

Summary

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a common X-linked, fatal genetic disorder characterized by progressive muscle wasting and is frequently associated with mental impairments. Dystrophin-deficiency was found to be the main underlying cause of this pathology. However, despite intense clinical and basic research into the causes and mechanisms of this disease for more than two decades, treatments remain palliative. Thus, much remains to be explored regarding the basic biological roles of the Dystrophin protein, both in the musculature and in the brain. DMD is associated with the absence of the muscle-specific isoform Dp427. This protein is located along the muscle membrane where it interacts with other proteins to form a complex called the Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC). Some Dystrophin isoforms and DGC members are also present at synapses at the neuromuscular junction (NMJ) and in the brain. The absence of some of the DGC proteins results in various types of muscular dystrophy likely due to destabilization of the sarcolemma resulting in exercise-induced muscle degeneration. The molecular mechanisms underlying the cognitive aspects of Dystrophin-deficiency, however, are still largely unknown. Therefore, the aim of this thesis has been to explore the roles that the DGC plays at peripheral and central synapses using *Drosophila* as a model system. We hope that our findings may provide novel insights for the development of future therapeutic approaches for treating the cognitive deficits in DMD patients which significantly worsen their prognoses.

In **Chapter 2** we present the finding that the Rho-GAP *crossveinless-c* (*cv-c*) gene, which encodes a negative regulator of Rho-GTPase pathways, genetically interacts with Dystrophin both during wing vein formation and at the NMJ. The *cv-c*¹ mutant exhibits a similar phenotype as that of the *Dystrophin DLP2* mutant: an increased number of presynaptic neurotransmitter release sites and higher probability of vesicle release. We found that decreased expression of the Rho-GTPase CDC42 suppresses the high neurotransmitter release of both the *cv-c*¹ and the *Dystrophin* mutants suggesting that CDC42 is the relevant substrate of CV-C. We conclude that Dystrophin and this Rho-GTPase signaling pathway interact at the postsynaptic side of the NMJ to maintain synaptic homeostasis.

We next describe the generation of a null mutation in the *Dystrobrevin* gene by homologous recombination (**Chapter 3.1**). The *Dystrobrevin* mutant exhibits an increased number of synaptic boutons and other ultrastructural abnormalities reflecting an “overdeveloped” bouton. Electrophysiological analysis revealed that the *Dystrobrevin* mutant has increased neurotransmitter release without changes in the number or the localization of glutamate receptors. Delocalization of Dystrobrevin in a *Dystrophin* mutant background was found to be the likely cause of the neurotransmitter release phenotype in the mutant. Relocalization of Dystrobrevin to the postsynaptic region by expression of an SSR-targeted Dystrobrevin protein suppressed the increased neurotransmitter release in the *Dystrophin* mutant. *Dystrobrevin* also was found to genetically interact with *cv-c* and DYB to signal through CDC42. Finally, we demonstrated that expression of constitutively-active CaMKII counteracts the increased neurotransmitter release resulting from activation of CDC42 and that CaMKII acts downstream of CDC42.

In **Chapter 3.2**, the identification is presented of a signaling molecule, Protein Kinase A, which interacts with Dystrobrevin to regulate presynaptic neurotransmitter release at the NMJ. We demonstrate that Dystrobrevin and the Protein Kinase A regulatory subunit (PKA-R) interact both genetically and physically. The increase in neurotransmitter release in the *Dystrobrevin* mutant can be prevented when constitutively active PKA is expressed either pre- or

postsynaptically suggesting that PKA normally interacts with Dystrobrevin to regulate synaptic homeostatic endpoints.

In **Chapter 4** our studies on the roles of another DGC protein at the NMJ, Dystroglycan, are described. In mammals Dystrobrevin indirectly associates with Dystroglycan via Dystrophin. We show that a reduction of Dystroglycan in the *Dystrophin* or *Dystrobrevin* mutant backgrounds suppresses their increased neurotransmitter release. Rescue experiments indicate that different Dystroglycan protein isoforms act pre- versus postsynaptically at the NMJ. We further find that a decrease in Synaptotagmin levels and an increase in CaMKII levels in the *Dystroglycan* mutants accompany the decrease in presynaptic neurotransmitter release.

In **Chapter 5** we present our studies on the roles of the CNS-specific Dystrophin isoform Dp186 in the fly's olfactory system. This isoform is expressed in the olfactory receptor neurons (ORNs) in the antennae, at the antennal lobes and in the higher order brain centers to which odor-induced neural signals travel to be integrated into behavioral responses. The Dp186 protein is expressed at both the presynaptic and postsynaptic compartments of the primary olfactory synapse in the antennal lobe. The lack of Dp186 results in a significant reduction in total ORN odor-evoked activity, without apparent anatomical defects, as measured in electroantennograms (EAGs). The decreased EAG amplitudes in the *Dp186* mutant can be rescued by presynaptic expression of the Dp186 protein. Furthermore, *Dp186* mutant flies exhibit behavioral abnormalities in odor avoidance tests. More specifically, these mutants are less responsive to aversive odors than wild type flies. This phenotype can be rescued by expression of Dp186 either in the primary olfactory receptor or in its downstream projection neuron target, suggesting that Dp186 acts at minimally two points in the olfactory circuit to ensure adequate information transfer.

Samenvatting

De spierziekte van Duchenne (DMD) is een letale, X-chromosomale genetische aandoening, die gekenmerkt wordt door progressieve spierafbraak en mentale retardatie bij een derde van de patiënten als gevolg van een mutatie in het *dystrofine* gen. Ondanks vele klinische en fundamenteel wetenschappelijke studies naar de oorzaak en mechanismen van deze ziekte, is behandeling tot op heden van palliatieve aard. Over de biologische functie van het Dystrofine eiwit in zowel de spieren als de hersenen is nog steeds veel onbekend. DMD is gecorreleerd aan de afwezigheid van de spier-specifieke Dystrofine isoform Dp427. Dit eiwit is gelokaliseerd langs het spiermembraan, waar het bindt aan andere eiwitten om het zogenaamde Dystrofine geassocieerde Glycoproteïne Complex (DGC) te vormen. Dystrofine en diverse andere eiwitten van het DGC zijn daarnaast ook aanwezig in de neuromusculaire synaps en in de hersenen. De afwezigheid van een aantal eiwitten van het DGC, waaronder Dystrofine, kan aanleiding geven tot spierdystrofie, waarschijnlijk door het veroorzaken van destabilisatie van het sarcolemma. De oorzaken van de cognitieve aspecten van DMD zijn vrijwel geheel onbekend. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richt zich op de rol van het synaptische DGC binnen de signaaltransductie tussen zenuwen en spieren en tussen zenuwen onderling waarbij de fruitvlieg, *Drosophila melanogaster*, als model systeem wordt gebruikt. Wij hopen dat onze resultaten zullen bijdragen aan de ontwikkeling van toekomstige therapieën voor DMD patiënten.

In **Hoofdstuk 2** beschrijven wij onze resultaten welke aantonen dat een negatieve regulator van de Rho-GTPase signaaltransductie route, RhoGAP Crossveinless-c (CV-C), een interactie aangaat met Dystrofine. De *cv-c¹* mutant vertoont een vergelijkbaar fenotype als dat van de Dystrofine DLP2 mutant: een verhoogd aantal locaties op het presynaptische membraan voor het afscheiden van neurotransmitter en een hogere waarschijnlijkheid van fusie van synaptische blaasjes. Onze resultaten wijzen uit dat een verlaagde expressie van de Rho-GTPase CDC42 de hoge neurotransmitter afgifte in zowel de *cv-c¹* als in de DLP2 mutant onderdrukt, hetgeen suggereert dat CDC42 het substraat is van CV-C. Wij concluderen dat Dystrofine in samenspel met de Rho-GTPase signaaltransductie route aan de postsynaptische zijde van de neuromusculaire eindplaat werkzaam zijn om synaptische homeostase te bewerkstelligen.

Hoofdstuk 3.1. beschrijft onze experimenten waarin door middel van homologe recombinatie een nul-mutatie in het *dystrobrevin* gen is aangebracht. Deze *dystrobrevin* mutatie leidt tot een toename van het aantal synaptische boutons en tot andere ultrastructurele afwijkingen, die duiden op een overontwikkelde synaptische eindplaat. Electrofysiologische analyse heeft aangetoond aan dat de toegenomen neurotransmitter afgifte in de *dystrobrevin* mutant niet wordt veroorzaakt door veranderingen in het aantal of de lokalisatie van glutamaat receptoren. De verhoogde neurotransmitter afgifte in de *dystrofine* mutant lijkt voornamelijk te worden veroorzaakt door delokalisatie van het Dystrobrevin eiwit op de synaps. Dit fenotype van de *dystrofine* mutant kon namelijk worden opgeheven door relokalisatie van Dystrobrevin naar het subsynaptisch reticulum. Naast Dystrofine blijkt ook Dystrobrevin een genetische interactie aan te gaan met CV-C via de signaaltransductie route van CDC42. Verder is gebleken dat de door CDC42 activatie geïnduceerde neurotransmitter afgifte kan worden onderdrukt door expressie van een permanent actief CaMKII. Tenslotte wijzen onze resultaten erop dat de signaaltransductie route waarschijnlijk verloopt van CDC42 naar CaMKII en niet vice versa.

In **Hoofdstuk 3.2.** identificeren wij een met Dystrobrevin geassocieerde postsynaptische signaaltransductie route welke de neurotransmitter afgifte op het presynaptische membraan van de neuromusculaire eindplaat reguleert. Wij hebben met zowel genetische als biochemische assays de interactie tussen Dystrobrevin en de regulatoire subunit van Proteïne Kinase A (PKA-

R) aan kunnen tonen. De expressie van continu actief PKA, zowel pre- als postsynaptisch, kan de toegenomen neurotransmitter afgifte in de *dystrobrevin* mutant terugbrengen tot het normale niveau. Dit resultaat suggereert dat de interactie tussen PKA en Dystrobrevin van belang is voor de regulatie van synaptische homeostase.

In **Hoofdstuk 4** wordt de bijdrage van het DGC-geassocieerde eiwit Dystroglycan aan de synaptische homeostase gepresenteerd. In zoogdieren is aangetoond dat Dystrobrevin indirect is geassocieerd met Dystroglycan, via Dystrofine. Vermindering van de hoeveelheid aanwezig Dystroglycan, enerzijds de *Dystrofine* en anderzijds de *Dystrobrevin* mutant, onderdrukt de verhoogde neurotransmitter afgifte. Door terugplaatsing van Dystroglycan in de bovengenoemde mutant-genetische achtergronden is gebleken dat verschillende isoformen van dit eiwit zowel pre- als postsynaptisch kunnen functioneren. Verder zijn ook verlaagde Synaptotagmin en verhoogde CaMKII niveaus in de Dystroglycan mutant geassocieerd met een verlaging van presynaptische neurotransmitter afgifte.

Hoofdstuk 5 beschrijft de rol van de CNS-specifieke Dystrofine isoform Dp186 in het olfactorische systeem van *Drosophila*. Dp186 komt tot expressie in de olfactorische receptor neuronen (ORNs) van de antennae alsmede in de hogere orde hersencentra waar de door geur geïnduceerde signalen naartoe worden getransporteerd om vertaald te worden naar specifiek gedrag. Het Dp186 eiwit komt tot expressie in zowel de pre- als de postsynaptische compartimenten van de primaire olfactorische synapsen van de antennal lobes in de hersenen. Afwezigheid van Dp186 resulteert in een significante verlaging van de totale ORN activiteit, gemeten in een electroantennogram (EAG), zonder duidelijke anatomische defecten. De in de Dp186 mutant gemeten afname van de EAG amplituden kunnen hersteld worden door presynaptische expressie van Dp186. Aan de hand van reuktesten is vastgesteld dat Dp186 mutanten een verminderde, geur geïnduceerde, gedragsrespons vertonen t.o.v. controle fruitvliegen. We concluderen dat de Dystrofine isoform Dp186 een rol speelt in de registratie van primaire olfactorische informatie en van belang is voor het door deze informatie geïnduceerde gedrag.