stereomikroskop
Virtual Dub	Avrey Lee (2005)		Filmbearbeitung
Visio	Microsoft	11.3216.5606	Erstellen von Schematazeichnungen

Tabelle 9: Liste der verwendeten Software.

2 Methoden

2.1 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm SigmaPlot durchgeführt. Der statistische Vergleich von zwei Gruppen erfolgte bei Normalverteilung der Daten über den t-Test, bei nicht normalverteilten Daten über den Mann-Whitney-Rangsummentest. Die statistische Analyse von mehreren Gruppen erfolgte bei normalverteilten Daten über einen *One-Way-Anova*-Test, bei nicht normalverteilten Daten über den *Anova-on-Ranks*-Test.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Nukleinsäuren

2.2.1.1 Extraktion genomicscher DNA

Die Isolierung der genomicschen DNA der Fliegen erfolgte nach der so genannten „*Single-Fly*“-DNA-Extraktionsmethode (Gloor *et al.* 1993). Mit einer mit 50 µl *Squishing-Buffer* gefüllten Pipettenspitze wurden zwei Fliegen in einem PCR-Reaktionsgefäß möglichst vollständig zerdrückt. Anschließend wurde der restliche Extraktionspuffer zugegeben und das Homogenisat 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die im Puffer enthaltene Proteinase K bei 95 °C für 5 min inaktiviert.

2.2.1.2 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten bei der Firma *Seqlab* über den *extendedHotShot*-Sequenzierungsservice. Das DNA/Primer-Gemisch wurde nach Angaben des Dienstanbieters eingeschickt. Es konnten pro Ansatz ca. 800-1000bp sequenziert werden. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Programm *EditSeq*.

2.2.1.3 Quantitative Real-Time-PCR

RNA-Extraktion

Männliche sieben Tage alte Fliegen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Extraktion aufbewahrt. Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des *PeqGOLD TriFast™* Reagenz der Firma *PeqLab* laut Herstellerprotokoll. Es wurden jeweils zehn Fliegen in 1 ml Trifast-Puffer mit einem elektrischen Stößel homogenisiert. Das RNA-Pellet wurde in 30-50 µl H₂O_{DEPC} gelöst. Am Mikrovolumen-Spektrophotometer NanoDrop1000 erfolgte die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA-Lösungen. Proben, die Werte außerhalb des zu erwarteten Bereiches zeigten, wurden verworfen.

Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde der *Quantitect™ Reverse Transcription Kit* der Firma *Qiagen* verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde nach den Angaben des

Herstellers angesetzt. Die Transkription erfolgte für 30 min bei 42 °C. Die anschließende Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 5 min bei 95 °C. Die cDNA wurde bei -80 °C maximal einen Tag aufbewahrt.

semi-quantitative Real-Time-PCR und Auswertung

Die semi-quantitative *real-time-PCR* wurde mit dem *Lightcycler™* System der Firma Roche bzw. dem *MiniOpticon™System* der Firma *BioRad* durchgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem *Quantitect SybrGreen Kit* der Firma *Qiagen* bzw. dem *iQ™ SYBR® Green Supermix* laut Protokoll angesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte über die $\Delta\Delta CT$ -Methode. Als interne Kontrolle wurde das *housekeeping gene* RP49 amplifiziert. Bei jedem Lauf wurde eine Leerprobe ohne DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen ausschließen zu können. Über die Analyse der Schmelzkurve der amplifizierten Produkte wurde die Reaktion auf Primerdimere und unspezifische Produkte überprüft. Es wurden pro Probe ein bis zwei biologische Wiederholungen mit jeweils drei technischen Replikaten angefertigt.

2.2.1.4 Hitzeschocktransformation

Hitzeschockkompetente Zellen wurden für ca. 10 min auf Eis aufgetaut. Danach wurden 0,5 µl der bereits hergestellten cDNA-Puast-Klone zu den Zellen gegeben und diese für 45 s auf 42 °C inkubiert. Anschließend hat man die Zellen für 2 min auf Eis ruhen lassen und dann 1,0 ml LB₀-Medium zugegeben. Nach 20 min leichten Schüttelns der Zellen auf 37 °C wurden jeweils 100 µl unverdünnte sowie 1:2 verdünnte Zellsuspension auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für 10-16 Stunden auf 37 °C.

2.2.1.5 Mini-Präparation

Für die Minipräparation wurden je 3 ml LB_{Amp}-Medium mit jeweils einem Retransformationsklon angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Aus den angesetzten Kulturen wurde für die Mikroinjektion reine Plasmid-DNA über den *QIAprep®-Miniprep-Kit* von *Qiagen* isoliert.

2.2.2 Proteine

2.2.2.1 Immunoblot-Verfahren

Proteinextraktion

Es wurden männliche Fliegen sieben Tage gealtert und dann in flüssigem Stickstoff abgetötet und bei -80 °C eingefroren. Jeweils vier Fliegen pro Genotyp wurden in 100 µl PCB plus 2 µl DTT mit Hilfe eines elektrischen Stößels in 1,5 ml Reaktionsgefäß homogenisiert. Anschließend wurden die Extrakte bei 4 °C und 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde dann zur vollständigen Aufreinigung ein weiteres Mal zentrifugiert. Das gewonnene Proteinextrakt wurde mit Proteinladepuffer versetzt und für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Extrakte wurden entweder sofort auf das Gel geladen oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Protein-Gelelektrophorese

Für die quantitative Detektion von p150^{Glued} wurden Acetatgele angefertigt. Da die interne Kontrolle Aktin mit einer Größe von 46 kDa bedeutend kleiner ist als das Zielprotein p150^{Glued} (150 kDa) wurden einfache Gradientengele mit drei verschiedenen Schichten angefertigt. Die unterste Schicht enthielt 6 %, die mittlere 5 % Polyacrylamid. Diese beiden Schichten wurden jeweils zu zwei Fünftel des gesamten Gels aufgegossen. Die oberste Gelschicht (Sammelgel) hatte eine Konzentration von 4 % Acrylamid. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 150 V für ca. vier bis fünf Stunden in einem speziellen Elektrophoresepuffer für Acetatgele (Tabelle 3, S.28).

Protein-Transfer

Die Proteine wurden über das so genannte *Wet-Blot*-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das „Blotsandwich“ wurde vom negativen zum positiven Pol in folgender Reihenfolge aufgebaut: Schwamm, 2 *Whatman*-Papiere, Proteingel, Membran, 2 *Whatman*-Papiere, Schwamm.

Die Schwämme, *Whatman*-Papiere und die Membran wurden zuvor im Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte für ca. 20 h bei 35 V.

Antikörperfärbung

Nach dem *Protein-Transfer* wurde die Membran für 10 min in TBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden anschließend mit Blockierungspuffer für 1,5–2 h bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte für 72 h bei 4 °C (Tabelle 10). Um die Antikörperbindung zu stabilisieren, wurde die Membran danach in der Antikörperlösung für ca. 1h auf RT aufgewärmt. Im Anschluss wurde die Antikörperlösung recycelt und die Membran wenigstens dreimal mit TBST unter leichtem Schütteln für mindestens 10 min gewaschen. Die Färbung mit dem sekundären Antikörper erfolgte lichtgeschützt bei RT für 2–3 h (Tabelle 10). Die Antikörperlösung wurde anschließend zurück gewonnen und die Membran wie oben beschrieben mit TBST gewaschen. Zum Schluss wurde die Membran für mindestens 5 min in TBS geschüttelt.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Sekundäre Antikörper	Verdünnung
<i>anti-Flag® M2</i>	1:200	<i>GAM-680</i>	1:3000
<i>anti-actin AA20-33</i>	1:3000	<i>DAR-800</i>	1:3000

Tabelle 10: Antikörperlösungen für p150^{Glued}-Western-BLOTS.

Detektion und Quantifizierung

Die Fluorophore der sekundären Antikörper auf der Membran wurden mit dem Infrarotscanner *Odyssey* der Firma *Li-Cor* bei 700 und 800 nm angeregt. Die Intensität der Infrarotfluoreszenz in den jeweiligen Wellenlängenbereichen wurde aufgezeichnet und gespeichert. Um die relative Proteinexpression quantifizieren zu können, wurde für das Zielprotein p150^{Glued} als auch für die interne Kontrolle Aktin die *Integrated Intensity* bestimmt. Der Quotient aus den beiden Werten gibt die relative Proteinmenge des untersuchten Proteins im Verhältnis zur internen Kontrolle innerhalb einer Einzelprobe wieder.

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Antikörperfärbungen von Ganzpräparaten

2.3.1.1 Anfertigung von Ganzpräparaten (*whole mounts*)

Für die Präparation von adulten Fliegengehirnen und Thorakalganglien wurden die Fliegen auf CO₂ kurz betäubt und für ca. 2,5 h in 4 % PFA/PBST auf RT fixiert. Das Fixans wurde anschließend vollständig entfernt und die Proben zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Die Präparation erfolgte dann in PBS unter Verwendung einer Kaltlichtquelle.

Larven wurden auf Eis anästhesiert und präpariert (Sullivan *et al.* 2000). Erst danach wurden die Larvenfilets bzw. die larvalen Gehirne für ca. 1 h auf RT fixiert. Nach der Fixierung wurde das PFA abgezogen und die Präparate mindestens dreimal 10 min mit PBS gewaschen.

2.3.1.2 Färbeprotokolle und Auswertung

Je nach Antikörperfärbung und Präparat kamen verschiedene Färbeprotokolle zum Einsatz (Tabelle 11). Nach jedem Färbeschritt wurde die restliche Färbelösung mit mindestens fünf Waschschritten in immer länger werdenden Intervallen (5 min, 10 min, 20 min, 40 min, 60 min) entfernt. Erfolgte die Inkubation mit der Antikörperlösung auf 4 °C wurden die Präparate vor dem Waschen zunächst für ca. 1/2 h auf RT aufgewärmt.

Für Zellkernmarkierungen wurde der DNA-interkalierende Farbstoff DAPI (1:100 in PBS) nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 10 min appliziert. Die Verstärkung von GFP-Signalen erfolgte über das GFP-bindende Protein *GFP-Boosters-Atto488* der Firma ChromoTek. Dieses wurde in einer Verdünnung von 1:200 zusammen mit dem sekundären Antikörper inkubiert (Tabelle 11).

Präparat	Färbung	Blockierung	Antikörper	Verdünnung	Inkubation
Thorakalganglien	p150 ^{Glued}	2 h, PBST (0,5%), 10 %NGS	H300	1:200	48h, 4 °C
			GAR -AF488	1:200	48h, 4 °C
Thorakalganglien	GFP (peptiderge Neuronen)	2 h, PBST (0,5%), 10 %NGS	anti-GFP	1:200	12h, 4 °C
			GAR -AF488	1:200	12h, 4 °C
Thorakalganglien	CSP, p150 ^{Glued}	2 h, PBST (0,5%), 10 %NGS	ab049	1:100	48h, 4 °C
			H300	1:200	48h, 4 °C
			GAM -Cy3	1:200	48h, 4 °C
			GAR -AF488	1:200	48h, 4 °C
Kletterlarven, Muskel	p150 ^{Glued} , Zellkerne	1 h, PBST (0,5%), 10 %NGS	H300	1:200	48h, 4 °C
			GAR -AF488	1:200	48h, 4 °C
			DAPI	1:100	10 min, RT
Kletterlarven, Segmentalnerven	p150 ^{Glued} , Mikrotubuli	1 h, PBST (0,5%), 10 %NGS	H300	1:200	48h, 4 °C
			22C10	1:200	
			GAR -AF488	1:200	48h, 4 °C
			GAM -Cy3	1:200	
Kletterlarven, Segmentalnerven	p150 ^{Glued} , CSP, GFP	1 h, PBST (0,5%), 10 %NGS	H300	1:200	48h, 4 °C
			ab049	1:100	
			GAR-AF555	1:200	48h, 4 °C
			GAM -AF647	1:200	
			GFP-Booster- Atto488	1:200	

Tabelle 11: Liste der angewandten Antikörper-Färbeprotokolle.

Die fertigen Proben wurden auf speziellen Objektträgern mit dem Einbettmedium *VectaShield* eingebettet und die aufgelegten Deckgläschen mit einem schnell trocknenden Nagellack versiegelt (Bayersdorfer 2009). Die Analyse erfolgt entweder am Fluoreszenzmikroskop Axiophot von Zeiss oder an den konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskopen LSM510* von Zeiss bzw. TCS SP8 von Leica.

Die Bildbearbeitung und Quantifizierungen wurden mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt.

Die Quantifizierung der dopaminergen Neurone erfolgte wie in der Arbeit von Bayersdorfer (2009) beschrieben.

2.3.2 Axonaler Mitochondrientransport

Die Untersuchung des axonalen Mitochondrientransports erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Pilling *et al.* (2006) und Baqri *et al.* (2009).

2.3.2.1 Anästhesierung der Larven

Männliche Larven des dritten Entwicklungsstadiums wurden zunächst in Wasser gewaschen und anschließend vorsichtig über Filterpapier gerollt, um das an den Larven haftende Wasser möglichst vollständig zu entfernen. Danach wurden die Tiere in 200 µl Voltalef-Öl H10S von ATOFINA gegeben und solange vorsichtig darin hin und her bewegt bis kein Wasserfilm mehr zu sehen war. Anästhetisiert wurden die Larven durch eine langsame, tropfenweise Zugabe von Chloroform unter ständigem Rühren. Es wurde gerade solange Chloroform zugegeben bis keinerlei Bewegung der Larven mehr zu sehen war (maximal 30 % des Gesamtvolumens) und die Larven noch keine starke Krümmung/Verkrampfung zeigten.

2.3.2.2 Einbettung

Die Einbettung erfolgte auf speziell angefertigten Objektträgern. Für deren Seiten wurden jeweils drei Deckgläschen miteinander verklebt und diese dann wiederum links und rechts auf ein weiters Deckglas aufgebracht. Somit erhält man einen genügend großen Raum, um die Tiere bei der Einbettung nicht zu quetschen. Damit das Einbettmedium an den Seiten nicht ausläuft, wurden diese mit Wachs versiegelt (Abbildung 7).

Die Larven wurden sofort nach dem Betäuben auf die Objektträger möglichst gerade aufgebracht und mit Voltalef-Öl H10S luftblasenfrei überschichtet. Dabei musste beachtetet werden, dass die ventrale Seite der Larven nach oben zeigt. Die Präparate wurden mit einem 20x20 mm Deckgläschen abgedeckt und mit schnell trocknendem Nagellack versiegelt.

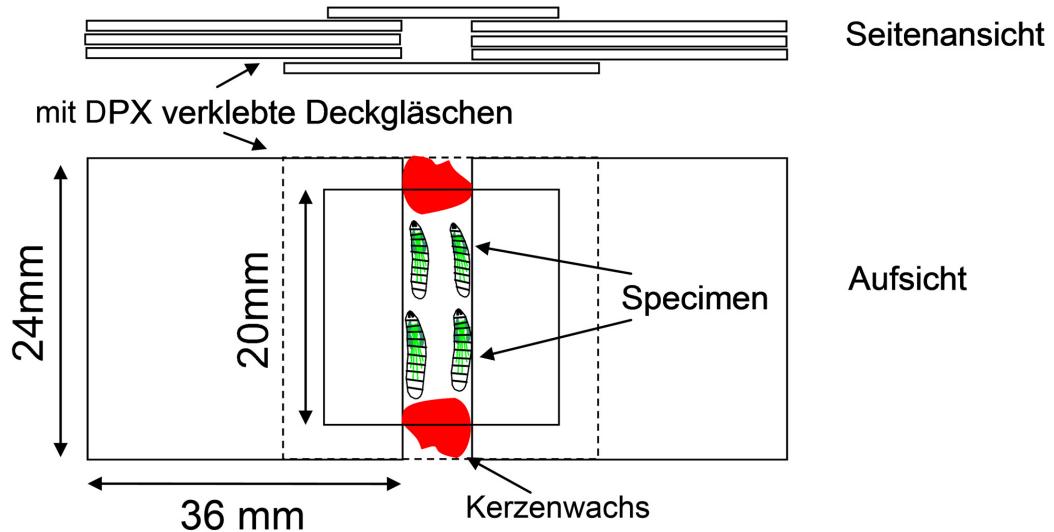


Abbildung 7: Schemazeichnung eines Objektträgers für die Messung des axonalen Transports.

2.3.2.3 Life Imaging

Die Detektion der GFP-fusionierten Mitochondrien mit dem LSM510 musste innerhalb von 30 min nach dem Betäuben abgeschlossen werden. Tiere, die sich noch zu stark bewegten oder deren Mitochondrien sich abrundeten wurden nicht berücksichtigt. Es wurden 50-100 Bilder pro Probe aufgenommen. Die Bildaufnahmerate betrug 0,5 fps. Die Anfertigung eines Bildes dauerte ca. 0,9 µs. Aufgenommen wurden ca. 35 µm von einem der beiden am weitesten posterior gelegenen, mittleren Segmentalnerven in einer Distanz von etwa 100 -150 µm zum Ventralganglion (Abbildung 8).

Die Detektion erfolgte mit einem Ölimmersionsobjektiv bei 63facher optischer Vergrößerung und vierfachem Aufnahme-Zoom. Um eine bessere Signalausbeute und eine tiefere Durchdringung des Gewebes zu erreichen, wurde der Durchmesser des physikalischen *Pinhole* auf ca. 7 µm gesetzt. Die Laserpower des Argonlasers lag bei 25 %, die Lasertransmission bei 30 %.

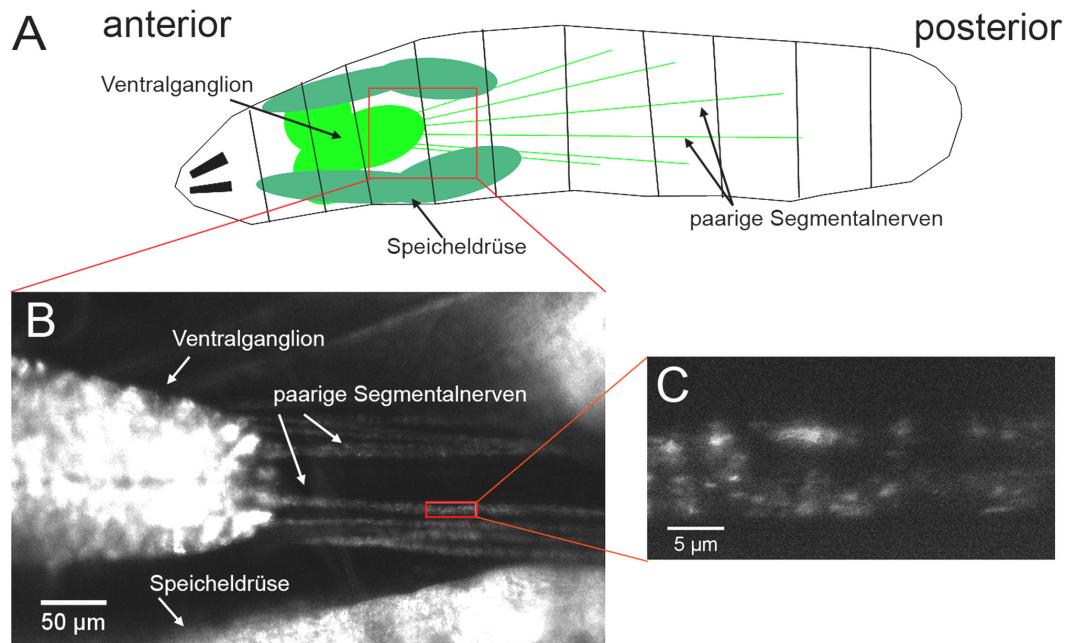


Abbildung 8: Versuchsanordnung zur Analyse des axonalen Mitochondrientransports. A: Ventralsicht einer Kletterlarve. B: Übersicht über die Lage der analysierten Segmentalnerven und des ausgewählten Aufnahmefeldes (roter Kasten). C: untersuchter Ausschnitt des Segmentalnervs mit GFP-fusionierten Mitochondrien.

2.3.2.4 Auswertung

Die *time-lapse*-Aufnahmen wurden mit dem *Plugin TransformJ Rotate* der Software *ImageJ* zunächst so gedreht, dass der Segmentalnerv horizontal ausgerichtet war. Um leichte Bewegungen der Probe zu eliminieren, wurden die Einzelaufnahmen/Frames mit dem *Plugin AlignSlices* über die *RigidBody*-Transformation aneinander angeglichen (Thevenaz *et al.* 1998). Mit Hilfe des *ImageJ Plugin MtrackJ* (Meijering *et al.* 2012) wurde ein sich bewegendes Mitochondrium in jeder Einzelaufnahme markiert, um die zurückgelegte Strecke des Organells zwischen zwei Aufnahmezeitpunkten berechnen zu können. Aus den gemessenen Einzelstrecken und der Gesamtaufnahmezeit konnte die Durchschnittsgeschwindigkeit jedes Mitochondriums berechnet werden. Pro Genotyp wurde jeweils ein Nerv pro Larve aufgenommen. Innerhalb einer Aufnahme wurden alle Mitochondrien analysiert, die wenigstens über einen Zeitraum von sechs Sekunden (drei Aufnahmen) verfolgt werden konnten. Bewegungspausen, die länger als zwei Sekunden dauerten und Mitochondrien, die sich im Laufe einer Bewegung rückwärts orientierten, wurden

ausgeschlossen. Es wurde die Durchschnittsgeschwindigkeit von mindestens fünf Mitochondrien pro Einzelprobe ermittelt.

2.4 Fliegenzucht, Keimbahntransformation und genetische Methoden

2.4.1 Fliegenzucht

Die Fliegen wurden in kleinen Gläsern mit Nahrungsbrei (0,8 % Agar, 2,2 % Zuckerrübensorup, 0,8 % Malzextrakt, 1,8 % Bierhefe, 1,0 % Sojamehl, 0,8 % Maismehl) gehalten. Des Weiteren wurden der Fliegennahrung 0,3 % des Fungizids Nipagin zugesetzt, um Pilzbefall zu verhindern. Sowohl Zucht als auch Alterungsexperimente erfolgten bei 18 °C, 25 °C oder 29 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 %. Alle Zuchtkultivatoren wurden mit einem simulierten 12/12 h LD Tag-Nacht-Rhythmus beleuchtet.

Für Kreuzungen wurden in der Regel drei bis fünf Männchen mit ca. zehn Jungfrauen pro Gläschen zusammengesetzt. Um eine gute Eiablage zu gewährleisten, wurde als Proteinquelle zusätzlich Trockenhefe zugegeben.

2.4.2 Keimbahntransformation

2.4.2.1 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion der Plasmid-DNA erfolgte auf 18°C in 30–60 min alte Embryonen (synzytiales Stadium) des Genotyps $y^*w^*; \Delta 2-3, Ki/+$. Diese Embryonen exprimieren konstitutiv das Enzym Transposase. Zunächst wurden die Embryonen durch vorsichtiges Rollen über ein doppelseitiges Klebeband dechorioniert. Anschließend wurden die Embryonen auf Apfagar aufgereiht, auf ein mit Klebstoff beschichtetes Deckgläschen übertragen und 10 min getrocknet. Die so vorbehandelten Embryonen wurden mit Voltalef-Öl H10S von ATOFINA überschichtet, um ein weiteres Austrocknen zu verhindern. Die DNA wurde mit Injektionspuffer und grüner Lebensmittelfarbe auf eine Endkonzentration von ca. 300 ng/ μ l verdünnt. Injiziert wurde die DNA-Lösung in der Nähe der Polzellen mit einer schräg abgebrochenen Glasnadel bei einem Druck von ca. 1 bar. Die

injizierten Embryonen wurden auf Apfelagarplatten mit einem kleinen Wasserreservoir transferiert und bis zum Schlüpfen der Larven auf 18 °C gehalten.

2.4.2.2 Selektion der Transformanten

Ab dem zweiten Tag nach der Injektion wurden die geschlüpften Larven mehrmals täglich abgesammelt und auf Futtergläschen mit aufgelockertem Brei gesetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Fliegen auf 25 °C gehalten. Mit den adulten Jungfrauen und Männchen wurden dann Einzelkreuzungen zu w^{1118} angesetzt. In der F1-Generation konnten die transgenen Fliegen über ihre rote Augenfarbe (Selektionsmarker: *mini-white*) selektiert werden.

2.4.2.3 Etablierung stabiler Linien

Um stabile, transgene Linien zu erhalten, wurden die rotäugigen Männchen ohne Transposaseaktivität (selektierbar über den Verlust des dominanten Markers *Ki*) zu Jungfrauen des Doppelbalancerstammes w^* ; *Sco/CyO; D3/TM3, Sb¹* gekreuzt. In der nächsten Generation wurden rotäugige Männchen und Jungfrauen mit den Merkmalen CyO und TM3, Sb¹ abgesammelt und aus diesen stabile Stämme der transgenen Fliegenlinien angesetzt.

Außerdem wurde für jede Linie ein Männchen aus der ersten Doppelbalancerkreuzung mit den Merkmalen CyO und TM3, Sb¹ eine weiteres Mal zum Doppelbalancerstamm gekreuzt, um den Insertionsort des P-Elements zu bestimmen. Trugen alle weißäugigen Fliegen die Marker Sco und CyO und es schlüpften rotäugige Fliegen mit den Merkmalen D3 und TM3, Sb¹ hatte die Insertion des P-Elements auf dem 2. Chromosom stattgefunden. Waren jedoch alle weißäugigen Fliegen vom Genotyp D3/TM3, Sb¹ und es gab rotäugige Sco/CyO-Fliegen, handelte es sich um eine Linie mit der Insertion des P-Elements auf dem 3. Chromosom. Linien mit p-Element-Insertion auf den Geschlechtschromosomen wurden nicht weitergeführt.

2.4.3 Genetische Methoden

2.4.3.1 Zeit- und gewebespezifische Expression von humanen und *Drosophila* Genen

Die in dieser Arbeit gezeigten Überexpressionsanalysen wurden mit Hilfe des binären UAS/Gal4-Systems durchgeführt (Brand & Perrimon 1993).

Die zeitliche Regulation der Gal4-gesteuerten Responderexpression erfolgte über das temperatursensitive Gal80^{ts}-System unter Kontrolle des ubiquitären Tubulinpromotors (tub-Gal80^{ts}). Bei 18° C bindet der Repressor Gal80 Gal4 und unterdrückt somit die Expression. Bei 29°C ist das temperatursensitive Gal80 inaktiv, Gal4 kann an die UAS (*upstream activation sequence*) binden und die Responderexpression aktivieren (McGuire *et al.* 2003).

2.4.3.2 „Jump-out“-Kreuzungen

Standen für ein Konstrukt nicht genügend unterschiedlichen transgenen Linien zur Verfügung, wurden so genannte „jump-out“-Kreuzungen angesetzt. Hierfür wurden in Einzelkreuzungen Jungfrauen einer Linie mit dem entsprechenden p-Element mit Männchen des konstitutiv Transposase exprimierenden Stammes $y^*w^*;;\Delta 2-3, Ki$ gekreuzt. Anschließend wurden Männchen der F1-Generation zu w^{1118} -Jungfrauen gekreuzt. Rotäugige Männchen der F2-Generation wurden dann, wie in 2.4.2.3 beschrieben, zu Jungfrauen des Doppelbalancerstammes gekreuzt, um neue stabile transgene Linien zu erhalten und den Insertionsort des p-Elements zu bestimmen. Linien mit Doppelinsertionen wurden, wenn möglich, nicht berücksichtigt.

2.4.3.3 Rekombinationskreuzungen

Für die meiotische Rekombination der Konstrukte P{GawB}D42 und P{UAS-mito-HA-GFP.AP}3 wurden ca. 200 Jungfrauen des Fliegenstammes $w^*; P\{GawB\}D42 (D42-Gal4)$ zu Männchen des Stammes $w^{1118}; P\{UAS-mito-HA-GFP.AP\}3, e^I$ gekreuzt. Rekombinante Fliegen konnten anhand der GFP exprimierenden Speicheldrüsen unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert und abgesammelt werden. Rekombinante Männchen wurden dann über Kreuzungen zum Doppelbalancerstamm $w^*; Sp/CyO; D3/TM6B, Tb^I$ balanciert und stabile Linien

etabliert. Dabei wurden nur Fliegen verwendet, die im Zuge der Rekombination die Mutation e^l des Gens *ebony* verloren hatten.

2.5 Verhaltensversuche

2.5.1 Beobachtung des Krabbelverhaltens (*tail-flipping*)

Männliche Larven des dritten Stadiums wurden vorsichtig mit einem Pinsel auf Apfelagarplatten (RT) gesetzt und dann nach kurzer Akklimatisierungszeit unter dem Stereomikroskop beobachtet. Das Verhalten der Tiere wurde mit einer Digital-Mikroskopkamera als Film bzw. Photo dokumentiert. Die Filme wurden mit dem Programm *VirtualDub* geschnitten und bearbeitet. Die Aufnahme der Photos erfolgte mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop.

Für die Untersuchung des *tail-flipping*-Phänotyps wurden pro Genotyp wenigstens jeweils zehn männliche Larven aus zwei unabhängigen Kreuzungen beobachtet.

2.5.2 Negative-Geotaxis-Tests

Die gealterten Männchen wurden am Abend vor dem Versuch auf Eis betäubt und vereinzelt. Der Versuch selbst erfolgte immer zwischen ZT 2 und ZT 4 bei gleichen Lichtverhältnissen und möglichst gleichbleibender Temperatur. Jeweils eine Fliege wurde in eine mit Watte einseitig verschlossenen Plastikpipette (10 ml) geschüttelt. Nach einer kurzen Erholungsphase von ca. 1 min wurde die Fliege auf den Watteboden der Pipette geklopft. Es wurde dann gemessen, wie viel Zentimeter die Fliege innerhalb von 12 s in der Pipette wieder senkrecht nach oben kletterte. Pro Genotyp und Versuchstag wurden von mindestens zehn Fliegen Daten erhoben in jeweils drei direkt aufeinander folgenden Durchläufen.

2.5.3 Lokomotor-Aktivitäts-Analyse

2.5.3.1 Aufnahme der Lokomotor-Aktivität

Die Aufnahme des Lokomotor-Aktivitätsverhaltens erfolgte mit Hilfe eines von der Werkstatt der Universität Regensburg gebauten Systems unter kontrollierten

Bedingungen in einer Klimakammer. Es wurde das Verhalten männlicher Fliegen einzeln aufgezeichnet, wie bereits in vorhergehenden Arbeiten beschrieben (Helfrich-Forster 1998; Rieger *et al.* 2007). Das verwendete System besteht aus acht aneinander geklebten Photometerküvetten mit einer Größe von ca. 4,5 x 1 x 1 cm. Es wurde dokumentiert, wie oft eine Fliege innerhalb einer Minute einen die Küvette durchquerenden Infrarotstrahl durchläuft. Die Versuche wurden unter kontrollierter Beleuchtung in einem alternierenden Tag-Nacht-Zyklus mit 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (LD 12/12) durchgeführt. Die Beleuchtung erfolgte dabei mit Weißlicht-LEDs in einer Stärke von 100 Lux, gesteuert von der *Lichtorgel Software*. Eingesetzt wurden drei Tage alte Fliegen.

2.5.3.2 Analyse der Lokomotor-Aktivität

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte immer erst ab Versuchstag 2, um die Eingewöhnungsphase des ersten Tages nicht in die Datenerhebung mit einzuschließen. Zunächst wurden alle Einzelwerte (Infrarotstrahldurchquerungen einer Fliege pro Minute), die größer als elf Ereignisse waren mit Hilfe des Programms Excel auf den Wert elf reduziert. Größere Werte gelten erfahrungsgemäß als unrealistisch und sind vermutlich auf Messfehler zurückzuführen (persönliche Mitteilung Prof. C. Helfrich-Förster). Um auszuschließen, dass tote Fliegen mit in die Auswertung eingehen, wurden dann die Aktivitätsdaten der einzelnen Fliegen über das *ImageJ Plugin ActoJ* als Aktogramm visualisiert und beurteilt. Datensätze, die nur eine sehr geringe bzw. keine Aktivität zeigten, wurden ausgeschlossen. Als Nächstes wurde die durchschnittliche Tagesaktivität pro Fliege über einen Zeitraum von jeweils 10 Tagen mit Hilfe eines Excel-Makros berechnet. Ausgegeben wird die durchschnittliche Aktivität einer Fliege für jede Minute eines Tages. Aus diesen durchschnittlichen Tagesaktivitäten pro Minute der einzelnen Fliegen eines Genotyps, kann das durchschnittliche Aktivitätsprofil eines Tages aller Fliegen eines Genotyps berechnet werden. Darüber hinaus wurde aus den Aktivitätswerten pro Minute eines kompletten Tages die durchschnittliche Tagesaktivität einer Fliege berechnet (Aktivitätsspiegel). Es wurden pro Genotyp mindestens 20 Fliegen ausgewertet.

Kapitel III: Ergebnisse

Ergebnisse

Mutationen im Gen *DCTN1* werden als Risikofaktoren für das Perry-Syndrom, eine atypische Form der Parkinsonschen Krankheit und die Motoneuronerkrankung Distale Hereditäre Motoneuropathie TypVII (dHMN7B) diskutiert. Im Zusammenhang mit dHMN7B konnte allerdings bisher nur für die Mutation G59S zweifelsfrei Kosegregation nachgewiesen werden (Puls *et al.* 2003). In einer Testreihe von über 2500 ALS-MND und Parkinson-Patienten sowie Kontrollpersonen wurden alle 32 Exons des Gens *DCTN1* auf weitere Sequenzvarianten untersucht. Dabei konnten 24 potentielle Mutationen identifiziert werden. Da für keine der Mutationen ein eindeutiges Vererbungsmuster nachgewiesen werden konnte, ist unklar, ob es sich bei den Sequenzvarianten tatsächlich um pathogene Risikofaktoren für ALS handelt (Stockmann *et al.* 2012). Ziel dieser Arbeit ist es, anhand eines transgenen *Drosophila*-Modells neun dieser neuen *DCTN1*-Varianten mit Hilfe von Überexpressionsanalysen zu charakterisieren. Die verschiedenen *DCTN1*-Varianten werden im Vergleich zur Überexpression des humanen wildtypischen Konstrukts und des *Drosophila*-Homologs bezüglich ihrer phänotypischen Effekte untersucht. Dabei soll eine Klassifizierung nach entwicklungsbiologischen Störungen gegenüber Motoneurondefekten vorgenommen werden. Die Überexpression der dHMN7B-verursachenden Mutation G59S wird als Positivkontrolle in die Analysen mit einbezogen. Für die Überexpressionsanalysen mussten zunächst transgene *Drosophila*-Stämme mit den jeweiligen *DCTN1*-Konstrukten etabliert werden.

1 Expression von humanem *DCTN1* in *Drosophila*

Innerhalb eines am Lehrstuhl durchgeführten Pilotprojektes wurden bereits transgene Linien für das humane wildtypische *DCTN1*-Konstrukt und die mutanten Versionen G59S und R149Q generiert (Stribl 2008). Die *DCTN1*-Varianten E34Q und R1049Q wurden im Rahmen einer Diplomarbeit kloniert, injiziert und stabile Linien etabliert (Rauenbusch 2010). Es sollten nun noch für das *Drosophila*-Homolog sowie für die folgenden neu identifizierten *DCTN1*-Varianten stabile transgene UAS-Linien

etabliert werden: D63Y, R148W, I196V, M571T, Y878C und T1249I (siehe auch S.20, Abbildung 5).

1.1 Etablierung stabiler transgener UAS-DCTN1-Linien

Die humanen *DCTN1*-Konstrukte mit den Mutationen D63Y, R148W, I196V, M571T, Y878C und T1249I wurden bereits aus den von der Universität Ulm zur Verfügung gestellten Zellkulturvektoren pcDNA3.1 in den Expressionsvektor pUAST kloniert. Außerdem wurde das *Drosophila* Ortholog *Glued* aus dem Klon RE24170 der cDNA Bibliothek der Firma *open Biosystems* in den Vektor pUAST kloniert (Hasler 2008; Stockmann *et al.* 2012). Alle Konstrukte wurden mit der *Drosophila*-Kozak-Konsensus-Sequenz CAAC ausgestattet. Die humanen *DCTN1*-Konstrukte tragen am C-Terminus die Sequenz für einen einfachen Flag-Tag. Die Sequenzen der Konstrukte wurden vor der Mikroinjektion per Sequenzierung überprüft (Hasler 2008; Rauenbusch 2010).

Die Konstrukte p{w[+] UAS- DCTN1-Flag} und p{w[+] UAS-glued} wurden in Embryonen der Kreuzung $w^{1118} \times y^*w^*$; $Ki\Delta 2-3$, wie in Kapitel II (2.4.2, S.42) beschrieben, injiziert. Tabelle 12 zeigt die jeweilige Anzahl der injizierten Embryonen, die Überlebensraten sowie die Anzahl der etablierten transgenen Linien.

UAS-Konstrukt	Anzahl der injizierten Embryonen	Überlebensrate Injektion (F1)		Überlebensrate nach Kreuzung zu w^{1118} (F2)		Anzahl der abgesammelten Transformanten	Anzahl der etablierten stabilen Linien
		Anzahl	in %	Anzahl	in %		
D63Y	282	31	11	15	50	15	14
R148W	260	18	7	11	61	14	14
I196V	315	61	19	23	38	13	8
M571T	277	33	12	26	79	13	11
Y878C	363	42	12	21	50	11	10
T1249I	265	43	16	21	50	18	16
glued (dmWT)	319	33	10	10	30	9	5

Tabelle 12: Daten der Mikroinjektion der Konstrukte p{w[+] UAS- DCTN1-Flag} und p{w[+] UAS-glued}.

Der genetische Status jeweils einer stabilen Linie der verschiedenen Konstrukte wurde nochmals per Sequenzierung überprüft. Eine Übersicht über alle Linien mit

Angabe der Insertionsorte und den jeweiligen Eigenschaften der Linien ist im Anhang (Tabelle 18, S.125) aufgelistet.

Die bereits etablierten Linien mit dem wildtypischen humanen Konstrukt und der Mutation R149Q mussten zum Teil, unter anderem aufgrund von Doppelinsertionen, neu balanciert werden. Für die G59S- und E34Q-Linien wurden über *jump-out*-Kreuzungen zusätzlich zu den bereits etablierten Linien stärker exprimierende Linien generiert (Anhang, Tabelle 19, S.126).

1.2 Validierung der transgenen UAS-DCTN1-Linien

In Vorarbeiten hat sich gezeigt, dass einige der beobachteten Phänotypen stark von der *DCTN1*-Expressionsstärke der jeweiligen Linien abhängig sind (Stribl 2008). Deshalb ist es wichtig, das Expressionsniveau der einzelnen Linien zu kennen, um gegebenenfalls in den Überexpressionsanalysen Linien mit ähnlich starker Expression verwenden zu können. Die Bestimmung der Expressionsstärke der einzelnen generierten Linien erfolgte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene.

1.2.1 Bestimmung der relativen *DCTN1*-mRNA-Expression der Linien

Für die Quantifizierung der relativen mRNA-Expression der einzelnen Linien wurden sieben Tage alte männliche Fliegen verwendet. Die Konstrukte wurden dabei mit dem motoneuronspezifischen Treiber D42-Gal4 exprimiert. Als Bezugspunkt für die relative Quantifizierung wurde die Linie 1 der Stämme mit dem wildtypischen humanen Konstrukt (hWT/1) gewählt, da bei dieser in den vorhergehenden Arbeiten bereits Phänotypen beobachtet wurden. In Abbildung 9 ist die relative mRNA-Expression der untersuchten Linien dargestellt. Mindestens eine Linie der *DCTN1*-Varianten E34Q, D63Y, R149Q, I196V, Y878C, R1049Q und T1249I zeigt ein ähnlich starkes Expressionsniveau wie hWT/1. Die getesteten Linien der Mutationen G59S, R148W und M571T exprimieren alle etwas stärker als hWT/1. Die Linien E34Q/1 und vor allem Y878C/7 zeigen eine deutliche schwächere *DCTN1*-Expression als die Referenzlinie hWT/1. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen

werden, dass sich die tatsächliche Proteinmenge von der mRNA-Expressionsstärke unterscheidet.

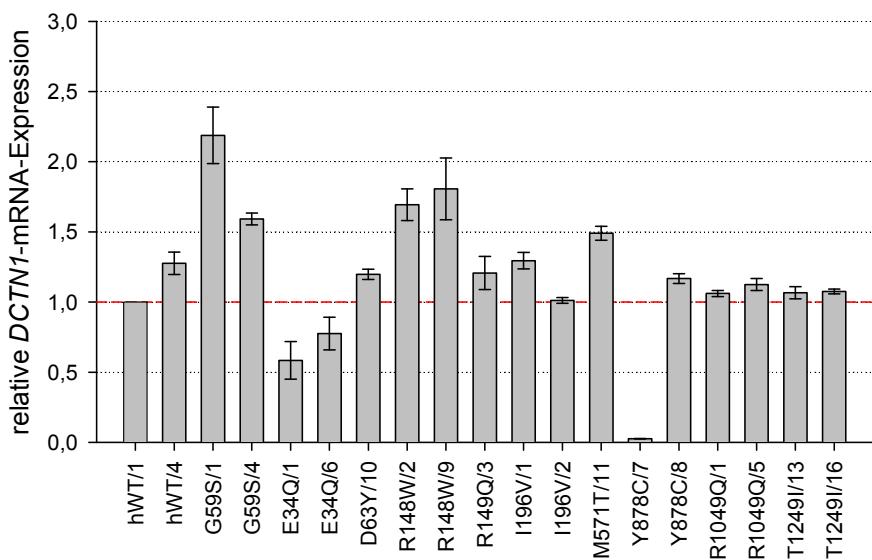


Abbildung 9: Relative DCTN1-mRNA-Expression verschiedener UAS-DCTN1-Linien. Gezeigt sind die in dieser Arbeit verwendeten Linien. Als Bezugspunkt dient die Expressionsstärke der Linie hWT/1 (rote Linie). Die Konstrukte wurden mit D42-Gal4 spezifisch in Motoneuronen exprimiert. Genotyp: $w^{1118}; D42-Gal4; UAS-DCTN1$.

1.2.2 Relative Proteinexpression der UAS-DCTN1-Linien

Die Bestimmung der p150^{Glued}-Menge in *DCTN1* überexprimierenden Fliegen erfolgte über Western-Blot-Analysen. Es wurden wiederum sieben Tage alte männliche Fliegen getestet. *DCTN1* wurde mit dem muskelspezifischen Treiber 24B-Gal4 exprimiert. Der Nachweis von p150^{Glued} erfolgte mittels Antikörperfärbung gegen den am C-Terminus des Proteins angebrachten Flag-Tag (Kapitel II, 2.2.2.1, S.35 und Kapitel III, 1.1, S.49). Da die UAS-glued-Konstrukte keinen Flag-Tag haben, konnte jedoch keine vergleichende Analyse der Expression der UAS-DCTN1-Konstrukte mit den UAS-glued-Konstrukten vorgenommen werden.

Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Proteinmengen von mindestens drei biologischen Replikaten pro Genotyp (Abbildung 10). Als Referenz diente ebenfalls die Linie hWT/1. Um sicherzustellen, dass für alle *DCTN1*-Konstrukte Linien mit gleicher Expressionsstärke zu Verfügung stehen, wurden für alle Mutationen mit stark abweichender mRNA-Expression im Vergleich zu hWT zusätzliche Linien getestet.

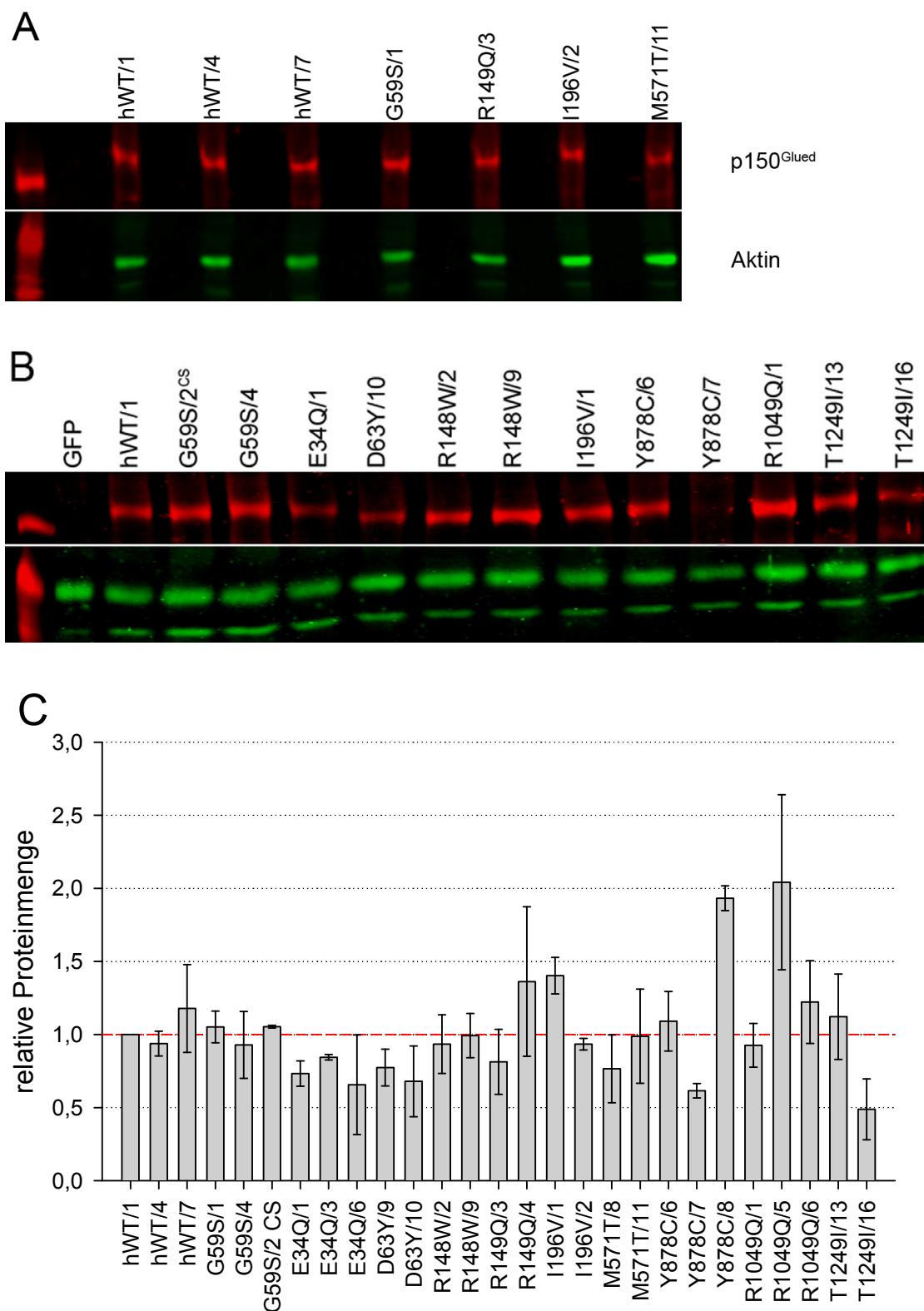


Abbildung 10: Relative $p150^{\text{Glued}}$ -Proteinmenge verschiedener UAS-DCTN1-Linien nach *DCTN1*-Expression im Muskel (24B-Gal4). A, B: Exemplarische Western-BLOTS der wichtigsten Linien. Grüne Banden: Aktin (ca. 42 kDa), rote Banden: $p150^{\text{Glued}}$ (ca. 150 kDa). C: Quantifizierung der relativen Proteinmenge. Dargestellt sind die relativen Proteinmengen, der in dieser Arbeit verwendeten Linien, normalisiert auf den Wert der Linie hWT/1 (rote Linie). Genotyp: w^{1118} ; 24B-Gal4; UAS-DCTN1.

Die meisten untersuchten Linien zeigten in den Western-Blot-Analysen ähnliche Expressionsstärken verglichen mit der Linie hWT/1 wie auf mRNA-Ebene. Auffällig ist jedoch, dass im Vergleich zur Messung der mRNA-Expression, tatsächlich in einigen Linien abweichende Proteinmengen im Verhältnis zu hWT/1 gemessen wurden. Die Linien Y878C/7 und Y878C/8 zeigen eine höhere p150^{Glued}-Menge als auf mRNA-Ebene. Obwohl die Linien G59S/1, G59S/4, R148W/2, R148W/9 und M571T/11 auf mRNA-Ebene mehr *DCTN1* exprimieren als hWT/1, ist die gemessene relative Proteinmenge in etwa so groß wie in der Linie hWT/1. Für alle untersuchten *DCTN1*-Varianten konnten Linien gefunden werden, die ungefähr gleich stark exprimieren (Abbildung 10). Zunächst sollten jedoch unabhängig von der Expressionsstärke alle etablierten Linien einer allgemeinen entwicklungsbiologischen Analyse unterzogen werden.

2 ***DCTN1*-Überexpression führt zu Entwicklungsstörungen**

Verschiedene zellbiologische Studien deuten darauf hin, dass der Proteinkomplex Dynaktin in der Mitose eine wichtige Rolle einnimmt (Clark & Meyer 1994; Muhua *et al.* 1994; Echeverri *et al.* 1996). So ist es nicht überraschend, dass eine dominant-negative Version der Untereinheit p150^{Glued} (*Gl^I*) z.B. zu schweren Störungen in der Augenentwicklung führt. Die adulten Augen sind kleiner, mit glatter, glänzender Oberfläche und unregelmäßiger Photorezeptor- und Borstenanordnung (Plough & Ives 1934; Fan & Ready 1997). Homozygot resultiert die verkürzte Version *Gl^I* in früher embryonaler Letalität (Harte & Kankel 1982). Bereits bekannt ist ebenfalls, dass die ubiquitäre Überexpression (actin-Gal4) des wildtypischen humanen Proteins in *Drosophila melanogaster* letal ist. Die actin-Gal4 gesteuerte Expression der mutanten *DCTN1*-Variante G59S führt jedoch zu keiner Beeinträchtigung der Entwicklung. Die Überexpressionen der Mutationen R149Q und R1049Q sind ebenfalls letal. Die schwach exprimierenden E34Q-Linien zeigen sich hingegen lebensfähig (Stribl 2008; Rauenbusch 2010). Anhand der actin-Gal4 getriebenen ubiquitären Überexpression sollten nun auch alle anderen neu identifizierten Mutationen sowie das *Drosophila* Homolog *Glued* bezüglich ihrer entwicklungsbiologischen Effekte untersucht werden.

2.1 Ubiquitäre Überexpression der UAS-DCTN1-Konstrukte

Da die, in den oben genannten Arbeiten, verwendeten Linien der Mutationen G59S und E34Q überwiegend schwächer exprimierten als die Linien mit dem humanen wildtypischen Konstrukt, wurden diese Mutationen nochmals mit den neuen stärker exprimierenden Linien überprüft. Es zeigte sich, dass alle G59S Linien unabhängig von ihrer Expressionsstärke nach ubiquitärer Expression lebensfähig sind. Die Überexpression der beiden wildtypischen Konstrukte (human/*Drosophila*) ist in jedem Fall letal. Ebenso sind auch alle anderen *DCTN1*-Varianten, wenn sie ubiquitär exprimiert werden, embryonal, larval oder pupal letal (Anhang, Tabelle 20, S.127). Einzige Ausnahme ist dabei die Mutation E34Q. Bemerkenswerterweise ist die ubiquitäre Überexpression von E34Q nicht zwangsläufig letal. In allen Linien überleben die Weibchen, bei einigen Linien sind auch die Männchen lebensfähig. Alle lebensfähigen E34Q-Tiere haben jedoch Probleme beim Schlüpfen und verkürzte oder fehlende Makrochaeten auf dem Notum (Abbildung 11). Dieser Effekt wurde auch in der Arbeit von Rauenbusch (2010) beschrieben.



Abbildung 11: Die ubiquitäre Überexpression von $p150^{\text{Glued}}\text{-E34Q}$ beeinträchtigt die Entwicklung der Makrochaeten. Die actin-Gal4 gesteuerte Expression der *DCTN1*-Variante E34Q ist nicht letal, führt aber zu einer Störung der Entwicklung der großen Borsten auf dem Notum. Die ebenfalls lebensfähige ubiquitäre Expression von $p150^{\text{Glued}}\text{-G59S}$ zeigt hingegen eine wildtypische Makrochaetenentwicklung. Genotyp: $w^{1118}; \text{actin-Gal4}; \text{UAS-DCTN1}$.

Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass zudem die ektopische Expression verschiedener *DCTN1*-Konstrukte in Photorezeptorzellen in schweren Störungen der Augenentwicklung resultiert (Stribl 2008; Rauenbusch 2010).

2.2 Augenspezifische Überexpression der UAS-DCTN1-Konstrukte

Die augenspezifische Expression des humanen wildtypischen Konstrukts (hWT) mit GMR-Gal4 führt interessanterweise zu einem *Gl^l* ähnlichen Phänotyp, wohingegen die Expression der Mutationen G59S und E34Q wiederum nur eine milde bzw. keine Entwicklungsstörungen hervorruft. Die mutante Variante R149Q verursacht einen ähnlichen Phänotyp wie das humane wildtypische Protein. Diese Effekte sind nicht nur von der Art des exprimierten Konstrukts, sondern auch von der Expressionsstärke abhängig (Stribl 2008; Rauenbusch 2010).

Es wurden nun auch die Linien der Mutationen D63Y, R148W, R149Q, I196V, M571T, Y878C, R1049Q und T1249I auf Störungen in der Augenentwicklung überprüft. Mittels GMR-Gal4 wurden die *DCTN1*-cDNAs wiederum spezifisch im Auge exprimiert. Außerdem wurden zusätzlich die neuen stärker exprimierenden Linien der bereits untersuchten Mutationen nochmals getestet. Die Expression von hWT-*DCTN1* führt auch hier zu einer starken Beeinträchtigung der Augenentwicklung (Abbildung 12). Die Augen sind bedeutend kleiner, die normalerweise sehr regelmäßige Ommatidialstruktur und Borstenanordnung geht teilweise oder komplett verloren und die Retina hat eine glänzende Oberfläche. Der gleiche Effekt tritt in unterschiedlich starker Ausprägung auch auf, wenn folgende Konstrukte im Auge getrieben werden: D63Y, R148W, R149Q, I196V, M571T, Y878C, R1049Q und T1249I. Außerdem konnte bestätigt werden, dass die von den genannten *DCTN1*-Versionen hervorgerufenen Entwicklungsstörungen von der Expressionsstärke abhängig sind. So zeigt zum Beispiel die schwächer exprimierende Linie Y878C/7 einen milder Phänotyp als die stärker exprimierende Linie 6 des gleichen Konstrukts (Abbildung 10, S.52 und Abbildung 12). Im Gegensatz dazu entwickeln die verschiedenen G59S Linien nur einen sehr schwachen Phänotyp. Die Augen erscheinen nahezu wildtypisch. Die Ommatidialstruktur ist noch deutlich zu erkennen und die Photorezeptorzellen sowie die Borsten sind nur stellenweise unregelmäßig angeordnet. Dieser sehr milde Phänotyp scheint unabhängig von der Expressionsstärke zu sein. Alle Linien zeigen einen ähnlich schwachen Effekt, so zum Beispiel auch die Linie G59S/1, welche auf dem selben Niveau exprimiert wie die Linie hWT/1. Interessanterweise führt die

augenspezifische Überexpression der Mutation E34Q ebenfalls nur zu einer sehr schwachen Störung der Retinaentwicklung. Lediglich zwei Linien zeigen einen etwas stärkeren Effekt (E34Q/3+6). Alle anderen Linien entwickeln nur sehr vereinzelt Störungen in der Retinastruktur (Abbildung 12). Eine für alle Linien aufgeschlüsselte Übersicht über die Stärke der Entwicklungsstörungen im Auge ist im Anhang zu finden (Tabelle 20, S.127).

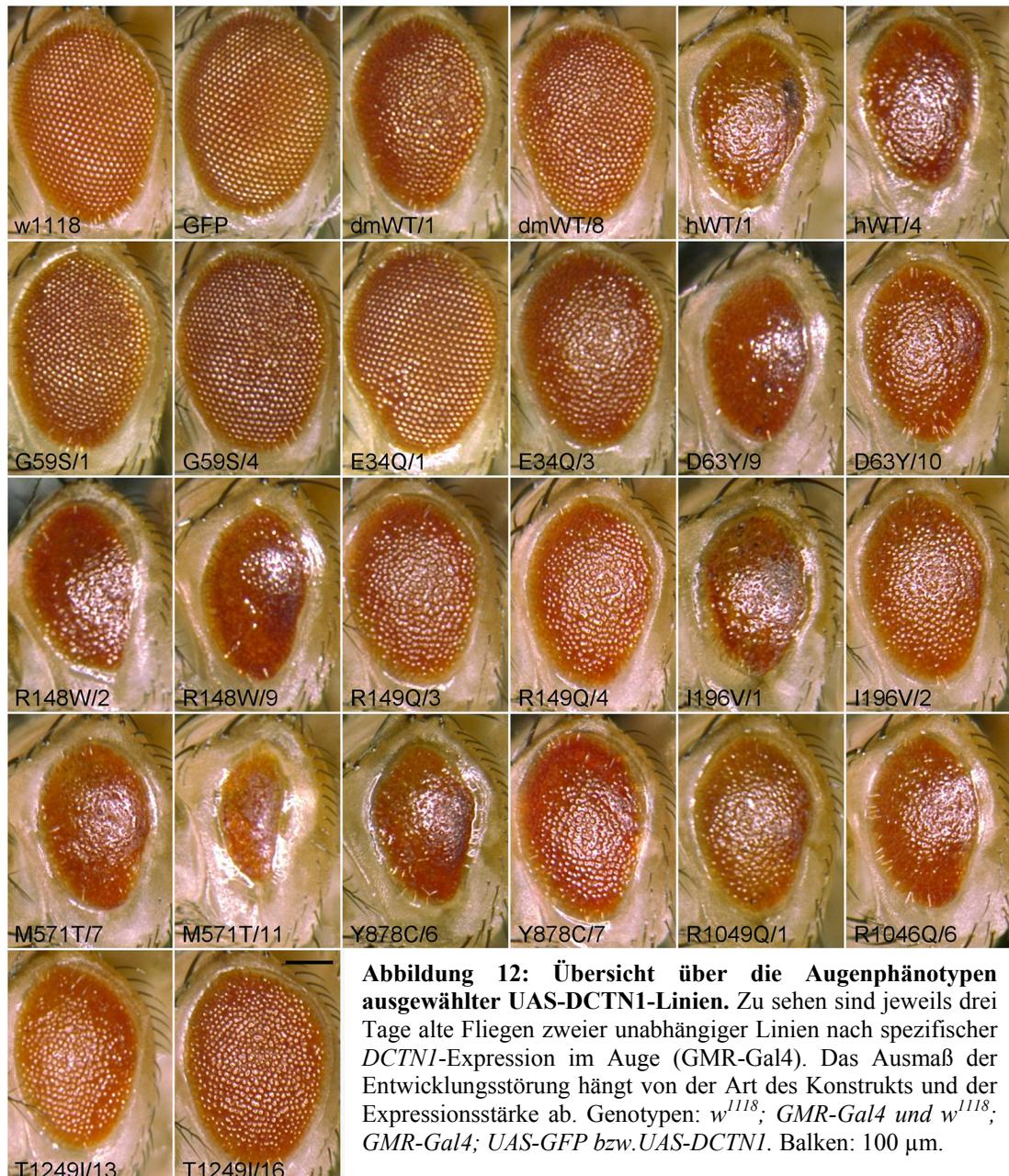


Abbildung 12: Übersicht über die Augenphänotypen ausgewählter UAS-DCTN1-Linien. Zu sehen sind jeweils drei Tage alte Fliegen zweier unabhängiger Linien nach spezifischer *DCTN1*-Expression im Auge (GMR-Gal4). Das Ausmaß der Entwicklungsstörung hängt von der Art des Konstrukts und der Expressionsstärke ab. Genotypen: *w¹¹¹⁸*; *GMR-Gal4* und *w¹¹¹⁸*; *GMR-Gal4; UAS-GFP* bzw. *UAS-DCTN1*. Balken: 100 µm.

Alle beobachteten Phänotypen sind bereits in frisch geschlüpften Fliegen zu beobachten und zeigen keine Verschlechterung im Alter (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen der Augenimaginalscheiben zeigen eine erhöhte Zelltodrate hinter

der morphogenetischen Furche in hWT exprimierenden Larven (Anhang, Abbildung 39, S.128). Dies legt nahe, dass es sich hier tatsächlich um Entwicklungsstörungen handelt und nicht etwa um altersabhängige neurodegenerative Effekte in der Retina.

In Tabelle 13 sind die entwicklungsbiologischen Effekte nach ubiquitärer und augenspezifischer Expression aller *DCTN1*-Konstrukte zusammengefasst. Die Überexpression der wildtypischen und mutanten *DCTN1*-Formen verursacht schwere Entwicklungsstörungen in *Drosophila*. Davon ausgenommen sind die beiden in der Mikrotubulibindedomäne der Dynaktinuntereinheit lokalisierten Mutationen G59S und E34Q, die nur milde Entwicklungsphänotypen verursachen. Es ist nun besonders interessant zu untersuchen, welche Auswirkung die motoneuronspezifische Überexpression dieser *DCTN1*-Varianten beispielsweise auf die motorischen Fähigkeiten der Fliegen hat.

UAS-Konstrukt Phänotyp	dmWT	hWT	G59S	E34Q	D63Y	R148W	R149Q	I196V	M571T	Y878C	R1049Q	T1249I
Letalität (actin-Gal4)	++	++	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++
Augenphänotyp (GMR-Gal4)	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 13: Übersicht über die Entwicklungsstörungen nach *DCTN1*-Expression. Die Mutationen G59S und E34Q zeigen sowohl nach ubiquitärer als auch nach augenspezifischer Expression kaum Beeinträchtigungen in der Entwicklung im Gegensatz zu allen anderen *DCTN1*-Konstrukten. Klassifizierung der Phänotypen: wildtypisch (-), milder Phänotyp (+), starker Phänotyp (++) . Genotyp: w^{1118} ; actin-Gal4 bzw. GMR-Gal4; UAS-DCTN1.

3 *DCTN1* beeinträchtigt die motorischen Fähigkeiten von *Drosophila*

Untersuchungen am transgenen Mausmodell zeigten bereits, dass transgene p150^{Glued}-G59S Mäuse einen MND ähnlichen Phänotyp entwickeln. Sie haben mit zunehmendem Alter häufiger Tremoranfälle und verlieren an Greifkraft (Laird *et al.* 2008). Wird p150^{Glued}-G59S motoneuronspezifisch in *Drosophila* exprimiert, kommt es auch hier zu einem altersabhängigen Verlust der motorischen Fähigkeiten. Fliegen, die p150^{Glued}-G59S exprimieren zeigen eine stärker reduzierte Lauffähigkeit

in Lokomotionstests im Vergleich zu Fliegen, die die wildtypischen Konstrukte exprimieren (Stribl 2008; Lloyd *et al.* 2012).

3.1 Analyse des Negativen-Geotaxis-Verhaltens

Mit Hilfe des Negativen-Geotaxis-Tests wurden alle *DCTN1*-Varianten auf ihren Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten der Fliegen überprüft. Dazu wurde *DCTN1* mit der Treiberlinie D42-Gal4 spezifisch in Motoneuronen exprimiert. Die Laufgeschwindigkeit wurde nach fünf, zehn, 15 bzw. 20 Tagen gemessen. Es wurden – soweit möglich – jeweils zwei unabhängige Linien der einzelnen Konstrukte getestet. An einem Versuchstag konnten maximal vier verschiedene Genotypen gemessen werden, um immer innerhalb einer Aktivitätsphase des Tageszyklus der Fliegen zu bleiben. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsdurchläufe zu gewährleisten, wurde in jedem Versuchsansatz die Überexpression des humanen wildtypischen *DCTN1* als interne Kontrolle mitgeführt. Im Anhang (Abbildung 40 und Abbildung 41, S.129-130) sind die Originaldaten für alle getesteten Linien der einzelnen Genotypen aufgeschlüsselt. Zur besseren Übersicht wurden in Abbildung 13 diese Daten für je eine Linie pro Genotyp zusammengefasst. Die Werte der einzelnen Mutationen sind gegen die Mittelwerte der Kontrollen aus den einzelnen Versuchen aufgetragen. Die statistische Analyse erfolgte anhand der Originaldaten (Anhang, Tabelle 21, S.131).

Der Kletterassay zeigt, dass die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins im Vergleich zu den Kontrollen (w^{1118} ; D42-Gal4; UAS-GFP und w^{1118} ; D42-Gal4) keinen verstärkten altersabhängigen Rückgang der motorischen Fähigkeiten verursacht. Im Gegensatz dazu beeinträchtigt die Expression der *DCTN1*-Variante G59S bereits nach 15 Tagen die Kletterfähigkeit. Die motoneuronspezifische Expression der Mutationen E34Q, D63Y und I196V führt dagegen nach 20 Tagen zu einer deutlichen Reduktion der Klettergeschwindigkeit. Alle anderen Mutationen zeigen keine altersabhängige Verschlechterung der Motorik im Vergleich zur Expression von hWT (Abbildung 13 und Anhang: Abbildung 40, Abbildung 41, S.129-130).

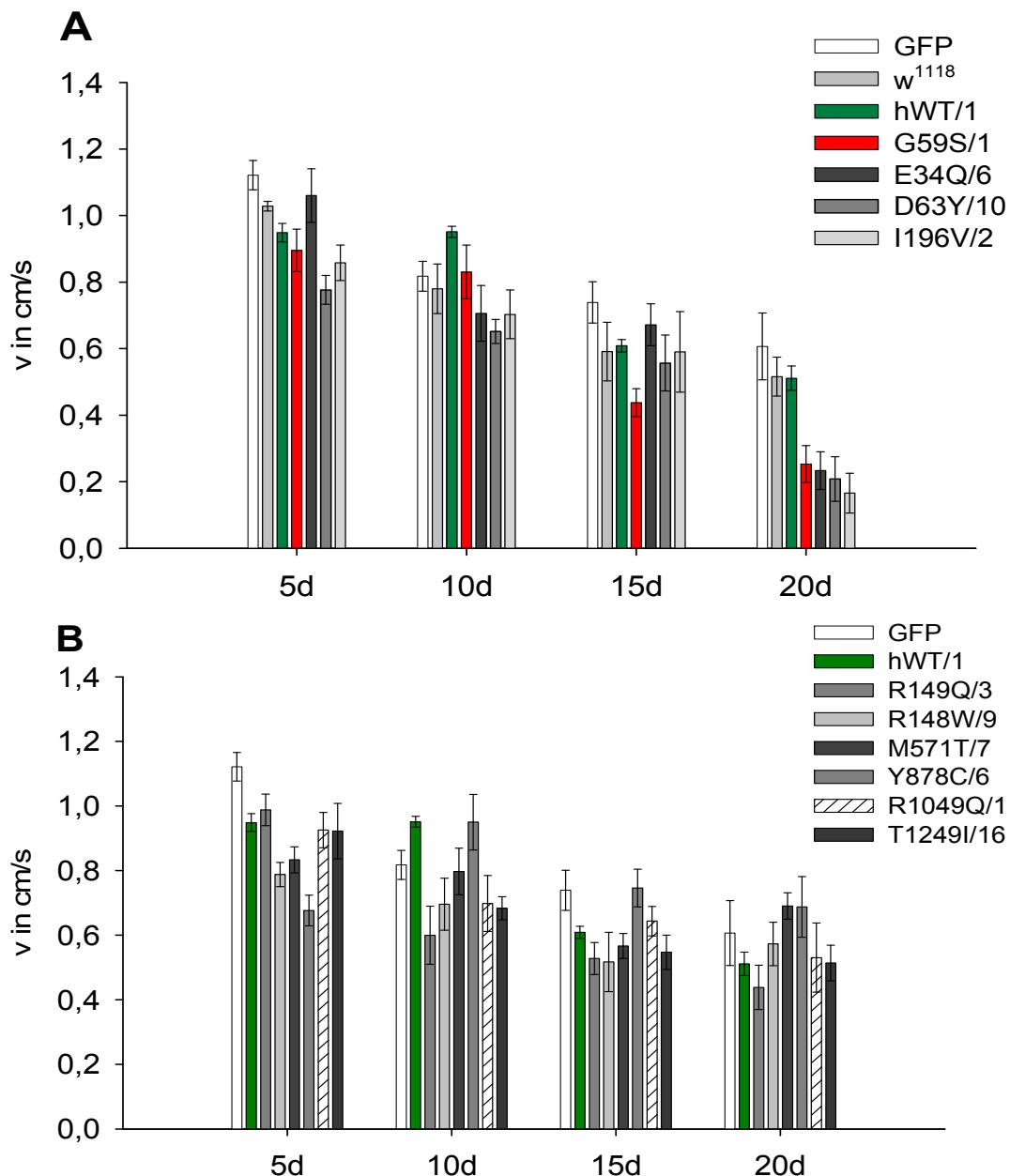


Abbildung 13: Negatives-Geotaxis-Verhalten nach motoneuronspezifischer *DCTN1*-Expression. *DCTN1* wurde mit D42-Gal4 in den Motoneuronen exprimiert. A: G59S, E34Q, D63Y und I196V führen zu einer altersabhängigen Reduktion der Klettergeschwindigkeit. B: Alle anderen *DCTN1*-Varianten zeigen keinen Einfluss auf die Kletterfähigkeit der Fliegen. Genotypen: *w¹¹¹⁸; D42-Gal4; UAS-DCTN1 bzw. UAS-GFP und w¹¹¹⁸; D42-Gal4*.

Da die Expression verschiedener *DCTN1*-Varianten tatsächlich unterschiedlich starke Störungen der motorischen Fähigkeiten verursacht, ist es interessant, zusätzlich zur Analyse der Kletterfähigkeit auch die allgemeine Lokomotor-Aktivität der *DCTN1* exprimierenden Fliegen zu untersuchen.

3.2 Lokomotor-Aktivitäts-Analyse

Für die Lokomotor-Aktivitäts-Analyse wurde das Aktivitätsverhalten männlicher Tiere über einen Zeitraum von fünf Wochen aufgezeichnet. Die Fliegen wurden dabei unter kontrollierten Bedingungen in Plastikküvetten gehalten. Es wurde gemessen, wie oft jede Fliege einen die Küvette durchquerenden Infrarotstrahl pro Minute durchläuft (Kapitel II: 2.5.3). Die *DCTNI*-Konstrukte wurden mit D42-Gal4 spezifisch in Motoneuronen exprimiert. Um einen altersabhängigen Effekt messen zu können, wurden zum einen die Aktivitätsdaten junger Fliegen (6-15 Tage alt, 1. Abschnitt: dritter bis zwölfter Versuchstag) zum anderen die Werte gealterter Fliegen (26-35 Tage alt, 2. Abschnitt: Versuchstage 23-32) getrennt ausgewertet (Anhang, Abbildung 42, S.132).

Da pro Versuchsansatz nur jeweils vier verschiedene Genotypen untersucht werden konnten, wurden mehrere Läufe durchgeführt. Es ist bekannt, dass die absoluten Aktivitätswerte von Lauf zu Lauf stark variieren können (persönliche Mitteilung Prof. C. Helfrich-Förster). Deshalb wurde in jedem Lauf die Expression von hWT als interne Kontrolle mitgeführt. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden die Daten der Einzelläufe auf die jeweiligen hWT-Mittelwerte normalisiert und in Abbildung 14 zusammengefasst. Die einzelnen Läufe sind im Anhang (Abbildung 43, S.133) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Originaldaten.

In jungen Fliegen (6-15 Tage alt) ist kein signifikanter Unterschied in der mittleren Tagesaktivität zwischen den Kontrollen (w^{1118} ; *D42-Gal4*; *UAS-GFP* und w^{1118} ; *D42-Gal4*) und der Überexpression der wildtypischen Konstrukte (hWT, dmWT) festzustellen (Abbildung 14). Auch die Expression der *DCTNI*-Variante D63Y zeigt keine Veränderung des Aktivitätsspiegels in Versuchsabschnitt 1. Die Mutationen I196V, R148W und R1049Q führen zu einer stark reduzierten Aktivität. Um einen Effekt des genetischen Hintergrunds der einzelnen Linien ausschließen zu können, wurden die UAS-Kontrollen (w^{1118} ; *UAS-DCTNI*) dieser Linien getestet. Interessanterweise zeigen die UAS-Kontrollen keine reduzierte Aktivität, sondern ein erhöhtes Aktivitätslevel. Die Überexpression der Mutation G59S führt in allen untersuchten Linien zu einer leicht erhöhten Lokomotoraktivität. Es konnte aber nur

für die Linie G59S/4 eine signifikant erhöhte Aktivität im Vergleich zu hWT/1 nachgewiesen werden ($p=0,043$).

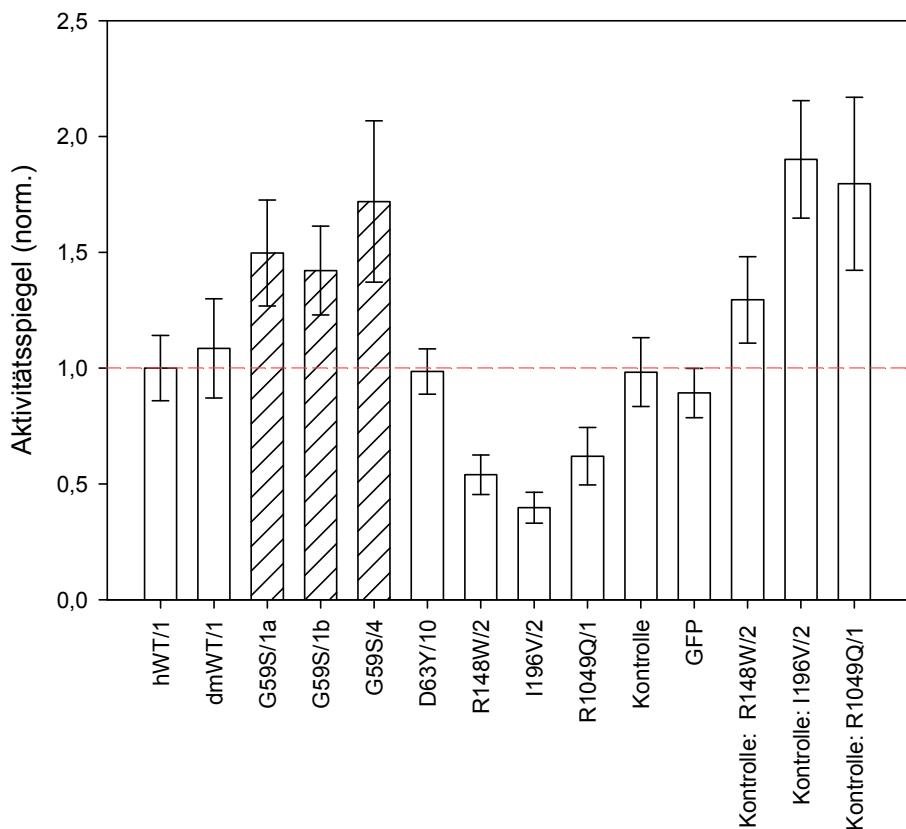


Abbildung 14: Normalisierter Aktivitätsspiegel junger Fliegen (6-15d) nach motoneuronenspezifischer *DCTN1*-Überexpression. Die D42-Gal4 gesteuerte Expression der Mutation G59S führt zu einem leicht erhöhten Aktivitätsspiegel im Vergleich zu dmWT und hWT. Die Mutationen R148W, I196V und R1049Q zeigen einen starken Rückgang der durchschnittlichen Lokomotoraktivität. Genotypen: w^{1118} ; *D42-Gal4*; *UAS-DCTN1*, Kontrollen: w^{1118} ; *D42-Gal4* und w^{1118} ; *UAS-DCTN1*.

Etwas anschaulicher werden die hier gezeigten Effekte, wenn man die durchschnittliche Lokomotoraktivität der Fliegen über den gesamten Tag darstellt. In Abbildung 15 sind die Tagesaktivitätsprofile der verschiedenen Genotypen im Vergleich zu der dazugehörigen hWT-Überexpression dargestellt. Alle Genotypen haben einen normalen Tagesrhythmus unter LD12/12 Bedingungen. Als dämmerungsaktive Tiere sind sie vor allem kurz nach „Licht-an“ (ZT0, Morgenaktivität) und kurz vor „Licht-aus“ (ZT12, Abendaktivität) besonders aktiv. Lediglich die Fliegen mit stark reduzierter Gesamtaktivität (R148W, I196V und R1049Q) zeigen nur noch einen sehr leichten Anstieg der Aktivität bei ZT0. In den Tagesprofilen ist zudem der Aktivitätsanstieg nach Überexpression von G59S im Vergleich zur hWT-Expression deutlich zu sehen (Abbildung 15).

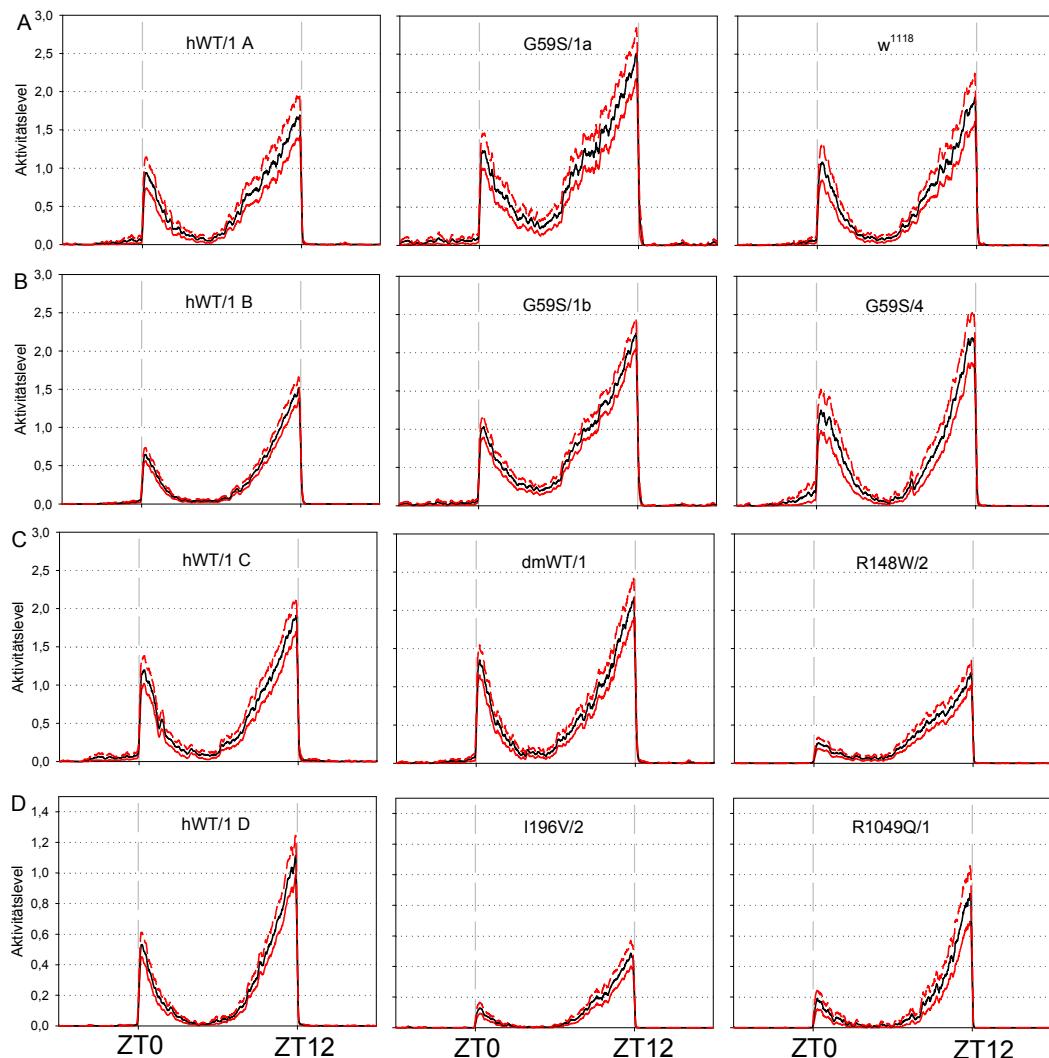


Abbildung 15: Durchschnittliches Aktivitätsprofil junger Fliegen im Verlauf eines Tages. Für die Berechnung eines Tagesaktivitätsprofils wurde für jede Fliege die mittlere Tagesaktivität innerhalb der Versuchstage 3-12 berechnet und dann alle Fliegen im durchschnittlichen Aktivitätslevel eines Tages zusammengefasst. A, B: Die motoneuronspezifische Expression der mutanten *DCTN1*-Form G59S zeigt in allen Versuchen ein höheres Aktivitätsniveau als die jeweilige Überexpression des humanen wildtypischen Proteins. A, C: Die Treiberkontrolle (w^{1118} ; *D42-Gal4*) und die Überexpression des *Drosophila*-Homologs (dmWT/1) zeigen im Vergleich zur hWT-Überexpression keine Veränderung. C, D: Die Aktivität der Fliegen nach Expression der Mutationen I196V, R148W und R1049Q ist stark reduziert. Die Messungen erfolgten unter LD12/12. ZT0: Licht-an, ZT12: Licht-aus, schwarze Linie: durchschnittliche Aktivität (*moving average*), rote Linien: \pm SEM. Genotypen: w^{1118} ; *D42-Gal4*; *UAS-DCTN1* und w^{1118} ; *D42-Gal4*.

Fast alle getesteten Genotypen zeigen tendenziell einen Anstieg der Aktivität im Alter (Anhang, Abbildung 43, S.133). Statistisch signifikant ist die erhöhte Aktivität in älteren Fliegen aber nur in den Kontrollen w^{1118} , *D42-Gal4* ($p=0,037$) und w^{1118} , *D42-Gal4*, *UAS-GFP* ($p<0,001$). Das heißt, die Überexpression der *DCTN1*-cDNAs scheint den in Wildtypfliegen beobachteten Aktivitätsanstieg im Alter zu hemmen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die motoneuronspezifische *DCTN1*-Expression je nach Mutation ein breites Spektrum an motorischen Defekten verursacht. Besonders auffällig ist dabei, dass nur die Mutation G59S eine leicht erhöhte Lokomotor-Aktivität in jungen Fliegen zeigt, aber auch die stärkste altersabhängige Reduktion der Kletterfähigkeit. Interessant ist ebenfalls die Mutation I196V, die in beiden Tests zu starken Beeinträchtigungen der motorischen Fähigkeiten führt (Tabelle 14).

UAS-Konstrukt Phänotyp	dmWT	hWT	G59S	E34Q	D63Y	R148W	R149Q	I196V	M571T	Y878C	R1049Q	T1249I
Negative-Geotaxis	–	–	++	+	+	–	–	+	–	–	–	–
Lokomotor-Aktivität	–	–	+↑	NG	–	++↓	NG	++↓	NG	NG	++↓	NG

Tabelle 14: Übersicht über die Beeinflussung der motorischen Fähigkeiten von *Drosophila* durch eine motoneuronspezifische *DCTN1*-Überexpression. Die Expression der *DCTN1*-Varianten G59S, E34Q, D63Y und I196V führt zu altersabhängig reduzierter Kletterfähigkeit in *Drosophila*. In den Lokomotor-Analysen zeigen die Mutationen R148W, I196V und R1049Q eine drastisch verringerte Aktivität im Vergleich zur dmWT- und hWT-Überexpression. G59S exprimierende Fliegen sind tendenziell etwas aktiver als die Kontrollfliegen. Klassifizierung der Phänotypen: wildtypisch (–), milder Phänotyp (+), starker Phänotyp, (++)-, reduzierte Aktivität (↓), erhöhte Aktivität (↑) NG: nicht getestet. Genotyp: w^{118} ; *D42-Gal4*; *UAS-DCTN1*.

Eine mögliche Ursache für den altersabhängigen Verlust motorischer Fähigkeiten nach motoneuronspezifischer *DCTN1*-Expression ist eine mit zunehmendem Alter verstärkte Degeneration der Motoneuronen z.B. aufgrund toxischer Effekte der mutanten *DCTN1*-Varianten.

4 *DCTN1*-Überexpression führt zu schwachen neurodegenerativen Phänotypen

In MND-Patienten, die die *DCTN1*-Mutation G59S tragen, wurde eine Degeneration der Nervenzellen und Axone im Ventralhorn und in der Medulla nachgewiesen (Puls *et al.* 2005). Auch im transgenen Mausmodell konnte eine erhöhte Neurodegeneration in Tieren, die das mutante Protein p150^{Glued}-G59S exprimierten, festgestellt werden (Lai *et al.* 2007; Chevalier-Larsen *et al.* 2008; Laird *et al.* 2008). Es stellt sich die Frage, ob auch in *Drosophila* die Expression von G59S zu einem altersabhängigen Verlust von Nervenzellen führt und inwiefern die neu

identifizierten *DCTN1*-Varianten die Überlebensfähigkeit der Neuronen beeinflussen.

4.1 ***DCTN1*-Expression in dopaminergen Neuronen**

Das dopaminerige System von *Drosophila* ist hinlänglich beschrieben und charakterisiert. Alle dopaminergen Neuronen sind eindeutig identifizierbar. Deshalb wurde dies auch zur Untersuchung von möglichen neurodegenerativen Effekten der *DCTN1*-Überexpression herangezogen. *DCTN1* wurde dabei gleichzeitig mit kernlokalisiertem GFP mit Th-Gal4 in dopaminergen Neuronen exprimiert. Männliche Fliegen wurden gealtert und deren Gehirne nach fünf, 30 bzw. 46 Tagen präpariert. Die Präparate wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Die Quantifizierung der GFP-Signale erfolgte mit Hilfe des Programms *ImageJ*.

In jungen fünf Tage alten Fliegen wurden nach Überexpression des humanen wildtypischen Proteins (hWT) im Schnitt sieben Zellen mehr detektiert als in der Kontrolle (w^{1118} ; *Th-Gal4*). Im Vergleich der Treiberkontrolle mit der Expression der mutanten Version G59S ist allerdings kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Neurone festzustellen. Nach 30 Tagen zeigt keiner der getesteten Genotypen einen Verlust dopaminerger Neurone. In 46 Tage alten Tieren sind jedoch nach Überexpression von hWT nur noch 80 % der anfänglichen Anzahl an Nervenzellen detektierbar ($p=0,002$), G59S-Fliegen verlieren 12% der Nervenzellen ($p=0,028$) im Vergleich zu jungen Fliegen des gleichen Genotyps. Verglichen mit der Anzahl der Neurone in den Kontrollfliegen (46 Tage) ist der Zellverlust in beiden *DCTN1*-Überexpressionen gleich (Abbildung 16). Es konnte keine verstärkte Neurodegeneration in den p150^{Glued}-G59S exprimierenden Zellen im Vergleich zur Überexpression des wildtypischen Proteins nachgewiesen werden. In Abbildung 17 ist exemplarisch jeweils eine Aufnahme pro Genotyp für fünf Tage und 46 Tage alte Tiere gezeigt.

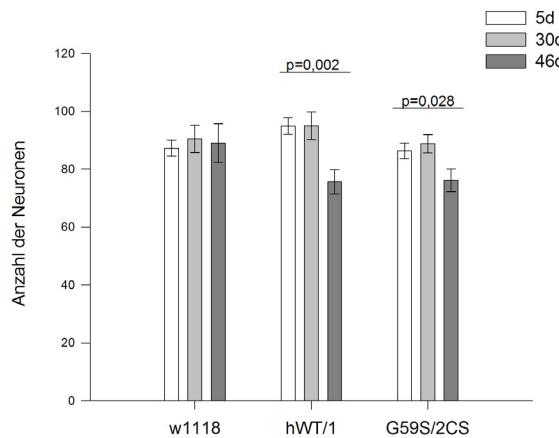


Abbildung 16: Auswirkung der *DCTN1*-Überexpression auf dopaminerige Neurone.

Sowohl das humane wildtypische Protein als auch p150^{Glued}-G59S führen nach 46 Tagen zu einem signifikanten altersabhängigen Verlust der dopaminergen Neuronen. Die Kontrolle (w^{1118}) zeigt keinen Zellverlust. Genotypen: w^{1118} ; Th-Gal4; UAS-*DCTN1* und w^{1118} ; Th-Gal4.

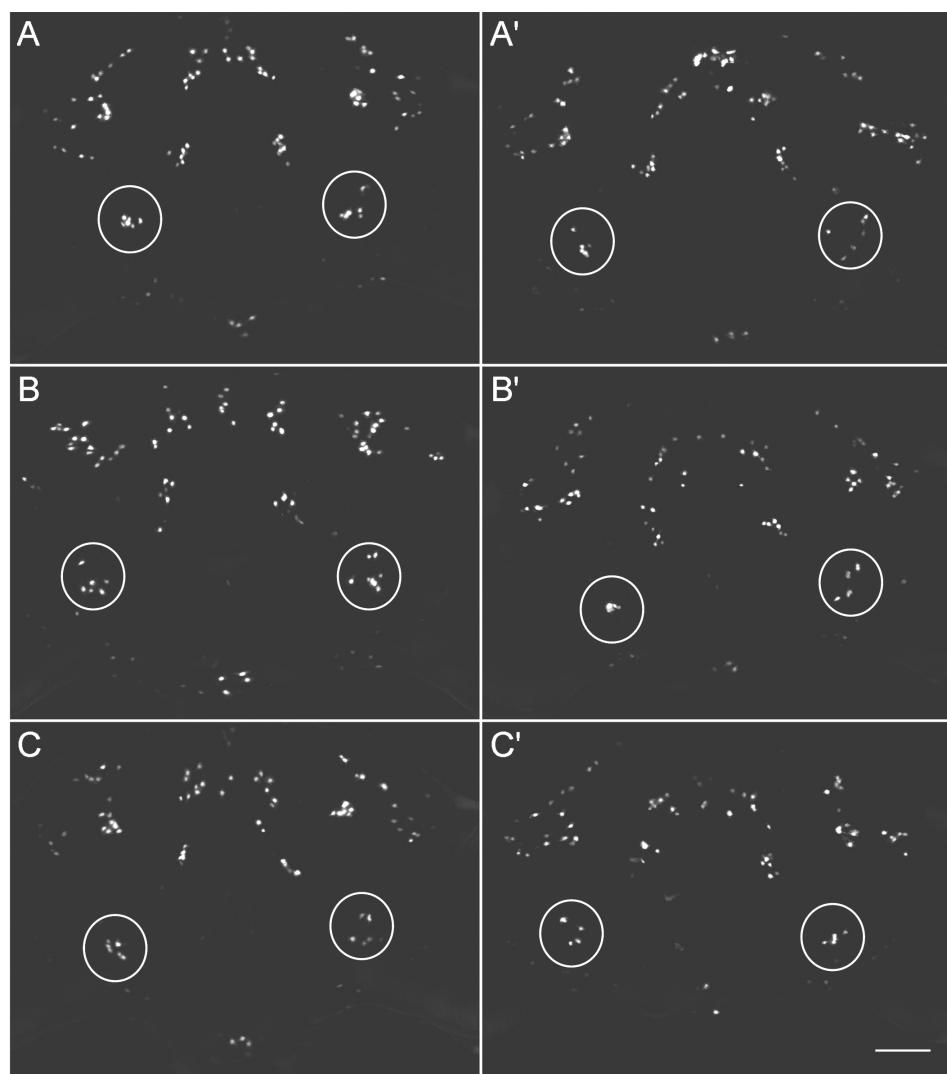


Abbildung 17: Verlust dopaminerger Neurone nach *DCTN1*-Überexpression. A: Kontrollfliegen: w^{1118} ; TH-Gal4, B: w^{1118} ; Th-Gal4; UAS-hWT/1, C: w^{1118} ; Th-Gal4; UAS-G59S/2^{CS}. A, B, C: 5d, A', B', C': 46d. Die Überexpression von *DCTN1* führt zu einem altersabhängigen Verlust dopaminerger Neuronen. Hier exemplarisch zu sehen am Beispiel der lateralen posteriellen protocerebralen Neuronen (PPL2-Cluster: Kreise). Nach 46 Tagen sinkt die Zahl der PPL2-Neuronen von ca. zwölf Neuronen auf sieben in hWT/1 und auf acht Neuronen in G59S. Balken: 50µm.

Die Arbeiten am Mausmodell zeigten jeweils eine spezifische Degeneration der Motoneuronen. Es ist möglich, dass auch in *Drosophila* G59S spezifisch die Motoneuronen beeinträchtigt. Aus diesem Grund wurde in einem zweiten Versuchsansatz die *DCTN1*-Expression simultan mit kernlokalisiertem GFP über D42-Gal4 in Motoneuronen gesteuert. Auch in den Motoneuronen führte die *DCTN1*-Expression zu einer schwachen Degeneration der Nervenzellen. Der Zellverlust war dabei nach Expression von hWT und G59S wiederum in etwa gleich groß (Daten nicht gezeigt). Da mit dieser Methode der Zellkörper bzw. Zellkern markiert wird, ist nur der endgültige Zelltod detektierbar. Der langsame degenerative Prozess eines von der Synapse her absterbenden Axons ist auf diese Weise nicht auflösbar.

4.2 *DCTN1*-Expression in neuropeptidergen Neuronen

Im Rahmen einer Masterarbeit wurde versucht ein System zu finden, dass es ermöglicht einzelne Axone zu identifizieren, um ein mögliches Absterben der neuronalen Projektionen beobachten zu können. Die über c929-Gal4 gesteuerte Expression von GFP in neuropeptidergen Neuronen erwies sich dabei als vielversprechende Methode (Schilling 2011). Wie bereits gezeigt, kann jedoch die spezifische Überexpression des humanen wildtypischen *DCTN1* z.B. im Auge zu Entwicklungsstörungen in *Drosophila* führen (Kapitel III-2, S.53). So zeigt auch die c929-Gal4 gesteuerte Expression von hWT eine veränderte Morphologie der Projektionen im Thorakalganglion (Schilling 2011). Diese entwicklungsbiologischen Defekte erschweren die Identifizierung einzelner Projektionen und somit auch die Quantifizierung eines möglichen Zelltods. Deshalb wurde nun die Expression der UAS-Konstrukte mittels des temperatursensitiven tub-Gal80^{ts}-Systems während der Entwicklung unterdrückt (siehe Kapitel II, 2.4.3.1, S.44). Fliegen, die entweder nur GFP oder GFP und *DCTN1* (hWT, G59S) gleichzeitig exprimierten, wurden auf 18° C gezüchtet – Responderexpression reprimiert, und dann auf 29° C gealtert – Responderexpression aktiviert. Nach fünf Tagen bzw. 30 Tagen wurden die Thorakalganglien der Tiere präpariert und das GFP-Signal mittels Antikörperfärbung verstärkt. Die Aufnahmen wurden mit einem Konfokalmikroskop angefertigt.

Um zu überprüfen, ob die tub-Gal80^{ts} kontrollierte Expression einen Einfluss auf die Stärke der GFP-Expression hat, wurden zunächst Fliegen der Genotypen w^{1118} ; *c929-Gal4*, *UAS-GFP* und w^{1118} ; *c929-Gal4*; *UAS-GFP*; *tub-Gal80^{ts}* wie oben beschrieben gezüchtet, gealtert und präpariert. Die Expression über das tub-Gal80^{ts}-System führt zu einer schwächeren GFP-Expression im Vergleich zu Kontrollfliegen (Abbildung 18). In Folge dessen sind in den Tieren mit tub-Gal80^{ts} kontrollierter Expression weniger Projektionen zu identifizieren. Die Unterschiede in der Morphologie der Axone in den verschiedenen Genotypen liegen nach fünf Tagen innerhalb der natürlichen Varianz. Es ist also gelungen die entwicklungsbiologischen Effekte einer *DCTN1*-Expression in den Neuronen zu umgehen. In den Kontrollen ist kaum ein Unterschied in der Anzahl der Projektionen zwischen den jungen fünf Tage alten Tieren und den gealterten Tieren (30 Tage) festzustellen.

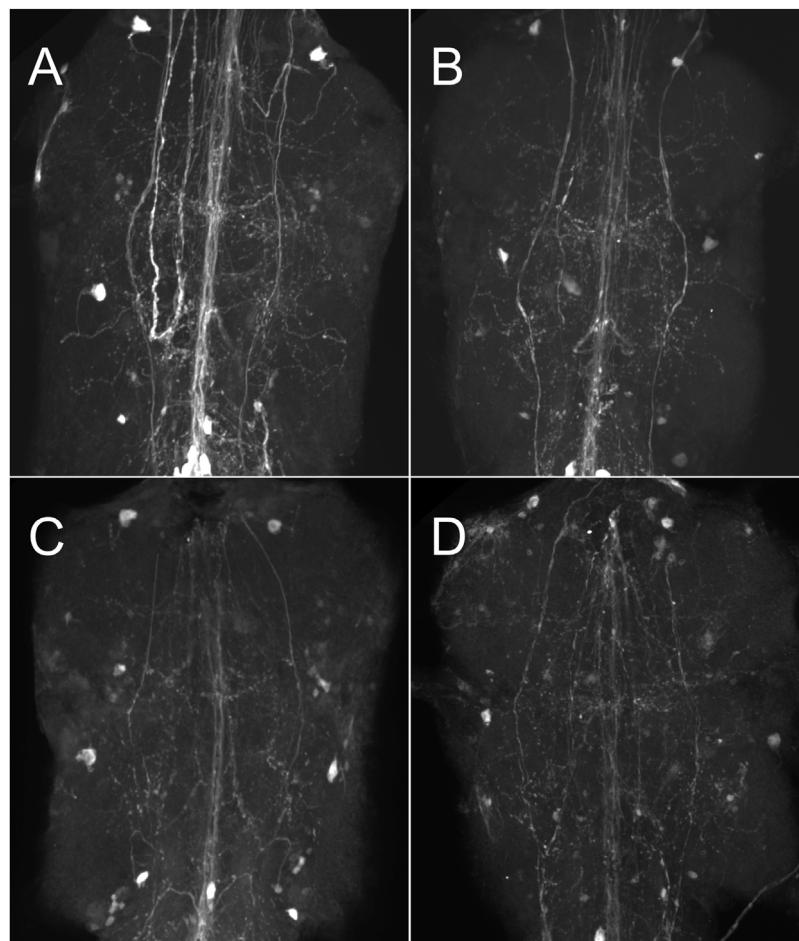


Abbildung 18: Die temperaturabhängige Expression über das tub-Gal80^{ts}-System führt zu einer geringeren GFP-Expression. A, C: 5d alt. B, D: 30d alt. A, B: w^{1118} ; *c929-Gal4*; *UAS-GFP*. C, D: w^{1118} ; *c929-Gal4*; *UAS-GFP*; *tub-Gal80^{ts}*. Sowohl in jungen Fliegen als auch in 30d alten Fliegen ist nach c929-Gal4 getriebener Expression über tub-Gal80^{ts} eine schwächere GFP-Expression und somit auch weniger Projektionen zu beobachten. Balken: 50µm.

Sowohl die Überexpression des mutanten Proteins als auch des humanen wildtypischen Proteins führt nach 30 Tagen in einigen der untersuchten Ganglien zu einer reduzierten Anzahl an Axonen (Abbildung 19). Eine eindeutige Identifikation der einzelnen Neuronen und somit eine Quantifizierung des Verlusts der Projektionen ist jedoch leider nicht gelungen. Die Überexpression des humanen wildtypischen Konstrukts führte zudem in 30 Tage alten Fliegen zu einer fragmentierten Färbung der Projektionen (Abbildung 19). Dieses veränderte Erscheinungsbild könnte ebenfalls auf eine altersabhängige Beeinträchtigung der Axone zurückzuführen sein. Im Gegensatz dazu ist in G59S-Fliegen die Färbung der Projektionen unverändert im Vergleich zu jungen Fliegen bzw. zur Kontrolle.

Zusätzlich zu den genannten Untersuchungen wurde versucht über die Analyse von Gewebeschnitten mittels Elektronenmikroskopie ein mögliches Absterben von Motoneuronen nachzuweisen. Nach motoneuronspezifischer *DCTN1*-Expression mit D42-Gal4 konnte aber auch hier keine erhöhte altersabhängige Neurodegeneration in G59S-Fliegen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Mit keiner der benutzten Methoden konnte ein erhöhter Neuronenverlust nach Expression von p150^{Glued}-G59S im Vergleich zur Expression des humanen wildtypischen Proteins eindeutig gezeigt werden. Die Überexpression der *DCTN1*-Konstrukte führt eher allgemein zu einer geringeren Überlebensrate der *DCTN1*-exprimierenden Neuronen. Da die Überexpression von p150^{Glued} generell toxisch für die betreffenden Neuronen zu sein scheint, wurde darauf verzichtet, die neu identifizierten Mutationen ebenfalls bezüglich neurodegenerativer Effekte zu überprüfen.

Neben der Degeneration von Neuronen wurden als ein weiteres neuropathologisches Merkmal der von G59S verursachten ALS-MND Proteineinschlüsse in den Medullazellen der Patienten nachgewiesen. Aus diesem Grund wurde als Nächstes die zelluläre Verteilung der verschiedenen p150^{Glued}-Versionen im *Drosophila*-Modell untersucht.

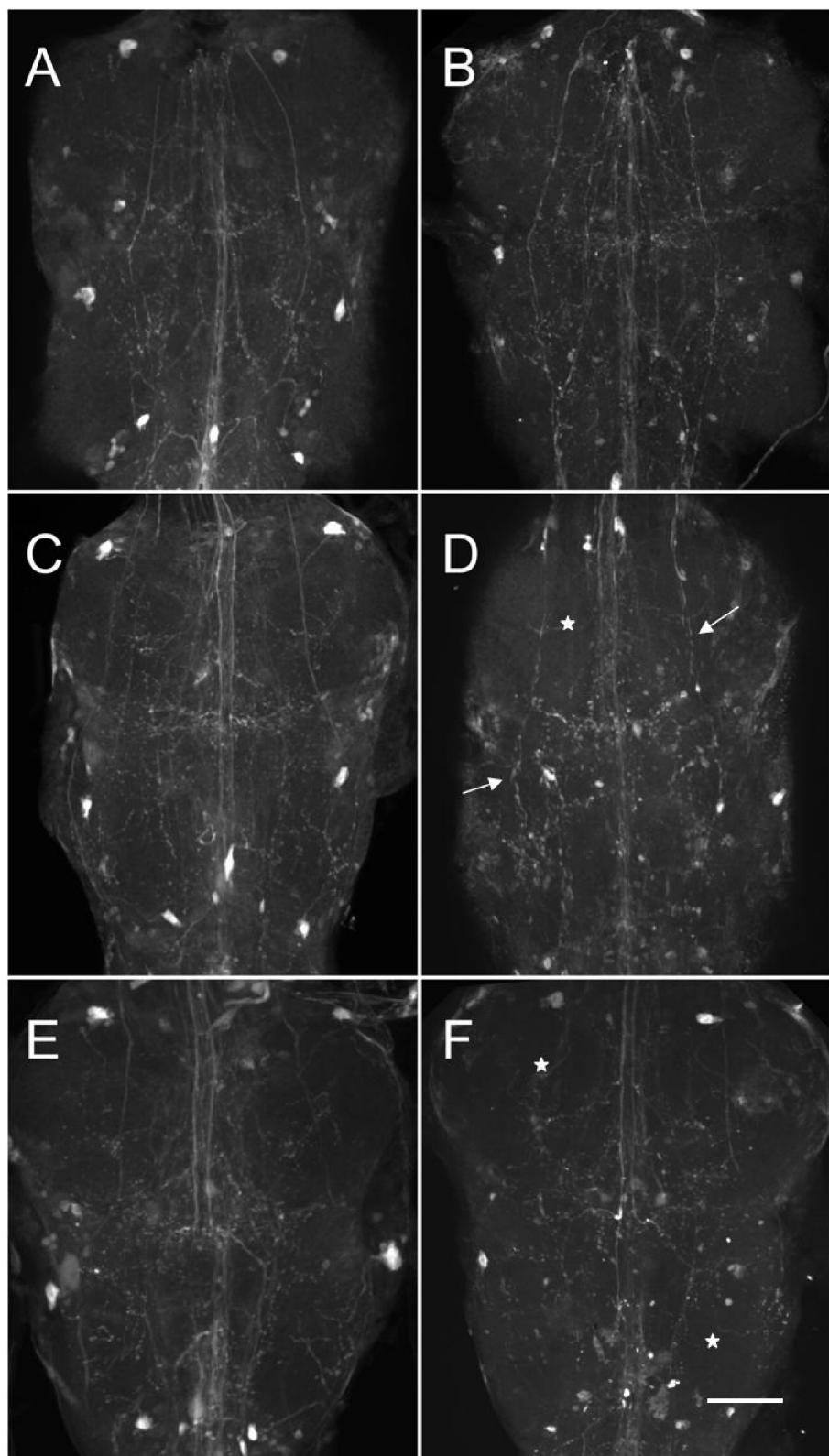


Abbildung 19: Auswirkung der *DCTN1*-Überexpression auf neuropeptiderge Neurone. A, B: *w¹¹¹⁸; c929-Gal4; UAS-GFP; tub-Gal80^{ts}*. C, D: *w¹¹¹⁸; c929-Gal4; UAS-GFP; tub-Gal80^{ts}; UAS-hWT/7*. E, F: *w¹¹¹⁸; c929-Gal4; UAS-GFP; tub-Gal80^{ts}; UAS-G59S/1*. A, C, E: 5d alt. B, D, F: 30d alt. Die c929-Gal4 gesteuerte Expression von humanem wildtypischen (C+D) und mutanten (G59S, E+F) p150^{Glued} in peptidergen Neuronen führt zu einem altersabhängigen Verlust von Projektionen (Sterne). Des Weiteren resultiert die Überexpression von hWT in einem fragmentierten GFP-Signal in den Projektionen 46 Tage alter Fliegen (D, Pfeile). Balken: 50 µm.

5 G59S führt zu p150^{Glued}-Aggregation in *Drosophila*

Zellkulturstudien konnten zeigen, dass G59S *in vitro* Dynaktinaggregation verursacht (Levy *et al.* 2006). In *Drosophila*-S2-Zellen führt die Expression der zu G59S korrespondierenden Mutation G38S zu p150^{Glued}-Aggregation, wohingegen das wildtypische Glued diffus im Zytoplasma verteilt ist, beziehungsweise mit den Mikrotubuli kolokalisiert (Lloyd *et al.* 2012). Ebenso führte die Expression von p150^{Glued}-G59S im transgenen Mausmodell zu p150^{Glued}-Aggregaten in Neuronen (Laird *et al.* 2008). Die in den Patienten identifizierten Inklusionen enthielten sowohl das Motorprotein Dynein als auch Dynakinakkumulationen (Puls *et al.* 2005).

5.1 DCTN1-Expression in larvalen Muskeln

Für die Analyse der zellulären p150^{Glued}-Verteilung in *Drosophila* wurden die *DCTN1*-Konstrukte zunächst spezifisch im Muskel mit 24B-Gal4 exprimiert. Larven des dritten Entwicklungsstadiums wurden präpariert und p150^{Glued} mittels Antikörperfärbung markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Analyse der filetierten Larven erfolgte am Konfokalmikroskop.

In Abbildung 20 ist deutlich zu sehen, dass auch im *Drosophila*-Modell p150^{Glued}-G59S aggregiert. Wie bereits beschrieben (Stockmann *et al.* 2012), befinden sich diese Aggregate vor allem im Bereich um die Nuklei. Die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins zeigt eine filamentähnliche p150^{Glued}-Verteilung.

In allen anderen *DCTN1*-Varianten entspricht die subzelluläre p150^{Glued}-Verteilung der des humanen wildtypischen Proteins. Lediglich die Überexpression der *DCTN1*-Konstrukte D63Y und I196V führt in einigen Larven vereinzelt zu p150^{Glued}-Aggregation. Außerdem zeigt die *DCTN1*-Variante R1049Q ein verändertes, diffuseres Verteilungsmuster im Vergleich zu hWT (Abbildung 21, S. 72). Dieses amorphe Verhalten von R1049Q wurde auch in primären Motoneuronen und COS7-Zellen beobachtet (Stockmann *et al.* 2012).

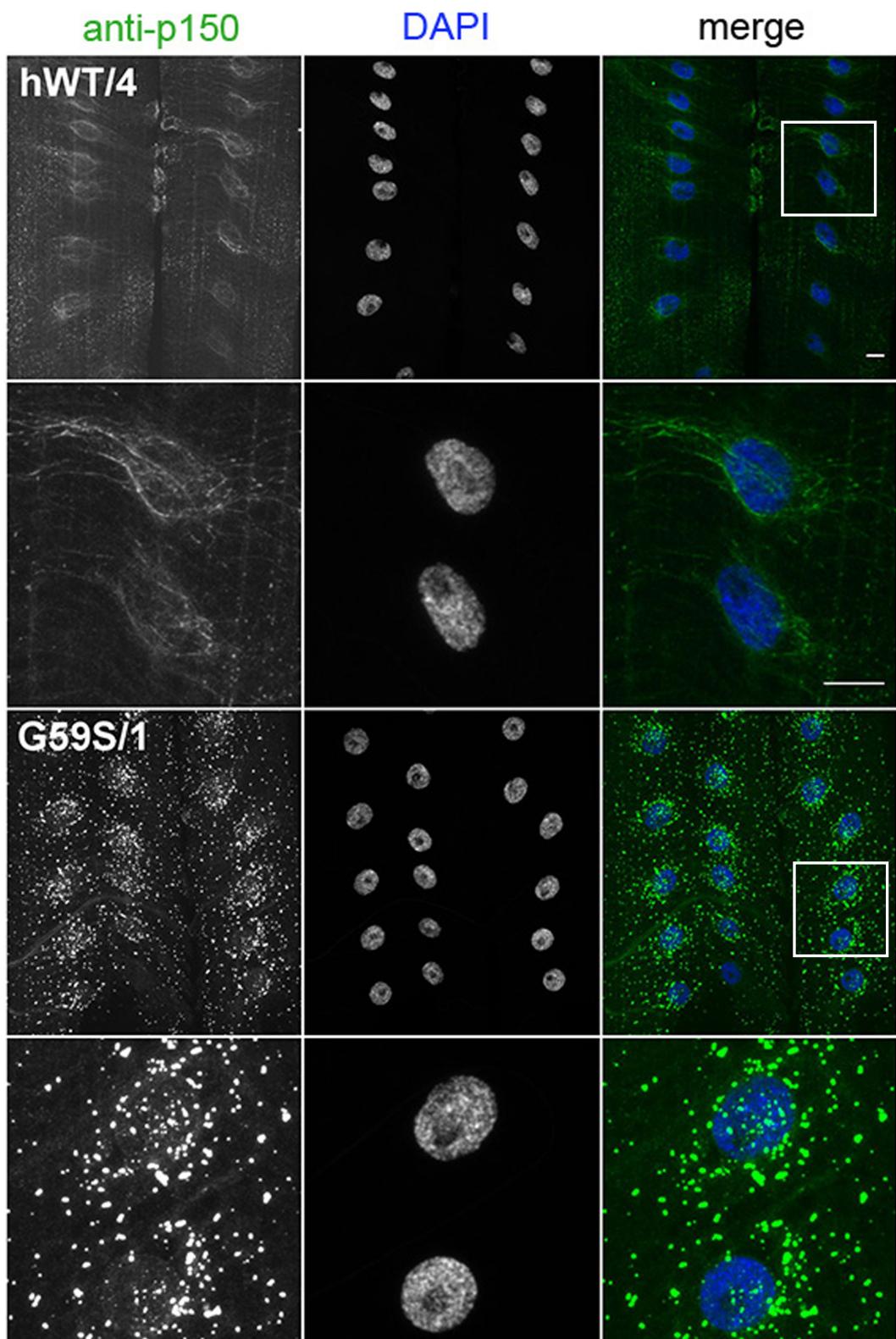


Abbildung 20: G59S führt zu p150^{Glued}- Aggregation im larvalen Muskel. Dargestellt sind repräsentative konfokale Mikroskopieaufnahmen larvaler Muskeln (L3, Muskel 6/7). Das mutante Protein aggregiert vor allem im Bereich der Nuklei (G59S/1). Humanes wildtypisches p150^{Glued} (hWT/4) ist in filamentären Strukturen angeordnet. Genotyp: w^{1118} ; 24B-Gal4; UAS-DCTN1. Balken: jeweils 10 μ m.

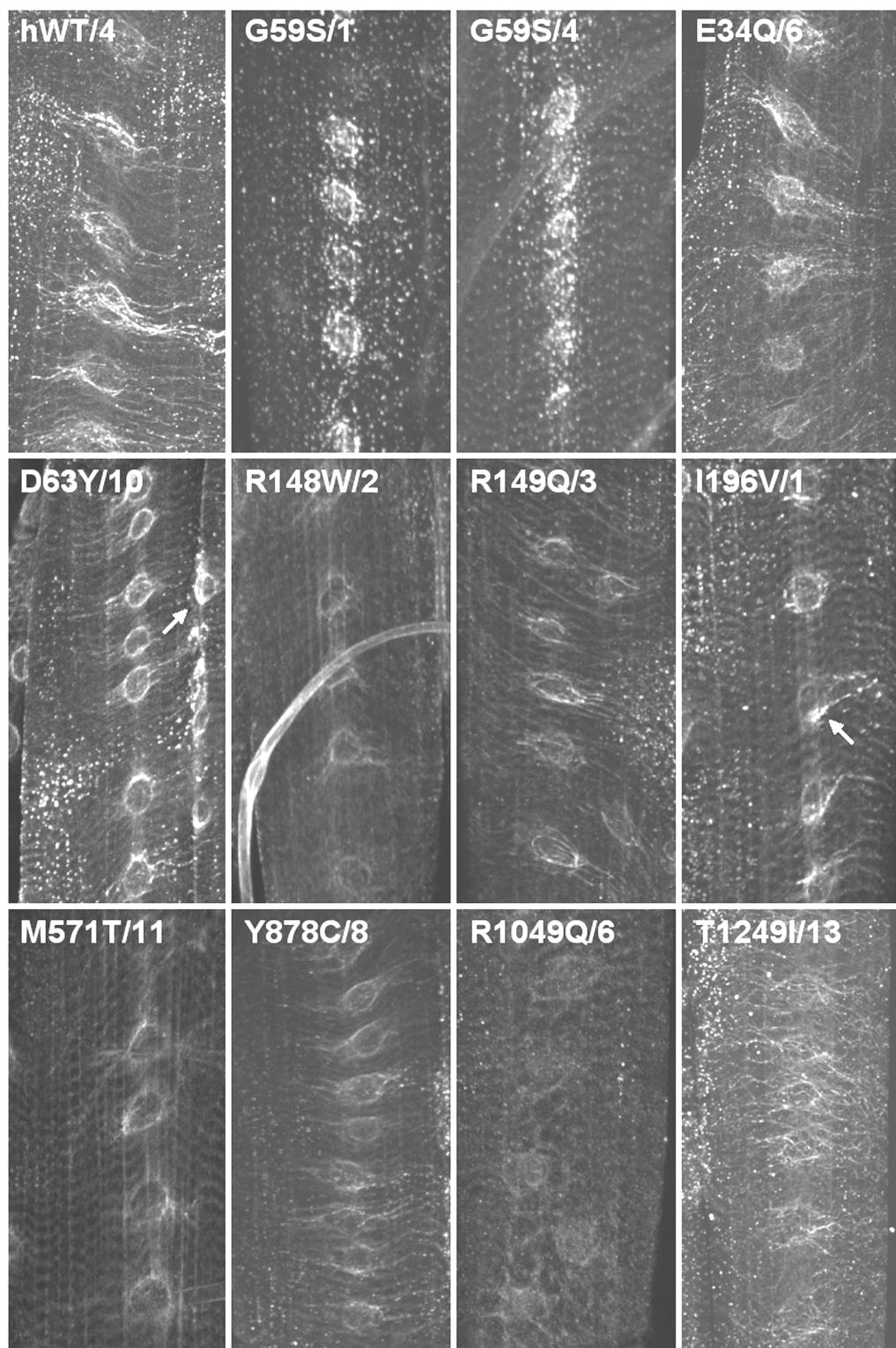


Abbildung 21: Subzelluläre p150^{Glued}-Verteilung nach spezifischer Expression in larvalen Muskeln (24B-Gal4). In p150^{Glued}-G59S exprimierenden larvalen Muskeln aggregiert Dynaktin in der Nähe der Zellkerne. Alle anderen potentiellen Mutationen und der humane Wildtyp zeigen hier eine filamentähnliche p150^{Glued}-Verteilung. Nur die *DCTN1*-Varianten D63Y und I196V führen vereinzelt zu p150^{Glued}-Aggregation (Pfeile) in der Nähe der Zellkerne. Außerdem zeigt die p150^{Glued}-Form R1049Q ein amorphes, eher diffuses Verteilungsmuster. Gezeigt sind repräsentative Segmentabschnitte der Muskeln 6 oder 7 von Larven des dritten Entwicklungsstadiums nach anti-p150-Färbung. Genotyp: *w¹¹¹⁸; 24B-Gal4; UAS-DCTN1*. Balken: 20 µm.

Um die zelluläre Verteilung in einem engeren Zusammenhang mit den pathologischen Merkmalen der ALS-MND zu untersuchen, wurde als Nächstes überprüft, wie sich die verschiedenen *DCTN1*-Varianten nach Überexpression in den Motoneuronen verhalten.

5.2 Spezifische *DCTN1*-Expression in Motoneuronen

5.2.1 G59S aggregiert in Axonen der Motoneuronen

Über die Treiberlinie D42-Gal4 wurde p150^{Glued} in Motoneuronen exprimiert. Fünf Tage alte Fliegen wurden präpariert und p150^{Glued} immunhistochemisch markiert. Mikroskopisch untersucht wurde das Neuropil im dorsalen Bereich der Thorakalganglien zwischen den Abschnitten T1 und T2 (T1/T2-Grenze, Abbildung 22).

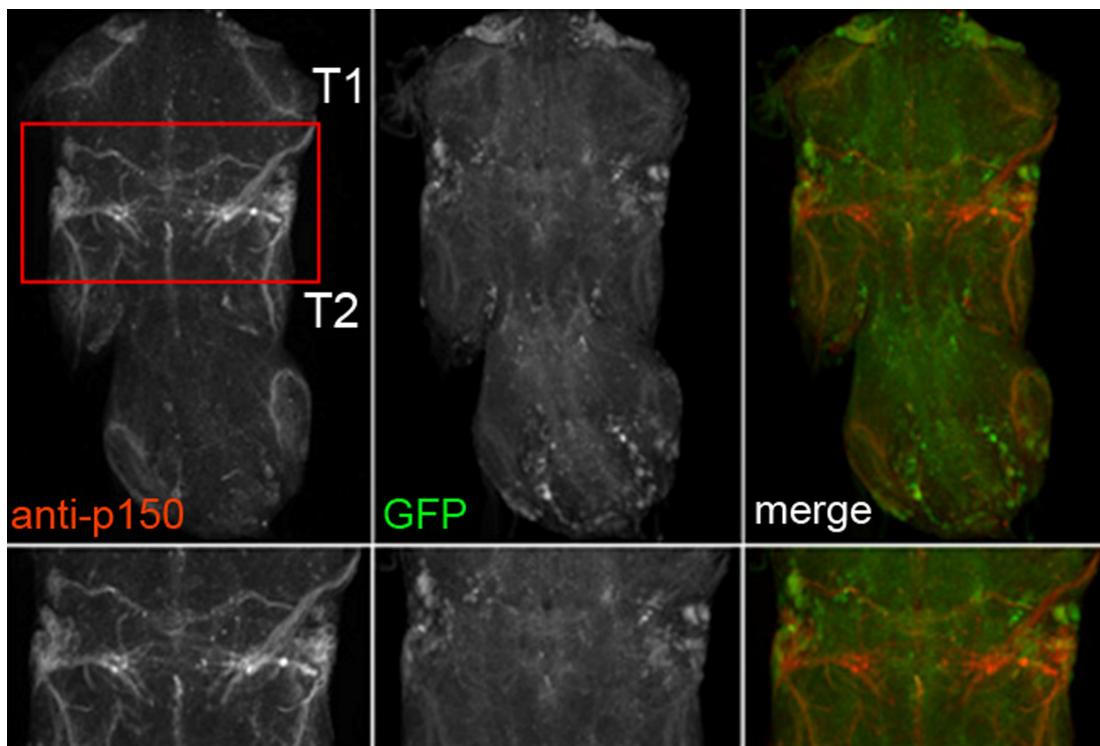


Abbildung 22: Neuropil im dorsalen Bereich des Thorakalganglions. Die Motoneuronen wurden über D42-Gal4 gesteuerte GFP-Expression markiert. Die Detailaufnahmen (unten) zeigen, dass p150^{Glued} vorrangig in den Axonen im Grenzbereich zwischen den Ganglienabschnitte T1 und T2 (roter Kasten) exprimiert wird. Dargestellt ist der dorsale Bereich der Ganglien. Genotyp: *w¹¹¹⁸; D42-Gal4; UAS-GFP; UAS-DCTN1*.

Das humane wildtypische Protein und alle neu identifizierten p150^{Glued}-Varianten zeigen eine überwiegend homogene p150^{Glued}-Verteilung in den Axonen des Thorakalganglions. Im Gegensatz dazu führt p150^{Glued}-G59S zu einer starken Aggregatbildung des Proteins vor allem im Neuropil der Ganglien (Abbildung 23).

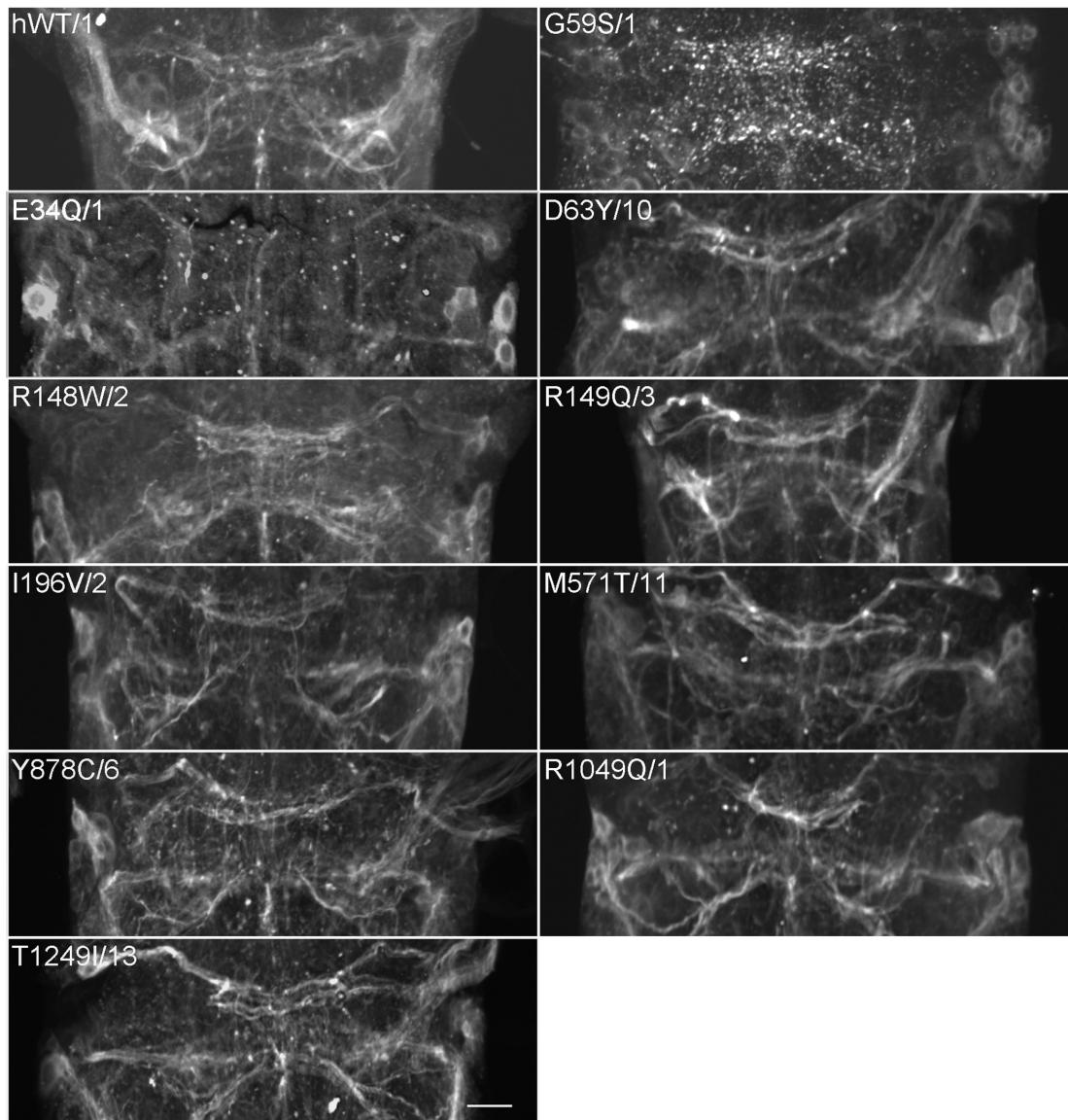


Abbildung 23: P150^{Glued}-G59S aggregiert in adulten Motoneuronen. Die mutante p150^{Glued}-Version G59S führt zu starker Aggregation im Neuropil der Ganglien. Alle anderen p150^{Glued}-Varianten sind gleichmäßig in den Axonen verteilt und zeigen nur vereinzelt p150^{Glued}-Akkumulationen. Zu sehen sind konfokalmikroskopische Aufnahmen der dorsalen T1/T2 Grenzbereiche der Thorakalganglien nach anti-p150-Färbung. Genotyp: *w¹¹¹⁸; D42-Gal4; UAS-DCTN1*. Balken: 20 µm.

In-vitro-Studien zeigten, dass wildtypisches p150^{Glued} eine hohe Mikrotubuli-Bindeaffinität hat und in den Zellkörpern entlang der Mikrotubuliröhren lokalisiert ist. Zudem wurde festgestellt, dass die pathogene Mutation G59S die p150^{Glued}-

Bindung an die Mikrotubuli beeinträchtigt und in einer eher diffusen, nicht mehr mit den Mikrotubuli assoziierten Verteilung des Proteins und der beschriebenen Aggregation resultiert (Levy *et al.* 2006; Stockmann *et al.* 2012). Dies führt zu der Frage, ob p150^{Glued} in den Axonen ebenfalls mit den Mikrotubuli assoziiert ist und inwiefern die Mutationen die axonale p150^{Glued}-Verteilung beeinträchtigen.

5.2.2 P150^{Glued}-Verteilung in larvalen Axonen

Da es nicht möglich ist an den verhältnismäßig kleinen Zellen des Thorakalganglions eine detaillierte Analyse der p150^{Glued}-Verteilung in den Axonen vorzunehmen, wurden die relativ großen, frei im Körper liegenden larvalen Segmentalnerven (L3) untersucht. Neben der Färbung von p150^{Glued} erfolgte gleichzeitig die Markierung der Mikrotubuli mit dem Futsch-Antikörper.

Humanes wildtypisches p150^{Glued} zeigt nach Expression mittels D42-Gal4 eine starke Assoziation mit den Mikrotubuli in den larvalen Nerven. P150^{Glued}-G59S ist hingegen nicht mehr mit den Mikrotubuli assoziiert und eher diffus in den Axonen verteilt. P150^{Glued}-G59S bildet auch in den Axonen der Segmentalnerven kleine Aggregate. In Larven, die das Konstrukt E34Q exprimieren, ist das Protein ebenso wie in hWT-Fliegen entlang der Mikrotubuliröhren lokalisiert, scheint insgesamt jedoch deutlich schwächer mit den Filamenten assoziiert zu sein. Bei allen anderen Mutationen ist p150^{Glued} in filamentären Strukturen entlang der Mikrotubuli angeordnet (Abbildung 24 und Abbildung 25, S.77).

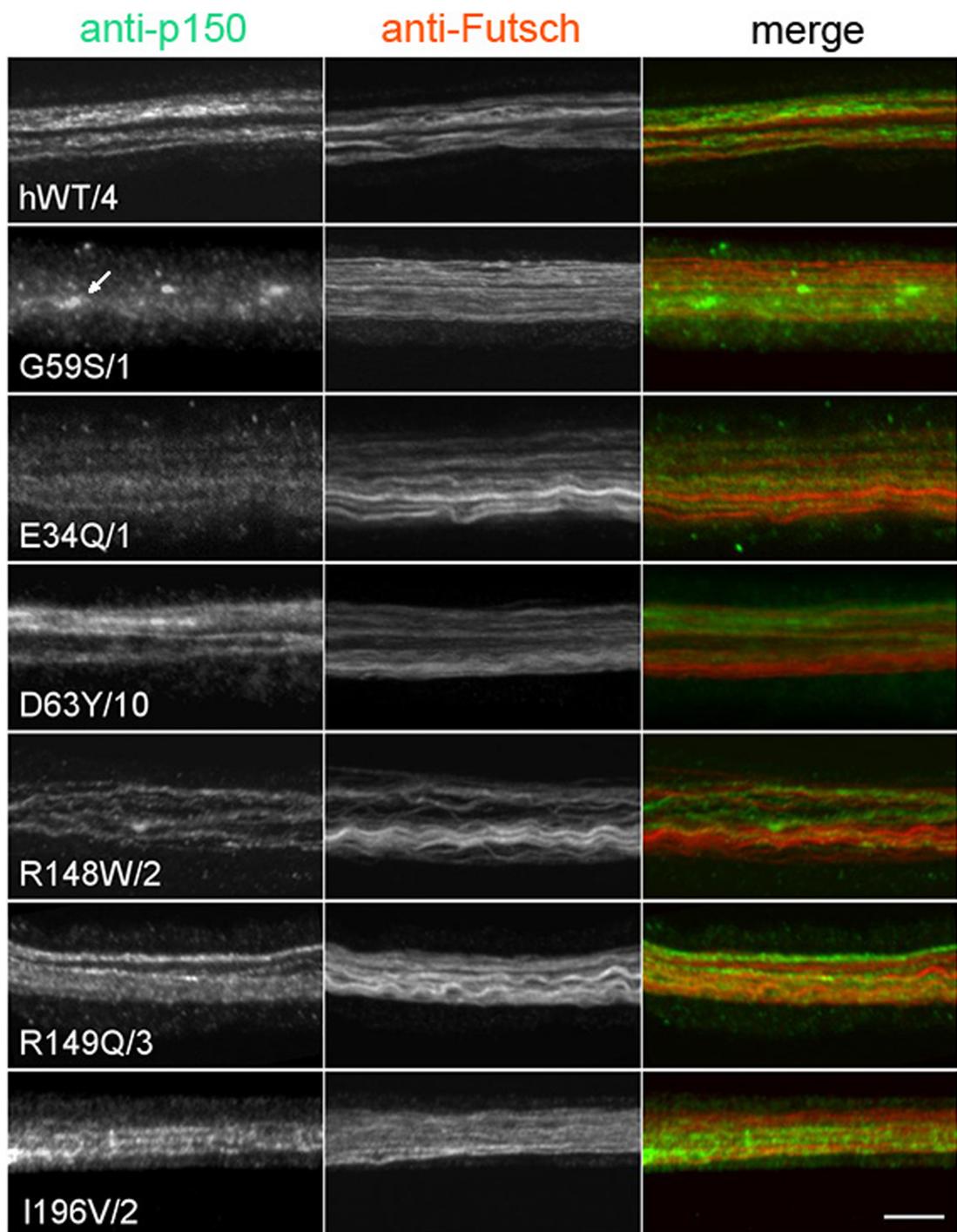


Abbildung 24: p150^{Glued}-Verteilung in larvalen Motoneuronen (Teil 1). Humanes wildtypisches (hWT/4) und mutantes p150^{Glued} (D63Y/10, R148W/2, R149Q/3, I196V/2) sind entlang der Mikrotubuli in den Axonen lokalisiert. G59S und E34Q führen zu einer reduzierten p150^{Glued}-Assoziation mit den Mikrotubuli. Die Mutation G59S zeigt außerdem p150^{Glued}-Aggregation (Pfeil). Dargestellt sind konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Abschnitte larvaler Segmentalnerven (L3) nach p150- und Futsch-Antikörperfärbung. Genotyp: w^{1118} ; $D42-Gal4$; $UAS-DCTN1$. Balken: 5 μ m.

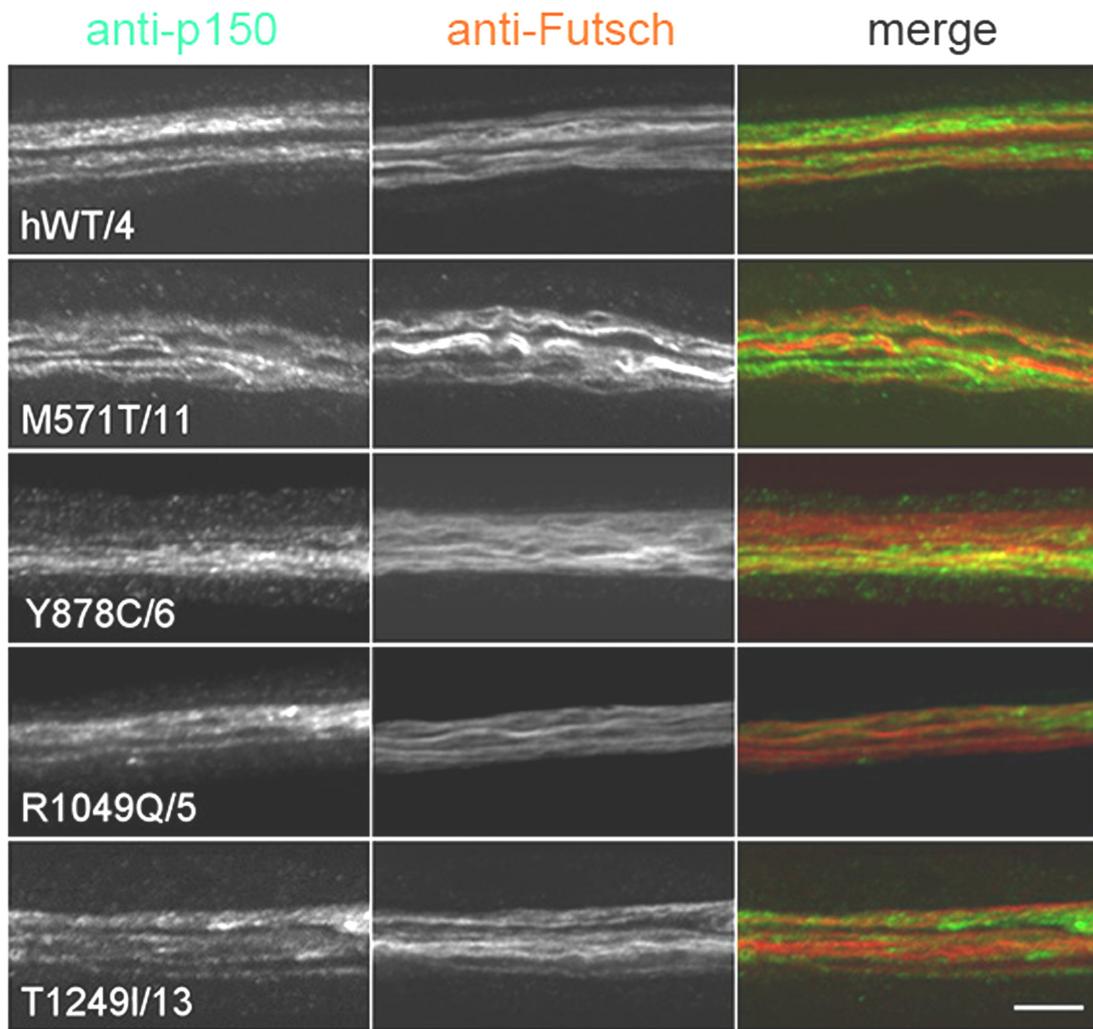


Abbildung 25: P150^{Glued}-Verteilung in larvalen Motoneuronen (Teil 2). Humanes wildtypisches (hWT/4) und mutantes p150^{Glued} sind stark mit den Mikrotubuli in den Axonen assoziiert. Genotyp: w^{1118} ; D42-Gal4; UAS-DCTN1. Balken: 5 µm.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in allen hier gezeigten Experimenten allein die mutante p150^{Glued}-Version G59S aggregiert. Interessanterweise konnte zudem eine Dissoziation des Proteins von den Mikrotubuli nach Überexpression der *DCTN1*-Formen G59S und E34Q beobachtet werden (Tabelle 15). Ungeklärt bleibt, ob die Aggregatbildung bzw. reduzierte Assoziation mit den Mikrotubuli von p150^{Glued}-G59S und p150^{Glued}-E34Q den axonalen Transport entlang der Mikrotubuli beeinflussen.

UAS-Konstrukt Phänotyp	dnWT	hWT	G59S	E34Q	D63Y	R148W	R149Q	I196V	M571T	Y878C	R1049Q	T1249I
Aggregate im Muskel (24B-Gal4)	NG	-	++	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Aggregate in Axonen (D42-Gal4)	NG	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dissoziation von den Mikrotubuli (D42-Gal4)	NG	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 15: Übersicht über die zelluläre und axonale p150^{Glued}-Verteilung nach motoneuronspezifischer *DCTN1*-Überexpression. Die Expression der *DCTN1*-Variante G59S führt zu Aggregatbildung in Muskelzellen und Axonen. Darüber hinaus zeigen die mutanten p150^{Glued}-Varianten G59S und E34Q verstärkte Dissoziation von den Mikrotubuli in larvalen Segmentalnerven. Klassifizierung der Phänotypen: wildtypisch (-), milder Phänotyp (+), starker Phänotyp, (++) , NG: nicht getestet. Genotyp: w^{1118} ; 24B-Gal4 bzw. D42-Gal4; UAS-DCTN1.

6 Überexpression von *DCTN1* führt zu Störungen des axonalen Transports

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Größe und Länge ihrer Axone scheinen Motoneuronen in besonderer Weise auf koordinierte und reibungsfreie Transportprozesse entlang der Axone angewiesen zu sein. So verdichteten sich in den letzten Jahren die Hinweise darauf, dass viele Motoneuronerkrankungen wie zum Beispiel die Distale Hereditäre Motoneuropathie (dHMN7B) und die Hereditäre Spastische Spinalparalyse (HSP) in direktem Zusammenhang mit Defekten im axonalen Transport stehen. Mutationen im Motorprotein Kinesin werden zum Beispiel mit einer früh ausbrechenden Form der HSP in Verbindung gebracht (Holzbaur 2004; El-Kadi *et al.* 2007). Darüber hinaus verursachen Mutationen des Motorproteins Dynein im Mausmodell Phänotypen der Motoneuronerkrankungen, die von Störungen des retrograden Transports begleitet werden (Hafezparast *et al.* 2003). Die dHMN7B verursachende Mutation G59S in der Dynaktin-Untereinheit p150^{Glued} führt außerdem zu Beeinträchtigungen des Vesikeltransports im transgenen Mausmodell (Laird *et al.* 2008). Aus diesem Grund ist es besonders spannend zu überprüfen, welche Auswirkungen eine Überexpression der verschiedenen *DCTN1*-Varianten auf den axonalen Transport im *Drosophila*-Modell hat.

6.1 *DCTN1*-Überexpression beeinträchtigt den axonalen Vesikeltransport

Um einen ersten Hinweis auf mögliche Störungen des axonalen Transports zu erlangen, wurden adulte Thorakalganglien auf ihre *Cystein-String-Protein* (CSP)-Verteilung überprüft. Hierfür wurde *DCTN1* mit D42-Gal4 in Motoneuronen exprimiert. Untersucht wurde der Kortex im ventralen T1/T2-Bereich der Thorakalganglien drei Tage alter Fliegen (Abbildung 26).

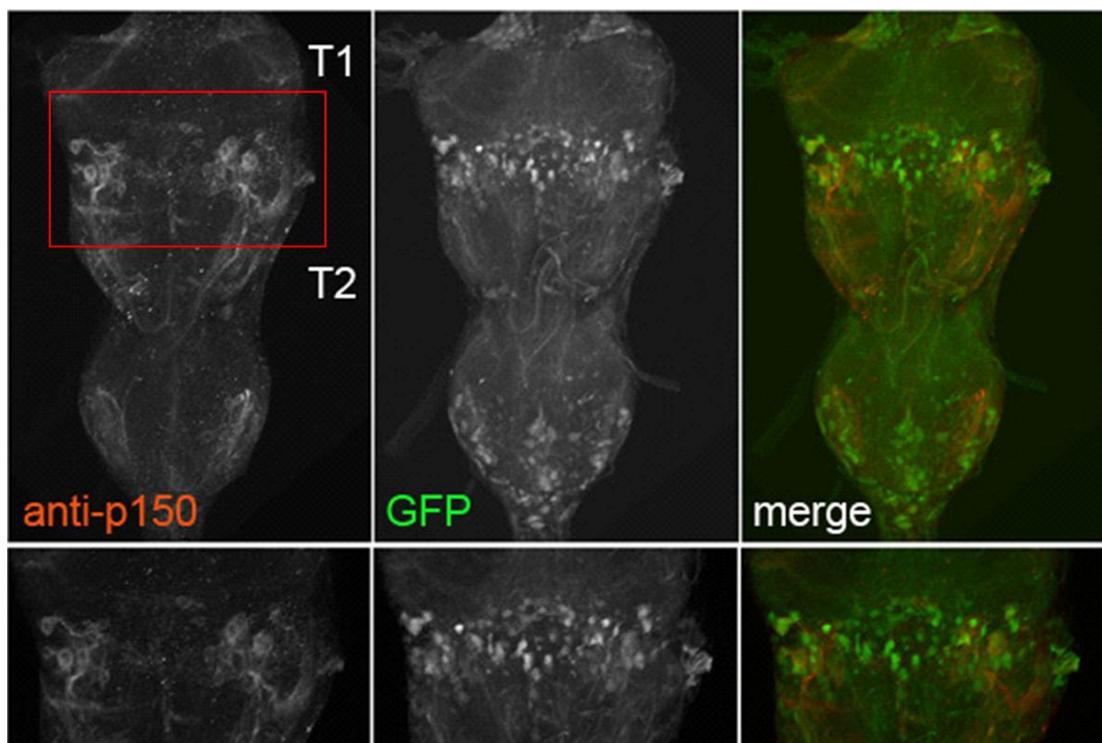


Abbildung 26: Kortex im ventralen Bereich des Thorakalganglions. Die Motoneuronen wurden über D42-Gal4 gesteuerte GFP-Expression markiert. Die Detailaufnahmen (unten) zeigen, dass p150^{Glued} nicht in allen GFP exprimierenden Zellen der Ganglienabschnitte T1 und T2 (rote Box) nachweisbar ist. Dargestellt ist der ventrale Bereich der Ganglien. Genotyp: *w*¹¹¹⁸; *D42-Gal4*; *UAS-GFP*; *UAS-DCTN1*.

CSP ist an der Neurotransmitterfreisetzung an den Synapsen beteiligt und muss somit anterograd von den Zellkörpern zur Synapse transportiert werden (Buchner & Gundersen 1997). Wildtypische Fliegen zeigen dementsprechend nur eine schwache, homogen verteilte CSP-Färbung im Kortex. Ebenso gestaltet sich die Situation in GFP überexprimierenden Fliegen und nach Überexpression des wildtypischen *Drosophila* Homologs Glued. Interessanterweise führt die Überexpression des

humanen wildtypischen Proteins zu starker CSP-Akkumulation in den Zellkörpern des Thorakalganglions (Abbildung 27).

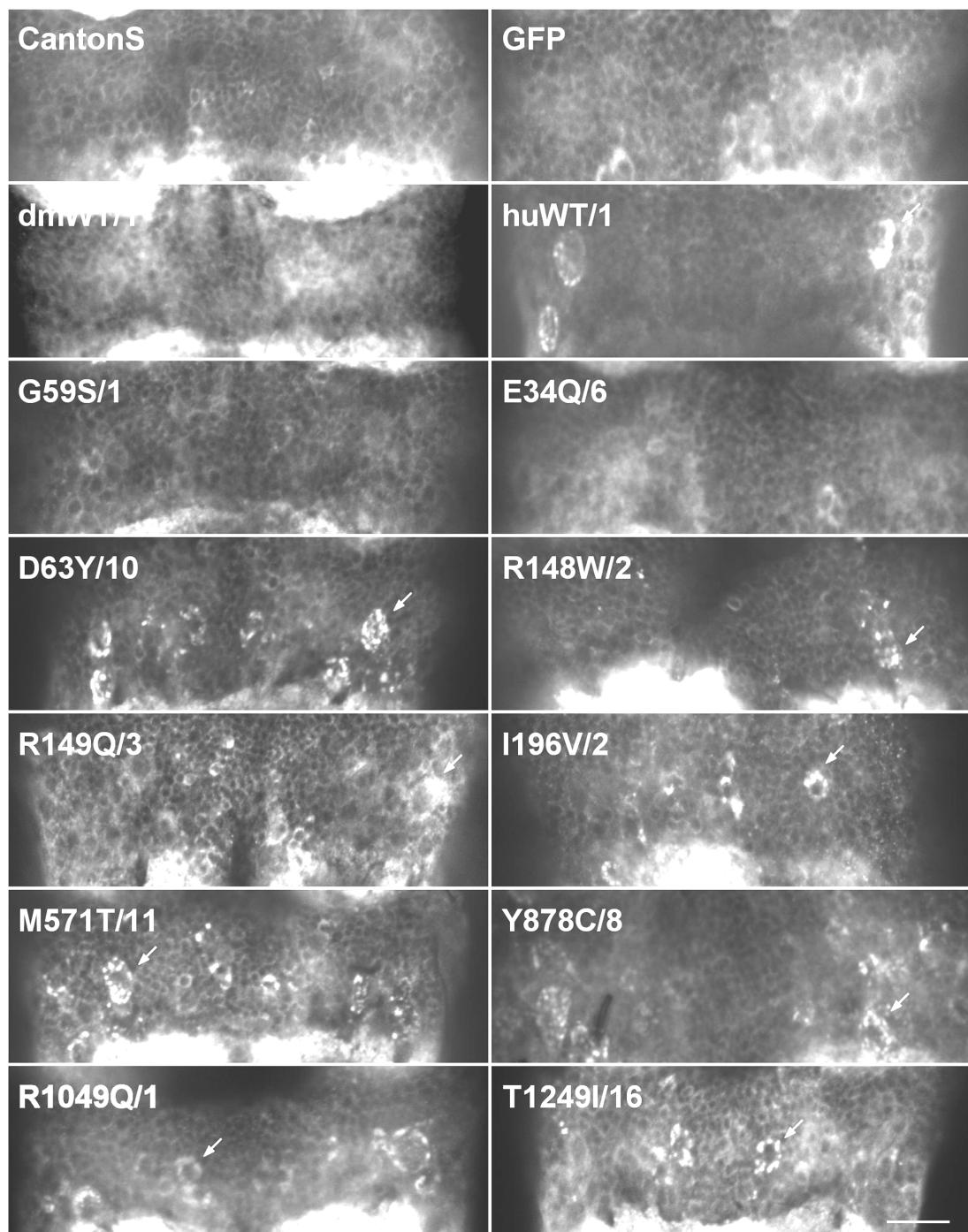


Abbildung 27: CSP-Verteilung im Kortex von Thorakalganglien nach *DCTN1*-Überexpression in Motoneuronen. Die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins und der meisten Mutationen führt zu CSP-Anhäufungen (Pfeile) in den Zellkörpern des Thorakalganglions (T1/T2). Eine Expression der Varianten G59S und E34Q sowie des *Drosophila* Proteins Glued zeigt keine CSP-Akkumulationen in den Zellkörpern. CSP ist hier, wie in den Kontrollen (CantonS und *w1118; D42-Gal4; UAS-GFP*), gleichmäßig verteilt. Genotyp: *w¹¹¹⁸; D42-Gal4; UAS-DCTN1*. Balken: 20 µm.

Nur die beiden in der Mikrotubulibindedomäne des Proteins liegenden Mutationen G59S und E34Q verhalten sich auffälligerweise wie die Kontrollen. Alle anderen p150^{Glued}-Varianten führen so wie das humane wildtypische Protein zu unterschiedlich starker CSP-Anreicherung im Kortex.

Abbildung 26 (S.79) zeigt, dass nicht in allen Zellen, in denen D42-Gal4 aktiv ist, p150^{Glued}-Expression nachgewiesen werden konnte. Um zu überprüfen, ob die beobachteten CSP-Akkumulationen in direktem Zusammenhang mit der p150^{Glued}-Überexpression stehen, wurden Doppelfärbungen mit CSP- und p150-Antikörpern angefertigt. Untersucht wurden exemplarisch Thorakalganglien drei Tage alter Fliegen, die das humane wildtypische Protein motoneuronspezifisch überexprimieren. In Abbildung 28 ist zu sehen, dass alle CSP-Akkumulationen ausschließlich in p150^{Glued} exprimierenden Zellen vorkommen. In den Detailaufnahmen wird außerdem ersichtlich, dass diese Akkumulationen tatsächlich innerhalb der Zellkörper lokalisiert sind und nicht etwa an den Synapsen.

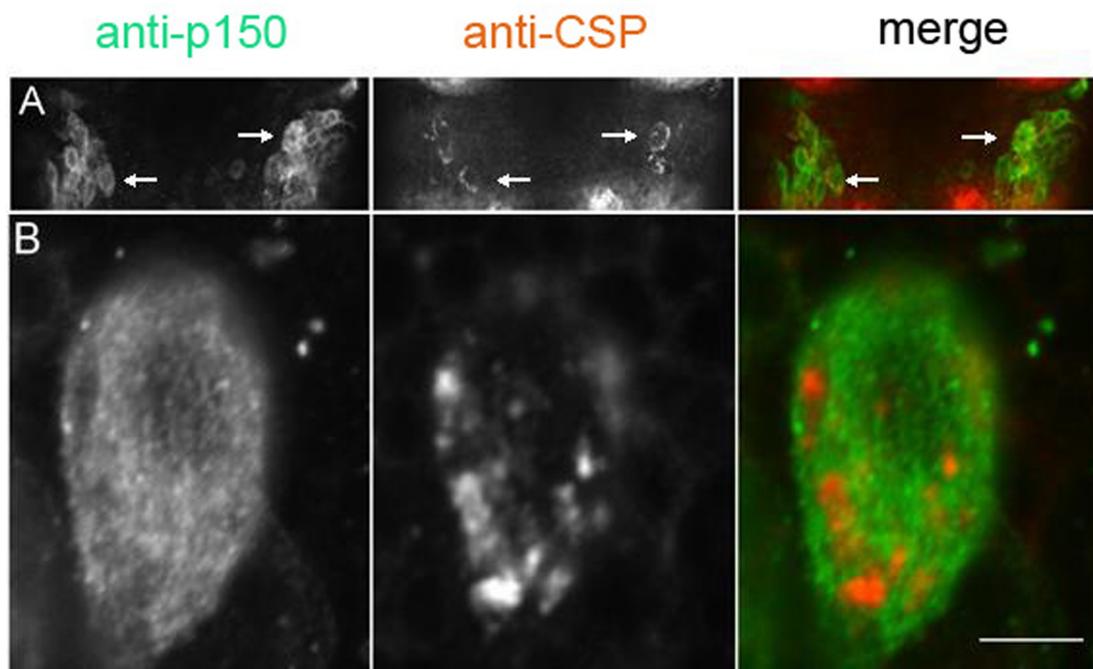


Abbildung 28: CSP akkumuliert innerhalb p150^{Glued} exprimierender Zellen. A: Ventralseite des T1/T2- Bereichs hWT exprimierender Thorakalganglien. CSP akkumuliert ausschließlich in p150^{Glued} exprimierenden Zellen (Pfeile). B: Detailaufnahme einer Zelle. CSP akkumuliert innerhalb des Zellkörpers. Genotyp: $w^{118}; D42\text{-Gal}4; UAS\text{-}hWT/1$. Balken: 5 μm .

Die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins aber nicht die von p150^{Glued}-G59S führt also zu abnormalen Vesikelanhäufung in den Zellkörpern der

Motoneuronen. Dies deutet auf eine Störung des anterograden Vesikeltransports hin. Über *in-vivo*-Studien des Mitochondrientransports sollte nun überprüft werden, ob diese Störungen des Transports nur spezifisch im anterograden Vesikeltransport auftreten oder ob eventuell eine generelle Beeinträchtigung des axonalen Transports vorliegt.

6.2 **DCTN1-Überexpression beeinträchtigt den axonalen Organellentransport**

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Mutationen der Motorproteine Dynein und Kinesin in *Drosophila* unter anderem zu einer reduzierten Transportgeschwindigkeit beziehungsweise Transportrate der Mitochondrien führen. Außerdem wurde festgestellt, dass das dominant-negative Allel des *Drosophila* Homologs *Gl^l* den Mitochondrientransport beschleunigt (Pilling *et al.* 2006). Um den Einfluss der *DCTN1*-Konstrukte auf die Parameter des Organellentransports messen zu können, musste zunächst eine Methode zur *in-vivo*-Untersuchung des axonalen Transports etabliert werden.

6.2.1 Etablierung des Mitochondrien-Trackings zur *in-vivo*-Untersuchung des axonalen Transports

Aufbauend auf dem von Pilling *et al.* (2006) verwendeten Versuchsaufbau wurde eine am Lehrstuhl durchführbare Methode zur Messung der axonalen Transportgeschwindigkeit mit Hilfe von GFP markierten Mitochondrien etabliert. Die genaue Durchführung ist in Kapitel II ,2.3.2 (S.39) beschrieben. Für die Markierung der Mitochondrien wurden transgene Fliegen benutzt, die eine mit GFP fusionierte mitochondriale Importsequenz unter UAS-Kontrolle (UAS-mitoGFP) exprimieren. *DCTN1* und mitoGFP wurden simultan unter Verwendung einer Rekombinationslinie (siehe Kapitel II, 2.4.3.3, S.44) spezifisch in Motoneuronen mit D42-Gal4 exprimiert.

Zunächst wurden ausschließlich Kontrolltiere (*w¹¹¹⁸*; *D42-Gal4*; *UAS-mitoGFP*) gemessen, um die Methode zu validieren. In Abbildung 29 sind die in dieser Arbeit erhobenen Daten im Vergleich zu den Daten der Kontrollen von Pilling *et al.* (2006)

dargestellt. Die Werte für die Geschwindigkeit des anterograden und retrograden Mitochondrientransports liegen in der gleichen Größenordnung. In beiden Versuchen bewegen sich die Mitochondrien insgesamt anterograd langsamer als retrograd. Im anterograden Transport bewegen sich bei Pilling *et al.* (2006) die meisten Mitochondrien mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,15-0,3 µm/s, im eigenen Versuch liegt der Peak zwischen 0,2 µm/s und 0,3 µm/s. Betrachtet man den retrograden Transport, liegen auch hier die Werte in der gleichen Größenordnung. Bei Pilling *et al.* (2006) bewegt sich der Großteil der Mitochondrien retrograd mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,3-0,5 µm/s. Die eigenen Werte liegen zwischen 0,2-0,5 µm/s. Es ist also gelungen eine Methode zu etablieren, die eine verlässliche Messung der Transportgeschwindigkeit ermöglicht.

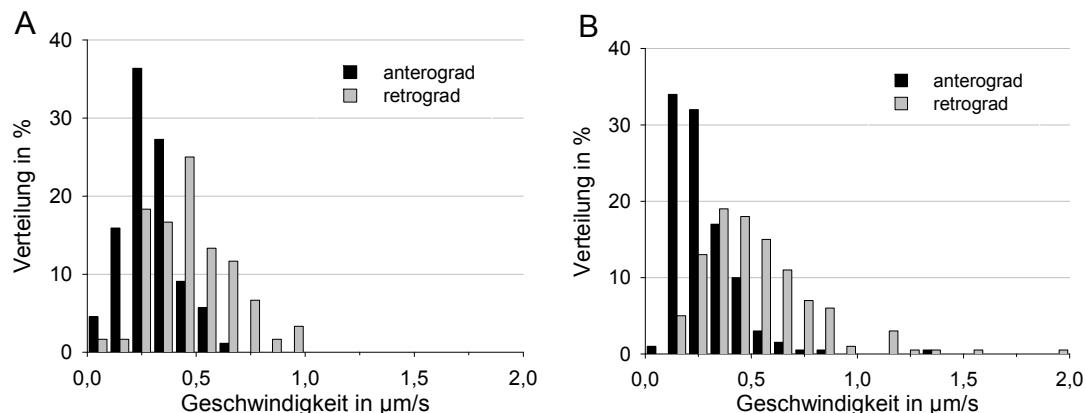


Abbildung 29: Vergleich der Verteilung der Transportgeschwindigkeiten der Mitochondrien in Kontrolllarven. Gezeigt ist die prozentuale Verteilung der Mitochondrien innerhalb der verschiedenen Geschwindigkeitsklassen. A: Daten des retrograden und anterograden Transports der Kontrollfliegen. Genotyp: w^{118} ; $D42-Gal4$; $UAS-mitoGFP$ B: Modifizierte Darstellung der Messungen von Pilling *et al.* (2006).

6.2.2 *DCTN1*-Überexpression beeinträchtigt den axonalen Mitochondrientransport

6.2.2.1 P150^{Glued} beim anterograden Mitochondrientransport

Die Analyse des anterograden Transports zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Geschwindigkeit der Mitochondrien zwischen der Kontrolle und der Überexpression der wildtypischen Konstrukte sowie den mutanten Versionen G59S und E34Q gibt. Ebenso scheint eine reduzierte Expression des endogenen

Proteins durch RNAi *knockdown* keinen Einfluss auf die anterograde Transportgeschwindigkeit zu haben. Allerdings ist zumindest bei der Überexpression der mutanten Version T1249I eine Verschiebung in Richtung eines verlangsamten Transports festzustellen ($p<0,001$). Es bewegen sich mehr Mitochondrien mit reduzierter Geschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 30, Tabelle 16, S.87). Die prozentuale Verteilung der Mitochondrien innerhalb der verschiedenen Geschwindigkeiten ist im Anhang, Abbildung 44 (S.134) gezeigt.

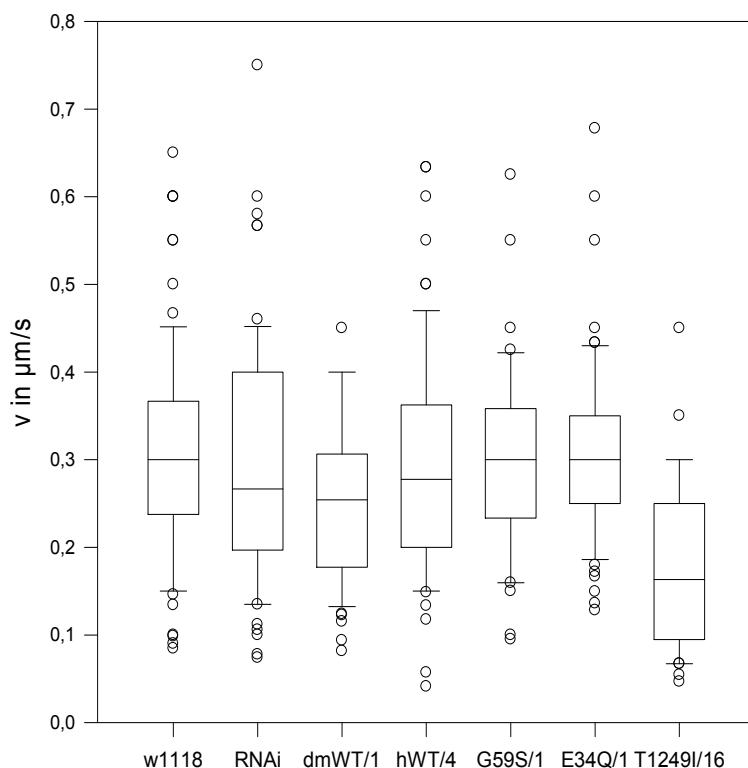


Abbildung 30: Auswirkung der *DCTN1*-Überexpression auf die anterograde Transportgeschwindigkeit. Die Häufigkeitsverteilung der Mitochondrien-Transportgeschwindigkeit zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und der *DCTN1*-Überexpression. Lediglich die Mutation T1249I führt zu einer signifikant reduzierten Transportgeschwindigkeit ($p<0,001$). Genotypen: w^{1118} ; D42-Gal4; UAS-mitoGFP, w^{1118} ; D42-Gal4; UAS-mitoGFP; UAS-RNAi und w^{1118} ; D42-Gal4; UAS-mitoGFP; UAS-DCTN1.

Im Zuge der Messungen musste darüber hinaus festgestellt werden, dass es nach Überexpression der humanen *DCTN1*-Konstrukte sehr schwierig ist überhaupt noch sich bewegende Mitochondrien in diesen Larven zu finden (Tabelle 16, S.87). So konnte zum Beispiel in der Kontrolle im Schnitt die Geschwindigkeit von zehn Mitochondrien pro Larve gemessen werden, wohingegen nach Überexpression des humanen wildtypischen Proteins viel weniger mobile Mitochondrien in einer Larve

identifiziert wurden. Es konnten hier nur sechs Mitochondrien pro Larve analysiert werden. Ähnlich gestaltete sich die Situation nach Überexpression der mutanten Formen G59S, D63Y, R149Q, I196V und M571T. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Überexpression der genannten humanen Konstrukte keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Organellentransports selbst hat, aber insgesamt weniger Organellen transportiert werden. Im Falle der Mutation E34Q konnte jedoch die Transportgeschwindigkeit von acht Mitochondrien pro Probe bestimmt werden, nahezu so viele wie in den Kontrollen. Der Einfluss der Mutation E34Q auf die Anzahl der Transportereignisse ist demnach weniger stark als der der Überexpression der anderen Konstrukte bzw. Mutationen. Eine Ausnahme ist die mutante Form T1249I. Es konnten hier sogar mehr Mitochondrien pro Larve analysiert werden als in den Kontrolltieren. Die Transportgeschwindigkeit war dabei jedoch signifikant reduziert (Tabelle 16, S.87).

6.2.2.2 P150^{Glued} beim retrograden Mitochondrientransport

Auch in der Analyse des retrograden Transports war es schwierig nach Überexpression der humanen *DCTN1*-Konstrukte genügend sich bewegende Mitochondrien in einer Aufnahme zu identifizieren (Tabelle 16, S.87). Es konnten bedeutend weniger Mitochondrien (zwei bis sechs Mitochondrien pro Larve) im Vergleich zur Kontrolle (zehn Mitochondrien pro Larve) gemessen werden. Einzige Ausnahme ist wiederum die Überexpression der mutanten Version E34Q mit neun gemessenen Mitochondrien pro Larve. Interessanterweise konnten in Larven mit einer reduzierten Expression des endogenen Glued (RNAi) fast doppelt so viele mobile Organellen pro Tier gemessen werden wie in der Kontrolle, wobei die Transportgeschwindigkeit selbst unverändert bleibt. Auch die Überexpression von *glued* und der *DCTN1*-Versionen E34Q und G59S und zeigt keine signifikante Veränderung der retrograden Transportgeschwindigkeit. Das humane wildtypische *DCTN1* führt jedoch zu einem verlangsamten retrograden Transport ($p=0,049$). Eine signifikant reduzierte Transportgeschwindigkeit konnte auch nach Überexpression der Mutation M571T ($p=0,001$) beobachtet werden (Abbildung 31, Anhang Abbildung 44). Alle anderen getesteten *DCTN1*-Varianten scheinen ebenfalls eine stark reduzierte Mitochondrien-Transportgeschwindigkeit zu verursachen. Die

Anzahl der gemessenen Ereignisse reichte aber für einen verlässlichen Signifikanztest nicht aus (Tabelle 16, S.87).

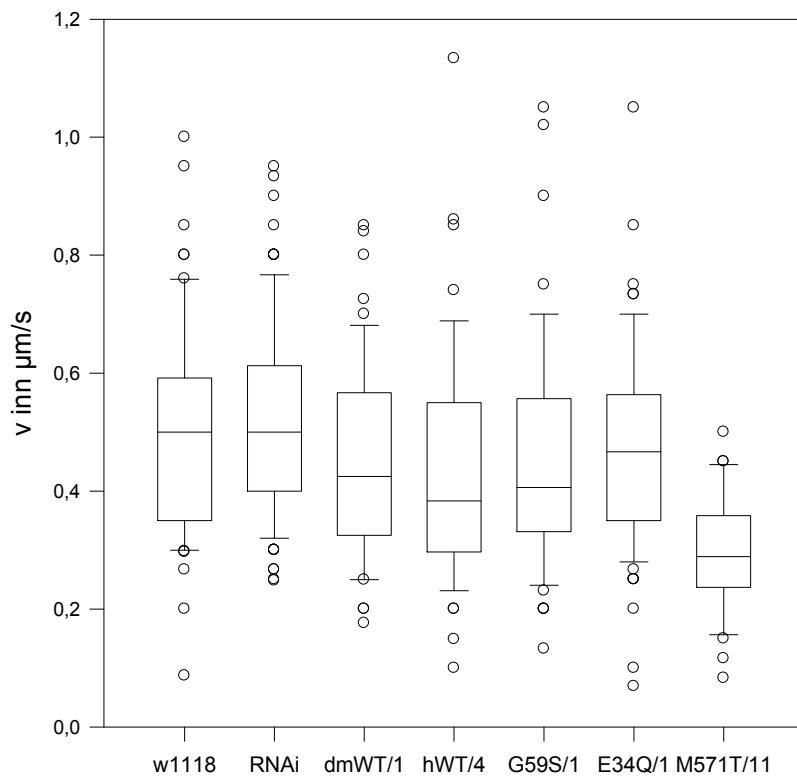


Abbildung 31: Auswirkung der *DCTN1*-Überexpression auf die retrograde Transportgeschwindigkeit. Die motoneuronspezifische Überexpression des humanen wildtypischen p150^{Glued} führt im Vergleich zur Kontrolle zu einem verlangsamten retrograden Mitochondrientransport ($p=0,049$). Die Mutation M571T zeigt eine noch stärkere Reduktion der Transportgeschwindigkeit als hWT ($p=0,001$). Genotypen: $w^{1118}; D42-Gal4; UAS-mitoGFP$, $w^{1118}; D42-Gal4; UAS-mitoGFP; UAS-RNAi$ und $w^{1118}; D42-Gal4; UAS-mitoGFP; UAS-DCTN1$.

Insgesamt bleibt festzustellen, dass die Überexpression der humanen *DCTN1*-Konstrukte anscheinend zu Störungen des anterograden und vor allem des retrograden Mitochondrien-Transports führt. Die einzigen Ausnahmen sind dabei die *DCTN1*-Varianten G59S und E34Q, welche entweder nur milde oder gar keine Beeinträchtigungen des axonalen Transports zeigen.

Auf Grund der interessanten Tatsache, dass zwei der getesteten Mutationen ein abweichendes Verhalten im Vergleich zu allen anderen Konstrukten zeigten, sollten noch weitergehende Untersuchungen zum axonalen Transport in *DCTN1* überexprimierenden *Drosophila*-Larven erfolgen. Hierfür wurden zum einen histologische Untersuchungen als auch verhaltensbiologische Analysen durchgeführt.

Genotyp D42-Gal4, UAS- mitoGFP x	Larven Anzahl	Mitochondrien Anzahl	Mitochondrien/ Larve	v in µm/s (Median)	Standard- abweichung
anterograd					
w ¹¹¹⁸	9	88	10	0.30	±0.12
RNAi	5	67	13	0.27	±0.14
dmWT/1	6	58	10	0.25	±0.09
hWT/4	11	68	6	0.28	±0.13
G59S/1	10	45	5	0.30	±0.11
E34Q/1	8	63	8	0.30	±0.10
D63Y/10	4	14	4	0.27	±0.14
R149Q/3	7	23	3	0.26	±0.12
I196V/2	3	13	4	0.20	±0.09
M571T/11	8	19	2	0.28	±0.13
T1249I/16	3	40	13	0.16*	±0.10
retrograd					
w ¹¹¹⁸	6	60	10	0.50	±0.18
RNAi	5	89	18	0.50	±0.16
dmWT/1	7	55	8	0.43	±0.16
hWT/4	10	46	5	0.38*	±0.20
G59S/1	9	54	6	0.41	±0.19
E34Q/1	8	73	9	0.47	±0.17
D63Y/10	2	3	2	0.20	-
R149Q/3	4	11	3	0.23	±0.08
I196V/2	7	14	2	0.23	±0.17
M571T/11	10	33	3	0.29*	±0.10
T1249I/16	2	9	5	0.22	±0.17

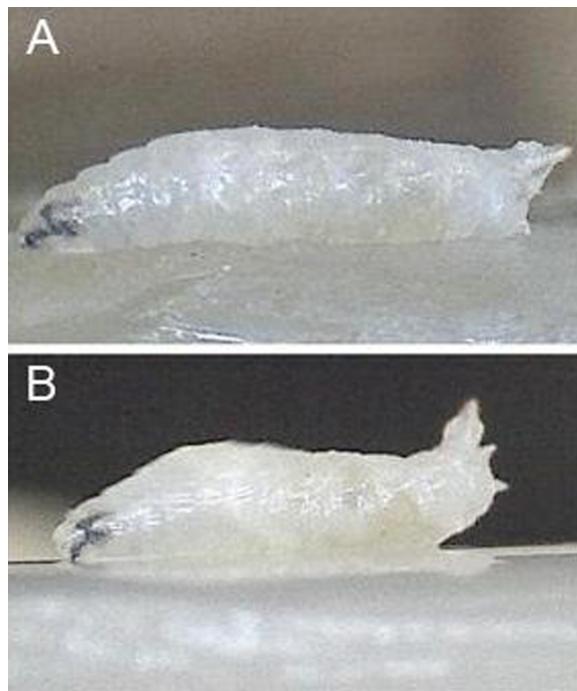
Tabelle 16: Parameter des Mitochondrientransports in den Segmentalnerven. Die Überexpression der *DCTN1*-Konstrukte führt zu einer reduzierten Zahl der Transportereignisse (Mitochondrien pro Larve) und einem verlangsamten retrograden Transport. Lediglich G59S und E34Q zeigen nur wenige bzw. keine Störungen des axonalen Transports. Fett: reduzierte Geschwindigkeit, *: signifikant verschieden im Vergleich zur Kontrolle, grau hinterlegt: reduzierte Anzahl an detektierten Transportereignissen pro Larve im Vergleich zur Kontrolle. Genotypen: w¹¹¹⁸; D42-Gal4; UAS-mitoGFP, w¹¹¹⁸; D42-Gal4; UAS-mitoGFP; UAS-RNAi und w¹¹¹⁸; D42-Gal4; UAS-mitoGFP; UAS-DCTN1.

6.3 *DCTN1*-Überexpression führt zu posteriorer Paralyse

In verschiedenen *Drosophila* Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich Beeinträchtigungen des schnellen axonalen Transports meist in einer posterioren ventralen Paralyse der larvalen Muskeln manifestieren. Diese Lähmung der motorischen Nerven äußert sich in veränderten Kriechbewegungen der Larven. Die distalen Segmente werden dabei abnormal nach oben gebogen. Dieser so genannte „tail-flipping“-Phänotyp wurden zum Beispiel bei Kinesin- und Dyneinmutanten beobachtet (Hurd & Saxton 1996; Martin *et al.* 1999; Bowman *et al.* 2000).

Mit Hilfe dieses einfachen verhaltensbiologischen Tests wurden die verschiedenen *DCTN1*-Konstrukte bezüglich ihres Einflusses auf den axonalen Transport überprüft und charakterisiert. *DCTN1* wurde dabei mit D42-Gal4 motoneuronspezifisch exprimiert und das Kriechverhalten männlicher Larven (L3) untersucht. Es wurden jeweils zwei unabhängige Linien getestet.

Sowohl die Treiberkontrolle als auch Larven, die motoneuronspezifisch GFP exprimieren zeigen ein wildtypisches Kriechverhalten, wohingegen Larven, die das humane wildtypische Protein exprimieren, interessanterweise den oben beschriebenen „tail-flipping“-Phänotyp zeigen. Ebenso führen die meisten der mutanten p150^{Glued}-Versionen zu einer distalen Paralyse. Zu beachten ist, dass nach Expression des *Drosophila* Homologs und der humanen *DCTN1*-Varianten G59S und R149Q nur wenige Larven eine sehr schwache Paralyse entwickeln, die sich in einem bedeutend schwächeren Aufbiegen der posterioren Segmente äußert. Larven, die das Konstrukt E34Q exprimieren verhalten sich völlig unauffällig (Abbildung 32).



Genotyp D42-Gal4 x	tail-flipping
w ¹¹¹⁸	-
GFP	-
dmWT/1	+
hWT/4	++
G59S/1	+
E34Q/1	-
D63Y/9	++
R148W/2	++
R149Q/3	+
I196V/2	++
M571T/11	++
Y878C/8	++
R1049Q/6	++
T1249I/13	++

Abbildung 32: Motoneuronspezifische *DCTN1*-Überexpression führt zu posteriorer Paralyse in *Drosophila*. Larven, die das humane wildtypische Konstrukt exprimieren (B: w^{1118} ; $D42\text{-Gal}4$: $UAS\text{-}hWT/4$), entwickeln eine distale Paralyse. Im Gegensatz zur Treiberkontrolle (A: w^{1118} ; $D42\text{-Gal}4$; +) werden die letzten Segmente beim Kriechen nach oben gebogen. In der Tabelle ist Auftreten und Stärke dieses „tail-flipping“-Phänotyps innerhalb der verschiedenen untersuchten Genotypen dargestellt. Klassifizierung der Phänotypen: wildtypisches Verhalten (-), schwacher Phänotyp (+); starker Phänotyp (++) . Genotypen: w^{1118} ; $D42\text{-Gal}4$ und w^{1118} ; $D42\text{-Gal}4$; $UAS\text{-}DCTN1$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass erstaunlicherweise die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins die Integrität der larvalen Motoneuronen und Muskeln in einem weit stärkeren Ausmaß stört als die Überexpression der „Goldstandard“-Mutation G59S. Ob der hier beobachtete Phänotyp tatsächlich auf Störungen des axonalen Transports zurückzuführen ist, kann anhand dieses Experimentes nicht geklärt werden. Jedoch ist bekannt, dass neben der posterioren Paralyse Organellen- und Vesikelansammlungen in den Axonen der Motoneuronen ein weiteres typisches Kennzeichen eines beeinträchtigten axonalen Transports in *Drosophila* sind.

6.4 P150^{Glued}-Akkumulation in axonalen Organellen- und Vesikelstaus

1996 stellten Hurd *et al.* fest, dass Mutationen in der schweren Kette des Motorproteins Kinesin zu axonalen Verdickungen in larvalen Segmentalnerven führen, die mit Organellen und Vesikelproteinen gefüllt sind. Darüber hinaus konnte

gezeigt werden, dass das Motorprotein selbst in den Segmentalnerven akkumuliert. Drei Jahre später wurden auch in Dyneinmutanten diese Organellenstaus in den Motoneuronen nachgewiesen (Martin *et al.* 1999). Im Rahmen einer am Lehrstuhl angefertigten Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins sowie der Mutation D63Y zu Vesikelansammlungen in den larvalen Segmentalnerven führen (Rauenbusch 2010).

Mit Hilfe von histologischen Analysen wurde nun überprüft, ob auch die Überexpression der verschiedenen *DCTN1*-Konstrukte diese typischen Merkmale eines gestörten axonalen Transports zeigt.

6.4.1 Mitochondrien akkumulieren in Segmentalnerven nach motoneuronspezifischer p150^{Glued}-Expression

Mitochondrien werden im Axon sowohl über den schnellen anterograden Transport zur Synapse transportiert als auch über den schnellen retrograden Transport zurück zum Zellkörper (Tsukita & Ishikawa 1980; Hirokawa *et al.* 1991; Quatacker *et al.* 1995). Aus diesem Grund eignet sich die Analyse der Verteilung der Mitochondrien in Axonen sehr gut, um einen ersten Hinweis darauf zu gewinnen, ob generell Störungen des axonalen Transports vorliegen.

Die Markierung der Mitochondrien erfolgte wiederum über transgene UAS-mitoGFP-Fliegen (siehe auch S.82, Kapitel III, 6.2.1). *DCTN1* und mitoGFP wurden gleichzeitig mit D42-Gal4 unter Verwendung einer Rekombinationslinie (siehe Kapitel II; 2.4.3.3) spezifisch in Motoneuronen exprimiert. Untersucht wurden die Axonbündel männlicher Larven (L3) mittels konfokaler Mikroskopie. In Abbildung 33 sind die direkt im Anschluss an das Ventralganglion liegenden Bereiche der Segmentalnerven, die die Abdominalsegmente 1 und 2 durchspannen, dargestellt.

Deutlich zu sehen ist eine Vielzahl von zufällig verteilten Mitochondrienansammlungen in den Nerven nach Überexpression des humanen wildtypischen Proteins (hWT/4). Im Gegensatz dazu sind beim *Drosophila* Homolog (dmWT/8) nur sehr wenige dieser Mitochondrienstaus zu beobachten. Die mutante Form G59S führt ebenfalls nur zu sehr wenigen Mitochondrienakkumulationen in den Axonen. Im Falle der Mutation E34Q sind keine abnormen Veränderungen im

Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Alle anderen *DCTN1*-Versionen zeigen den gleichen Phänotyp wie die Überexpressionen des humanen wildtypischen p150^{Glued}. In Abbildung 33 ist exemplarisch die Mitochondrienverteilung nach Überexpression der *DCTN1*-Form R148W dargestellt.

Die Resultate bezüglich der Mitochondrienverteilung korellieren mit den Ergebnissen des Verhaltenstests. Larven mit normalem Kriechverhalten zeigen eine unveränderte Mitochondrienverteilung in den Segmentalnerven. In Tieren, die eine posteriore Paralyse entwickeln, wurden Mitochondrienansammlungen in den Axonen nachgewiesen.

In den von Kinesinmutationen ausgelösten axonalen Staus wurden nicht nur Organellen und Vesikel nachgewiesen, sondern auch das Motorprotein Kinesin selbst (Hurd & Saxton 1996). Damit konnte gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen den axonalen Schwellungen und dem mutiertem Motorprotein besteht. Dies führt zu der Frage, ob auch die Mitochondriestaus in den Segmentalnerven *DCTN1* exprimierender Larven p150^{Glued}-Ansammlungen aufweisen.

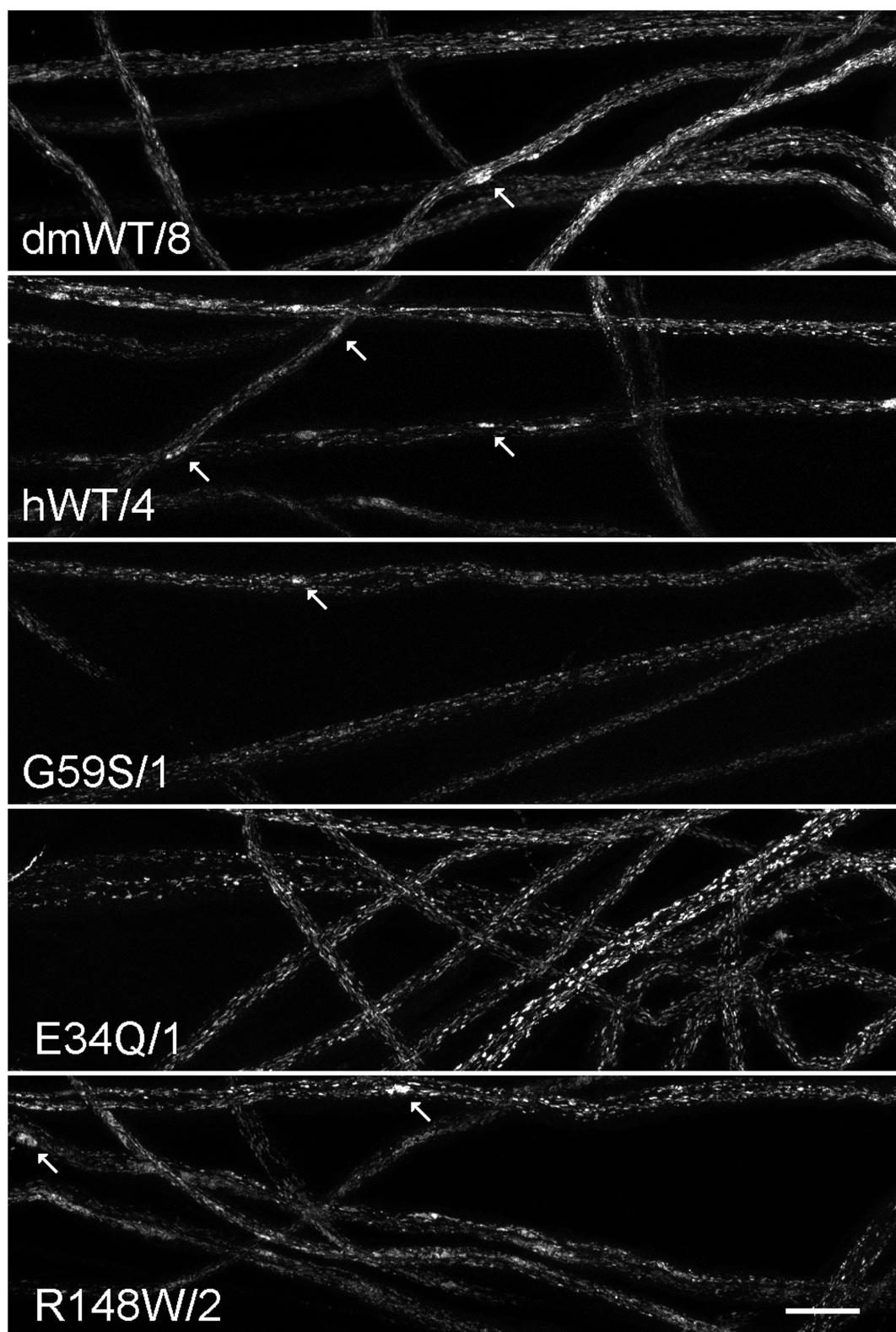


Abbildung 33: Mitochondrienstaus in Segmentalnerven *DCTN1* exprimierender Larven. Die Überexpression von *Drosophila* Glued als auch der humanen mutanten Versionen G59S und E34Q zeigen eine nahezu wildtypische Mitochondrienverteilung in den larvalen Nerven. Larven, die das humane wildtypische Konstrukt oder die humane *DCTN1*-Version R148W exprimieren, entwickeln zufällig verteilte Organellenansammlungen in den Axonen (Pfeile). Genotyp: w^{1118} ; *D42-Gal4*; *UAS-mitoGFP*; *UAS-DCTN1* bzw. *UAS-glued*. Balken: 20 μ m, anterior: rechts.

6.4.2 P150^{Glued} akkumuliert in larvalen Axonen nach motoneuronspezifischer Expression

Für die Untersuchung der p150^{Glued}-Verteilung wurde *DCTN1* wiederum über D42-Gal4 spezifisch in Motoneuronen exprimiert. Es wurden larvale Segmentalnerven präpariert und mit p150- sowie mit Futsch-Antikörpern gefärbt. In Abbildung 34 ist die p150^{Glued}-Verteilung innerhalb zufällig ausgewählter, repräsentativer Abschnitte der Segmentalnerven dargestellt. Wie bereits in 5.2.1 (S.73) beschrieben, ist das Protein in filamentären Strukturen entlang der Mikrotubuli angeordnet. Lediglich im Falle der Mutationen G59S und E34Q ist das überexprimierte mutante Protein weniger stark mit den Mikrotubuli assoziiert. Allerdings konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins und fast aller anderen p150^{Glued}-Varianten zu großen, zufällig verteilten p150^{Glued}-Akkumulationen in den Segmentalnerven führt. Die Mutationen G59S und E34Q zeigen ähnlich zu den Untersuchungen der Mitochondrienverteilung nur sehr wenige oder keine dieser großen Dynaktinansammlung. Des Weiteren ist festzustellen, dass die Axonbündel an manchen Stellen mit p150^{Glued}-Ansammlungen verdickt sind. Exemplarisch zu sehen in der Darstellung der Mutation R148W (Abbildung 34).

Unbewiesen bleibt jedoch, ob Organellenstaus und p150^{Glued}-Akkumulationen unabhängig voneinander sind oder im direkten Zusammenhang stehen.

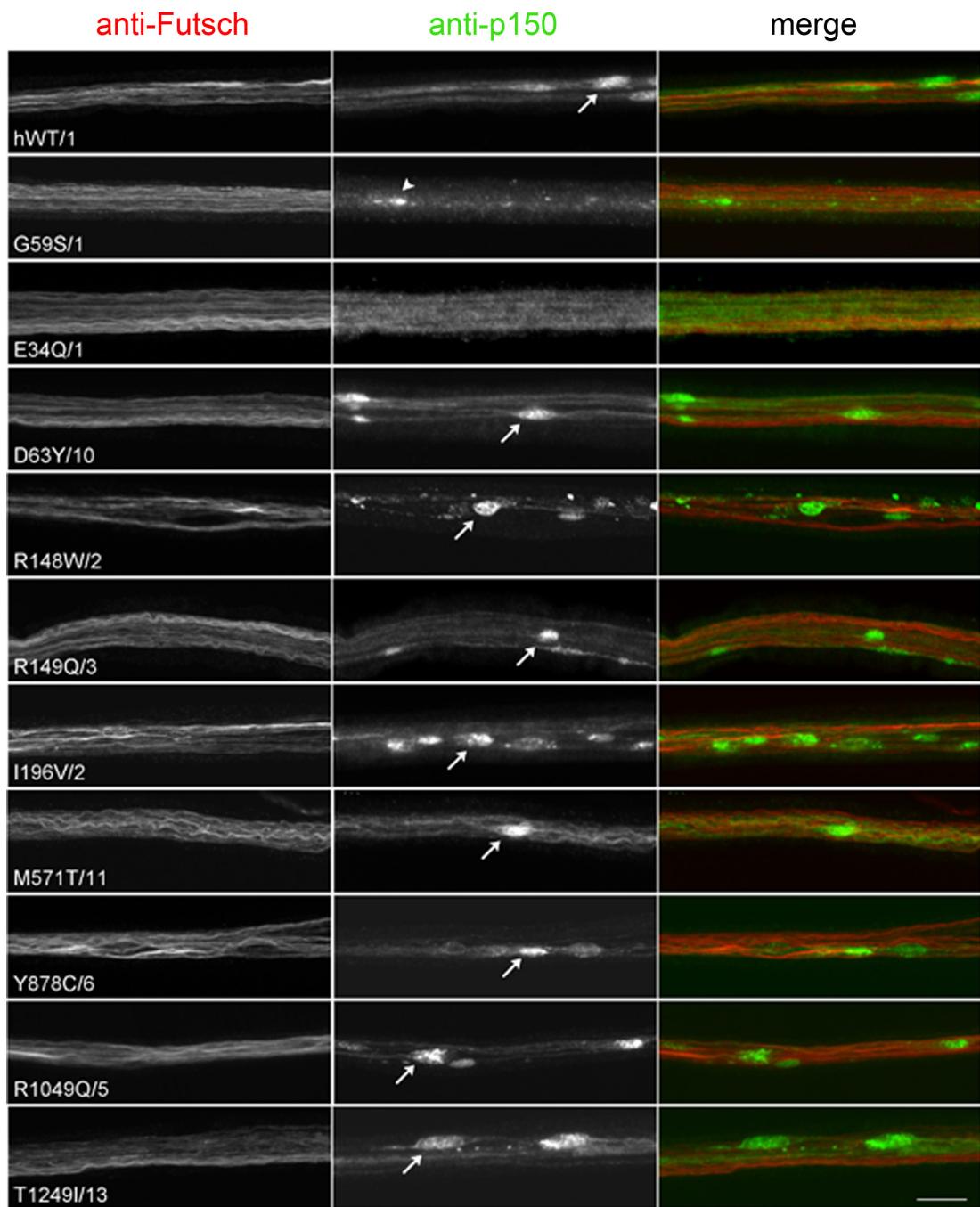


Abbildung 34: Wildtypisches und mutantes p150^{Glued} akkumuliert in Segmentalnerven. Die motoneuronspezifische Überexpression des wildtypischen Proteins und der meisten mutanten Formen führt zu p150^{Glued}-Akkumulationen (Pfeile). Die Mutationen G59S und E34Q zeigen hingegen keine dieser großen p150^{Glued}-Anhäufungen. G59S führt nur zu kleineren p150^{Glued}-Aggregaten (Pfeilspitze). Genotyp: w^{1118} ; $D42-Gal4$; $UAS-DCTN1$. Balken: 10 μ m.

6.4.3 Die p150^{Glued}-, Vesikel- und Organellenanhäufungen in larvalen Segmentalnerven sind koinzident

Um zu überprüfen, ob die beobachteten p150^{Glued}-Akkumulationen und die Mitochondrienstaus in den Nerven zusammentreffen, wurden männliche mitoGFP exprimierende Larven auf p150^{Glued} gefärbt. Außerdem wurde gleichzeitig über eine Markierung des Vesikelproteins CSP mit anti-CSP untersucht, ob anterograd transportiertes Frachtgut ebenso in den axonalen Staus nachgewiesen werden kann.

Die Mitochondrienansammlungen, die bei Überexpression der entsprechenden *DCTN1*-Versionen nachgewiesen werden konnten, treffen in allen Fällen mit p150^{Glued}- und CSP-Akkumulationen zusammen. Dies ist in Abbildung 35 exemplarisch für das humane wildtypische Protein sowie die Mutationen D63Y und R148W gezeigt. Außerdem ist zum Vergleich die Mitochondrien-, CSP- und p150^{Glued}-Verteilung in G59S und E34Q exprimierenden Larven dargestellt.

Die bei der Überexpression von *DCTN1* auftretenden axonalen Staus enthalten demnach nicht nur Organellen sondern auch das Transportprotein Dynaktin bzw. seine Untereinheit p150^{Glued} und anterograd transportierte Vesikelproteine. Dies bedeutet, dass sowohl der schnelle anterograde als auch der schnelle retrograde Transport beeinträchtigt sind. Es ist erstaunlich, dass gerade die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins den axonalen retrograden und anterograden Transport so massiv stört, wohingegen die nach Überexpression der mutanten Form G59S beobachteten Phänotypen generell nicht so stark ausfallen wie bei den anderen humanen *DCTN1*-Konstrukten.

Die Zusammenfassung der hier beschriebenen Phänotypen eines gestörten axonalen Transports macht außerdem deutlich, dass die Mutation E34Q eine herausragende Stellung innerhalb der untersuchten Mutationen innehaltet. Als einzige zeigt sie in allen untersuchten Parametern kaum Beeinträchtigungen des axonalen Transports (Tabelle 17, S.97). Da die verwendete Linie ähnlich stark exprimiert wie alle anderen getesteten Linien (siehe Kapitel III, 1.2.2), scheint diese Mutation so wie G59S nur milde Störungen des axonalen Transports zu verursachen.

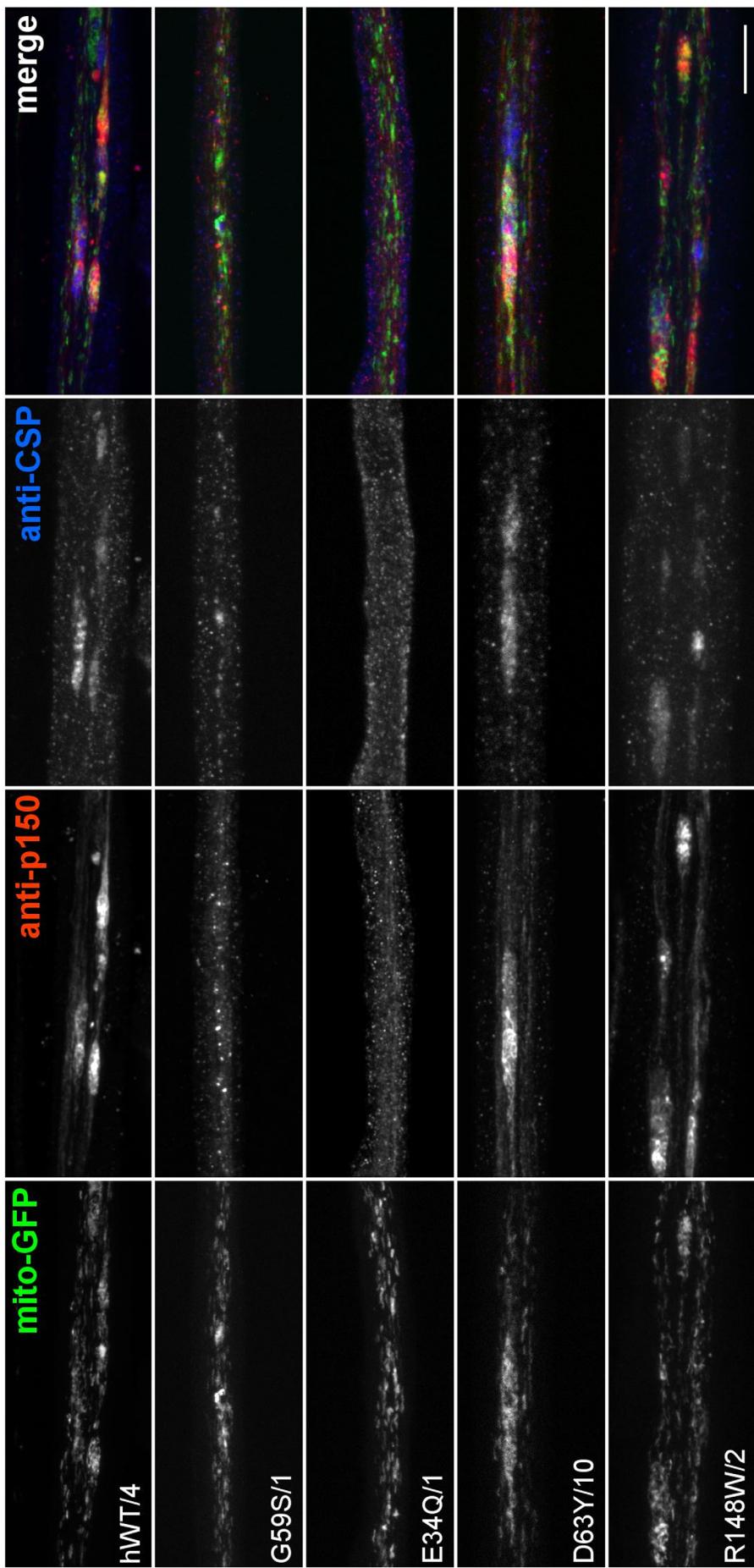


Abbildung 35: Die P150^{Glued}-, Vesikel- und Organellenanhäufungen in larvalen Segmentalnerven sind koinzident. Mitochondrien, CSP und p150^{Glued} akkumulieren zusammen in axonalen Status nach Überexpression des humanen wildtypischen p150^{Glued} sowie der mutanten Formen D63Y und R148W. Die Mutationen G59S und E34Q zeigen eine normale Verteilung der Organellen und Proteine. Genotyp. w^{1118} ; *D42-Ga4; UAS-mitoGFP; UAS-DCTN1*. Balken: 10 µm.

Phänotyp \ UAS-Konstrukt	dmWT	hWT	G59S	E34Q	D63Y	R148W	R149Q	I196V	M571T	Y878C	R1049Q	T1249I
CSP-Akkumulation im Kortex	-	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++
Mitochondrien-Transport	-	++	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++
distale Paralyse	-	++	+	-	++	++	+	++	++	++	++	++
Mitochondrienstaus	-	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++
P150 ^{Glued} -Staus	NG	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++

Tabelle 17: Zusammenfassung der Untersuchungen zum axonalen Transport in den Segmentalnerven. Die motoneuronspezifische Überexpression (D42-Gal4) der humanen *DCTN1*-Konstrukte resultiert in einer starken Beeinträchtigung des axonalen Transports. Dies manifestiert sich in einer distalen Paralyse sowie Störungen des Organellen- und Vesikeltransports einhergehend mit p150^{Glued}-Ansammlungen in den Segmentalnerven. Zu beachten ist, dass die beiden in der Mikrotubulibindedomäne des Proteins liegenden Mutationen E34Q und G59S kaum Beeinträchtigungen des axonalen Transports zeigen. Klassifizierung der Phänotypen: wildtypisch (-), milder Phänotyp (+), starker Phänotyp (++) . NG: nicht getestet. Genotypen: *w¹¹¹⁸*; *D42-Gal4*; *UAS-DCTN1* bzw. *w¹¹¹⁸*; *D42-Gal4*; *UAS-DCTN1*; *UAS-mitoGFP*.

Kapitel IV: Diskussion

Diskussion

Seit einigen Jahren steigt aufgrund der ständig zunehmenden Lebenserwartung die Zahl der Patienten, die an neurodegenerativen Syndromen leiden, stetig an. Bis heute stehen jedoch nur in den wenigsten Fällen effektive Behandlungsmethoden zur Verfügung. Häufig ist es noch nicht einmal gelungen die pathogenen Ursachen der Erkrankungen aufzuklären. Wenn auch der Großteil aller Fälle sporadisch auftritt, so konnten dennoch genetische Defekte mit neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Aufgrund des häufig sehr komplizierten Vererbungsmusters dieser Krankheiten und nur unzureichend zur Verfügung stehenden familiären Stammbäumen sind genetische Studien oft nur sehr limitiert möglich. In den letzten zwei Jahrzehnten ist es aber wiederholt gelungen, potentielle Risikogene im Modellsystem *Drosophila melanogaster* zu untersuchen. So wurden unter anderem *Drosophila*-Modelle für die Parkinsonsche Erkrankung, Morbus Alzheimer und für Motoneuronerkrankungen wie Amyotrophe Lateralsklerose etabliert (Lu & Vogel 2009; Hirth 2010).

1 Ein *Drosophila*-Modell für ALS assoziierte Motoneuronerkrankungen

Ein genetischer Risikofaktor für ALS, sind Mutationen im Gen *DCTN1*, das für die Untereinheit p150^{Glued} des Multiproteinkomplexes Dynaktin kodiert. In dieser Arbeit wurde ein *Drosophila melanogaster*-Modell für ALS etabliert, das auf Überexpressionsanalysen des Gens *DCTN1* mit Hilfe transgener *Drosophila*-Stämme basiert. Des Weiteren wurden anhand dieses *Drosophila*-Modells neu identifizierte Mutationen im Gen *DCTN1* auf ihre pathogenen Eigenschaften überprüft und charakterisiert.

1.1 Überexpression von humanem *DCTN1* in *Drosophila*

Für alle *DCTN1*-Varianten wurden zunächst stabile transgene Linien etabliert und mittels quantitativer *real-time*-PCR und Western-Blot-Analysen validiert. Ebenso wurden stabile UAS-glued-Linien etabliert. Eine Bestimmung der Expressionsstärke

konnte aber für diese Linien leider nicht vorgenommen werden, da kein entsprechender Antikörper zur Verfügung stand. Hierfür müssten die UAS-glued-Konstrukte ebenfalls mit einem *Flag-Tag* versehen werden. Dies würde eine vergleichende Bestimmung der Expressionsstärke der humanen und der *Drosophila*-Konstrukte ermöglichen.

Interessanterweise zeigen die Linien der Mutation G59S, in denen mittels Western-Blot-Analysen eine ähnliche Menge von p150^{Glued} wie in der Referenzlinie des humanen wildtypischen Konstrukts nachgewiesen werden konnte, eine stark erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zur hWT-Referenzlinie. Dieser Effekt wurde auch schon in vorhergehenden Arbeiten sowohl im Mausmodell als auch in *Drosophila* beschrieben (Lai *et al.* 2007; Lloyd *et al.* 2012). Das mutante Protein p150^{Glued}-G59S scheint demnach instabiler zu sein und in der Zelle schneller abgebaut zu werden als die wildtypische Form. Kristallstrukturanalysen zeigten (Li *et al.* 2002), dass die Aminosäure Glyzin an Position 59 wichtig ist für die Bildung der drei β-Faltblattstrukturen im Zentrum der Cap-Gly-Domäne (Abbildung 36, S. 101). Es wird angenommen, dass der Austausch der Aminosäure Glyzin an Position 59 gegen das größere Serin in einer sterischen Behinderung im Zuge der Proteinfaltung resultiert und infolgedessen das falsch gefaltete Protein instabiler ist (Levy *et al.* 2006; Lai *et al.* 2007).

Zusätzlich zeigt die Analyse der *DCTN1*-Expression der Linien auch für die Mutationen R148W, M571T und D63Y ein ähnliches Phänomen. Die jeweiligen p150^{Glued}-Varianten erscheinen ebenfalls weniger stabil als das wildtypische Protein. Im Gegensatz dazu ist bei der Mutation Y878C genau das Gegenteil zu beobachten. Die Linien haben vergleichsweise eine geringere mRNA-Expression als der Proteinspiegel erwarten lässt. Möglicherweise führt der Aminosäureaustausch an Position 878 zu einer höheren Stabilität des Proteins. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollte jedoch in weiteren Experimenten die Stabilität bzw. Degradationsrate der verschiedenen p150^{Glued}-Formen z.B. über Western-Blot-Analysen eingehender untersucht werden.

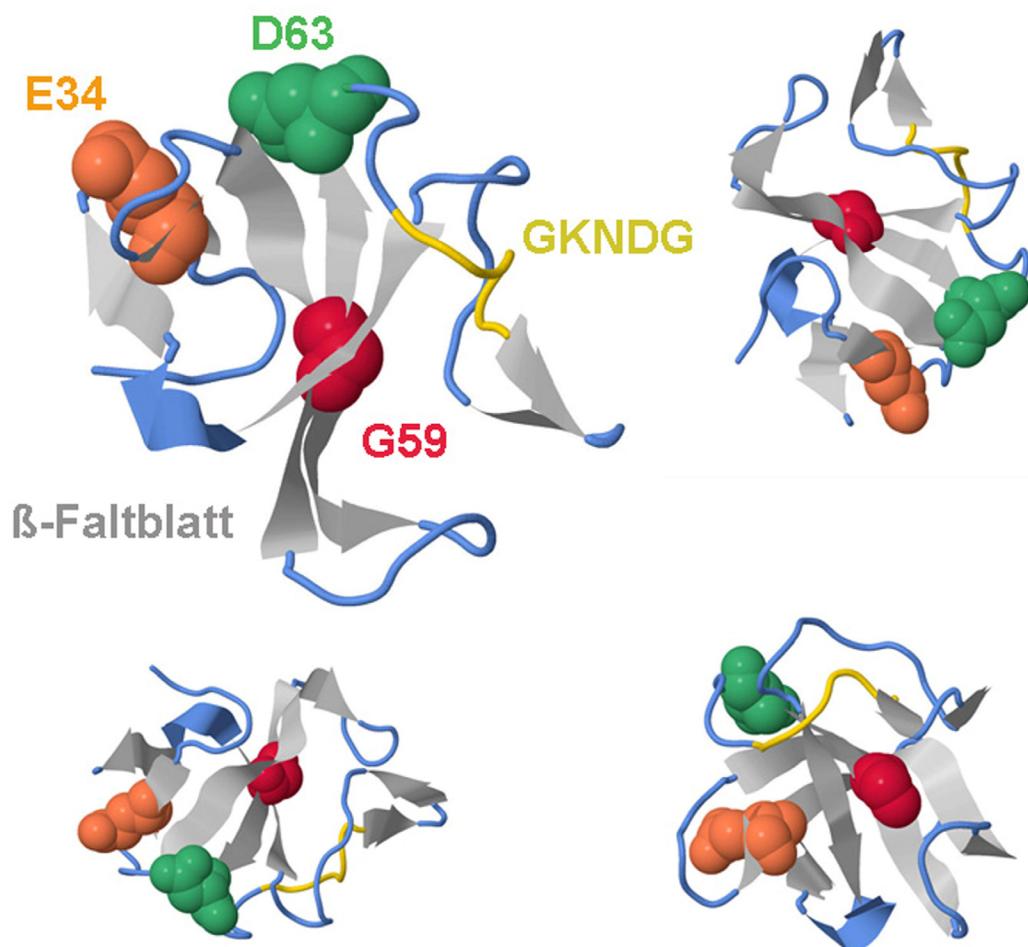


Abbildung 36: Schematische Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur der Cap-Gly-Domäne von humanem p150^{Glued}. Gezeigt ist die räumliche Struktur des N-Terminus von p150^{Glued} aus unterschiedlichen Blickwinkeln. Die Aminosäure Glyzin (G) an Position 59 (rot) liegt im Zentrum der Domäne. Die Aminosäuren Glutaminsäure (E) an Position 34 (orange) und Asparaginsäure (D) an Position 63 (grün) sowie das GKNDG-Motiv (gelb) befinden sich an der Oberfläche der globulären Domäne. Im bzw. in der Nähe des GKNDG-Motivs sind die Perry-Syndrom verursachenden Mutationen lokalisiert. Die Abbildung wurde mit dem Programm Jmol erstellt, auf Basis der von Honnappa *et al.* (2006) veröffentlichten 2HKQ.pdb-Datei.

Dennoch konnten für alle Konstrukte Linien identifiziert werden, die auf Proteinebene eine ähnliche Expressionsstärke haben. Dies ist wichtig, da in den durchgeföhrten Experimenten die Überexpression der verschiedenen *DCTN1*-Sequenzvarianten im Vergleich zur Überexpression der wildtypischen Konstrukte analysiert wurde. Es war bereits bekannt, dass die Überexpression der *DCTN1*-Konstrukte je nach Expressionsstärke zu unterschiedlich starken Phänotypen führen kann. Deshalb wurden in allen Analysen Linien mit ähnlicher p150^{Glued}-Menge untersucht. Es ist also auszuschließen, dass die beobachteten unterschiedlichen

Effekte der verschiedenen Konstrukte z.B. in der Entwicklung, allein auf abweichende Expressionsstärken der Linien zurückzuführen sind.

1.2 Die Überexpression funktioneller *DCTN1*-Konstrukte führt zu schweren Entwicklungsstörungen in *Drosophila*

Dominant-negative Allele von Glued verursachen in *Drosophila* schwere Entwicklungsstörungen, so führt die verkürzte Form Gl^1 homozygot zu früher Letalität der Fliegen und heterozygot zur Missbildung der Rhabdomerstruktur des Auges (Plough & Ives 1934; Fan & Ready 1997). Interessanterweise resultiert auch die Überexpression der wildtypischen $\text{p}150^{\text{Glued}}$ -Formen in Störungen der Entwicklung. Wie auch schon in anderen Arbeiten beschrieben (Stribl 2008; Rauenbusch 2010; Lloyd *et al.* 2012), sind sowohl das wildtypische humane als auch das wildtypische *Drosophila* Protein ubiquitär exprimiert letal. Außerdem verursacht vor allem die ektopische Expression des humanen wildtypischen *DCTN1* massive Störungen der Retinaentwicklung. Diese Störungen sind ebenfalls, wenn auch weniger prominent, nach Expression des *Drosophila* Proteins zu beobachten. Lloyd *et al.* (2012) konnten sowohl mit einer schwachen Expression des *Drosophila* Glued als auch des humanen $\text{p}150^{\text{Glued}}$ die von Gl^1 verursachten Phänotypen retten. Dies lässt vermuten, dass das humane $\text{p}150^{\text{Glued}}$ auch in *Drosophila* in den Proteinkomplex eingebaut wird und voll funktionsfähig ist. Wieso führt aber gerade die Überexpression der funktionellen Proteine zu solch schweren Entwicklungsstörungen? Das dominant-negative Allel Gl^1 und die *DCTN1*-Überexpression zeigen ähnliche Entwicklungsstörungen. Es ist bereits bekannt, dass Gl^1 die Integrität des Multiproteinkomplexes Dynaktin stört (Fan & Ready 1997). Möglicherweise beeinträchtigt auch die Überexpression der wildtypischen bzw. funktionellen $\text{p}150^{\text{Glued}}$ -Formen die Bildung und Stabilität des Dynaktinkomplexes. Ein ähnlicher Effekt wurde schon für die Überexpression der Dynaktin-Untereinheit p50 beschrieben. Die p50-Überexpression stört die Bindung von $\text{p}150^{\text{Glued}}$ an die Untereinheit Arp1 und beeinträchtigt dadurch die Integrität und somit Funktionalität des Dynaktinkomplexes (Echeverri *et al.* 1996; Burkhardt *et al.* 1997). Außerdem ist die Stabilität des kompletten Komplexes streng als eine Einheit reguliert. So führt

zum Beispiel eine reduzierte Expression der Untereinheit p50 zu einer Hemmung der Expression des gesamten Komplexes (Jacquot *et al.* 2010).

Darüber hinaus ist bekannt, dass die in Gl¹-Mutanten beobachteten Störungen stark dosisabhängig sind. So zeigen Fliegen die Gl¹ spezifisch im Auge überexprimieren einen noch stärkeren Augenphänotyp als die heterozygote Mutante (Allen *et al.* 1999). Ein dosisabhängiger Effekt konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Die Entwicklungsstörungen sind umso stärker ausgeprägt, je höher die *DCTN1*-Expression der Linien ist. Das heißt, das funktionelle Protein ist vor allem in zu hohen Dosen toxisch für den Proteinkomplex Dynaktin. Dies könnte auch den geringeren Effekt der Überexpression des wildtypischen *Drosophila glued* im Auge erklären. Da die Expressionsstärke der UAS-glued-Linien nicht bestimmt werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Linien schwächer exprimieren als die Linien des humanen wildtypischen Konstrukts.

Im Gegensatz zu den wildtypischen *DCTN1*-Konstrukten zeigt die Expression von G59S kaum Beeinträchtigungen in der Entwicklung. Transgene Fliegen mit ubiquitärer *DCTN1*-G59S-Expression sind lebensfähig. Die augenspezifische Expression zeigt nur einen sehr milden Phänotyp. Dies ist umso erstaunlicher, da eine gleich starke Expression der wildtypischen p150^{Glued}-Formen schwere Störungen in der Entwicklung hervorruft. Dieses Phänomen wurde auch in der Arbeit von Lloyd *et al.* (2012) beschrieben. Die spezifische Überexpression des wildtypischen humanen als auch des *Drosophila* Proteins in Neuronen mit elav-Gal4 führt zu ähnlichen Augenphänotypen, wie die augenspezifische *DCTN1*-Expression in dieser Arbeit. Es wurden aber nur milde Störungen der Entwicklung nach einer neuronalen Expression der humanen *DCTN1*-Mutante G59S beobachtet. Zudem zeigt die Expression der zu G59S korrespondierenden mutanten *Drosophila* Version *glued*-G38S ebenfalls nur geringe Entwicklungsstörungen.

Für die mutante p150^{Glued}-Version G59S konnte bereits gezeigt werden, dass diese, im Gegensatz zum wildtypischen Protein, die Bildung und den Erhalt des Dynaktinkomplexes selbst nicht beeinträchtigt (Levy *et al.* 2006). Dennoch ist es überraschend, dass die Überexpression der mutanten *DCTN1*-Form G59S keinen entwicklungsbiologischen Effekt zeigt. Schließlich führt die in der Mikrotubulibindedomäne liegende Mutation unter anderem zu einer reduzierten

Bindung von p150^{Glued} an die Mikrotubuli. Kim *et al.* (2007) wiesen außerdem nach, dass gerade diese Domäne in der Mitose von entscheidender Bedeutung bei der Organisation des Spindelapparates und der Mikrotubuli ist. Die Deletion des N-Terminus von p150^{Glued} führte zudem in S2-Zellen nicht nur zum Verlust der Mikrotubulibindefähigkeit, sondern auch zur Bildung multipolarer Spindelapparate und freier Mikrotubuliorganisationzentren. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zwar ein funktionaler Dynaktinkomplex für die Entwicklung absolut notwendig ist, aber die Cap-Gly-Domäne bzw. die von G59S ausgelösten Beeinträchtigungen der Funktionalität dieser Domäne nur eine untergeordnete Rolle spielen. Möglicherweise führt G59S nur zu einem partiellen Funktionsverlust der Cap-Gly-Domäne und verursacht deshalb nur geringe Störungen während der Entwicklung. Andererseits wurde schon mehrfach gezeigt, dass G59S aggregiert (Puls *et al.* 2005; Levy *et al.* 2006; Laird *et al.* 2008; Lloyd *et al.* 2012; Stockmann *et al.* 2012). Es ist vorstellbar, dass transgenes p150^{Glued}-G59S zu einem Großteil in Aggregate rekrutiert wird und nur zu einem geringen Anteil in den Komplex eingebaut wird. Dies könnte ebenfalls erklären, warum die Überexpression der *loss-of-function*-Mutation G59S kaum zu Entwicklungsdefekten führt. Ein G59S *knock-in* Mausmodell zeigte außerdem, dass homozygote G59S Mäuse nicht lebensfähig sind, während die heterozygoten Tiere sich normal entwickeln (Lai *et al.* 2007). Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass die Entwicklungsphänotypen abhängig sind von dem in der Zelle vorliegendem Mengenverhältnis des wildtypischen Proteins/Komplexes zum mutanten Protein/Komplex.

Die Überexpressionen fast aller untersuchten Mutationen verursachen gleiche bzw. ähnliche Phänotypen wie die Überexpression der wildtypischen Konstrukte (Abbildung 37, S.121). Vermutlich führt die Überexpression dieser *DCTN1*-Varianten ebenfalls zu einer Beeinträchtigung des Dynaktinkomplexes. Im Gegensatz dazu verhält sich die *DCTN1*-Variante E34Q eher wie die „Goldstandard“-Mutation G59S. Die Tiere sind nach ubiquitärer Expression zumeist lebensfähig und zeigen nur milde Störungen der Augenentwicklung. Dies ist vor allem dahingehend besonders beachtenswert, da die Mutation E34Q in derselben Domäne des Proteins liegt wie G59S (Abbildung 37, S.121). Wie bereits erwähnt, zeigen heterozygote G59S *knock-in* Mäuse keinerlei Störungen der Entwicklung. Interessanterweise entwickeln diese Tiere aber einen MND-ähnlichen Phänotyp.

Dieser manifestiert sich unter anderem im Verlust von Motoneuronen und in motorischen Defiziten (Lai *et al.* 2007).

1.3 *DCTN1*-Mutationen beeinträchtigten die motorischen Fähigkeiten von *Drosophila*

Auch in anderen Mausmodellen entwickeln transgene Mäuse nach Überexpression von *DCTN1*-G59S motorische Störungen. Mäuse, die p150^{Glued}-G59S auf einem vergleichsweise hohen Level exprimieren, zeigen spontane Tremoranfälle, einen altersabhängigen Rückgang der Greifkraft sowie Muskelschwäche (Laird *et al.* 2008). In einem Mausmodell, in dem nur eine sehr schwache p150^{Glued} Expression nachgewiesen wurde, entwickeln die G59S-Tiere ebenfalls motorische Defizite. Es wurde aber nur ein sehr milder und langsam fortschreitender Rückgang der Greifkraft und Muskelschwäche beobachtet (Chevalier-Larsen *et al.* 2008).

In *Drosophila* konnte nachgewiesen werden, dass die zu G59S korrespondierende *Drosophila*-Mutation G38S ebenfalls zu einem progressiven Verlust der motorischen Fähigkeiten führt (Lloyd *et al.* 2012). Auch die p150^{Glued}-G59S Überexpression resultiert in einem stärkeren altersabhängigen Rückgang der Klettergeschwindigkeit im Vergleich zur Expression des wildtypischen Proteins (Stribl 2008; Schilling 2011). Ebenso führt die Expression der mutanten Formen E34Q, D63Y und I196V zu einem altersabhängigen Verlust der motorischen Fähigkeiten. Dies lässt vermuten, dass es sich bei diesen Mutationen möglicherweise um potentielle Risikofaktoren für Motoneuronerkrankungen handeln könnte. Vor allem in Anbetracht dessen, dass zwei der *DCTN1*-Varianten (E34Q, D63Y) in derselben Region des Proteins lokalisiert sind wie G59S (Abbildung 36, S.101 und Abbildung 37, S.121).

Überraschend erscheint, dass in der Untersuchung der Lokomotor-Aktivität kein altersabhängiger Rückgang der motorischen Fähigkeiten in *DCTN1* exprimierenden Tieren beobachtet werden konnte. Im Gegenteil, die Fliegen zeigten tendenziell einen Anstieg in ihrer Lokomotor-Aktivität im Alter, jedoch ist nur in den Kontrollen ein signifikanter Aktivitätsanstieg feststellbar. Verschiedene Studien beschreiben einen Rückgang der motorischen Fähigkeiten im Alter bei induzierter Lokomotor-Aktivität wie zum Beispiel der Negativen-Geotaxis (Le Bourg 1987; Fernandez *et al.*

1999; Martin *et al.* 1999; Gargano *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu wurde in nicht induzierten Aktivitätstest wie z.B. der Messung der *walking activity* ein Anstieg der Aktivität im Alter nachgewiesen (Fernandez *et al.* 1999; White *et al.* 2010). Dieses Phänomen wurde auch in Vertebraten beobachtet (Wax & Goodrick 1978; Martin *et al.* 1986). Dies zeigt, dass die induzierte Motorik von anderen neuronalen Netzwerken reguliert wird als das freie Laufen. Da in meinen Tests in den Kontrollen eine bedeutend stärkere Aktivitätszunahme im Alter zu verzeichnen ist als in den *DCTN1*-Überexpressionen, wird vermutlich durch die *DCTN1*-Überexpression in den Motoneuronen die Motorik im Alter generell beeinträchtigt. Erstaunlicherweise waren aber große Unterschiede bei der Lokomotor-Aktivität in jungen Tieren zu beobachten. Während die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins keinen Einfluss auf das Aktivitätsprofil der Fliegen hatte, führte die Überexpression der mutanten Formen R148W, I196V und R1049Q zu einer stark reduzierten Aktivität. G59S-Tiere sind hingegen im Vergleich zu hWT exprimierenden Tieren tendenziell hyperaktiv. Die *DCTN1*-Variante D63Y zeigte keinen Einfluss auf das Lokomotorverhalten der Fliegen. Diese Unterschiede konnten jedoch nicht bei jungen Tieren im Negativen–Geotaxis–Test beobachtet werden. Dies weist wiederum auf eine Regulierung der verschiedenen Lokomotor-Verhaltensweisen über unterschiedliche neuronale Schaltkreise hin. Da jedoch die zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen nicht bekannt sind, ist eine Interpretation der Daten schwierig. Dennoch sollten die Mutationen, die zu einem stark veränderten lokomotorischen Verhalten führen, in weiteren Tests wie zum Beispiel der Messung der so genannten *walking activity* genauer untersucht werden. Vorversuche haben bereits gezeigt, dass die Überexpression von G59S auch hier einen Anstieg der Laufaktivität verursacht (Daten nicht gezeigt). Insbesondere ist es wichtig, auch die anderen *DCTN1*-Varianten vor allem die Mutation E34Q zu überprüfen. Dies würde es ermöglichen den Einfluss der *DCTN1*-Varianten auf das Bewegungsverhalten insgesamt besser einordnen zu können.

Der fortschreitende Verlust der motorischen Fähigkeiten der Patienten geht mit dem Absterben von Motoneuronen in der Medulla und im Vorderhorn einher. Insbesondere wurde ein schwerer Verlust der Axone diagnostiziert (Puls *et al.* 2005). Da es sich bei dem Verlust der Motoneurone um ein wesentliches Kennzeichen der

Erkrankung handelt, wurden auch alle etablierten dHMN7B-Tiermodelle auf Neurodegeneration überprüft.

1.4 Die Überexpression von *DCTN1* verursacht eine schwache Neurodegeneration

Zellkulturstudien und Untersuchungen anhand von Tiermodellen führten zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der möglichen degenerativen Effekte der mutanten p150^{Glued}-Form G59S. Während Levy *et al.* (2006) in mit *DCTN1*-G59S transfizierten murinen Motoneuronen (MN1-Zellen) eine erhöhte Zelltodrate feststellten, konnten in einer anderen Studie keinerlei Anzeichen einer vermehrten Apoptose in transfizierten primären Motoneuronen nachgewiesen werden (Stockmann *et al.* 2012).

In dieser Arbeit resultierte die Expression des humanen p150^{Glued} (wildtypisch und p150^{Glued}-G59S) in den dopaminergen Neuronen der Fruchtfliegen in einem schwachen altersabhängigen Verlust der Zellen. Dabei konnte aber kein verstärkter Zellverlust in G59S exprimierenden Tieren nachgewiesen werden. In allen bisher durchgeführten Arbeiten wurde jedoch ausschließlich der erhöhte Verlust von Motoneuronen beschrieben (Chevalier-Larsen & Holzbaur 2006; Lai *et al.* 2007; Laird *et al.* 2008). Auch in Zellkultur führte die Expression von G59S zwar in motoneuronalen Zellen zu erhöhtem Zelltod jedoch nicht in den nicht-neuronalen COS7-Zellen (Levy *et al.* 2006). Dies legt nahe, dass vor allem Motoneurone anfällig sind für den degenerativen Effekt von G59S. Aus diesem Grund wurde *DCTN1* spezifisch in Motoneuronen exprimiert. Auch hier führte die Überexpression der humanen Konstrukte zu einem Zellverlust. Es war wiederum keine erhöhte Degeneration in G59S exprimierenden Zellen feststellbar. Weiterführende Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Überexpression des humanen wildtypischen Konstruktts die Entwicklung der Neurone beeinflusst und zu einer veränderten Morphologie der Zellen und vor allem der Axone führt (Schilling 2011). Dies macht es zum einen schwierig die einzelnen Neurone eindeutig zu identifizieren, zum anderen besteht die Gefahr, dass die Überexpression des wildtypischen Konstruktts die Zellen schon während der Entwicklung schädigt. Ein solcher Effekt könnte ebenfalls zu einem früheren Absterben der Zellen führen und würde eine von G59S

verursachte Degeneration möglicherweise maskieren. Um einen entwicklungsbiologischen Effekt ausschließen zu können, wurde in einem weiteren Ansatz die Expression über das temperatursensitive Tubulin^{ts}-Gal80-System erst in den adulten Tieren angeschaltet. Dies führt ebenfalls nur zu einem schwachen degenerativen Effekt und zeigt keinen verstärkten Zellverlust in G59S exprimierenden Tieren.

In den bekannten Mausmodellen resultiert die Mutation G59S vor allem in einem Absterben der Axone und einer veränderten Morphologie der Synapsen. So konnten Chevalier-Larsen *et al.* (2008) in transgenen G59S-Mäusen keinen Verlust von Motoneuronen nachweisen, jedoch zeigen die Tiere geschädigte und fragmentierte NMJs (*neuro muscular junctions*). Auch im Fliegenmodell führt die zu G59S korrespondierende Mutation G38S zu Veränderungen der Morphologie der NMJs. Die Anzahl der larvalen Boutons ist reduziert und der letzte Bouton hat ein erhöhtes Volumen. Elektrophysiologische Tests zeigten ein reduziertes exitatorisches Übergangspotential (EJP), ein Hinweis auf eine reduzierte Transmitterausschüttung (Lloyd *et al.* 2012). Bereits im Jahr 2002 konnte nachgewiesen werden, dass Dynaktin wichtig ist für die Erhaltung der Stabilität der Synapsen (Eaton *et al.* 2002). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem von G59S ausgelösten neuronalen Zellverlust um eine distale Axonopathie handeln könnte. Das heißt, die Degeneration beginnt an der Synapse und führt im Alter zu einem fortschreitenden Abbau der Zelle von der Peripherie in Richtung des Zellkörpers. Dies wäre mit den angewandten Untersuchungsmethoden nur schwer nachweisbar. Eine verstärkte Axonopathie in transgenen G59S-Tieren kann also nicht ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins schwere Störungen im axonalen Transport verursacht. Es ist bereits bekannt, dass Probleme beim axonalen Transport im Verlust von Motoneuronen resultieren können (LaMonte *et al.* 2002; Hafezparast *et al.* 2003; Holzbaur 2009). Möglicherweise führen die Beeinträchtigungen im Transport zu einem altersabhängigen neuronalen Zellverlust in hWT exprimierenden Fliegen. Der beobachtete Zellverlust ist also möglicherweise in den beiden Genotypen auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen. Wenn man bedenkt, dass es sich bei dHMN7B um eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung handelt,

ist außerdem vorstellbar, dass die Fliegen nicht alt genug werden, um eine von G59S ausgelöste Neurodegeneration nachweisen zu können.

Eines der typischen Kennzeichen neurodegenerativer Erkrankungen sind Proteineinschlüsse in den betreffenden Neuronen. Die Amyloid-Plaques bei Morbus Alzheimer und die Lewy-Körperchen, ein pathophysiologisches Merkmal der Parkinsonschen Krankheit, zählen dabei zu den bekanntesten Beispielen solcher abnormalen Aggregate in den Zellen. Die Bildung dieser Aggregate wird als eine mögliche Ursache für die Degeneration der Nervenzellen diskutiert. Auch im Zusammenhang mit der von G59S verursachten Form der Distalen Hereditären Motoneuropathie wurden solche Proteininklusionen in den Motoneuronen beschrieben (Puls *et al.* 2005).

1.5 *DCTN1*-Überexpression führt zur Aggregatbildung und verändert die zelluläre p150^{Glued}-Verteilung

1.5.1 P150^{Glued}-Aggregation in *Drosophila*

In Autopsiestudien wurde sowohl Dynein als auch Dynaktin in den zytoplasmatischen Aggregaten des Patientengewebes nachgewiesen. Darüber hinaus konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die gewebsspezifische Expression von p150^{Glued}-G59S Aggregatbildung in Motoneuronen induziert (Laird *et al.* 2008). Es wird angenommen, dass p150^{Glued}-G59S aufgrund der von der Mutation verursachten Faltungsprobleme instabiler ist und anfälliger zu aggregieren (Levy *et al.* 2006; Lai *et al.* 2007). Auch in unserem *Drosophila*-Modell führt die Mutation G59S nach gewebespezifischer Überexpression zur Aggregatbildung. Dies scheint jedoch nicht zellspezifisch zu sein, da p150^{Glued}-Aggregate nicht nur in Motoneuronen sondern auch nach spezifischer Expression im Muskel nachgewiesen werden konnte. Lloyd *et al.* (2012) konnten zeigen, dass die Aggregatbildung abhängig vom Expressionslevel ist, da nur in stark exprimierenden Linien p150^{Glued}-Aggregate nachweisbar waren. Auch in heterozygoten G59S *knock-in* Mäusen konnten keine Aggregate identifiziert werden (Lai *et al.* 2007). Da p150^{Glued}-G59S instabiler ist und schneller degradiert wird, scheint erst eine hohe Konzentration des mutanten Proteins Aggregatbildungen auszulösen.

Zellkulturstudien zeigten, dass auch die Mutationen D63Y und E34Q zu p150^{Glued}-Aggregation führen. Wohingegen allen anderen hier getesteten *DCTN1*-Varianten weder in COS7-Zellen noch in primären Motoneuronen Aggregate bildeten (Stockmann *et al.* 2012). Auch in meinen Studien zeigten die *DCTN1*-Varianten R148W, R149Q, M571T, Y878C, R1049Q und T1249I keine Aggregatbildung. Bezuglich der Mutationen E34Q und D63Y konnten wir jedoch nur für die Mutation D63Y vereinzelt Aggregate nachweisen. Allerdings zeigten die Zellkulturstudien auch, dass die Aggregatbildung vor allem bei der Mutation E34Q zeitabhängig ist, 48h nach der Transfektion wurde eine bedeutend stärkere Aggregatbildung beobachtet als sechs Stunden nach der Transfektion. In dieser Arbeit wurden nur sehr junge Fliegen (fünf Tage alt) untersucht. Um eine möglicherweise erst später auftretende p150^{Glued}-Aggregatbildung feststellen zu können, sollten zusätzlich ältere Fliegen untersucht werden. Wie bereits erwähnt, scheint die Neigung zur Aggregatbildung nicht nur von der Mutation, sondern auch von der Höhe der Proteinmenge abhängig zu sein. Vorstellbar wäre demnach auch, dass bei diesen Mutationen erst bei einer höheren Expression zelluläre Einschlüsse entstehen. Untersuchungen von stärker exprimierenden Linien bzw. nach erhöhter Überexpression dieser *DCTN1*-Varianten (Fliegen bei 29°C gealtert) zeigten jedoch ebenfalls keine verstärkte Aggregation (Daten nicht gezeigt). Die Bildung der Proteinakkumulationen in den Zellen scheint demnach bei diesen *DCTN1*-Varianten unabhängig von der Expressionsstärke zu sein, obgleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei einer noch stärkeren Expression Aggregate auftreten könnten. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass die Perry-Syndrom auslösenden Mutationen ebenfalls nur eine geringe Proteinaggregation verursachen (Lloyd *et al.* 2012). Dies ist insbesondere beachtenswert, da sie ebenfalls in der Cap-Gly-Domäne liegen so wie G59S, E34Q und D63Y. Die Perry-Syndrom auslösenden Mutationen befinden sich jedoch in bzw. in der Nähe des GKNDG-Motivs an der Oberfläche der Domäne, während G59S im Inneren lokalisiert ist (Abbildung 36, S.101). Es wird vermutet, dass aus diesem Grund die Beeinträchtigung der Proteinkonformation bei G59S größer ist als bei den Mutationen des Perry-Syndroms (Honnappa *et al.* 2006). Betrachtet man die Lage der Mutationen E34Q und D63Y ist festzustellen, dass auch diese Mutationen eher an der Oberfläche der Domäne liegen. Möglicherweise zeigen diese Mutationen aus diesem Grund ebenfalls nur eine

geringe Neigung zur Aggregatbildung. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Art der Aminosäureaustausche dieser Mutationen *per se* kaum einen Einfluss auf die Konformation des Proteins hat und deshalb nur zu geringer Aggregatbildung führt. Die Expression der Mutation I196V führte in Zellkultur zu verdickten Filamenten. In dieser Arbeit konnte keine veränderte Morphologie der Filamente gezeigt werden. Allerdings führte zumindest die Überexpression im Muskel vereinzelt zu kleinen p150^{Glued}-Ansammlungen.

1.5.2 G59S und E34Q beeinträchtigen die Assoziation von p150^{Glued} mit den Mikrotubuli

In histologischen Untersuchungen konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass G59S nicht nur zur Aggregatbildung führt, sondern auch die zelluläre Verteilung des Proteins verändert. In dieser Arbeit zeigte die muskelspezifische Expression eine filamentähnliche Anordnung des wildtypischen Proteins. Die Untersuchungen der larvalen Segmentalnerven ergaben zudem eine starke Assoziation des humanen wildtypischen Proteins mit den Mikrotubuli in den Axonen. P150^{Glued}-G59S ist hingegen diffus in den Axonen des Segmentalnervs verteilt, von den Mikrotubuli dissoziiert und wird in Aggregate rekrutiert. Frühere *in-vivo-* und *in-vitro*-Studien zeigten bereits, dass das in der Mikrotubulibindedomäne lokalisierte Cap-Gly-Motiv wichtig ist für die Bindungsfähigkeit von Dynaktin an die Mikrotubuli (Riehemann & Sorg 1993; Waterman-Storer *et al.* 1995; Vaughan *et al.* 2002). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die in dieser Domäne liegende dHMN7B auslösende Mutation G59S zu einer verringerten Mikrotubulibinddefähigkeit führt. Es wird vermutet, dass die in der Mikrotubulibindedomäne lokalisierte Mutation die Konformation des Proteins verändert und somit auch die Mikrotubulibindung beeinträchtigt (Levy *et al.* 2006). Auch in Zellkultur wurde beobachtet, dass das wildtypische Protein in filamentären Strukturen entlang des Mikrotubulinnetzwerks der Zelle angeordnet ist, wohingegen die verminderte Bindefähigkeit von p150^{Glued}-G59S zur Dissoziation des Proteins von den Mikrotubuli und einer diffuseren Verteilung des Proteins im Zellkörper führt (Levy *et al.* 2006; Stockmann *et al.* 2012). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass allein die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins in *Drosophila* zu einer veränderten zellulären Verteilung führt. Deshalb wäre es wichtig, auch die Verteilung des endogenen

Homologs Glued zu untersuchen. Insbesondere wäre dabei interessant, welche Auswirkungen eine Überexpression von Glued auf die zelluläre Verteilung des Proteins hat.

Von den hier untersuchten neuen potentiellen Mutationen sind nur E34Q und D63Y so wie G59S in der Cap-Gly-Domäne von p150^{Glued} lokalisiert (Abbildung 37, S.121). Tatsächlich konnte in Mikrotubuli-*binding-assays* eine reduzierte Mikrotubuliaffinität der p150^{Glued}-Form D63Y nachgewiesen werden. Zudem zeigten histologische Untersuchungen eine geringere Assoziation von p150^{Glued}-D63Y und P150^{Glued}-E34Q mit dem Mikrotubulinnetzwerk der Zellen (Stockmann *et al.* 2012). Wir konnten im Falle der Mutation E34Q zumindest in den Segementalnerven ebenfalls eine verminderte Assoziation des Proteins mit den Filamenten beobachten. Dies würde darauf hin deuten, dass die Mutation E34Q ähnlich wie G59S die biochemischen Eigenschaften der Cap-Gly-Domäne beeinflusst und zu einer geringeren Mikrotubuliaffinität von p150^{Glued} führt. In unseren Untersuchungen konnten wir jedoch keine Dissoziation des Proteins von den Mikrotubuli bei Überexpression der *DCTN1*-Variante D63Y nachweisen.

Stockmann *et al.* (2012) wiesen außerdem ein amorphes Verteilungsmuster von p150^{Glued}-R1049Q in feinen filamentären Strukturen um den Zellkern nach. Die p150^{Glued}-Färbung nach Expression im Muskel zeigt auch in *Drosophila* ein verändertes Muster verglichen mit der Überexpression des wildtypischen Proteins. Die Überexpression dieser *DCTN1*-Variante in Motoneuronen zeigte jedoch die gleiche Verteilung des Proteins wie bei der Überexpression des humanen wildtypischen *DCTN1*. Es ist völlig unklar, warum der am C-Terminus in der Arp1-Bindedomäne des Proteins liegende Aminosäureaustausch die zelluläre Verteilung von Dynaktin beeinträchtigt. Möglicherweise handelt es sich hier um einen indirekten Effekt. Vorstellbar wäre zum Beispiel, dass die Mutation die Bindung an das Arp1-Filament des Proteinkomplexes Dynaktin beeinträchtigt. Dies könnte wiederum die Bildung oder den Erhalt des Komplexes stören und somit auch seine zelluläre Verteilung verändern.

Die Überexpression der Mutationen R148W, R149Q, I196V, M571T, Y878C und T1249I führen weder in *Drosophila* noch in Zellkultur zu einer abnormalen p150^{Glued}-Verteilung im Zytoplasma beziehungsweise Axoplasma der Zellen. Diese

Sequenzvarianten liegen alle außerhalb der Mikrotubulibindedomäne. So ist es auch nicht überraschend, dass sie keine veränderte, abnormale zelluläre p150^{Glued}-Verteilung verursachen und die Mikrotubulibindefunktion des Proteins erhalten bleibt.

Die unterschiedliche p150^{Glued}-Verteilung nach Überexpression der verschiedenen *DCTN1*-Verteilung ist über die Aggregatbildung hinausgehend auch deshalb interessant, da dies möglicherweise auch die Funktionalität des Dynaktinkomplexes beim axonalen Transport beeinträchtigt.

1.6 *DCTN1*-Überexpression beeinträchtigt den axonalen Transport

Das wichtigste Motorprotein des retrograden Transports ist zytoplasmatisches Dynein. Es ist bekannt, dass zytoplasmatisches Dynein auch ohne seinen Interaktionspartner Dynaktin entlang der Mikrotubuli gleiten kann, dennoch benötigt es für viele seiner Funktionen den Proteinkomplex Dynaktin. Es wird unter anderem angenommen, dass Dynaktin wichtig ist für die Regulierung der Prozessivität des Motors Dynein (Gill *et al.* 1991; Waterman-Storer *et al.* 1997; King & Schroer 2000; Haghnia *et al.* 2007). Die genauen Mechanismen der Interaktion von Dynein und Dynaktin sowie die Aufgaben des Multiproteinkomplexes und seiner einzelnen Untereinheiten innerhalb der Dynein/Dynaktin-Interaktion sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt. Unbestritten ist jedoch die Bedeutung des Proteinkomplexes für den koordinierten axonalen Transport. Die Funktion der Untereinheit p150^{Glued} im axonalen Transport ist allerdings Gegenstand kontroverser Diskussionen.

So wie in den Untersuchungen der entwicklungsbiologischen Effekte, zeigen auch alle Experimente zum axonalen Transport starke Defekte nach Überexpression des humanen wildtypischen Proteins. Eine motoneuronspezifische Expression von hWT führt zu abnormalen Mitochondrien- und Vesikelansammlungen in den Segmentalnerven, sowie zu einer veränderten p150^{Glued}-Verteilung und in Konsequenz dessen zu einer distalen Paralyse. Die beobachteten Effekte kopieren Phänotypen, die beispielsweise auch nach Schädigung der Motorproteine beobachtet wurden. So zeigen Kinesin- und Dyneinmutanten ebenfalls eine posteriore

Muskellähmung und axonale Verdickungen mit Organellenansammlungen (Hurd & Saxton 1996; Martin *et al.* 1999). Dies weist darauf hin, dass die hier beobachteten Effekte einer Überexpression des wildtypischen Proteins tatsächlich auf Beeinträchtigungen des axonalen Transports zurückzuführen sind. Interessanterweise zeigen auch Larven in denen die Integrität des Dynaktinkomplexes gestört ist die oben beschriebenen Phänotypen. So zu sehen zum Beispiel nach Überexpression des dominant-negativen Gl¹ oder in Arp1-Mutanten (Martin *et al.* 1999; Haghnia *et al.* 2007). Diese Studien zeigten bereits, dass die Funktion des Dynaktinkomplexes absolut notwendig ist für einen koordinierten retrograden als auch anterograden Transport. Es ist anzunehmen, dass, wie bereits zuvor erwähnt, die Überexpression des humanen wildtypischen Proteins die Integrität des Dynaktinkomplexes beeinträchtigt und folglich zu schweren Beeinträchtigungen des axonalen Transports führt. Zusätzlich zu den histologischen Untersuchungen erfolgte die Analyse des axonalen Transports in *DCTN1* exprimierenden Tieren auch über *in-vivo*-Messungen der axonalen Transportgeschwindigkeit der Mitochondrien in larvalen Segmentalnerven. Vorversuche ergaben für die Messung der Kontrollen ähnliche Werte, wie die bereits veröffentlichten Messungen von Pilling *et al.* (2006). Es kann also davon ausgegangen werden, dass es gelungen ist eine verlässliche Methode zur *in-vivo*-Untersuchung des axonalen Transports zu entwickeln. Dabei konnte erneut gezeigt werden, dass die Überexpression des wildtypischen p150^{Glued} den axonalen Transport beeinträchtigt. Die Analysen zeigten, dass vor allem im retrograden Transport die Überexpression des wildtypischen Proteins zu einem tendenziell verlangsamten Mitochondrientransport führt. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass in hWT-Larven weniger mobile Mitochondrien beobachtet werden können, also scheinbar weniger Mitochondrien transportiert werden als in den Kontrollen.

Im Gegensatz zur Überexpression des wildtypischen humanen p150^{Glued} konnten in den Untersuchungen der Überexpression der mutanten *DCTN1*-Version G59S nur sehr geringe Beeinträchtigung des axonalen Transports beobachtet werden. G59S-Tiere zeigen nur sehr wenige Organellenstaus, nur milde Paralyse und keine Veränderung der retrograden und anterograden Transportgeschwindigkeit der Mitochondrien. Lediglich die Anzahl der Transportereignisse war im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Auch wenn man voraussetzt, dass p150^{Glued}-G59S die Integrität des Dynaktinkomplexes nicht beeinträchtigt (Levy *et al.* 2006), scheint es dennoch

zunächst erstaunlich, dass die Mutation G59S kaum Auswirkungen auf die Funktionalität des axonalen Transports hat. Schließlich hemmt die in der Cap-Gly-Domäne lokalisierte Mutation G59S die Mikrotubulibindung von p150^{Glued} und es wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass gerade diese Fähigkeit, an die Mikrotubuli binden zu können, entscheidend ist für die Dyneinbewegung entlang der Mikrotubuli. Allerdings hatte die Deletion des N-Terminus in S2-Zellen keinen Einfluss auf den intrazellulären Transport. In primären Maus-Motoneuronzellkulturen konnte der durch p150^{Glued} *knock-down* ausgelöste Transportdefekt über die Expression einer mutierten Form von p150^{Glued} mit Deletion der Cap-Gly-Domäne (p150^{Glued ΔCap-Gly}) gerettet werden. Die Expression von p150^{Glued ΔCap-Gly} verursachte keine Beeinträchtigung des axonalen Transports selbst, jedoch war die Initiation des Transports gehemmt. Ähnliches beschreibt auch Lloyd *et al.* (2012) in *Drosophila melanogaster*. Die in der Cap-Gly-Domäne liegende Mutation G38S führt zwar zu einem partiellen Funktionsverlust des Proteins und zu einer Hemmung der Transportinitiation, zeigt aber keinen Einfluss auf den axonalen Transport selbst. Auch meine Ergebnisse bestätigen, dass die Mikrotubulibinfähigkeit der Cap-Gly-Domäne nicht der ausschlaggebende Faktor im axonalen Transport zu sein scheint. Obgleich zumindest milde Störungen nachgewiesen wurden. Die reduzierte Anzahl der Transportereignisse im retrograden Transport könnte auf eine gehemmte Initiation des Transports bei Überexpression von G59S zurückzuführen sein. Dies sollte zum Beispiel über histologische Untersuchungen der NMJs in weiterführenden Experimenten überprüft werden.

Andererseits konnte gezeigt werden, dass p150^{Glued}-G59S zwar in den Dynaktinkomplex eingebaut wird und dessen Integrität nicht stört, aber zu einer reduzierten Bindung an das Motorprotein Dynein führt. Es wird angenommen, dass die von G59S ausgelöste Konformationsänderung der Cap-Gly-Domäne auch Auswirkungen auf die weiter entfernt im Protein lokalisierte Dyneinbindedomäne hat (Moughamian & Holzbaur 2012). Möglicherweise sind also die beobachteten Beeinträchtigungen im axonalen Transport in G59S exprimierenden Tiere auf eine schlechtere Bindung des Dynaktinkomplexes an das Motorprotein Dynein zurückzuführen. Dennoch kann, ähnlich wie bei den Entwicklungsdefekten der *DCTN1*-Überexpression, nicht ausgeschlossen werden, dass die schwächeren Phänotypen in G59S-Tieren auf einen dosisabhängigen Effekt zurückzuführen sind.

Möglicherweise wird aufgrund der Aggregatbildung weniger p150^{Glued}-G59S in den Dynaktinkomplex eingebaut als bei der Überexpression des wildtypischen Proteins. Es konnte schon gezeigt werden, dass eine Überexpression von Gl¹ wesentlich stärkere Phänotypen verursacht als in der heterozygoten Gl¹-Mutante zu beobachten sind. Anscheinend sind 50% des wildtypischen Proteins ausreichend, um einen koordinierten axonalen Transport in der Zelle aufrechterhalten zu können.

Trotzdem wurde in heterozygoten Gl¹-Larven eine erhöhte Geschwindigkeit des Mitochondrientransports festgestellt. Dies führte zu der Annahme, dass das wildtypische Protein die Geschwindigkeit des Motors Dynein bremst (Pilling *et al.* 2006). Andererseits ist bekannt, dass Dynaktin über die Untereinheit p150^{Glued} auch die Prozessivität von Dynein erhöht. Dass heißt, die Einzelstrecken, die der Dynein/Dynaktinkomplex zurücklegt, bevor er von den Mikrotubuli abfällt, sind länger. Außerdem konnten Culver-Hanton *et al.* (2006) zeigen, dass p150^{Glued} auch ohne molekularen Motor an den Mikrotubuli entlang gleiten kann. Möglicherweise führt die Überexpression des wildtypischen p150^{Glued} in den Zellen dazu, dass auch die nicht in den Dynaktinkomplex eingebunden Untereinheiten an die Mikrotubuli binden und diese dann die Wege für die Dynaktin/Dyneinkomplexe blockieren. Da die Mutation G59S aber nicht so gut an die Mikrotubuli binden kann und schneller abgebaut wird, würde wahrscheinlich die Überexpression der mutanten p150^{Glued}-Version die Transportprozesse weniger stark stören.

Insgesamt deuten die gezeigten *DCTN1*-Überexpressionsanalysen darauf hin, dass zwar die Funktion des Proteinkomplexes Dynaktin für einen reibungsfreien axonalen Transport absolut notwendig ist, aber die Funktionalität der Cap-Gly-Domäne der Untereinheit p150^{Glued} eher von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. Außerdem zeigen die vorliegenden Arbeiten, dass die *DCTN1*-Überexpression nicht nur in Larven zu Problemen beim axonalen Transport führt, da auch in adulten Tieren abnormale CSP-Akkumulationen im Kortex beobachtet werden konnten. Dies zeigt außerdem, dass nicht nur der Dynein-abhängige, retrograde Transport von einer Beeinträchtigung des Dynaktinkomplexes gestört wird, sondern dass auch Defekte beim anterograden Transport auftreten. Schon in früheren Arbeiten wurde festgestellt, dass Dynaktin wahrscheinlich nicht nur beim retrograden Transport von

Bedeutung ist. Viel mehr scheint der Multiproteinkomplex generell für einen koordinierten axonalen Transport benötigt zu werden (Martin *et al.* 1999).

In den Analysen der neu identifizierten Mutationen zeigte sich, dass vor allem die Mutation E34Q eine herausragende Stellung einnimmt. Als einzige Mutation zeigt sie ähnlich wie G59S keine oder nur milde Störungen beim axonalen Transport. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Mutation ebenfalls die Bildung und Integrität des Dynaktinkomplexes nicht stört und somit den Transport nicht beeinflusst. Dies ist auch konsistent mit den Untersuchungen der *DCTN1*-Überexpression während der Entwicklung. Interessanterweise zeigt E34Q noch weniger Beeinträchtigung des axonalen Transports als G59S. Dies könnte in der etwas geringeren Expression der getesteten Linien begründet sein. Es wäre aber auch vorstellbar, dass E34Q, obwohl es in derselben Domäne wie G59S liegt und in allen bisher untersuchten Parametern ähnliche Effekt hervorruft, dennoch zu anderen biochemischen Veränderungen der Untereinheit p150^{Glued} führt. Deshalb wäre es interessant unter anderem die Mikrotubulinbindefähigkeit von p150^{Glued}-E34Q und dessen Bindung an das Motorprotein Dynein genauer zu untersuchen. Außerdem sollte untersucht werden, ob E34Q so wie G59S die Initiation des retrograden Transports stört. Die Überexpression aller anderen getesteten Mutationen verhielt sich weitestgehend wie die des humanen wildtypischen Proteins.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein verlässliches *Drosophila*-Modell für ALS-assoziierte Motoneuronerkrankungen zu etablieren. Dieses auf Überexpressionsanalysen basierende Modell ermöglicht es funktionelle Auswirkungen von Mutationen im ALS-Risikogen *DCTN1* zu untersuchen. So konnten motoneuronspezifische Störungen, wie zum Beispiel Defizite der Motorik und Aktivität im Tiermodell ausgelöst werden. Darüber hinaus konnten wesentliche Funktionen des Risikogens untersucht werden. Es hat sich gezeigt, dass die Überexpression sowohl die Entwicklung als auch den axonalen Transport beeinflusst. Darüber hinaus zeigt auch das *Drosophila*-Modell wesentliche pathogene Merkmale der Erkrankung wie Aggregation des mutanten Proteins und Neurodegeneration. Diese Eigenschaften ermöglichen es zudem, das *Drosophila*-Modell als verlässliches Evaluierungssystem für neu entdeckte Mutationen im Menschen zu nutzen.

2 Charakterisierung der neu identifizierten *DCTN1*-Sequenzvarianten

Anhand von Überexpressionsanalysen wurden die verschiedenen *DCTN1*-Varianten bezüglich ihrer entwicklungsbiologischen Effekte, motoneuronspezifischen Eigenschaften und ihren Einfluss auf den axonalen Transport klassifiziert. Dabei wurde auch die Überexpression der wildtypischen Konstrukte miteinbezogen und als Positivkontrolle die Überexpression von G59S mitgeführt. Mutationen die ähnliche phänotypische Effekte zeigen wie G59S können als potentielle Risikofaktoren für neurodegenerative Erkrankungen eingestuft werden, wohingegen *DCTN1*-Formen, die sich wie die Überexpression des humanen wildtypischen Konstrukts verhalten als pathogene Mutationen eher auszuschließen sind.

2.1 Die stillen Mutationen: R149Q, M571T, Y878C und T1249I

Die Analysen zeigten, dass die Überexpression der *DCTN1*-Varianten R149Q, M571T, Y878C und T1249I in nahezu keinem der untersuchten Parameter sich in ihren Effekten von der Überexpression des humanen wildtypischen Konstrukts unterscheiden (Abbildung 37, S.121). Auch in Zellkultur konnte für keine der genannten *DCTN1*-Varianten abweichende Effekte im Vergleich zum wildtypischen Protein festgestellt werden (Stockmann *et al.* 2012). Genetische Studien erbrachten darüber hinaus keinerlei Beweis für eine Kosegregation der Mutationen (Vilarino-Guell *et al.* 2009; Stockmann *et al.* 2012). Betrachtet man die genannten Daten im Ganzen, kann davon angenommen werden, dass diese *DCTN1*-Formen keine ALS verursachenden Mutationen oder MND-Risikofaktoren sind. Es scheint sich hier eher um stille Mutationen beziehungsweise benigne Polymorphismen zu handeln.

2.2 Die potentiell pathogenen Kandidaten: D63Y, R148W, I196V und R1049Q

Die Überexpression der *DCTN1*-Varianten D63Y, R148W, I196V und R1049Q resultierte nur in wenigen von der Überexpression des wildtypischen Proteins

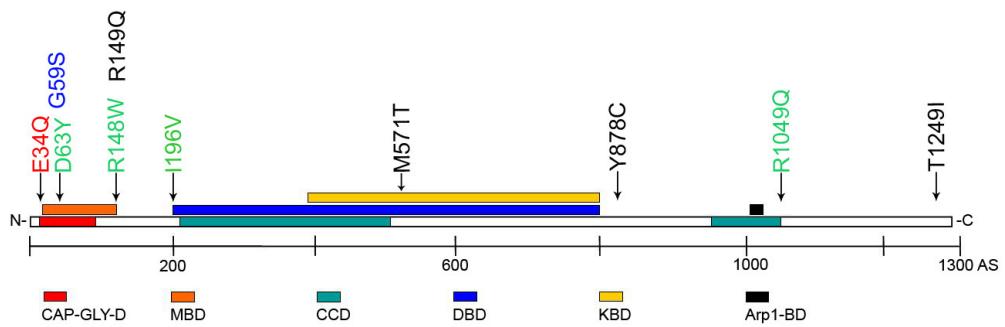
abweichenden Phänotypen (Abbildung 37, S.121). So zeigen sowohl die Überexpression in der Entwicklung als auch die Untersuchungen zum axonalen Transport dasselbe Verhalten wie wildtypisches p150^{Glued}. Die muskelspezifische *DCTN1*-Expression der Mutationen D63Y, I196V und R1049Q führte zumindest zu einer teilweise veränderten zellulären p150^{Glued}-Verteilung. Beachtenswert ist jedoch, dass diese Mutationen dennoch alle zu Beeinträchtigungen der motorischen Fähigkeiten führen. So resultiert die Überexpression der beiden *DCTN1*-Varianten D63Y und I196V so wie bei G59S in einer altersabhängigen Verschlechterung der Kletterfähigkeiten der Fliegen. Die motoneuronspezifische Expression von I196V zeigte zudem eine stark reduzierte Lokomotoraktivität der Fliegen. Auch R148W und R1049Q führen wie die Überexpression von I196V zu einem dramatischen Rückgang der Lokomotoraktivität. Diese Mutationen wurden entweder nur sehr selten (D63Y, R148W) oder auch in Kontrollen (I196V, R1049Q) gefunden (Stockmann *et al.* 2012, persönliche Mitteilung Prof. A.C. Ludolph).

Es ist aus den dargestellten Gründen eher unwahrscheinlich, dass diese *DCTN1*-Varianten *per se* pathogene Mutationen sind. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier um Risikofaktoren für neurodegenerative Erkrankungen handelt. Es ist bekannt, dass die verschiedenen Formen der Motoneuronerkrankungen nur selten auf eine rein monogenetische pathogene Ursache zurückzuführen sind. Vielmehr wird angenommen, dass erst ein Zusammentreffen von genetischen Risikofaktoren und äußeren Stressauslösern zum Ausbruch der Erkrankung führt (Shaw 2005; Pratt *et al.* 2012). Deshalb ist es vorstellbar, dass diese Mutationen die Prädisposition für ALS erhöhen und erst in Koinzidenz mit weiteren Stressfaktoren pathogen sind. Die genannten Mutationen könnten darüber hinaus Teil eines polygenetischen Erbgangs sein. Aus diesem Grund sollten die Auswirkungen dieser Mutationen in Interaktion mit anderen bekannten pathogenen Faktoren untersucht werden. Vielversprechende Kandidaten wären dafür z.B. Mutationen in den ALS assoziierten Genen *FUS* und *TDP-43*. Sowie Mutationen in den Motorproteinen Dynein und Kinesin. Des Weiteren sollte der Einfluss von äußeren Stressfaktoren wie zum Beispiel oxidativer Stress untersucht werden. Es ist außerdem möglich, dass diese Mutationen Risikofaktoren für andere neurodegenerative Erkrankungen sein könnten. Das Perry-Syndrom eine atypische Parkinson-Erkrankung wird ebenfalls von in der Cap-Gly-Domäne der Untereinheit

p150^{Glued} liegenden *DCTN1*-Mutationen verursacht. Hier sind nicht die Motoneuronen sondern vorrangig das dopaminerige System betroffen (Farrer *et al.* 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die entsprechenden mutanten Proteine im Gegensatz zu p150^{Glued}-G59S kaum zur Aggregatbildung neigen (Moughamian & Holzbaur 2012). Unterschiedliche Mutationen stören also je nach Lage und Art des Aminosäureaustauschs unterschiedliche Funktionen der Untereinheit p150^{Glued} und können verschiedene neurologische Erkrankungen verursachen.

2.3 Die Mutation E34Q- ein pathogener Risikofaktor

Innerhalb der hier untersuchten Mutationen nimmt die *DCTN1*-Variante E34Q eine herausragende Sonderstellung ein. Die Überexpression dieser *DCTN1*-Variante zeigt in allen untersuchten Parametern ein von der Überexpression des humanen wildtypischen Konstrukts abweichendes Verhalten. Interessanterweise sind einige der beobachteten Phänotypen sehr ähnlich zu den, von der Überexpression der dHMN7B auslösenden Mutation G59S, verursachten Effekten. E34Q führt zu einer altersabhängigen Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten wie G59S, wenn auch erst im höheren Alter. Beide Mutationen verursachen nur milde Störungen der Entwicklung und des axonalen Transports. Zu beachten ist, dass beide Mutationen in der Mikrotubulibindedomäne liegen (Abbildung 37, S.121) und somit wahrscheinlich ähnliche Auswirkungen auf die Funktionalität der Domäne haben können. Obwohl E34Q auch in gesunden Personen nachgewiesen werden konnte, zeigen die Daten, dass es sich bei der *DCTN1*-Variante E34Q mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich um eine pathogene Mutation handeln könnte. Aus diesem Grund wäre eine weiterführende genauere Untersuchung der funktionellen Auswirkungen und pathogenen Eigenschaften dieser Mutation im Mausmodell sinnvoll.



Phänotyp UAS-Konstrukt	Entwicklungsphänotypen												
	dmWT	hWT	G59S	E34Q	D63Y	R148W	R149Q	I196V	M571T	Y878C	R1049Q	T1249I	
Entwicklungsphänotypen													
Letalität (actin-Gal4)	++	++	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Augenphänotyp (GMR-Gal4)	+	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Motorische Fähigkeiten													
Negative-Geotaxis (D42-Gal4)	-	-	++	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Lokomotor-Aktivität (D42-Gal4)	-	-	↑↑	NG	-	↓↓	NG	↓↓	NG	NG	↓↓	NG	NG
Zelluläre p150^{Glued}-Verteilung													
p150 ^{Glued} im Muskel (24B-Gal4)	NG	-	++	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Aggregate in Axonen (D42-Gal4)	NG	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dissoziation von den Mikrotubuli (D42-Gal4)	NG	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phänotypen des axonalen Transports													
CSP-Akkumulation im Kortex (D42-Gal4)	-	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Mitochondrien-Transport (D42-Gal4)	-	++	+	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++
distale Paralyse (D42-Gal4)	-	++	+	-	++	++	+	++	++	++	++	++	++
Mitochondriestaus (D42-Gal4)	-	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++
P150 ^{Glued} -Staus (D42-Gal4)	NG	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++

Abbildung 37: Charakterisierung der verschiedenen DCTN1-Varianten mittels Überexpressionsanalysen. Grafik: Schematische Darstellung der untersuchten Mutationen in der Untereinheit p150^{Glued}. CAP-GLY-D: Cap-Gly-Motiv, MBD: Mikrotubulibindedomäne, CCD: coiled-coil-Domäne, DBD: Dyneinbindedomäne, KBD: Kinesinbindedomäne, Arp1-BD: Arp1-Bindedomäne, AS: Aminosäuren. Tabelle: Zusammenfassung der DCTN1-Überexpressionsanalysen. Von der Überexpression des wildtypischen Proteins abweichendes Verhalten ist rot hinterlegt. Die Mutation E34Q (rot) verursacht ähnliche Effekte wie die Mutation G59S. Die Mutationen D63Y, R148W, I196V und R1049Q (grün) führen zu Beeinträchtigungen der motorischen Fähigkeiten und einer teilweise veränderten zellulären p150^{Glued}-Verteilung. Die Mutationen R149Q, M571T, Y878C und T1249I resultieren in den gleichen Phänotypen wie das wildtypische Protein und sind als pathogene Mutationen auszuschließen. Klassifizierung der Phänotypen: wildtypisch (-), milder Phänotyp (+), starker Phänotyp (++) NG: nicht getestet.

Kapitel V: Anhang

Anhang

1 Ergänzende Daten

1.1 Fliegenlinien

1.1.1 Neu etablierte p{w[+] UAS- DCTN1-Flag}35- Linien

Konstrukt	Linie	Kürzel	Insertion	Eigenschaften
Glued	1	dmWT/1	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	2	dmWT/2	Chromosom III	homozygot letal
	5	dmWT/5	Chromosom III	homozygot steril
	6	dm WT/6	Chromosom III	homozygot letal
	8	dmWT/8	Chromosom II	homozygot lebensfähig
D63Y	1	D63Y/1	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	3	D63Y/3	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	4	D63Y/4	Chromosom II	homozygot steril
	5	D63Y/5	Chromosom II	homozygot steril
	6	D63Y/6	Chromosom II	homozygot steril
	7	D63Y/7	Chromosom II	homozygot steril
	8	D63Y/8	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	9	D63Y/9	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	10	D63Y/10	Chromosom II	homozygot steril
	11	D63Y/11	Chromosom III	homozygot steril
	12	D63Y/12	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	13	D63Y/13	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	14	D63Y/14	Chromosom II	homozygot steril
	15	D63Y/15	Chromosom III	homozygot letal
R148W	1	R148W/1	Chromosom III	homozygot steril
	2	R148W/2	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	3	R148W/3	Chromosom III	homozygot steril
	4	R148W/4	Chromosom III	homozygot steril
	5	R148W/5	Chromosom III	homozygot steril
	6	R148W/6	Chromosom III	homozygot steril
	7	R148W/7	Chromosom III	homozygot steril
	8	R148W/8	Chromosom III	homozygot steril
	9	R148W/9	Chromosom II	homozygot letal
	10	R148W/10	Chromosom II	homozygot letal
	11	R148W/11	Chromosom II	homozygot letal
	12	R148W/12	Chromosom II	homozygot letal

R148W	13	R148W/13	Chromosom III	homozygot steril
	14	R148W/14	Chromosom II	homozygot lebensfähig
I196V	1	I196V/1	Chromosom III	homozygot steril
	2	I196V/2	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	5	I196V/5	Chromosom II	homozygot steril
	6	I196V/6	Chromosom III	homozygot steril
	8	I196V/8	Chromosom II	homozygot letal
	9	I196V/9	Chromosom II	homozygot steril
	12	I196V/12	Chromosom II	homozygot steril
	13	I196V/13	Chromosom II	homozygot steril
	1	M571T/1	Chromosom III	homozygot lebensfähig
M571T	2	M571T/2	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	3	M571T/3	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	4	M571T/4	Chromosom II	homozygot steril
	5	M571T/6	Chromosom II	homozygot steril
	6	M571T/7	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	7	M571T/8	Chromosom II	homozygot steril
	8	M571T/9	Chromosom II	homozygot steril
	9	M571T/10	Chromosom II	homozygot steril
	10	M571T/11	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	13	M571T/13	Chromosom III	homozygot lebensfähig
Y878C	1	Y878C/1	Chromosom III	homozygot steril
	2	Y878C/2	Chromosom III	homozygot steril
	3	Y878C/3	Chromosom III	homozygot steril
	4	Y878C/4	Chromosom II	homozygot letal
	5	Y878C/5	Chromosom II	homozygot letal
	6	Y878C/6	Chromosom II	homozygot steril
	7	Y878C/7	Chromosom II	homozygot letal
	8	Y878C/8	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	9	Y878C/9	Chromosom II	homozygot letal
	11	Y878C/11	Chromosom III	homozygot letal
T1249I	1	T1249I/1	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	2	T1249I/2	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	3	T1249I/3	Chromosom II	homozygot letal
	4	T1249I/4	Chromosom II	homozygot letal
	5	T1249I/5	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	6	T1249I/6	Chromosom II	homozygot lebensfähig
	7	T1249I/7	Chromosom III	homozygot letal
	8	T1249I/8	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	9	T1249I/9	Chromosom III	homozygot steril
	10	T1249I/10	Chromosom III	homozygot steril
	11	T1249I/11	Chromosom III	homozygot steril
	13	T1249I/13	Chromosom III	homozygot lebensfähig

T1249I	14	T1249I/14	Chromosom III	homozygot steril
	16	T1249I/16	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	17	T1249I/17	Chromosom III	homozygot lebensfähig
	18	T1249I/18	Chromosom III	homozygot letal

Tabelle 18: Übersicht über die etablierten p{w[+]} UAS- DCTN1-Flag}- und p{w[+]} UAS-glued}-Linien.

1.1.2 Weitere p{w[+]} UAS- DCTN1-Flag}- Linien

Linie	Herkunft	Insertion	Eigenschaften
hWT/1	Stribl 2008, neu balanciert	Chromosom II	homozygot steril
hWT/3	Stribl 2008, neu balanciert	Chromosom II	homozygot lebensfähig
hWT/4	Stribl 2008, neu balanciert	Chromosom II	homozygot lebensfähig
hWT/7	Stribl 2008, neu balanciert	Chromosom III	homozygot letal
G59S/1 ^{CS}	Stribl 2008	Chromosom II	homozygot lebensfähig
G59S/2 ^{CS}	Stribl 2008	Chromosom II	homozygot steril
G59S/3 ^{CS}	Stribl 2008	Chromosom III	homozygot letal
G59S/4 ^{CS}	Stribl 2008	Chromosom III	homozygot letal
G59S/1	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom III	homozygot steril
G59S/3	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom II	homozygot lebensfähig
G59S/4	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom II	homozygot steril
G59S/5	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom II	homozygot steril
G59S/6	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom II	homozygot letal
G59S/7	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom II	homozygot steril
G59S/8	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom III	homozygot lebensfähig
G59S/9	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom II	homozygot lebensfähig
G59S/10	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom II	homozygot lebensfähig
G59S/11	<i>Jump out</i> (G59S/2 ^{CS})	Chromosom III	homozygot letal
E34Q/1 ^{SR}	Rauenbusch 2010	Chromosom II	homozygot lebensfähig
E34Q/2 ^{SR}	Rauenbusch 2010	Chromosom X	homozygot lebensfähig
E34Q/3 ^{SR}	Rauenbusch 2010	Chromosom III	homozygot steril
E34Q/4 ^{SR}	Rauenbusch 2010	Chromosom III	homozygot steril
E34Q/6 ^{SR}	Rauenbusch 2010	Chromosom II+III	homozygot lebensfähig
E34Q/7 ^{SR}	Rauenbusch 2010	Chromosom II	homozygot lebensfähig
E34Q/1	<i>Jump out</i> (E34Q/1 ^{SR})	Chromosom II	homozygot steril
E34Q/2	<i>Jump out</i> (E34Q/1 ^{SR})	Chromosom III	homozygot steril
E34Q/3	<i>Jump out</i> (E34Q/1 ^{SR})	Chromosom III	homozygot steril
E34Q/5	<i>Jump out</i> (E34Q/1 ^{SR})	Chromosom II	homozygot steril
E34Q/6	<i>Jump out</i> (E34Q/1 ^{SR})	Chromosom II	homozygot steril
E34Q/7	<i>Jump out</i> (E34Q/1 ^{SR})	Chromosom II	homozygot steril
E34Q/8	<i>Jump out</i> (E34Q/1 ^{SR})	Chromosom II	homozygot steril
R149Q/1	Stribl 2008	Chromosom X+III	homozygot lebensfähig
R149Q/2	Stribl 2008	Chromosom X+III	homozygot lebensfähig
R149Q/3	Stribl 2008, neu balanciert	Chromosom III	homozygot lebensfähig

R149Q/4	Stribl 2008	Chromosom	X+III	homozygot letal
R1049Q/1	Rauenbusch 2010	Chromosom	II	homozygot letal
R1049Q/2	Rauenbusch 2010	Chromosom	II	homozygot lebensfähig
R1049Q/5	Rauenbusch 2010	Chromosom	II+III	homozygot lebensfähig
R1049Q/6	Rauenbusch 2010	Chromosom	III	homozygot lebensfähig

Tabelle 19: Übersicht über die weiteren p{w[+] UAS-DCTN1-Flag}-Linien.

1.2 Entwicklungsstörungen

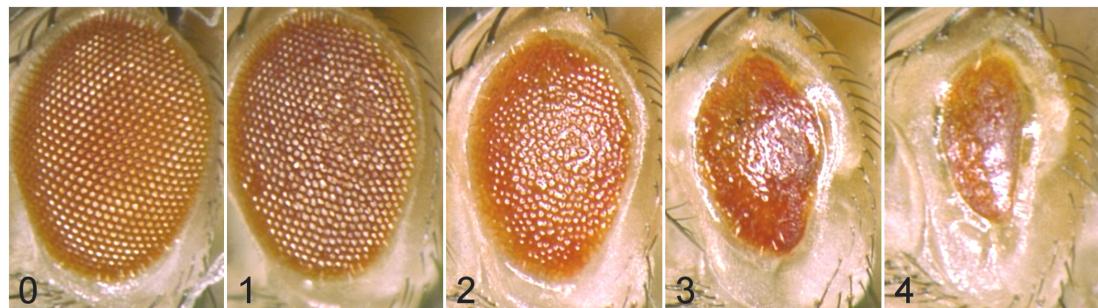


Abbildung 38: Einstufung der Augenphänotypen. Die Entwicklungsstörungen wurden in Kategorien von 1 (sehr schwacher Phänotyp) bis 4 (starke Beeinträchtigung der Retinaentwicklung) eingeteilt. Kategorie 0: wildtypisches Auge. Genotyp: w^{1118} ; GMR-Gal4; UAS-DCTN1.

Konstrukt	Linie	actin-Gal4	GMR-Gal4	Konstrukt	Linie	actin-Gal4	GMR-Gal4
hWT	1	letal	3	I196V	1	letal	2-3
	3	letal	3		2	letal	2
	4	letal	3		5	letal	NG
	7	letal	4		6	letal	3
dmWT (glued)	1	letal	2	M571T	8	letal	1
	2	letal	1		9	letal	1
	5	letal	2		12	♀ lebensfähig	1
	6	letal	2		13	letal	
	8	letal	1-2		1	letal	4
G59S	1	lebensfähig	1	Y878C	2	letal	4
	3	lebensfähig	1		3	letal	4
	4	lebensfähig	1		4	letal	4
	5	lebensfähig	1		5	letal	NG
	6	lebensfähig	1		6	letal	4
	7	lebensfähig	1		7	letal	2
	8	lebensfähig	1		8	letal	4
	9	lebensfähig	1		9	letal	4
	10	lebensfähig	1		10	letal	2-4
	11	lebensfähig	1		13	letal	4
	1	lebensfähig	1		1	letal	3-4
	2	lebensfähig	1		2	letal	NG

E34Q	3	lebensfähig	2	Y878C	3	letal	3
	5	♀ lebensfähig	1		4	letal	3-4
	6	♀ lebensfähig	2		5	letal	3
	7	♀ lebensfähig	1		6	letal	3
	8	♀ lebensfähig	1		7	letal	2
D63Y	1	lebensfähig	1		8	letal	2
	3	lebensfähig	1		9	letal	3
	4	letal	4		11	letal	1
	5	letal	3	R1049Q	1	letal	3
	6	letal	3		5	letal	3
	7	letal	4		6	letal	3
	8	♀ lebensfähig	2	T1249I	1	letal	4
	9	letal (L3)	3		2	letal	4
	10	letal	2		3	letal	3
R148W	1	letal	NG		4	letal	3-4
	3	letal	3		5	letal	3-4
	4	letal	4		6	letal	4
	5	letal	1		7	letal	1
	6	letal	1		8	letal (L3)	1
	7	letal	2		9	letal	4
	8	letal	1		10	letal	4
	9	letal	3		11	letal	2
	11	letal	2		13	letal	3
	12	letal	2		14	letal	3
	13	letal	2		16	letal (L3)	1
	14	letal	2		17	letal	2
R149Q	3	letal	3		18	letal	1
	4	letal	3				

Tabelle 20: Übersicht über Lebensfähigkeit und Stärke der Augenphänotypen der *DCTN1*-Linien. Die Lebensfähigkeit wurde mit actin-Gal4 getestet (L3: bis ins dritte Larvenstadium lebensfähig). Die augenspezifische Expression der *DCTN1*-cDNAs führte zu unterschiedlich starken Entwicklungsstörungen von 1 (sehr schwacher Phänotyp) bis 4 (starke Beeinträchtigung der Retinaentwicklung, Abbildung 38), NG: nicht getestet. Genotypen: *w¹¹¹⁸*; *actin-Gal4*; *UAS-DCTN1* und *w¹¹¹⁸*; *GMR-Gal4*; *UAS-DCTN1*.

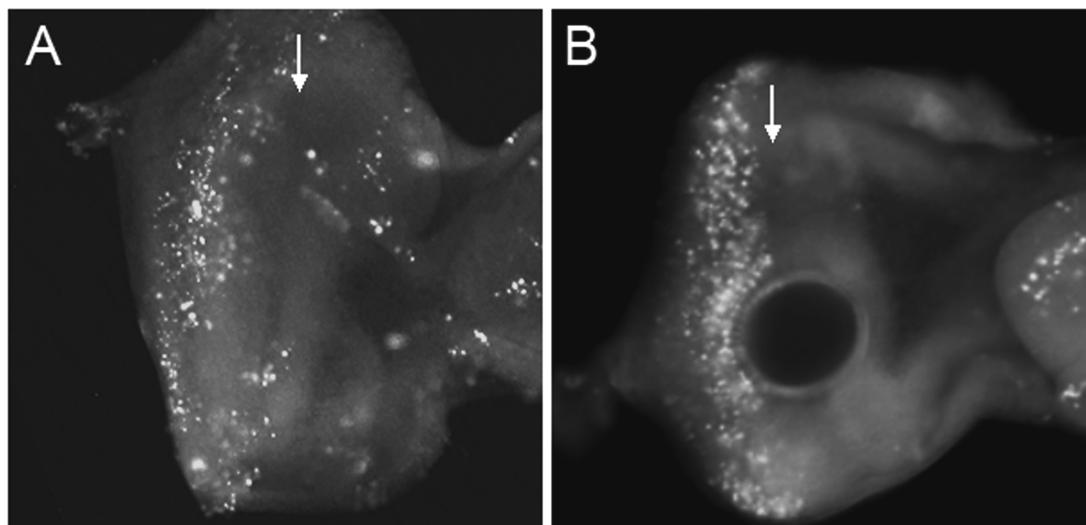


Abbildung 39: Humanes wildtypisches *DCTN1* verursacht vermehrten Zelltod in der Augenimaginalscheibe. A: Kontrolle: $w^{1118}; GMR-Gal4$, B: $w^{1118}; GMR-Gal4; UAS-hWT/4$. Die augenspezifische Expression des humanen wildtypischen p150^{Glued} führt zu stärkerer Acridinorange-Färbung posterior der morphogenetischen Furche (Pfeil). Rechte Seite: anterior.

1.3 *DCTN1* beeinträchtigt die motorischen Fähigkeiten

1.3.1 Negative-Geotaxis

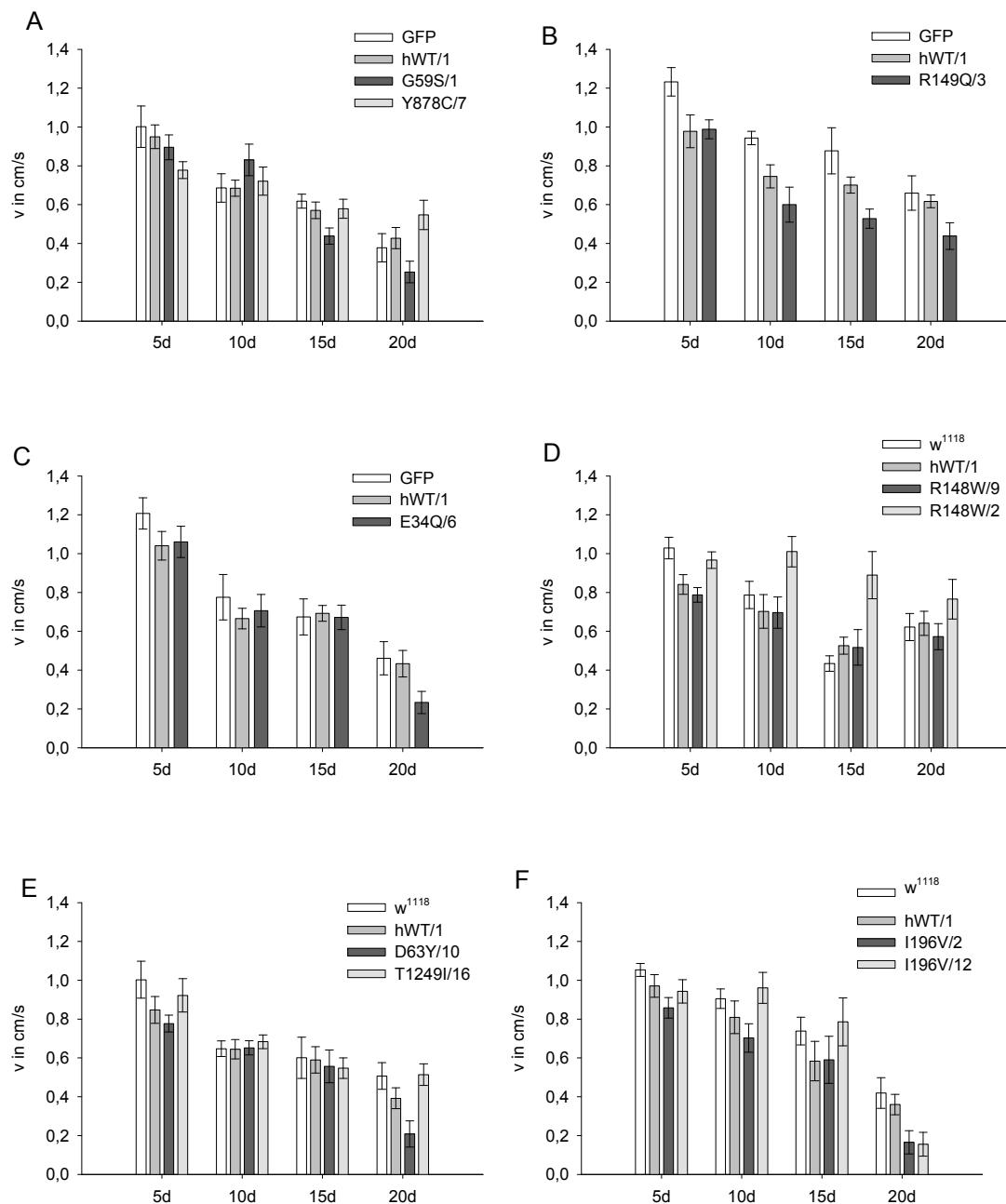


Abbildung 40: Originaldaten des Negativen-Geotaxis-Verhaltens nach motoneuronspezifischer p150^{Glued}-Expression (Teil1). Die Konstrukte wurden mit D42-Gal4 in den Motoneuronen exprimiert. Statistische Auswertung: Tabelle 21. Genotypen: *w¹¹¹⁸; D42-Gal4; UAS-DCTN1 bzw. UAS-GFP und w¹¹¹⁸; D42-Gal4*.

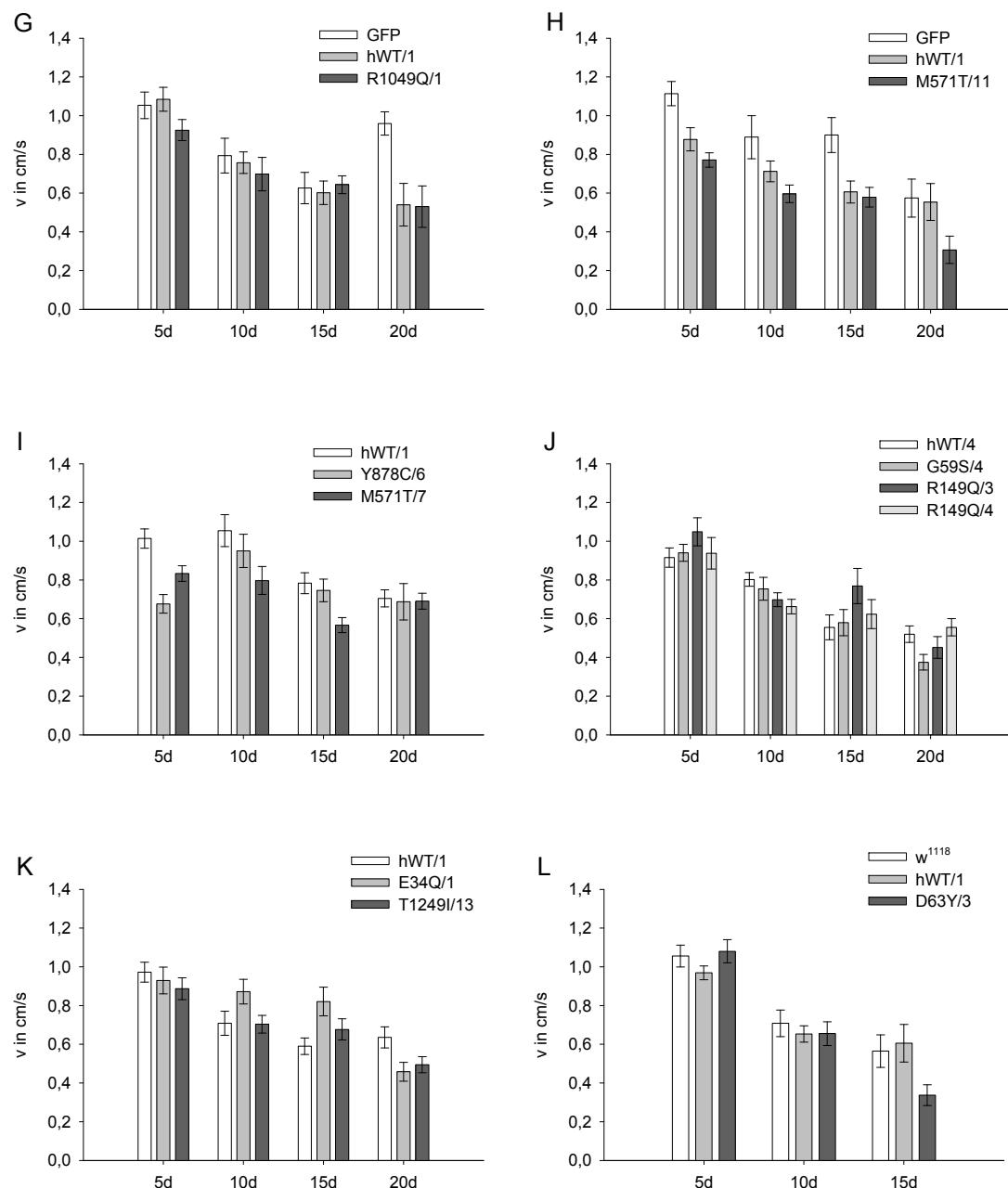


Abbildung 41: Originaldaten des Negativen-Geotaxis-Verhaltens nach motoneuronspezifischer p150^{Glued}-Expression (Teil2). Die Konstrukte wurden mit D42-Gal4 in den Motoneuronen exprimiert. Statistische Auswertung: Tabelle 21. Genotypen: w^{1118} ; D42-Gal4; UAS-DCTN1 bzw. UAS-GFP und w^{1118} ; D42-Gal4.

Konstrukt	Linie	Graph	motorische Fähigkeiten im Vergleich zur Überexpression von hWT		reduzierte Kletterfähigkeit	
			nach 15d/p-Wert	nach 20d/p-Wert	Linie	Konstrukt
G59S	1	A	0,031	0,035	+	+
	4	J	0,799	0,021	+	
E34Q	1	K	0,034	0,022	+	+
	6	C	0,797	0,017	+	
D63Y	3	L	0,023	-	+	+
	10	E	0,766	0,046	+	
R148W	2	D	0,005	0,463	-	-
	9	D	0,980	0,287	-	
R149Q	3	B	0,047	0,335	-	-
	3	J	0,015	0,045	+	
	4	J	0,498	0,567	-	
I196V	2	F	0,967	0,023	+	+
	12	F	0,239	0,019	+	
M571T	7	I	0,005	0,824	-	-
	11	H	0,568	0,056	-	
Y878C	6	I	0,645	0,852	-	-
	7	A	0,903	0,200	-	
R1049Q	1	G	0,589	0,952	-	-
T1249I	13	K	0,299	0,052	-	-
	16	E	0,633	0,140	-	

Tabelle 21: Statistische Auswertung des Negativen-Geotaxis-Verhaltens nach motoneuronspezifischer p150^{Glued}-Expression. Angegeben sind die p-Werte (15d, 20d) bezogen auf den Unterschied zur Überexpression von hWT. Genotypen mit statistisch signifikant reduzierter Kletterfähigkeit: fett und (+), kein Unterschied: (-). Genotyp: w^{118} ; D42-Gal4; UAS-DCTN1.

1.3.2 Lokomotor-Aktivität

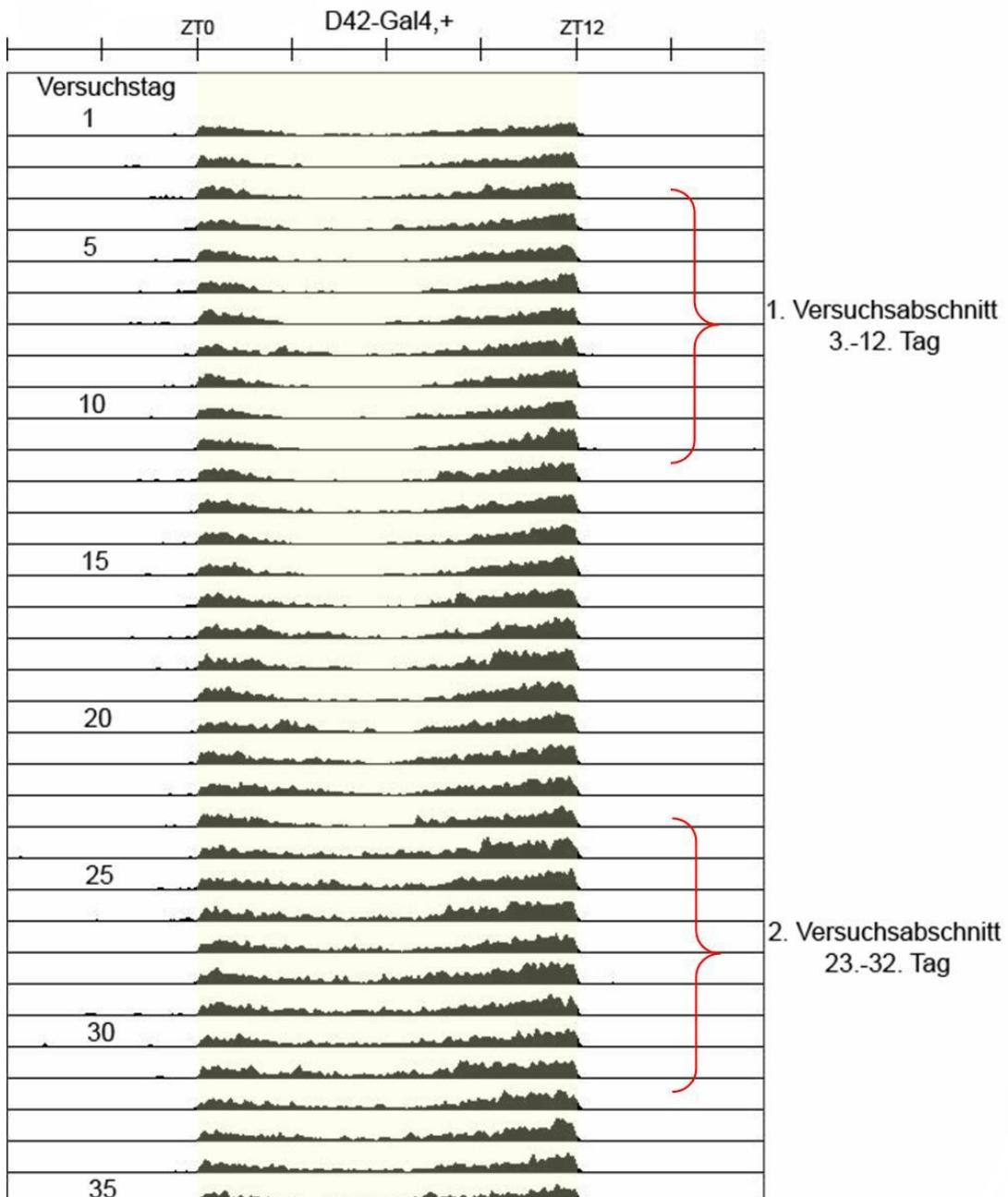


Abbildung 42: Durchschnittliches Aktogramm aller Fliegen der Treiberkontrolle. Die Versuche zur Bestimmung der Aktivität wurden wie in Kapitel II: 2.5.3 beschrieben durchgeführt. Gezeigt ist die durchschnittliche Anzahl an Infrarotstrahldurchquerung pro Minute. Es wurden Daten über einen Zeitraum von fünf Wochen (35d) unter einem abwechselnden 12h Licht/12h Dunkelheit (12/12 LD) Lichtregime erhoben. Für die Berechnung der Aktivitätsspiegel sowie der Tages-Aktivitätsprofile wurden die Daten junger Fliegen im Alter von 6-15d (1. Abschnitt, Versuchstage 3-12) und 26-35 Tage alter Fliegen (2. Abschnitt, Versuchstage 23-32) herangezogen. ZT0: Licht-an, ZT12: Licht-aus. Genotyp: w^{1118} ; $D42\text{-Gal}4$.

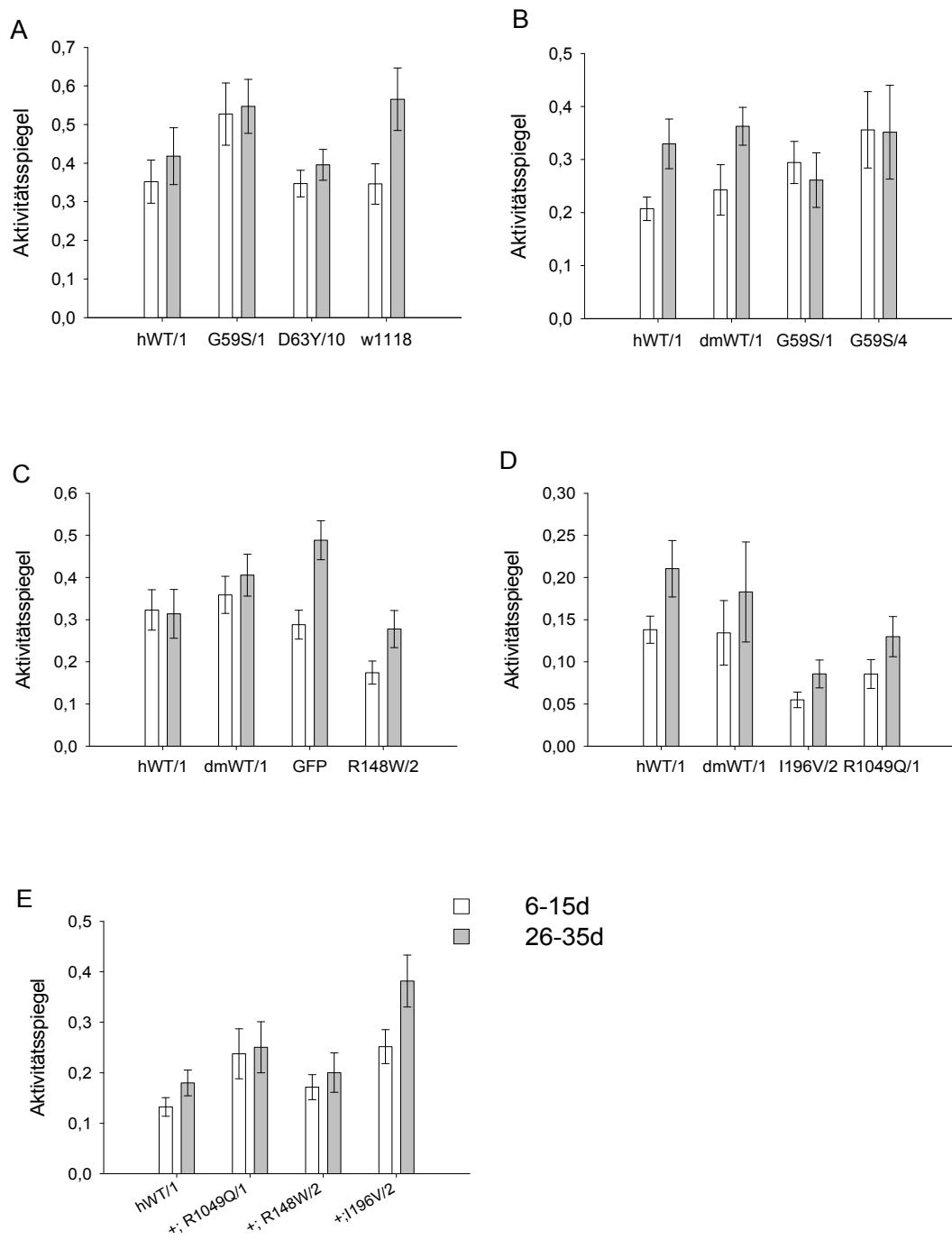


Abbildung 43: Aktivitätsspiegel nach motoneuronspezifischer Überexpression der *DCTN1*-Varianten. A, C: Die Kontrollen zeigen eine signifikant erhöhte Aktivität im Alter (26-3d) im Vergleich zu 6-15d alten Fliegen (GFP: p<0,001, w¹¹¹⁸: p=0,037). A, B: Junge G59S exprimierende Fliegen (6-15d) erscheinen aktiver im Vergleich zu jungen hWT-Fliegen. Einen signifikanten Unterschied zeigt nur G59S/4 (p=0,043). C, D: In jungen Fliegen ist die Aktivität nach Expression der Mutationen R148W (p=0,013), I196V (p<0,001) und R1049Q (p=0,020) signifikant niedriger als in hWT exprimierenden Fliegen. I196V-Fliegen zeigen auch im Alter eine reduzierte Aktivität (p=0,002) im Vergleich zu hWT-Fliegen im gleichen Alter. E: Die UAS-Kontrollen zeigen keinen reduzierten Aktivitätsspiegel verglichen mit hWT exprimierenden Fliegen. Genotypen: w¹¹¹⁸; *D42-Gal4*; *UAS-DCTN1*, w¹¹¹⁸; *UAS-DCTN1* und w¹¹¹⁸; *D42-Gal4*.

1.4 Mitochondrientransport

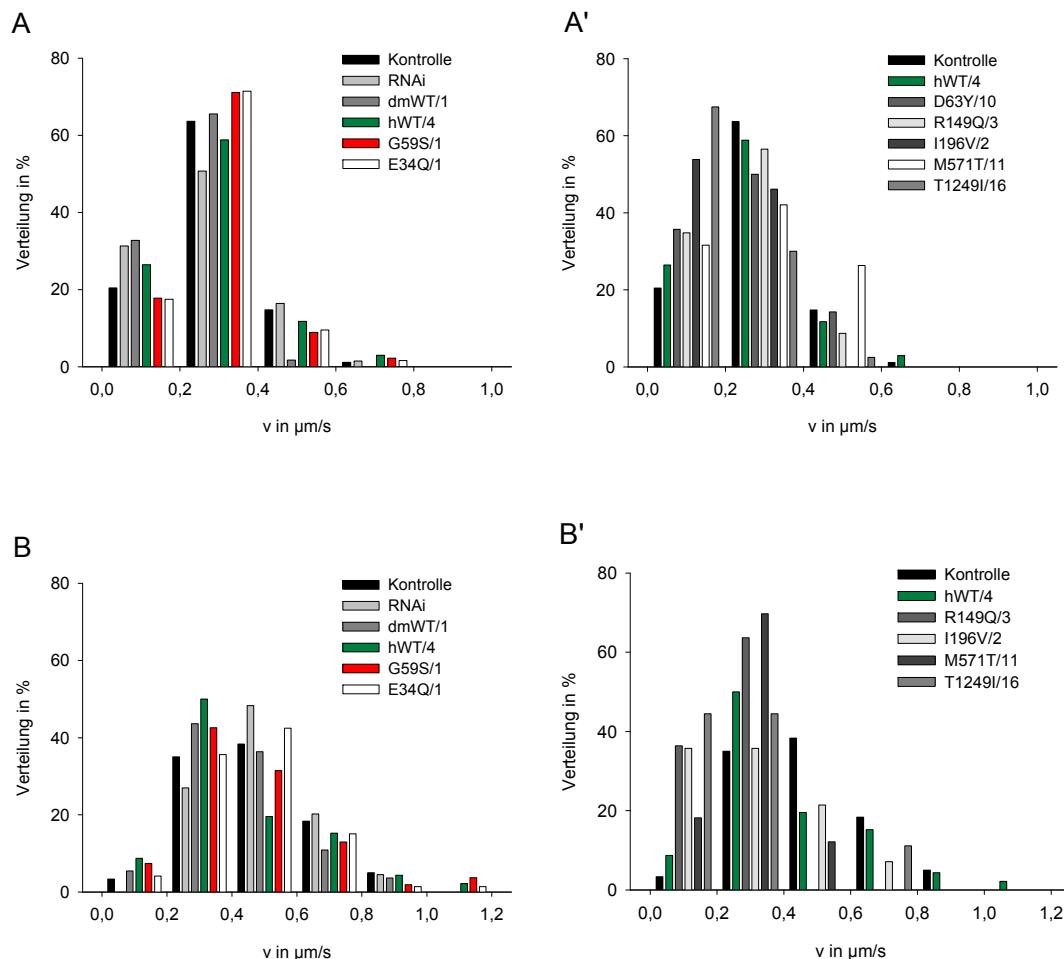


Abbildung 44: Häufigkeitsverteilung der Mitochondrien-Transportgeschwindigkeit. A, A': Häufigkeitsverteilung der anterograden Transportgeschwindigkeit. B, B': Häufigkeitsverteilung der retrograden Transportgeschwindigkeit. Genotypen: w^{1118} ; $D42-Gal4$; $UAS-DCTN1$, Kontrolle: w^{1118} ; $D42-Gal4$.

2 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANG	Angiogenin
APS	Ammoniumpersulfat
Arp1	<i>actin-related protein1</i>
ATP	Adenosintriphosphat,
BD	Bindedomäne
BSC	<i>Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University</i>
ca.	circa
CaPZ	<i>capping proteinZ</i>
CCD	<i>coiled-coil-</i> Domäne
cDhc	<i>cytoplasmic dynein heavy chain</i> , schwere Kette des zytoplasmatischen Dyneins
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CLIP-170	<i>cytoplasmic linker protein-170</i>
COS7	Fibroblastenzelllinie (<i>C. aethiops</i> , <i>origin-defective SV-40</i>)
CSP	<i>Cystein String Protein</i>
CyO	<i>Curly of Oyster</i> , Balancerchromosom (II)
D3	<i>Dichaete3</i> , Marker für das 3. Chromosom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAR	<i>donkey-anti-rabbit</i>
DBD	Dyneinbindedomäne
dd	doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dHMN7B	Distale Hereditäre Motoneuropathie Typ VII
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EB1	<i>end binding protein1</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EJP	<i>excitatory junction potential</i> , exitatorisches Übergangspotential
fALS	familiäre ALS
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fps	<i>frames per second</i>
FUS	<i>Fused in sarcoma</i>
Gal4	Transkriptionsfaktor aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GAM	<i>goat-anti-mouse</i>
GAR	<i>goat-anti-rabbit</i>
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>Aequorea victoria</i>)
Gl ¹	<i>truncated Glued</i>
h	Stunde(n)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase

HSP	Hereditäre Spastische Spinalparalyse
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
KBD	Kinesinbindedomäne
kDa	Kilo-Dalton
Khc	<i>Kinesin heavy chain</i> , schwere Kette des Motorproteins Kinesin
L3	Larven des dritten Entwicklungsstadiums
LD	Licht/Dunkelheit
LED	<i>light-emitting diode</i> , lichtemittierende Diode
LMD	<i>Lower Motoneuron Disease</i> , Erkrankung des zweiten Motoneurons
MBD	Mikrotubilibindedomäne
MN1	<i>murine motor neuron-neuroblastoma cell line</i>
MND	<i>motoneuron disease</i> , Motoneuronerkrankung
NMJ	<i>neuromuscular junction</i>
OPTN	Optineurin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>PBS plus TritonX-100</i>
PCB	<i>protein cracking buffer</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
qRT-PCR	quantitative <i>real-time PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sALS	sporadische ALS
Sco	<i>Scutoid</i> , Marker für das 2. Chromosom
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	Standardfehler
SETX	Senataxin
SOD1	Cu,Zn Superoxid-Dismutase
Sp	<i>Sternopleural</i> , Marker für das 2. Chromosom
T _a	<i>annealing</i> -Temperatur
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris buffered saline plus Tween-20</i>
TDP-43	<i>TAR DNA binding protein-43</i>
TM3	<i>third multiply inverted #3</i> , Balancerchromosom (III)
TM6B	<i>third multiply inverted #6B</i> , Balancerchromosom (III)
ü.N.	über Nacht
UAS	<i>upstream activation sequence</i>
UBQLN2	Ubiquilin-2
V	Volt
v	Geschwindigkeit
VAPB	<i>VAMP-associated protein B</i>
VCP	<i>Valosin-containing protein</i>
z.B.	zum Beispiel

3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnisse

3.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die häufigsten bekannten genetischen Risikofaktoren für ALS	12
Tabelle 2: Liste der verwendeten Fliegenstämme	26
Tabelle 3: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.....	28
Tabelle 4: Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	29
Tabelle 5: Liste der verwendeten Enzyme.	29
Tabelle 6: Liste der verwendeten Farbstoffe.....	29
Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper.....	30
Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte.....	31
Tabelle 9: Liste der verwendeten Software.....	32
Tabelle 10: Antikörperlösungen für p150 ^{Glued} -Western-Blots.....	36
Tabelle 11: Liste der angewandten Antikörper-Färbeprotokolle.....	38
Tabelle 12: Daten der Mikroinjektion der Konstrukte p{w[+] UAS- DCTN1-Flag} und p{w[+] UAS-glued}.....	49
Tabelle 13: Übersicht über die Entwicklungsstörungen nach <i>DCTN1</i> -Expression	57
Tabelle 14: Übersicht über die Beeinflussung der motorischen Fähigkeiten von <i>Drosophila</i> durch eine motoneuronspezifische <i>DCTN1</i> -Überexpression.....	63
Tabelle 15: Übersicht über die zelluläre und axonale p150 ^{Glued} -Verteilung nach motoneuronspezifischer <i>DCTN1</i> -Überexpression	78
Tabelle 16: Parameter des Mitochondrientransports in den Segmentalnerven.....	87
Tabelle 17: Zusammenfassung der Untersuchungen zum axonalen Transport in den Segmentalnerven	97
Tabelle 18: Übersicht über die etablierten p{w[+] UAS- DCTN1-Flag}- und p{w[+] UAS-glued}-Linien.....	125
Tabelle 19: Übersicht über die weiteren p{w[+] UAS- DCTN1-Flag}- Linien.....	126
Tabelle 20: Übersicht über Lebensfähigkeit und Stärke der Augenphänotypen der <i>DCTN1</i> -Linien .	127
Tabelle 21: Statistische Auswertung des Negativen-Geotaxis-Verhaltens nach motoneuronspezifischer p150 ^{Glued} Expression	131

3.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des motorischen Systems	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Multiproteinkomplexes Dynaktin.....	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Untereinheit p150 ^{Glued} des Multiproteinkomplexes Dynaktin	16
Abbildung 4: Interaktion von Gl ¹ mit mutierten Versionen der Motorproteine Kinesin und zytoplasmatisches Dynein	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Lage der zu untersuchenden Mutationen in p150 ^{Glued}	20
Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der augenspezifischen Überexpression der <i>DCTN1</i> -Konstrukte.....	22
Abbildung 7: Schemazeichnung eines Objekträgers für die Messung des axonalen Transports.....	40
Abbildung 8: Versuchsanordnung zur Analyse des axonalen Mitochondrientransports.....	41
Abbildung 9: Relative <i>DCTN1</i> -mRNA-Expression verschiedener UAS-DCTN1-Linien	51
Abbildung 10: Relative p150 ^{Glued} -Proteinmenge verschiedener UAS-DCTN1-Linien nach <i>DCTN1</i> -Expression im Muskel	52
Abbildung 11: Die ubiquitäre Überexpression von p150 ^{Glued} -E34Q beeinträchtigt die Entwicklung der Makrochaeten	54
Abbildung 12: Übersicht über die Augenphänotypen ausgewählter UAS-DCTN1-Linien.....	56
Abbildung 13: Negatives Geotaxis-Verhalten nach motoneuronspezifischer <i>DCTN1</i> -Expression.....	59
Abbildung 14: Normalisierter Aktivitätsspiegel junger Fliegen (6-15d) nach motoneuronspezifischer <i>DCTN1</i> -Überexpression	61
Abbildung 15: Durchschnittliches Aktivitätsprofil junger Fliegen im Verlauf eines Tages	62
Abbildung 16: Auswirkung der <i>DCTN1</i> -Überexpression auf dopaminerige Neurone.....	65
Abbildung 17: Verlust dopaminerger Neurone nach DCTN1-Überexpression.....	65
Abbildung 18: Die temperaturabhängige Expression über das tub-Gal80 ^{ts} -System führt zu einer geringeren GFP Expression	67
Abbildung 19: Auswirkung der <i>DCTN1</i> -Überexpression auf neuropeptiderge Neurone.....	69
Abbildung 20: G59S führt zu p150 ^{Glued} - Aggregation im larvalen Muskel.....	71
Abbildung 21: Subzelluläre p150 ^{Glued} -Verteilung nach spezifischer Expression in larvalen Muskeln	72
Abbildung 22: Neuropil im dorsalen Bereich des Thorakalganglions	73
Abbildung 23: P150 ^{Glued} -G59S aggregiert in adulten Motoneuronen	74

Abbildung 24: p150 ^{Glued} -Verteilung in larvalen Motoneuronen (Teil 1).....	76
Abbildung 25: P150 ^{Glued} -Verteilung in larvalen Motoneuronen (Teil 2).....	77
Abbildung 26: Kortex im ventralen Bereich des Thorakalganglions	79
Abbildung 27: CSP-Verteilung im Kortex von Thorakalganglien nach <i>DCTN1</i> -Überexpression in Motoneuronen.....	80
Abbildung 28: CSP akkumuliert innerhalb p150 ^{Glued} exprimierender Zellen.....	81
Abbildung 29: Vergleich der Verteilung der Transportgeschwindigkeiten der Mitochondrien in Kontrolllarven.....	83
Abbildung 30: Auswirkung der <i>DCTN1</i> -Überexpression auf die anterograde Transportgeschwindigkeit.....	84
Abbildung 31: Auswirkung der <i>DCTN1</i> -Überexpression auf die retrograde Transportgeschwindigkeit	86
Abbildung 32: Motoneuronspezifische <i>DCTN1</i> -Überexpression führt zu posteriorer Paralyse in <i>Drosophila</i>	89
Abbildung 33: Mitochondrienstaus in Segmentalnerven <i>DCTN1</i> exprimierender Larven	92
Abbildung 34: Wildtypisches und mutantes p150Glued akkumuliert in Segmentalnerven	94
Abbildung 35: Die P150 ^{Glued} -, Vesikel- und Organellenanhäufungen in larvalen Segmentalnerven sind koinzident	96
Abbildung 36: Schematische Darstellung der vorhergesagten Proteinstruktur der Cap-Gly-Domäne von humanem p150Glued.....	101
Abbildung 37: Charakterisierung der verschiedenen <i>DCTN1</i> -Varianten mittels Überexpressionsanalysen	121
Abbildung 38: Einstufung der Augenphänotypen.....	126
Abbildung 39: Humanes wildtypisches <i>DCTN1</i> verursacht vermehrten Zelltod in der Augenimaginalscheibe.....	128
Abbildung 40: Originaldaten des Negativen-Geotaxis-Verhaltens nach motoneuronspezifischer p150 ^{Glued} -Expression (Teil1).....	129
Abbildung 41: Originaldaten des Negativen-Geotaxis-Verhaltens nach motoneuronspezifischer p150 ^{Glued} -Expression (Teil2).....	130
Abbildung 42: Durchschnittliches Aktogramm aller Fliegen der Treiberkontrolle.....	132
Abbildung 43: Aktivitätsspiegel nach motoneuronspezifischer Überexpression der <i>DCTN1</i> -Varianten	133
Abbildung 44: Häufigkeitsverteilung der Mitochondrien-Transportgeschwindigkeit	134

4 Literaturverzeichnis

- Alexianu, M. E., M. Kozovska, et al. (2001).** "Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression." *Neurology* **57**(7): 1282-1289.
- Allen, M. J., X. Shan, et al. (1999).** "Targeted expression of truncated glued disrupts giant fiber synapse formation in Drosophila." *J Neurosci* **19**(21): 9374-9384.
- Almer, G. (2003).** "Amyotrophe Lateralsklerose: Überlegungen zu Ursprung und Pathophysiologie der Erkrankung." *JOURNAL FÜR NEUROLOGIE, NEUROCHIRURGIE UND PSYCHIATRIE* **4**: 6-12.
- Bailey-Wilson, J. E., C. C. Plato, et al. (1993).** "Potential role of an additive genetic component in the cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia in the western Pacific." *Am J Med Genet* **45**(1): 68-76.
- Baqri, R. M., B. A. Turner, et al. (2009).** "Disruption of mitochondrial DNA replication in Drosophila increases mitochondrial fast axonal transport in vivo." *PLoS One* **4**(11): e7874.
- Barbosa, L. F., F. M. Cerqueira, et al. (2010).** "Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS." *Biochim Biophys Acta* **1802**(5): 462-471.
- Bayersdorfer, F. (2009).** "Die Bedeutung von oxidativem Stress bei hereditären und sporadischen Formen der Parkinson'schen Krankheit. Eine Studie an Drosophila melanogaster." *Universität Regensburg Dissertation*.
- Bilsland, L. G., E. Sahai, et al. (2010).** "Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(47): 20523-20528.
- Bonini, N. M. & M. E. Fortini (2003).** "Human neurodegenerative disease modeling using Drosophila." *Annu Rev Neurosci* **26**: 627-656.
- Bowman, A. B., A. Kamal, et al. (2000).** "Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein." *Cell* **103**(4): 583-594.
- Brady, S. T. (1991).** "Molecular motors in the nervous system." *Neuron* **7**(4): 521-533.
- Brand, A. H. & N. Perrimon (1993).** "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." *Development* **118**(2): 401-415.
- Buchner, E. & C. B. Gundersen (1997).** "The DnaJ-like cysteine string protein and exocytotic neurotransmitter release." *Trends Neurosci* **20**(5): 223-227.
- Burkhardt, J. K., C. J. Echeverri, et al. (1997).** "Overexpression of the dynaminin (p50) subunit of the dynein complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution." *J Cell Biol* **139**(2): 469-484.
- Chevalier-Larsen, E. & E. L. Holzbaur (2006).** "Axonal transport and neurodegenerative disease." *Biochim Biophys Acta* **1762**(11-12): 1094-1108.
- Chevalier-Larsen, E. S., K. E. Wallace, et al. (2008).** "Lysosomal proliferation and distal degeneration in motor neurons expressing the G59S mutation in the p150Glued subunit of dynein." *Hum Mol Genet* **17**(13): 1946-1955.
- Clark, S. W. & D. I. Meyer (1994).** "ACT3: a putative centractin homologue in *S. cerevisiae* is required for proper orientation of the mitotic spindle." *J Cell Biol* **127**(1): 129-138.

- Clement, A. M., M. D. Nguyen, et al. (2003).** "Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice." Science **302**(5642): 113-117.
- Dastur, D. K. (1964).** "Cycad Toxicity in Monkeys: Clinical, Pathological, and Biochemical Aspects." Fed Proc **23**: 1368-1369.
- Dengler, R. (2011).** Amyotrophe Lateralsklerose (ALS). D. D. G. f. M. e.V.
- Driscoll, M. & B. Gerstbrein (2003).** "Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration." Nat Rev Genet **4**(3): 181-194.
- Duncan, M. W., J. C. Steele, et al. (1990).** "2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam." Neurology **40**(5): 767-772.
- Eaton, B. A., R. D. Fetter, et al. (2002).** "Dynactin is necessary for synapse stabilization." Neuron **34**(5): 729-741.
- Echeverri, C. J., B. M. Paschal, et al. (1996).** "Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynein reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis." J Cell Biol **132**(4): 617-633.
- Eckley, D. M., S. R. Gill, et al. (1999).** "Analysis of dynein subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the arp1 minifilament pointed end." J Cell Biol **147**(2): 307-320.
- El-Kadi, A. M., V. Soura, et al. (2007).** "Defective axonal transport in motor neuron disease." J Neurosci Res **85**(12): 2557-2566.
- Fan, S. S. & D. F. Ready (1997).** "Glued participates in distinct microtubule-based activities in Drosophila eye development." Development **124**(8): 1497-1507.
- Farrer, M. J., M. M. Hulihan, et al. (2009).** "DCTN1 mutations in Perry syndrome." Nat Genet **41**(2): 163-165.
- Fernandez, J. R., M. D. Grant, et al. (1999).** "Differences in locomotor activity across the lifespan of Drosophila melanogaster." Exp Gerontol **34**(5): 621-631.
- Gargano, J. W., I. Martin, et al. (2005).** "Rapid iterative negative geotaxis (RING): a new method for assessing age-related locomotor decline in Drosophila." Exp Gerontol **40**(5): 386-395.
- Gill, S. R., T. A. Schroer, et al. (1991).** "Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein." J Cell Biol **115**(6): 1639-1650.
- Gloor, G. B., C. R. Preston, et al. (1993).** "Type I repressors of P element mobility." Genetics **135**(1): 81-95.
- Hafezparast, M., R. Klocke, et al. (2003).** "Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport." Science **300**(5620): 808-812.
- Haghnia, M., V. Cavalli, et al. (2007).** "Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for dynein membrane attachment." Mol Biol Cell **18**(6): 2081-2089.
- Harte, P. J. & D. R. Kankel (1982).** "Genetic analysis of mutations at the Glued locus and interacting loci in Drosophila melanogaster." Genetics **101**(3-4): 477-501.
- Hasler, D. (2008).** "Weiterführende Arbeiten zu einem Drosophila melanogaster Modell für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)." Bachelorarbeit. Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie. Universität Regensburg

- Helfrich-Forster, C. (1998).** "Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants." *J Comp Physiol A* **182**(4): 435-453.
- Hirokawa, N. (1996).** "Organelle transport along microtubules - the role of KIFs." *Trends Cell Biol* **6**(4): 135-141.
- Hirokawa, N., R. Sato-Yoshitake, et al. (1991).** "Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo." *J Cell Biol* **114**(2): 295-302.
- Hirth, F. (2010).** "Drosophila melanogaster in the study of human neurodegeneration." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **9**(4): 504-523.
- Hodgkinson, J. L., C. Peters, et al. (2005).** "Three-dimensional reconstruction of the dynein complex by single-particle image analysis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3667-3672.
- Holzbaur, E. L. (2004).** "Motor neurons rely on motor proteins." *Trends Cell Biol* **14**(5): 233-240.
- Holzbaur, E. L., J. A. Hammarback, et al. (1991).** "Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the *Drosophila* gene Glued." *Nature* **351**(6327): 579-583.
- Holzbaur, E. L. F. (2009).** Axonal Transport and ALS. *Encyclopedia of Neuroscience*: 1181–1187.
- Honnappa, S., O. Okhrimenko, et al. (2006).** "Key interaction modes of dynamic +TIP networks." *Mol Cell* **23**(5): 663-671.
- Horner, R. D., K. G. Kamins, et al. (2003).** "Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans." *Neurology* **61**(6): 742-749.
- Hurd, D. D. & W. M. Saxton (1996).** "Kinesin mutations cause motor neuron disease phenotypes by disrupting fast axonal transport in *Drosophila*." *Genetics* **144**(3): 1075-1085.
- Imai, H., A. Narita, et al. (2006).** "Two-dimensional averaged images of the dynein complex revealed by single particle analysis." *J Mol Biol* **359**(4): 833-839.
- Jacquot, G., P. Maidou-Peindara, et al. (2010).** "Molecular and functional basis for the scaffolding role of the p50/dynamitin subunit of the microtubule-associated dynein complex." *J Biol Chem* **285**(30): 23019-23031.
- Kawamata, T., H. Akiyama, et al. (1992).** "Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue." *Am J Pathol* **140**(3): 691-707.
- Kim, H., S. C. Ling, et al. (2007).** "Microtubule binding by dynein is required for microtubule organization but not cargo transport." *J Cell Biol* **176**(5): 641-651.
- King, S. J. & T. A. Schroer (2000).** "Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor." *Nat Cell Biol* **2**(1): 20-24.
- Kurland, L. T. (1988).** "Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin." *Trends Neurosci* **11**(2): 51-54.
- Lai, C., X. Lin, et al. (2007).** "The G59S mutation in p150(glued) causes dysfunction of dynein in mice." *J Neurosci* **27**(51): 13982-13990.
- Laird, F. M., M. H. Farah, et al. (2008).** "Motor neuron disease occurring in a mutant dynein mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking." *J Neurosci* **28**(9): 1997-2005.
- LaMonte, B. H., K. E. Wallace, et al. (2002).** "Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration." *Neuron* **34**(5): 715-727.

- Le Bourg, E. (1987).** "The rate of living theory. Spontaneous locomotor activity, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*." *Exp Gerontol* **22**(5): 359-369.
- Levy, J. R., C. J. Sumner, et al. (2006).** "A motor neuron disease-associated mutation in p150Glued perturbs dynactin function and induces protein aggregation." *J Cell Biol* **172**(5): 733-745.
- Li, S., J. Finley, et al. (2002).** "Crystal structure of the cytoskeleton-associated protein glycine-rich (CAP-Gly) domain." *J Biol Chem* **277**(50): 48596-48601.
- Lloyd, T. E., J. Machamer, et al. (2012).** "The p150(Glued) CAP-Gly domain regulates initiation of retrograde transport at synaptic termini." *Neuron* **74**(2): 344-360.
- Lu, B. & H. Vogel (2009).** "Drosophila models of neurodegenerative diseases." *Annu Rev Pathol* **4**: 315-342.
- Martin, J. R., R. Ernst, et al. (1999).** "Temporal pattern of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*." *J Comp Physiol A* **184**(1): 73-84.
- Martin, J. R., A. Fuchs, et al. (1986).** "Altered light/dark activity difference with aging in two rat strains." *J Gerontol* **41**(1): 2-7.
- Martin, M., S. J. Iyadurai, et al. (1999).** "Cytoplasmic dynein, the dyactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport." *Mol Biol Cell* **10**(11): 3717-3728.
- McGeer, P. L., C. Schwab, et al. (1997).** "Familial nature and continuing morbidity of the amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex of Guam." *Neurology* **49**(2): 400-409.
- McGrail, M., J. Gepner, et al. (1995).** "Regulation of cytoplasmic dynein function in vivo by the Drosophila Glued complex." *J Cell Biol* **131**(2): 411-425.
- McGuire, S. E., P. T. Le, et al. (2003).** "Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*." *Science* **302**(5651): 1765-1768.
- Meijering, E., O. Dzyubachyk, et al. (2012).** "Methods for cell and particle tracking." *Methods Enzymol* **504**: 183-200.
- Meyerowitz, E. M. & D. R. Kankel (1978).** "A genetic analysis of visual system development in *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* **62**(1): 112-142.
- Miana-Mena, F. J., C. Gonzalez-Mingot, et al. (2011).** "Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol* **258**(5): 762-769.
- Miranda, M. L., M. Alicia Overstreet Galeano, et al. (2008).** "Spatial analysis of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis among 1991 Gulf War veterans." *Neurotoxicology* **29**(6): 964-970.
- Moughamian, A. J. & E. L. Holzbaur (2012).** "Dynactin is required for transport initiation from the distal axon." *Neuron* **74**(2): 331-343.
- Muhua, L., T. S. Karpova, et al. (1994).** "A yeast actin-related protein homologous to that in vertebrate dyactin complex is important for spindle orientation and nuclear migration." *Cell* **78**(4): 669-679.
- Munch, C., A. Rosenbohm, et al. (2005).** "Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD." *Ann Neurol* **58**(5): 777-780.
- Munch, C., R. Sedlmeier, et al. (2004).** "Point mutations of the p150 subunit of dyactin (DCTN1) gene in ALS." *Neurology* **63**(4): 724-726.
- Mujit, M. M. & M. B. Feany (2002).** "Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach?" *Nat Rev Neurosci* **3**(3): 237-243.

- Paschal, B. M., E. L. Holzbaur, et al. (1993).** "Characterization of a 50-kDa polypeptide in cytoplasmic dynein preparations reveals a complex with p150GLUED and a novel actin." J Biol Chem **268**(20): 15318-15323.
- Perry, T. L., C. Bergeron, et al. (1989).** "Beta-N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice." J Neurol Sci **94**(1-3): 173-180.
- Pilling, A. D., D. Horiuchi, et al. (2006).** "Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons." Mol Biol Cell **17**(4): 2057-2068.
- Plaitakis, A. & J. T. Caroscio (1987).** "Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis." Ann Neurol **22**(5): 575-579.
- Plough, H. H. & P. T. Ives (1934).** "Heat Induced Mutations in Drosophila." Proc Natl Acad Sci U S A **20**(5): 268-273.
- Pratt, A. J., E. D. Getzoff, et al. (2012).** "Amyotrophic lateral sclerosis: update and new developments." Degener Neurol Neuromuscul Dis **2012**(2): 1-14.
- Puls, I., C. Jonnakuty, et al. (2003).** "Mutant dynactin in motor neuron disease." Nat Genet **33**(4): 455-456.
- Puls, I., S. J. Oh, et al. (2005).** "Distal spinal and bulbar muscular atrophy caused by dynactin mutation." Ann Neurol **57**(5): 687-694.
- Quatacker, J., W. Annaert, et al. (1995).** "The organisation of the axonal reticulum at a ligation, in vitro incubated bovine splenic nerves." Brain Res **680**(1-2): 36-42.
- Quintyne, N. J., S. R. Gill, et al. (1999).** "Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes." J Cell Biol **147**(2): 321-334.
- Rauenbusch, S. (2010).** "Funktionelle Charakterisierung transgener Dynaktin p150Glued Stämme in Drosophila melanogaster: Ein Modell zur Analyse der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)" Diplomarbeit. Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie. Universität Regensburg
- Rieger, D., C. Fraunholz, et al. (2007).** "The fruit fly Drosophila melanogaster favors dim light and times its activity peaks to early dawn and late dusk." J Biol Rhythms **22**(5): 387-399.
- Riehemann, K. & C. Sorg (1993).** "Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins." Trends Biochem Sci **18**(3): 82-83.
- Rosser, A. M., B. Kalmar, et al. (2012).** "The distal hereditary motor neuropathies." J Neurol Neurosurg Psychiatry **83**(1): 6-14.
- Sasaki, S., H. Warita, et al. (2005).** "Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene." Acta Neuropathol **110**(1): 48-56.
- Schilling, T. (2011).** "A *Drosophila melanogaster* model of ALS: Effects of Dynactin-1^{G59S} overexpression." Master Thesis. Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie. Universität Regensburg
- Schnapp, B. J. & T. S. Reese (1989).** "Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(5): 1548-1552.
- Schroer, T. A. (2004).** "Dynactin." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 759-779.
- Shaw, P. J. (2005).** "Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **76**(8): 1046-1057.

- Shi, P., J. Gal, et al. (2010).** "Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis." Biochim Biophys Acta **1802**(1): 45-51.
- Siller, K. H. & C. Q. Doe (2008).** "Lis1/dynactin regulates metaphase spindle orientation in Drosophila neuroblasts." Dev Biol **319**(1): 1-9.
- Spencer, P. S. (1987).** "Guam ALS/parkinsonism-dementia: a long-latency neurotoxic disorder caused by "slow toxin(s)" in food?" Can J Neurol Sci **14**(3 Suppl): 347-357.
- Spencer, P. S., P. B. Nunn, et al. (1987).** "Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin." Science **237**(4814): 517-522.
- Stockmann, M., M. Meyer-Ohlendorf, et al. (2012).** "The dynactin p150 subunit: cell biology studies of sequence changes found in ALS/MND and Parkinsonian Syndromes." J Neural Transm.
- Stribl, C. (2008).** "Ein Drosophila melanogaster Modell für Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)." Diplomarbeit. Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie. Universität Regensburg
- Sullivan, W., M. Ashburner, et al. (2000).** Drosophila protocols. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Swaroop, A., J. W. Sun, et al. (1986).** "Molecular organization and expression of the genetic locus glued in Drosophila melanogaster." Mol Cell Biol **6**(3): 833-841.
- Thevenaz, P., U. E. Ruttmann, et al. (1998).** "A pyramid approach to subpixel registration based on intensity." IEEE Trans Image Process **7**(1): 27-41.
- Tsukita, S. & H. Ishikawa (1980).** "The movement of membranous organelles in axons. Electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles." J Cell Biol **84**(3): 513-530.
- Vallee, R. B. & G. S. Bloom (1991).** "Mechanisms of fast and slow axonal transport." Annu Rev Neurosci **14**: 59-92.
- Vaughan, P. S., P. Miura, et al. (2002).** "A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport." J Cell Biol **158**(2): 305-319.
- Vilarino-Guell, C., H. Chai, et al. (2009).** "MEIS1 p.R272H in familial restless legs syndrome." Neurology **73**(3): 243-245.
- Vilarino-Guell, C., C. Wider, et al. (2009).** "Characterization of DCTN1 genetic variability in neurodegeneration." Neurology **72**(23): 2024-2028.
- Waterman-Storer, C. M. & E. L. Holzbaur (1996).** "The product of the Drosophila gene, Glued, is the functional homologue of the p150Glued component of the vertebrate dynactin complex." J Biol Chem **271**(2): 1153-1159.
- Waterman-Storer, C. M., S. Karki, et al. (1995).** "The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centrin (Arp-1)." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1634-1638.
- Waterman-Storer, C. M., S. B. Karki, et al. (1997).** "The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(22): 12180-12185.
- Wax, T. M. & C. L. Goodrick (1978).** "Nearness to death and wheelrunning behavior in mice." Exp Gerontol **13**(3-4): 233-236.
- White, K. E., D. M. Humphrey, et al. (2010).** "The dopaminergic system in the aging brain of Drosophila." Front Neurosci **4**: 205.

Williamson, T. L. & D. W. Cleveland (1999). "Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons." Nat Neurosci **2**(1): 50-56.

Zhang, B., P. Tu, et al. (1997). "Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation." J Cell Biol **139**(5): 1307-1315.

Weitere Quellen

Fujita SC, Zipursky SL, et al. (1982). Monoclonal antibodies against the Drosophila nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A. **79**(24):7929-33.

Hofbauer A, Ebel T, et al. (2009). The Wuerzburg Hybridoma Library against Drosophila Brain. J Neurogenet;23(1-2):78-91.

Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

<http://www.virtualdub.org/>

ActogramJ: developed by Taishi Yoshii and Benjamin Schmid at the University of Wuerzburg, in the Department of Neurobiology and Genetics. <http://actogramj.neurofly.de/>

Ich sage nur ein Wort:

Vielen Dank, (Horst Hrubesch)

- ✿ an meinen Doktorvater Prof. Dr. Stephan Schneuwly!
- ✿ an meine Mentoren Prof. Dr. Frank Sprenger und Prof. Dr. A.C. Ludolph!
- ✿ an alle Mitglieder des Lehrstuhls, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere an Dr. José Botella, Dr. Florian Bayersdorfer, Dr. Alois Hofbauer, Dr. Juan A. Navarro, Dr. Susanne Fischer, Frau Renate Reng, Frau Ursula Roth und Frau Eva Köppel!
- ✿ an Frau Prof. Dr. Charlotte Helfrich-Förster für die Hilfe bei der Auswertung der Lokomotor-Aktivität!
- ✿ an meine Studenten Silvia Rauenbusch, Tabea Schilling und Tobias Weichselgartner, sowie all meine Praktikanten!
- ✿ an die Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V!

Vielen Dank an meine Familie und meine Freunde!

Danke Beibs!

„Ich denke gern an die Chance einer Möglichkeit.“

James T. Kirk, Der Zorn des Khan