

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Abteilung Neuroanatomie
Der Medizinischen Fakultät
Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Morphologische Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins Munc119 in
der Netzhaut**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2009

Vorgelegt von: Stefanie Käppel
geb. am: 11.12.1983
in Cottbus

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatter:

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	6
2.1.	Das Auge	6
2.2.	Die Retina	6
2.2.1.	Die Schichten der Netzhaut	7
2.2.2.	Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen	13
2.2.3.	Ganglienzellen	13
2.3.	Synapsen und Synapsentypen	14
2.3.1.	Elektrische Synapsen	14
2.3.2.	Chemische Synapsen	15
2.3.3.	Chemische Synapsen in der Retina	17
2.3.4.	Ribbonsynapsen	18
2.4.	RIBEYE	21
2.5.	Munc119	24
2.6.	Zielstellung dieser Arbeit	29
3.	Material und Methoden	30
3.1.	Untersuchungsmaterial	30
3.2.	Präparation	30
3.2.1.	Präparation der Retina aus Rinderaugen	30
3.2.2.	Präparation der Epiphyse und Augen einer Ratte	30
3.3.	Herstellung der Kryostatschnitte	31
3.4.	Immunfluoreszenzfärbung	31
3.4.1.	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	31
3.4.2.	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung	32
3.5.	Mikroskopische Analyse	33
3.6.	GST-Präabsorption	34
3.7.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot-Analyse	34
3.8.	Verwendete Antikörper und Bezugsquellen	35
3.9.	Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen	36
3.10.	Verwendete Lösungen	36

3.11.	Geräte und sonstige Hilfsmittel	37
4.	Ergebnisse	38
4.1.	Anti-Munc119	38
4.2.	Präabsorptionsexperimente	46
4.3.	Doppelfluoreszenzuntersuchungen	48
5.	Diskussion	57
5.1.	RIBEYE, eine Komponente synaptischer Ribbons	57
5.2.	RIBEYE interagiert mit Munc119	58
5.3.	Die Funktion von Munc119 für die synaptische Übertragung	59
5.4.	Munc119 ist essentiell für den Sehvorgang	60
5.5.	Munc119 interagiert mit CaBP4	60
6.	Literatur	63
7.	Danksagung	76
8.	Lebenslauf	77
9.	Publikation	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung a	Radialschnitt durch die adulte Affenretina aus: „The synaptic organization of the brain“, G. Shepherd, ed. 1998.....	7
Abbildung b	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Stäbchen-Endfußes und seines synaptischen Komplexes (Wässle et al., 2003).....	11
Abbildung c	Die elektrische Synapse nach Kandel et al.,1996.....	15
Abbildung d	Signalübertragung an chemischen Synapsen nach Kandel et al., 1995.....	17
Abbildung e	Chemische Synapsen in der Retina aus „The retina“, Dowling 1987.....	18
Abbildung f	Prognostizierte modellierte Struktur der RIBEYE(B)-Domäne nach Nardini et al., 2003.....	23
Abbildung g	Schematische Domänenstruktur von Munc119.....	25
Abbildung 1	Gereinigtes Munc119-GST-Fusionsprotein in der SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese.....	38
Abbildung 2	Western Blot-Analyse von gereinigtem Munc119-GST Fusionsprotein.....	39
Abbildung 3	Co-Immunopräzipitation von RIBEYE und Munc119 aus der bovinen Retina.....	40
Abbildung 4	Lokalisierung von Munc119 in der Retina.....	41
Abbildung 5	Inkubation eines Retinaschnitts nur mit Zweitantikörper (ohne Primäantikörper).....	41
Abbildung 6	Markierungen der Rinderretina mit dem Präimmenserum von Anti-Munc119 V2T2.....	42
Abbildung 7	Immunmarkierung der Rinderretina mit U26564 (Anti-RIBEYE(B)-Domäne).....	43
Abbildung 8	Inkubation eines Rinderretinaschnitts mit Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag (IT) mit PBS verdünnt im Verhältnis 1:100.....	43
Abbildung 9	Immunmarkierung mit Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag 1:500 verdünnt mit PBS.....	44

Abbildung 10	Immunmarkierung eines Rinderretinaschnitts mit Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag (IT) 1:1000 verdünnt mit PBS.....	44
Abbildung 11	Inkubation eines Kryoschnitts der Rinderretina mit Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag verdünnt mit PBS im Verhältnis 1:3000.....	44
Abbildung 12	Immunmarkierung eines Rinderretinaschnitts mit Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag verdünnt mit PBS im Verhältnis 1:5000.....	45
Abbildung 13	Immunmarkierung eines Kryoschnitts der Rinderretina mit Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag im Verhältnis 1:10000 mit PBS verdünnt.....	45
Abbildung 14	Kryostatschnitte der Rinderretina inkubiert mit GST-präabsorbiertem Anti-Munc119 V2T2 120. IT.....	46
Abbildung 15	Immunmarkierung eines Rinderretinaschnitts mit Munc119-GST-präabsorbiertem Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag.....	47
Abbildung 16	Doppelfluoreszenzuntersuchung von Munc119 und RIBEYE(B).....	49
Abbildung 17	Munc119 co-lokalisiert mit RIBEYE in der OPL der Rinderretina.....	50
Abbildung 18	Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 und Anti-CtBP1.....	52
Abbildung 19	Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 und Anti-CtBP1 in 100facher Vergrößerung.....	53
Abbildung 20	Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 V2T2 120. IT und Anti-GRIP.....	54
Abbildung 21	Immunmarkierung der Rinderretina mit Anti-Munc119 V2T2 120. IT, Anti-GRIP, sowie Überlagerung beider Markierungen.....	55
Abbildung 22	Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 und Anti-Synaptophysin, Überlagerung beider.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Antikörper und Bezugsquellen.....	35
Tabelle 2	Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen.....	36
Tabelle 3	Verwendete Lösungen.....	36
Tabelle 4	Geräte und sonstige Hilfsmittel.....	37

Abkürzungsverzeichnis

A	Amakrinzelle
B	Bipolarzelle
CaBP4	Calcium binding protein 4
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CH	Pigmentepithelzellschicht (choroid layer)
CtBP1	C-terminal binding protein 1
CtBP2	C-terminal binding protein 2
CT,RT	Stäbchen- und Zapfenterminalen
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
ELM	äußere Grenzmembran (external limiting membrane)
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
GRIP	glutamate receptor-interacting protein
GST	Glutathione-S-Transferase
H	Horizontalzelle
HRG4	Human retinal gene 4
INL	innere Körnerschicht (inner nuclear layer)
IPL	innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer)
IS	Innensegment der Photorezeptoren (inner segment)
IT	Immunisierungstag
M	Müllerzelle

ME	Müllerendfüßchen
Munc119	Mammalian UNC119
µm	Mikrometer
NFL	Nervenfaserschicht (n erve f iber l ayer)
nm	Nanometer
ONL	äußere Körnerschicht (o uter n uclear l ayer)
OPL	äußere plexiforme Schicht (engl. o uter p lexiform l ayer)
OS	Außensegment der Photorezeptoren (o uter s egment)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PrBP/δ	Preyl binding protein delta
RPE	retinales Pigmentepithel (r etinal p igment e pithelium)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
UNC119	Uncoordinated 119
YTH	Yeast two hybrid

Zusammenfassung

1. Zusammenfassung

Nervenzellen übertragen Informationen an distinkten Kontaktstellen, den Synapsen. An chemischen Synapsen erfolgt die interzelluläre Signalübertragung via Exozytose von neurotransmitterhaltigen synaptischen Vesikeln. Die Ribbonsynapse ist eine spezialisierte chemische Synapse, die sich in bestimmten Nervenzellen, wie z.B. Photorezeptorzellen und Bipolarzellen der Netzhaut, Haarzellen des Innenohrs sowie Pinealozyten findet. Ribbonsynapsen unterscheiden sich sowohl morphologisch als auch physiologisch von konventionellen chemischen Synapsen. Ein charakteristisches morphologisches Merkmal von Ribbonsynapsen sind große präsynaptische, elektronenmikroskopisch sichtbare Strukturspezialisierungen, die man als Synaptic Ribbons bezeichnet. Synaptic Ribbons sind in der aktiven Zone der Ribbonsynapse verankert und mit großen Mengen von synaptischen Vesikeln assoziiert. Von ihren physiologischen Eigenschaften sind Ribbonsynapsen tonisch aktive Synapsen, die eine große Bandbreite von Stimulusintensitäten präzise und dynamisch weiterleiten können. Diese große Menge von synaptischen Vesikeln, die am Synaptic Ribbon gebunden sind, lassen vermuten, dass die Synaptic Ribbons zentrales Strukturelement sind, das die Exozytose und Endozytose von synaptischen Vesikeln in dieser tonisch aktiven Synapse beschleunigt. Wie genau die Synaptic Ribbons auf molekularer Ebene arbeiten und zu den bemerkenswerten physiologischen Eigenschaften der Ribbonsynapse beitragen, ist jedoch noch unbekannt. Prof. Dr. Frank Schmitz und seine Arbeitsgruppe identifizierten ein Protein namens RIBEYE, das die Hauptkomponente der Synaptic Ribbons bildet.

RIBEYE besteht aus einer aminoterminalen A-Domäne und einer carboxyterminalen B-Domäne, die identisch mit dem Protein CtBP2 ist. Die RIBEYE(B)-Domäne wird weiter untergliedert in eine NADH-bindende Subdomäne (NBD) und eine Substrat-bindende Subdomäne (SBD). Die NADH-Bindung erfolgt mit hoher Affinität. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass RIBEYE ein Strukturprotein ist, mit idealen Eigenschaften, um die Synaptic Ribbons aufzubauen und um die ultrastrukturelle Plastizität, die diese Strukturen aufweisen, zu erklären. Um zu verstehen, wie RIBEYE und die Synaptic Ribbons auf molekularer Ebene arbeiten, ist es wichtig, neue Interaktionspartner von RIBEYE zu identifizieren und zu charakterisieren. Im Rahmen seiner Dissertation identifizierte Kannan Alpadi das Protein Munc119 als Interaktionspartner von RIBEYE. Diese Interaktion konnte mit verschiedenen unabhängigen Methoden bestätigt werden.

Munc119 besteht aus einer aminoterminalen prolinreichen Domäne (PRD) und einer carboxyterminalen Domäne, die homolog zum Prenylbindungsprotein δ (PRBP/ δ) ist.

Zusammenfassung

Funktionsstörungen im Munc119 führen zu Störungen im synaptischen Signalübertragungsprozess sowie im Sehvorgang, die sowohl beim Menschen als auch im entsprechenden Mausmodell zur Erblindung führen.

Ziel dieser Arbeit war die morphologische Untersuchung der Lokalisation des Proteins Munc119 in der Netzhaut, um ultrastrukturelle Informationen zur Interaktion von Munc119 mit RIBEYE zu erhalten. An zehn Mikrometer dicken Kryostatschnitten der Rinderretina habe ich Immunmarkierungen des Proteins Munc119 sowie Doppelfluoreszenzen mit anderen in der Retina lokalisierten Proteinen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Munc119 zu großen Mengen in der äußeren plexiformen Schicht der Retina lokalisiert ist, nicht jedoch in der inneren plexiformen Schicht. Präabsorbitionsexperimente bewiesen, dass diese Markierungen in der äußeren plexiformen Schicht des Munc119-Antigens durch Munc119-Antikörper spezifisch bewirkt wurden. In Doppelfluoreszenzuntersuchungen zeigte sich, dass Munc119 in sehr enger räumlicher Verbindung zu RIBEYE lokalisiert ist, in seiner Verteilung jedoch nicht auf die Synaptic Ribbons beschränkt ist. Auch im Vergleich zu CtBP1, welches die Synaptic Ribbons in typischer hufeisenförmiger Anordnung markiert, zeigt sich Munc119 als etwas diffuser, jedoch in sehr enger räumlicher Beziehung zu den Synaptic Ribbons lokalisiert. Dies bekräftigt die Annahme, dass Munc119 eine lösliche, peripher gebundene Komponente in Ribbonsynapsen ist, die nach Bedarf an die Synaptic Ribbons rekrutiert wird (Ph.D.Th. Kannan Aljadi, Aljadi et al., 2008). Im Vergleich zu GRIP (glutamate receptor interacting protein), einem postsynaptischen Strukturprotein an Glutamatrezeptoren wird deutlich, dass Munc119 in der Präsynapse lokalisiert ist. Eine Doppelfluoreszenzuntersuchung mit Synaptophysin, einem synaptischen Vesikelprotein, welches als Marker für Nerventerminalen dient, verdeutlicht, dass Munc119 nur in Synaptophysin-positiven Nerventerminalen zu finden ist. Zusammenfassend wäre zu sagen, dass Munc119 stark in den präsynaptischen Terminalen der äußeren plexiformen Schicht exprimiert wird und dort mit RIBEYE in den Synaptic Ribbons co-lokalisiert. Interessanterweise besitzen aus der Retina gereinigte Synaptic Ribbons, die stringente Waschschriffe bei der Reinigung durchlaufen, wenig Munc119 (Ph.D.Th. Kannan Aljadi, Aljadi et al., 2008). Diese gereinigten Synaptic Ribbons können aber spezifisch Munc119-Fusionsprotein binden. Dies weist darauf hin, dass Munc119 eine peripher assoziierte Komponente der Synaptic Ribbons ist, die relativ leicht von den Synaptic Ribbons abdissoziieren kann. Die Faktoren, die die Assoziation und Dissoziation von Munc119 mit den Synaptic Ribbons regulieren, gilt es durch zukünftige Untersuchungen zu identifizieren. Die synaptischen Defekte, die in Munc119-tragenen Mäusen und in Munc119-defizienten

Zusammenfassung

Patienten beobachtet wurden, betonen die große Wichtigkeit von Munc119 für den Sehprozess und für synaptische Prozesse in der Photorezeptorsynapse. Die Tatsache, dass die PrBP/ δ -Domäne von Munc119, die auch entscheidend für die Funktion von Munc119 ist, auch die Interaktion mit RIBEYE vermittelt, betont weiter die physiologische Bedeutung der RIBEYE-Munc119-Interaktion in der Photorezeptorsynapse und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Zusammenfassung

Summary

Nerve cells communicate at distinct intercellular contact sites, the synapses. At chemical synapses signal transduction occurs via exocytosis of neurotransmitter-containing synaptic vesicles with the presynaptic plasma membrane. The ribbon synapse is a specialized chemical synapse present in certain types of neurons such as rod and cone photoreceptors, retinal bipolar cells, hair cells and pinealocytes. Ribbon synapses differ from conventional synapses both morphologically and physiologically. Characteristic feature of ribbon synapses are large electron-dense presynaptic specializations, called synaptic ribbons. Synaptic ribbons are anchored at the active zone and associated with large amounts of synaptic vesicles. Physiologically, ribbon synapses are characterized by tonic neurotransmitter release, which is optimized for very rapid and sustained neurotransmitter release. The large amounts of synaptic vesicles indicate that synaptic ribbons are a central component which speeds synaptic vesicle trafficking. But how the synaptic ribbon works on molecular level is still largely unknown. Prof. Dr. Frank Schmitz identified the protein RIBEYE as a major component of synaptic ribbons. RIBEYE consists of a unique aminoterminal A-domain and a carboxyterminal B-domain which is identical to the protein CtBP2. RIBEYE(B)-domain consists of a NADH-binding subdomain (NBD) and substrate-binding subdomain (SBD). We demonstrated that RIBEYE is a scaffolding protein with ideal properties to explain the assembly of the synaptic ribbons and its ultrastructural dynamics via a modular assembly mechanism. To better understand how RIBEYE and synaptic ribbons work on the molecular level the identification and characterisation of novel interaction partners of RIBEYE was expected to obtain important information. Kannan Aljadi identified Munc119 as an interaction partner of RIBEYE. This interaction could be approved by five independent approaches. Munc119 consists of an aminoterminal Proline-rich domain (PRD) and a carboxyterminal Prenyl-binding-protein- δ (PrBP/ δ) homology domain. Munc119 is essential for synaptic transmission in photoreceptor ribbon synapses and vision by unknown molecular mechanisms.

Goal of the present thesis work was the morphologically analysis of the localisation of Munc119 in the retina to obtain ultrastructural information about the Munc119-RIBEYE interaction. The co-immunoprecipitation experiments from bovine retina demonstrated the presence of Munc119 on synaptic ribbons. Large amounts of Munc119 were found at synaptic ribbons in the outer plexiform layer and in close vicinity to synaptic ribbons. In the inner plexiform layer no Munc119 was found. The binding of Munc119 was specific because the control protein, GST did not bind to synaptic ribbons. Immunolabelling with Munc119 and

Zusammenfassung

RIBEYE has shown that Munc119 co-localizes with RIBEYE in the outer plexiform layer. Munc119 was found in close vicinity to RIBEYE. Compared to CtBP1, which assigns synaptic ribbons, Munc119 is localized more diffuse, but similar to CtBP1. This confirms the assumption that Munc119 is a peripheral protein component of synaptic ribbon that can relatively easily dissociate from synaptic ribbons. In comparison to GRIP (glutamate receptor-interacting protein), a postsynaptic protein, Munc119 is localized in the presynaptic nerve terminal. Immunolabeling with Synaptophysin, a synaptic vesicle protein, which selects nerve terminals, showed that Munc119 is only localized in Synaptophysin-positive nerve terminals. In conclusion could be said that strong immunosignals of Munc119 were found at synaptic ribbons and co-localize with RIBEYE in the outer plexiform layer in the bovine retina.

Interestingly, the purified synaptic ribbons isolated from bovine retina specifically recruited Munc119 in synaptic ribbon pull-down assays. Since Munc119 is virtually absent from purified synaptic ribbon, but appears to be a synaptic ribbon-associated component that can easily dissociate from synaptic ribbons. The factors that regulate the association and dissociation of Munc119 with the synaptic ribbons *in vivo*, should to be elucidated by further analyses.

The synaptic defects observed in Munc119-transgenic mice and Munc119-deficient patients stress the role of Munc119 for vision and synaptic processing in the visual system. The PrBP/ δ homology domain which is crucial for Munc119 function was shown to be the interaction domain with RIBEYE. This finding particularly emphasizes the physiological importance of the RIBEYE-Munc119 interaction for synaptic transmission at the photoreceptor ribbon synapse and should be determined in further analyses.

Einleitung

2. Einleitung

2.1. Das Auge

Das Auge ist ein Sinnesorgan, das zur abbildenden Wahrnehmung von elektromagnetischer Strahlung (Licht) dient. Für den Menschen ist der Lichtsinn von sehr großer Bedeutung, er ist der Leitsinn, der eine sichere Orientierung ermöglicht. Der adäquate Reiz beim Menschen sind elektromagnetische Strahlungen im Spektrum von ca. 380 nm (violett/blau) bis 760 nm (rot) (Luo, 2000). Der Phototransduktionsprozess in den Außensegmenten der Photorezeptoren umfasst die Umwandlung von Lichtreizen über die Reaktion der Phototransduktionskette in chemische und danach in elektrische Impulse. Die in abgestufte Potentialänderungen transformierten Lichtsignale werden an der Photorezeptorsynapse an die nachgeschalteten Zellen in der Retina und nachfolgend über den Sehnerv an die übergeordneten Zentren des visuellen Systems (Corpus geniculatum laterale, corticale Sehzentren) weitergeleitet.

2.2. Die Retina

Die Retina (Netzhaut) ist eine Schicht von spezialisiertem Nervengewebe an der hinteren Innenseite des Auges. In ihr wird das auftreffende Licht, nachdem es die Hornhaut, die Linse und den Glaskörper durchquert hat, in elektrische Impulse umgewandelt. Die Netzhaut besteht aus mehreren Schichten. Fällt ein Lichtstrahl auf die Netzhaut, so durchquert er zuerst die Nervenfaserschicht, dann die Ganglienzellschicht sowie die innere und äußere Körnerschicht. Durch diesen inversen Aufbau ist die intensive Versorgung der äußeren Körnerschicht durch die Aderhaut gewährleistet. Funktionell lässt sich die Retina in drei Abschnitte unterteilen. Stäbchen und Zapfen bilden dabei das erste Neuron. Die in der inneren Körnerschicht gelegenen Bipolarzellen werden als das zweite Neuron aufgefasst und die in der Ganglienzellschicht angesiedelten Ganglienzellen bilden das dritte Neuron. Das Licht erreicht das erste Neuron also erst, nachdem es das zweite und dritte Neuron passiert hat.

Einleitung

2.2.1. Die Schichten der Netzhaut

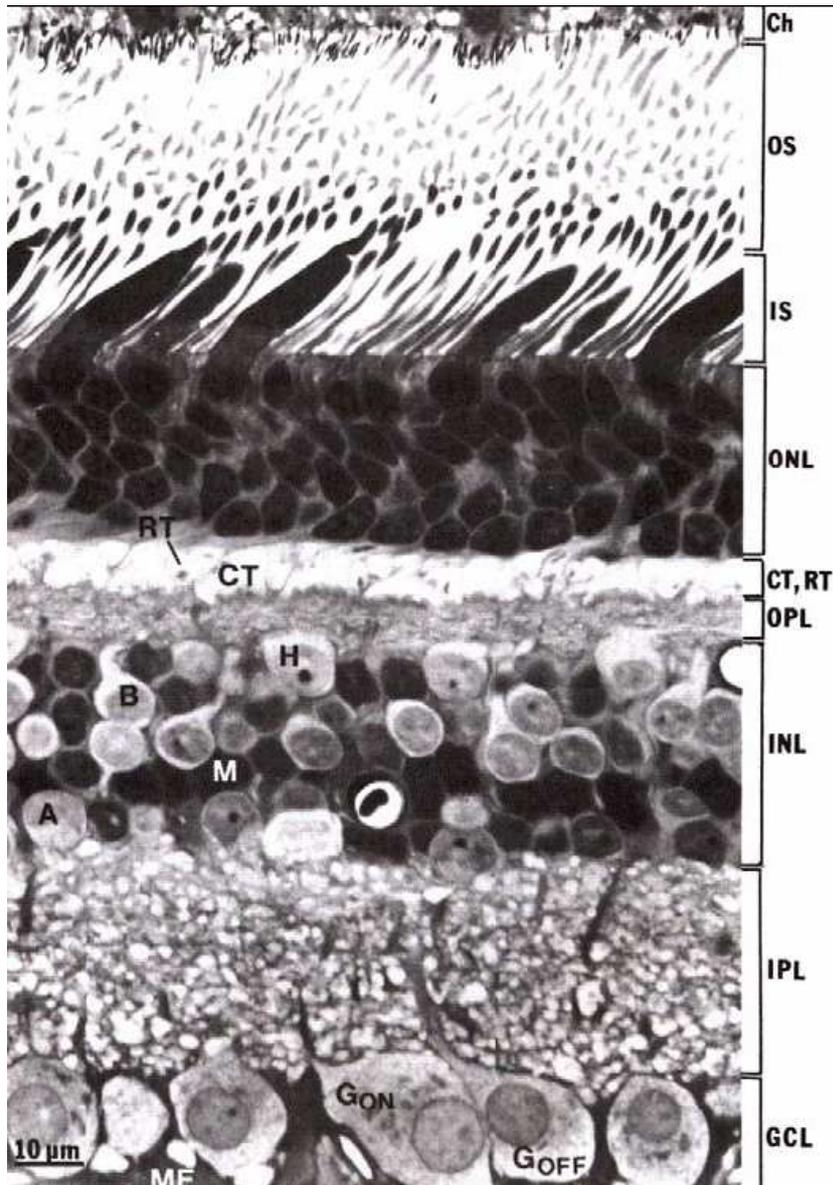


Abbildung a : Radialschnitt durch die adulte Affenretina ca. 5 mm von der fovea centralis entfernt. Aus: „The synaptic organization of the brain“, Sterling, P. Fourth edition, 1998.

CH:	Pigmentepithel
OS:	Außensegmente der Photorezeptoren
IS:	Innensegmente der Photorezeptoren
ONL:	äußere Körnerzellschicht
OPL:	äußere plexiforme Schicht mit
CT,RT:	Stäbchen- und Zapfenterminalen
INL:	innere Körnerzellschicht
H:	Horizontalzelle
B:	Bipolarzelle
A:	Amakrinzelle
M:	Müllerzelle
IPL:	innere plexiforme Schicht
GCL:	Ganglienzellschicht mit ON- und OFF-Ganglienzellen
ME:	Müllerendfüßchen

Nicht dargestellt sind die innere Grenzmembran und die Nervenfaserschicht.

Einleitung

Das retinale Pigmentepithel

Das RPE (retinal pigment epithelium) dient der Absorption von Streulicht (400-800nm) und dem Stoffaustausch mit den Außengliedern der Photorezeptoren.

Es ist ein hexagonal aufgebautes, einschichtiges Epithel mit Melanosomen, die das Streulicht absorbieren. Mikrovilläre Fortsätze umgreifen die Photorezeptorzellen, sie dienen der Ernährung, phagozytieren die Photorezeptorspitzen und regenerieren gebleichtes Retinal aus aktiviertem Rhodopsin. Außerdem verhindert das RPE ein Eintreten von Blut aus der stark vaskularisierten Choriocapillaris (Blut-Retina-Schranke).

Die Photorezeptorzelle

Den Photorezeptoren kommt unter den Zellen der Netzhaut besondere Bedeutung zu, weil sie für die Phototransduktion verantwortlich sind. Sie sind stark polarisierte Zellen. Die menschliche Netzhaut enthält etwa 120 Millionen Stäbchen, welche auf das Sehen bei schwacher Beleuchtung spezialisiert sind (skotopisches Sehen) und etwa sechs Millionen Zapfen, die für das Farbsehen (photopisches Sehen) verantwortlich sind. Von den Zapfen gibt es drei Subtypen, die ihr jeweiliges Absorptionsmaximum im blauen (440nm), grünen (535nm) und roten (565nm) Spektralbereich haben. Die Zapfen sind jedoch weniger lichtsensitiv als die Stäbchen, daher verändert sich das Farbempfinden bei Nacht, der sogenannte Purkinje-Effekt (Eloholma, 2006).

Schon ein einziges Photon kann ein Stäbchen aktivieren, allerdings müssen mehrere Stäbchen aktiviert werden, damit die Netzhaut die Anwesenheit von Licht signalisiert (Rayer, 1990).

Beim Auftreffen eines Photons auf das in Membranstapel der Photorezeptoren eingelagerte Rhodopsin (=Stäbchenopsin) erfährt dieses eine Konformationsänderung. Dadurch wird eine Enzymkaskade ausgelöst, die visuelle Signaltransduktionskaskade, die schließlich zur Aktivitätsänderung der Nervenzellen führt (zur Übersicht siehe Purves et al., 2001).

Die Photorezeptorzellen bestehen aus einem Außensegment, einem Innensegment, dem Zellkörper mit Zellkern, welcher in der äußeren Körnerschicht liegt und einem Axon mit einer spezialisierten präsynaptischen Terminale, die in der äußeren plexiformen Schicht endet.

Einleitung

Das Außensegment

Das OS (outer segment) ist ein spezialisiertes Zellkompartiment der Photorezeptoren. In den Außensegmenten findet ein wesentlicher Teil der visuellen Signaltransduktion mittels des mit Retinal gekoppelten Proteins Rhodopsin statt. Im Aufbau des Außensegments unterscheiden sich die beiden Photorezeptortypen. Die Außensegmente der Stäbchen sind lang, schmal und grenzen an das retinale Pigmentepithel. Die Außensegmente der Zapfen sind dagegen wie die gesamte Zapfenphotorezeptorzelle kürzer und breiter als die Stäbchen und laufen konisch zu. Das Außensegment ist über ein modifiziertes Cilium in dezentraler Lage, das Verbindungscilium, mit dem Rest der Zelle verbunden. Neun Mikrotubuli-Dupletts in nonagonaler Anordnung bilden die innere Struktur dieses unbeweglichen Ciliums.

Weiterhin besitzen die Außensegmente entweder viele membranöse „disks“ in den Stäbchen oder Membraneinfaltungen in den Zapfen, in welches das Rhodopsin eingelagert ist. Rhodopsin macht über 90% der Proteinmasse im Außensegment aus.

Das Innensegment

Das IS (inner segment) ist der Bereich der Photorezeptorzellen, der Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum (ER) enthält. Das Innensegment besteht aus einem distalen azidophilen Ellipsoid, das mit Mitochondrien ausgefüllt ist, und einem proximalen basophilen Myoid in dem sich glattes ER, Ribosomen und Anteile des Golgi-Apparates befinden

IS und OS werden durch ein schmales Verbindungscilium voneinander getrennt, durch das alle Substrate für das OS aktiv transportiert werden müssen. Auch entstehen hier neue Diskenmembranen, dies sind Membranabschnürungen bepackt mit Rhodopsin. Durch die Neusynthese bewegen sich diese Disks zum retinalen Pigmentepithel und werden dort phagozytiert.

Die äußere Grenzmembran

Die äußere Grenzmembran ist eine abschließende, undurchlässige Membran. Sie wird durch Ausläufer der Müllerschen Zellen und Zelladhäsionsverbindungen (adhering junctions) mit den Photorezeptorzellen gebildet. Dieses fibrilläre Netzwerk lässt kreisförmige Öffnungen für den Durchtritt der Rezeptoren frei.

Einleitung

Die äußere Körnerschicht (ONL)

Die ONL (outer nuclear layer) enthält die Zellkörper der Photorezeptoren, Zellkörper von Zapfen und Stäbchen sind parallel nebeneinander gruppiert und strecken ihre lichtempfindlichen Fortsätze, die Außensegmente in Richtung des retinalen Pigmentepithels aus.

Die präsynaptische Terminale der Photorezeptoren

Die Synapsen der Photorezeptoren befinden sich in der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Die OPL ist somit die erste synaptische Schaltstelle in der Retina. Hier werden die Lichtsignale der Zapfen und Stäbchen, über die Freisetzung des chemischen Transmitters Glutamat, auf die nachgeschalteten Nervenzellen, die Horizontal- und Bipolarzellen, übertragen. Die Menge an freigesetztem Glutamat hängt von der herrschenden Lichtintensität ab, und die Photorezeptoren passen ihre Glutamatfreisetzung ständig den sich ändernden Lichtintensitäten an. Dazu bedarf es einer spezialisierten chemischen Synapse, die kontinuierlich viele Transmittervesikel zur Exozytose bereitstellt (zur Übersicht siehe Wässle et al., 2003). Diese spezialisierte Photorezeptorsynapse besteht aus einem präsynaptischen Organell, dem synaptischen Band, zwei lateralen, invaginierenden Fortsätzen von Horizontalzellen und ein bis zwei zentralen invaginierenden postsynaptischen Dendriten von Bipolarzellen (Abb. b) Wässle et al. haben 2003 herausgefunden, dass die Horizontalzellen und vor allem die verschiedenen Bipolarzellen, die mit den Endfüßchen der Photorezeptoren in Kontakt treten, an ihren Kontaktstellen Rezeptormoleküle exprimieren, die unterschiedlich auf Glutamat ansprechen. Dadurch wird das Lichtsignal der Photorezeptoren in unterschiedliche, parallel arbeitende Bipolarzellbahnen eingespeist und durch die Retina geleitet.

Einleitung

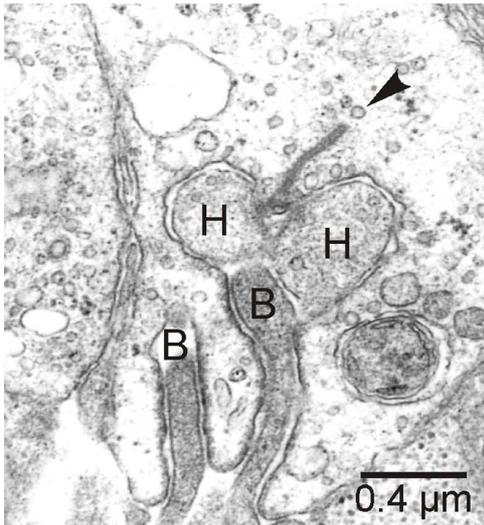


Abb. b: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Stäbchen-Endfußes und seines synaptischen Komplexes. Das synaptische Band (Pfeilspitze) ist an der aktiven Zone der Präsynapse verankert. An der Basis des synaptischen Bandes wird kontinuierlich Glutamat freigesetzt, das die nachgeschalteten Nervenzellen, die Bipolarzellen (B) und Horizontalzellen (H), erregt beziehungsweise hemmt.

Die äußere plexiforme Schicht (OPL)

In der OPL (outer plexiform layer) verschalten sich die Dendriten der Horizontal- und Bipolarzellen mit Terminalen der Photorezeptoren und bilden so die erste Stufe der intraretinalen Informationsverarbeitung.

Daneben finden sich hier auch Fortsätze der Müller'schen Stützfasern und in der Übergangszone zur nächsten Schicht das tiefere Versorgungsnetz der retinalen Kapillaren, die aus der Arteria centralis retinae stammen.

Die innere Körnerschicht (INL)

Die INL (inner nuclear layer) enthält die Zellkörper von Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen für die Vorverarbeitung von Signalen. Außerdem sind hier die Zellkörper des neuronalen Stützgewebes, der Müller'schen Gliazellen angesiedelt.

Die innere plexiforme Schicht (IPL)

In die IPL (inner plexiform layer) ziehen die Dendriten der Ganglien- und Amakrinzellen sowie die Axonterminalen der Bipolarzellen und bilden einen dichten Plexus. Die Bipolarzellen übermitteln die Signale der Photorezeptoren aus den äußeren Retinaschichten.

Einleitung

Die Signale werden durch synaptische Interaktionen mit Amakrinzellen und Ganglienzellen moduliert und schließlich an die Ganglienzellen weitergeleitet.

Die Ganglienzellschicht (GCL)

Die GCL (ganglion cell layer) enthält die Zellkörper der Ganglienzellen. Die unterschiedlich großen Zellkörper liegen in der peripheren Retina meist einschichtig, in zentralen Anteilen jedoch mehrschichtig. Neben Ganglienzellen findet man in der GCL noch einige Amakrinzelltypen und Gliazellen.

Die Nervenfaserschicht (NFL)

Die NFL (nerve fiber layer) besteht aus Anhäufungen der Axone der Ganglienzellen. Sie tragen die Informationen aller Photorezeptoren nach außen. Die menschliche NFL enthält etwa 1 Million Ganglienzellaxone, ihre Fasern sind marklos und erhalten ihre Markscheiden erst nach Austritt aus dem Bulbus.

In der Fovea centralis ist die Faserdichte am geringsten. Zwischen ihr und der Papille laufen die Axone bogenförmig zusammen und bilden das makulo-papilläre Bündel. Alle übrigen Nervenfasern laufen um dieses Bündel bogenförmig herum und überschreiten nie die horizontale Mittellinie. Die Ganglienzellaxone der vorderen Retina, deren Zellkörper am weitesten von der Papille entfernt liegen, verlaufen am weitesten außen in der Faserschicht und liegen auch im Sehnerv peripher. Analog dazu liegen Axone der Ganglienzellen, die näher zur Pupille liegen auch zentraler im Sehnerv. In der NFL und der angrenzenden Ganglienzellschicht verlaufen außerdem die größeren Blutgefäße der Retina.

Die innere Grenzmembran

Die innere Grenzschicht der Retina bilden die Basal- und Plasmamembranen der Müllerschen Zellen sowie Kollagenfasern und Proteoglykoside. Sie bilden die innere Begrenzung der Retina gegen den Glaskörper. Sie bedecken die gesamte Retina und gehen vorn mit einer etwas vergrößerten Struktur in die Zonulalamelle über.

Einleitung

2.2.2. Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen

Die Horizontalzellen sind lateral verschaltete Interneuronen, die Photorezeptorzellen miteinander verschalten. Sie dienen unter anderem zur Kontrastverstärkung durch laterale Inhibition benachbarter Photorezeptoren. Horizontalzellen stehen über gap junctions miteinander in Verbindung (zur Übersicht siehe Wässle et al., 2003)

Die Bipolarzellen sind die zentripetal verschalteten sekundären Neurone der Sehbahn. Sie werden durch die Photorezeptorzellen innerviert. Man unterscheidet verschiedene Typen von Bipolarzellen: verschiedene Typen, die Zapfen kontaktieren (Zapfen-Bipolarzellen) und einen Typ, der Stäbchen kontaktiert (Stäbchen-Bipolarzellen). Dabei kann ein Zapfen mit bis zu 15 verschiedenen Bipolarzellen kontaktieren, aber auch mit nur zwei Kleinstbipolaren (Boycott und Wässle, 1991). Bipolarzellen innervieren die Amakrinzellen und Ganglienzellen. Amakrinzellen sorgen ähnlich den Horizontalzellen für die laterale Verschaltung in dieser Schicht der Retina und tragen so zur Modulation der Signalverarbeitung bei. Es gibt insgesamt über 30 verschiedene Amakrinzelltypen, in denen man bereits jeden Neurotransmitter des ZNS gefunden hat (Boycott und Wässle, 1991; Masland, 2001 a,b).

2.2.3. Ganglienzellen

Den Bipolar- und Amakrinzellen nachgeschaltet sind die Ganglienzellen. Sie sind die Ausgangsneurone der Netzhaut und leiten die visuelle Information über den Nervus opticus zum Ganglion geniculatum laterale im Gehirn weiter. Insgesamt übernehmen 10-15 verschiedene Ganglienzelltypen die Signale von den Bipolarzellen (Masland, 2001a).

Diese große Vielfalt an Nervenzellen in der Retina mit ihren unterschiedlichen Morphologien und Funktionen, sowie ihren komplexen Verschaltungen untereinander bildet die Basis für die vielfältigen, hochkomplexen Leistungen der Retina (Boycott und Wässle, 1991; Brandstätter et al., 1998)

Einleitung

2.3. Synapsen und Synapsentypen

Eine Nervenzelle (Neuron) besteht grundsätzlich aus einem Zellkörper (Soma) und aus einem oder mehreren Fortsätzen. Die Fortsätze werden in Dendriten (dienen dem Erregungsempfang) und Axone (dienen der Erregungsweitergabe) unterteilt. Am Ende eines Axons befindet sich eine terminale Aufzweigung (Telodendron). Die Enden dieser Aufzweigungen wiederum weisen kleine, knötchenförmige Auftreibungen auf, die synaptischen Endknöpfchen. Zusammen mit der Zellmembran der nachfolgenden Zelle und dem dazwischen liegenden Spalt bilden sie die Synapsen. Synapsen bilden somit Kontaktstellen zwischen den Nervenzellen und dienen der Informationsübertragung.

Es gibt zwei Typen von Synapsen, an denen Nervenzellen miteinander kommunizieren: elektrische Synapsen und chemische Synapsen. Diese beiden Synapsentypen werden nachfolgend kurz beschrieben.

2.3.1. Elektrische Synapsen

Bei den so genannten gap junctions sind Prä- und Postsynapse bis auf einen Spalt von zwei Nanometer aneinandergelagert und über Proteinkomplexe, die Connexone verbunden. Connexone bestehen aus sechs Untereinheiten aus Connexin, die so angeordnet sind, dass in ihrer Mitte eine wassergefüllte Pore entsteht. Der so gebildete etwa 1,5 nm im Durchmesser betragende Kanal dient dem bidirektionalen Austausch von Ionen, Metaboliten, second messengern und anderen Molekülen, die kleiner als 1 kDa sind (Meier und Dermietzel, 2006). Die Durchlässigkeit der Kanäle ist von der Zusammensetzung der Connexone abhängig und zusätzlich durch pH-Wert-Änderungen und Phosphorylierungen der Connexine modulierbar. (Vaney et al.,1998)

Wird eine der durch gap junctions miteinander verbundenen Zellen durch ein Aktionspotential depolarisiert, so entsteht ein Potenzialgefälle zwischen der depolarisierten (präsynaptischen) und der nicht-depolarisierten (postsynaptischen) Zelle. Durch die Connexone fließen nun positive Ionen entlang des Potenzialgefälles in die postsynaptische Zelle. Erreicht die daraus resultierende Depolarisation einen Schwellenwert, so kann es auch in der Postsynapse zu einem Aktionspotential kommen.

Die Ionenströme entstehen aufgrund der kurzen Distanz praktisch ohne Zeitverzögerung (weniger als 0,1ms).

Einleitung

Nachteilig ist jedoch zu bemerken, dass nur benachbarte Zellen kommunizieren können. Außerdem ist eine Erregungsübertragung auf entfernte Zellen nicht möglich. Prä- und Postsynapse sind immer im gleichen Erregungszustand, so dass eine Hemmung aus einer Erregung hinaus unmöglich ist. Darum bilden elektrische Synapsen im Vertebratenhirn Ausnahmen und sind lediglich in der Retina (in der IPL und OPL), im Hirnstamm, in den Vestibulariskernen und der unteren Olive zu finden.

In der OPL sind die Zapfen untereinander und in der IPL die Stäbchenbipolaren mit den Amakrinzellen über gap junctions verbunden (Boycott und Wässle, 1991; Veruki und Hartveit, 2002).

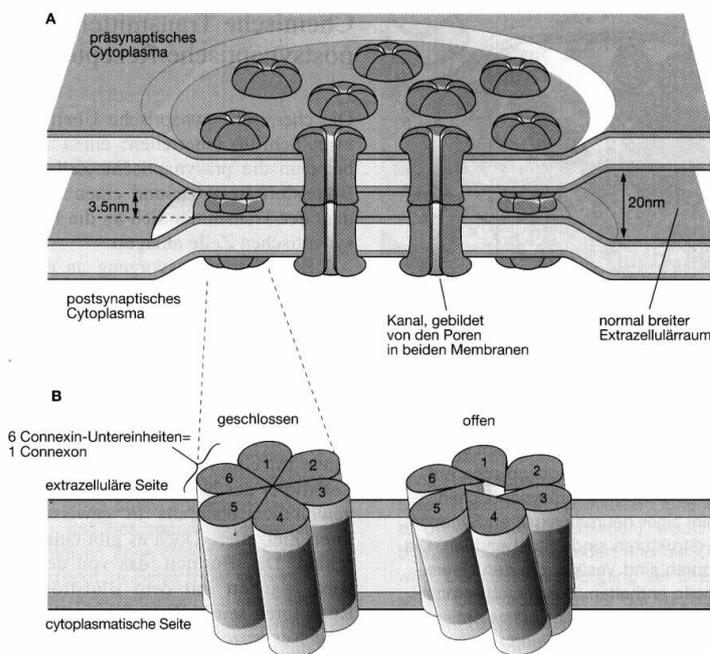


Abb. c: Elektrische Synapse nach Kandel et al., 1996.

Dreidimensionales Modell einer elektrischen Synapse mit zwei angeschnittenen gap junctions, die sich aus zwei Hemikanälen zusammensetzen. Diese wiederum sind aus den sog. Connexonen aufgebaut. Durch den von ihnen geöffneten Kanal wird eine zytoplasmatische Verbindung benachbarter Zellen hergestellt.

2.3.2. Chemische Synapsen

Auch die chemische Synapse dient der Erregungsübertragung vom präsynaptischen auf das postsynaptische Neuron. Da das Ruhemembranpotenzial der Zelle ein Fließgleichgewicht zwischen Ionenströmen darstellt, kann es durch Änderung der Durchlässigkeit für bestimmte Ionen verändert werden. Dies ermöglicht die chemische Signalübertragung, die im Folgenden beschrieben wird.

Die chemische Erregungsübertragung erfolgt durch einen extrazellulären, etwa 20 nm breiten synaptischen Spalt, der die Membranen der prä- und postsynaptischen Zellen voneinander

Einleitung

trennt. In der präsynaptischen Axonendigung befinden sich je nach Zelle wenige (5-10) bis einige Tausend membranumhüllte synaptische Vesikel, die einen Durchmesser von ungefähr 30-50 nm haben und jeweils 10^4 bis $5 \cdot 10^4$ Transmittermoleküle enthalten.

Trifft in der präsynaptischen Axonendigung ein Aktionspotential oder z.B. in den Photorezeptoren eine abgestufte Potenzialänderung ein, wird sie depolarisiert. Die Depolarisation aktiviert die Ca^{2+} -Kanäle der Axonendigung, Ca^{2+} tritt ein. Die gestiegene Ca^{2+} Konzentration innerhalb der Zelle löst die Exozytose von Transmitter-enthaltenden Vesikeln aus und diese entleeren ihren Inhalt in den extrazellulären Raum. Der Transmitter diffundiert durch den extrazellulären Raum und bindet an Rezeptormoleküle in der postsynaptischen Membran. Die Anheftung des Transmitters an der Postsynapse aktiviert entweder ionotrope oder metabotrope Rezeptoren. Ionotrope Rezeptoren sind Ionenkanäle, die sich bei Bindung des Liganden öffnen und dadurch die Leitfähigkeit der Membran für einwertige Kationen unspezifisch verändern. Welche Kationen fließen, ist abhängig vom elektrochemischen Gradienten. Der Einstrom positiver Ionen führt zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran, die als exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) bezeichnet wird. Dieses zunächst lokal im Synapsenbereich gebildete EPSP breitet sich passiv elektrotonisch über die gesamte postsynaptische Zellmembran aus und gehorcht dabei dem Alles-oder-nichts-Gesetz. Werden viele exzitatorische Synapsen gleichzeitig oder kurz nacheinander aktiviert, summieren sich die Ströme und depolarisieren die gesamte Zelle. Wird ein Schwellenwert erreicht, werden schlagartig spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet und die Zelle bildet ein Aktionspotential aus.

Metabotrope Rezeptoren aktivieren bei Bindung ihres Liganden ein nachgeschaltetes G-Protein oder eine Proteinkinase und modulieren damit intrazelluläre Signalkaskaden durch Konzentrationsänderungen von sekundären Botenstoffen.

Einleitung

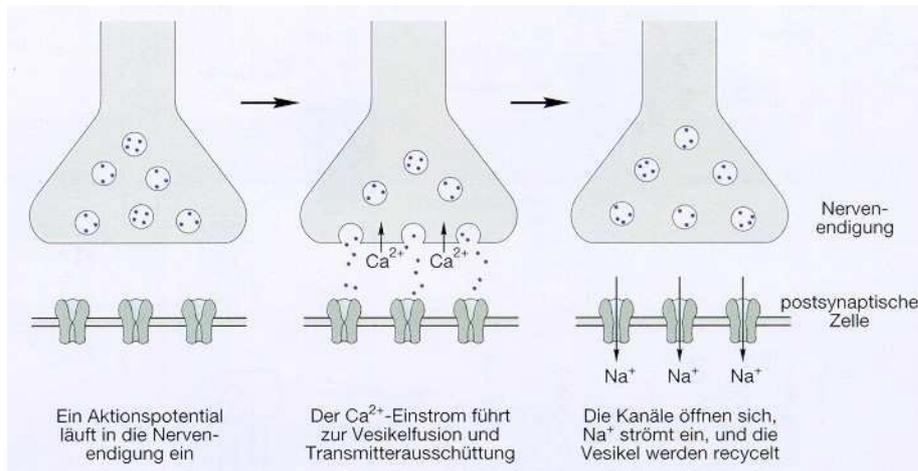


Abb. d: Chemische Synapse: synaptische Vesikel schütten Transmitter aus, die den synaptischen Spalt überqueren und dort an Rezeptormoleküle in der postsynaptischen Membran binden. (Kandel et al., 1995)

Aufgrund der komplexen Übersetzung von elektrischen in chemische Signale ist die Latenzzeit der chemischen Synapse im Vergleich zur elektrischen Synapse wesentlich länger, sie liegt zwischen 0,3 und mehreren Millisekunden.

Die Fähigkeit zur Regulierung der Intensität der übertragenen Signale durch Modulierung der Teilprozesse führte dazu, dass sich die chemische Synapse gegenüber der elektrischen in den meisten Systemen durchgesetzt hat.

2.3.3. Chemische Synapsen in der Retina

In der Netzhaut befinden sich neben konventionellen chemischen Synapsen auch besonders spezialisierte chemische Synapsen, die Ribbonsynapsen (Sterling, 1998; Dowling, 1987).

Diese Ribbonsynapsen findet man nur in Vertebraten, wo sie in sensorischen Synapsen mit außergewöhnlichen Anforderungen gefunden wurden. In der Retina enthalten Photorezeptor- und Bipolarzellen klassische Ribbonsynapsen (Dowling, 1987; Sterling, 1998). Außerdem findet man sie in den Haarzellen der Cochlea (Smith und Sjöstrand, 1961) und dem Vestibularorgan (Flock, 1964), sowie in der Glandula pinealis (Hopsu und Arstila, 1964).

Abgesehen von der Epiphyse, wo die Funktion der Ribbonsynapsen unklar ist, haben sie sich als essentielle Bestandteile der zwei wichtigsten Sinne von Wirbeltieren entwickelt, Hören und Sehen. Durch ihre speziellen physiologischen Eigenschaften ermöglichen sie die Übertragung eines kontinuierlichen Flusses an Informationen (Dowling, 1987; Juusola et al., 1996).

Einleitung

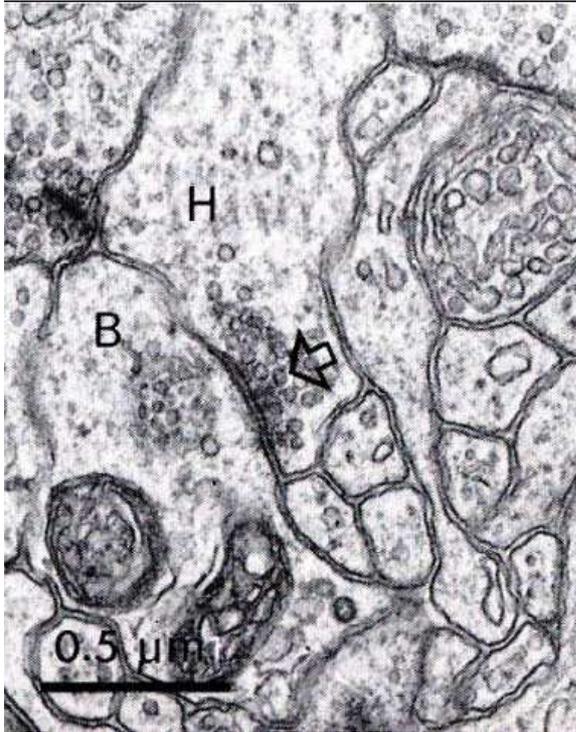


Abbildung e: aus: „The Retina“, Dowling, 1987.

Abgebildet ist eine konventionelle chemische Synapse in der Retina, die Präsynapse wird von einer Horizontalzelle (H), die Postsynapse von einer Bipolarzelle (B) gebildet. Der Pfeil zeigt auf eine Ansammlung synaptischer Vesikel um die aktive Zone.

2.3.4. Ribbonsynapsen

In der Retina von Vertebraten findet man Ribbonsynapsen in der inneren plexiformen Schicht (Terminalen der Bipolarzellen) und in der äußeren plexiformen Schicht (Terminalen von Zapfen- und Stäbchenrezeptorzellen).

Die Ribbonsynapse der Photorezeptoren ist folgendermaßen aufgebaut: Eine große präsynaptische Rezeptorterminale kontaktiert zwei dendritische Horizontalzellfortsätze sowie einen oder zwei dendritische Fortsätze von Bipolarzellen, die die Postsynapsen darstellen (Boycott und Kolb, 1973; Gray und Pease, 1971; Rao-Mirotnik et al., 1995)

Die postsynaptischen Dendriten liegen in einer Einbuchtung (Invagination) der Präsynapse.

Bei den Stäbchenphotorezeptorsynapsen wird die typische Anordnung von vier postsynaptischen Dendriten als Tetrade bezeichnet, wohingegen die Anordnung von nur drei Dendriten bei den Zapfenphotorezeptorzellen als Triade bezeichnet wird.

Diese Form der Ribbonsynapsen findet sich nur in Vertebraten. Stellvertretend für Invertebraten wurden in der präsynaptischen Terminale der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* T-förmige Strukturen gefunden (Trujillo-Cenoz, 1972; Wan et al., 2000), die den Ribbons ähnlich sind, sich jedoch in der Form (T-Form) sowie der direkten Anheftung an

Einleitung

die aktive Zone der präsynaptischen Membran von den klassischen Ribbonsynapsen unterscheiden (Schmitz et al., 2000).

Ein typisches Merkmal der Ribbonsynapsen sind die elektronenmikroskopisch erkennbaren elektronendichten bandförmigen Strukturen, die synaptischen Ribbons, die über die Arciform Densities an der präsynaptischen Plasmamembran verankert sind (Sjöstrand, 1958; Dowling, 1987; Sterling, 1998). Synaptische Ribbons sind elektronendichte, lamellenförmige plattenartige Strukturen, die sich hufeisenförmig der Krümmung der präsynaptischen Membran anpassen (Sjöstrand, 1958; Vollrath et al., 1989; Rao-Mirotnik et al., 1995).

Jeder dieser synaptischen Ribbons ist von mit Transmitter gefüllten synaptischen Vesikeln umgeben (Wagner, 1997), die über dünne Filamente mit dem Ribbon konnektiert sind (Rao-Mirotnik et al., 1995). Außerdem finden sich neben den Ribbons so genannte Synaptic Spheres, die wahrscheinlich größere Aggregationseinheiten kleinerer Untereinheiten sind und eventuell Abbau- oder Aufbaustrukturen von Ribbons sind (Schmitz et al., 1989; Vollrath et al., 1989). Die Filamente beeinflussen in Abhängigkeit von ihrer An- oder Abwesenheit die Position der synaptischen Vesikel im Verhältnis zur Plasmamembran und/oder der Synapse. Ribbonsynapsen unterliegen in der Anzahl und Anordnung ihrer Komponenten einem zirkadianen Rhythmus, so findet man beispielsweise tagsüber viermal so viele Ribbons wie Synaptic Spheres und nachts gar keine Synaptic Spheres in den Photorezeptorzellen. Nachts sind die Ribbons länger als am Tage (Vollrath et al., 1989).

In den Terminalen der Stäbchenphotorezeptorzellen findet sich in der Regel nur ein synaptischer Ribbon, während in den größeren Terminalen der Zapfenphotorezeptorzellen mehrere synaptische Ribbons enthalten sein können (Gray und Pease, 1971; Sterling, 1998). So enthalten die Zapfenterminalen mehrere (beim Menschen mehr als 20) aktive Zonen mit jeweils einem zentralen Ribbon (Ahnelt et al., 1990; Missotten, 1965), wohingegen die Stäbchenterminale nur eine aktive Zone mit einem synaptischen Ribbon enthält (Rao-Mirotnik, 1995). Die Stäbchenterminale ist damit das einzige bekannte Vertebratenneuron, dessen Transmitter nur an einer einzigen Stelle abgegeben wird. In den Bipolarzellen der IPL sind die Ribbons wesentlich kleiner als in den Rezeptorzellen der OPL (Dowling, 1987). Außerdem sind Ribbons in Stäbchenterminalen länger (mehr als 700nm) als in Zapfenterminalen (Sparado et al., 1978). Die aktive Zone der Synapse ist der Bereich, in dem die synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusionieren, um ihren Neurotransmitter per Exozytose in den synaptischen Spalt freizugeben. Der Neurotransmitter der Ribbonsynapsen in Photorezeptorzellen ist Glutamat. Die aktiven Zonen in Ribbonsynapsen sind größer und kapazitätsreicher als in konventionellen chemischen

Einleitung

Synapsen. Die Exozytose der Glutamat-gefüllten synaptischen Vesikel erfolgt in Plasmamembranbereichen, die in engem Kontakt zum membranverankerten Ribbon stehen (Raviola, 1976; Schaeffer und Raviola, 1978; Schaeffer et al., 1982; Burns und Augustine, 1995, Zenisek et al., 2000).

Die typische Stäbchenphotorezeptorsynapse eines Vertebraten enthält eine einzelne, lineare aktive Zone, die Andockstellen für etwa 130 Vesikel bietet. Ist jedoch ein Ribbon an der aktiven Zone verankert, bietet es ein Depot für ungefähr 640 Vesikel (Rao- Mirotznik et al., 1995). Das physiologische Charakteristikum der Ribbonsynapse ist eine hohe Rate tonischer Neurotransmitterfreisetzung, die durch die kontinuierliche Vesikelexozytose gewährleistet wird (Dowling, 1987; Sterling, 1998). Der rasche Nachschub an Vesikeln zur Freigabe wird durch den schnellen Transport dieser zur aktiven Zone erreicht, ähnlich einem Förderband (Bunt, 1971; Gray und Pease, 1971). Die Ribbons dienen hierbei wahrscheinlich als eine Art Transporter für Glutamat-beladene Vesikel vom Zytoplasma zur aktiven Zone.

Die Exozytose der angedockten Vesikel wird wie in konventionellen chemischen Synapsen durch Calciumionen stimuliert, nur auf höherem Niveau. Moderate Calciumionenkonzentrationen induzieren die Freisetzung von etwa 50 Vesikeln/s, während bei maximaler Calciumionenkonzentration bis zu 500 Vesikel/s exozytiert werden können (Parsons et al., 1994; Rieke und Schwarz, 1996; von Gersdorff et al., 1996). Im Vergleich zu einer maximalen Vesikelfreisetzung von z. B. 20 Vesikel/s in der hippocampalen Synapse ist diese hohe Rate bemerkenswert (Stevens und Tsujimoto, 1995). Zur kompletten Exozytose aller fusionsfähigen Vesikel werden etwa 200ms benötigt, deren Endozytose dauert eine Sekunde (Lenzi und von Gersdorff, 2001; Paillard et al., 2003). In Ribbonsynapsen retinaler Bipolaren erfolgt eine kompensatorische Endozytose, so dass die Membranoberfläche ein bis zwei Sekunden nach der Exozytose komplett wiederhergestellt ist (von Gersdorff und Matthews, 1994a; Heidelberger, 2001). Die so endozytierten Vesikel werden wieder mit Transmitter befüllt und der aktiven Zone zur erneuten Freisetzung zugeführt (Betz und Bewick, 1992).

Die Verschlüsselung des binären Signals erfolgt umgekehrt als gewöhnlich, Null steht für ein Photon und wird über die tonische Exozytose kodiert, Eins steht für kein Photon und wird durch eine Pause der Transmitterfreisetzung kodiert (Dowling, 1991).

Rao et al. vermuteten 1994 , dass mindestens 40 Vesikel/s für die tonische Transmitterfreisetzung notwendig sind, um diese Signalkodierung aufrecht zu erhalten, bei einer Bindung von 130 Vesikeln an der aktiven Zone reicht dies etwa 3 Sekunden. Da am Ribbon (im Photorezeptor) insgesamt 600 Vesikel gebunden sind, kann dieser 15 Sekunden

Einleitung

lang Transmitterfreisetzungsvorgänge gewährleisten, ohne auf den Reservepool zugreifen zu müssen.

Umfangreiche Studien zur Verteilung verschiedener präsynaptischer Proteine in Ribbonsynapsen zeigten, dass sie im Allgemeinen dieselben Proteine wie konventionelle Synapsen enthalten (Ullrich und Südhof, 1994; Brandstätter et al., 1996a; von Kriegstein et al., 1999). Lediglich kleine Unterschiede wurden beobachtet, so zum Beispiel die Verwendung von Syntaxin 3 an Stelle von Syntaxin 1 zur Vesikelfusion (Morgans et al., 1996) und L-Typ Calciumkanälen anstatt N-, P/Q- oder R-Typ - Kanälen für den Calciumeinstrom (Heidelberger und Matthews, 1992; Nachman-Clewner et al., 1999).

Das einzige bisher entdeckte spezifische Protein von Ribbonsynapsen ist RIBEYE, ein Protein, das nur in Ribbon-, nicht aber in konventionellen Synapsen zu finden ist (Schmitz et al., 2000).

2.4. RIBEYE

Schmitz et al. identifizierten 2000 ein Protein, welches sie RIBEYE (RIB von ribbon, Eye wegen der Entdeckung im Auge) nannten, als eine Hauptkomponente synaptischer Ribbons. RIBEYE ist ein ~120kDa Protein, welches aus einer N-terminalen A-Domäne, die aus 563 Aminosäuren besteht und einer C-terminalen B-Domäne aus 425 Aminosäuren zusammengesetzt ist. Datenbankrecherchen ergaben, dass die A-Domäne ein bisher unbekanntes Protein darstellt und die B-Domäne identisch zu CtBP2 ist (Schmitz et al., 2000). CtBP2 (C-terminal binding protein), ein Kernprotein, bildet zusammen mit CtBP1 eine Familie von Transkriptionsrepressoren im Zellkern (Schaeper et al., 1995; Katsanis und Fisher, 1998; Poortinga et al., 1998; Turner und Crossley, 1998; Zhang und Levine, 1999). Sie sind der Familie der NAD^+ - abhängigen Hydroxysäure-Dehydrogenasen sehr ähnlich (Schmitz et al., 2000).

Die B-Domäne von RIBEYE enthält die volle CtBP2-Sequenz bis auf 20 N-terminale Aminosäuren. Diese Sequenzgleichheit deutet darauf hin, dass beide Proteine vom selben Gen codiert werden (Schmitz et al., 2000). Untersuchungen im Genom von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* zeigten, dass obwohl beide ein CtBP-Homolog besitzen, keine Sequenzen mit signifikanter Ähnlichkeit zur A-Domäne von RIBEYE detektiert werden konnten. Dies belegt den Verdacht, dass RIBEYE und synaptische Ribbons eine evolutionäre Neuerung der Wirbeltiere sind (Schmitz et al., 2000). Die Struktur von RIBEYE und seinem Gen weist darauf hin, dass es eine Proteinkreuzung (Hybrid) ist, in

Einleitung

welcher ein vorbestehendes Protein (CtBP) mit einer neuen N-terminalen Domäne verbunden wurde, um ein Protein mit einer neuen Funktion zu kreieren. MRNAs, die die A-Domäne enthalten, wurden nur in der Retina entdeckt, wohingegen mRNAs mit der B-Domäne in nahezu allen Geweben gefunden wurden. Dies unterstützt den Verdacht, dass RIBEYE vom gemeinsamen RIBEYE/CtBP2-Gen nur in einem bestimmten Anteil an Geweben transkribiert wird, während CtBP2 weit verteilt in allen Geweben zu finden ist (Schmitz et al., 2000).

Immunfluoreszenzfärbungen an Kryostatschnitten von der Rinderretina zeigten, dass RIBEYE in hoher Dichte in den Synapsen der OPL und in geringerer Dichte in Synapsen der IPL vorhanden ist. Die RIBEYE-enthaltenden Strukturen in der OPL weisen ein typisches hufeisenförmiges Erscheinungsbild auf und sind einzeln oder als Gruppierungen in synaptischen Ribbons der Stäbchen- und Zapfenphotorezeptorzellen angeordnet, besetzen aber nicht die gesamte präsynaptische Terminale. Doppelimmunfluoreszenzen mit Synaptophysin, einem synaptischen Vesikelprotein, das als Marker für Nerventerminalen dient (Navone et al., 1986) ergaben, dass im Gegensatz zur punktförmigen Verteilung von RIBEYE-Immunreaktivität Synaptophysin die gesamte synaptische Zone markiert. Zusätzlich entdeckte man, dass RIBEYE-Markierungen nur innerhalb Synaptophysin-positiver Nerventerminalen zu finden waren. Blot-Untersuchungen am Gehirn zeigten, dass RIBEYE keine generelle Komponente von konventionellen Synapsen ist, sondern eine spezifische Komponente von Ribbonsynapsen und synaptischen Ribbons ist (Schmitz et al., 2000).

Zur Funktion von RIBEYE ist bisher wenig bekannt. Entsprechend einem Modell, das Schmitz et al. 2000 entworfen haben, ist die A-Domäne in die Anordnung der proteinösen Ribbons als Proteinaggregate involviert, was durch das Verhalten der A-Domäne in transfizierten 293-Zellen eruiert werden konnte. RIBEYE allein ist nicht suffizient, Ribbons zu organisieren, sondern benötigt noch mindestens eine weitere Proteinkomponente. Die Präsenz einer solchen weiteren Proteinkomponente legte der Fund eines zweiten einzigartigen Proteins in der biochemisch gereinigten Ribbonfraktion nahe, jedoch ist dieses noch nicht identifiziert (Schmitz et al., 2000)

Magupalli et al. haben 2008 gezeigt, dass RIBEYE ein Gerüstprotein ist, mit idealen Möglichkeiten, den Aufbau der synaptischen Ribbons sowie ihre ultrastrukturelle Dynamik durch einen baukastenartigen Mechanismus zu erzeugen. Die RIBEYE(B)-Domäne enthält zwei Subdomänen, eine NADH-bindende Subdomäne und eine substratbindende Subdomäne. Die NADH-bindende Falte besteht aus zwei Einheiten eines Mononukleotid-bindenden Motivs und wird Rossmann-Falte genannt. Die Rossmann-Falte ist eine konservierte strukturelle Domäne zusammengesetzt aus drei parallelen β -Strängen, die durch eine α -Helix

Einleitung

verbunden sind. Sie bilden so ein parallel gewundenes Faltblatt, welches von einer α -Helix flankiert wird. Sie formen so eine $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Struktur.

In der Dehydrogenase-Domäne bindet jedes wiederholte $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Strukturelement eine Mononukleotidkomponente des NAD(P)-Coenzym (zur Übersicht s. Chinnadurai 2003, 2005). Diese Strukturen zeigen, dass die RIBEYE(B)-Domäne zur Homodimerisation befähigt ist. So können ausgedehnte, weitgehend hydrophobe Verbindungen gebildet werden (Kumar et al., 2002; Nardini et al., 2003; Magupalli et al., 2008).

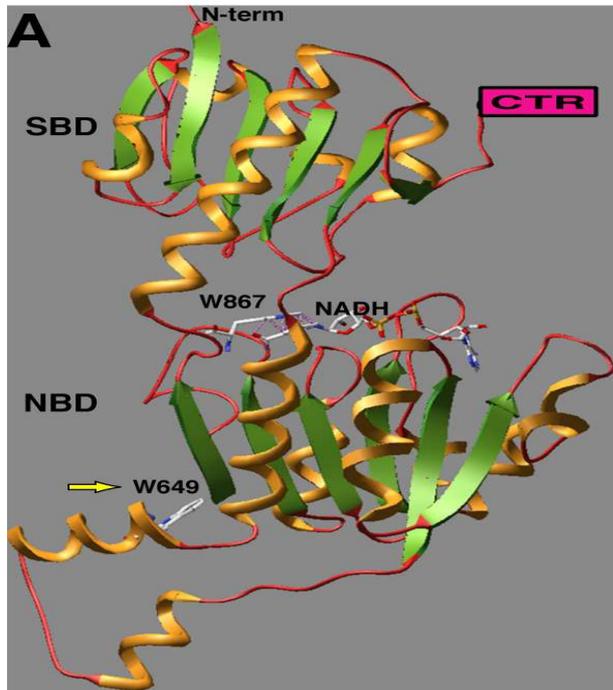


Abbildung f: Prognostizierte modellierte Struktur der RIBEYE(B)-Domäne unter Nutzung der Röntgenstruktur von CtBP1 (Nardini et al., 2003; Schmitz et al., 2000; Magupalli et al., 2008; Alpadi et al., 2008)

Die RIBEYE(B)-Domäne bindet NAD^+ mit hoher Affinität, was zeigt, dass ihre Homologie zu NAD^+ -abhängigen Dehydrogenasen funktionell relevant ist und sie vielleicht auch als Enzym dient.

CtBPs sind Transkriptionsrepressoren in einer großen Zahl an Organismen und lassen vermuten, dass ihre NAD^+ -Bindung und mögliche enzymatische Funktion daran beteiligt sind, diese Fähigkeiten auszuführen (Schmitz et al., 2000). Die Bindungssequenzen für CtBPs in ihren Zielproteinen teilen eine übereinstimmende Sequenz, die durch ein PXDLS-Motiv charakterisiert wird. Schmitz et al. zogen 2000 den Analogieschluss, dass die RIBEYE(B)-Domäne (die identisch ist mit CtBP2) auf der Oberfläche der synaptischen Ribbons präsentiert wird.

Auf der Ribbonoberfläche interagiert RIBEYE möglicherweise mit einer Zielsequenz, die das PXDLS-Motiv der CtBPs enthält. Dieses Modell deutet darauf hin, dass sich die Zielsequenz

Einleitung

in einem synaptischen Vesikelprotein befindet, und dass diese Interaktion in den Andock-/ oder Translokationsvorgang der Vesikel involviert ist.

Des Weiteren ist es vorstellbar, dass eine unbekannte enzymatische Reaktion der B-Domäne in den Primingvorgang involviert ist. Obwohl sehr spekulativ, könnte dieses Modell eine Erklärung anbieten, wie sich Ribbons entwickeln und wie sie arbeiten.

Zusammenfassend wäre zu bemerken, dass RIBEYE eine einzigartige Komponente synaptischer Ribbons ist, welche sich unter Nutzung eines präexistenten Proteins in Wirbeltieren entwickelt hat und ein einmaliges Gerüst für eine spezialisierte Synapse bildet.

2.5. Munc119

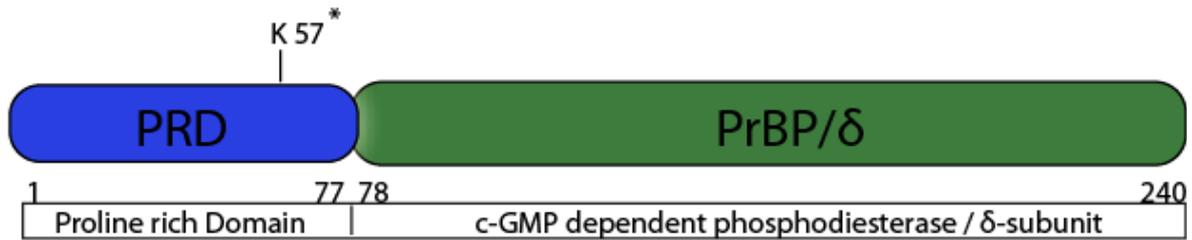
Munc119 ist das Säugetierhomolog zum *Caenorhabditis elegans* Protein unc119 und wird auch als RG4 (retinal gene 4) bezeichnet (Higashide et al., 1996). Es ist essentiell für den Sehvorgang und die synaptische Übertragung in Photorezeptorzellen (Higashide et al., 1996, 1998; Swanson et al., 1998) bei noch unbekanntem molekularen Mechanismus. Munc119/RG4 wird in hohem Maße in Photorezeptorzellen exprimiert (Higashide et al., 1996, 1998; Swanson et al., 1998; Alpadi et al., 2008).

Das Entwicklungsprofil der Expression des Munc119-Genes zeigte, dass es ab dem fünften postnatalen Tag in der sich entwickelnden Rattenretina exprimiert wird, zum gleichen Zeitpunkt, wie die Photorezeptordifferenzierung mit der Formation der OPL, ONL, Innen- und Außensegmente abzulaufen beginnt (Higashide et al., 1996). Das Expressionslevel steigert sich schnell während der restlichen Photorezeptorreifung und erreicht seinen maximalen Expressionsgrad am postnatalen Tag 23, wenn die Retina voll entwickelt ist. Danach bleibt sein Expressionsgrad gleich. Sowohl während des Entwicklungsabschnitts als auch im Erwachsenenalter ist der Expressionort in den Photorezeptoren. Das Entwicklungsmuster der Expression ist identisch zu dem anderer photorezeptorspezifischer Gene, wie zum Beispiel Rhodopsin, was darauf hinweist, dass HRG4/RRG4 eine Rolle in reifen Photorezeptoren spielt (Higashide et al., 1996).

Munc119 enthält 240 Aminosäuren, bestehend aus α -Helices, β -Faltblättern und Windungen (Higashide et al., 1996). Munc119 besteht aus einer aminoterminalen 77-Aminosäuren-langen Prolin-reichen Region und einer carboxyterminalen 163-Aminosäuren-langen Region, die eine signifikante Sequenzhomologität zu PrBP/ δ (früher auch bezeichnet als δ -Untereinheit von cGMP-abhängigen Phosphodiesterasen (PDE6) in Photorezeptoren) aufweist (Higashide et al., 1996; Li et al., 1998; Kobayashi et al., 2000; Zhang et al., 2004).

Einleitung

Diese C-terminale PrBP/ δ -homologe Domäne ist zwischen den verschiedenen Arten höchst bewahrt und essentiell für die Funktion von Munc119 (Higashide et al., 1996, 1998; Swanson et al., 1998).



* Premature stop codon at Lysine 57, in a Cone rod dystrophy patient.

Abb. g: Schematische Domänenstruktur von Munc119

Die 77-Aminosäuren-lange prolinreiche Domäne ist blau dargestellt, die PrBP/ δ -homologe Domäne grün. K57 (Lysin) markiert die Stelle der frühen Codon-Abbruchmutation die zur Zapfen-Stäbchen-Dystrophie in dem menschlichen Patienten geführt hat.

Die Größe des Proteins in der SDS-Gelelektrophorese war größer als die zuvor kalkulierte Größe (27kDa versus 35 und 33 kDa). Diese Größendiskrepanz könnte mit der anfänglichen Charakteristik und späterer Translationsmodifikation zusammenhängen. Sie könnte auf der prolinreichen Eigenschaft dieser Sequenz beruhen, ein Phänomen, das schon bei anderen Proteinen entdeckt wurde. Die natürlichen Proteine haben vielleicht immer eine ganz andere Größe, beruhend auf posttranslationaler Modifikation (Higashide et al., 1996)

Die hydrophile Natur des codierten Genprodukts weist darauf hin, dass es ein lösliches Phototransduktionsprotein sein könnte, aber es enthält keine erkennbaren Sequenzmotive für ein solches Protein. Außerdem zeigt seine Expression keine Abhängigkeit vom Hell-/Dunkelzyklus, wie viele andere Phototransduktionsproteine wie z.B. Opsin, Transducin oder S-Antigen (Higashide et al., 1996)

Die prolinreiche aminoternale Region von HRG4 hat mehrere KaseinII-Phosphorylierungsstellen, könnte also auch wichtig für solche Interaktionen sein (Higashide et al., 1998).

Das Fehlen einer hydrophoben Membraneinschnürungssequenz scheint gegen HRG4 als eingebautes synaptisches Membranprotein wie Synaptotagmin, Synaptobrevin, Synaptophysin oder SNAP-25 zu sprechen. Es könnte, wie auch immer, ein peripher membrangebundenes Protein sein (Higashide et al., 1998).

Die Homologität von HRG4 mit Munc119 ist vereinbar mit der Möglichkeit, dass HRG4 eine wichtige Rolle im synaptischen Vesikelzyklus spielt. Obwohl die Lokalisation in der Synapse oder die Funktion von unc119 in C.elegans noch nicht dargelegt ist, führt ein Defekt in diesem Gen zu signifikanten Problemen in Bewegung, Ernährung und Chemosensitivität, vereinbar mit einem Defekt in der Neurotransmission (Maduro et al., 1995). Vereinbar mit

Einleitung

einer Funktion im Nervensystem sind *unc119*-Reportergene überall im Nervensystem von *C.elegans* exprimiert (Maduro et al., 1995). Das *C. elegans* *unc119*-Protein hat eine starke Sequenzähnlichkeit zu den genannten menschlichen Genen für HRG4, deren Kopien reichlich in der Retina zu finden sind (Higashide et al., 1999). Die Expression von Teilen von HRG4 oder *Dmunc119*, können geleitet vom *unc119*-Promotor den *C. elegans* *unc119* Mutant-Phänotyp vollständig reparieren.

Munc119/HRG4 und *Dmunc119* stellen Mitglieder einer neuen Klasse neuronaler Gene dar, deren gemeinsame Funktion während der Evolution der Vielzeller aufrechterhalten wurde (Maduro et al., 1995)

Das *unc119*-Protein wird in verschiedenen neuronalen Strukturen des sich entwickelnden Zebrafischembryos und seiner Larve exprimiert. Morpholino Oligonukleotid-knockdowns von *unc119* endeten in einem "curly tail down" Phänotyp (Manning et al., 2004). Die Untersuchung neuronaler Strukturen zeigten, dass dieser "curly tail down"-Zebrafisch eine ähnliche Konstellation neuronaler Defekte aufwies wie in *C. elegans* - *unc119* - Mutanten entdeckt wurden: fehlende oder fehlplazierte Zellkörper, Defaszikulationen der Nervenfortsätze, axonale Wegfindungsfehler und abnorme Axonverzweigung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Munc119* eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion des Nervensystems von Wirbeltieren spielt (Manning et al., 2004).

Die essentielle Funktion von *Munc119* für die synaptische Übertragung zeigten Kobayashi et al. 2000 an einer Patientin mit einer frühen Codon-Abbruch-Mutation. Diese Mutation äußerte sich in einem *Munc119*-Protein, dem die PrBP/ δ -Domäne fehlte. Die Patientin zeigte eine Zapfen- und Stäbchendystrophie. Eine transgene *Munc119*-Maus, die diese Codonmutation reproduzierte, zeigte ebenfalls schwere Störungen in der synaptischen Übertragung an Photorezeptorsynapsen sowie Fehler beim Sehen (Kobayashi et al., 2000; Kubota et al., 2002).

Das transgene Mausmodell, welches eine mutierte Form von HRG4 in den Photorezeptorsynapsen exprimiert, zeigte einen progressiven Abfall der b-Welle im Elektroretinogramm (ERG) (unabhängig von der Fähigkeit der Photorezeptoren, c-Wellen zu erzeugen). Das Mausmodell zeigte eine retinale Degeneration mit hauptsächlichlicher Degeneration der Synapsen (Kobayashi et al., 2000; Kubota et al., 2002).

Der Mechanismus, wie *Munc119* in den Photorezeptorzellen arbeitet, ist noch unklar.

Die beschriebene synaptische Degeneration wurde in Stäbchenphotorezeptorzellen beobachtet, vereinbar mit einer Expression des Transgens vom Rhodopsinpromotor. Die

Einleitung

Erscheinung der Erkrankung hauptsächlich im oberen temporalen Quadranten korreliert mit der höchsten Expression des Transgens in dieser Region der Retina (Kobayashi et al., 2000).

Der spezifische Abfall dreier synaptischer Vesikelproteine (Synapsin IIa, Synaptotagmin und Doc2) in der HRG4-transgenen Netzhaut belegt zusätzlich die Rolle von HRG4 in der synaptischen Vesikelfunktion (Kobayashi et al., 2000). Der zeitliche Ablauf des Auftretens dieser Reduktion passt zur Erscheinung der Pathologien im transgenen Modell. Transgene Mäuse, die jünger als ein Jahr waren, zeigten keine signifikanten Pathologien in der Netzhautfunktion und -morphologie. Westernblot-Ergebnisse zeigten, dass sich das Level dieser synaptischen Proteine in transgenen und nicht-transgenen Modellen nicht unterscheidet (Kobayashi et al., 2000). Funktionelle (reduzierte b-Welle im ERG) und strukturelle (retinale Desorganisation/Degeneration) Defekte beginnen im transgenen Mausmodell im Alter von ca. einem Jahr zu erscheinen (Kobayashi et al., 2000).

Obwohl die physiologische Wichtigkeit von Munc119 für die synaptische Übertragung an Photorezeptorribbonsynapsen gut dokumentiert wurde, ist nicht klar, wie Munc119 auf molekularer Ebene in der Synapse arbeitet. Ein Schlüssel zum Verständnis dieser Funktion ist vielleicht die Homologität zu PrBP/ δ . PrBP/ δ verbindet und trennt prenylierte Proteine von Membranen (Zhang et al., 2004, 2007). Diese enzymatische Aktivität ist von großer Wichtigkeit für intrazelluläre Membran- und Proteintransporte (Zhang et al., 2004, 2007).

In den Photorezeptorzellen spielt sich die Transportrolle von PrBP/ δ vorherrschend in den Innen- und Außensegmenten ab.

Die Interaktion von PDE δ mit ARL2 bietet eine interessante Möglichkeit für die Funktion von HRG4. PDE δ ist homolog zu HRG4 (Kobayashi et al., 2003). PDE δ wird überall exprimiert, während HRG4 vorwiegend in Photorezeptorzellen exprimiert wird (Higashide et al., 1996; Florio et al., 1996). PDE δ wurde ursprünglich aus der löslichen Form von PDE6, der stäbchenspezifischen cGMP-Phosphodiesterase, isoliert, aber wirkte nicht auf die katalytische Aktivität des Enzyms (Gillespie et al., 1989; Florio et al., 1996). Stattdessen fand Florio 1996 heraus, dass PDE δ α - und β -Untereinheiten von PDE6 an deren prenylierten COOH-Enden bindet und so von Photorezeptormembranen löst. PDE δ interagiert mit und löst außerdem Rab13, eine kleine GTPase, die in den Membrantransport von Fibroblasten involviert ist (Marzesco et al., 1998). PDE δ interagiert weiterhin mit RPGR (retinitis pigmentosa GTPase Regulator), dem pathogenen Gen für die x-chromosomal übertragene Retinitis Pigmentosa RP3 (Linari et al., 1999).

Einleitung

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass PDE δ in den intrazellulären Proteintransport und deren Lokalisation involviert ist (Kobayashi et al., 2003).

Von PDE δ wurde angenommen, dass es ein löslicher Transportfaktor für bestimmte Proteine ist, was durch seine Interaktion mit ARL2-GTP vermittelt wird (Hanzal-Bayer et al., 2002).

Li et al. zeigten 1998, dass HRG4 nicht in der Lage ist, PDE6 von den Außensegmentmembranen der Photorezeptoren zu lösen, aber es könnte eine Rolle in der Insertion/Extraktion von anderen Membranproteinen spielen.

Wegen seiner Assoziation zu synaptischen Vesikeln scheint es verlockend, anzunehmen, dass HRG4 in den Membrantransport bestimmter synaptischer Vesikelproteine involviert ist (Kobayashi et al., 2003).

Kubota et al. demonstrierten 2002 einen spezifischen Abfall der Level einiger peripherer Membranproteine von synaptischen Vesikeln in Photorezeptoren im transgenen Mausmodell, welches den gleichen Codonabbruch von HRG4 zeigte, wie der menschliche Patient mit der spät manifestierten Zapfen-Stäbchen-Dystrophie. Dieses Phänomen könnte vereinbar damit sein, dass HRG4 eine Rolle im Membrantransport von Photorezeptorsynapsen spielt.

Munc119 interagiert mit RIBEYE (Alpadi et al., 2008). Die PrBP/ δ -homologe Domäne von Munc119 ist dabei essentiell für die Interaktion mit der NADH-bindenden Region der RIBEYE(B)-Domäne.

Diese Bindung ist aber nicht NADH-abhängig, und RIBEYE-Punktmutanten, die nicht mit Munc119 interagieren, verhindern trotzdem nicht die NADH-Bindung. Daraus folgt, dass die Bindung von Munc119 und NADH an RIBEYE unabhängig voneinander sind.

Munc119 kann durch seine Interaktion mit RIBEYE den synaptischen Ribbons zugeordnet werden und scheint essentiell für die synaptische Signalübertragung an der Photorezeptorsynapse (Alpadi et al., 2008). Gereinigte synaptische Ribbons, die während des Reinigungsprozesses strenge biochemische Behandlungen durchlaufen, enthalten wenig Munc119, aber gereinigte Ribbons können Munc119 rekrutieren. Dies lässt vermuten, dass Munc119 eine peripher gebundene Komponente synaptischer Ribbons ist, die relativ leicht von den Ribbons gelöst werden kann (Alpadi et al., 2008). Higashide et al. zeigten bereits 1998, dass ein großer Teil von Munc119 wahrscheinlich löslich ist.

Einleitung

2.6. Zielstellung dieser Arbeit

Anliegen der vorliegenden Dissertationsarbeit war die morphologische Untersuchung der Lokalisation von Munc119 im Hinblick auf seine potentielle Bedeutung als Interaktionspartner von RIBEYE in der Retina. Obwohl klar ist, dass Munc119 essentiell für den Sehvorgang und synaptische Prozesse in der Retina ist, sind die genauen molekularen Mechanismen, wie Munc119 in der Photorezeptorsynapse arbeitet noch nicht bekannt. Eine genaue morphologische Lokalisation dieses faszinierenden Proteins soll helfen, die Funktion von Munc119 und ferner auch seine Interaktion mit dem photorezeptorsynaptischen Protein RIBEYE besser zu verstehen. Ein geeigneter Antikörper zur Markierung des Proteins Munc119 war auszutesten. Die genaue Lokalisation von Munc119 in den Photorezeptoren wurde an Kryostatschnitten von Rinderretina untersucht und mit der Lokalisation von weiteren synaptischen Proteinen in der Retina verglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterialien

Die nachfolgend beschriebenen Experimente führte ich an Präparaten von Rinderaugen durch. Dafür erhielten wir Rinderaugen vom lokalen Schlachthof. Diese standen uns 30 Minuten post mortem zur Verfügung und wurden sofort aufgearbeitet.

Für weitere Versuche erhielten wir Ratten aus dem Institut für experimentelle Chirurgie der Universitätsklinik Homburg/Saar.

3.2 Präparationen

3.2.1. Präparation der Retina aus Rinderaugen

Die Rinderaugen wurden an der der Retina abgewandten Seite aufgeschnitten und der Bulbus vorsichtig umgestülpt, so dass Linse und Glaskörper herausfielen. Die Retina konnte nun vorsichtig zum Nervus opticus hin zusammengeschoben und dort abgeschnitten werden. Die so gewonnenen Retinapräparate wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -86°C gelagert.

3.2.2. Präparation der Epiphyse und Augen der Ratte

Ausgewachsene Ratten aus dem Institut für experimentelle Chirurgie wurden zunächst in einem Glasgefäß mit Diethylether narkotisiert und dann bei vollständiger Areflexie mittels Scherenschnitt dekapitiert. Per Längsschnitt durch die Kopfhaut und die Kalotte wurde das Gehirn freigelegt und die Epiphyse aus dem Interhemisphärenspalt herauspräpariert. Das entnommene Organ wurde in einem Gefäß mit gefrorenem Isopentan vorgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Das Vorfrieren in Isopentan ermöglicht ein gewebeschonenderes Einfrieren, da sofortiges Schockfrostet Eiskristalle im Gewebe erzeugen würde. Das so eingefrorene Organ wurde dann in einem Aluminiumfolietütchen verpackt und beschriftet in der Kühltruhe bei -86° gelagert.

Die Augen wurden von frontal aus der Orbita in toto enukleiert und ebenfalls in gefrorenem Isopentan vorgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefrostet. Infolgedessen wurden die Bulbi oculi in Aluminiumfolietütchen verpackt und beschriftet in der Kühltruhe bei -86°C gelagert.

Material und Methoden

3.3. Herstellung der Kryostatschnitte

Die entnommenen Gewebestücke aus der Retina des Rindes wurden in kleine Blöcke geschnitten und mit gekühltem Isopentan schockgefroren. Dann wurden sie in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Die weitere Zwischenlagerung erfolgte bei -86°C. Direkt vor dem Schneiden wurden die Gewebelöcke auf einem Halter in „Gewebeeinbettmedium für Gefrierschnitte Neg - 50 von Richard Allen Scientific“ (Inhalt: Polyvinyl-Alcohol; Polyethylen-Glycol) eingebettet aufgebracht und daraufhin bis zu einer Temperatur von -50°C schockgefrostet. Überflüssiges Gewebeeinbettmedium wurde mit Hilfe einer Rasierklinge entfernt. Nun konnte das Objekt auf dem Blöckchen in den dafür vorgesehenen Halter eingeklemmt und das Messer justiert werden. 20µm dicke Trimmschnitte dienten der Entfernung des Mediums bis zum Anschneiden des Organs.

Es folgte die Herstellung von 8 µm dicken Kryostatschnitten mit dem Kryostat.

Davon wurden jeweils zwei auf einen Objektträger (Raumtemperatur) aufgezogen und auf der 60°C heißen Heizplatte getrocknet. Anschließend wurden die auf Objektträgern hitzefixierten Schnitte bei -18°C im Tiefkühlschrank verwahrt.

3.4. Immunfluoreszenzfärbung

3.4.1. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Zur Markierung von Munc119 wurde Anti-Munc119 V2T2 120.Immunisierungstag (IT) 1:1000 mit 1xPBS verdünnt verwendet. Der entsprechende Sekundärantikörper war Goat-anti-Rabbit (GAR) Cy3 (Zymed® Laboratories). Die Sekundärantikörper wurden immer 1:1000 mit 1xPBS verdünnt. Zur Immunmarkierung von RIBEYE wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die RIBEYE-(B)-Domäne (U26564; Schmitz et al., 2000), (Verdünnung 1:1000 mit PBS; Inkubation über Nacht bei 4° C) verwendet. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte mit Cy3-markiertem Ziege-anti-Kaninchen (goat-anti-rabbit, GAR) konjugiertem Zweitantikörper (GAR-Cy3). Für die Doppelfluoreszenzen wurden verschiedene Primärantikörper aus verschiedenen Spezies benutzt, um die Beziehung der Munc119-Markierung zu prä- und postsynaptischen Strukturen noch detaillierter zu untersuchen.

Material und Methoden

Anti-CtBP1 (BD Transduction Laboratories) markiert die Synaptic Ribbons und wurde 1:500 mit PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Zweitantikörper wurde Chicken anti-Mouse (CAM)-Alexa 488 verwendet (Verdünnung 1:1000 in PBS, eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur).

CtBP2 entspricht der B-Domäne von RIBEYE. Da U26564 ebenso wie Anti-Munc119 ein Antikörper aus Kaninchen ist und beide mit denselben Zweitantikörpern (Ziege-anti-Kaninchen) reagieren, wurde in entsprechenden Doppelmarkierungsexperimenten zur Markierung von synaptischen Ribbons ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen CtBP2 benutzt, um die Synaptic Ribbons zu markieren (BD Transduction Laboratories, 1:500 verdünnt mit PBS, Inkubation über Nacht bei 4°C). Sekundärantikörper war CAM Alexa 488 (Molecular Probes, Jackson, Verdünnung 1:1000 in PBS, eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur).

Ein Antikörper gegen GRIP (glutamate receptor-interacting protein), ein postsynaptisches Strukturprotein, wurde verwendet, um die Munc119-Markierung in Beziehung zu den postsynaptischen Dendriten zu setzen. Für diesen Zweck wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper eingesetzt (Anti-GRIP, BD Transduction Laboratories). Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (Inkubation über Nacht bei 4°C). Als Zweitantikörper diente hier Goat-anti-Maus (GAM) konjugiert mit Cy3 (GAM-Cy3; IgM+IgG; Sigma Inc.) (Verdünnung 1:1000 in PBS, eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur).

Actin ist ebenfalls in der Postsynapse lokalisiert, Anti-Actin Ab-1 monoclonal mouse IgM (Amersham®) markiert somit die Postsynapse. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Zweitantikörper war GAM-Cy3 IgM (Sigma Inc.). (Daten nicht dargestellt)

Synaptophysin ist ein synaptisches Vesikelprotein, das als Marker für Nerventerminalen dient. Es markiert die gesamte mit synaptischen Vesikeln gefüllte, präsynaptische Terminale. Der Antikörper Anti-Synaptophysin SIGMA sin S5768 (Sigma Inc.) wurde 1:250 mit PBS verdünnt. Der Zweitantikörper hierfür war CAM Alexa-488 (Molecular Probes, Jackson).

3.4.2. Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Die Kryostatschnitte aus dem Tiefkühlschrank wurden 15 Minuten auf der Heizplatte bei 63°C hitzefixiert. Währenddessen erfolgte die Herstellung der benötigten Verdünnungen (siehe oben) der Primärantikörper. Dazu wurde zuerst die benötigte Menge PBS (zum

Material und Methoden

Beispiel 1000 μ l) in ein Eppendorf-Cup pipettiert und anschließend der erforderliche Anteil (meist ein μ l) an Primärantikörper hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Dann wurde der Cup verschlossen und bis zu seiner Verwendung auf Eis gelagert. Die getrockneten Schnitte wurden waagrecht in die mit PBS befüllte feuchte Kammer gelegt und mit jeweils 30 μ l der benötigten Antikörperverdünnung benetzt. Für die Doppelfluoreszenzen wurden beide Primärantikörper zu gleichen Teilen auf die Schnitte aufgetragen.

Als Negativkontrolle wurde ein Objektträger anstelle des Primärantikörpers mit PBS benetzt. Als Positivkontrolle wurde meist der Primärantikörper U26564 Anti-RIBEYE (B)-Domain verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlraum bei 4° Celsius.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte gewaschen, dazu wurden sie dreimal jeweils 5 Minuten in eine Küvette mit PBS gestellt. In dieser Zeit wurden die Sekundärantikörper entsprechend mit PBS verdünnt und auf Eis gelegt. Nach dem Waschen wurden die Ränder der Objektträger vorsichtig mit einem Kosmetiktuch getrocknet und wieder waagrecht in eine mit PBS gefüllte feuchte Kammer gelegt. Jeder Schnitt wurde mit 30 μ l des entsprechenden Sekundärantikörpers benetzt. Bei den Doppelfluoreszenzen wurden beide Sekundärantikörper auf die jeweiligen Schnitte aufgetragen und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Währenddessen wurde ein Cup mit dem Eindeckmittel N- Propyl-gallat aus dem Gefrierschrank genommen und in einem Thermo-Shaker auf 37°C erwärmt. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte wieder dreimal je fünf Minuten mit PBS gewaschen und die Ränder vorsichtig mit einem Kosmetiktuch getrocknet. Auf jeden Schnitt wurden 30 μ l NPG aufgetragen und die Objektträger mit einem Deckgläschen bedeckt, welches anschließend mit Nagellack fixiert wurde.

Die Lagerung der fertigen Schnitte erfolgte in einer Mappe im Kühlraum.

3.5. Mikroskopische Analyse

Die lichtmikroskopische Analyse der Kryostatschnitte erfolgte am Mikroskop Axiovert 200M der Firma ZEISS, ausgestattet mit einer Fluoreszenzlampe HBO 100 und einer Fotokamera (MRM der Firma Zeiss).

Dazu wurden zuerst unter kleinerer Vergrößerung (10x – 20x) Übersichtsaufnahmen zur orientierenden Lokalisation von Munc119 in den Schichten der Retina angefertigt und dokumentiert. In höherer Vergrößerung (40x, 100x, mit Immersionsöl) wurde besonders die

Material und Methoden

äußere plexiforme Schicht mit den markierten Strukturen in den Ribbonsynapsen untersucht und dokumentiert. Diese Analyse sollte Aufschluss über die Lokalisation von Munc119 in der Retina, speziell in den Ribbonsynapsen und seine Beziehung zu anderen Strukturen der äußeren plexiformen Schicht geben.

3.6. GST-Präabsorption

Der Primärantikörper Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag (IT) wurde im Verhältnis 1:3000 mit PBS gemischt. Zu je 100µl dieser Mischung wurden zehn Mikroliter GST-Beads als Negativkontrolle bzw. zehn Mikroliter UNC-GST-Beads hinzugefügt. Die Ansätze wurden über Nacht in der Kühlkammer bei 4°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen konnten die Eppendorf – Cups bei 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und die Überstände wie oben beschrieben zur Immunfluoreszenzfärbung verwendet werden.

3.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot-Analysen

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld, in der Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Nach Hitzedenaturierung durch Kochen in 6xSDS – Probenpuffer (Laemmli, 1975) und Verwendung reduzierender Agenzien (β -Mercaptoethanol) binden die denaturierten Polypeptide das stark anionische Detergens SDS und werden so negativ geladen. Weil die Menge des gebundenen SDS proportional zum Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptids ist, wandern die SDS-Polypeptid-Komplexe bei der Elektrophorese nun in Abhängigkeit von der Größe des Polypeptids unterschiedlich weit im Polyacrylamidgel. So ist eine Auftrennung der unterschiedlichen Polypeptide möglich. Es wurden Zwei-Phasen-Gele gegossen, mit Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptidkomplexe in einem möglichst kleinen Volumen in einem oberen Gelabschnitt („stacking gel“) und Auftrennung dann im unteren Gelabschnitt zur Erhöhung der Auflösung der Gele (King und Laemmli, 1971). Coomassie brilliant blue R-250-Lösung bindet an die Proteine, was die Erkennung von Proteinbanden im SDS-Gel ermöglicht. Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung unter sanftem Schütteln 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Der Hintergrund wurde durch anschließendes Tauchen in Acrylamidgelentfärbelösung reduziert. Danach erfolgte die Dokumentation der Gele mit Hilfe eines HP-Scanners oder des BIO RAD Gel Doc – Gerätes.

Material und Methoden

Für die Western Blot-Analysen wurden die Proteine nach der SDS-PAGE im elektrischen Feld auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Nach dem Western Blot wurden die Proteinbanden mit Ponceau S zur Überprüfung des Elektrotransfers gefärbt und nachfolgend mit PBS entfernt. Die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte mit einer 5% Magermilchlösung in PBS (45 Minuten, Raumtemperatur). Die Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:5000 in 5% Magermilch in PBS (über Nacht bei 4°C) inkubiert. Die Bindung des Primärantikörpers wurde durch entsprechende Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper (1:10000 in Blockierungspuffer verdünnt, eine Stunde bei 4°C) und ECL-Detektion nachgewiesen (Alpadi et al., 2008).

3.8. Verwendete Antikörper und Bezugsquellen

Antikörper	Bezugsquelle
Primärantikörper	
Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag (IT)	Alpadi et al., 2008
Anti-Munc119 1.Versuch, 61. IT 250902	unveröffentlicht
U26564 anti-RIBEYE(B)-domain	Schmitz et al.,2000
Monoclonal Anti-Synaptophysin	Sigma Inc.
Anti-CtBP 1	BD Transduction Laboratories
Anti-CtBP 2 (monoclonal)	BD Transduction Laboratories
Anti GRIP monoclonal mouse	BD Transduction Laboratories
Anti-Actin mono	Calbiochem®
Sekundärantikörper	
GAR Cy3 IgG	Zymed® Laboratories
GAM Cy3	Sigma Inc.
Alexa Fluor® 488 chicken anti-rabbit IgG (H+L) *2mg/mL*	Molecular Probes, Jackson
CAM Alexa 488	Molecular Probes, Jackson
GAM Cy 3 IgM + IgG	Sigma Inc.

Material und Methoden

3.9. Verwendete Chemikalien und Bezugsquellen

Chemikalien	Bezugsquelle
Toluidinblau	Merck
Natriummethylat	Merck-Schuchardt OHG; Hohenbrunn
Methanol	Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken
Xylol	Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken
Aceton	Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken
N-Propyl-gallat	Sigma
Cacodylsäure	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R 250	Carl Roth GmbH; Karlsruhe

3.10. Verwendete Lösungen

Lösung	Rezept
Phosphatgepufferte Salzlösung 1 x PBS (1fach konzentriert)	8g Natriumchlorid (NaCl) 0,2g Kaliumchlorid (KCl) 1,3g Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 0,2g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Add 1l aqua dest. pH = 7,4 einstellen
NPG (N-Propyl-gallat) – Eindeckmittel	100ml 60% Glycerol in PBS 1,5g N-Propyl-gallat (bei 60°C lösen)
Coomassie brilliant blue stain	600 ml Isopropanol 1560ml dd H ₂ O 240 ml Essigsäure 0,6 g Coomassie Brilliant Blue R 250
SDS-PAGE - Elektrophoresepuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 1,0 g SDS mit aqua dest. auf 1 Liter auffüllen

Material und Methoden

3.11. Geräte und sonstige Hilfsmittel

Geräte/ Hilfsmittel	Bezugsfirma
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss; Jena
Fluoreszenzlampe HBO 100	Carl Zeiss; Jena
Objektträger „Superfrost®ROSA“, geschnitten	ROTH Karlsruhe
Deckgläser 24x50mm	Menzel-Gläser®
Eppendorfpipette 0,5-10µl Eppendorfpipette 20-200 µl Eppendorfpipette 200-1000µl	Eppendorf® research
Pipettenspitzen	Plastibrand®; Germany
Nagellack	Drogerie

Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. Anti-Munc119

In der hier vorliegenden Arbeit wurde morphologisch untersucht, wo Munc119 in der Netzhaut und speziell in den Photorezeptorzellen lokalisiert ist. Hintergrund dazu ist, dass Munc119 von Kannan Alpadi im Rahmen seiner Doktorarbeit unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als Interaktionspartner von RIBEYE identifiziert wurde. Zur Untersuchung der Lokalisation von Munc119 wurden an zehn Mikrometer dicken Kryostatschnitten von der Rinderretina Immunfluoreszenzen durchgeführt. Diese morphologische Untersuchung zur Lokalisation des Proteins Munc119 in der Retina erforderte einen spezifischen Antikörper zur Markierung von Munc119. Der verwendete Antikörper wurde von der AG Schmitz in einem Kaninchen generiert. Dem Kaninchen wurde ein gereinigtes Munc119-GST-Fusionsprotein injiziert und in regelmäßigen Abständen Serum entnommen. Das zur Infusion benutzte Fusionsprotein ist in der nachfolgenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dargestellt (Abb. 1).

Munc119-GST lässt sich rekombinant exprimieren und als noch angereichertes Fusionsprotein isolieren (Abb. 1). Die Größe von GST beträgt 25 kDa, Munc119 selber ist ein 35 kDa-Protein, Munc119-GST präsentiert sich zwischen der 43kDa- und der 66kDa-Markierung der Standardprobe. Das gereinigte Munc119-GST Fusionsprotein wurde dem Kaninchen zur Antikörperproduktion injiziert.

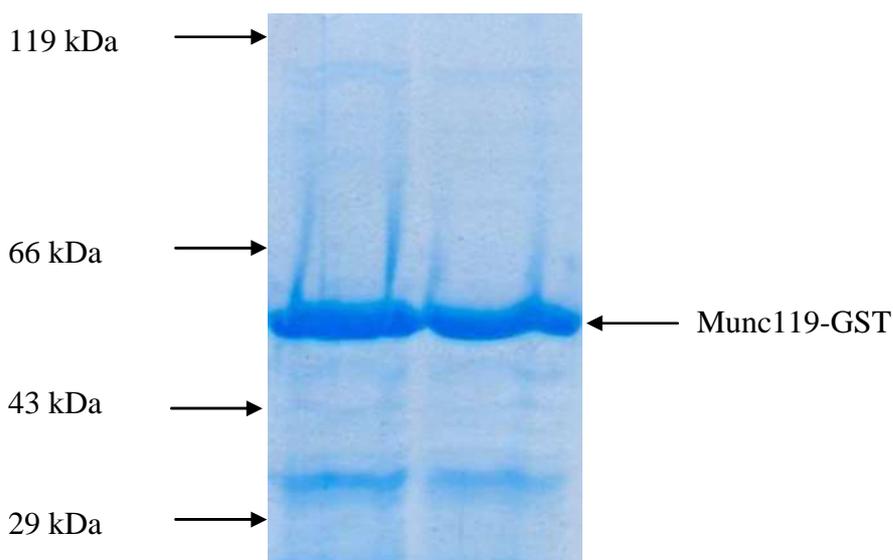


Abb. 1: Gereinigtes Munc119-GST-Fusionsprotein in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Munc119-GST-Bande ist zwischen der 43kDa- und der 66kDa-Markierung der Standardprobe zu finden.

Ergebnisse

Das hergestellte Munc119 Immuneserum – nicht aber das Prä-Immuneserum – erkennt im Western Blot spezifisch Munc119-GST (Abb. 2) und wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

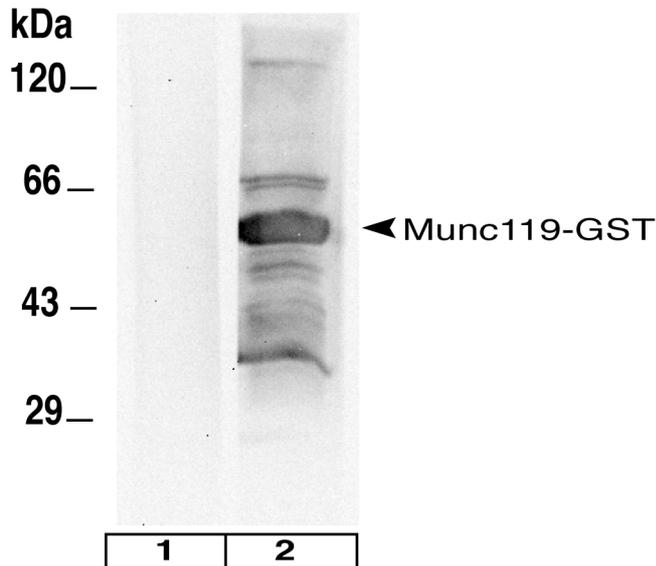


Abb. 2: Western Blot-Analyse von gereinigtem Munc119-GST Fusionsprotein (siehe auch Abbildung 1) mit Prä-Immuneserum (Spur 1) und Munc119 Immuneserum (V2T2; 120. Immunisierungstag, Spur2). Das Immuneserum – nicht aber das Prä-Immuneserum – erkennt spezifisch die Munc119-GST Bande.

An Extrakten der bovinen Retina wurden Co-Immunopräzipitationsuntersuchungen durchgeführt, um zu testen, ob Antikörper gegen RIBEYE mit Munc119 co-immunopräzipitieren können. Immunmarkiertes RIBEYE mit co-immunmarkiertem Munc119 zeigt im RIBEYE-Immuneserum (nicht jedoch im RIBEYE-Präimmuneserum) eine spezifische Interaktion dieser beiden Proteine (Abb. 3A), genau wie in der Retina. Ähnlich reagieren co-immunopräzipitiertes RIBEYE und Munc119 im Munc119- Immuneserum, aber nicht im Präimmuneserum (Abb. 3B). Da RIBEYE ausschließlich in den synaptischen Ribbons vorkommt (Schmitz et al., 2000), zeigen die Co-Immunopräzipitationsexperimente, dass Munc119 auch eine Komponente synaptischer Ribbons ist.

Ergebnisse

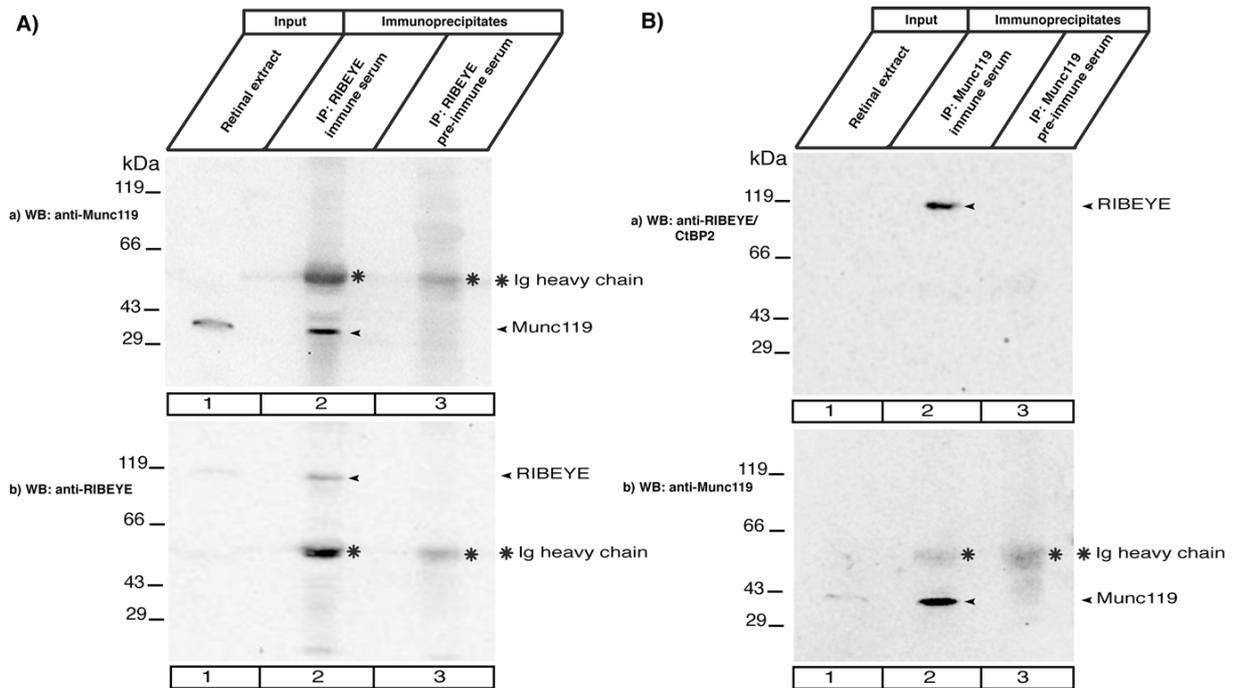


Abb. 3: Coimmunopräzipitation von RIBEYE und Munc119 aus der bovinen Retina

A) RIBEYE-Immunsereum und RIBEYE-Prä-Immunsereum wurden in ihrer Fähigkeit getestet, Munc119 zu co-immunopräzipitieren. B) Munc119-Immunsereum und Munc119-Prä-Immunsereum wurden in ihrer Fähigkeit getestet, RIBEYE zu co-immunopräzipitieren.

(Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Kannan Alpadi i.R. seiner Ph.D.-Arbeit zur Verfügung gestellt)

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden mehrere Antikörper aus verschiedenen Kaninchen und von unterschiedlichen Immunisierungstagen ausgetestet. Der Antikörper Anti-Munc119 vom 17.01.03, Versuch 2, Tier 2, 120. Immunisierungstag (im Folgenden Teil als Anti-Munc119 Immunsereum (V2T2 120. IT) bezeichnet) zeigte kräftige Markierungen des Proteins Munc119 in der bovinen Retina (Abb.4) und wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Das Munc119 - Immunsignal ist besonders kräftig in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) der Retina. Man erkennt deutlich die Immunfluoreszenzmarkierung in dieser Schicht (Abb. 4). In der inneren plexiformen Schicht (IPL) finden sich keine signifikanten Markierungen, so dass man davon ausgehen kann, dass Munc119 in der OPL, nicht jedoch in der IPL exprimiert wird.

Ergebnisse

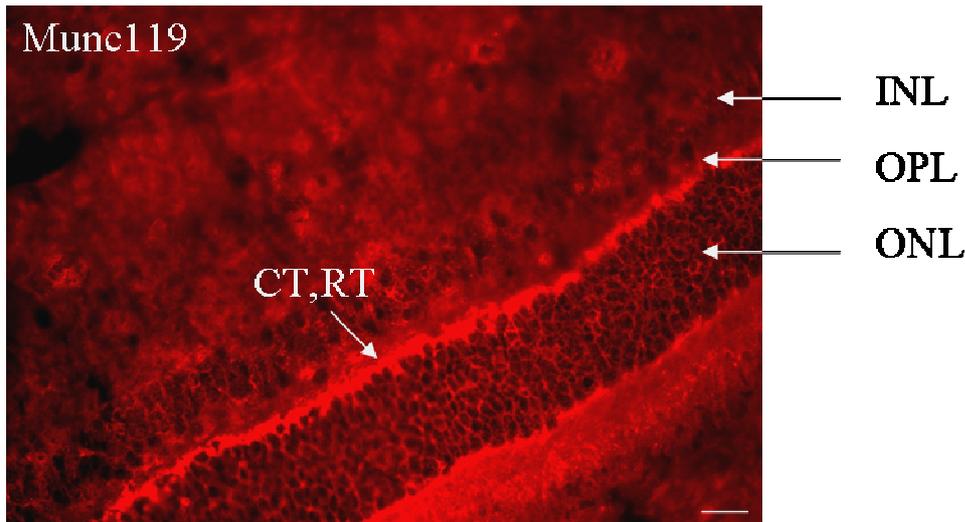


Abb. 4: Lokalisierung von Munc119 in der Retina. Markierung mit Anti-Munc119 Immunsereum (V2T2 120. Immunisierungstag). Man erkennt eine deutliche Anreicherung von Munc119 in der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Belichtungszeit 25ms, Maßstab: 10µm. INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen

Als Negativkontrolle wurde bei jeder Versuchsreihe ein Kryoschnitt anstelle des Primäantikörpers nur mit PBS und anschließend mit GAR CY3 als Sekundäantikörper inkubiert, um Hintergrundsignale von den Antikörper-induzierten Signalen abgrenzen zu können (Abb. 5). Die mit PBS inkubierten Kryoschnitte der Rinderretina zeigten keine signifikanten Markierungen in den verschiedenen Schichten der Retina, abgesehen von einer diskreten Hintergrundmarkierung (Abb. 5).

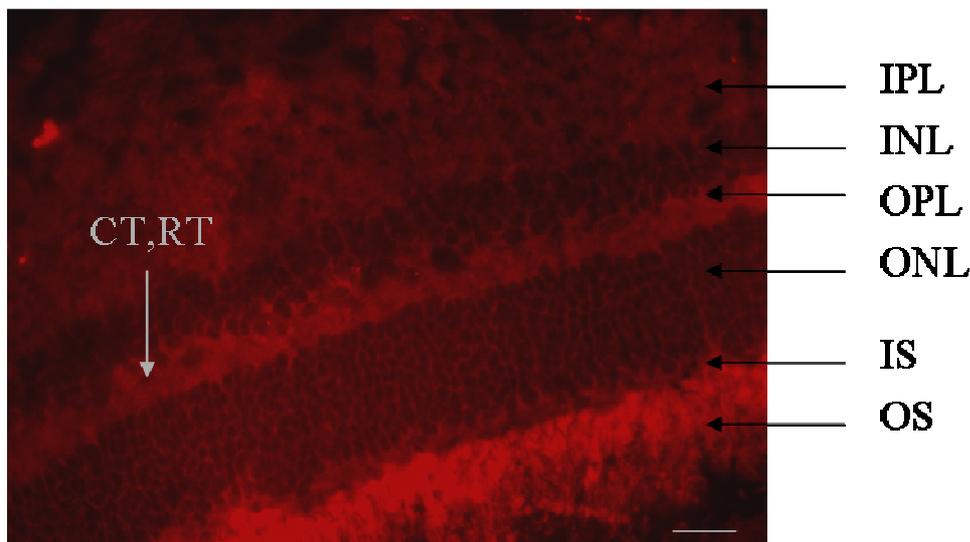


Abb. 5: Inkubation eines Retinaschnitts nur mit Zweitantikörper (ohne Primäantikörper) Die Inkubation nur mit dem Zweitantikörper zeigt keine signifikanten Markierungen sondern eine diskrete Hintergrundmarkierung insbesondere der Innenglieder. Die Innenglieder haben aufgrund ihres hohen Gehalts an Mitochondrien eine gewisse Autofluoreszenz. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10µm. INL: innere Körnerzellschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen; IS, OS: Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren

Ergebnisse

Ebenfalls als Negativkontrolle diente die Inkubation mit dem Prä-Immunsereum von Anti-Munc119 V2T2, welches vor der Immunisierung aus dem Kaninchen gewonnen wurde. Diese Inkubationen wurden durchgeführt, um Reaktionen des Gewebes mit vorbestehenden Antikörpern, die nicht gegen das injizierte Immunogen gerichtet sind, auszuschließen (Abb.6). Auch hier zeigten sich ähnlich wie bei der Inkubation nur mit Zweitantikörper in der gesamten Retina keine Markierungen einer bestimmten Struktur. Dies belegt, dass die Immunmarkierung der OPL (Abb.4) auf Antikörper gegen Munc119 und nicht auf vorbestehende Antikörper zurückzuführen ist. Diese Annahme wurde durch Präabsorptionsexperimente (Siehe Abschnitt 4.2.) weiter untermauert und bestätigt.

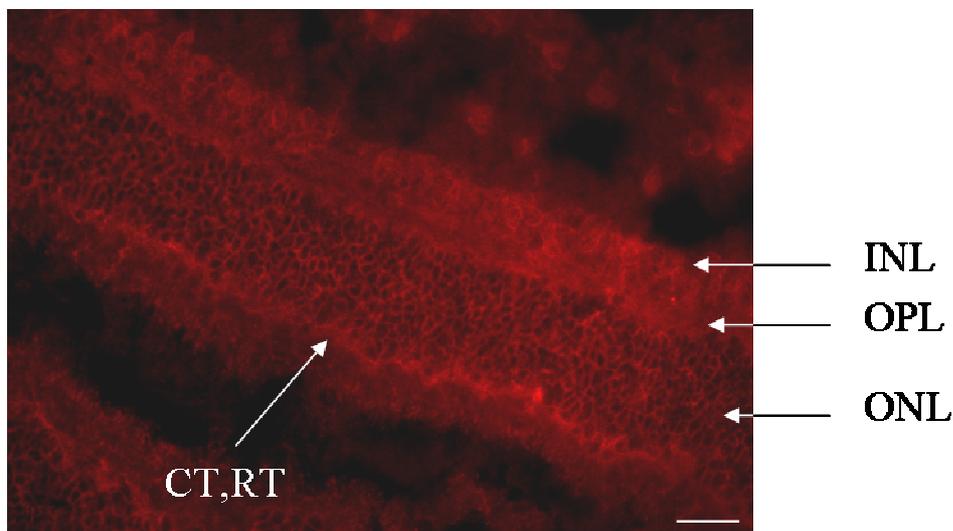


Abb. 6: Markierungen der Rinderretina mit dem Prä-Immunsereum von Anti-Munc119 Immunsereum (V2T2 120. Immunisierungstag). Es finden sich keine Markierungen in der äußeren plexiformen Schicht sowie in der gesamten Retina. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10µm. INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen

Als Positivkontrolle diente U26564, ein Antikörper gegen die RIBEYE(B)-Domäne. RIBEYE ist eine Hauptkomponente synaptischer Ribbons (Schmitz et al., 2000, Magupalli et al., 2008). Antikörper gegen RIBEYE markieren, wie erwartet, die Synaptic Ribbons in der OPL (Abb.7) und IPL (nicht gezeigt). Das hufeisenförmige Erscheinungsbild der Strukturen, die mit dem Antikörper gegen RIBEYE markiert wurden ist typisch für Synaptic Ribbons in den Photorezeptorsynapsen.

Ergebnisse

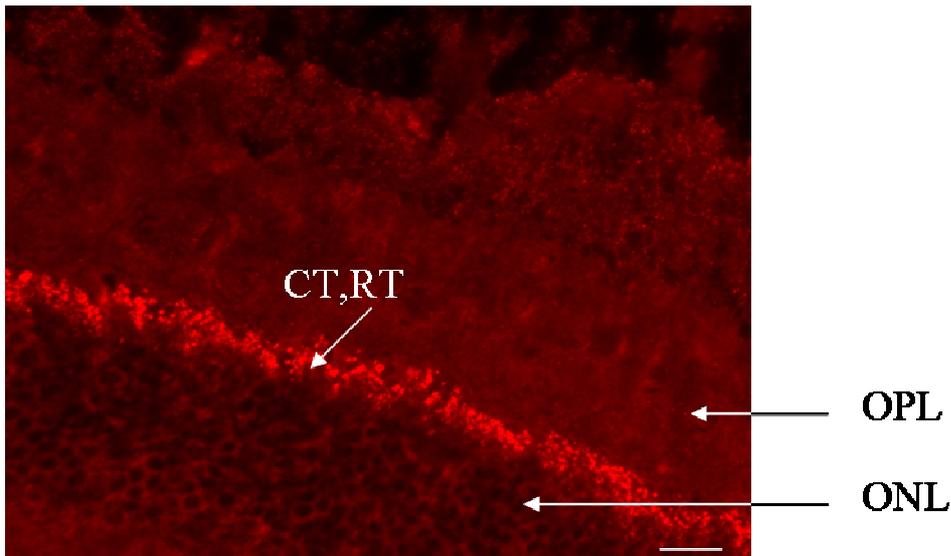


Abb. 7: Immunmarkierung der Rinderretina mit U26564 (Anti-RIBEYE(B)Domäne). In der Positivkontrolle zeigt sich, dass RIBEYE in hoher Dichte in den Synapsen der OPL vorhanden ist. Die RIBEYE-enhaltenden Strukturen in der OPL weisen ein typisches hufeisenförmiges Erscheinungsbild auf. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10µm. OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen

Anschließend wurde in einer Verdünnungsreihe die Endkonzentration von Anti-Munc119 V2T2 120. IT gesucht. Dafür wurde jeweils ein Mikroliter des Antikörpers mit verschiedenen Mengen von einfach konzentriertem PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) verdünnt und Immunfluoreszenzmarkierungen durchgeführt (Abb. 8 bis 13). Dabei erwies sich eine 1:1000 Verdünnung von Munc119 V2T2 als die geeignetste (bestes Signal- zu Hintergrundverhältnis).

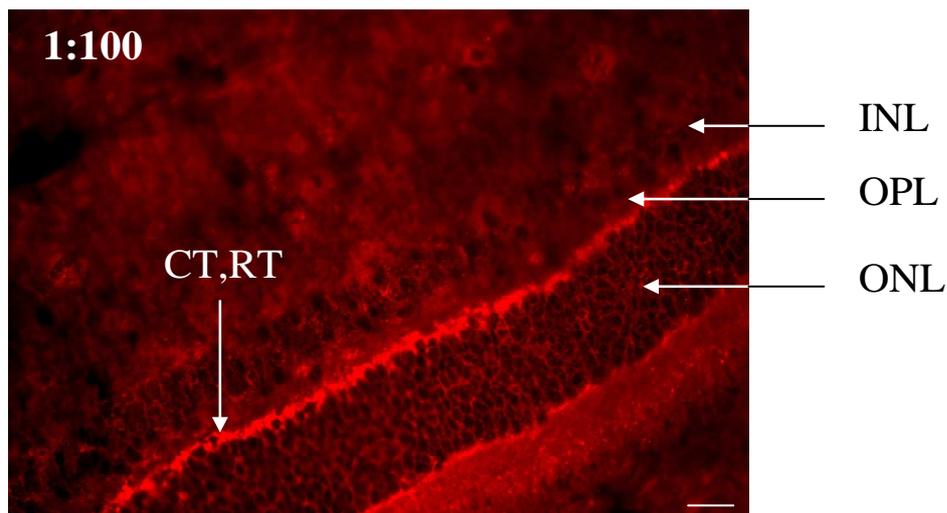


Abb.8: Inkubation eines Rinderretinaschnitts mit Anti-Munc119 Immunsereum (V2T2 120. Immunisierungstag) verdünnt im Verhältnis **1:100**. Bei dieser Verdünnung des Antikörpers Anti-Munc119 V2T2 120. IT erkennt man eine deutliche Anreicherung von Munc119 in den präsynaptischen Terminalen der Zapfen- und Stäbchenschicht. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 µm. INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

Ergebnisse

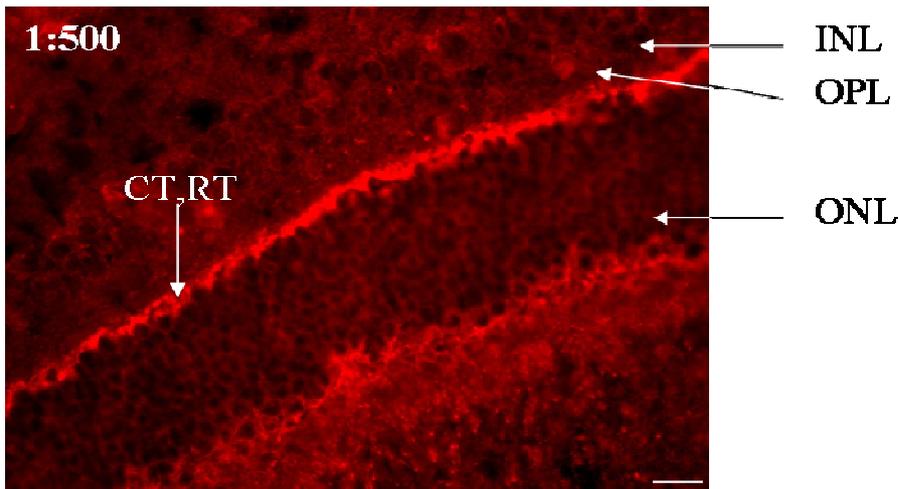


Abb. 9: Immunmarkierung mit Anti-Munc119 Immunsereum (V2T2 120. Immunisierungstag) **1:500** verdünnt mit PBS. Die Verdünnung **1:500** eignet sich ebenfalls sehr gut zur Immunfluoreszenzmarkierung des Proteins Munc119. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μ m. INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

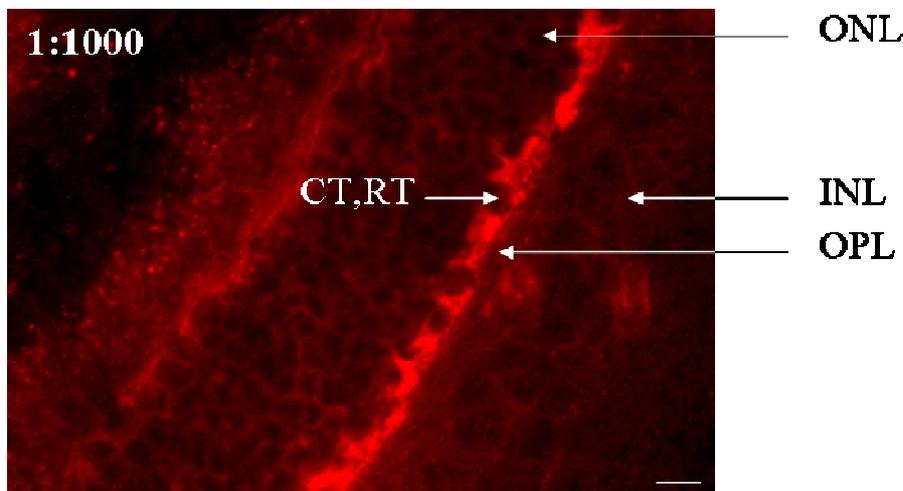


Abb. 10: Immunmarkierung eines Rinderretinaschnitts mit Anti-Munc119 Immunsereum (V2T2 120. Immunisierungstag) **1:1000** verdünnt mit PBS. Hier zeigen sich deutliche Signale des Proteins Munc119 in der OPL. Für alle weiteren Versuche wurde Anti-Munc119 V2T2 120. IT im Verhältnis 1:1000 mit PBS verdünnt. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μ m.

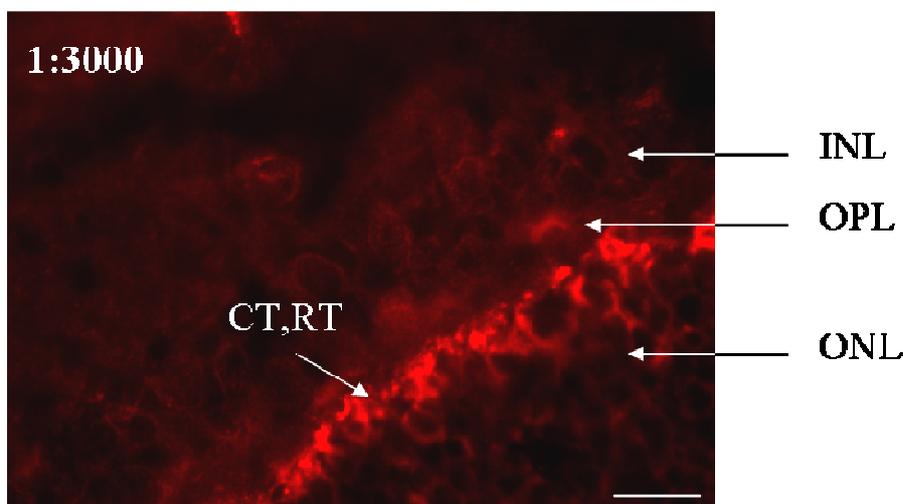


Abb. 11: Inkubation eines Kryoschnitts der Rinderretina mit Anti-Munc119 Immunsereum (V2T2 120. Immunisierungstag) (Verdünnung **1:3000**). Die 1:3000 Verdünnung des Munc119-Antigens zeigen noch deutliche Markierungen in der OPL. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μ m.

Ergebnisse

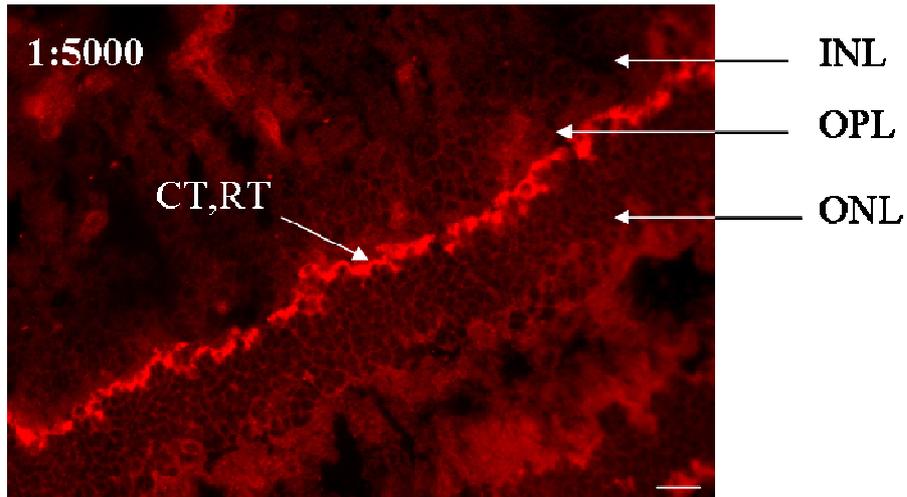


Abb. 12: Immunmarkierung eines Rinderretinaschnitts mit Anti-Munc119 Immuneserum (V2T2 120. Immunisierungstag) verdünnt mit PBS im Verhältnis **1:5000**. Die Inkubation mit einer Verdünnung von 1:5000 ergab eine kräftige Immunfluoreszenzmarkierung von Munc119 in der OPL. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten wurde jedoch von einer so hohen Verdünnung abgesehen. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μm . INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen

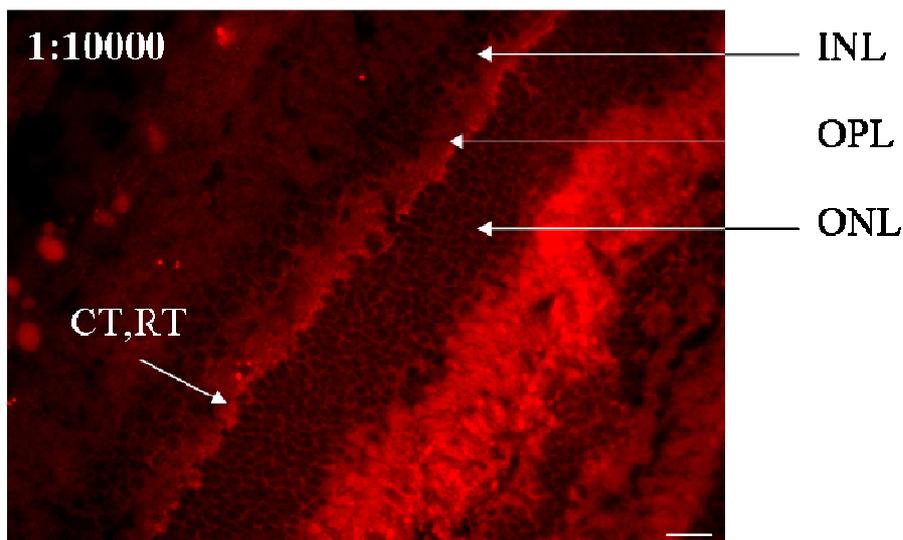


Abb. 13: Immunmarkierung eines Kryoschnitts der Rinderretina mit Anti-Munc119 V2T2 120. Immunisierungstag im Verhältnis **1:10000** mit PBS verdünnt. Bei diesen Verdünnungen sind keine Markierungen in der OPL mehr erkennbar, lediglich eine unspezifische Hintergrundfärbung. Das Verhältnis 1:10000 erwies sich somit als „Endpunkt“ der möglichen Verdünnungen. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μm . INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

Ergebnisse

4.2. Präabsorptionsexperimente

Um die Spezifität der Immunmarkierung weiter zu überprüfen, wurde das Munc119-Antigen entweder mit GST (als Kontrolle) oder mit Munc119-GST präabsorbiert. Die Präabsorption mit Munc119-GST führte zur Blockierung der Immunmarkierung in der äußeren plexiformen Schicht (Abb. 15), wohingegen die Präabsorption mit GST allein die Immunmarkierung in der OPL nicht beeinflusste (Abb. 14). Dieses Ergebnis zeigte, dass die OPL-Markierungen durch das Munc119-Antigen durch Munc119-Antikörper bewirkt wurden, die gegen den Munc119-Teil des Fusionsproteins gerichtet sind. Die zur Durchführung der Präabsorptionsexperimente erforderlichen Fusionsproteine wurden freundlicherweise von Herrn Kannan Alpadi aus der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

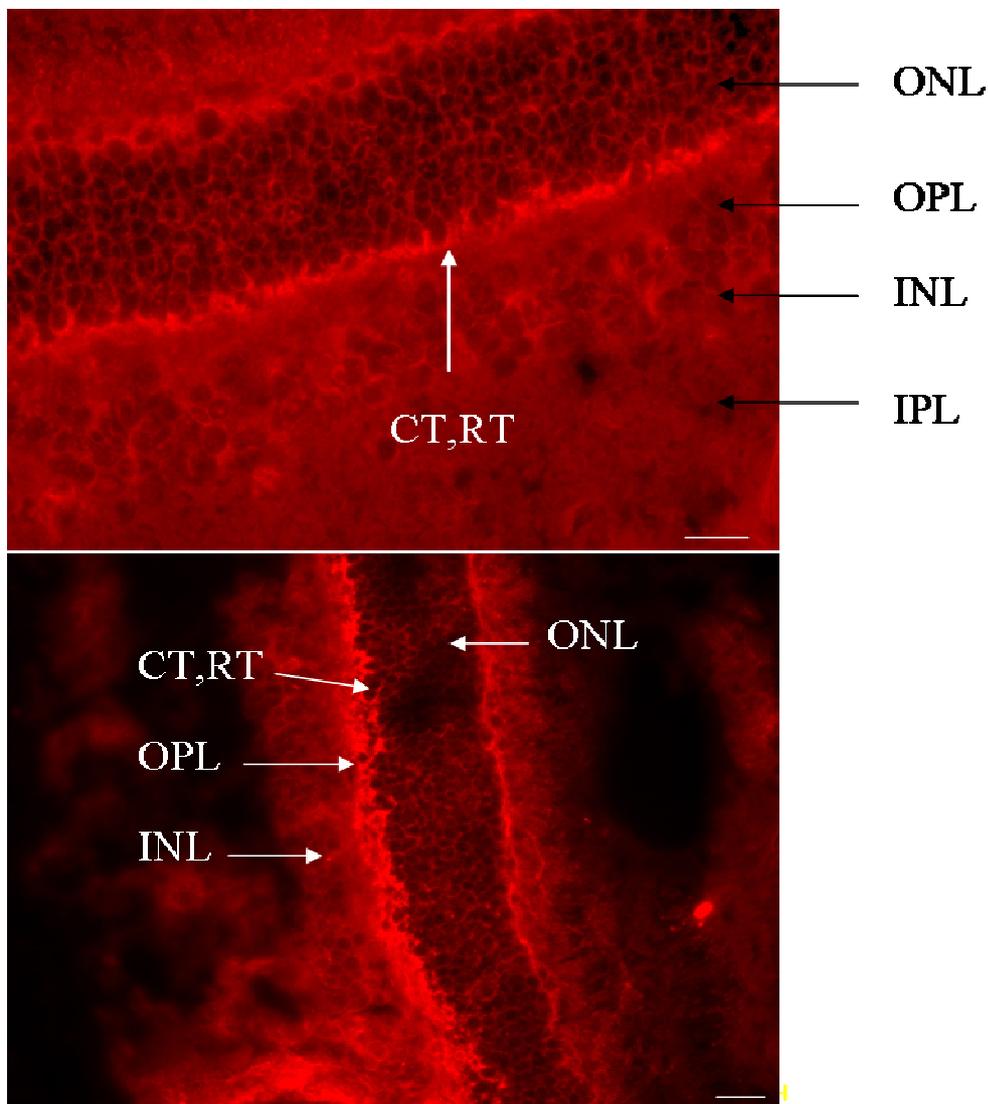


Abb. 14: Kryostatschnitte der Rinderretina inkubiert mit GST-präabsorbiertem Anti-Munc119 V2T2 120. IT
Die mit GST-präabsorbierten Antikörpern markierten Schnitte zeigen immer noch eine deutliche Markierung von Munc119 in der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Dies beweist, dass der verwendete Antikörper spezifisch Munc119 in der OPL detektiert. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μm . IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

Ergebnisse

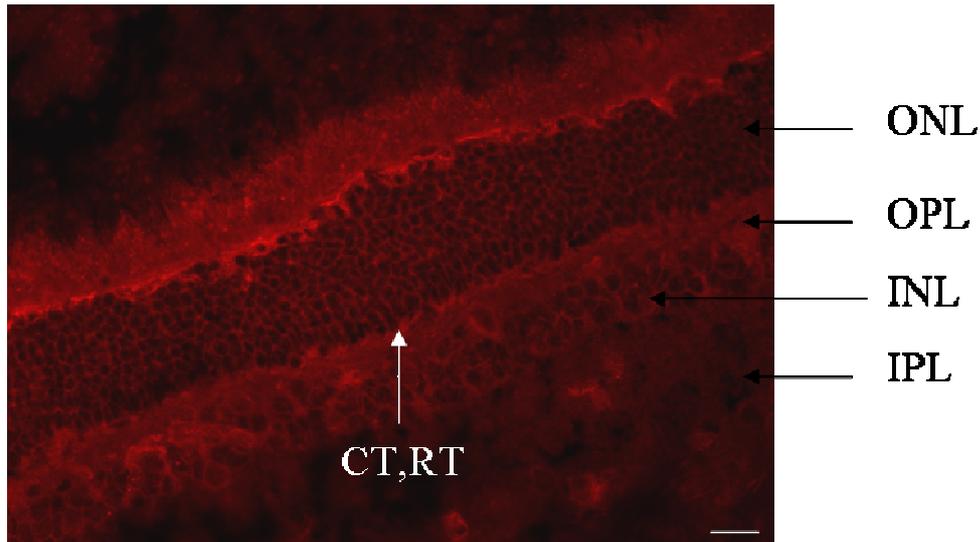


Abb. 15: Immunmarkierung eines Rinderretinaschnitts mit Munc119-GST-präabsorbiertem Anti-Munc119 Antiserum (Immunsereum, V2T2 120. Immunisierungstag). Der mit Munc119-GST-Beads vorbehandelte Antikörper zeigt in der Immunfluoreszenzmikroskopie kein Signal in der äußeren plexiformen Schicht. Der Antikörper wurde erfolgreich durch die Präabsorption mit Munc119-GST, nicht aber durch GST allein (Abb.14) präabsorbiert. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μm . IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

Ergebnisse

4.3. Doppelfluoreszenzuntersuchungen

In den nachfolgenden Doppelfluoreszenzuntersuchungen wurden neben Munc119 noch andere Proteine der Retina markiert, um die Lokalisation von Munc119 noch präziser bestimmen zu können. Zu diesem Zweck wurden weitere Antikörper gegen verschiedene prä- und postsynaptische Proteine der Photorezeptorsynapse eingesetzt. Für die Doppelfluoreszenzen wurden beide Primärantikörper in entsprechenden Verdünnungen gleichzeitig auf die Kryoschnitte pipettiert und inkubiert. Da die Primärantikörper jeweils aus verschiedenen Spezies stammten, war eine selektive Detektion der Primärantikörper durch entsprechende Sekundärantikörper möglich. Anti-Munc119 ist ein Antikörper aus Kaninchen, die anderen Primärantikörper waren jeweils in Mäusen hergestellte und gewonnene Antikörper.

Da U26564 (Anti-RIBEYE(B)-Domäne) genau wie Anti-Munc119 ein aus einem Kaninchen gewonnener Antikörper ist, wurde zur Darstellung von RIBEYE der monoklonale Antikörper Anti-CtBP2 gewählt, der die B-Domäne von RIBEYE markiert (Abb.16 B, 17 B). Das Protein CtBP2 selbst ist in der Retina nicht enthalten (unveröffentlichte Befunde) markiert aber die RIBEYE(B)-Domäne, die praktisch identisch ist mit CtBP2. Die Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 und Antikörpern gegen CtBP2 (C-terminal binding protein 2) zeigt die typische hufeisenförmige Lokalisation von RIBEYE in den Ribbonsynapsen (Abb. 16,17). Munc119 zeigt sich hier in sehr enger räumlicher Verbindung zu RIBEYE lokalisiert. Das Munc119 Immunsignal ist sehr ähnlich, aber nicht identisch, sondern zeigt insgesamt ein etwas diffuseres Anordnungsmuster.

Ergebnisse

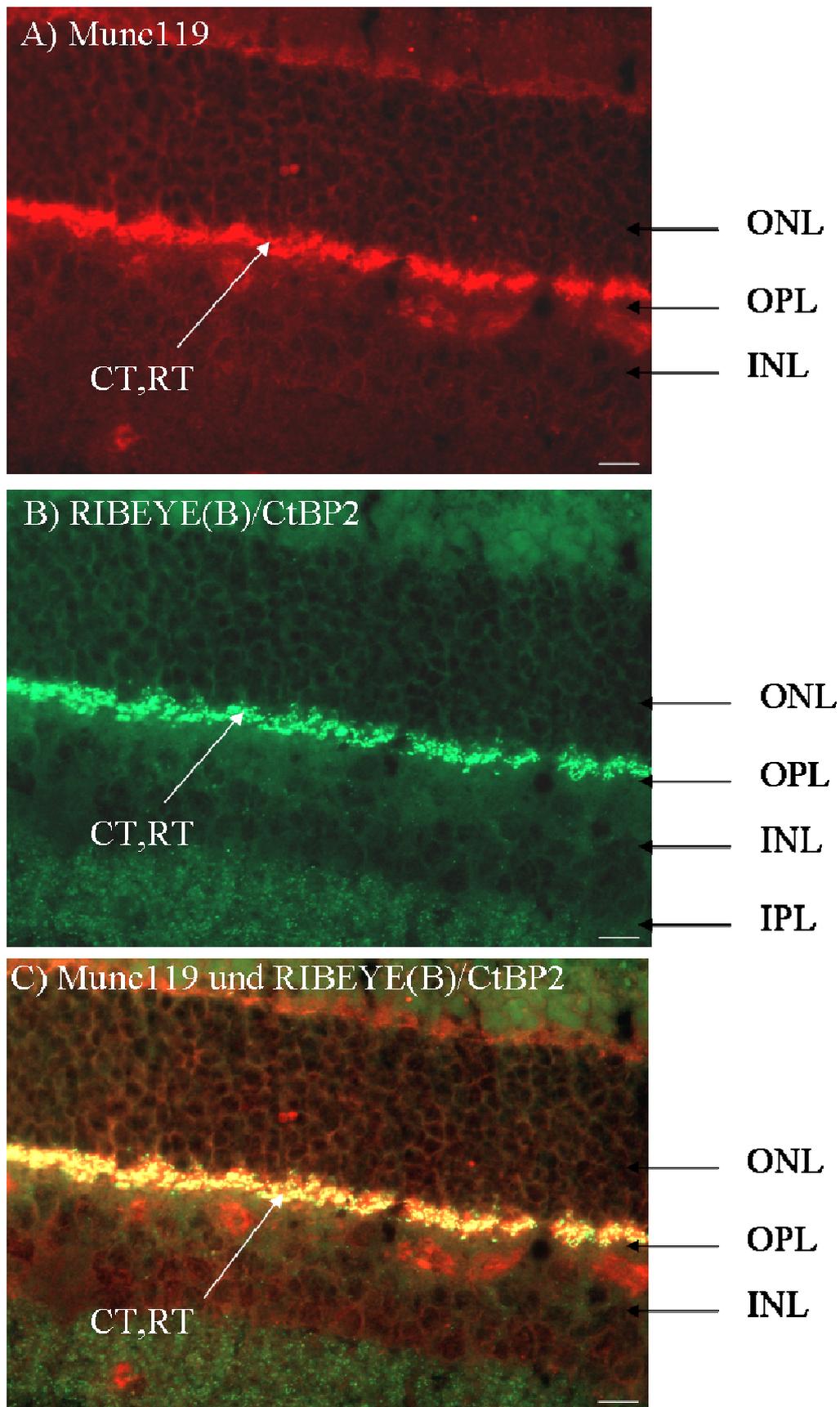


Abb. 16: Doppelfluoreszenzimmunmarkierungen der Rinderretina mit Antikörpern gegen Munc119 (A) und RIBEYE(B)/CtBP2 (B). C) zeigt die Überlagerung der beiden Signale. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μm . IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

Ergebnisse

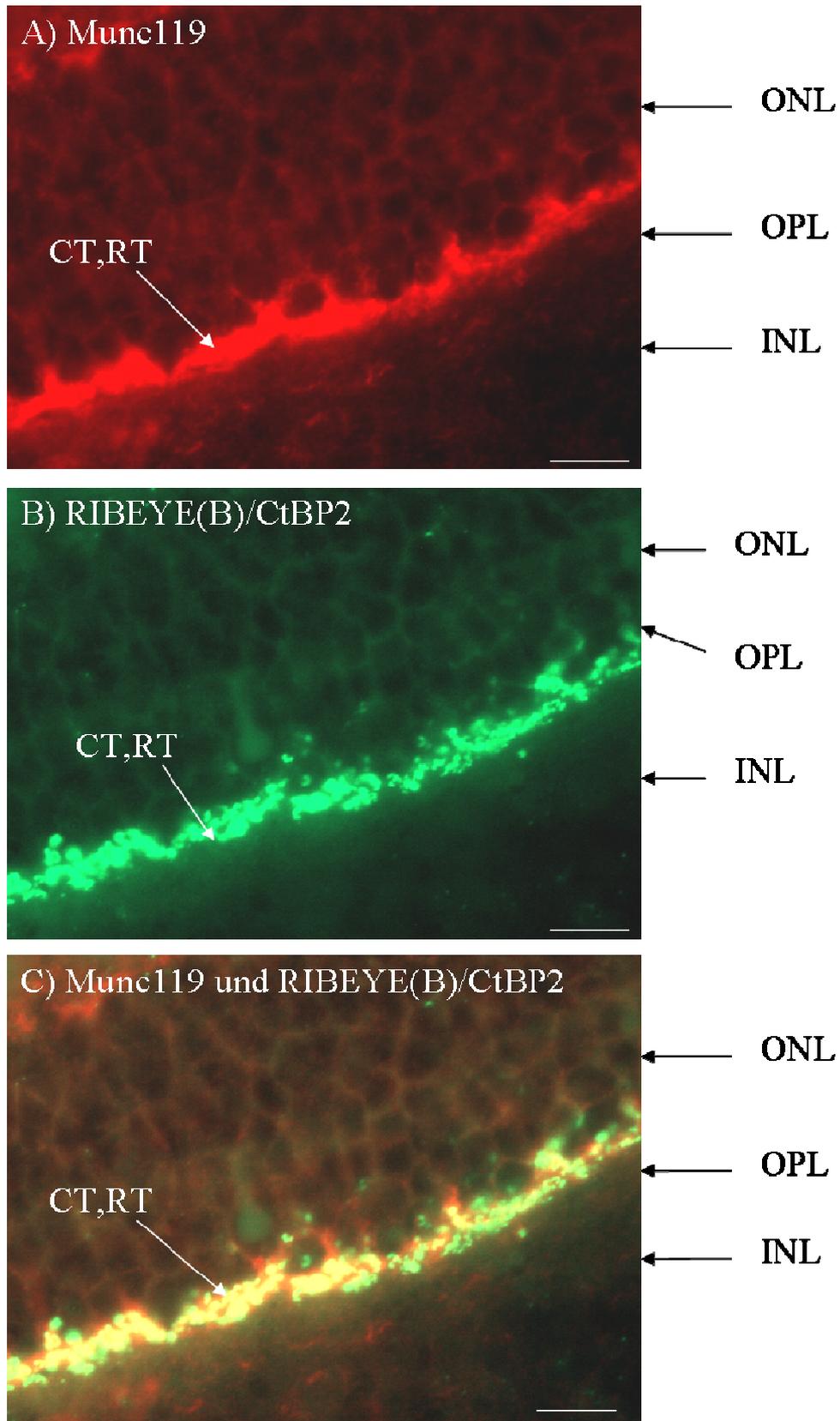


Abb. 17: Munc119 co-lokalisiert mit RIBEYE in der OPL der Rinderretina. Immunmarkierung von Rinderretinaschnitten mit Antikörpern gegen Munc119 (A), CtBP2 (B), sowie Überlagerung beider in 100facher Vergrößerung (C). Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μm . IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen

Ergebnisse

Neben RIBEYE ist auch CtBP1 (C-terminal binding Protein 1) eine Komponente der synaptischen Ribbons. Die gleichzeitige Markierung von Munc119 und CtBP1 offenbart, dass beide Proteine in den Photorezeptorterminalen der äußeren plexiformen Schicht co-lokalisieren (Abb.18 und 19). CtBP1 markiert die synaptischen Ribbons in den Photorezeptorzellen und spiegelt das typische hufeisenförmige Anordnungsmuster dieser synaptischen Ribbons wieder. CtBP1-Markierungen finden sich in der OPL. In der IPL finden sich ebenfalls Synaptic Ribbons, jedoch sind sie dort kleiner als in der OPL. Munc119 befindet sich ebenfalls in den Ribbonsynapsen der OPL. Munc119 co-lokalisiert mit dem RIBEYE-Signal. Das Verteilungsmuster von Munc119 ist allerdings wesentlich diffuser und nicht allein auf die Synaptic Ribbons beschränkt (Abb. 18 und 19).

Ergebnisse

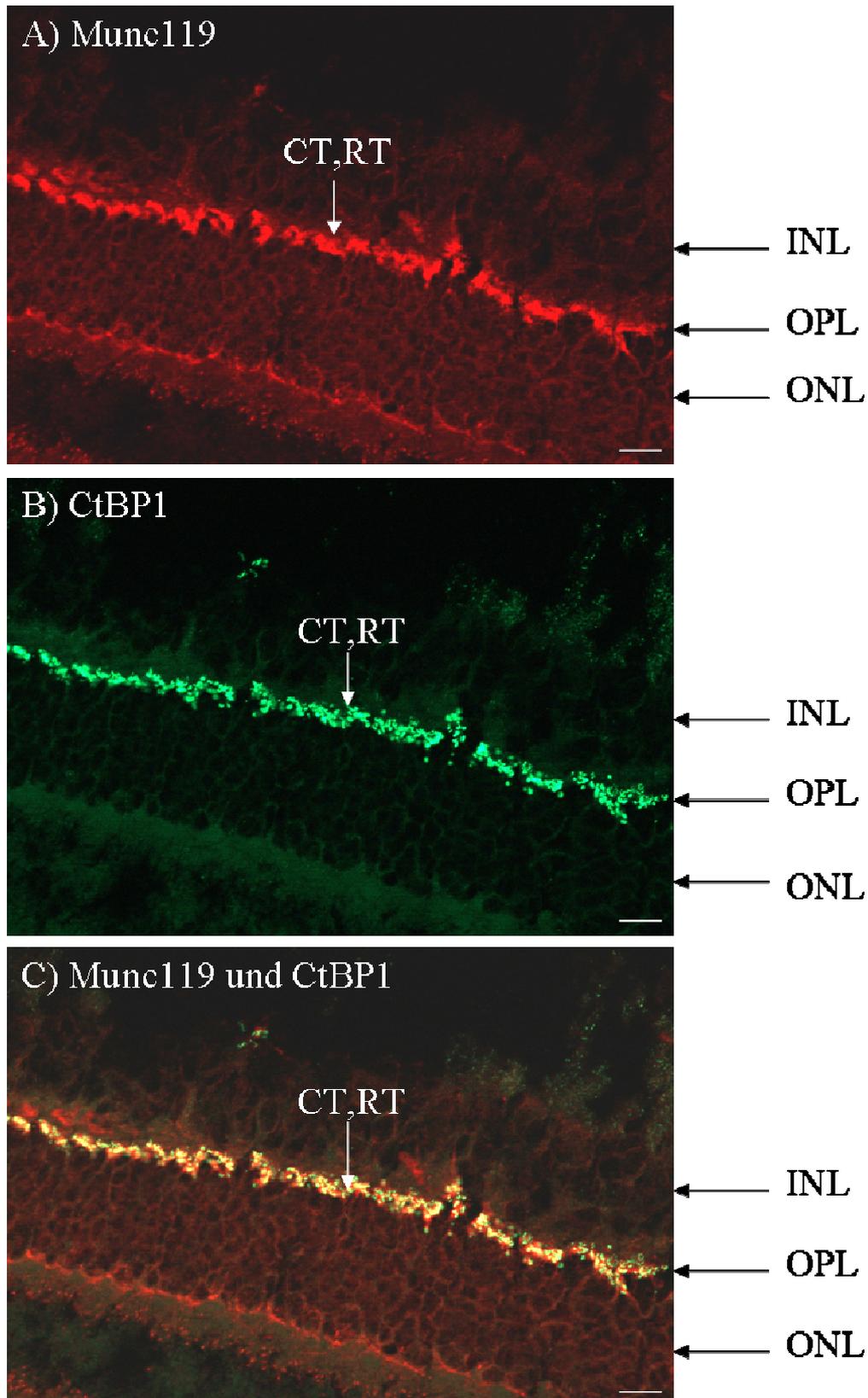


Abb. 18: Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 und Anti-CtBP1

A) Kryostatschnitt der Rinderretina markiert mit Anti-Munc119. In der OPL zeigt sich eine deutliche Anreicherung von Munc119 B) CtBP1 ist ein Marker für synaptische Ribbons. Man erkennt eine kräftige Fluoreszenz in den Zapfen- und Stäbchenterminalen in der OPL. Die hufeisenförmige Konfiguration der Ribbons ist deutlich zu erkennen. C) Überlagerung beider Kanäle. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μ m. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: Innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

Ergebnisse

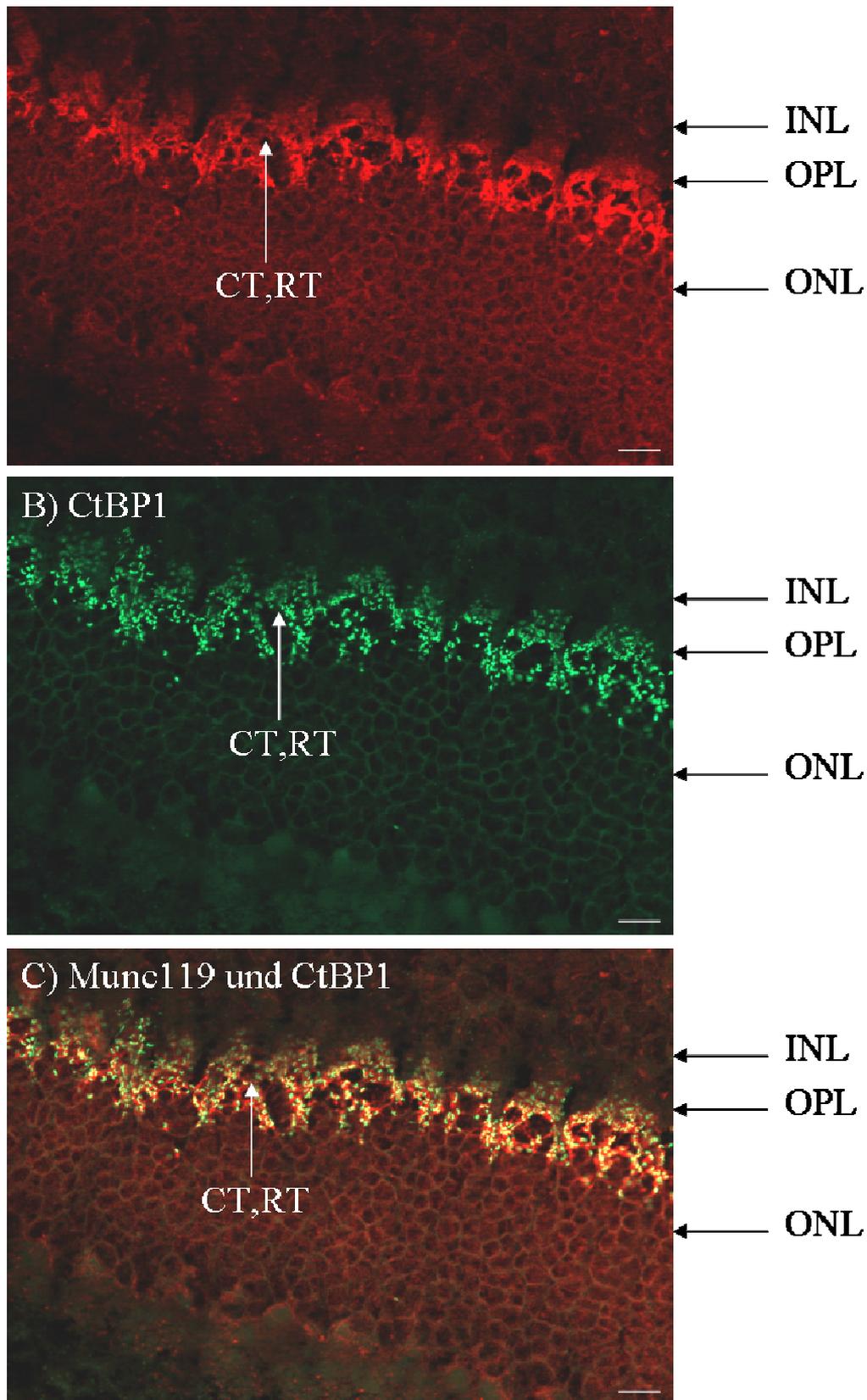


Abb. 19: Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 und Anti-CtBP1 in 100facher Vergrößerung
A) Retina markiert mit Antikörpern gegen Munc119. B) Immunmarkierung mit Antikörpern gegen CtBP1 C) Überlagerung beider Kanäle. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μ m. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: Innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen

Ergebnisse

GRIP (glutamate receptor-interacting protein) ist ein postsynaptisches Strukturprotein an Glutamatrezeptoren (Zhang et al., 2001, Wässle et al., 2001). Anti-GRIP markiert damit die postsynaptische Nerventerminale der Photorezeptorsynapsen in der OPL (Abb.20 und 21). Im Gegensatz dazu ist Munc119 deutlich in der Präsynapse lokalisiert. Besonders in der großen Vergrößerung (Abb. 21) wird die diffuse Verteilung großer Mengen von Munc119 nahezu in der gesamten präsynaptischen Terminale der Photorezeptorzellen deutlich.

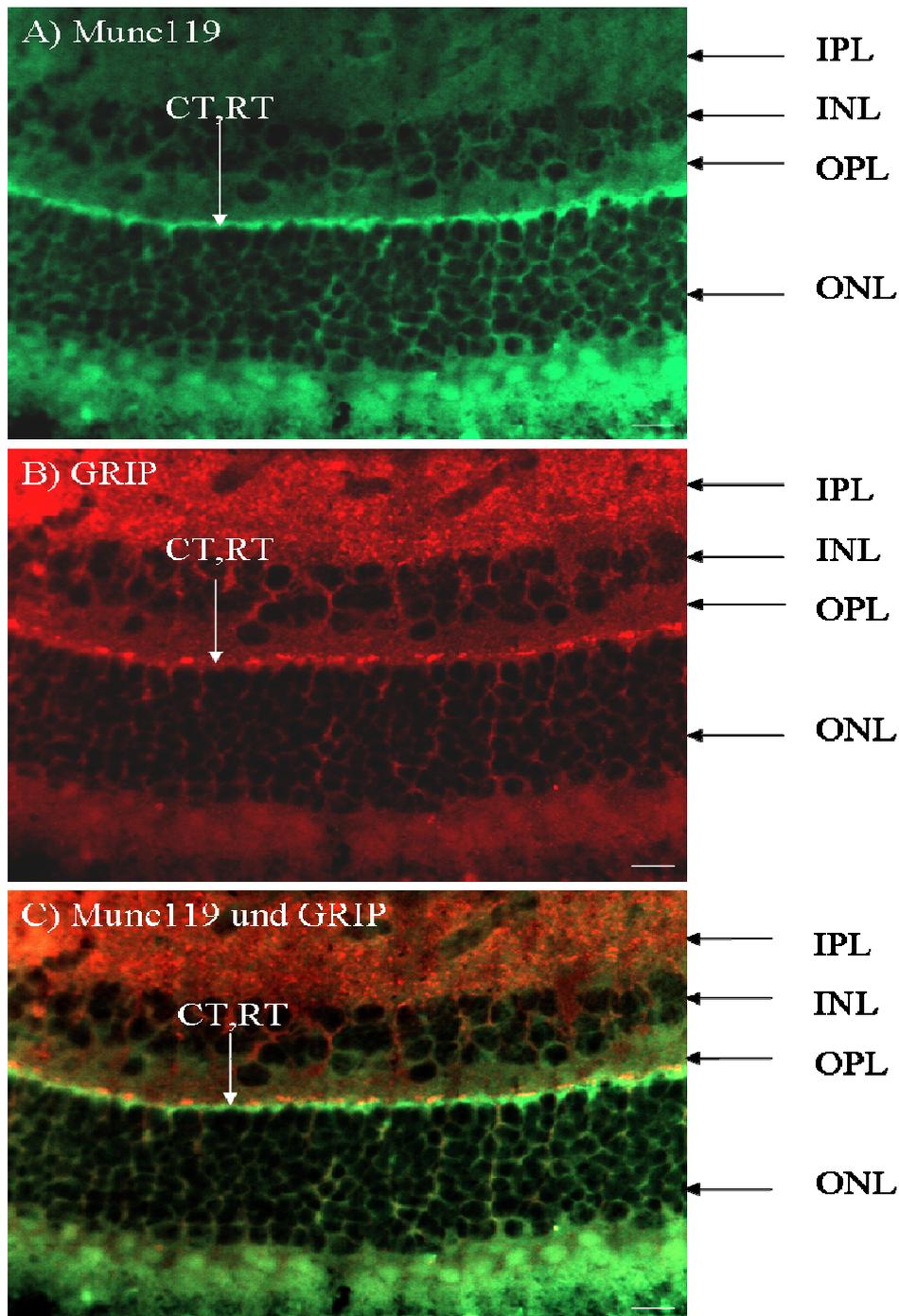


Abb. 20: Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 V2T2 120. IT und Anti-GRIP. A,B) Man erkennt, dass sowohl Munc119 als auch GRIP in der äußeren plexiformen Schicht lokalisiert sind. C): Überlagerung, GRIP befindet sich in der Postsynapse, Munc119 dagegen in der Präsynapse lokalisiert. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μ m. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen

Ergebnisse

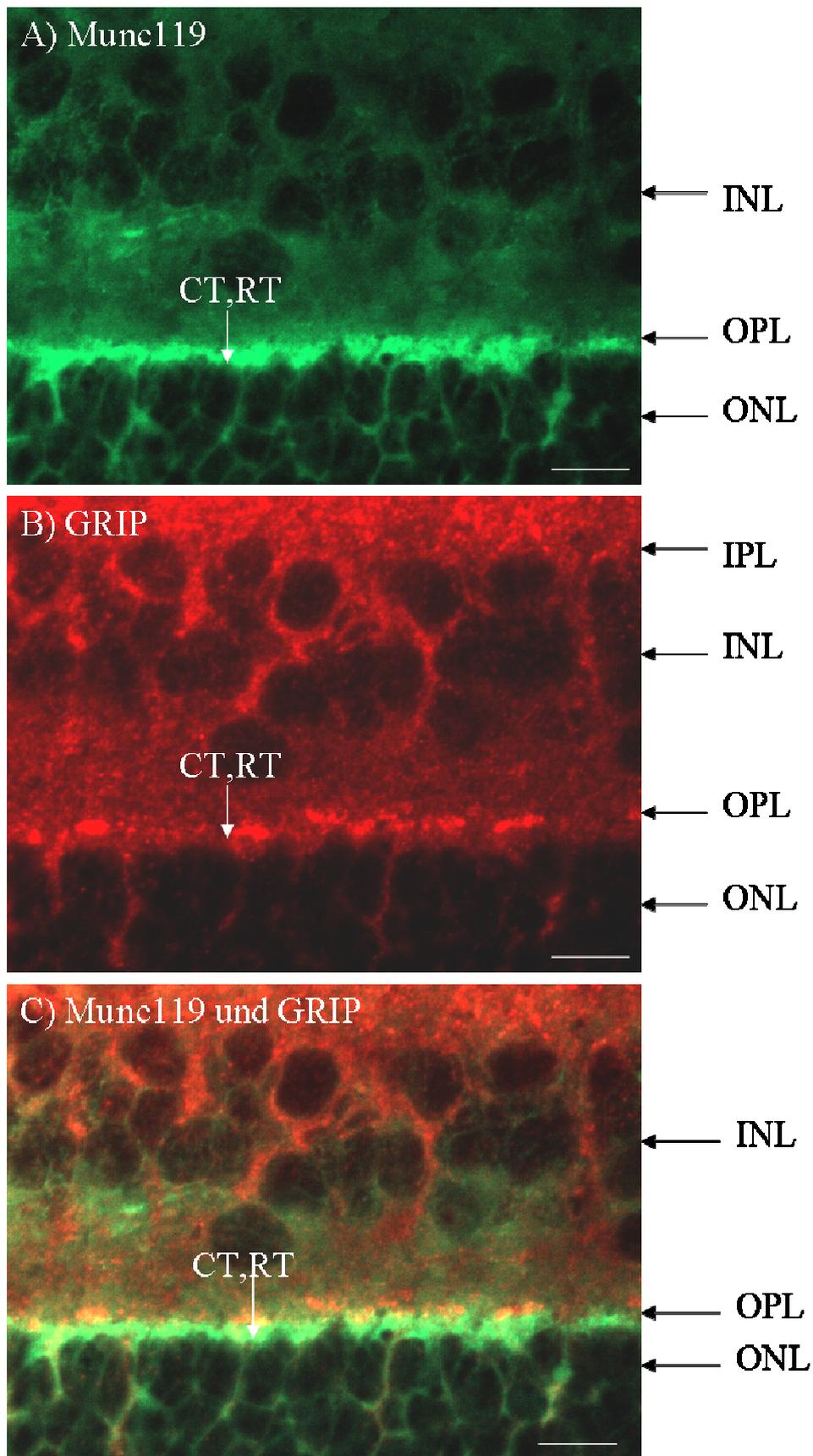


Abb. 21: Immunmarkierung der Retina mit Munc119-Antikörpern (A), Antikörpern gegen GRIP (B), sowie Überlagerung beider (C) in 100facher Vergrößerung. Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μ m. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerzellschicht; CT,RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

Ergebnisse

Synaptophysin ist ein synaptisches Vesikelprotein, das als Marker für Nerventerminalen dient (Navone et al., 1986). Anti-Synaptophysin markiert also die gesamte synaptische Zone (Abb. 22). Die Doppelfluoreszenz mit Anti-Synaptophysin ergab, dass sich Munc119-Markierungen nur innerhalb Synaptophysin-positiver Nerventerminalen finden, jedoch nicht die gesamte Nerventerminale besetzt wird (Abb. 22).

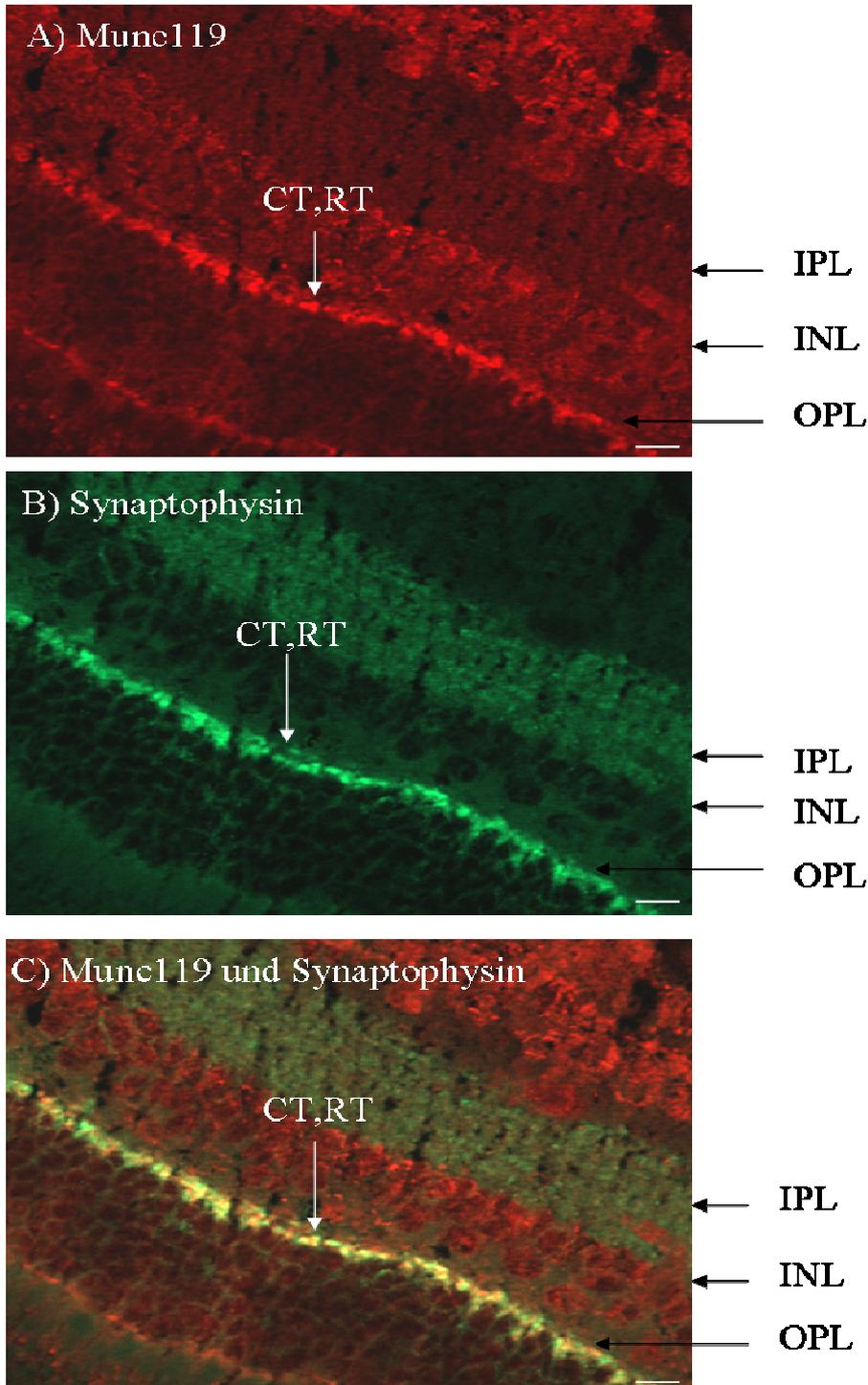


Abb. 22: Immunmarkierung von Munc119 (A), Synaptophysin (B) und Überlagerung beider (C). Belichtungszeit 25ms, Maßstab 10 μm . IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerzellschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; CT, RT: Zapfen- und Stäbchenterminalen.

5. Diskussion

5.1. RIBEYE, eine Komponente synaptischer Ribbons

Ribbonsynapsen sind spezialisierte chemische Synapsen, die vor allem in bestimmten sensorischen Zellen von Vertebraten zu finden sind. In der Retina finden sich Ribbonsynapsen in Photorezeptor- und Bipolarzellen (Dowling, 1987; Sterling, 1998). Sie unterscheiden sich von konventionellen chemischen Synapsen. Morphologisch sind sie durch Anwesenheit von großen, elektronendichten präsynaptischen bandförmigen Strukturen, die man als Synaptic Ribbons bezeichnet, gekennzeichnet (Sjöstrand, 1958, Dowling, 1987, Sterling, 1998). Jedes dieser Ribbons ist von transmittergefüllten synaptischen Vesikeln umgeben (Wagner, 1996). Physiologisch gesehen sind Ribbonsynapsen tonisch aktive Synapsen, die zu einer hohen Rate tonischer Neurotransmitterfreisetzung befähigt sind, die durch eine kontinuierliche Vesikelexozytose gewährleistet wird (Dowling, 1987, Sterling, 1998). Die große Menge an synaptischen Vesikeln, die an diesen Ribbons gebunden sind, lassen vermuten, dass die Synaptic Ribbons ein zentrales Strukturelement der Ribbonsynapsen sind, das die Exozytose und Endozytose von synaptischen Vesikeln in diesen spezialisierten Synapsen beschleunigt. Wie genau die Synaptic Ribbons auf molekularer Ebene arbeiten ist noch unbekannt.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Schmitz identifizierte das Protein RIBEYE, das die Hauptkomponente der Synaptic Ribbons bildet. RIBEYE ist nur in Ribbon-, nicht aber in konventionellen Synapsen zu finden (Schmitz et al., 2000). Die AG Schmitz hat gezeigt, dass RIBEYE ein Strukturprotein ist, mit idealen Eigenschaften, um die Synaptic Ribbons aufzubauen, und die ultrastrukturelle physiologische Plastizität, die diese Strukturen aufweisen, zu erklären (Magupalli et al., 2008).

Die Identifikation und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von RIBEYE soll weitere wichtige Informationen liefern, um zu verstehen, wie RIBEYE und die Synaptic Ribbons in der Synapse auf molekularer Ebene arbeiten.

Diskussion

5.2. RIBEYE interagiert mit Munc119

Kannan Alpadi identifizierte im Rahmen seiner naturwissenschaftlichen Doktorarbeit mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden Munc119 als Interaktionspartner von RIBEYE. In Fusionsprotein-Pulldown-Analysen, Co-Immunopräzipitationsuntersuchungen sowie mit Hilfe transfizierter COS-Zellen konnte eine spezifische Interaktion zwischen der RIBEYE(B)-Domäne und Munc119 nachgewiesen werden. Unter Verwendung des YTH-Systems (Hefe-Zwei-Hybrid-System) wurde gezeigt, dass die PrBP/ δ -Homologiedomäne von Munc119 für die Interaktion mit der NADH-bindenden Subdomäne von RIBEYE verantwortlich ist. Punktmutanten von RIBEYE, denen die Fähigkeit zur NADH-Bindung fehlte, konnten weiterhin Munc119 binden. Dies deutet darauf hin, dass die NADH-Bindung und die Munc-Bindung an RIBEYE unabhängige Ereignisse sind.

Diese Hypothese konnte in Protein-Pulldown-Analysen weiter bestätigt werden, in denen gezeigt wurde, dass die Interaktion zwischen RIBEYE(B)MBP und Munc119-GST nicht durch Zugabe physiologischer Mengen von NAD⁺ und NADH zu beeinflussen ist. Dennoch befindet sich die Munc119-Bindungsstelle in enger räumlicher Nachbarschaft zur NADH-Bindungsstelle, wie die Analyse verschiedener Punktmutanten der NADH-Bindungsdomäne zeigte (Alpadi et al., 2008).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde morphologisch untersucht, wo Munc119 in der Netzhaut und speziell in den Photorezeptorzellen lokalisiert ist, um so auf morphologischer Ebene die Interaktion von Munc119 mit RIBEYE besser verstehen zu können. Mit morphologischen Methoden sollte bestimmt werden, ob Munc119 in räumlicher Nähe zu den Synaptic Ribbons vorliegt. Zu diesem Zweck wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Munc119 hergestellt und in der Immunfluoreszenz ausgetestet. Es zeigte sich, dass Munc119 diffus in der präsynaptischen Terminale verteilt ist inklusive der Region, in der auch die Synaptic Ribbons anwesend sind. Das Munc119-signal co-lokalisiert mit dem Signal, das mit Antikörpern gegen die B-Domäne von RIBEYE(B)/CtBP2 detektiert wurde. Das Munc119-Signal ist allerdings nicht auf die Ribbons begrenzt, sondern befindet sich auch im Rest der präsynaptischen Terminale. Befunde von Alpadi et al. (2008) legen nahe, dass Munc119 in dieser Lokalisation durch noch unbekannte Stimuli an die Synaptic Ribbons rekrutiert werden kann.

Die Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen Munc119 und CtBP1, das ebenfalls in den Synaptic Ribbons vorhanden ist (Tom Dieck et al., 2005) bestätigt weiter, dass beide Proteine

Diskussion

in großer Menge in den Zapfen- und Stäbchenterminalen der äußeren plexiformen Schicht vorhanden sind und dort co-lokalisieren. Die Markierung von CtBP1 spiegelt das typische hufeisenförmige Anordnungsmuster von RIBEYE in den synaptischen Ribbons wieder. Munc119 befindet sich ebenfalls in den Ribbonsynapsen, weist jedoch ein wesentlich diffuseres und großflächigeres Anordnungsmuster auf. Die Doppelfluoreszenz mit CtBP2, welches der B-Dömane von RIBEYE entspricht, verdeutlicht ebenfalls die hufeisenförmige Lokalisation von RIBEYE in den Ribbonsynapsen und die weitläufigere Anordnung von Munc119 in den Zapfen- und Stäbchenterminalen. Dies belegt die Vermutung, dass Munc119 eine peripher gebundene Komponente synaptischer Ribbons ist. GRIP (glutamate receptor-interacting protein) markiert die Postsynapse und in der Doppelfluoreszenz mit GRIP präsentiert sich Munc119 in der Präsynapse. Auch Actin ist ein Marker der Postsynapse, die Doppelfluoreszenz mit Anti-Munc119 und Anti-Actin unterstreicht die Schlussfolgerung, dass Munc119 in der Präsynapse lokalisiert ist (Befunde nicht dargestellt). Doppelimmunfluoreszenzen mit Anti-Synaptophysin, einem synaptischen Vesikelprotein, das als Marker für Nerventerminalen dient (Navone et al., 1986) ergaben, dass Synaptophysin die gesamte präsynaptische Terminale markiert. In den durchgeführten Immunfluoreszenzmarkierungen zeigte sich, dass sich große Mengen an Munc119 in den präsynaptischen Terminalen der Photorezeptorzellen befinden.

5.3. Die Funktion von Munc119 für die synaptische Übertragung

Obwohl die physiologische Wichtigkeit von Munc119 für die synaptische Übertragung an Photorezeptorsynapsen gut dokumentiert wurde, ist nicht klar, wie Munc119 auf molekularer Ebene in der Synapse arbeitet. Ein Schlüssel zum Verständnis dieser Funktion ist vielleicht die Homologität zu PrBP/ δ . PrBP/ δ verbindet und trennt prenylierte Proteine von Membranen (Zhang et al., 2004,2007). Diese enzymatische Aktivität ist von großer Wichtigkeit für intrazelluläre Membran- und Proteintransporte (Zhang et al., 2004,2007).

In den Photorezeptorzellen spielt sich die Transportrolle von PrBP/ δ vorherrschend in den Innen- und Außensegmenten ab. Alpadi et al. vermuten, dass Munc119 ähnliche Funktionen in den Ribbonsynapsen erfüllt. Solch eine Transporterrolle scheint für die tonisch aktiven Ribbonsynapsen besonders wichtig zu sein, da diese einen intensiven Membrantransport benötigen, der über lange Zeit eine konstante Geschwindigkeit aufrechterhalten kann.

Die Hypothese, dass Munc119 ähnliche Prozesse unterstützt wie PrBP/ δ , nur an anderen subzellulären Lokalisationen, wird gestützt von der Tatsache, dass PrBP/ δ und Munc119

Diskussion

gemeinsame Interaktionspartner teilen. Die gemeinsamen Interaktionspartner sind ARL2 und ARL3. ARL- (ADP ribosylation like) Proteine sind Bestandteil des Proteintransportsystems. Die Interaktionen von Munc119 beziehungsweise PrBP/ δ mit ARL2 und ARL3 laufen jedoch an unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen ab (van Valkenburg et al., 2001; Hanzal-Bayer et al., 2002; Kobayashi et al., 2003).

5.4. Munc119 ist essentiell für den Sehvorgang

Die Auswirkungen eines mutierten humanen UNC119 zeigte ein Patient mit Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (CRD = cone-rod dystrophy). CRD`s sind erbliche Netzhautdystrophien aus der Gruppe der Pigment-Retinopathien. Sie sind charakterisiert durch Pigmentablagerungen in der Retina. Im Gegensatz zur Retinitis Pigmentosa sind primär die Zapfen betroffen, was sich in verminderter Sehschärfe, gestörtem Farbsehen, Lichtscheu und verminderter Lichtempfindlichkeit im zentralen Sehfeld äußert und schließlich zu Erblindung führen kann (zur Übersicht siehe Hamel, P. C., 2007, Encyclopédie Orphanet).

Dieser Patient hatte eine heterozygote Mutation im HRG4/Munc119-Gen (human retinal gene 4 = human UNC119). Dies führte zu einem abgebrochenen Protein, dem die PrBP/ δ -homologe Domäne fehlte. Diese Domäne ist genau die, die mit RIBEYE interagiert (Alpadi et al., 2008).

Elektroretinogrammstudien dieses Patienten zeigten reduzierte b-Wellen und normale c-Wellen, so wie PrBP/ δ -knockout-Mäuse (Zhang et al., 2007). Diese reduzierte b-Welle korreliert zu dem Defekt in der synaptischen Übertragung in Photorezeptorsynapsen und deutet eine mögliche Rolle von Munc119 in der synaptischen Übertragung an. Die Tatsache, dass die PrBP/ δ -Homologität entscheidend für die Munc119-Funktion ist, unterstreicht besonders die physiologische Wichtigkeit der RIBEYE-Munc119-Interaktion für die synaptische Signalübertragung in Photorezeptorsynapsen.

5.5. Munc119 interagiert mit CaBP4

CaBPs (Calcium binding Proteins) sind neuronale Calciumbindungsproteine mit Ähnlichkeit zu Calmodulin. CaBP4 wird spezifisch in Photorezeptorzellen exprimiert und ist dort in den terminalen Synapsen lokalisiert. CaBP4-Knockout-Mäuse zeigten eine dünnere äußere plexiforme Schicht als Wildtyp-Mäuse. Außerdem wiesen CaBP4-Knockout-Mäuse eine um ein hundertfaches reduzierte Sensitivität der Bipolarzellen auf. Elektroretinogramme deuten

Diskussion

auf eine Reduktion der Funktion von Zapfen- und Stäbchensynapsen hin. Der Phänotyp dieser CaBP4-Knockout-Mäuse ähnelt dem von Patienten mit inkompletter angeborener stationärer Nachtblindheit (CSNB2). CaBP4 ist weiterhin assoziiert mit der C-terminalen Untereinheit der Cav1.4 alpha-Untereinheit und steuert die Aktivierung dieser zu Hyperpolarisationen. Dies legt nahe, dass CaBP4 wichtig für normale synaptische Funktion ist, möglicherweise durch Regulation von Calciumeinfluss und Neurotransmitterfreisetzung in den Photorezeptorsynapsen (Haeseller et al., 2004).

Haeseleer et al. entdeckten vor kurzem, dass Munc119 (auch HRG4) mit CaBP4 interagiert (Haeseleer et al., 2008). Beide co-lokalisieren in der adulten Retina und werden gleichzeitig ab dem vierten postnatalen Tag in der Retina von Mäusen exprimiert. Die Abhängigkeit beider Proteine voneinander wurde in Untersuchungen an CaBP4-Knockout-Mäusen gezeigt. Diese Knockout-Mäuse zeigten eine generelle Desorganisation der Photorezeptorterminalen sowie eine starke Abnahme von Munc119 in den Photorezeptorsynapsen. Andere synaptische Proteine wie Syntaxin3, SV2 und PSD-95 waren dagegen nur gering reduziert. Genauer scheint die Abwesenheit von CaBP4 ein Trigger für den Verlust zu sein, oder sie bewirkt einen gemeinsamen Signalweg, der in der Instabilität und dem Verlust von Munc119 resultiert. Munc119 und CaBP4 scheinen wichtig für die Stabilität der Synapsen zu sein, da ein Fehlen eines oder beider Proteine abnorme Axonverzweigungen und retinale Degenerationen verursacht. Ihre Co-Lokalisation und Interaktion deuten darauf hin, dass Munc119 und CaBP4 an den gleichen Signalwegen mitwirken und wichtig für die Aufrechterhaltung und korrekte Lokalisation besonders der adulten und weniger der sich entwickelnden Synapse sind. Ribbonsynapsen enthalten spezifische Subtypen von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Haeseleer et al. haben gezeigt, dass CaBP4 die Neurotransmitterfreisetzung durch Regulation präsynaptischer Cav1 L-Typ-Calciumkanäle moduliert. In den Photorezeptorzellen ist die Neurotransmitterfreisetzung linear abhängig von dem Calciumeinstrom durch Cav1-Kanäle. Diese Abhängigkeit setzt eine große Nähe der Calciumkanäle zur Fusionsstelle der synaptischen Vesikel voraus. CaBP4 reguliert diese Neurotransmitterfreisetzung nicht nur durch Interaktion mit Cav1-Kanälen, sondern auch durch Interaktion mit Munc119. Die Bindung von CaBP4 und Munc119 ist ein calciumsensitiver Prozess. Durch experimentelle Zugabe von Calciumchlorid wurde CaBP4 teilweise von Munc119 gelöst. Nun könnte man spekulieren, dass Interaktion von Munc119 und CaBP4 abhängig von der Calciumkonzentration ist. Eine mögliche Interpretation dieser Erkenntnisse ist folgendes Szenario: Der Einstrom von Calcium durch den Cav1-Kanal wird durch CaBP4 gesteuert. Nach Calciumeinstrom kommt es zur Änderung der Affinität von

Diskussion

CaBP4 zu Munc119. Der CaBP4/Munc119-Komplex löst sich und Munc119 ist frei für seine Rolle im Mechanismus der synaptischen Vesikelfreisetzung (Haeseller et al., 2008). Ergänzend wäre zu bemerken, dass Munc119 in Immunzellen bestimmte Proteinkinasen (src-Kinasen Lck und Fyn) aktiviert. Munc119 verbindet sich mit CD3 und CD4 und aktiviert Lck und Fyn. Es wäre möglich, dass Munc119 in den Photorezeptoren auf diese Weise einen ähnlichen Mechanismus der synaptischen Übertragung aktiviert. Weitere Untersuchungen müssen sicherlich angestellt werden, um den genauen Wirkmechanismus weiter zu beschreiben.

6. Literatur

Ahnelt, P., Keri, C., Kolb, H. (1990)

Identification of pedicles of putative blue-sensitive cones in the human retina.

Journal of Comparative Neurology, **293**, 39-53

Alpadi, K., Magupalli, V.G., Käppel, S., Köblitz, L., Schwarz, K., Seigel, G.M., Sung, C.H., Schmitz, F. (2008)

RIBEYE recruits Munc119, a mammalian ortholog of the *Caenorhabditis elegans* protein unc119, to synaptic ribbons of photoreceptor synapses.

J. Biol. Chem., **283**, 26461-26467

Betz, W.J., Bewick, G.S. (1992)

Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction.

Science, **255**, 200-203

Boycott, B.B., Kolb, H. (1973)

The connections between bipolar cells and photoreceptors in the retina of the domestic cat.

Journal of Comparative Neurology, **148**, 91-114

Boycott, B.B., Wässle, H. (1991)

Morphological classification of bipolar cells of the primate retina.

European Journal of Neuroscience, **3**, 1069-1088

Brandstätter, J.H., Wässle, H., Betz, H., Morgans, C.W. (1996a)

The plasma membrane protein SNAP-25, but not syntaxin, is present at photoreceptor and bipolar cell synapses in the rat retina.

Eur. J. Neurosci., **8**, 823-828

Brandstätter, J.H., Koulen, P., Wässle, H. (1998)

Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina.

Vision Research, **38**, 1385-1397

Literatur

Bunt, A.H. (1971)

Enzymatic digestion of synaptic ribbons in amphibian retinal photoreceptors.

Brain Research, **25**, 571-577

Burns, M.E., Augustine, G.J. (1995)

Synaptic structure and function.

Cell, **83**, 187-194

Cen, O., Gorska, M.M., Stafford, S.J., Sur, S., Alam, R. (2003)

Identification of UNC119 as a novel activator of SRC-type tyrosine kinases.

J. Biol. Chem., **278**, 8837-8845

Dowling, J.E. (1987)

The retina: an approachable part of the brain.

Cambridge, MA: Harvard University Press

Dowling, J.E. (1991)

The retina in encyclopedia of human biology.

New York: Academic Press, 615-631

Dowling, J.E., Boycott, B.B. (1966)

Organisation of the primate retina: Electron microscopy

Proceedings of the Royal Science of London (B), **166**, 80-111

Eloholma M., Ketomäki j., Orreveteläinen p., Halonen L. (2006)

Visual performance in night-time driving conditions.

Ophthalmic Physiol. Opt., **26** (3), 254-263

Flock, A. (1964)

Structure of the macula utriculi with special reference to the directional interplay of sensory responses as revealed by morphological polarisation.

Journal of Cell Biology, **22**, 413-431

Literatur

Florio, S. K., Prusti, R.K. and Beavo, J.A. (1996)

Solubilization of membrane-bound rod phosphodiesterase by the rod phosphodiesterase recombinant δ subunit.

J. Biol. Chem., **271**, 24036-24047

Gorska, M.M., Stafford, S.J., Cen, O., Sur, S., Alam, R. (2004)

Unc119, a novel activator of Lck/Fyn, is essential for T cell activation.

J. Exp. Med., **199**, 369-379

Gray, E.G., Pease, H.L. (1971)

On understanding the organisation of the retinal receptor synapses.

Brain research, **35**, 1-15

Haeseleer, F. (2008)

Interaction and colocalisation of CaBP4 and Unc119 (MRG4) in photoreceptors.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **49**, 2366-2375

Haeseleer, F., Imanishi, Y., Maeda, T., Possin, D. E., Maeda, A., Lee, A., Rieke, F., Palczewski, K. (2004)

Essential role of Ca²⁺-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function.

Nat. Neurosci., **7**, 1079-1087

Hanzal-Bayer, M., Renault, R., Roversi, P., Wittinghofer, A., Hillig, R.C. (2002)

The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function.

EMBO J., **21**, 2095-2106

Heidelberger, R. (2001)

ATP is required at an early step in compensatory endocytosis in synaptic terminals.

Journal of Neuroscience, **21**, 6467-6474

Literatur

Heidelberger, R., Matthews, G. (1992)

Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons.

J. Physiol. (London), **447**, 235-256

Higashide, T., Murakami, A., McLaren, M.J., Inana, G. (1996)

Cloning of the cDNA for a novel photoreceptor protein.

J. Biol. Chem., **271**, 1797-1804

Higashide, T., McLaren, M.J., Inana, G. (1998)

Localization of HRG4, a photoreceptorprotein homologous to Unc-119, in ribbon synapse.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **39**, 690-698

Hopsu, V.K., Arstila, A.U. (1965)

An apparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of the rat.

Expl. Cell Research, **37**, 484-487

Juusola, M., French, A.S., Uusitalo, R.O., Weckstrom, M. (1996)

Information processing by graded-potential transmission through tonically active synapses.

Trends Neurosci., **19**, 292-297

Katsanis, N., Fisher, E.M. (1998)

A novel C-terminal binding protein (CtBP2) is closely related to CtBP1, and adenovirus E1A-binding protein, and maps to human chromosome 21q21.2.

Genomics, **47**, 294-299

Kidd, M. (1962)

Electron microscopy of the inner plexiform layer of the retina in the cat and the pigeon.

Journal of Anatomy, **96**, 179-188

Literatur

Kobayashi, A., Higashide, T., Hamasaki, D., Kubota, S., Sakuma, H., An, W., Fujimaki, T., McLaren, M.J., Weleber, R.G., Inana G. (2000)

HRG4 (UNC119) mutation found in cone-rod dystrophy causes retinal degeneration in a transgenic model.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **11**, 3268-3277

Kobayashi, A., Kubota, S., Mori, N., McLaren, M.J., Inana G. (2003)

Photoreceptor synaptic protein HRG4 (UNC119) interacts with ARL2 via a putative conserved domain.

FEBS Lett., **534**, 26-32

Kubota, S., Kobayashi, A., Mori, N., Higashide, T., McLaren, M.J., Inana, G. (2002)

Changes in retinal synaptic proteins in the transgenic model expressing a mutant HRG4 (UNC119).

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **43**, 308-313

Kumar, V., Carlson, J.E., Ohgi, K.A., Edwards, T.A., Rose, D.W., Escalante, C.R., Rosenfeld, M.G. and Aggarwal, A.K. (2002)

Transcription corepressor CtBP is an NAD⁺- regulated dehydrogenase.

Mol. Cell, **10**, 857-869

Lenzi, D., von Gersdorff, H. (2001)

Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines.

Bio Essays, **23**, 831-840

Li, L., Florio, S.K., Pettenati, M.J., Rao, N., Beavo, J.A., Baehr, W. (1998)

Characterization of human and mouse rod cGMP phosphodiesterase delta (PDE6D) and chromosomal localization of the gene.

Genomics, **49**, 76-82

Linari, M., Ueffing, M., Manson, F., Wright, A., Meitinger, T. and Becker, J. (1999)

The retinitis GTPase regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 1315-1320

Literatur

Luo, Y.R. (2000)

Why is the human visual system sensitive only to light of wavelengths from approximately 760 to 380 nm. An answer from thermochemistry and chemical kinetics.

Biophysical Chemistry, **83**, 179-184

Maduro, M. and Pilgrim, D. (1995)

Identifikation and cloning of unc119, a gene expressed in the *Caenorhabditis elegans* nervous system.

Genetics, **141**, 977-988

Magupalli, V.G., Schwarz, K., Alpadi, K., Natarajan, S., Seigel, G. M., Schmitz, F. (2008)

Multiple Ribeye-Ribeye interactions create a dynamic scaffold for the formation of synaptic ribbon.

Journal of Neuroscience, **28**, 7954-7967

Manning, A.G., Crawford, B.D., Waskiewicz, A.J. and Pilgrim, D.B. (2004)

Unc119 homolog required for normal development of the zebrafish nervous system.

Genesis, **40**, 223-230

Marzesco, A.M., Galli, T., Louvard, D. and Zahraoui A. (1998)

The rod CGMP phosphodiesterase delta subunit dissociates the small GTPase Rab13 from membranes.

J. Biol. Chem., **273**, 22340-22345

Masland, R.H. (2001a)

The fundamental plan of the retina.

Nature Neuroscience, **4**, 877-886

Masland, R.H. (2001b)

Neuronal diversity in the retina.

Current Opinion in Neurobiology, **11**, 431-436

Literatur

Meier, C., Dermietzel, R., 2006

Electrical synapses—gap junctions in the brain.

Results Probl. Cell Differ., **43**, 99-128

Missotten, L. (1965)

The ultrastructure of human retina.

Arschia Uitgaven, Brussels.

Morgans, C.W., Brandstätter, J.H., Kellerman, J., Betz, H., Wässle, H. (1996)

A SNARE complex containing syntaxin 3 is present in ribbon synapses of the retina.

J. Neuroscience, **16**, 6713-6721

Nachman-Clewner, M., St. Jules, R., Townes-Anderson, E. (1999)

L-type calcium channels in the photoreceptor ribbon synapse: localization and role in plasticity.

J. Comp. Neurol., **415**, 1-16

Nardini, M., Spano, S., Cericola, C., Pesce, A., Massaro A., Millo, E., Luini, A., Corda, D. and Bolognesi, M. (2003)

CtBP/BARS: a dual function protein involved in transcription corepression and golgi membrane fission.

EMBO J., **22**, 3122-3130

Navone, F., Jahn, R., Di Gioia, G., Stukenbrok, H., Greengard, P.,

De Camilli, P. (1986)

Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells.

J. Cell Biol., **103**, 2511-2527

Paillart, Ch., Li, J., Matthews, G., Sterling, P. (2003)

Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse.

Journal of Neuroscience, **23**, 4092-4099

Literatur

Parsons, T.D., Lenzi, D., Ahners, W., Roberts, W.M. (1994)

Calcium triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell: capacitance measurements in saccular hair cells.

Neuron, **13**, 875-883

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., La Mantia, A.S., McNamara, J.O and Williams, SM (2001).

Neuroscience. Second edition.

Poortinga, G., Watanabe, M., Parkhurst, S.M. (1998)

Drosophila CtBP: a hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression.

EMBO J., **17**, 2067-2078

Rao-Mirotnik, R., Harkin, A.B., Buchsbaum, G., Sterling, P. (1995)

Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse.

Neuron, **14**, 561-569

Raviola, E. (1976)

Intercellular junctions in the outer plexiform layer of the retina.

Vis. Neuroscience, **3**, 21-32

Rayer B., Naynert ., Stieve H., (1990)

Phototransduction: different mechanisms in vertebrates and invertebrates.

Photochem. Photobiol. B., **7**, 107-148

Rieke, F., Schwartz, E.A. (1996)

Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse.

Journal of Physiology, **493**, 1-8

Schaeffer, S.F., Raviola, E. (1978)

Membrane recycling in the cone cell endings of the turtle retina.

J. Cell Biol., **79**, 802-825

Literatur

Schaeffer, S.F., Raviola E., Heuser, J.E. (1982)

Membrane specialisations in the outer plexiform layer of the turtle retina.

J. Comp. Neurol., **204**, 253-270

Schaeper, u., Boyd, J.M., Sulekha, V., Uhlmann, E., Subramanian, T., Chinnadurai, G. (1995)

Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation.

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **92**, 10467-10471

Schmitz, F., Kirsch, M., Wagner, H.-J. (1989)

Calcium-modulated synaptic ribbon dynamics in cone photoreceptors: a pharmacological and electron spectroscopic study.

Eur. J. Cell Biol., **49**, 207-212

Schmitz, F., Königstorfer, A., Südhof, T.C. (2000)

Ribeye, a component of synaptic ribbons: a proteins journey throught evolution provides insight into synaptic ribbons function.

Neuron, **28**, 857-872

Sjöstrand, F.S. (1958)

Ultrastructure of retinal synapses of the guinea pig as revealed by three dimensional reconstructions from serial sections.

J. Ultrastruct. Res., **2**, 122-170

Smith, C.A., Sjöstrand, F.S. (1961)

A synaptic structure in the hair cellsof the guinea pig cochlea.

Journal of Ultrastructural Research, **5**, 523-556

Sparado, A., de Simonis, I., Puzzulo, D. (1978)

Ultrastructural data and chronobiological patterns of the synaptic ribbons in the outer plexiform layer in the retina of albino rats.

Acta Anatomica, **102**, 365-373

Literatur

Sterling, P. (1998)

The Retina. In: The synaptic organization of the brain.

Fourth edition, G. Shepherd, ed.

New York: Oxford University Press, 205-253

Stevens, C.F., Tsujimoto, T. (1995)

Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 846-849

Swanson, D.A., Chang, J.T., Campochiara, P.A., Zack, D.J., Valle, D. (1998)

Mammalian ortholog of *C.elegans* unc-119 is highly expressed in photoreceptors.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 39, 2085-2094

Tom Dieck, S., Altroock, W.D., Kessels, M.M., Qualmann, B., Regus, H., Brauner, D.,

Fejtová, A., Bracko, O., Gundelfinger, E.D., Brandstätter, J.H.

Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex.

J. Cell. Biol., 168, 825-836

Trujillo-Cenoz, O. (1972)

The structural organization of the compound eye in insects.

In Handbook of sensory Physiology, Volume 7/2, Physiology of Photoreceptor Organs.

M.G.F. Fuortes, ed. (New York: Springer Verlag), 5-62

Turner, J., Crossley, M. (1998)

Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Krüppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators.

EMBO J., 17, 5129-5140

Literatur

Ullrich, B., Südhof, T.C. (1994)

Distribution of synaptic markers in the retina: implications for synaptic vesicle traffic in ribbon synapses.

J. Physiol., **88**, 249-257

Van Valkenburgh, H., Shern, J.F., Sharer, J.D., Zhu, X., Kahn, R.A. (2001)

ADP-ribosylation factors (ARFs) and ARF-like 1 (ARL1) have both specific and shared effectors: characterizing ARL1-binding proteins.

J. Biol. Chem., **276**, 22826-22837

Vaney, D.I., Nelson, J.C., Pow, D.V. (1998)

Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina.

Journal of Neurosciencce, **18**, 10594-10602

Veruki, M.L., Hartveit, E. (2002)

AII (Rod) amacrine cells form a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina.

Neuron, **33**, 935-946

Vollrath, L., Meyer, A., Buschmann, F. (1989)

Ribbon synapses of the mammalian retina contain two types of synaptic bodies – ribbons and spheres.

Journal of Neurocytol., **18**, 115-120

von Gersdorff, H., Matthews, G. (1994a)

Dynamics of synaptic vesicle function and membrane retrieval in synaptic terminals.

Nature, **367**, 735-739

von Gersdorff, H., Vardi, E., Matthews, G., Sterling, P. (1996)

Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released.

Neuron, **16**, 1221-1227

Literatur

Von Kriegstein, K., Schmitz, F., Link, E., Südhof, T.C. (1999)

Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses.

Eur. J. Neurosci., **11**, 1335-1348

Wagner, H.J. (1997)

Presynaptic bodies (“ribbons”): from ultrastructural observations to molecular perspectives.

Cell Tissue Research, **287**, 435-446

Wan, H.I., DiAntonio, A., Fetter, R.D., Bergstrom, K., Strauss, R.,
Goodman, C.S. (2000)

Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*.

Neuron, **26**, 313-329

Wässle, H., Ghosh, K.K., Haverkamp, S.

Glutamate receptors in the rod pathway of the mammalian retina.

J. Neuroscience, **21**, 8636-8647

Zenisek, D., Steyer, J.A., Almers, W. (2000)

Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones.

Nature, **406**, 849-854

Zhang, H., Levine, M. (1999)

Groucho and dCtBP mediate separate pathways of transcriptional repression in the *Drosophila* embryo.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 535-540

Zhang, H., Liu, X.-H., Zhang, K., Chen, C.-K., Frederick, J.M., Prestwich, G.D., Baehr, W.
(2004)

Photoreceptor cGMP phosphodiesterase δ subunit (PDE δ) functions as a prenyl-binding protein.

J. Biol. Chem., **279**, 407-413

Literatur

Zhang, H., Li, A., Doan, T., Rieke, F., Detwiler, P.B., Frederick, J.M.,
Baehr, W. (2007)

Deletion of PrBP/ δ impedes transport of GRK1 and PDE6 catalytic subunits to photoreceptor
outer segments.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **104**, 8857-8862

Zhang, Q., Fan, J.S., Zhang, M. (2001)

Interdomain chaperoning between PSD-95, Dlg, and ZO-1 (PDZ) domains of glutamate
receptor-interacting proteins.

J. Biol. Chem., **276**, 216-220

Danksagung

7. Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Schmitz in der Abteilung für Neuroanatomie am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes angefertigt.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Frank Schmitz für die Überlassung dieses spannenden Themas, die geduldige Hilfestellung und Beantwortung aller Fragen, sowie die Ausdauer bei der Betreuung meiner Arbeit. Danke Frank!

Weiterhin danke ich Dr. Karin Schwarz, Dr. Kannan Alpadi, Dr. Venkat Giri Magupalli und Dr. Josif Mirceski für unzählige Antworten und die stets freundliche Einweisung in die erforderlichen Arbeitsschritte, sowie geduldige Erklärungen der wissenschaftlichen Hintergründe. Vielen Dank euch allen!

Gerlinde und Sylvia, sowie allen anderen nicht namentlich erwähnten Kollegen der AG Schmitz danke ich ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Niemals aufzuwiegen ist die Unterstützung durch meine liebsten Eltern, ohne die alles, das ich bisher erreicht habe, nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem danke ich meinen Großeltern und meiner Oma, die mich durch ausdauerndes Nachfragen bei Laune hielten und mir des Öfteren finanziell unter die Arme griffen.

Danke, dass ihr alle mich auf diesem langen Weg so herzlich und intensiv unterstützt habt!

Lebenslauf

8. Lebenslauf

Name	Stefanie Käppel
Geburtsdatum	11.12.1983
Geburtsort	Cottbus
Anschrift	Dissener Weg 39 03054 Cottbus
Studium	10/2003 – 11/2009 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 08/2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 11/2009 Erlangung der Approbation als Ärztin am 16.11.2009
Schulbildung	1996 – 2003 Humboldt-Gymnasium Cottbus 2003 Abitur