

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

**Immunologische Charakterisierung eines Epitops präsynaptischer
Strukturspezialisierungen (sog. Synaptic Ribbons) der
Photorezeptorsynapse**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016*

vorgelegt von:

Lisa Wocker
geb. am 14.12.1989
in Saarbrücken

Gutachter:

1. Univ.-Prof. Dr. med. Schmitz

2.

3.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Äußerer Aufbau und Aufgabe des Auges | 1 |
| 1.2 | Die Gliederung der Retina | 3 |
| 1.2.1 | Das retinale Pigmentepithel (Stratum pigmentosum retinae) | 4 |
| 1.2.2 | Die Photorezeptoren mit ihrem Außen- und Innensegment (Stratum segmentorum/ neuroepitheliale retinae) | 4 |
| 1.2.3 | Die äußere Grenzmembran (Lamina limitans externa) | 5 |
| 1.2.4 | Die äußere Körnerzellschicht (Stratum nucleare externum, ONL) | 5 |
| 1.2.5 | Die äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum, OPL) | 6 |
| 1.2.6 | Die innere Körnerzellschicht (Stratum nucleare internum, INL) | 7 |
| 1.2.7 | Die innere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme internum, IPL) | 8 |
| 1.2.8 | Die Ganglienzellschicht (Stratum ganglionicum) | 8 |
| 1.2.9 | Die Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum) | 8 |
| 1.2.10 | Die innere Grenzmembran (Lamina limitans interna) | 8 |
| 1.3 | Synapsentypen der Retina | 9 |
| 1.3.1 | Chemische Synapse | 9 |
| 1.3.2 | Ribbonsynapse | 11 |
| 1.3.2.1 | Aufbau und Zusammensetzung | 12 |
| 1.3.2.2 | Funktion | 15 |
| 1.4 | RIBEYE – Hauptbestandteil der Ribbonsynapse | 16 |
| 1.5 | Aktin | 18 |
| 1.6 | Anti-AktinC4 Antikörper | 21 |
| 1.7 | Zielstellung dieser Arbeit | 21 |
| 2 | MATERIAL & METHODEN | 22 |
| 2.1 | Humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) | 22 |
| 2.2 | Verwendete Primär- & Sekundärantikörper | 22 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3 | Verwendete Chemikalien | 23 |
| 2.4 | Verwendete Puffer und Lösungen | 24 |
| 2.5 | Geräte und sonstige Hilfsmittel | 25 |
| 2.6 | Immunfluoreszenz | 26 |
| 2.7 | Preembedding Immunogoldelektronenmikroskopie | 27 |
| 2.8 | Polymerasekettenreaktion | 27 |
| 2.9 | Agarose-Gelelektrophorese | 29 |
| 2.9.1 | Gelextraktion (Eluieren der Banden) | 30 |
| 2.10 | Photometrische Messung der DNS-Konzentration | 30 |
| 2.11 | Sequenzierung der DNS | 31 |
| 2.12 | Transformation der amplifizierten DNS | 31 |
| 2.13 | Restriktionsverdau und Triple-Ligation | 33 |
| 2.14 | Plasmidpräparation | 34 |
| 2.14.1 | Minipräparation | 34 |
| 2.14.2 | Midipräparation | 35 |
| 2.15 | Aufreinigung der DNS | 35 |
| 2.16 | Zellkultur und Transfektion | 36 |
| 2.17 | SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse | 37 |
| 3 | ERGEBNISSE | 40 |
| 3.1 | Epifluoreszenzmikroskopie mit Anti-AktinC4 in der bovinen Retina | 40 |
| 3.2 | Phalloidin-FITC Markierung von filamentösem Aktin in der Mäuse-Retina | 43 |
| 3.3 | Immunelektronenmikroskopie mit Anti-AktinC4 in der bovinen Retina | 45 |
| 3.4 | Western-Blot-Analyse bovinen Gewebes mit Anti-AktinC4 | 47 |
| 3.5 | Vergleichende Epifluoreszenzmikroskopie von Anti-AktinC4 in der Retina des Rindes und der Ratte | 48 |
| 3.6 | PCR-Amplifikation der cDNS des bovinen RIBEYE(A) | 50 |
| 3.7 | Klonierung der bovinen RIBEYE(A) cDNS in das Plasmid pJET1.2/blunt | 53 |
| 3.8 | Klonierung des pRIBEYE(A)mCherry-Plasmids | 54 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|---|
| 3.9 | Restriktionsverdau von pRIBEYE(A)mCherry | 56 |
| 3.10 | Verteilungsmuster der A-Domäne des bovinen RIBEYE in transfizierten HEK293-Zellen | 57 |
| 3.11 | Expression von RIBEYE(A)mCherry in einer Kotransfektion mit RIBEYE(A)EGFP | 58 |
| 3.12 | Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Anti-AktinC4 in RIBEYE(A)mCherry-transfizierten HEK293-Zellen | 59 |
| 3.13 | Western-Blot-Analyse des bovinen RIBEYE(A) mit Anti-AktinC4 | 61 |
| 4 | DISKUSSION | 64 |
| 4.1 | Posttranslationale Modifikation | 66 |
| 4.2 | Konformationsepitop | 68 |
| 4.3 | Bindungsaffinität des Anti-AktinC4 Antikörpers | 70 |
| 4.4 | Bedeutung der Kreuzreaktivität | 71 |
| 5 | LITERATURVERZEICHNIS | 72 |
| 6 | ANHANG | 80 |
| 6.1 | Elektropherogramme | 80 |
| 7 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 83 |
| 8 | TABELLENVERZEICHNIS | 85 |
| 9 | DANKSAGUNG | 86 |
| 10 | LEBENS LAUF | FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT. |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celcius |
| μ | mikro |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| Abb. | Abbildung |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin) |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cDNS | <i>complementary</i> (komplementäre) DNS |
| dest. | destilliert |
| dH ₂ O | destilliertes H ₂ O |
| DMEM | <i>Dulbeccos modified Eagles medium</i> |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendinitrotetraacetat |
| et al. | <i>et alii</i> (und andere) |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum) |
| fw | <i>forward</i> (vorwärts) |
| g | Gramm |
| h | Stunde(n) |
| H ₂ O | Wasser |
| i.e. | <i>id est</i> (das heißt, d.h.) |
| Ig | Immunglobulin |
| INL | <i>Inner nuclear layer</i> (innere Körnerschicht) |
| IPL | <i>Inner plexiform layer</i> (innere plexiforme Schicht) |
| kb | Kilobasenpaar(e) |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LB-Medium | <i>Lysogeny Broth</i> (Medium für Bakterien) |
| M | mol/l |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| min | Minute(n) |
| ml | Mililiter |
| rv | <i>reverse</i> (rückwärts) |
| rpm | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| sog. | sogenannt |
| ONL | <i>Outer nuclear layer</i> (äußere nukleäre Schicht) |
| OPL | <i>Outer plexiform layer</i> (äußere plexiforme Schicht) |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung) |
| s | Sekunde(n) |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |
| sog. | sogenannte/r/s |
| Tris-HCl | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid |

Zusammenfassung

Immunologische Charakterisierung eines Epitops präsynaptischer Struktur-spezialisierungen (sog. Synaptic Ribbons) der Photorezeptorsynapse

Ribbonsynapsen sind kontinuierlich aktive chemische Synapsen in Retina, Innenohr und Zirbeldrüse. Wesentliches Strukturmerkmal dieser Synapsen sind die Synaptischen Ribbons. Synaptische Ribbons sind mit einer großen Anzahl freisetzungsbereiter synaptischer Vesikel assoziiert und in der aktiven Zone der Synapse verankert. Hauptkomponente der Synaptischen Ribbons ist das Strukturprotein RIBEYE.

Ausgangspunkt dieser Arbeit bildete die Beobachtung, dass der Anti-AktinC4 Antikörper in der bovinen Retina wider Erwarten sowohl auf lichtmikroskopischer Ebene als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene eine starke und selektive Immunmarkierung der Synaptischen Ribbons zeigte. Dieser Befund war überraschend, da Aktin in der Retina eine sehr breite Verteilung aufweist. Biochemische Befunde (Western-Blot- und zweidimensionale Gelanalysen) wiesen darauf hin, dass der Antikörper mit RIBEYE, der Hauptkomponente der Synaptischen Ribbons, kreuzreagiert.

In der vorliegenden Arbeit widmete ich mich der näheren Charakterisierung dieses durch den Anti-AktinC4 Antikörper erkannten Epitops. Das Epitop sollte innerhalb des Proteins RIBEYE eingegrenzt und charakterisiert werden. RIBEYE besteht aus einer aminoterminalen A-Domäne, die evolutionär zwischen den Spezies stark divergiert, und einer carboxyterminalen B-Domäne, die zwischen den verschiedenen Spezies stark konserviert ist. Da der Anti-AktinC4 Antikörper in der Retina der Maus – im Gegensatz zum Rind – keine Markierung der Synaptischen Ribbons zeigte, habe ich das Epitop in einer spezies-spezifischen Region des RIBEYE-Proteins, genauer gesagt in der A-Domäne, vermutet.

Mittels Polymerasekettenreaktion habe ich deshalb die komplette cDNS der A-Domäne von RIBEYE amplifiziert und in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert. Nach Transfektion in HEK-Zellen wurde die A-Domäne hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität mit dem Anti-AktinC4 Antikörper in der Immunfluoreszenz und mittels der Western-Blot-Analyse untersucht.

In der Immunfluoreszenz zeigt sich eine deutliche Reaktion des Anti-AktinC4 Antikörpers mit bovinem RIBEYE(A). Dies belegt die vermutete Kreuzreaktivität des Antikörpers mit der A-Domäne von bovinem RIBEYE. Allerdings zeigte der Anti-AktinC4 Antikörper

Zusammenfassung

überraschenderweise in der Western-Blot-Analyse keine Kreuzreaktivität mit dem heterolog in HEK293 exprimierten RIBEYE(A)-Fusionsprotein.

Das fehlende Signal des Anti-AktinC4 Antikörpers mit RIBEYE(A) in der Western-Blot-Analyse lässt sich möglicherweise auf eine posttranslationale Modifikation oder ein Konformationsepitop zurückführen.

Die weitere Charakterisierung und genauere Lokalisation des Epitops muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden. Sie könnte Aufschlüsse über den Mechanismus der Signaltransduktion an der Ribbonsynapse geben und somit helfen, die Funktionsweise der Ribbonsynapse weiter zu verstehen.

Summary

Immunological characterization of an epitope of presynaptic specializations (synaptic ribbons) of the photoreceptor synapse

Ribbon synapses are chemical synapses in the retina, the inner ear and the pineal gland that are continuously (tonically) active. The unique structural specializations of these synapses are the synaptic ribbons. Synaptic ribbons are associated with a large amount of release-ready synaptic vesicles and are anchored in the active zone of the synapse. The main component of Synaptic ribbons is the structural protein RIBEYE.

Starting point of this thesis is that a particular actin antibody (anti-actinC4 antibody) showed – contrary to the expectations – a strong and selective immunostaining of the synaptic ribbons as shown both at the light microscopic and electron microscopic level. This result was surprising because actin is known to show a very broad distribution in the retina. Biochemical findings (Western blot and two-dimensional gel analyses) indicated that the Anti-ActinC4 antibody cross-reacts with RIBEYE, the main component of synaptic ribbons.

In the present thesis work, I wanted to further characterize the epitope detected by the anti-actinC4 antibody. The aim was to localize and characterize the epitope within the protein RIBEYE. RIBEYE consists of an amino-terminal A-domain, which evolutionarily is very divergent between the species, and a carboxy-terminal B-domain, which is highly conserved between the species. Since the anti-actinC4 antibody did not show any labeling of synaptic ribbons in the mouse retina – in contrast to the bovine retina –, I reasoned that the epitope detected by the anti-actinC4 antibody was most likely part of the species-specific region of the protein RIBEYE, i.e. of the A-domain of RIBEYE.

Therefore, I generated and amplified the full-length cDNA of the A-domain of RIBEYE by means of the polymerase chain reaction (PCR) and cloned the full-length RIBEYE(A)-domain cDNA into a eukaryotic expression vector to characterize the heterologously expressed protein for a possible reactivity with the anti-actinC4 antibody. After the transfection into HEK-cells, the A-domain was analyzed for its cross-reactivity with the anti-actinC4 antibody using immunolabeling and Western blot analyses.

The immunolabeling showed that the anti-aktinC4 antibody strongly detected the heterologously expressed bovine RIBEYE(A)-domain. This was shown by double-labeling experiments and supports the hypothesis that the anti-actinC4 antibody cross-reacts with the

Summary

A-domain of bovine RIBEYE. Surprisingly, the anti-actinC4 antibody did not react with the same protein in Western blot analyses.

The missing signal of the anti-aktinC4 antibody with RIBEYE(A) in the Western blot analyses could possibly be due to a posttranslational modification or a conformational epitope.

Future research will be needed to further characterize the epitope within RIBEYE(A). This further characterization could shed light on the mechanism of the synaptic communication and, thus, help in the further understanding of the functioning of the ribbon synapse.

1 Einleitung

1.1 Äußerer Aufbau und Aufgabe des Auges

Das Auge des Säugetieres ist ein faszinierendes und sehr leistungsfähiges Sinnesorgan. Es ist in der Lage, Lichtreize, die auf die Netzhaut treffen, in elektrische Signale umzuwandeln und sie an das Gehirn weiterzuleiten, das aus der Vielzahl an visuellen Impulsen ein Bild erstellt.

In seiner Funktion als wichtigstes Sinnesorgan des Menschen besitzt es einen komplizierten Aufbau, der sich im Laufe der Evolution perfektioniert hat. Das Auge stellt den größten Informationslieferanten des Gehirns dar – von keinem anderen Sinnesorgan werden so viele Informationen zum Gehirn geleitet.

In seinem anatomischen Aufbau besitzt es im Wesentlichen drei Schichten (Abbildung 1). Die äußerste Schicht (Tunica fibrosa), die sowohl dem Schutz des Auges als auch der ersten Bündelung der Lichtstrahlen dient, besteht aus der Lederhaut (Sklera) und der Hornhaut (Kornea). Nach innen schließt sich im hinteren Teil die gefäßversorgende Schicht, die Aderhaut (Choroidea), an. Vervollständigt wird diese Schicht nach vorne durch den Ziliarkörper und die Regenbogenhaut (Iris). Ersterem verdankt das Auge seine Fähigkeit zur Akkommodation, d.h. die Veränderung der Linsenbrechkraft, die durch Zug oder Entspannung des Ziliarkörpers an die Entfernung des Objektes zum Auge angepasst wird. Die Regenbogenhaut wirkt wie die Blende einer Fotokamera. Durch eine Schicht parasymphatisch innervierter glatter Muskelzellen ist sie in der Lage, ihre Öffnungsfläche, die Pupille, an die jeweiligen Lichtverhältnisse anzupassen. In ihrer Gesamtheit wird diese mittlere Augenschicht auch als Tunica vasculosa bzw. Uvea bezeichnet.

Die dritte Schicht stellt die Netzhaut (Retina) dar, der innerhalb des Auges die sensorische Funktion zukommt.

Der Raum im Inneren des Auges wird von einer gelartigen Masse, dem Glaskörper, ausgefüllt.

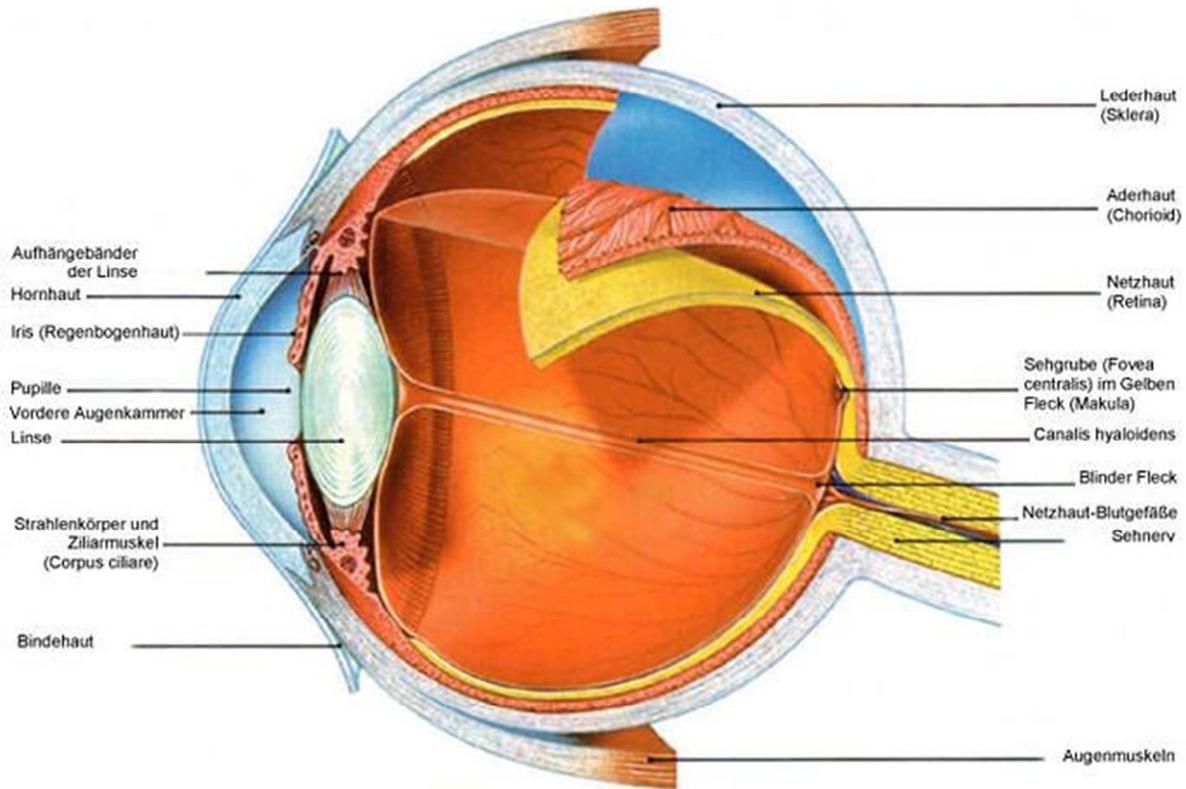


Abbildung 1: Anatomischer Aufbau des Auges eines Säugetieres.

Quelle: <http://www.vision-training.com/de/Augenanatomie/Augenanatomie.htm>

Hat das Licht den Brechungsapparat aus Hornhaut, Kammerwasser, der hinteren und vorderen Augenkammer und der Linse passiert, erfolgt nach Durchdringen des Glaskörpers an der Netzhaut die Umwandlung der gebündelten Strahlen in elektrochemische Impulse. Dazu durchlaufen die Lichtteilchen die Schichten der Netzhaut von innen nach außen, bis sie schließlich die Photorezeptorzellen erreichen. Die neuronale Impulsweiterleitung erfolgt nun im umgekehrten Weg – von außen nach innen. Die letzte Station innerhalb der Retina bilden die Ganglienzellen, deren Axone die Lichtsinnesinformationen weiterleiten und als Sehnerv das Auge in Richtung Gehirn verlassen.

Im Folgenden werden die einzelnen Schichten der Netzhaut näher beschrieben.

1.2 Die Gliederung der Retina

Das Auge des Säugetieres entsteht entwicklungsgeschichtlich aus dem Neuroektoderm, dessen Ursprung, das Ektoderm, neben dem Entoderm und dem Mesoderm eines der drei Keimblätter der Embryogenese darstellt. Aus dem Neuroektoderm geht der embryologische Augenbecher hervor, der aus zwei Blättern besteht. Das innere Blatt entwickelt sich zum sensorischen Teil der Retina. Das äußere Blatt bildet das retinale Pigmentepithel. Beide Schichten sind nur an der Austrittsstelle des Sehnervs und an der Ora serrata, der Grenzlinie am Übergang zwischen Pars optica und Pars caeca der Netzhaut, strukturell miteinander verbunden. Die Netzhaut ist in Schichten aufgebaut (Abbildung 2), die im Folgenden erläutert werden.

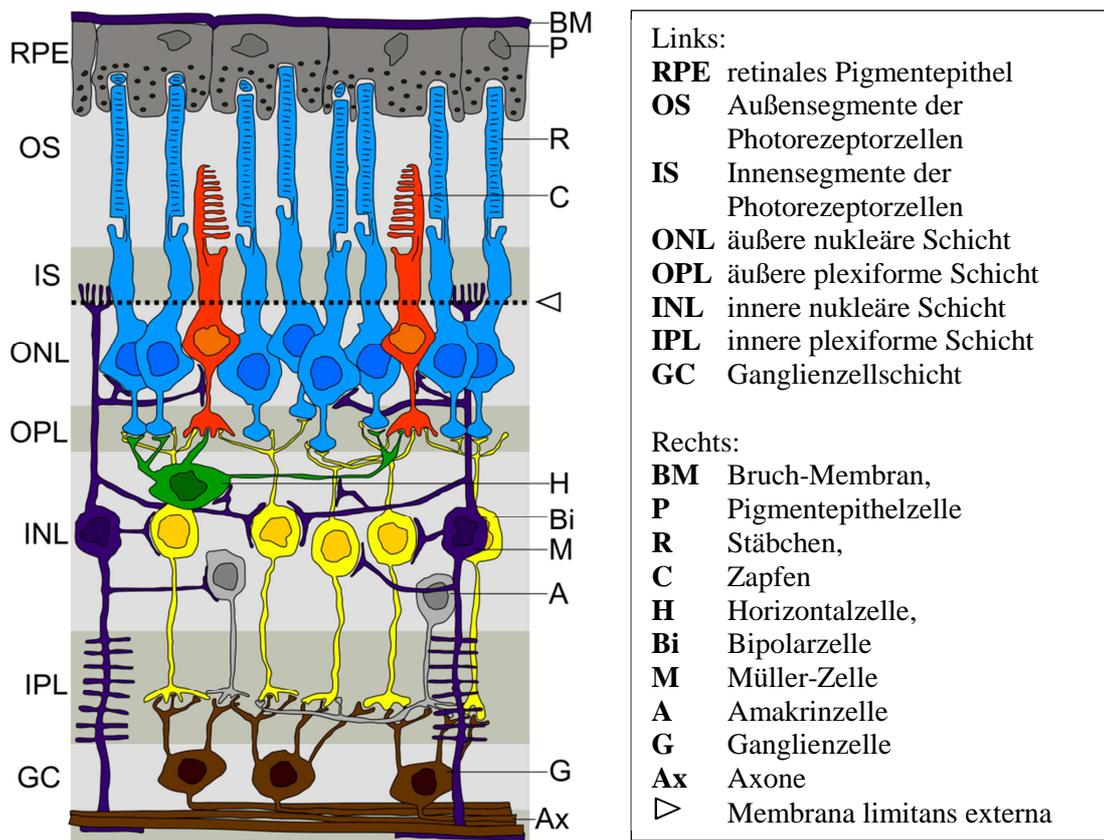


Abbildung 2: Schematische Zeichnung der histologischen Gliederung der Retina im Längsschnitt.
 Quelle: <https://de.wikipedia.org/wiki/Netzhaut>.

1.2.1 Das retinale Pigmentepithel (Stratum pigmentosum retinae)

Das retinale Pigmentepithel (Stratum pigmentosum) ist eine einschichtige isoprismatische Epithelschicht, die zwischen der Aderhaut (Choroidea) und der neurosensorischen Retina liegt (Zilles und Tillmann 2010). An ihrer basalen Seite ist sie mit der Bruch-Membran fest verbunden. Apikal steht sie über fingerförmige Fortsätze mit der Photorezeptorschicht in einer dynamischen Verbindung.

Das Pigmentepithel erfüllt vielfältige Funktionen im physikalisch-optischen und metabolischen Bereich.

Durch seinen hohen Gehalt an Photonen absorbierender Melaningranula dient es der Reduktion von Streustrahlung und verhindert damit die Bildung störender Lichtreflexe.

Über das retinale Pigmentepithel wird die Ernährung der Netzhaut vermittelt, die durch die Lamina choriocapillaris, die innerste Gefäßschicht der Aderhaut, erfolgt. Ebenso sorgt es für den Wärmeausgleich zur Aderhaut.

Die Tight Junctions zwischen den Pigmentepithelzellen stellen zusammen mit denjenigen der Endothelzellen der retinalen Gefäße die Blut-Retina-Schranke dar. So bildet die Pigmentepithelschicht die wichtige adhärente Verbindung zu der die Netzhaut versorgenden Choroidea und bietet als Barriere zugleich Schutz vor dem Übertritt schädlicher Substanzen aus der Blutbahn.

Ferner ist eine wichtige Aufgabe des Pigmentepithels die Phagozytose abgestorbener Membranbestandteile der Photorezeptoren und die Regeneration des Retinols zu 11-cis-Retinal (Strauss 2005).

1.2.2 Die Photorezeptoren mit ihrem Außen- und Innensegment (Stratum segmentorum/ neuroepitheliale retinae)

Der Photorezeptor besitzt die Fähigkeit, die elektromagnetischen Wellen des eintreffenden Lichtes in neuronale Impulse umzuwandeln. Durch sein bei Dunkelheit niedriges Membranpotential ergibt sich eine hohe Transmitterausschüttung bei fehlendem Lichteinfall und umgekehrt eine verminderte Transmitteraktivität bei Helligkeit.

Zu unterscheiden sind die hell-dunkel differenzierenden Stäbchen, die für das skotopische Sehen (Nachtsehen) zuständig sind, und die farbwahrnehmenden Zapfen für das photopische Sehen (Tages- und Farbsehen). Die menschliche Retina enthält etwa 20-mal so viele Stäbchenzellen wie Zapfenzellen (ca. 120 Millionen versus 6 Millionen), während erstere

vorwiegend in der Netzhautperipherie und letztere vor allem in der Fovea centralis, dem Ort des schärfsten Sehens, zu finden sind (Trepel 2011). Der dem Pigmentepithel zugewandte Teil des Photorezeptors kann in zwei Segmente unterteilt werden: das Außen- und das Innensegment.

Das Außensegment ist der Ort der Phototransduktion. In den Zapfen findet sich der Sehfärbstoff Jodopsin in multiplen Membraneinstülpungen, wohingegen die Stäbchen den Sehfärbstoff Rhodopsin in stapelweise angeordneten Membranscheiben (Disks) einlagern.

Das Innensegment, das durch ein unbewegliches, dezentral gelegenes Zilium mit dem Außensegment verbunden wird, ist wiederum in zwei strukturell unterschiedliche Bereiche gegliedert. Das Ellipsoid enthält eine große Anzahl an Mitochondrien und ist somit wichtig für die Energiegewinnung der Photorezeptorzelle, wohingegen im vitreal gelegenen Myoid das endoplasmatische Retikulum lokalisiert ist. Dies ist der Ort der Proteinbiosynthese und der Bildung der photosensiblen Membranen. Daneben stellt das Myoid den kontraktile Teil der Photorezeptorzelle dar, der Bündel von parallel angeordneten Myofilamenten, im Wesentlichen Aktin und Myosin, enthält. (Pietzsch-Rohrschneider 1976; Burnside 1976; Drenckhahn und Wagner 1985; Nagle et al. 1986; Pagh-Roehl et al. 1992). Diese regulieren je nach Lichtverhältnissen die relative Position von Stäbchen und Zapfen, und die Erregbarkeit bzw. den Arbeitsbereich der verschiedenen Photorezeptortypen (Eckmiller 2004).

1.2.3 Die äußere Grenzmembran (Lamina limitans externa)

Die äußere Grenzschicht liegt zwischen den Somata der Photorezeptorzellen und deren Innensegmenten. Gebildet wird sie von den langen, skleral gerichteten Zellfortsätzen der Müller-Zellen. In dieser Schicht findet sich eine große Anzahl von Aktinfilamenten (Drenckhahn und Wagner 1985).

1.2.4 Die äußere Körnerzellschicht (Stratum nucleare externum, ONL)

Die Somata der Photorezeptorzellen (Stäbchen, Zapfen) befinden sich in dieser Schicht, der äußeren Körnerzellschicht (ONL). Die Photorezeptorzellen stellen die ersten Neurone der Sehbahn dar, die in der Retina grob aus einer Kette von drei hintereinandergeschalteten Neuronen besteht. Die Bipolarzellen stellen das zweite Neuron dar, die Ganglienzellen das dritte Neuron.

1.2.5 Die äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum, OPL)

In der äußeren plexiformen Schicht sind vor allem die synaptischen Verbindungen zwischen den Photorezeptorzellen und den Dendriten der nachgeschalteten Bipolarzellen gelegen. Die Photorezeptorsynapse ist eine Ribbonsynapse. Die Fortsätze der postsynaptischen ON-Bipolarzellen sind zusammen mit den postsynaptischen Fortsätzen der Horizontalzellen (dienen der horizontalen Verschaltung) in die synaptischen Terminalen der Photorezeptoren invaginiert (»hineingestülpt«) und bilden eine sogenannte Triade (Dowling 1987; Schmitz 2009).

Schematisch verbildlicht ist die Verschaltung der einzelnen Neurone in Abbildung 3 am Beispiel der Photorezeptorterminale einer Zapfensynapse, in der mehrere dieser beschriebenen synaptischen Einheiten eingebaut sind.

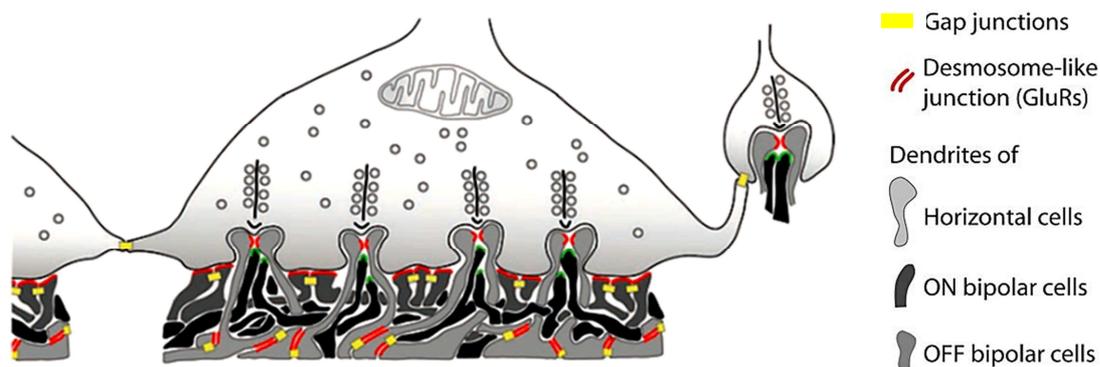


Abbildung 3: Schematische Zeichnung der Photorezeptorterminale einer Zapfenzelle in der äußeren plexiformen Schicht der Vertebratenretina. Zu sehen ist ein vertikaler Schnitt durch das Endfußchen einer Zapfenzelle und die postsynaptisch verschalteten Neurone. In der präsynaptischen Terminale sind Proteinbänder, genannt »Synaptic Ribbons«, samt anhängender Vesikel abgebildet. Gemeinsam mit den invaginierten Fortsätzen der Horizontal- und ON-Bipolarzellen wird diese synaptische Architektur eine Triade genannt. Sowohl hier als auch an den basalen Kontakten der OFF-Bipolarzellen und an den Verbindungen (Gap junctions) zwischen den Horizontalzellen finden sich ionotrope (grün) und metabotrope (rot) Glutamatrezeptoren (GluRs). Die in gelb dargestellten Gap junctions zwischen OFF-Bipolarzellen und zwischen den Photorezeptoren sind gleichartig aufgebaut mit dem Connexin Cx36 als wesentlichem Bestandteil (Puller et al. 2009).

Bereits die Absorption eines einzelnen Photons durch den Photorezeptor löst eine Kaskade von Prozessen aus, die in einer Hyperpolarisation der Zelle und damit in einer verminderten Ausschüttung des Transmitters Glutamat enden. Bei Dunkelheit ist der Photorezeptor depolarisiert und setzt mehr Neurotransmitter Glutamat frei.

Die basal liegenden OFF-Bipolarzellen werden bei Lichteinfall und der damit verbundenen verminderten Glutamatfreisetzung entsprechend weniger aktiviert. Bei Dunkelheit löst der

erhöhte Glutamatspiegel eine Aktivierung der OFF-Bipolarzelle aus. Die ON-Bipolarzellen hingegen generieren in Abwesenheit von Glutamat über einen Ionenkanal kontinuierlich Aktionspotentiale. Glutamat ist durch Bindung an seinen postsynaptischen metabotropen Rezeptor in der ON-Bipolarzelle in der Lage, über eine G-Protein vermittelte Signalkaskade den Ionenkanal zu schließen. Bei Abwesenheit von Licht führt der erhöhte Glutamatspiegel im synaptischen Spalt folglich in der ON-Bipolarzelle zu einer Hemmung des Ionenkanals und durch die resultierende Hyperpolarisation zu einer verminderten Fähigkeit, Aktionspotentiale zu generieren. Eine Aktivierung des Photorezeptors durch Licht bedeutet umgekehrt eine verminderte Glutamatausschüttung und verursacht keine Hemmung der ON-Bipolarzelle. Im Falle der ON-Bipolarzelle entsteht also eine Konversion des Signals der Photorezeptorzelle.

Die Ribbonsynapse ist eine spezialisierte Synapse, die als besondere Strukturen die sogenannten »Synaptic Ribbons« (Synaptische Ribbons) enthält, die diese Synapse zu einer im Hinblick auf die Transmitterausschüttung sehr leistungsfähigen machen (von Gersdorff 2001; Heidelberger et al. 2005) . Auf diese besondere Art von Synapse wird in Kapitel 1.3.2 näher eingegangen.

1.2.6 Die innere Körnerzellschicht (Stratum nucleare internum, INL)

Die innere Körnerschicht wird gebildet von den Zellkörpern der Bipolarzellen zusammen mit denen der Horizontal- und amakrinen Zellen. Während die Bipolarzellen als die zweiten Neurone der Sehbahn die Impulse der Photorezeptorzellen an die nachgeschalteten multiploaren Ganglienzellen weitergeben, dienen amakrine und horizontale Zellen der intraretinalen Informationsverarbeitung und -modulation. Durch vielfältige interneuronale Verschaltungen greifen sie hemmend an den Synapsen zwischen Bipolarzellen und Photorezeptoren bzw. Ganglienzellen ein und sind so unter anderem durch den Mechanismus der lateralen Hemmung an der Kontrastverstärkung beteiligt (Schmidt und Thews 2013). Zusätzlich enthält diese Schicht die Zellkörper der Müller-Zellen, die Gliazellen der Retina, deren Fortsätze sich von der inneren bis zur äußeren Grenzmembran erstrecken. Die Müller-Zellen agieren in einer »metabolischen Symbiose« mit den übrigen Neuronen der Retina (Bringmann et al. 2006). Neben der extrazellulären Ionenhomöostase, dem metabolischen Support der Neuronen und der Freisetzung neuro- und vasoaktiver Substanzen gehört zu ihren Funktionen auch die Regulation der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (Bringmann und Wiedemann 2012).

1.2.7 Die innere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme internum, IPL)

In der inneren plexiformen Schicht erfolgt die Verschaltung der Zelltypen der inneren nukleären Schicht (INL) mit den Dendriten der Ganglienzellen. Das Verhältnis von Photorezeptoren zu Bipolar- und Ganglienzellen liegt außerhalb der Macula lutea (blinder Fleck) bei 125:30:1. Es folgt also dem Konvergenzprinzip (Graumann und Sasse 2005).

Die zuvor beschriebenen ON- und OFF-Bipolarzellen bilden Synapsen mit den jeweils korrespondierenden ON- und OFF-Ganglienzellen. Lichteinfall auf die Photorezeptoren führt durch die verminderte Transmitterausschüttung zu einer Hyperpolarisation der OFF-Bipolarzelle damit zu einer Hemmung der OFF-Ganglienzelle. Die ON-Bipolarzelle dagegen konvertiert das Signal des Photorezeptors und aktiviert die ON-Ganglienzelle. So entsteht – in Zusammenarbeit mit den lateral verschaltenden Interneuronen (Horizontal- und Amakrinzellen) – ein Hell-Dunkel-Kontrast.

1.2.8 Die Ganglienzellschicht (Stratum ganglionicum)

Sie bildet die innere der drei nukleären Schichten und damit stellt das retinale Ganglion das letzte afferente Neuron der Sehbahn dar.

1.2.9 Die Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum)

Die Axone der retinalen Ganglienzellen verlaufen in der Retina in der innersten Schicht, der Nervenfaserschicht. Sie vereinigen sich an der Papilla nervi optici und verlassen als Nervus opticus den Augapfel. Weil an der Austrittsstelle des Nervus opticus keine Photorezeptoren vorhanden sind, spricht man hier vom »blinden Fleck«. In ihrem Verlauf in der Nervenfaserschicht sind die Axone der Ganglienzellen marklos, um ihre Durchlässigkeit für Licht zu erhöhen. Nach ihrer Vereinigung sind sie zur schnelleren Signalweiterleitung von einer Myelinscheide umhüllt.

1.2.10 Die innere Grenzmembran (Lamina limitans interna)

Sie ist – ähnlich wie die Membrana limitans externa – aus den Fortsätzen der Müller-Zellen gebildet und dient der Abgrenzung der Retina zum Glaskörper.

1.3 Synapsentypen der Retina

Eine Synapse bezeichnet die Stelle des Informationsaustausches zwischen einem Neuron und einer weiteren Zelle. Bei letzterer kann es sich um ein zweites Neuron oder um die Zelle eines Effektororgans handeln (Drüse, Muskel, Sinneszelle). Neben der Informationsweiterleitung und -modulation dienen solche Zellkontakte auch der Informationsspeicherung und sind somit Grundlage von Intelligenz.

Eingeteilt werden die Synapsen in elektrische und chemische Synapsen (Meier und Dermietzel 2006). Chemische Synapsen sind prinzipiell aufgebaut aus Präsynapse, Postsynapse und synaptischem Spalt. Die Ribbonsynapse ist eine spezielle Form der chemischen Synapse.

1.3.1 Chemische Synapse

Dieser Synapsentyp ist der am häufigsten vorkommende im menschlichen Körper. Er unterscheidet sich in vielen Eigenschaften von einer elektrischen Synapse.

Der synaptische Spalt der chemischen Synapse ist mit etwa 10-20 nm deutlich weiter als der einer elektrischen Synapse, und die Zellen sind nicht durch direkten Membrankontakt miteinander verbunden. Zudem verläuft die Signalweitergabe wegen des unterschiedlichen Aufbaus der Prä- und Postsynapse unidirektional. Anders als bei der elektrischen Synapse ergibt sich durch den fehlenden direkten Membrankontakt und den Prozess der Signalumwandlung eine Weiterleitungsverzögerung von ungefähr 1 ms.

Eine chemische Synapse ist durch präsynaptische Transmitterfreisetzung und deren Wirkung auf den postsynaptischen Transmitterrezeptor vermittelt. Elektrische Impulse, in der Regel ein Aktionspotential, das im Axon typischerweise saltatorisch weitergeleitet wird, werden an der konventionellen Synapse in chemische Signale umgewandelt.

Auf einen ankommenden elektrischen Reiz, in konventionellen Synapsen typischerweise ein Aktionspotential, werden in der präsynaptischen Terminale spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet. Darauf kommt es zum Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellularraum in die Zelle. Dies löst eine Kaskade an Prozesse aus, an der verschiedenste Proteine beteiligt sind – unter anderem Synaptotagmin und SNARE-Proteine (»soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor« - Proteine), die sowohl an der Vesikel- als auch an der Plasmamembran angesiedelt sind. Die Transmitter-beladenen Vesikel, membranumschlossene Kompartimente, werden in Richtung des synaptischen Spalts

transportiert und setzen durch kalziumabhängige Verschmelzung mit der präsynaptischen Membran ihren Inhalt frei. Dieser Vorgang wird Exozytose genannt.

In seiner Funktion als Kalziumsensor vermittelt Synaptotagmin die Aktivierung des Fusionsprozesses. Bei regulärer intrazellulärer Kalziumkonzentration fungiert es als eine Art Abstandhalter zwischen den SNARE-Komplexen der Membranen von Präsynapse und Vesikel, wohingegen es bei Kalziumeinstrom in die Zelle durch Konformationsänderung die Annäherung der SNARE-Komplexe ermöglicht (van den Bogaart et al. 2011). Das vesikuläre Protein (v-SNARE) Synaptobrevin bildet mit den *target*-Proteinen (engl.: Ziel, t-SNARE) wie Syntaxin und SNAP-25 in der präsynaptischen Membran eine stabile Einheit, woraufhin die Synaptotagmin-vermittelte Konformationsänderung des SNARE-Komplexes die gezielte Membranfusion und damit die Transmitterfreisetzung auslöst (Han und Jackson 2006; Südhof 2012).

Nach der Freisetzung des vesikulären Inhalts in den synaptischen Spalt diffundieren die Neurotransmitter zur postsynaptischen Membran und bewirken dort eine Aktivierung verschiedener Rezeptoren. Zu unterscheiden sind zwei Arten von ausgelösten Potentialen, die Transmitter- und Rezeptorabhängig sind: das exzitatorische postsynaptische Potential (EPSP) und das inhibitorische postsynaptische Potential (IPSP). Um die Membran über einen gewissen Schwellenwert zu depolarisieren und damit in der postsynaptischen Zelle ein Aktionspotential zu generieren, bedarf es mehrerer EPSPs. Umgekehrt führt eine ausreichende Anzahl von IPSPs zu einer Hyperpolarisation und damit zu einer verminderten Erregbarkeit der Zelle.

Hinsichtlich ihrer Funktionsweise sind zwei grundsätzliche Arten von postsynaptischen Rezeptoren zu unterscheiden: ligandengesteuerte und metabotrope Rezeptore, die mit einem G-Protein (GTPase) gekoppelt sind. Im Falle der nachfolgend beschriebenen Ribbonsynapse ist vor allem der G-Protein gekoppelte Glutamat-Rezeptor von Bedeutung (Krishnan und Schiöth 2015).

1.3.2 Ribbonsynapse

Photorezeptorzellen sind Neurone, die kein Aktionspotential generieren (*»non-spiking neurons«*). Stattdessen wird durch eintreffende Photonen ein elektrisches Signal erzeugt, das eine an die Lichtintensität adaptierte Freisetzung von Neurotransmittern hervorruft. Durch Photorezeptoren werden sensorische Informationen in abgestuften Änderungen im Membranpotential über eine große dynamische Bandbreite vermittelt (Sterling und Matthews 2005; Matthews und Fuchs 2010). Um das synaptische Signal kontinuierlich sehr fein an die Änderungen der Lichtintensität anzupassen, ist eine spezialisierte Synapse erforderlich, die gleichzeitig in der Lage sein muss, bei Dunkelheit eine lang anhaltend hohe Rate an Neurotransmitterfreisetzung aufrechtzuerhalten: die Ribbonsynapse (von Gersdorff 2001).

Sie gehört zu den chemischen Synapsen und zeichnet sich durch eine besondere Leistungsfähigkeit in der Transmitterfreisetzung aus.

Bei Wirbeltieren werden Ribbonsynapsen von den Photorezeptoren in der äußeren und den Bipolarzellen in der inneren plexiformen Schicht der Retina gebildet (Abbildung 4). Daneben kommen sie in den Haarzellen des Vestibularorgans und der Cochlea vor (Fuchs et al. 2003, Matthews und Fuchs 2010). Außerdem findet man sie in den Pinealozysten der Zirbeldrüse im Gehirn, die mit der Retina in Verbindung steht (McNulty und Fox 1992).

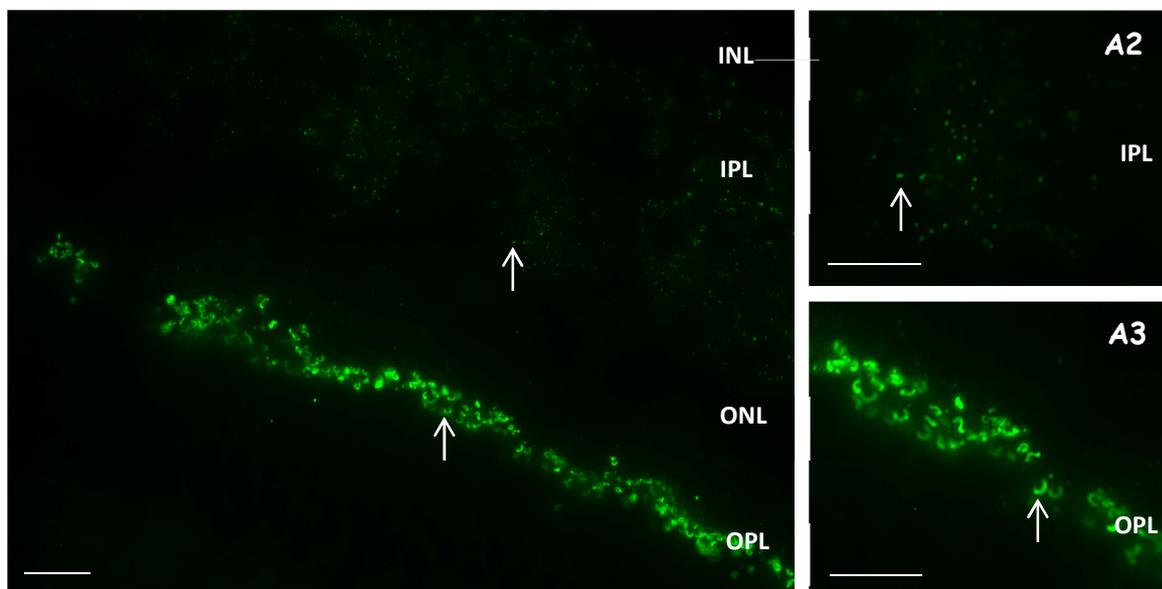


Abbildung 4: Kryostatschnitt der bovinen Retina (Querschnitt) immunmarkiert mit einem Antikörper gegen RIBEYE. Die Ribbonsynapsen in OPL und IPL wurden mit einem Antikörper gegen RIBEYE markiert. RIBEYE ist eine Hauptkomponente der Synaptischen Ribbons. Ribbonsynapsen sind in der OPL und IPL sichtbar (A1). Während die Synaptischen Ribbons in der OPL bogenförmig sind (A3), Ribbons in der IPL kleiner (A2). A2, A3 stellen einen vergrößerten Ausschnitt aus A1 dar. Pfeil: Synaptisches Ribbon. Skalierungsbalken: 10 µm.

1.3.2.1 Aufbau und Zusammensetzung

Der charakteristische, zentrale Bestandteil der Ribbonsynapse sind elektronendichte, mit Vesikeln assoziierte Strukturen, die an der aktiven Zone der Ribbonsynapse verankert sind. Diese Strukturen werden als Synaptische Ribbons («Synaptic Ribbons») bezeichnet und geben der Synapse ihren Namen. Der Synaptische Ribbon stellt das Schlüssel-Organell der Ribbonsynapse dar. Seine Hauptaufgabe besteht darin, dieser tonisch aktiven Synapse eine ständig hohe Neurotransmitterausschüttung zu ermöglichen.

Sjöstrand, einer der Pioniere der Elektronenmikroskopie, beschrieb diese elektronendichte Struktur 1953 erstmals (Sjöstrand 1953). Der Synaptische Ribbon der Photorezeptorzelle ist 35 nm dick, bis zu 1.0 µm hoch und 1–2 µm lang (Heidelberger et al. 2005).

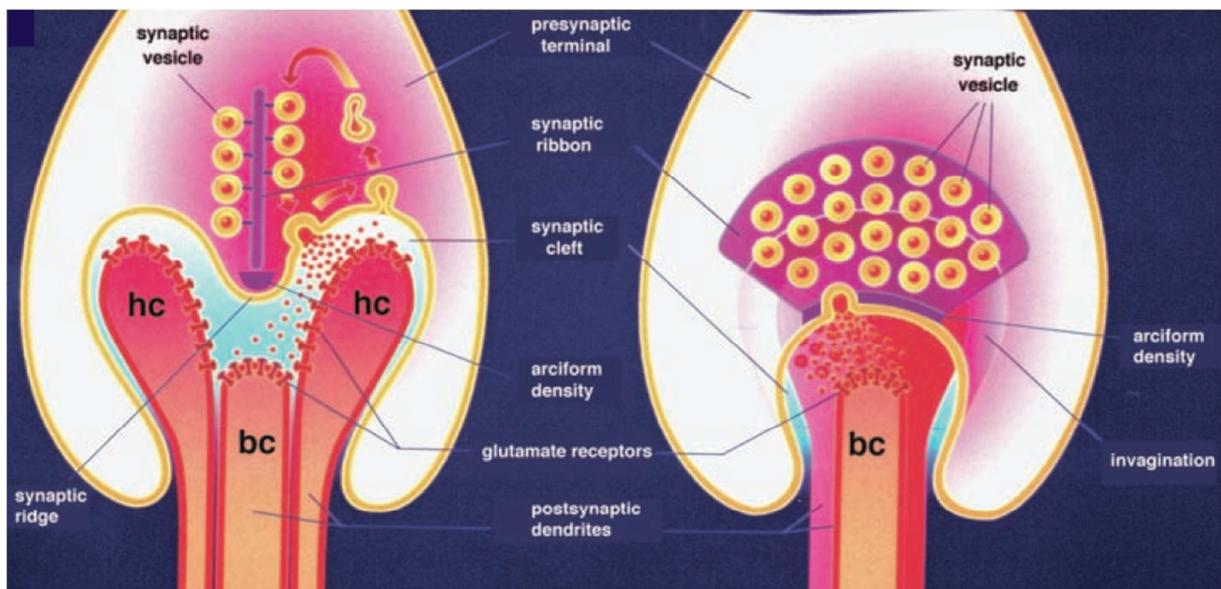


Abbildung 5: Schematische Illustration einer Ribbonsynapse der Stäbchenzelle. Der stabförmige Synaptische Ribbon auf der linken Seite stellt den Querschnitt der eigentlich platten Struktur dar, die sich sichel- oder hufeisenförmig entlang der invaginierten Plasmamembran krümmt (rechte Seite). Die Querschnitte der Dendriten von Horizontal- und Bipolarzellen sind vereinfacht dargestellt (Schmitz 2009).

Synaptische Ribbons kommen in der Netzhaut von Wirbeltieren in den Terminalen der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) in der äußeren plexiformen Schicht und in den Terminalen der Bipolarzellen in der inneren plexiformen Schicht vor. Dort sind sie in der aktiven Zone lokalisiert und senkrecht zur Plasmamembran orientiert. In der OPL erscheinen sie in der elektronenmikroskopischen Ansicht oft stabförmig (Abbildung 6). Dreidimensional rekonstruiert sind sie in der Hochauflösung plattenartige Strukturen, die sich dem gekrümmten Membranverlauf der Präsynapse anpassen und daher ein hufeisenförmiges Aussehen zeigen, wie in Abbildung 5 dargestellt (Schmitz et al. 2000). Der in der

Elektronenmikroskopie stabförmig erscheinende Ribbon ist somit als Querschnitt einer plattenförmigen Struktur zu verstehen. Für die immunmarkierte Retina in Kryostatschnitten ist die gekrümmte Gestalt der Ribbons typisch (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu sind sie in der IPL eher von kugeliger Gestalt und treten zahlreicher auf (tom Dieck und Brandstätter 2006; LoGiudice und Matthews 2009; Maxeiner et al. 2016).

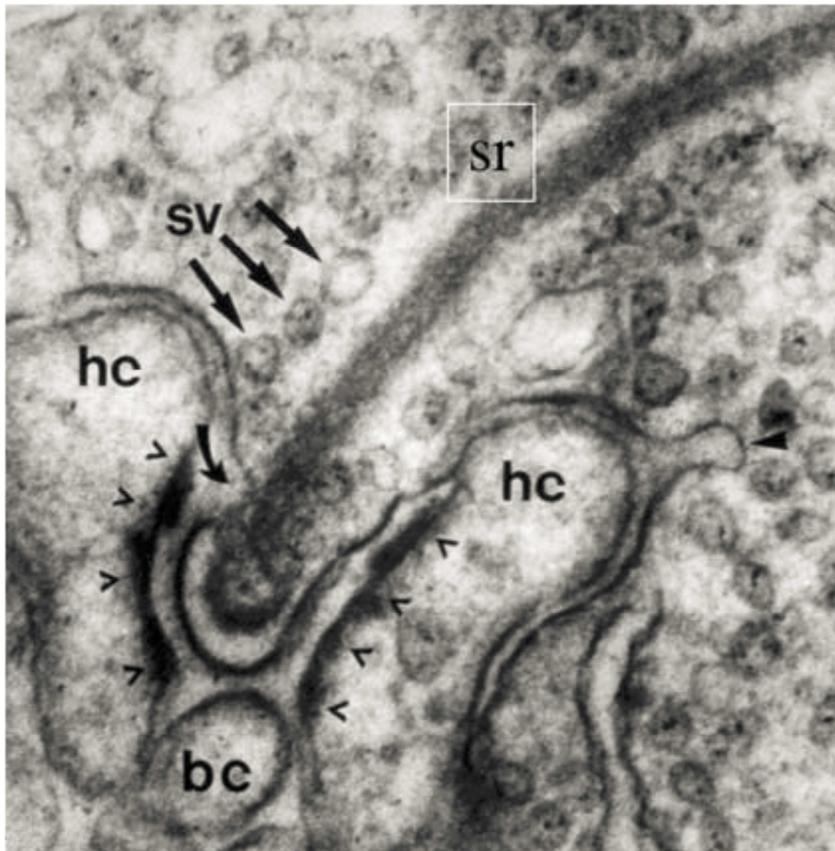


Abbildung 6: Ultrastrukturelle Darstellung einer retinalen Ribbonsynapse der Karpfenfischart *Carassius carassius*. Synaptic ribbon (sr), Synaptisches Vesikel (sv), Dendriten der Horizontalzelle (hc) und Bipolarzelle (bc). Die Pfeile bezeichnen die synaptischen Vesikel; die Pfeilköpfe markieren den Ort der Endozytose, der gebogene Pfeil die Exozytose-Zone (Schmitz 2009).

Elektronenmikroskopisch betrachtet zeigen sie einen dreischichtigen Aufbau mit einer mittleren Schicht geringer Elektronendichte und zwei umgebenden stark elektronendichten Bereichen (Wagner 1997).

Die Anzahl der Synaptischen Ribbons variiert je nach Zelltyp. Stäbchen besitzen in ihrer einzigen aktiven Zone einen Synaptisches Ribbon (Rao et al. 1994), Zapfen dagegen in ihrer wesentlich größeren Terminale 20–40 Ribbons (Haverkamp et al. 2000).

An diesen hoch-spezialisierten Strukturen sind Transmitter gefüllte Vesikel angeheftet. Diese stehen in Verbindung über dünne Filamente (Rao-Mirotznik et al. 1995). Hinsichtlich des Vesikel-Depots am Synaptischen Ribbon ist zu unterscheiden der kleinere, unmittelbar

freisetzbare Pool («rapidly releasable pool»), dessen Vesikel mit der Membran der aktiven Zone in direktem Kontakt stehen (~ 100 Vesikel), von einem größerer Reserve-Pool, dessen Ribbon-assoziierte Vesikel bei Bedarf rasch Richtung präsynaptische Membran wandern und freigesetzt werden können (~ 600 Vesikel) (Sterling und Matthews 2005; Bartoletti et al. 2010). Pro aktive Zone können in einer Sekunde bis zu 500 Vesikel freigesetzt werden (Parsons et al. 1994). Bipolare Zellen der Retina von Goldfischen enthalten circa 55 der kleineren Synaptische Ribbons pro Terminale, die jeweils 110 Vesikel binden, von denen wiederum ein Fünftel an der Ribbon-Basis mit der Plasmamembran in direktem Kontakt steht (von Gersdorff 2001). Viel größer ist die Gesamtanzahl der über die Terminale verstreuten Ribbons. Sie kann von einigen Zehntausend in den Stäbchen von Säugetieren bis zu einer Million in Bipolarzellen betragen (Heidelberger et al. 2005), die den an die Synaptischen Ribbons und die Plasmamembran angehefteten Pool schnell wieder auffüllen können. Im Gegensatz dazu halten konventionelle chemische Synapsen deutlich weniger Vesikel bereit. Die Verbindung der Synaptischen Ribbons mit der präsynaptischer Membran erfolgt durch »Arciform Densities« (engl. bogenförmige Verdichtung) (McLaughlin 1976). Sie sind innerhalb einer an L-Typ Calcium-Kanal reichen Region gelegen, die sich in einer Evagination der Plasmamembran befindet.

Hinsichtlich der Zusammensetzung von Synaptischen Ribbons sind bei weitem noch nicht alle beteiligten Proteine bekannt. Bisherige Analysen zeigen allerdings, dass sich die Komposition der Ribbonsynapse nicht wesentlich von der einer konventionellen chemischen Synapse unterscheidet (von Kriegstein et al. 1999). Als einziges Ribbon-spezifisches Protein ist RIBEYE die zentrale Struktur der Synapse (Schmitz et al. 2000). Das Protein RIM2 (Rab3-interacting molecule) ist an der Basis des Synaptischen Ribbons lokalisiert (Lv et al. 2012). CtBP1 ist strukturell verwandt mit der B-Domäne von RIBEYE. Seine Funktion ist aber noch genauso ungeklärt wie die von KIF3A, das gehäuft in Synaptischen Ribbons vorkommt (Muresan et al. 1999). Außerdem sind die Proteine Piccolo und Bassoon Teil der Synaptischen Ribbons (Brandstätter et al. 1999; Dick et al. 2001). Letzteres Protein interagiert mit der RIBEYE(B)-Domäne und scheint eine Rolle bei der Verankerung des Synaptischen Ribbons in der aktiven Zone zu spielen, denn in Mäusen ist nachgewiesen worden, dass bei seiner Abwesenheit Synaptische Ribbons frei in der Zelle schwimmen (Dick et al. 2003; tom Dieck et al. 2005). Eine weitere Komponente ist das Arf-GTPase aktivierende Protein-3 (ArfGAP3), ein bekannter Regulator der Vesikelentstehung am Golgi-Apparat, der in Interaktion mit RIBEYE eine Rolle bei der Endozytose spielt (Dembla et al. 2014).

1.3.2.2 Funktion

Konventionelle chemische Synapsen ändern ihre Transmitterausschüttung über die Variation des Aktionspotentials, wohingegen in der sehr sensiblen Retina eine größere Bandbreite an Freisetzungsgeschwindigkeiten der Vesikel gefordert ist. Eine kontinuierliche Freisetzung, die diskrete Abstufungen zulässt, ist vonnöten. Diese Eigenschaft ist durch die Ribbonsynapse gegeben, deren Rate an Transmitterfreisetzung die der konventionellen chemischen Synapsen vielfach übersteigt (Stevens und Tsujimoto 1995). Sie erfolgt durch Ca^{2+} -getriggerte Exozytose (Südhof 2004).

Synaptische Ribbons sind dynamische Strukturen. Sie sind in der Lage, sich in ihrer Anzahl und Struktur sowohl an äußere Lichtverhältnisse als auch an innere Gegebenheiten wie den zirkadianen Rhythmus anzupassen (Schmitz und Drenckhahn 1993; Vollrath und Spiwoks-Becker 1996). Ihre große synaptische Plastizität zeigt sich unter anderem darin, dass sie in Stäbchen bei Dunkelheit, wenn die Transmitterausschüttung maximal ist, länger als bei Helligkeit sind (Spiwoks-Becker et al. 2004). Zuständig für diese Formänderung sind »Vorläufer-Kugeln«, die einige Proteine enthalten, aus denen Synaptische Ribbons aufgebaut sind. Diese regulieren durch Abspaltung von den Synaptischen Ribbons deren Größe und sind darüber hinaus als eine Art Transporteinheit für deren Ausreifung von Bedeutung (Regus-Leidig et al. 2009).

An der Transmitterausschüttung sind vor allem spannungsabhängige Kalzium-Kanäle vom L-Typ beteiligt, die an der Stelle der Vesikelfreisetzung angereichert zu finden sind. Diese können ihren Abstand zur aktiven Zone variieren und somit die Stärke der Synapse regulieren (Mercer et al. 2012).

In erster Linie beeinflussen spannungsabhängige Änderungen der präsynaptischen Kalzium-Konzentration Freisetzungswahrscheinlichkeit der Transmitter – die Größe des unmittelbar zur Freisetzung verfügbaren Pools an Vesikeln wird durch den Einstrom von Kalzium nicht verändert (Thoreson et al. 2016). Des Weiteren reguliert Kalzium die Wiederaufstockung des Vesikel-Pools (Babai et al. 2010).

Nicht abschließend geklärt ist der Transportmechanismus der Vesikel entlang des Synaptischen Ribbons. Denkbar sind ein aktiver und ein passiver Transport.

Untersuchungen der Gruppe um Heidelberger aus dem Jahr 2002 haben gezeigt, dass diese Vesikel einen allzeit einsatzbereiten Pool darstellen (Heidelberger et al. 2002). Ihre Freisetzung erfolgt nämlich auch in Abwesenheit von ATP-Hydrolyse. Die fehlende Energie hat auf die Fusionskinetik keinen Einfluss. Diese Erkenntnis spricht wiederum für einen

passiven Prozess und nicht für einen aktiven Transportmechanismus. Es wurde angenommen, dass die Vesikel durch ein Gleiten entlang der Synaptischen Ribbons im Sinne einer Diffusion zur Zellmembran in die aktive Zone (»hot spot«) gelangen und dort freigesetzt werden (Gersdorff et al. 1996; Zenisek et al. 2000).

Die Diffusion alleine erklärt allerdings nicht die hohe Freisetzungsgeschwindigkeit. Eine neuere Überlegung benutzt das Modell der sogenannten »compound exocytosis«. In diesem Modell fusionieren die Vesikel kurz vor oder während der Exozytose gleichzeitig sowohl miteinander als auch mit der Plasmamembran. Diese Form der Freisetzung wird z. B. von exokrinen Drüsen genutzt. Gut belegt ist dieser Mechanismus für die exokrinen Zellen des Magendarmtraktes (Pickett und Edwardson 2006).

Somit stehen sich zwei Theorien über den Transportmechanismus gegenüber. Die eine sieht die Synaptischen Ribbons als aktives Förderband (»conveyer belt«), die andere als passiven Sicherheitsgürtel (»safety belt«) an, der Vesikel in unmittelbarem und stabilem Kontakt hält und die multivesikuläre Freisetzung durch »compound exocytosis« ermöglicht (Parsons und Sterling 2003).

Elektrophysiologischen Untersuchungen an retinalen Bipolarzellen zufolge existieren zwei Arten der Endozytose. Ein schneller Mechanismus ist Clathrin und Kalzium abhängig (Smith et al. 2008), ein langsamer ist ebenfalls Clathrin abhängig, aber unabhängig von Kalzium. So ist ein optimales Reagieren auf Änderungen im Vesikel-Verkehr gewährleistet, da das Funktionieren einer Synapse ein ausgewogenes Verhältnis von Endo- und Exozytose erforderlich macht.

Um die genaue Funktionsweise der Ribbonsynapse, die Bindung und der Transport von Vesikeln und deren Regulation zu verstehen, ist es vor allem essentiell, mehr über den Aufbau und die beteiligten Proteine herauszufinden, von denen bisher nur ein Teil identifiziert ist.

1.4 RIBEYE – Hauptbestandteil der Ribbonsynapse

RIBEYE ist das einzige bekannte Ribbon-spezifische Protein (Schmitz et al. 2000; tom Dieck et al. 2005). Seinen Namen erhielt das im Jahr 2000 entdeckte Protein durch die Zusammensetzung der Wörter Ribbon als Organell, in dem es vorkommt, und »eye« (engl. Auge) als Ursprungsgewebe. Es ist einzigartig durch die Tatsache, dass alle anderen bisher identifizierten Proteine auch in konventionellen chemischen Synapsen vorkommen und auch hinsichtlich seines mengenmäßigen Anteils von circa 67% ist es die wesentliche Komponente des Synaptischen Ribbons (Zenisek et al. 2004).

Morphologie

Untersuchungen der Morphologie zufolge hat RIBEYE selbst-aggregierende Eigenschaften. Dies entsteht vor allem durch die Interaktion der A-Domänen untereinander. Es existieren drei Interaktionsstellen innerhalb der RIBEYE(A)-Domäne, die gleichsinnig mit anderen RIBEYE(A)-Domänen in Verbindung stehen. Auch B-Domänen interagieren und auch A- und B-Domäne miteinander. Dadurch ist es RIBEYE möglich, ein dreidimensionales Gerüst aufzubauen (Schmitz 2009). Lässt man RIBEYE im Gesamten heterolog exprimieren, erhält man runde Strukturen, die den Synaptischen Ribbons der inneren Haarzellen gleichen (Magupalli et al. 2008). Dies weist darauf hin, dass diese Form wohl die ursprüngliche ist und die Hufeisen- oder Stabform erst im Zusammenspiel mit weiteren Strukturproteinen zustande kommt.

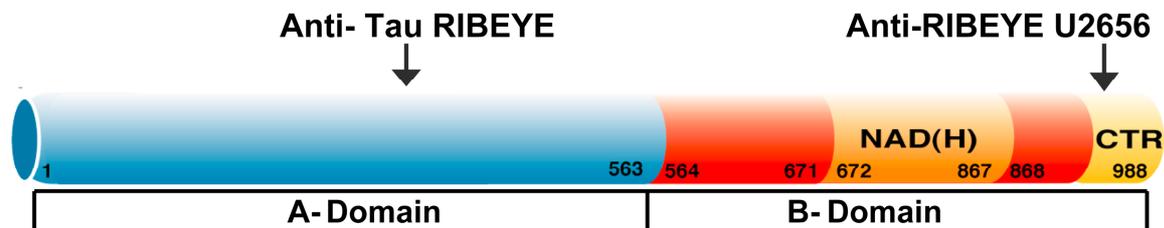


Abbildung 7: Aufbau von RIBEYE mit Bindungsstellen von Antikörpern gegen die A- bzw. B-Domäne. Modifiziert nach Magupalli et al. (2008).

RIBEYE hat eine Gesamtmolekülmasse von 120 kDa. Es besteht aus der N-terminalen A-Domäne mit 565 Aminosäuren (1689 bp) und einer C-terminalen, NAD(H)-bindenden B-Domäne mit 420 Aminosäuren (1275 bp) (Abbildung 7) (Schmitz et al. 2000).

Die B-Domäne ist in ihrer Primärstruktur bis auf die N-terminalen 20 Aminosäuren identisch mit dem transkriptionalen Korepressor CtBP2 (C-terminal binding Protein 2). Sie leiten sich beide von demselben Gen ab. Die Entstehung des einen oder anderen Proteins ist Resultat alternativen Spleißens desselben Genes CtBP2, was Analysen der Gendatenbank bestätigt haben. Die N-terminalen 20 Aminosäuren des CtBP2 sind im Falle von RIBEYE durch ein anderes Exon mit einer Sequenz von 560 Aminosäuren (A-Domäne) ersetzt (Schmitz et al. 2000).

Anders als RIBEYE, das nur als Bestandteil von Ribbonsynapsen auftaucht, kommt CtBP2 ubiquitär vor.

Funktion

Aus seiner Morphologie ergibt sich die primäre Funktion von RIBEYE in der Ribbonsynapse: die Bildung des inneren Gerüsts für das Synaptische Ribbon. In Mäusen führt eine vollständige Deletion von RIBEYE dazu, dass die Ausbildung von Ribbons ausbleibt. In Bipolarzellen erfährt die schnelle synchronisierte Transmitterausschüttung eine deutliche Beeinträchtigung (Maxeiner et al. 2016). Den Ergebnissen zufolge wurde die Kopplung zwischen den Vesikeln und Kalziumkanälen beeinträchtigt. Außerdem wurde die Anzahl der unmittelbar freisetzbaren Vesikel in der aktiven Zone verringert. Diese Beobachtungen lassen im Umkehrschluss Vermutungen über die Funktion der Synaptischen Ribbons, und durch die Tatsache, dass bei Deletion seiner wesentlichen Komponente RIBEYE keine Ribbons ausgebildet werden, auch auf die Relevanz von RIBEYE zu. Die Untersuchungen bestätigen seine Rolle als wesentliches Strukturprotein und als unabdingbaren Bestandteil des Synaptischen Ribbons.

RIBEYE(A)

Als der für den Aufbau des inneren Gerüsts des Synaptischen Ribbons wesentliche Bestandteil wird die A-Domäne verantwortlich gemacht. Im Gegensatz zur B-Domäne von RIBEYE ist die A-Domäne nicht homolog zu irgendeinem anderen bekannten Protein, und sie ist auffallend reich an den Aminosäuren Serin und Prolin (Schmitz et al. 2000).

1.5 Aktin

Der Erstbeschreiber des Aktins, William Dobinson Halliburton, nannte die durch ihn im Jahr 1887 identifizierte Struktur »Myosin-Ferment« (Halliburton 1887). Eine neuere, in Abwandlung heute noch gebräuchliche Technik der Proteinextraktion ermöglichte 1942 dem Biochemiker Brunó Ferenc Straub die Isolation des Muskel-Aktins in einer höheren Reinheitsstufe. Seinen endgültigen Namen erhielt das Aktin von Albert Szent-Györgyi, in dessen Labor Straub arbeitete und der sich für die Namensgebung des griechischen Wortes *aktis* für »Strahl« bediente.

Bis in die 1970er Jahre nahm man an, dass Aktin nur in Muskelzellen vorkommt. Heute weiß man, dass Aktin in allen eukariotischen Zellen ubiquitär exprimiert wird.

Bei Aktin handelt es sich um ein im Verlauf der Evolution hoch-konserviertes Protein, dessen Sequenz sich über einen Zeitraum von Billionen Jahren von der Hefe als einzelliges Lebewesen bis zum Homo sapiens kaum verändert hat (Gunning et al. 2015). Es gibt 6 Isoformen des Aktins – zwei zytoplasmatische und vier Formen, die im Muskel vorkommen (Perrin and Ervasti 2010). Daneben existiert Aktin in zwei Zuständen: monomeres, globuläres Aktin (G-Aktin) und polymeres, filamentöses Aktin (F-Aktin), wobei F-Aktin durch Polymerisierung von globulärem Aktin entsteht. Jedes G-Aktin hat eine ATP-Bindungsstelle. Dort findet die Energie freisetzende Umwandlung von ATP in ADP und anorganisches Phosphat (Hydrolyse) und die Regenerierung von ADP in ATP (Phosphorylierung) statt (Kabsch et al. 1990; Dominguez und Graceffa 2003).

Als Bestandteil des Zytoskelettes ist Aktin an vielzähligen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt. Es spielt eine Rolle bei der Stabilisierung der Zelle, dem Transport innerhalb der Zelle, der Zellmotilität, der Zellteilung, der Zelldifferenzierung und beim Ablauf der Apoptose (Pollard und Cooper 2009). Zur Gewährleistung der Stabilität einer Zelle bildet es ein sich an der Innenseite der Plasmamembran ausbreitendes Netzwerk aus. Mit einer Molekülmasse von 43 kDa kann es passiv durch die Kernporen diffundieren. Dort greift es unter anderem durch Interaktion mit allen drei Formen der eukaryotischen RNA-Polymerasen in die Translation ein (Rajakylä und Vartiainen 2014).

Die Fähigkeit zur Zellmotilität (Zellmigration) beruht neben der gerichteten Aktinpolymerisierung auf dem Zusammenspiel mit dem Motorprotein Myosin. Das Aktinfilament ist eine polare Struktur mit einem Minus- und Plus-Ende. Hier erfolgt der dynamische Ab- und Aufbau der Aktinfilamente, der sehr rasch vonstattengehen kann. Der Plus-Pol stellt dabei das wachsende und der Minus-Pol das schrumpfende Ende dar. Sind alle Plus-Pole gleichsinnig angeordnet, ist durch das Vorwärtsschieben der Zellmembran eine gerichtete Bewegung möglich (Pollard und Cooper 2009). Die einzelnen Aktinfilamente sind in Form einer Doppelhelix organisiert und können in Ihrer Gesamtheit zusammen mit anderen Proteinen eine Muskelkontraktion erzeugen. Des Weiteren bilden sie die Form beispielsweise von Membranin- und evaginationen, wie es für die aktive Zone der Synapsen der Photorezeptoren zutrifft.

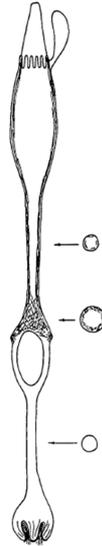


Abbildung 8: Schematische Zeichnung der Verteilung von Aktinfilamenten in der Zapfenzelle. Rechts daneben ist die Verteilung im Querschnitt im zentralen Anteil des Myoids, im proximalen Anteil des Myoids und im Axon gezeigt. Abbildung aus: Nagle et al. 1986.

Die Existenz von Aktin in der äußeren plexiformen Schicht der Retina ist gut dokumentiert (Nagle et al. 1986; Schmitz and Drenckhahn 1993; Schmitz and Drenckhahn 1997). Mittels verschiedener Aktin-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin zeigt sich ein diskontinuierliches Muster von Aktin in der äußeren plexiformen Schicht mit großen punktförmigen immunreaktiven Strukturen, die einen Durchmesser von 3–5 μm aufweisen und sowohl an den durch die Photorezeptoren invaginierten Enden der Dendriten von Bipolar- und Horizontalzellen als auch in schwächerer Ausprägung an den Photorezeptorterminalen selbst lokalisierbar sind (Schmitz und Drenckhahn 1993). Aus diesen Beobachtungen kann vermutet werden, dass Aktin wesentlich bei der Bildung oder Aufrechterhaltung des postsynaptischen dendritischen Komplexes beteiligt ist (Schmitz und Drenckhahn 1993). Filamentöses Aktin ist vorwiegend in den synaptischen Terminalen der Zapfen zu finden (Woodford und Blanks 1989) und durchzieht das Ellipsoid und das Myoid der Innensegmente der Photorezeptoren, während es in der Kernregion fehlt, wie in Abbildung 8 ersichtlich ist (Nagle et al. 1986). Dies macht die stark polare Struktur der hoch-spezialisierten Photorezeptorzelle deutlich. Licht führt zu einer Verlängerung der Stäbchen, Dunkelheit zu einer Verlängerung der Zapfen. Vermittelt wird dies über die Kontraktion Aktin im Myoid der Innensegmente (Pagh-Roehl et al. 1992).

Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Schmitz aus dem Jahr 1993 lassen vermuten, dass Aktin durch Dystrophin in der postsynaptischen Plasmamembran in der Retina verankert

wird, was für die synaptische Plastizität wichtig ist, und dass die Dystrophin-Verankerung von Aktin eine Rolle bei der synaptischen Transmission zwischen Photorezeptoren und den nachgeschalteten Dendriten spielt (Schmitz et al. 1993). Patienten, die an der X-chromosomal rezessiv vererbten Muskeldystrophie vom Typ Duchenne leiden, die mit einem Fehlen von Dystrophin einhergeht, weisen Sehstörungen und ein abnormales Retinogramm auf (Fitzgerald et al. 1999).

1.6 Anti-AktinC4 Antikörper

Bei dem Anti-AktinC4 Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen, monospezifischen, bivalenten Maus-Antikörper des Isotyps IgG1 mit Gamma1 als schwerer und Kappa als Leichtkette. Als Immunogen bei der Herstellung diente Aktin aus dem Kaumagen des Huhns. Der Antikörper reagiert gegen ein Epitop einer hoch-konservierten Region in allen sechs Isoformen des Aktins bei Wirbeltieren (Lessard 1988). Er bindet in den N-terminalen zwei Dritteln (Lessard 1988). Über den genauen Ort kann aber bisher nur gemutmaßt werden. Wahrscheinlich liegt das Epitop im Bereich der Aminosäuren 18 bis 40 (Ribic et al. 2014, Datenblatt des Herstellers). Dies ist eine hoch-konservierte Region des Aktins, was auch durch die Tatsache bekräftigt wird, dass der Antikörper alle Isoformen des Aktins bei Wirbeltieren erkennt.

1.7 Zielstellung dieser Arbeit

Ausgangspunkt dieser Arbeit bildet der Befund, dass der Anti-AktinC4 Antikörper an Kryostatschnitten der bovinen Retina zu einer Ribbon-spezifischen Anfärbung in der Rinderretina führte (siehe Abbildung 4). Das zugrunde liegende Antigen sollte in der vorliegenden Dissertationsarbeit charakterisiert werden.

2 Material & Methoden

2.1 Humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen)

Die Human Embryonic Kidney-Zelllinie (HEK-Zellen) besteht seit Ende der 1970er Jahre. Durch gezielte Veränderungen wurden diesen Zellen spezielle Charakteristika einer Karzinomzelle verliehen, sodass sie beispielsweise in der Lage sind, sich theoretisch unendlich oft zu teilen. Diese Eigenschaften wurden durch das Einschleusen von Genomsequenzen des Adenovirus Typ 5 erreicht (Graham et al. 1977). Bezogen wurde diese Zelllinie von der Firma ATCC (American Tissue Culture Collection).

HEK293-Zellen wachsen adhärent und haben morphologisch Ähnlichkeit mit Fibroblasten. Sie sind in ihrer Handhabung vergleichsweise einfach und lassen sich leicht transfizieren.

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit werden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche mit Trypsin von ihrer Unterlage abgelöst und in niedrigerer Konzentration wieder ausgesät. Unter idealen Kultur- (DMEM + 10 % FCS) und Umgebungsbedingungen (Bebrütung bei 37 °C, 5 % CO₂ in feuchter Umgebung) kann so eine Wachstumsverdopplung innerhalb von 24 h erzielt werden.

2.2 Verwendete Primär- & Sekundärantikörper

Tabelle 1: Verwendete Primär- & Sekundärantikörper

| Antikörper | Bezugsquelle |
|--------------------------------------|---|
| TAU Ribeye ES | Gerichtet gegen die A-Domäne von RIBEYE; unpubliziert |
| Anti-AktinC4 Antikörper (Maus, mono) | MP Biomedicals 69100 |
| Anti-mCherry Antikörper (1C51) | Abcam ab 125096 |
| U2656 | Schmitz et al. 2000 |
| CtBP2 (BD, Maus, mono) | Sigma, SAB1405672-50UG |
| SV2 Überstand | Laboreigen, Hybridomaüberstand |
| Phalloidin-FITC | Molecular Probes |
| Goat-anti-rabbit (GAR)-POX | Sigma G7277 (5 nm Gold) G3779, G7402 (10 nm Gold) |
| Goat-anti-mouse (GAM)-pox | Sigma G7527 (5 nm Gold) G7652 (10 nm Gold) |

| | |
|--|----------------------------------|
| Alexa Fluor Chicken-anti-mouse (CAM) 488 | Molecular Probes, Jackson A21441 |
| Alexa Fluor Donkey-anti-rabbit (DAR) 568 | Invitrogen A 10042 |

2.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Bezugsquelle |
|---|---------------------|
| APS (Ammoniumpersulfat) | Roth |
| BSA (Bovines Serum-Albumin) | Sigma |
| β-Mercaptoethanol | Roth |
| DMEM (Zell-Medium) | Sigma |
| EDTA | Roth |
| FCS (Foetales Kälber-Serum) | Invitrogen |
| Isopropanol | Roth |
| Luminol | Roth |
| Magermilchpulver | Töpfer |
| Natriumchlorid | Roth |
| n-Propylgallat (NPG) | Sigma |
| PBS (Phosphat buffered saline), Ca ²⁺ frei | Sigma |
| Ponceau S | Roth |
| Red-Taq DNS-Polymerase | Sigma |
| SDS (Sodiumdodecylsulfat) | Roth |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) | Merck |
| Tris | Roth |
| Triton X-100 | Fluka |
| Roti®-Mark STANDARD | Roth |
| DNS Leiter-Mix | Peqlab |

2.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

| Produkt | Rezept |
|--|---|
| Chloroquin-Lösung 10mM | 5,2 mg Chloroquin in 1 ml H ₂ O steril filtriert |
| Blocking-Puffer | 0,5 % BSA + 0,1 % Triton X-100 in 1xPBS |
| ECL-Lösung (Enhanced chemiluminescence) | ECL-I: 10 ml Tris 1M pH 8.5 1 ml Luminol 440 µl Para-hydroxy Coumarin Acid (PCA) Mit destilliertem H ₂ O auf 100 ml auffüllen ECL-II: 10 ml Tris 1M pH 8.5 64 µl H ₂ O ₂ Mit destilliertem H ₂ O auf 100 ml auffüllen |
| Medium (Zellen) | 10 % FCS in DMEM |
| Lade-Puffer (Agarosegel) | 10 µl 100mM EDTA 490 µl dd H ₂ O 500 µl Glycerol |
| Lyse-Puffer | 40 ml deionisiertes H ₂ O 5 ml 100mM Tris-HCl pH 8,0 0,438 g NaCl 0,019 g EDTA 5 ml 1 % Triton X-100 |
| 5x PBS, Ca ²⁺ frei | 40 g NaCl 1 g KCl 7.2 g Na ₂ HPO ₄ 1.2 g KH ₂ PO ₄ Mit destilliertem H ₂ O auf 1 l auffüllen |
| 4% Paraformaldehyd (PFA) | 4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS |
| Polyacrylamid-Gel (10 % Trenngel) | Sammelgel: 1.5 ml dd H ₂ O, 1.9 ml 1 M Tris pH 8.8 2.5 ml 30 % Acrylamid 75 µl 10 % SDS 1.5 ml 50 % Glycerol 5 µl TEMED 38 µl 10 % APS Trenngel: 4.73 ml dd H ₂ O 1.88 ml 1 M Tris pH 8.8 0.75 ml 30% Acrylamid 75 µl 10% SDS 7.5 µl TEMED 56.3 µl 10 % APS |
| Ponceau S-stain | 30 g Trichloressigsäure 5 g Ponceau S |

| | |
|--------------------------------|--|
| | Mit destilliertem H ₂ O auf 1 l auffüllen |
| SDS-PAGE-Puffer | 3.03 g Tris 14.4 g Glycine 1.0 g SDS Mit dd H ₂ O auf 1 l auffüllen |
| SDS-Lade-Puffer 4x | 1,6 g SDS 4 ml β-Mercaptoethanol 2 ml Glycerol 2 ml 1M Tris pH 7 4 mg Bromo phenol blue 2 ml ddH ₂ O |
| Transfer-Puffer (Western Blot) | 15.125 g Tris 72.05 g Glycine 1 l Methanol Mit destilliertem H ₂ O auf 5 l auffüllen |

2.5 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Tabelle 4: Verwendete Geräte und sonstige Hilfsmittel

| Produkt | Bezugsquelle |
|---|---------------------------------------|
| Kühlzentrifuge Multifuge X1R | Thermo Scientific |
| Blot Papier | GE healthcare |
| Chemidoc XRS-System | Bio-Rad |
| Deckgläser | Roth |
| Dosierpipetten | Eppendorf |
| Externes Netzteil/elektronisches Vorschaltgerät EPS 301 | Amersham Biosciences |
| Filter Sterilisation | Millipore |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M Fluoreszenzkamera AxioCam MRm | Carl Zeiss |
| Konfokales Mikroskop | Nikon A1R LSCM |
| Magnetrührer | Neolab |
| Mikrotom/Kryostat, Cryo-Star HM560MV SW40 rotor | Microm Int. GmbH, Walldorf Beckman |
| Nagellack | Drogeriemarkt |
| Objektträger | R. Langenbrick |
| pH-Meter | Inolab |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Ratiolab |

| | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Präzisionswaage | Sartorius |
| Nitrozellulose | GE healthcare |
| Rotator | Edmund Bühler |
| Thermoschüttler | Behr |
| Thermomixer | Eppendorf |
| SDS-PAGE-Elektrophorese-Gerät | Amersham Biosciences |
| Ultrazentrifuge | Beckmann |
| Vortexmischer | VWR International |
| Western Blot Transfer - Apparat | HOEFER Scientific Instruments |
| Ultra-Turrax | IKA RW16 Basic |

2.6 Immunfluoreszenz

Um bestimmte Strukturen in der Zelle sichtbar zu machen, bedient man sich der Methode der indirekten Immunfluoreszenz. An das Epitop der Zielstruktur bindet ein spezifischer Erstantikörper, dessen Fc-Teil (*»crystallisable fragment«*) wiederum von einem Zweitantikörper markiert wird (Abbildung 9). Dieser emittiert nach Anregung durch das Fluoreszenzlicht ein Licht bestimmter Wellenlänge. So emittiert beispielsweise Alexa 488 grünes Licht mit einem Emissionsmaximum um 519 nm.

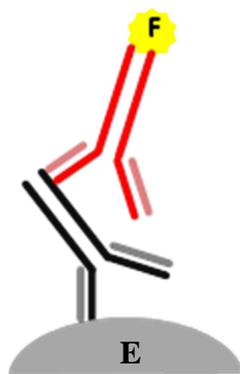


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise der indirekten Immunfluoreszenz. Das Epitop (E) eines Antigens wird von dem in schwarz dargestellten Primärantikörper gebunden. An dessen Fc-Teil bindet der in rot gekennzeichnete und mit einem Fluorophor (F) konjugierte Zweitantikörper.

Für die Immunfluoreszenzfärbung mussten die transfizierten Zellen zunächst fixiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe von 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei Raumtemperatur sowie vorherigem und nachfolgendem dreimaligem Waschen mit 1xPBS.

Im Anschluss daran wurden die Zellen in einer Lösung von 0,1 % Triton X-100 in 1xPBS für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Dies diente der Permeabilisierung der Zellen, also der Öffnung der Zellmembran, sodass der Antikörper Zugang zu seinem Ziel-Antigen hat. Nach

Entfernen dieses Puffers wird ein Blocking-Puffer (0,5 % BSA + 0,1 % Triton X-100 in 1xPBS) hinzugefügt. Dies ist ein Puffer zum Verhindern von unspezifischen Bindungen des Antikörpers. Er wirkte bei Raumtemperatur für 45 min ein. Das Deckglas wurde durch Abkippen von dem Puffer befreit und an Unterseite und Rand getrocknet. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl des Primärantikörpers, der in verschiedenen Verhältnissen in dem Blocking-Puffer verdünnt war. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Danach wurden die Deckgläser je dreimal für 10 min mit 1xPBS gewaschen. Nach Hinzufügen des ebenfalls in Blocking-Puffer verdünnten Zweitantikörpers wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Deckgläschen auf der zellbedeckten Seite mit je 20 µl NPG (1,5 % n-Propyl-gallat mit 60 % Glycerol in PBS) auf dem Objektträger angebracht. NPG ist schwer löslich und muss daher vor Verwenden erwärmt werden. Es vermindert das Ausbleichen der Präparate (Giloh und Sedat 1982).

In dieser Form konnten die Präparate nun unter dem inversen Axiovert200M Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Mikroskop) analysiert werden. Das Fluoreszenzmikroskop war mit den das mit einer entsprechenden Filterblöcken ausgestattet. Außerdem kam das konfokale Zwei-Photonen-Mikroskop A1R (Nikon) (in der 1-Photonen-Anregung) zum Einsatz.

2.7 Preembedding Immunogoldelektronenmikroskopie

Die Preembedding Immunogoldelektronenmikroskopie wurde exakt so durchgeführt wie in Schmitz et al. (1996) beschrieben und vom Labor zur Verfügung gestellt.

2.8 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein biochemisches Verfahren zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure in einem selektiven Bereich.

Das Prinzip besteht in einer wiederkehrenden Abfolge von drei Schritten: Denaturierung der DNS, Hybridisierung der Primer und Abschreiben des gewünschten Genomabschnittes.

Benötigt werden eine thermostabile Polymerase, Ausgangs-DNS mit der interessierenden Sequenz, zwei zur jeweiligen Startsequenz komplementäre Primer, Nukleotide zur Synthese

der neuen DNS-Stränge und eine geeignete Pufferlösung, die optimale Arbeitsbedingungen für die Polymerase herstellt.

Zunächst wurde die DNS im Thermocycler (PCR-Block) auf 94 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur denaturierte die DNS und trennte sich in die beiden Einzelstränge auf. Nun konnten sich im zweiten Schritt die Primer, synthetisch hergestellte Oligonukleotide, anlagern, die den zu vervielfältigenden DNS-Abschnitt eingrenzten. Hierzu musste die Temperatur auf ungefähr 54 °C gesenkt werden. Die ideale Höhe dieses Wertes hängt von der Zusammensetzung des Primers ab und lässt sich anhand der Art und Anzahl seiner Nukleotide berechnen. Im nun folgenden dritten Schritt fand die eigentliche Kettenverlängerung statt. Nachdem das Gemisch auf 72 °C geheizt war, war die optimale Temperatur für die Arbeit der Red Taq-Polymerase erreicht. Es handelt sich bei diesem Enzym um eine Polymerase aus einem speziellen Bakterium (**Thermus aquaticus**), das unter diesen thermischen Bedingungen lebensfähig ist. Die Polymerase verlängerte nun mit Hilfe der freien Nukleotide die Primer-Oligonukleotide und bildete so an dieser Stelle den zur Ausgangs-DNS komplementären Strang. Pro Zyklus verdoppelte sich folglich die DNS-Menge – bei n Zyklen ergab sich eine Gesamtanzahl von 2ⁿ DNS-Strängen. Insgesamt wurde dieser Prozess 40 Mal durchlaufen, sodass aus einer geringen DNS-Menge eine bedeutende Anzahl von Kopien eines bestimmten Genabschnittes entstand.

Tabelle 5: Reaktionsprotokoll der Polymerasekettenreaktion

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| 94 °C: 3 min | initiale Denaturierung |
| 40 Zyklen: | |
| 94 °C: 30 s | Denaturierung |
| 54 °C: 30 s | Primerhybridisierung (Annealing) |
| 72 °C: 1.45 min | Extension |
| 72 °C: 7 min | finale Extension |
| → 4 °C | |

Die cDNS von RIBEYE(A) wurde zur Vereinfachung der Polymerasekettenreaktion aufgrund seiner Größe in drei kleineren Abschnitten vervielfältigt und später zusammengesetzt. Hierzu wurden folgende Restriktionsstellen und die dazu passenden Primer ausgewählt:

Tabelle 6: Primer-Sequenzen (5'→ 3'). Fett gedruckt: Restriktionsstellen und ihre zugehörigen Enzyme.

| Insert | Name | Primer-Sequenz (5' → 3') | Herkunft |
|----------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Insert 1 | Xho1 forward | TTTTCTCGAGCCACCATGCCGGTCCAGCAG | Eurofins MWG Operon |
| | Age1 reverse | CAGGTGACCGGTGTCCTGCA | Biomed GmbH |
| Insert 2 | Age1 forward | TGCAGGACACCGGTCACCTG | Biomed GmbH |
| | Nhe1 reverse | ACCCGCTAGCCAGGCGGCT | Biomed GmbH |
| Insert 3 | Nhe1 forward | AGCCGCCTGGCTAGCGGGT | Biomed GmbH |
| | BamH1 reverse | TATGGATCCCCACTTGGTCCGGGGCCAGCA | Eurofins MWG Operon |

2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Größenordnung verschiedener geladener Substanzen. Sie ist einerseits geeignet zur Isolierung und Gewinnung der vervielfältigten cDNS aus einer Polymerasekettenreaktion und dient andererseits auch als ergänzende Methode zur Sequenzierung, um den Erfolg der PCR zu kontrollieren.

Als Trägermatrix wurde Agarose, ein Polysaccharid, benutzt, das unter Aufkochen polymerisiert und so ein Netz bildet. Je nach verwendeter Agarosemenge sind die Poren unterschiedlich groß. Dabei gilt: Je höher die Konzentration an Agarose im Gel, desto kleiner sind die gebildeten Poren. Für DNS mit geringer Anzahl an Basenpaaren eignet sich ein hochprozentiges Agarosegel und umgekehrt.

Zur Herstellung eines Geles mit einem 1%igen Gehalt an Agarose wurden 100 ml 1xAE (Tris-Acetat + EDTA) mit 1 g Agarose zum Kochen gebracht, bis sich die Agarose aufgelöst hatte. Anschließend wurden 5 µl ETBR (1 % Ethydiumbromid) hinzugefügt und gemischt. Diese so angefertigte Gelmischung wurde nun in spezielle Träger gegossen. Um später das auspolymerisierte Gel beladen zu können, wurde ein Kamm in die noch flüssige Gelmasse gesteckt. Nach 15-20 min war das Gel ausgekühlt und konnte mit Proben beladen werden. Dazu wurde der Kamm aus der nun polymerisierten Gelmatrix gezogen und hinterließ tiefe Abdrücke in selbiger (Taschen).

Die DNS wurde in diese Taschen des Gels gefüllt. Da sich das Gel in einem leitenden Puffer befand, wurde durch Anlegen einer Spannung die Wanderung der DNS-Moleküle in Richtung der Anode hervorgerufen. Das im Gel befindliche Ethydiumbromid interkalierte in die Nukleinsäuren und ermöglichte durch seine Fluoreszenz unter UV-Licht eine Sichtbarmachung der einzelnen DNS-Banden. Im Vergleich mit einem ebenfalls auf das Gel geladenen Marker (DNS Leiter-Mix), der aus DNS-Stücken bekannter Größe besteht, ließ sich eine Aussage über die Größe der auf das Gel geladenen DNS treffen. So konnte kontrolliert werden, ob aus der PCR hinsichtlich dieses Kriteriums das gewünschte Produkt hervorgegangen ist.

Außerdem war es nun möglich, die vervielfältigte DNS zu isolieren. Dazu wurde unter UV-Licht die betroffene Bande aus dem Gel herausgeschnitten.

2.9.1 Gelextraktion (Eluieren der Banden)

Um die DNS wieder aus dem Gel herauszulösen, wurden die entsprechenden Gelstücke ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß eingebracht. Zur DNS-Gewinnung aus dem Gel wurde der QIAquick® Gel Extraction Kit verwendet. Zusammen mit 600 µl Puffer QG wurden die Gelstücke bei 50 °C für 5–10 min im Thermoschüttler inkubiert und durchmischt. Anschließend wurde das nun gelöste Gel in eine Anionenaustauscher-Säule gegeben, deren Silikonkugeln während einer Zentrifugation mit 13.000 rpm die DNS banden. Der Puffer wurde verworfen und nach Zugabe von 750 µl Puffer PE wurde die Säule erneut zentrifugiert. Dies diente der Reinigung der gebundenen DNS von eventuell vorhandenen Salzen. Nach zweimaliger Zentrifugation mit 13.000 rpm wurde die Säule auf einem neuen Reaktionsgefäß angebracht und 50 µl Puffer EB zugegeben. Es handelt sich dabei um einen Puffer aus Trishydroxymethylaminomethan (Tris), der mit Salzsäure (HCl) versetzt wurde. Diese Tris-Cl Lösung wurde für 1 min belassen und anschließend für 1 min zentrifugiert.

2.10 Photometrische Messung der DNS-Konzentration

Die Konzentration der DNS wurde photometrisch festgestellt. Eine im Verhältnis 1:50 verdünnte DNS-Probe (2 µl DNS-Lösung + 98 µl H₂O Millipore) wurde in eine Quarzküvette gefüllt und im Photometer mit UV-Licht bestrahlt. DNS absorbiert diese Strahlung vornehmlich bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch den Vergleich der Stärke dieser

Absorption mit der von reinem H₂O Millipore als Leerwert ließ sich die DNS-Konzentration berechnen.

2.11 Sequenzierung der DNS

Um die Korrektheit der vervielfältigten DNS zu überprüfen, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine DNS-Probe der automatischen Sequenzierung zugeführt. Im Labor der Firma Eurofins MWG Operon wurde die Basenabfolge der eingesendeten DNS nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al. 1977) bestimmt. Diese konnte nachfolgend mit der in einer Datenbank erhältlichen cDNS verglichen werden und somit hinsichtlich der Fehlerfreiheit überprüft werden.

Die Sequenzierung der klonierten RIBEYE(A)-Domäne zeigte, dass die komplette Klonierung fehlerfrei gelungen war (siehe Elektropherogramme im Anhang).

2.12 Transformation der amplifizierten DNS

Um die gewonnene DNS weiter zu amplifizieren, wurde die Arbeit kompetenter Bakterien in Anspruch genommen, deren Membran durch verschiedene Verfahren durchlässig für freie DNS gemacht wurde. In dieser Arbeit wurden chemisch kompetente DH10B-Bakterien der Firma ThermoFisher Scientific verwendet.

Vorbereitung:

Die drei Genstücke waren durch die RedTaq-Polymerase für das Einbringen in den ersten Vektor (pJet1.2/blunt) derart beschaffen, dass sie so mittels einer Ligase aneinandergesetzt werden konnten. Für die anschließende zweite Transformation wurde die DNS von Restriktionsenzymen derart geschnitten, dass überhängende Enden (»sticky ends« für engl. klebrige Enden) entstanden. Ein Restriktionsenzym ist eine aus Bakterien isolierte Restriktionsendonuklease vom Typ II, die in der Lage ist, einen Polynukleotid-Strang an einer für jedes Enzym spezifischen Erkennungssequenz zu schneiden. Die Basen dieser Sequenz sind spiegelbildlich angeordnet, sodass das Ende eines DNS-Abschnitts dann jeweils komplementär zu dem Beginn des nächsten ist (Palindrom).

Die Restriktionsstellen wurden entsprechend der zuvor eingesetzten Primer gewählt.

Tabelle 7: Verwendete Restriktionsenzyme und die Länge des resultierenden DNS-Abschnittes.

| DNS-Sequenz | Restriktionsenzyme | Länge | |
|-------------------------------|---------------------------|--------------|----------|
| Insert 1 (Vorderes Fragment) | XhoI, AgeI | 473 bp | 1,684 kb |
| Insert 2 (Mittleres Fragment) | AgeI, NheI | 558 bp | |
| Insert 3 (Hinteres Fragment) | NheI, BamHI | 653 bp | |
| pmCherry-N1-Vektor | XhoI, BamHI | | |

Die derart durch die in Tabelle 7 aufgeführten Restriktionsenzyme geschnittenen Enden konnten durch die T4-Ligase mit den jeweils komplementären, durch das gleiche Enzym bearbeiteten Folgestücken verbunden werden um nachfolgend über die Schnittstellen von XhoI und BamHI in einen zweiten Vektor (pmCherry-N1) integriert zu werden. Dieser machte es im Gegensatz zum ersten Vektor pJet1.2/blunt erforderlich, dass die Enden überhängende Basenpaare besaßen. Er codierte für ein fluoreszierendes Protein, mCherry, das später in der Zellkultur zusammen mit dem Gen exprimiert wurde und als Marker für die Lokalisation von Ribeye(A) unter dem Mikroskop diente. Außerdem befand sich in beiden Plasmiden ein Antibiotikaresistenzgen. Dies war wichtig, um das Anwachsen von nicht transformierten Bakterien zu verhindern.

Zum Herstellen des Ligase-Ansatzes mischte man 10 µl des aufgereinigten PCR-Produktes mit 1 µl Vektor und 2 µl T4 Ligase-Puffer. Vervollständigt wurde der Ansatz durch Zugabe von 6 µl H₂O und 1 µl der T4 DNS-Ligase. Dieses Enzym sorgte in den folgenden 2–3 h bei Raumtemperatur für eine Verknüpfung des Plasmids mit der zu vervielfältigen DNS.

Das fertige Konstrukt wurde nun über eine Transformation in die Bakterienzellen eingeschleust. Dazu versetzte man den Ligationsansatz mit 100 µl kompetenter Bakterien. Nachdem diese Mischung nun 30 min auf Eis, danach für 5 min bei 37 °C und abschließend wieder 10 min auf Eis inkubiert worden war, gab ich 300 µl Nährmedium (LB-Medium) hinzu. Der Begriff LB-Medium stammt vom englischen »Lysogeny Broth«, was übersetzt so viel wie »Lysogenie-Brühe« heißt. Es steht also für eine Nährflüssigkeit, in dem sich Zellen (Bakterien) vermehren, die fremde DNS exprimieren. Seine heute noch gebräuchliche Zusammensetzung wurde von Giuseppe Bertani entwickelt und beschrieben (Bertani 1951; Bertani 2004). In diesem Medium wurden die Bakterien für 30 min bei 37 °C belassen und dabei geschüttelt. Nachfolgend wurde der Ansatz auf einer mit Antibiotika beschichteten Agar-Platte vorsichtig ausplattiert, das heißt, mit einem Spatel auf der dem Nährmedium

verteilt, und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich dabei nach der Plasmid-Codierung. Der Vektor pJet1.2/blunt codierte für eine Ampicillin-Resistenz, im Falle des pmCherry-N1-Vektors handelte es sich um Kanamycin.

Neben der Elimination von nicht transformierten Bakterien durch deren fehlende Antibiotikaresistenz wurde die Transformation noch durch eine weitere Methode kontrolliert. Sie diente der Sichtbarmachung von Bakterien, die ein Plasmid ohne eingefügte DNA-Sequenz (Insert) enthalten, und funktionierte folgendermaßen: Die Platten waren zusätzlich mit einer Substanz, X-Gal, versehen. X-Gal ist ein Analogon von Lactose mit einem Indolrest und kann von der auf dem Vektor im *lacZ*-Gen codierten β -Galactosidase gespalten werden, wodurch zu einer blauen Farbreaktion kommt. Ein Insert im Vektor verhindert die Expression des Enzyms. Allein die untransformierten Vektoren waren daher zur Blaufärbung der Kolonien fähig und konnten identifiziert werden.

Zum Anzichten dieser erfolgreich transformierten Bakterien wurden LB-Medium und ein je nach Plasmid ausgewähltes Antibiotikum in einem Kolben im Verhältnis 1:1000 gemischt. In je 2 ml dieses Ansatzes wurde eine einzelne, erfolgreich transformierte weiße Kolonie suspendiert und über Nacht bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Eine regelmäßig sichtbare Trübung zeugte vom Wachstum der Bakterien.

2.13 Restriktionsverdau und Triple-Ligation

Die DNS-Stücke wurden aus ihren Vektoren geschnitten und anschließend zu dem interessierenden DNS-Abschnitt (RIBEYE(A)) zusammengefügt.

Dazu wurden zu je 3 μ g DNS, 5 μ l 10x BSA, 5 μ l Restriktionspuffer (NE Puffer) und je 1,5 μ l der jeweiligen zwei zu den Schnittstellen passenden Restriktionsenzyme gegeben. Der Ansatz wurde mit dH₂O auf 50 μ l aufgefüllt und bei 37 °C für 2,5 h inkubiert.

Hierzu fanden die in Tabelle 7 aufgeführten Restriktionsenzyme Verwendung.

Das Zusammenfügen der einzelnen Teile erfolgte in einer Triple-Ligation. Die drei restriktiv geschnittenen Fragmente der RIBEYE(A)-Domäne wurden zusammen mit dem ebenfalls restriktiv geschnittenen Plasmid pmCherry-N1 in einem Ansatz ligiert. Zu 2 μ l Puffer und 3 μ l H₂O wurden je 12 μ g eines Inserts zusammen mit 1 μ l des später für die Sichtbarmachung des exprimierten Proteins wichtigen mCherry-Vektors gemischt. Zum Schluss wurde 1 μ l T4-Ligase hinzugefügt, die die Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen den einzelnen DNS-Strängen katalysierte. Dieses Gemisch wurde für

2,5 h bei Raumtemperatur inkubiert um anschließend in einer erneuten Transformation durch DH10B-Bakterien vermehrt zu werden.

Von diesem Endprodukt erfolgten anschließend wiederum die photometrische Konzentrationsmessung und die Durchführung von Plasmidpräparationen.

2.14 Plasmidpräparation

Die nächsten Schritte dienen der Vermehrung der Plasmid-DNS. Hierzu stehen die Minipräparation und zur Generierung einer größeren Menge an Plasmid-DNS die Midipräparation zur Verfügung. Diese wurden nach dem QIAGEN Protokoll mit dem jeweiligen QIAGEN® Plasmid Mini bzw. Midi Kit durchgeführt.

2.14.1 Minipräparation

Die flüssige Bakterienkultur wurde bis zum Entstehen eines Pellets maximal zentrifugiert, der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 250 µl Puffer P1 vollständig gelöst und zur basischen Zelllyse mit 250 µl Buffer P2 versetzt. Mit Hilfe von 350 µl Puffer N3, der aus Guanidinhydrochlorid und Kaliumacetat besteht, wurde das basische Gemisch wieder reneutralisiert, was der Plasmid-DNS eine Renaturalisierung ermöglichte. Die Lipide der lysierten Membranen banden an das im Puffer P2 enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS). Durch das Kaliumacetat präzipitierte das SDS und es bildete sich bei mehrmaligem Drehen des Gefäßes ein sichtbarer Niederschlag. Nach der 20-minütigen Zentrifugation mit 13.000 rpm bei 4 °C wurde der DNS-haltige Überstand in eine Anionenaustauscher-Säule gegeben und für 30 – 60 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Eine weitere Reinigung erfolgte mit 0,75 ml Puffer PE. Die Säule wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben und die gebundene DNS mit 50 µl Buffer EB (Tris-Cl) gelöst.

Anschließend wurde ein Teil der gewonnenen DNS gemäß des in Kapitel 2.13 angegebenen Prozederes an ihren Restriktionsstellen verdaut um den Erfolg der Transformation mittels Gelelektrophorese und nachfolgender Sequenzierung des Plasmids zu bestätigen.

2.14.2 Midipräparation

Um nach der Kontrolle der cDNS durch Gelelektrophorese und Sequenzierung größere Mengen zu kultivieren, wurde eine sogenannte Midipräparation vorgenommen.

Das Vorgehen erfolgte analog dem der Minipräparation mit dem QUIAGEN Plasmid Kit. Allerdings wurden andere Mengen verwendet.

In einem autoklavierten 250 ml Kolben wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µl Kanamycin vermischt und darin eine Bakterienkolonie suspendiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht unter permanentem Schütteln bei 200 rpm und 37 °C. Anschließend wurde die flüssige Bakterienkultur in ein 50 ml Röhrchen gegeben und bei 4500 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurden in 4 ml Puffer P1 aufgelöst. Hierzu wurden 4 ml Puffer P2 gegeben und nach vorsichtigem Schwenken des Röhrchens für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden dem Gemisch 4 ml Puffer P3 hinzugegeben und durch Schwenken vermischt. Nach der Zentrifugation bei 4700 rpm für 30 min wurde der Überstand in eine Anionenaustauscher-Säule auf einem autoklavierten 100 ml Kolben gefüllt und mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert. Der Überstand aus der Zentrifugation wurde nun auf die Säule gegeben und zweimal mit je 10 ml Puffer QC gewaschen. Nun wurde die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gebracht und die an das Säulenmaterial gebundene DNS mit 1,2 ml Puffer QF eluiert. Dieser Vorgang wurde mit zwei weiteren Eppendorf-Reaktionsgefäßen wiederholt. Die meiste DNS befand sich nun in Gefäß 2. Diese Lösung wurde anschließend zum Ausfällen der Plasmid-DNS mit 750 µl Isopropanol gemischt und bei 13.000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet aus Plasmid-DNS wurde mit 1 ml Ethanol 70 % gewaschen und bei 13.000 rpm und RT für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfung des Ethanols wurde das Pellet über Kopf bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend wurden insgesamt 100 µl Puffer EB (Tris-Cl) auf die drei Reaktionsgefäße verteilt und deren Konzentration photometrisch bestimmt.

2.15 Aufreinigung der DNS

Um eine höhere Reinheit der DNS-Lösung und damit eine effektivere Transfektion zu erzielen, wurde die DNS-Lösung mittels des QIAquick® Purification Kits weitestgehend von störenden Substanzen befreit. Dazu mischte man in einem Eppendorfgefäß 100µl der zu reinigenden DNS mit 500 µl Binde-Puffer (PB), bis sich eine homogene Lösung bildete.

Dieser Ansatz wurde in eine Anionenaustauscher-Säule gegeben und anschließend 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt diente der Bindung der DNS-Moleküle an das sich in der Säule befindliche Silikat. Der sich im Säulenreservoir befindliche Überstand wurde verworfen. Anschließend folgte das zweimalige Waschen mit je 500 µl Ethanolhaltigem Puffer PE. Die Säule wurde jeweils für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Puffer anschließend verworfen. Da die DNS-Lösung für eine nachfolgende Transfektion Ethanolfrei sein musste, wurde die Säule nach dem zweiten Waschen erneut für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend für 10 min über Kopf bei Raumtemperatur getrocknet. Nun erfolgte die Lösung der gebundenen DNS. Dazu wurde die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt. Nach Zugabe von 50 µl 5mM Tris-Cl pH 8,5 und einer Einwirkzeit von 2 min wurde die Säule ein letztes Mal für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der DNS-Konzentration (s. o.)

2.16 Zellkultur und Transfektion

Protein-Expression in HEK293-Zellen

An Tag 1 wurden die HEK293-Zellen in Petrischalen (für Transfektionen) mit bzw. (für Western-Blot-Analysen) ohne gelatinierte Deckgläschen ausgesät und in je 10 ml DMEM-Medium + 10 % FCS inkubiert. Durch den Gelatine-Überzug der Deckgläschen hafteten die Zellen besser auf der Glasoberfläche.

An Tag 2 erfolgte die Transfektion der Zellen. Pro Petrischale wurden zwei 15 ml-Falcons benötigt. In Falcon 1 wurden umgerechnet circa 500 ng DNS mit dH₂O verdünnt, sodass sich ein Endvolumen von 1000 µl ergab. Zu dieser Verdünnung wurden tropfenweise und unter ständigem Schütteln 100 µl Ca₃(PO₄)₂ hinzugefügt. Dies führte durch Bindung der DNS an Calciumphosphat zur Ausfällung von kleinen DNS-Kristallen, die später von der Zelle endozytiert werden konnten.

In Falcon 2 wurden 1100 µl 2xHBSS-Puffer gefüllt. Tropfenweise und unter ständiger Luftblasenerzeugung wurde nun der DNS-Calciumphosphat-Mix zu dem Puffer gegeben.

Das Medium wurde mit 110 µl Chloroquin 2,5 M versetzt. Im Endvolumen von 2,2 ml war Chloroquin somit in einer Konzentration von ca. 140 mM vorhanden. Chloroquin sorgte für eine weniger schnelle pH-Absenkung in den die phagozytierte DNS enthaltenen Endosomen

bzw. Lysosomen der HEK293-Zellen und somit für einen verminderten Abbau durch saure Hydrolasen (Ichtchenko et al. 1995, Luthman et al. 1983).

Die transfizierten Zellen wurden nach 24 bis 72 h analysiert.

Nach der ersten Beurteilung des Transfektionserfolges mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen und mit 4 %PFA bei Raumtemperatur für 15 min fixiert.

Anschließend wurde das jeweilige Deckglas an Unterseite und Rand getrocknet und möglichst ohne Luftblasen mit 20 µl NPG auf einem Objektträger angebracht. Nach 15 min wurden die Deckgläser mit Nagellack versiegelt, um ein Austrocknen des Einbettmediums zu verhindern.

2.17 SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse

Probenvorbereitung

Die Zellen wurden nach erfolgreicher Transfektion mittels eines Zellschabers geerntet. Nach mehrmaligem Zentrifugierung und Zugabe von PBS zur Auswaschung des im Medium enthaltenen FCS (fötales Kälberserum), wurde das Pellet mittels 100 µl eines Lysepuffers lysiert. Dieser Lysepuffer enthält 40 ml deionisiertes H₂O, 5 ml 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,438 g NaCl, 0,019 g EDTA und 5 ml 1 % Triton X-100. Letzteres wurde 10 min nach Rühren zugegeben. Nach Zugabe dieses Puffers wurde der Ansatz in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 20 min bei 4 °C gedreht.

SDS-PAGE

Die dem Western Blot vorausgehende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. »sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis«) diente der Auftrennung des Proteingemischs nach der Größe. Das Polyacrylamid-Gel wurde entsprechend der in Tabelle 3 beschriebenen Zusammensetzung angefertigt.

Der Probenpuffer verlieh den Proteinen wichtige Eigenschaften. Durch die Bindung der Proteine an stark negativ geladenes Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde ihre Eigenladung überlagert, sodass bei der Auftrennung nunmehr nur noch ihre Masse eine Rolle spielte. Das ebenfalls im Puffer enthaltende Mercaptoethanol sorgte für die Aufhebung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Zusätzlich wurden die Proteine durch Aufkochen im Thermoschüttler

denaturiert. Dazu wurden je 20 µl des Zell-Lysates zusammen mit je 10 µl SDS-Puffer für 15 min bei 95 °C erhitzt.

Das Gel bestand aus zwei Phasen. Das Gemisch wurde zunächst in die Vertiefungen des Sammelgels – der oberen Phase – pipettiert, um nach Anlegung der Spannung in die untere Phase zu diffundieren, wo das Gel seine Siebwirkung entfaltete. Nachdem die Proteine das Sammelgel verlassen hatten (1 h bei 90 V), wurde die angelegte Spannung auf 120 V erhöht. Hierbei wirkte das im Trenngel enthaltene Acrylamid wie ein Gitter, das die kleineren Proteine schneller passieren ließ.

Parallel wurde ein Marker mit einem standardisierten Gemisch von Proteinen unterschiedlicher Masse mitlaufen gelassen, der Roti®-Mark STANDARD.

Western Blot

Nach erfolgter Sortierung der Proteine durch die vorausgegangene SDS-PAGE wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde ein zu Gel und Membran senkrecht eingestelltes elektrisches Feld angelegt wobei die Membran sich auf der Seite der Anode befand. Das Gel wurde so in dem Transfer-Puffer, deren Zusammensetzung in Tabelle 3 ersichtlich ist, bei 50 V und 4 °C für 5 h inkubiert. Die Proteine übertrugen sich auf die Nitrocellulose-Membran und wurden auf dieser immobilisiert.

Zunächst wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Der Überschuss wurde mit dH₂O gespült. Dies diente der Sichtbarmachung aller sich auf der Membran befindlichen Proteine und damit der Erfolgskontrolle des Transfers. Zudem konnte so die Lage der Markerbanden bestimmt und festgehalten werden, sodass die Proteine später anhand ihrer Größe in Bezug zur Markerbande identifizierbar waren. Das Färbemittel (Ponceau S) wurde anschließend mit PBS für 1 h ausgewaschen.

Damit verhindert werden konnte, dass die Antikörper unspezifisch an die Membran binden, mussten die noch freien Bindungsstellen blockiert werden. Hierzu wurde die Nitrocellulose-Membran bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch eingelegt. Die darin enthaltenen Proteine blockieren unspezifische Proteinbindungsstellen.

Nun wurde ein in 5 % Magermilch verdünnter Primärantikörper über Nacht bei 4 °C und unter ständiger Durchmischung zusammen mit der Membran inkubiert.

Nachdem ungebundene Antikörper dreimal für je 10 min mit PBS ausgewaschen worden waren, wurde ein ebenfalls in 5 % Magermilch verdünnter Sekundärantikörper hinzugegeben, der den vorhandenen Primärantikörper detektiert. Dieser wurde bei Raumtemperatur für 1,5 h

unter ständigem Schütteln auf der Membran belassen. Er band an den Primärantikörper und war nach Zugabe der entsprechenden Substrate zu einer Licht-Reaktion fähig, die detektiert werden und eine Aussage über die Lokalisation der gesuchten Proteine und damit ihrer Größe geben konnte. Die Nitrocellulose-Membran dazu wurde erneut dreimal für je 10 min mit PBS gewaschen und nachfolgend mit den Chemieillumineszenz-Reagenzien ECL 1 und ECL 2 (siehe Tabelle 3) im Verhältnis 1:1 inkubiert. Die Signale konnten mit dem BIO RAD GelDoc Gerät analysiert werden.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktivität des Aktin-Antikörpers Anti-Aktin clone C4 von MP Biomedicals mit den Synaptic Ribbons untersucht. Dieser Antikörper zeigt eine spezifische Reaktion mit den Synaptic Ribbons (siehe unten). Diese spezifische Reaktion zeigen andere Aktin-Antikörper nicht (Schmitz et al. 1993; unveröffentlichte Ergebnisse der AG Schmitz). Daher erschien es möglich, dass der Antikörper Anti-AktinC4 möglicherweise mit einem anderen Protein als Aktin kreuz-reagiert.

3.1 Epifluoreszenzmikroskopie mit Anti-AktinC4 in der bovinen Retina

Um das Fluoreszenzverhalten des Anti-AktinC4 Antikörpers an der Retina zu untersuchen, wurden Kryostatschnitte der Netzhaut von Mäusen und Rindern mit Anti-AktinC4 Antikörper als Primär- und mit Alexa Fluor 488 chicken-anti-mouse (CAM) als Sekundärantikörper eingefärbt.

Für die in den Abbildungen 10 und 11 dargestellten Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden Kontroll-Inkubationen angefertigt, indem das Schnittpräparat statt des Primärantikörpers mit PBS inkubiert wurde. Der Sekundärantikörper wurde in der Verdünnung wie in den Vergleichspräparaten zugegeben. Hier ließen sich keine, in der Fluoreszenz sichtbaren Signalanreicherungen erkennen, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass der Sekundärantikörper keine unspezifischen Antigenbindungen eingeht.

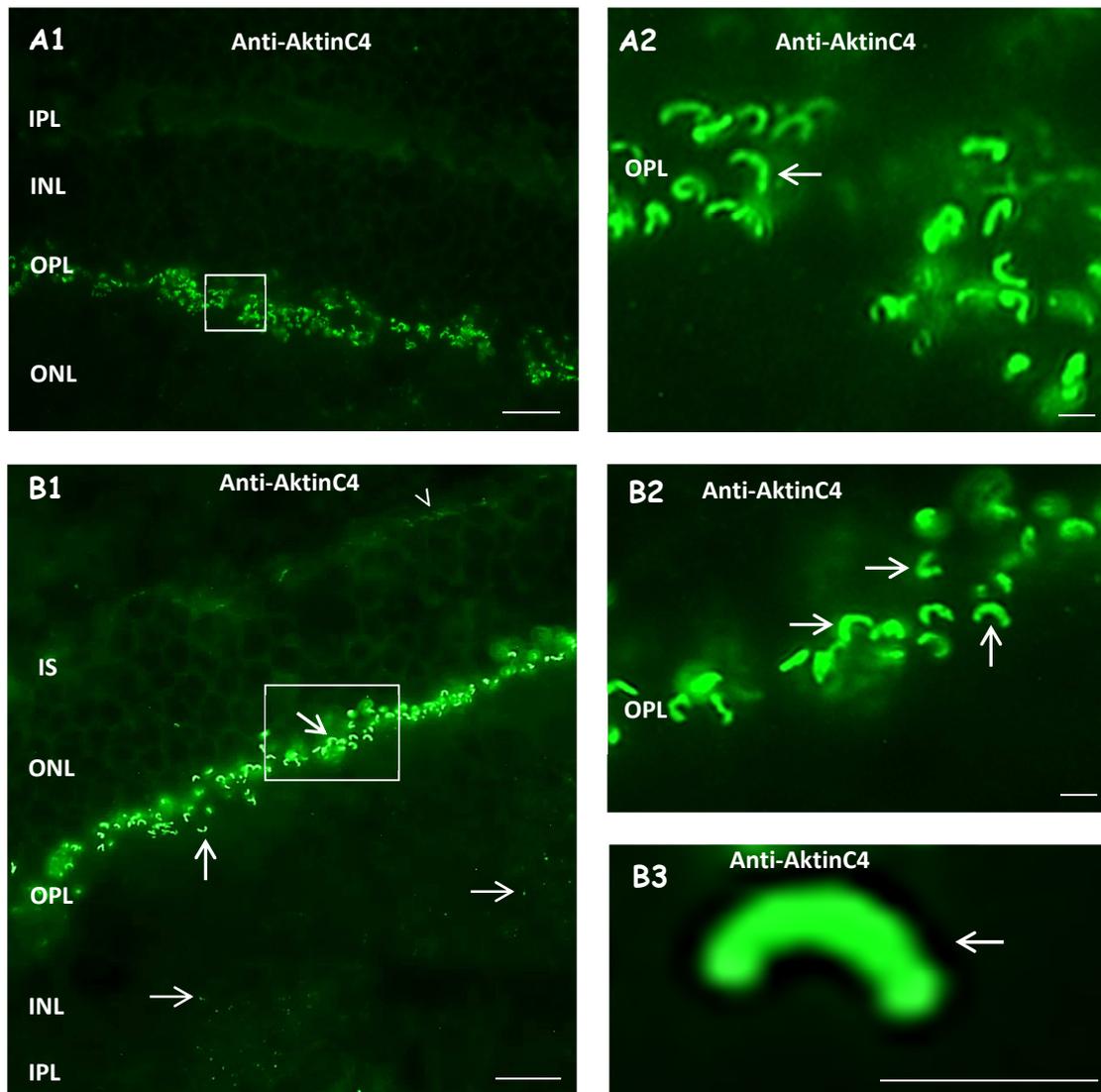


Abbildung 10: Expressionsmuster von Synaptischen Ribbons in der bovinen Retina mit Anti-AktinC4 & Alexa 488 chicken anti mouse (CAM), (A1, B1) bogenförmige Synaptic Ribbons sichtbar im Stratum plexiforme externum (»outer plexiform layer«, OPL) und punktförmige im Stratum plexiforme internum (IPL); (A2, B2, B3) sind die vergrößerten Ausschnitte der Kästchen aus (A1, B1); (B3) stellt ein einzelnes Synaptic Ribbon dar. IS = inner segments (Innensegmente der Photorezeptorzellen); ONL = outer nuclear layer (Äußere Körnerschicht); OPL = outer plexiform layer (Äußere plexiforme Schicht); INL = inner nuclear layer (Innere Körnerschicht); IPL = inner plexiform layer (Innere plexiforme Schicht). Dicker Pfeil: Synaptic Ribbon in OPL; dünner Pfeil: Synaptic Ribbon in IPL; Pfeilspitze: Aktin in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen. Skalierungsbalken: 15 μm (A1, B1), 1 μm (A2, B2, B3)

Das Anfärbungsmuster des Anti-AktinC4 Antikörpers entspricht nicht der zu erwartenden Verteilung von Aktin, sondern gleicht einer Ribbonmarkierung (Abbildung 10). Denn neben der Anfärbung von Aktin in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen in der bovinen Retina finden sich sowohl in der äußeren als auch in der inneren plexiformen Schicht Signalanreicherungen, die in Lokalisation und Aussehen Synaptic Ribbons entsprechen. In der äußeren plexiformen Schicht stellen sie sich in einer Hufeisenform dar, wie es für ihre

Seitansicht typisch ist (Abbildung 10, A2, B2, B3). Es sind im Grunde genommen nur die Ribbons markiert, während das umgebende Aktin nicht zu sehen ist. Diese Beobachtung stellt die Grundlage der folgenden Untersuchungen dar.

Zur weiteren Prüfung der Reaktivität des Anti-AktinC4 Antikörpers mit Synaptic Ribbons wurde in Schnittpräparaten der bovinen Retina eine Doppelimmunfluoreszenz mit dem Aktin- und dem Antikörper U2625 durchgeführt (Abbildung 11). U2656 ist ein Antikörper gegen RIBEYE, im speziellen gegen die RIBEYE(B)-Domäne des Kaninchens. Dieser Antikörper ist bereits gut dokumentiert (Schmitz et al. 2000) und eignet sich daher bestens als Positivkontrolle für die Markierung von RIBEYE und damit der Synaptic Ribbons.

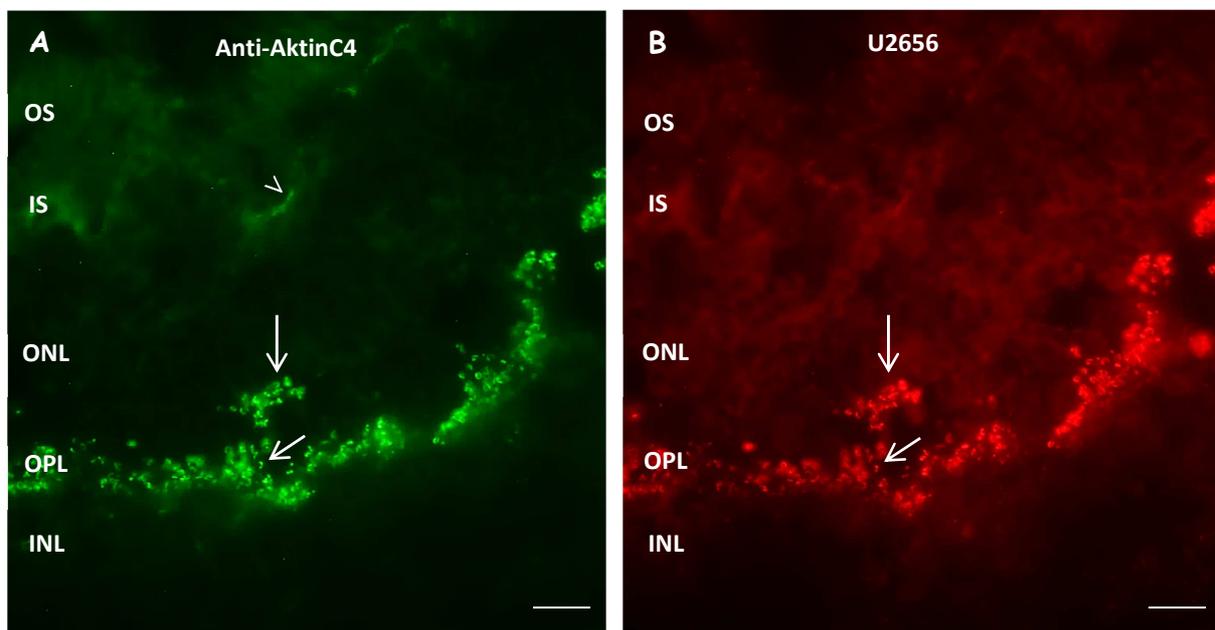


Abbildung 11: Expressionsmuster der Synaptischen Ribbons in der bovinen Retina, **A.** Anti-AktinC4 & Alexa 488 CAM (grün), **(B)** rabbit polyclonal RIBEYE antibody U2656 (rot); bogenförmige Synaptic Ribbons sichtbar im Stratum plexiforme externum (OPL). OS = outer segments (Außensegmente der Photorezeptorzellen); IS = inner segments (Innensegmente der Photorezeptorzellen); ONL = outer nuclear layer (Äußere Körnerschicht); OPL = outer plexiform layer (Äußere plexiforme Schicht); INL = inner nuclear layer (Innere Körnerschicht); IPL = inner plexiform layer (Innere plexiforme Schicht). Pfeile: Synaptic Ribbons. Skalierungsbalken: 10 μ m

Es zeigen sich in beiden Farbkanälen identische hufeisenförmige Signalanreicherungen in der äußeren plexiformen Schicht, die typisch für Synaptic Ribbons in der Photorezeptorzelle sind. Dieser Umstand lässt die Vermutung zu, dass der Anti-AktinC4 Antikörper mit einem Protein reagiert, das Bestandteil des Synaptic Ribbons ist.

3.2 Phalloidin-FITC Markierung von filamentösem Aktin in der Mäuse-Retina

Um die Verteilung von Aktin in der Retina mit den Befunden der Immunmarkierung mit Anti-AktinC4 zu vergleichen, wurde ein Kryostatschnitt der Maus-Retina mit dem an das grün fluoreszierende FITC (Fluoreszein Isothiocyanat) gekoppelten Phalloidin behandelt. Dieses ist ein Marker für filamentöses (F-) Aktin.

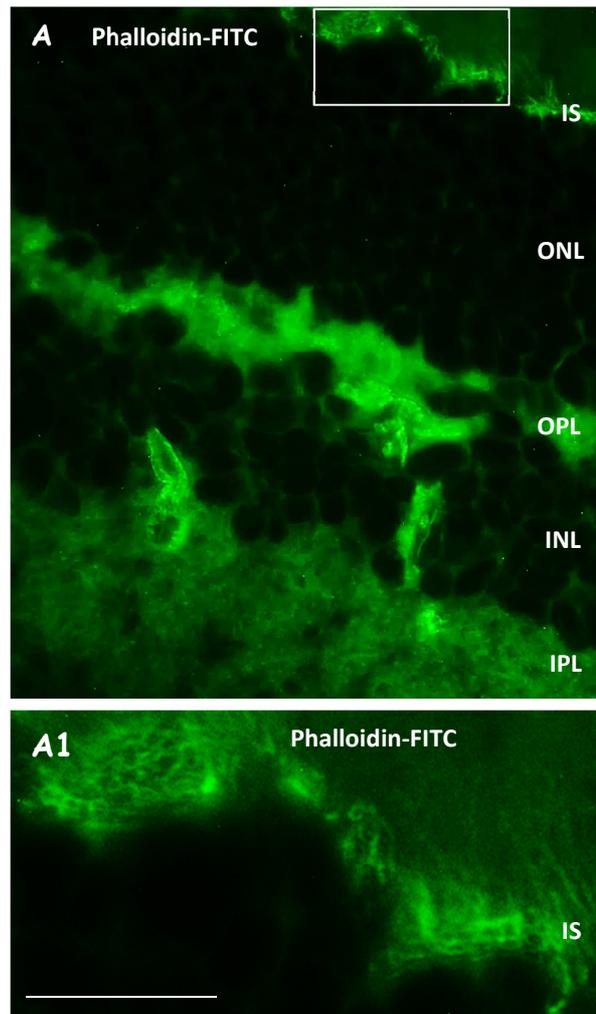


Abbildung 12: Expressionsmuster von Aktin im Kryostatschnitt der Maus-Retina, Phalloidin-FITC markiert (filamentöses) F-Aktin (grün), Aktin sichtbar in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen; A2 stellt den vergrößerten Ausschnitt des Kästchens in den Innensegmenten von A1 dar. IS = inner segments (Innensegmente der Photorezeptorzellen); ONL = outer nuclear layer (Äußere Körnerschicht); OPL = outer plexiform layer (Äußere plexiforme Schicht); INL = inner nuclear layer (Innere Körnerschicht); IPL = inner plexiform layer (Innere plexiforme Schicht). Skalierungsbalken: 10 μm .

Abbildung 12 zeigt, dass das filamentöse Aktin neben den beiden plexiformen Schichten besonders in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen zu sehen ist. Dort ist Aktin bekanntermaßen besonders stark angesiedelt (Chaitin und Bok 1986; Woodford und Blanks

1989). Mit Phalloidin-FITC zeigt sich in der äußeren plexiformen Schicht aber kein für die Synaptic Ribbons typisches, hufeisenförmiges Signal, wie es der Anti-AktinC4 Antikörper gezeigt hat (Abbildung 10).

Dieser Umstand führte zu der Frage, wie es sein kann, dass Phalloidin-FITC und der Anti-AktinC4 Antikörper unterschiedliche Markierungsmuster ergeben. Die Expression und Verteilung von Aktin in Photorezeptoren ist gut dokumentiert (Nagle et al. 1986; Schmitz und Drenckhahn 1993; Schmitz und Drenckhahn 1997). Allerdings gleicht die Markierung des Anti-AktinC4 Antikörpers nicht dem Erscheinungsbild von Aktin, sondern entspricht dem typischen Aussehen von Synaptic Ribbons.

3.3 Immunelektronenmikroskopie mit Anti-AktinC4 in der bovinen Retina

Um diese Vermutung weiter zu bestätigen, wurde eine in Preembedding-Technik durchgeführte Immunmarkierung der bovinen Photorezeptorzelle unter dem Elektronenmikroskop analysiert. Diese wurde von Univ.-Prof. Dr. med. Frank Schmitz zur Verfügung gestellt.

Das genaue Vorgehen der Preembedding-Technik entspricht demjenigen wie in Schmitz et al. (1996) beschrieben. Nach der Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen durch die Zugabe von BSA wurde das Schnittpräparat mit dem Erstantikörper Anti-AktinC4 inkubiert. Anschließend erfolgte das Auswaschen ungebundener Antikörper. Der nun hinzugefügte Zweitantikörper war mit ultrakleinen (ca. 1 nm) großen Gold-Partikeln konjugiert, die nachfolgend durch Silberverstärkung sichtbar gemacht wurden, sodass die Bindungsstellen des Primärantikörpers elektronenmikroskopisch zu erkennen waren.

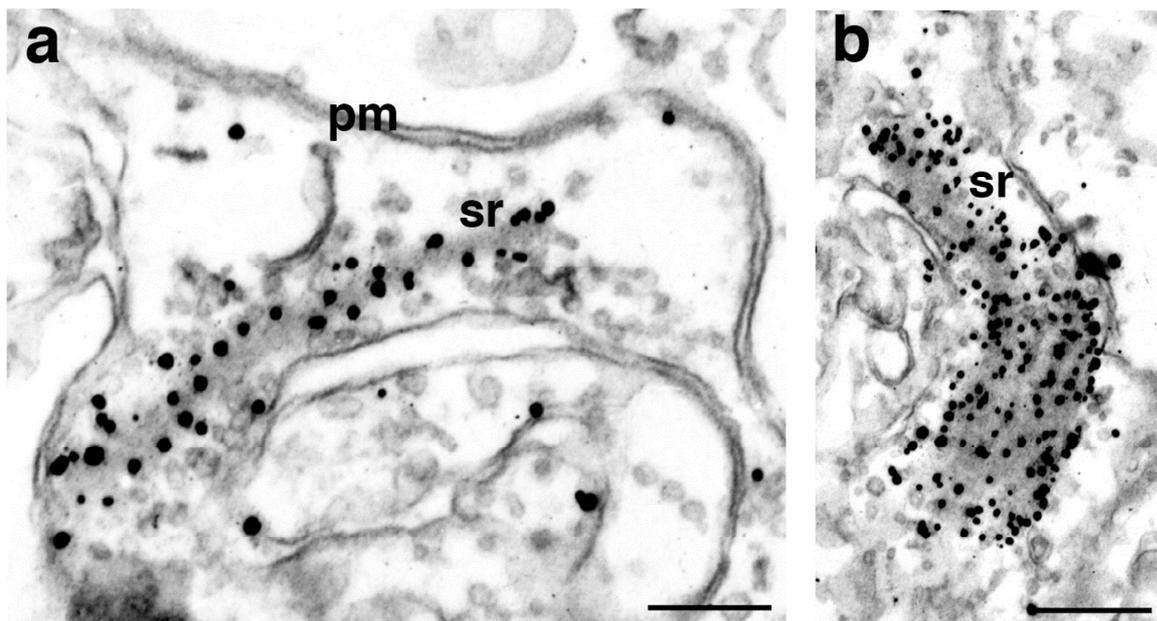


Abbildung 13: Immunelektronenmikroskopie eines Schnitts durch die bovine Netzhaut mit Anti-AktinC4 und einem 1 nm-Gold konjugierten Zweitantikörper. **a, b,** Deutlich sichtbar ist die Anreicherung der Goldpartikel im Bereich des Synaptic Ribbons (*sr*) der Photorezeptorzelle. *pm* = plasma membrane (presynaptic membrane); *sr* = Synaptic Ribbon. Skalierungsbalken: 100 nm.

Deutlich sichtbar ist die Anreicherung der Goldpartikel im Bereich des Synaptic Ribbons der Photorezeptorzelle (Abbildung 13). Es ist eine regelmäßige, über die gesamte Ausdehnung des Synaptic Ribbon verteilte Markierung erkennbar. Da innerhalb dieser Struktur kein Vorkommen von Aktin bekannt ist, handelt es sich somit um eine Reaktion des Antikörpers mit einem Antigen, das Teil des Synaptischen Ribbons ist. Dies zeigt auch auf

ultrastruktureller Ebene, dass der Anti-AktinC4 Antikörper die Synaptischen Ribbons markiert.

Es stellte sich nun die Frage, wie diese Reaktivität zustande kommt und welcher Teil des Synaptischen Ribbons das Antigen für den Anti-AktinC4 Antikörper darstellt.

3.4 Western-Blot-Analyse bovinen Gewebes mit Anti-AktinC4

Um herauszufinden, mit welchem Protein des Synaptic Ribbon der Antikörper reagiert, wurden Western-Blot-Analysen mit verschiedenen retinalen Zellfraktionen, darunter gereinigte Synaptic Ribbons (Spuren 7, 8, 10; gereinigt nach Schmitz et al. 1996, 2000), sowie weniger gereinigte Vorfraktionen (Spuren 3-6) und gereinigtes Aktin (Spur 1) durchgeführt (Abbildung 14). Als Primärantikörper wurde der Anti-AktinC4 Antikörper verwendet.

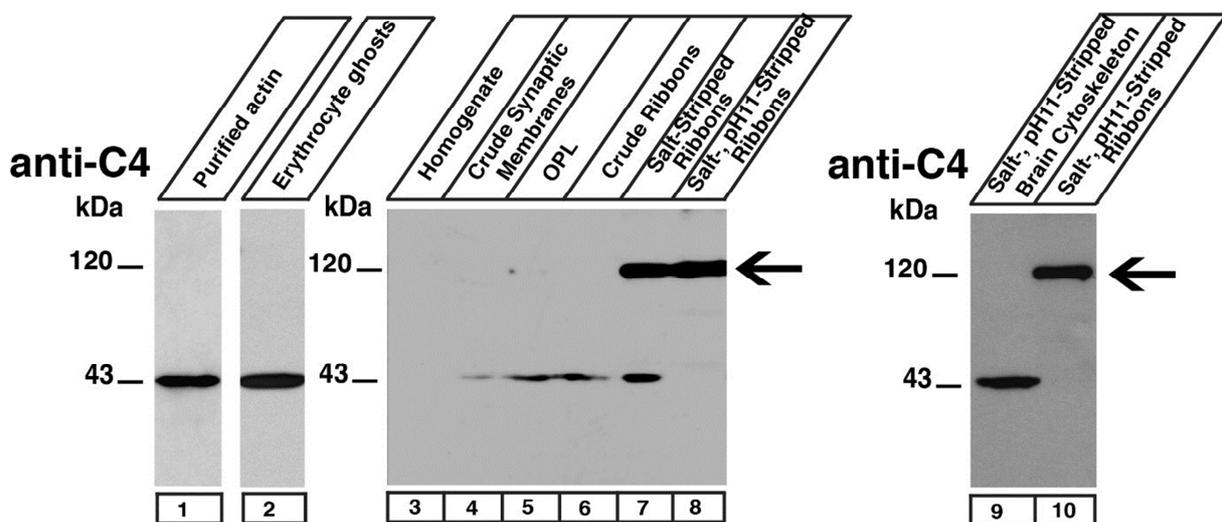


Abbildung 14: Western-Blot-Analysen verschiedener Proteinfractionen aus bovinem Gewebe mit Anti-AktinC4. 1 = gereinigtes Aktin; 2 = Erythrozytenmembran; 3 = Homogenisat der bovinen Retina; 4 = Rohe/unbearbeitete synaptische Membranen aus der Retina; 5 = gereinigte OPL Fraktion (outer plexiform layer, Äußere plexiforme Schicht); 6 = grob gereinigte Ribbonfraktion; 7 = Salz-gewaschene Ribbons; 8 = Bei pH 11 Salz-gewaschene Ribbons; 9 = Bei pH 11 Salz-gewaschene Proteine des Zytoskeletts des Gehirns; 10 = Bei pH 11 Salz-gewaschene Ribbons (AG Schmitz, unpubliziert)

In der Western-Blot-Serie aus Abbildung 14 ist zu erkennen, dass der Anti-AktinC4 Antikörper neben Aktin bei 43 kDa in den angereicherten Ribbonfraktionen auch mit einem Protein reagiert, dessen Bande bei 120 kDa liegt. Diese Größe entspricht der des Proteins RIBEYE. Somit ist die beobachtete Markierung der Synaptischen Ribbons durch den Anti-AktinC4 Antikörper wahrscheinlich auf eine Kreuzreaktivität mit RIBEYE zurückzuführen. Darauf weisen auch hochauflösende 2D-Gelanalysen der AG Schmitz hin, die zeigen, dass der durch den Anti-AktinC4 Antikörper detektierte Proteinspot in der 2D-Analyse auch mit RIBEYE-Antikörpern reagiert (unveröffentlichte Befunde).

Nicht bekannt ist allerdings die genaue Lokalisation der Antikörperbindungsstelle innerhalb von RIBEYE.

3.5 Vergleichende Epifluoreszenzmikroskopie von Anti-AktinC4 in der Retina des Rindes und der Ratte

Ein weiterer wegweisender Befund ergab sich aus dem nachfolgend angefertigten mit Anti-AktinC4 immunmarkiertem Kryostatschnitt der Maus-Retina (Abbildung 15).

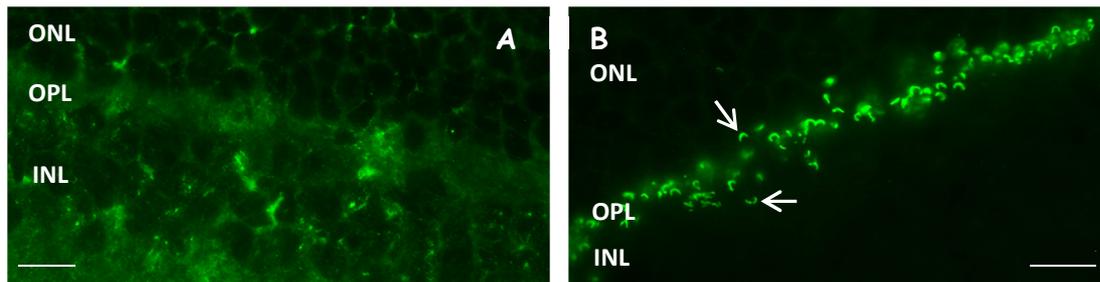


Abbildung 15: Kryostatschnitt der Maus-Retina A) und bovinen Retina B) im Vergleich bei Behandlung mit Anti-AktinC4 (grün), A): keine Markierung von Synaptic Ribbons in OPL, B): deutliche hufeisenförmige Markierung der Synaptic Ribbons in der OPL. ONL = outer nuclear layer (Äußere Körnerschicht); OPL = outer plexiform layer (Äußere plexiforme Schicht); INL = inner nuclear layer (Innere Körnerschicht). Pfeile: Synaptic Ribbons. Skalierungsbalken: 10 μ m.

Im Vergleich mit der Retina des Rindes zeigte die Anfärbung des Kryostatschnittes der Maus-Retina mit dem Anti-Aktin-C4 Antikörper keine Markierung der Synaptic Ribbons in der äußeren plexiformen Schicht, wohingegen die Synaptic Ribbons in der bovinen Retina deutlich sichtbar sind. Die Reaktion von Anti-AktinC4, die in boviner Retina zu beobachten war, fehlte also in der Maus.

Im Hinblick auf die Lokalisation der Antikörperbindungsstelle kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei der Kreuzreaktion des Anti-AktinC4 Antikörpers mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Epitop handelt, das in einem Bereich liegt, der zwischen den Spezies divergent ist.

Es stellt sich nun die Frage, welcher Teil von RIBEYE in Zusammenhang mit diesem Befund eher für die Kreuzreaktion verantwortlich sein kann. Die A-Domäne von RIBEYE ist im Gegensatz zu seiner hoch konservierten B-Domäne speziesspezifisch (Schmitz et al. 2000). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass das vom Antikörper erkannte Epitop in diesem Teil, der A-Domäne des bovinen RIBEYE, zu lokalisieren ist.

Um diese Annahme zu untermauern, war es sinnvoll, lediglich die A-Domäne des bovinen RIBEYE dem Anti-AktinC4 Antikörper auszusetzen. Wie nachfolgend beschrieben, wurde

dazu die cDNS des bovinen RIBEYE(A) durch PCR-Amplifikation und Klonieren generiert und anschließend in HEK293-Zellen transfiziert.

3.6 PCR-Amplifikation der cDNS des bovinen RIBEYE(A)

Um die Kreuzreaktivität des Anti-AktinC4 Antikörpers zu testen, war es notwendig, die cDNS der einzelnen RIBEYE(A)-Teile zusammenzusetzen. Als cDNS am Stück lag das bovine RIBEYE(A) bislang noch nicht vor.

Da die Vervielfältigung von RIBEYE(A) im Gesamten nach wiederholten Versuchen nicht möglich war, wurde die cDNS aus drei Teilstücken zusammengesetzt (Abbildung 16). Hierzu wurden Restriktionsschnittstellen (AgeI und NheI) gewählt, welche die RIBEYE(A)-Domäne in etwa gleich große Fragmente teilten. Die 5'- und die 3'-Restriktionsschnittstelle (XhoI und BamHI) wurden über die endständigen Primer eingebracht. Die jeweiligen Sequenzen der Restriktionsstellen waren Teil der Primersequenz und wurden somit in der PCR-Amplifikation an die Enden der cDNS von RIBEYE(A) angehängt. Die Nukleotidsequenz des RIBEYE(A) blieb dabei unberührt. Bei der Klonierung der Gesamt-cDNS aus den Einzelstücken habe ich intern vorhandenen Schnittstellen genutzt. Somit war es nicht notwendig, Basen in einer sogenannten »stillen Mutagenese« einzuklonieren, ohne dabei die Aminosäuresequenz zu verändern. Für die Amplifikation der drei Teile machte wurden die in der Sequenz von RIBEYE(A) vorhandenen Restriktionsstellen AgeI und NheI genutzt. Die Primer AgeI forward bzw. reverse und NheI forward bzw. reverse sind in ihrer Sequenz demnach vollständig in der des bovinen RIBEYE(A) abgebildet. Später konnten die drei Genstücke an diesen Stellen zusammengefügt werden.

Durch das Verfahren konnte erreicht werden, dass das später entstandene Konstrukt in seiner Nukleotidsequenz exakt der cDNS des bovinen RIBEYE(A) entsprach.

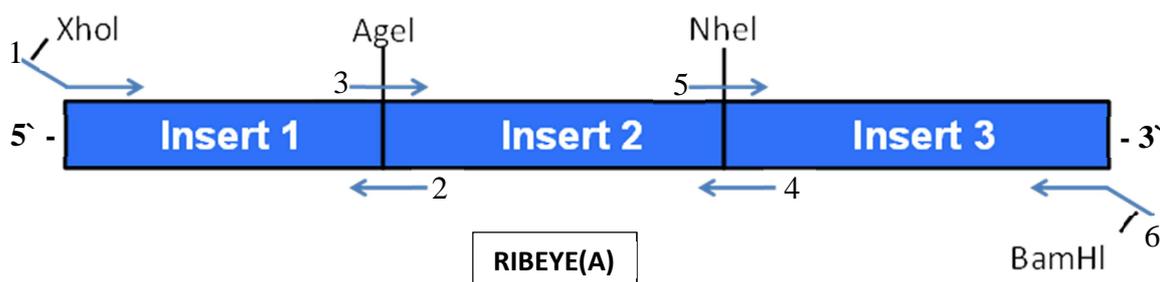


Abbildung 16: Schematische Genkarte des bovinen RIBEYE(A) mit Restriktionsschnittstellen und verwendeten Primern. Die Restriktionsschnittstellen XhoI und BamHI wurden über die endständigen Primersequenzen eingefügt; die Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen von AgeI und NheI sind natürlicher Bestandteil des bovinen RIBEYE(A) und in den jeweiligen Primern enthalten. Primer: 1 = XhoI fw, 2 = AgeI rv, 3 = AgeI fw, 4 = NheI rv, 5 = NheI fw, 6 = BamHI rv. Pfeile: Primer.

Zur Polymerasekettenreaktion wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Primer verwendet.

Im Anschluss an die PCR-Amplifikation wurden die Proben auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, wo sie ihrer Größe nach aufgetrennt wurden. Anschließend wurden die gewünschten Fragmente als Gelstücke entnommen und mittels Gelextraktion isoliert.

Neben der Kontrolle durch Gelelektrophorese wurden die Basenabfolgen der einzelnen Teile durch Sequenzierung bestimmt.

Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese nach dem Restriktionsverdau der in den pJET1.2/blunt-Vektor klonierten PCR-Produkte.

Für die einzelnen Teilstücke samt ihrer Primer wurden folgende Größen erwartet, die im Voraus anhand der ihrer Sequenz aus der Gendatenbank berechnet werden konnten.

Tabelle 8: Länge der PCR-Produkte

| PCR-Produkt (inklusive Primersequenz) | Länge |
|---------------------------------------|--------|
| Primer XhoI fw – Primer AgeI rv | 489 bp |
| Primer AgeI fw – Primer NheI rv | 576 bp |
| Primer NheI fw – Primer BamHI rv | 671 bp |

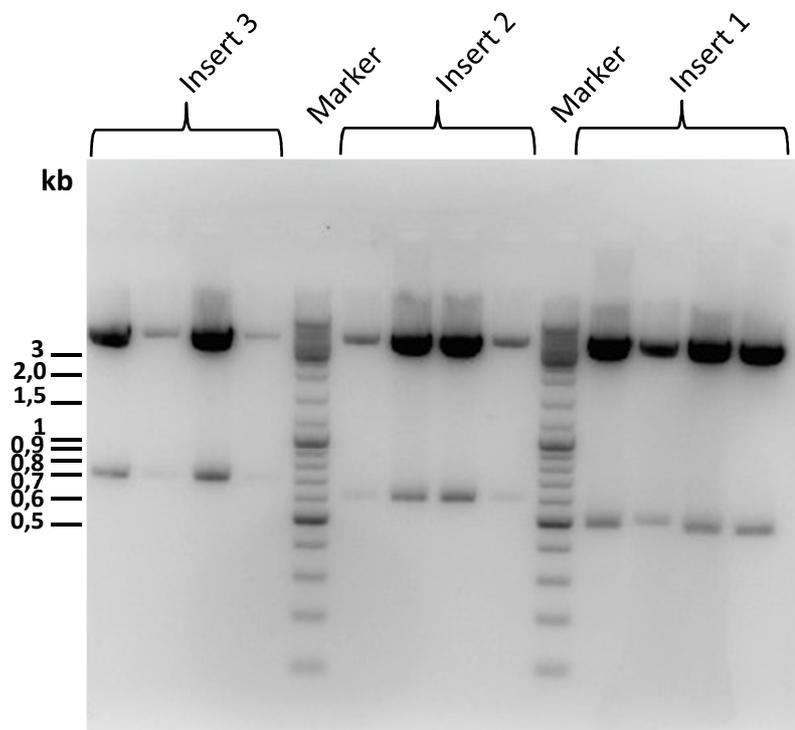


Abbildung 17: Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der in den pJET1.2/blunt – Vektor klonierten PCR-Produkte. In 3 Einzelteilen vervielfältigtes RIBEYE (A): Insert 3 = hinteres Fragment (NheI, BamHI), Insert 2 = mittleres Fragment (AgeI, NheI), Insert 3 = vorderes Fragment (XhoI, AgeI); pJET1.2/blunt – Vektor bei 3 kb; Marker: DNS Leiter-Mix.

Als geschätzte Größen ergaben sich für das vordere Fragment (Primer XhoI - Primer AgeI) ~ 0,5 kb, für das mittlere Fragment (Primer AgeI - Primer NheI) ~ 0,6 kb und für das hintere Fragment (Primer NheI - Primer BamHI) ~ 0,68 kb.

Diese stimmten in Annäherung gut mit den berechneten Längen überein. Anschließend wurden die gewünschten Fragmente als Gelstücke entnommen und mittels Geextraktion isoliert.

Neben der Kontrolle durch Gelelektrophorese wurden die Basenabfolgen der einzelnen Teile durch Sequenzierung bestimmt.

3.7 Klonierung der bovinen RIBEYE(A) cDNS in das Plasmid pJET1.2/blunt

Die Genstücke wurden in das Plasmid pJET1.2/blunt eingebracht. Hierzu bedurfte es keiner Restriktionsenzyme, da dieses Plasmid die Basenpaare an seiner Multiple Cloning Site direkt integrieren und verbinden konnte (engl. »blunt« = stumpf), ohne dass überhängende Basen oder sonstige Modifikationen an den Enden notwendig waren.

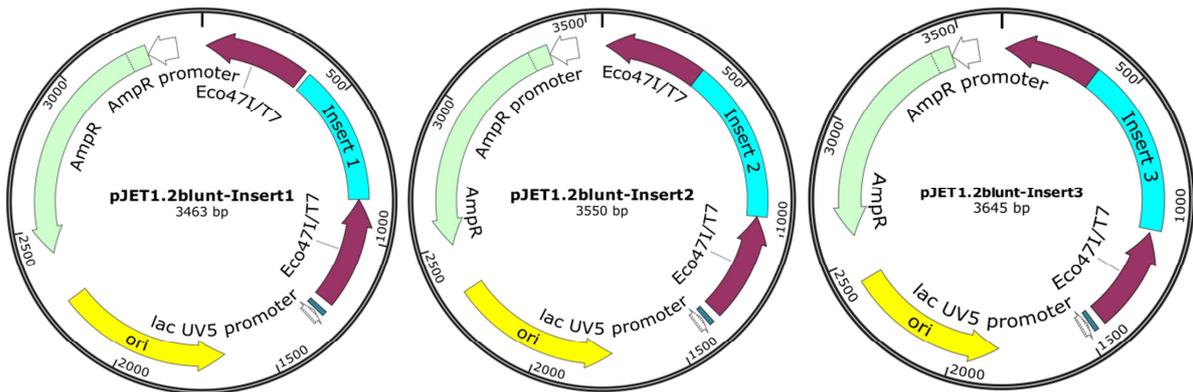


Abbildung 18: Karten der Inserts 1-3 im jeweiligen Klonierungs-Vektor pJET1.2/blunt. ori = origin of replication, AmpR = β -Lactamase-Resistenzgen für Ampicillin, Carbenicillin und verwandte Antibiotika Eco471/T7= letales Gen; AmpR/lac UV5 promoter= Promotoren zur Vermittlung der Transkription. Erstellt mit SnapGene

Der Vektor besitzt neben einem β -Lactamase-Resistenzgen für Ampicillin noch einen weiteren Mechanismus für die positive Selektion der Bakterien mit rekombinanter DNS. Das Gen Eco471/T7 ist ein letales Gen, in dessen Innerem die Multiple Cloning Site liegt (Abbildung 18). War die Ligation der DNS in den Vektor erfolgreich, verlor dieses Gen seine Funktion. Umgekehrt waren untransformierte Bakterien durch die Aktivität dieses Genes unfähig, Kolonien zu bilden.

Zur Ligation wurde der Ansatz wie in Kapitel 2.13 beschrieben bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation in kompetente Bakterien, die auf einer mit Ampicillin bestrichenen Agar-Platte ausgesät wurden. Je eine erfolgreich transformierte Kolonie wurde in LB-Medium bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nun erfolgten eine Plasmidpräparation (siehe 2.14) und die anschließende Kontrolle mittels Restriktionsverdau, gelelektrophoretischer Analyse und Sequenzierung (siehe 2.9, 2.11).

Die einzelnen Genfragmente wurden über ihre Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor isoliert, um nachfolgend in den pmCherry-N1-Vektor einkloniert zu werden (Abbildung 19). Dabei fanden die Restriktionsenzyme aus Tabelle 7 Verwendung. Jedes Insert wurde in einem

getrennten Ansatz geschnitten. Ebenso wurde der pmCherry-N1-Vektor für die Ligation vorbereitet, indem er an XhoI und BamHI restriktiv geschnitten wurde, sodass die Enden komplementär zu denjenigen der ebenso verdauten RIBEYE(A)-Teile (Insert 1 und 3) waren. Die Zusammensetzung des Verdau-Ansatzes ist in Kapitel 2.13 beschrieben.

3.8 Klonierung des pRIBEYE(A)mCherry-Plasmids

Der für die Klonierung des gesamten bovinen RIBEYE(A) verwendete Vektor pmCherry-N1 besitzt eine Sequenz, die für mCherry, ein rot-fluoreszierendes Protein, codiert. Dieses wird später zusammen mit dem Protein von Interesse exprimiert. Durch die endogene Fluoreszenz des mCherry-Fusionsanteiles kann dann das Expressionsmuster von RIBEYE(A) (mit mCherry fusionierter Proteinanteil von Interesse) im Mikroskop betrachtet werden.

Der Vektor wurde an XhoI und BamHI restriktiv geschnitten, sodass die Enden komplementär zu denen der zuvor verdauten RIBEYE(A)-Teile waren. Die anschließende gleichzeitig durchgeführte kombinierte Dreifach-Ligation der drei cDNS-Fragmente von RIBEYE(A) in den Vektor erfolgte wie unter 2.13 beschrieben.

Die folgenden Abbildung zeigen das fertige pRIBEYE(A)mCherry-Konstrukt schematisch (Abbildung 19) und in typischer Ringform (Abbildung 20).

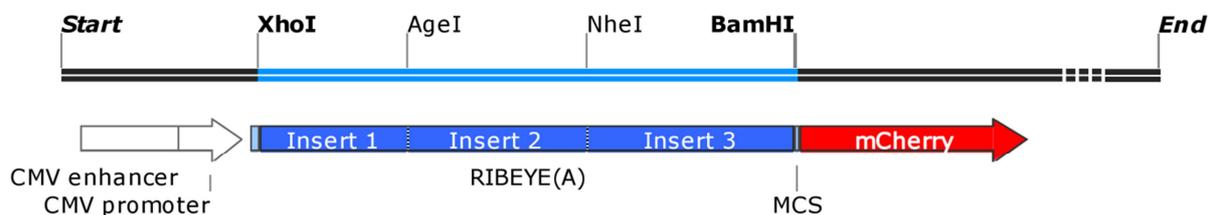


Abbildung 19: Schematische Karte des pRIBEYE(A)mCherry-Plasmids. Erstellt mit SnapGene.

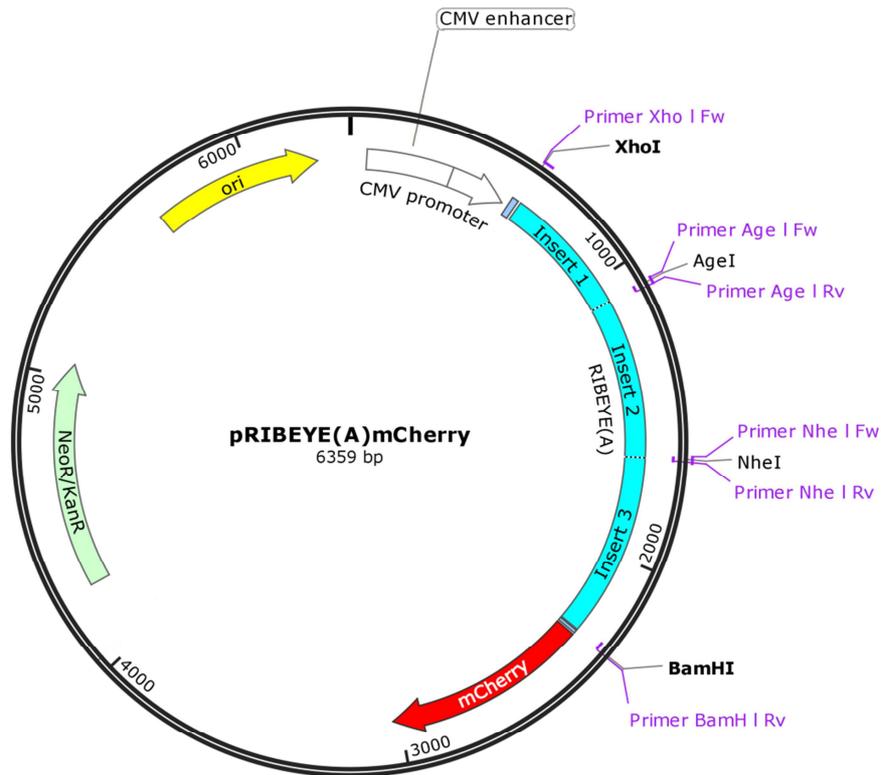


Abbildung 20: Das pRIBEYE(A)mCherry-Plasmid. RIBEYE(A) wurde mittels PCR in 3 Sequenzen (Restriktionsstellen XhoI, AgeI, NheI, BamHI) vervielfältigt, wobei die Basensequenzen für XhoI und BamHI über die endständigen Primer eingefügt wurden. RIBEYE(A) wurde an den Restriktionsstellen geschnitten, an AgeI und NheI ligiert und über die Restriktionsschnittstellen XhoI und BamHI in den pmCherry-N1-Vektor eingefügt. ori = origin of replication, CMV promoter = viraler Promotor für die Expression des nachfolgenden DNS-Abschnittes in HEK-Zellen; NeoR/KanR = Sequenz, die für eine Antibiotikaresistenz gegen Neomycin/Kanamycin codiert. Erstellt mit SnapGene.

3.9 Restriktionsverdau von pRIBEYE(A)mCherry

Zur Überprüfung des klonierten Konstruktes wurde pRIBEYE(A)mCherry einem Vierfachverdau mit XhoI, AgeI, NheI und BamHI mit anschließender gelelektrophoretischer Analyse zugeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 21 zu sehen.

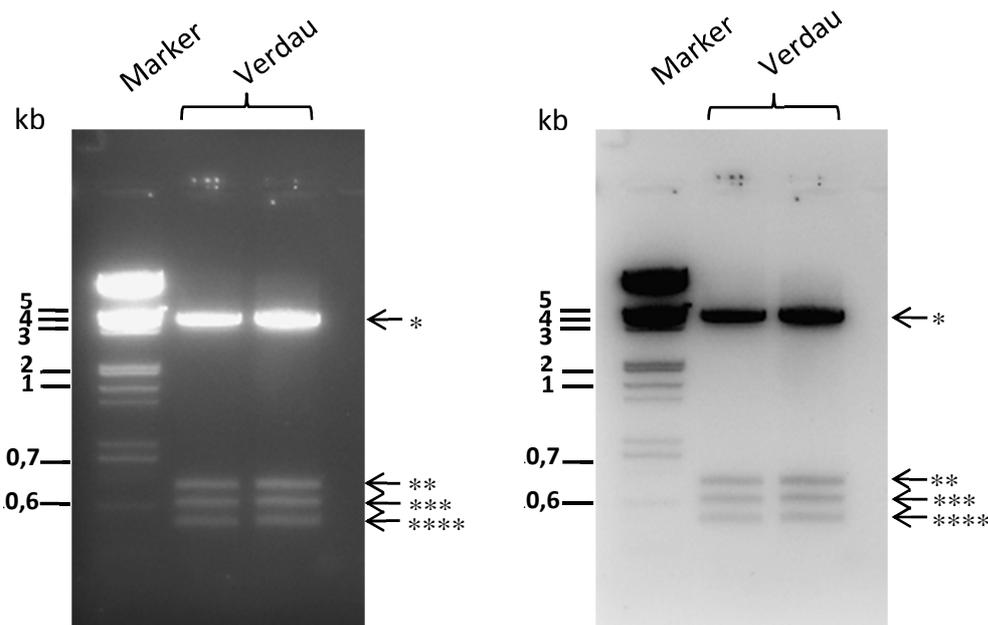


Abbildung 21: Gelelektrophorese des Plasmids RIBEYE(A)mCherry nach Vierfach-Restriktionsverdau mit XhoI, AgeI, NheI und BamHI in regulärer und invertierter Farbgebung. * = pmCherry-NI-Vektor (~4,7 kb); ** = hinteres Fragment (~ 0,66 kb); *** = mittleres Fragment (~ 0,6 kb) ; **** = vorderes Fragment (~ 0,5 kb). Daraus ergibt sich eine Gesamtlänge für RIBEYE (A) inklusive der eingefügten Schnittstellen von von 1,7 kb (563 aa); Marker: DNS Leiter-Mix.

Aus der Gendatenbank ergab sich die jeweils genaue Anzahl an Basenpaaren der RIBEYE(A)-Fragmente, die wie folgt waren und in Annäherung gut mit den in der Gelelektrophorese gemessenen Werten übereinstimmten.

Tabelle 9: Länge der klonierten Fragmente von RIBEYE(A)

| Fragmente von RIBEYE(A) | Länge |
|-------------------------|--------|
| XhoI –AgeI | 473 bp |
| AgeI –NheI | 558 bp |
| NheI –BamHI | 653 bp |

Insgesamt ergab sich somit für cDNS des bovines RIBEYE(A) inklusive der eingefügten Restriktionsstellen (XhoI und BamHI) eine Länge von von 1,684 kb.

Die Bande bei ~ 4,7 kb entspricht der Vektorbande von pmCherry-N1.

Die Richtigkeit des Konstruktes konnte neben dem den Testverdaus mit XhoI, AgeI, NheI und BamHI auch in der automatischen Sequenzierung aller drei RIBEYE(A)-Teile bestätigt werden.

3.10 Verteilungsmuster der A-Domäne des bovines RIBEYE in transfizierten HEK293-Zellen

Zunächst führte ich eine Einzeltransfektion von HEK293-Zellen mit pRIBEYE(A)mCherry durch, um die Funktionalität des Proteins zu überprüfen.

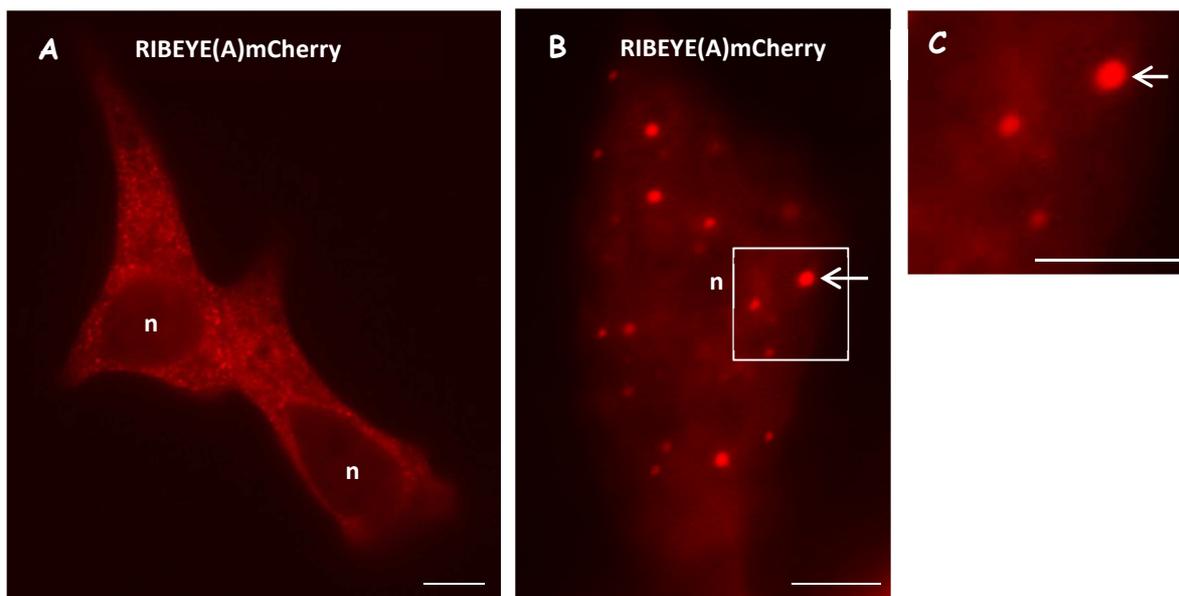


Abbildung 22: A-C Immunfluoreszenz von bovines RIBEYE(A)mCherry exprimierenden HEK293-Zellen. Zu erkennen ist das typische punkartige Verteilungsmuster. Zellkerne sind als n gekennzeichnet. (C) stellt einen vergrößerten Ausschnitt aus B dar. n= nucleus, Pfeile: punktförmige Anreicherung von bovines RIBEYE(A). Skalierungsbalken: 10 μ m.

Die Immunfluoreszenz zeigt das typische punkartige Verteilungsmuster von RIBEYE(A) um den Zellkern herum (Abbildung 22). Dieses Expressionsmuster ist sehr ähnlich dem Muster des von Ratten stammenden und humanen RIBEYE(A) (Schmitz et al. 2000). Es zeigt sich weiterhin eine zytosolische Verteilung, die charakteristisch für die A-Domäne ist (Schmitz et al. 2000).

3.11 Expression von RIBEYE(A)mCherry in einer Kotransfektion mit RIBEYE(A)EGFP

Um die Funktionalität des Plasmids RIBEYE(A)mCherry weiter abzusichern, führte ich eine Kotransfektion mit einem weiteren Plasmid durch, das die RIBEYE(A)-Domäne einer anderen Spezies enthält. Das bereits für frühere Versuche hergestellte und gut dokumentierte RIBEYE(A)EGFP aus der Ratte wurde zusammen mit dem bovinen RIBEYE(A)mCherry in HEK293-Zellen transfiziert und dort koexprimiert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluorezenzeigenschaften waren sie in verschiedenen Farbkanälen differenzierbar. EGFP emittiert Wellenlängen im grünen, mCherry Wellenlängen im roten Bereich.

Negativkontrollen mit Einzeltransfektionen von bovinem RIBEYE(A)mCherry und RIBEYE(A)EGFP (Ratte) zeigten, dass die Proteine nur im erwarteten Kanal sichtbar waren – das Signal des bovinen RIBEYE(A)mCherry war nur im roten und das des RIBEYE(A)EGFP aus der Ratte nur im grünen Kanal zu sehen. So konnte ausgeschlossen werden, dass die Fluoreszenzsignale beispielsweise aufgrund eines zu starken Fluoreszenzsignals in dem jeweils anderen Kanal zum Vorschein kommen (sogenanntes »bleeding through«).

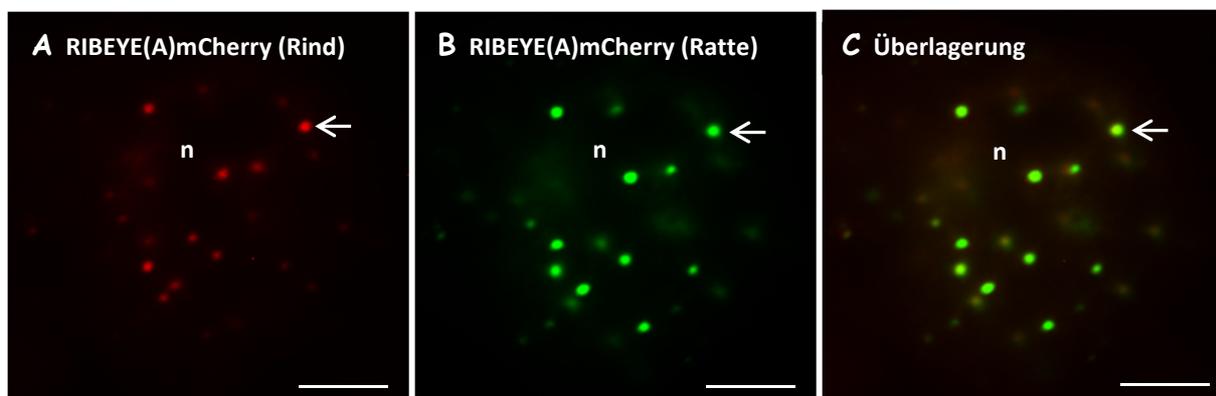


Abbildung 23: Expression von (A) RIBEYE(A)mCherry, (B) RIBEYE(A)EGFP, (C) RIBEYE(A)mCherry und RIBEYE(A)EGFP in transfizierten HEK293-Zellen; n= nucleus, Pfeile: punktförmige Anreicherung von bovinem RIBEYE(A) und demjenigen aus der Ratte. Skalierungsbalken: 5 μ m.

Die A-Domäne des bovinen RIBEYE zeigt sich als distinkte, globuläre Struktur, die im jeweiligen Farbkanal fluoresziert (Abbildung 23). Im Mischkanal wird deutlich, dass sich die Signale von bovinem RIBEYE(A)mCherry und RIBEYE(A)EGFP (Ratte) überlagern. Sie koassemblieren in die gleichen Strukturen, wie dies auch bereits vermutet wurde (Schmitz et al. 2000). Dies zeigt, dass das hergestellte Expressionskonstrukt der bovinen RIBEYE(A)-Domäne funktionell aktiv ist.

3.12 Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Anti-AktinC4 in RIBEYE(A)mCherry-transfizierten HEK293-Zellen

Nachdem der Anti-AktinC4 Antikörper bereits an Schnittpräparaten der Retina erfolgreich unter Beweis stellte, dass er in der Lage ist, Synaptic Ribbons zu markieren und – wie in der elektronenmikroskopischen Aufnahme und der Western-Blot-Serie dargestellt – im speziellen RIBEYE als Zielstruktur aufweist, wurde die genauere Lokalisation dieses Epitops weiter untersucht. Um zu zeigen, dass es sich bei dem Epitop um eine Region in der A-Domäne des bovinen RIBEYE handelt, wurden RIBEYE(A)mCherry-transfizierte HEK293-Zellen mit dem Antikörper behandelt.

Als Negativkontrolle dienten dabei Zellen, die den gleichen Transfektionsprozess durchliefen, allerdings wurde der Schritt der Addition des Plasmids durch die Zugabe von destilliertem H₂O ersetzt. Betreffend die sich anschließende Antikörper-Inkubation wurde mit ihnen in gleicher Weise wie mit den RIBEYE(A)mCherry-transfizierten Zellen verfahren. Unter dem Fluoreszenzmikroskop waren in den Kontrollpräparaten keine Antikörpermarkierungen zu sehen.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei den Fluoreszenzereignissen im grünen Farbkanal nicht um Signale aus dem roten Kanal handeln, die in den grünen Kanal hineinstrahlen, sondern tatsächlich um Signale, die von dem Anti-AktinC4 Antikörper ausgehen, wurden in einem parallelen Ansatz RIBEYE(A)mCherry transfizierte Zellen ohne Verwendung von Antikörpern mikroskopiert. In diesem Ansatz konnte im grünen Kanal kein Signal detektiert werden (Abbildung nicht gezeigt). Zusätzlich traten im grünen Kanal Signale auf, die im roten Kanal nicht vorhanden waren (siehe Pfeil Abbildung 24, A2).

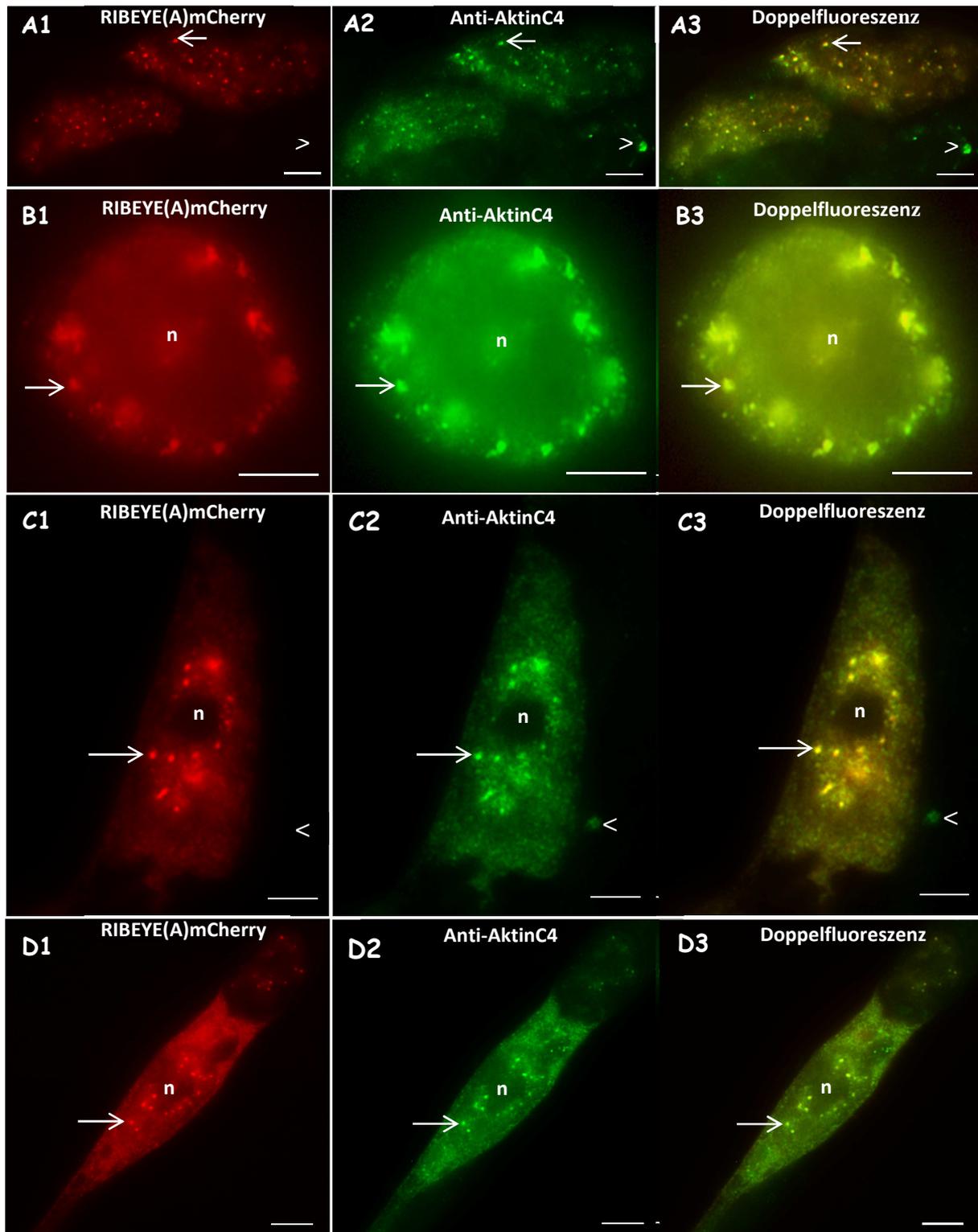


Abbildung 24: Immunfluoreszenz von RIBEYE(A)mCherry (bovin) transfizierten HEK293-Zellen. (A1, B1, C1, D1) Direkte Immunfluoreszenz: RIBEYE(A)mCherry. (A2, B2, C2, D2) Indirekte Immunfluoreszenz: Primärantikörper: Anti-AktinC4, Sekundärantikörper: Alexa 488 chicken-anti-mouse (CAM). (A3, B3, C3, D3) RIBEYE(A)mCherry (rot), Anti-AktinC4, Alexa 488 chicken-anti-mouse (CAM, grün). n = nucleus, Pfeile: RIBEYE(A)mCherry-Aggregate, die auch vom Anti-AktinC4 Antikörper angefärbt werden; Pfeilspitze: Signale, die nur im grünen Kanal vorhanden sind. Skalierungsbalken: 10 μ m.

Auch hier sind in der Epifluoreszenz-Mikroskopie wie erwartet globuläre, rot-fluoreszierende Strukturen erkennbar, die der typischen Verteilung von RIBEYE(A) entsprechen (Abbildung 24). Weiterhin ist deutlich zu sehen, dass Antikörper Anti-AktinC4 (grüner Farbkanal) und RIBEYE(A)mCherry (roter Farbkanal) an denselben Orten angesiedelt sind. Im Mischkanal ist eine eindeutige Kolo-kalisation des Signals von RIBEYE(A)mCherry mit den durch den Anti-AktinC4 Antikörper markierten Strukturen zu erkennen.

3.13 Western-Blot-Analyse des bovinen RIBEYE(A) mit Anti-AktinC4

Um die Kreuzreaktivität des Antikörpers weiter zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen mit dem Protein RIBEYE(A)mCherry und dem Anti-AktinC4 Antikörper durchgeführt. Um zu belegen, dass die Expression und das Blotten gelungen war, wurde die Nitrocellulosemembran zusätzlich mit einem Antikörper gegen das mit der RIBEYE(A)-Domäne koexprimierte mCherry behandelt.

Zur Herstellung der Proteine wurden drei HEK293-Zellhaltige Petrischalen parallel transfiziert. Das pRIBEYE(A)mCherry-Plasmid wurde zur Expression und Gewinnung von RIBEYE(A)mCherry transfiziert.

Als Positivkontrolle für den mCherry-Antikörper diente dabei das Protein mCherry selbst, dessen cDNS in gleicher Art und Weise wie pRIBEYE(A)mCherry als pmCherry-N1-Vektor in HEK293-Zellen transfiziert und dort exprimiert wurde.

Die Negativkontrolle bestand aus den extrahierten Proteinen von HEK293-Zellen, die ebenso den Transfektionsprozess durchlaufen haben. Allerdings wurde dem Ansatz anstelle des Plasmids destilliertes Wasser zugesetzt.

Nach dem Ernten der transfizierten Zellen und der Extraktion der Proteine wurde der Western Blot wie in Kapitel 2.17 beschrieben durchgeführt. Die Nitrocellulose-Membran wurde zusammen mit dem Primärantikörper Anti-AktinC4 und anschließend mit dem Sekundärantikörper Goat anti Mouse (GAM)-Pox inkubiert.

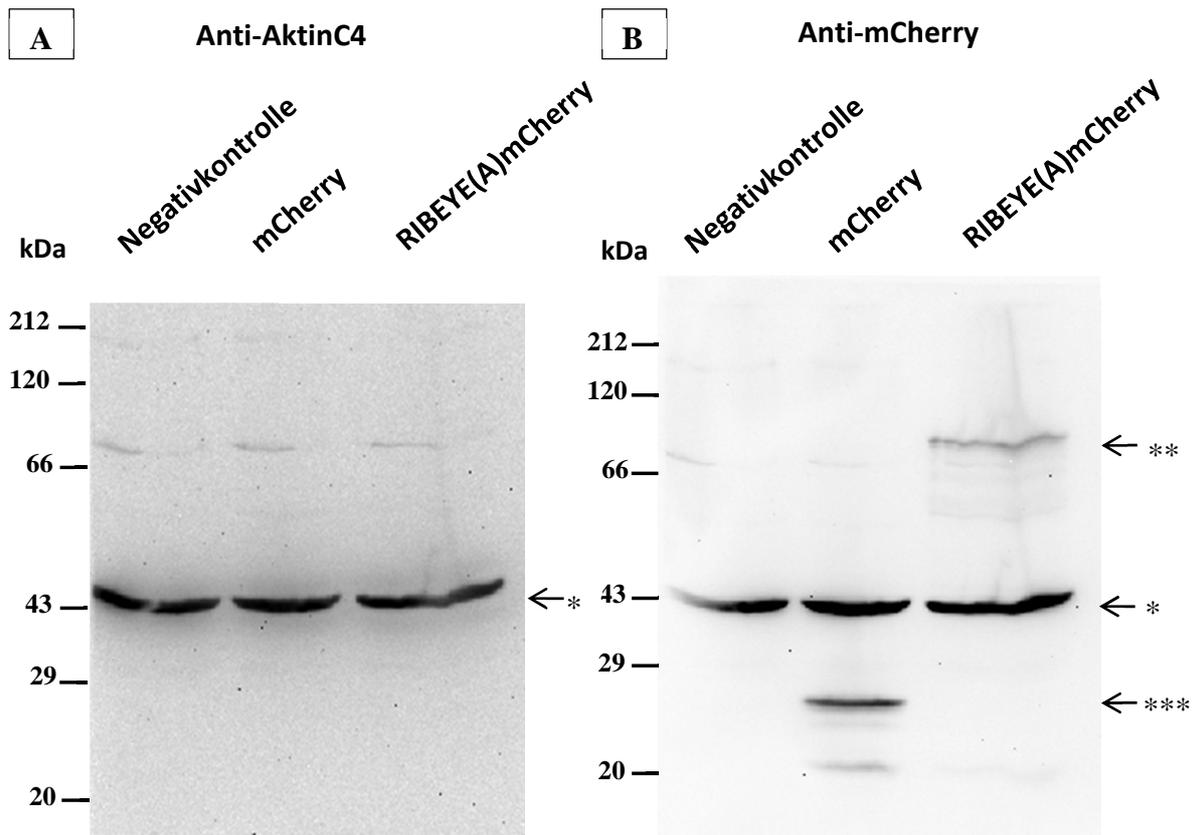


Abbildung 25: Western-Blot-Analyse von HEK293-Zelllysaten entsprechend transfizierter Zellen. Transfektionen mit dest. Wasser (Spur 1, Negativkontrolle), mCherry (Spur 2, Positivkontrolle), pRIBEYE(A)mCherry (Spur 3) (A) Primärantikörper: Anti-AktinC4, Sekundärantikörper: Goat-anti-Mouse (GAM)-Pox; * = Aktin bei ~ 42 kDa; (B) Primärantikörper: Anti-mCherry-Antikörper, Sekundärantikörper: Goat-anti-mouse (GAM)-Pox; ** = RIBEYE(A)mCherry bei ~ 90 kDa; *** = mCherry bei ~ 25 kDa.

Auf dem vorliegenden Blot (Abbildung 2, A) zeigt sich eine deutliche Bande in Höhe von 42 kDa, welche dem spezifischen Gewicht von Aktin entspricht. Im Bereich von 90 kDa (RIBEYE(A)mCherry) ist kein Signal zu sehen.

Um die erfolgreiche Expression von RIBEYE(A)mCherry zu dokumentieren, wurde der Blot anschließend mit dem primären Antikörper gegen mCherry und dem sekundären Goat anti Mouse (GAM)-Pox Antikörper inkubiert, der das gekoppelte mCherry-Protein sichtbar machen und somit indirekt das Vorhandensein von RIBEYE(A) belegen sollte. Wie in Abbildung 25, B zu erkennen ist, sind sowohl mCherry bei 25 kDa als auch RIBEYE(A)mCherry bei 90 kDa durch den Antikörper markiert. Somit kann gezeigt werden, dass RIBEYE(A)mCherry auf dem Blot an der erwarteten Stelle existent war, jedoch von dem Anti-AktinC4 Antikörper nicht detektiert wurde.

Auch nach wiederholter Durchführung der Western-Blot-Analyse konnte keine zuverlässige Reaktivität des Anti-AktinC4 Antikörpers mit bovinem RIBEYE(A)mCherry festgestellt werden.

4 Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit war der Befund, dass ein monoklonaler Aktin-Antikörper (Anti-AktinC4) an Kryostatschnitten der bovinen Retina ein für Aktin völlig untypisches Muster erkannte. Der C4-Antikörper produzierte nicht – wie erwartet – ein für Aktin typisches breit verteiltes Anfärbungsmuster, sondern markierte – überraschenderweise – hoch selektiv präsynaptische Spezialisierungen von Ribbonsynapsen, die Synaptic Ribbons.

Verschiedene biochemische Untersuchungen (Western-Blot-Untersuchungen, 2D-Gelelektrophoresen) zeigten, dass der C4-Antikörper mit RIBEYE kreuzreagiert. Auch in der Immunfluoreszenz zeigte der Antikörper eine starke Reaktivität mit den Ribbons aus der Rinderretina, nicht jedoch mit den Ribbons aus der Ratten-/Mausretina.

Somit war das Ziel-Protein des Antikörpers in der bovinen Retina identifiziert. RIBEYE ist die Hauptkomponente der synaptic Ribbons (Schmitz et al. 2000; Zenisek et al. 2004; Magupalli et al. 2008; Maxeiner et al. 2016). RIBEYE besteht aus einer Prolin-reichen A-Domäne; die carboxyterminale B-Domäne ist praktisch identisch mit dem NADH-bindenden Protein CtBP2. Die B-Domäne ist hoch konserviert zwischen den Spezies, wohingegen die A-Domäne relativ divergent zwischen den Spezies ist.

Die Fragestellung lautete daher, das Epitop von RIBEYE einzugrenzen, mit dem der Anti-AktinC4 Antikörper kreuzreagiert. Ich habe mich auf die A-Domäne von RIBEYE konzentriert, da ihre relative Divergenz zwischen den Spezies die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Ribbons in den verschiedenen Spezies mit dem C4-Antikörper erklären könnte.

Die von RIBEYE(A)mCherry in der Fluoreszenzmikroskopie gezeigte punktförmige zytosolische Verteilung ist in ihrer Morphologie identisch mit der Verteilung von RIBEYE(A)EGFP in einer zum Vergleich angefertigten Zellkultur. Transfiziertes RIBEYE generiert in den transfizierten Zellen Ribbon-ähnliche Strukturen, in denen RIBEYE hochangereichert vorliegt (Magupalli et al. 2008). Dies deckt sich in mit den Ergebnissen von (Schmitz et al. 2000), die das Erscheinungsbild von RIBEYE(A)EGFP in transfizierten HEK293-Zellen als eine Anhäufung großer immunreaktiver Partikel beschreiben. Auch einer Veröffentlichung von West and McDermott (2011) zufolge stellt sich das durch sie hergestellte und in Haarzellen exprimierte Fusionsprotein RIBEYE(A)mCherry in der Fluoreszenzmikroskopie in aggregierter Form dar.

In der Anfärbung der mit RIBEYE(A)mCherry transfizierten HEK293-Zellen mittels Anti-AktinC4 ist deutlich eine Kolo-kalisation von dem rot fluoreszierenden RIBEYE(A)mCherry-Konstrukt und den grün fluoreszierenden, durch den Antikörper markierten Bereichen zu erkennen. Es ist eine Kreuzreaktion des eigentlich gegen Aktin gerichteten Antikörpers mit RIBEYE(A)mCherry zu beobachten.

Im Gegensatz dazu steht der Befund in den Western-Blot-Untersuchungen. In der Western-Blot-Analyse mit dem Lysat der mit dem Fusionsprotein RIBEYE(A)mCherry transfizierten COS-Zellen ist die Kreuzreaktion nicht zu beobachten, wohingegen im Western Blot unter Verwendung von Rinderretinap-roben eine Kreuzreaktivität mit RIBEYE vorhanden ist. In beiden Analysen zeigt der Antikörper dagegen ein deutliches Aktin-Signal, was die Funktionalität des Antikörpers belegt.

Es stellt sich die Frage, wie sich erklären lässt, dass der Anti-AktinC4 Antikörper in der Immunfluoreszenz mit in HEK293-Zellen exprimiertem RIBEYE(A) kreuzreagiert, dieses Verhalten aber in der Western-Blot-Analyse nicht zeigt.

Das Epitop in der Western-Blot-Analyse muss sich also von dem in der Immunfluoreszenz-Analyse in irgendeiner Weise unterscheiden. Möglicherweise reagiert der Antikörper mit einer Struktur der A-Domäne von RIBEYE, die eine der folgenden Eigenschaften aufweist:

- posttranslationale Modifikation
 - ADP-Ribosylierung
 - Phosphorylierung, Acetylierung, Glycosylierung
 - Ubiquitinierung
 - SUMO-Peptide
- Konformationsepitop

4.1 Posttranslationale Modifikation

Es ist möglich, dass der Antikörper gegen eine posttranslationale Modifikation der A-Domäne von RIBEYE gerichtet ist.

Zum einen ist die ADP-Ribosylierung zu nennen, eine häufig vorkommende Modifikation. Die durch Ribosyltransferasen an Proteine gehefteten ADP-Ribosylgruppen sind an regulatorischen Prozessen innerhalb der pro- und eukaryotischen Zelle beteiligt (Okazaki and Moss 1999), sowie am Vorgang der Apoptose (Watanabe et al. 1999).

Daneben können Proteine posttranslational eine Acetylierung, Glycosylierung oder Phosphorylierung erfahren. Unter den Aminosäuren, die üblicherweise phosphoryliert werden, sind Threonin und Serin die häufigsten (Lim et al. 2014, 50). Die Tatsache, dass die A-Domäne von RIBEYE reich an Serin ist, macht diese Art der Modifikation nicht unwahrscheinlich (Schmitz et al. 2000).

Es gibt die Möglichkeit, posttranslationale Modifikationen nach Auftrennung in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese mittels Fluoreszenz basierter Färbungen zu detektieren (Steinberg et al. 2003; Schulenberg et al. 2003; Ge et al. 2004).

Außerdem sind sie in der Western-Blot-Analyse durch Antikörper, die spezifisch sind für die jeweilige Modifikation, nachweisbar (Glenney et al. 1988).

Des Weiteren können diese Arten der posttranslationalen Modifikation massenspektroskopisch nachgewiesen und zugeordnet werden, da sie die Masse des Proteins um einen gewissen Betrag erhöhen, der je nach Art der Modifikation unterschiedlich groß ist (Witze et al. 2007; Silva et al. 2013).

Eine andere Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation ist die Ubiquitinierung. Dabei handelt es sich um die Ausbildung einer kovalenten Isopeptidbindung des Substrates mit einem Lysin von Ubiquitin. Abhängig davon, welches Lysin für die Ubiquitinierung verwendet wird, erfolgt die weitere Prozessierung des modifizierten Proteins. Häufig intendiert die Ubiquitinierung den Abbau in einem Proteasom.

Ähnlich zur Ubiquitinierung ist der Vorgang der Sumoylierung. Die Anheftung eines SUMO-Peptides (engl. für *Small Ubiquitin-related MODifier*) hat Einfluss verschiedene Prozesse wie den Zellzyklus, die Apoptose und die Regulation der Transkription (Jackson and Durocher 2013).

Genau wie Ubiquitin sind SUMO-Peptide klein und verursachen keine wesentliche Beeinflussung des Molekulargewichts. Daher sind sie massenspektroskopisch schwer zu erfassen. Sie können durch den Einsatz spezieller Antikörper mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden (Ohkuni et al. 2015).

Eine posttranslationale Modifizierung könnte *in-situ* in der Netzhaut in quantitativ bedeutsamen Mengen durchgeführt werden und dort zur Kreuzreaktivität mit dem C4-Antikörper führen. In den HEK293-Zellen scheint diese Modifikation in nur quantitativ unbedeutenden Mengen durchgeführt zu werden. Sie reicht zwar aus zur Immundetektion von RIBEYE an den Strukturen, wo RIBEYE stark angereichert ist. In der Western-Blot-Analyse an HEK-Zell-Lysaten ist das Epitop aber wohl nicht darstellbar, weil es keine abundante Modifikation darstellt bzw. unterhalb der Detektionsschwelle liegt. Alternativ könnte das posttranslational modifizierte Epitop instabil sein und schnell wieder abgebaut werden. Dies könnte z.B. bei Phosphorylierungen der Fall sein, wäre aber auch bei allen anderen Modifikationen möglich. Aktin wird sowohl acetyliert, ADP-ribosyliert, methyliert und phosphoryliert (Aktories et al. 2011; Terman and Kashina 2013). Einige dieser posttranslationalen Modifikationen sind auch für RIBEYE bekannt und könnten für das Epitop, das von dem Anti-AktinC4 Antikörper erkannt wird, eine Rolle spielen.

Aus dem Vergleich der Sequenz der RIBEYE(A)-Domäne mit bekannten Motiven für Angriffsorte bzw. Substrate von Kreatinkinasen aus der Datenbank von ELM (The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins) ergeben sich einige Motive, die innerhalb von RIBEYE(A) potentielle Phosphorylierungsstellen darstellen könnten. Beispielsweise finden sich unter den aa 74–80 und aa 495–501 Motive, die von einer im Zytosol lokalisierten Proteinkinase für die Serin- und Threonin-Phosphorylierung erkannt werden können (Daten nicht gezeigt). Diese Aminosäuresequenzen der RIBEYE(A)-Domäne könnten somit möglicherweise posttranslational phosphoryliert werden.

4.2 Konformationsepitop

Ein anderer denkbarer Erklärungsansatz ist ein Konformationsepitop als Zielstruktur des Anti-AktinC4 Antikörpers.

Bei einer antigenen Determinante kann es sich um ein Sequenzepitop handeln, bei dem eine Sequenz in seiner Primärstruktur mit der Antigen-Bindungsstelle interagiert. Die Rezeptoren von T-Zellen beziehen sich vorwiegend auf lineare Epitope (Gressner and Arndt 2013:452). Die Antigene Determinante kann aber auch erst durch die Faltung in eine Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur entstehen. In dem Fall spricht man von einem Konformationsepitop. Diese bilden im Allgemeinen die Epitope für die Immunglobuline von B-Zellen.

RIBEYE besitzt die Fähigkeit zur Ausbildung einer Quartärstruktur. Die einzelnen RIBEYE-Moleküle interagieren miteinander und bilden so ein Gerüst für das Synaptische Ribbon. Verantwortlich dafür ist seine A-Domäne. RIBEYE(A) besitzt drei Interaktionsstellen, an denen es gleichsinnig mit anderen A-Domänen in Verbindung steht (Schmitz 2009).

Antikörper reagieren entweder mit einem Sequenzepitop oder mit einem Konformationsepitop. Einen wesentlichen Einfluss auf den Konformationszustand des Epitops hat der Vorgang der Denaturierung. Hierbei ändern sich nicht nur die physikalischen sondern auch die chemischen Eigenschaften des Epitops. Die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen gehen verloren. Das Epitop liegt anschließend in seiner linearen Primärstruktur vor, sodass Antikörper, die gegen ein Konformationsepitop gerichtet sind, ihre Bindungsfähigkeit an das denaturierte Epitop verlieren, wie bereits seit 1936 durch Karl Landsteiner bekannt ist (Landsteiner 1936). Bei der Behandlung mit dem anionischen Natriumdodecylsulfat (SDS) und dem ebenfalls in dem SDS-Lade-Puffer enthaltenen Mercaptoethanol gehen die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen verloren. Ebenso trägt das Erhitzen im Rahmen der Probenvorbereitung zur Denaturierung bei. Dies hat zur Folge, dass ein Antikörper in diesem Verfahren vorwiegend lineare Epitope detektiert.

Es ist also denkbar, dass die fehlende Reaktivität des Anti-AktinC4 Antikörpers mit der A-Domäne von RIBEYE in der Western-Blot-Analyse darauf zurückzuführen ist, dass es sich bei dem Anti-AktinC4 Antikörper um ein Immunglobulin handelt, das gegen ein Konformationsepitop gerichtet ist. Diese Überlegung wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass ein Vergleich der Sequenzen von Aktin und bovinem RIBEYE(A) keine Übereinstimmungen zeigt, die auf das Vorhandensein eines Sequenzepitops hindeuten.

In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigt der Anti-AktinC4 Antikörper im Gegensatz zur Western-Blot-Analyse eine deutliche Reaktivität mit RIBEYE(A). Da die Fixierung der HEK293-Zellen hier mit einer gepufferten Formaldehyd-Lösung und nicht beispielsweise mit einer Methanol/Aceton-Lösung erfolgt ist, kann zum Zeitpunkt der Antikörperbindung von einer weitgehend intakten Quartärstruktur des Proteins ausgegangen werden. Der Anti-AktinC4 Antikörper könnte also gegen ein Konformationsepitop in seiner Quartärstruktur gerichtet sein, was seine nicht vorhandene Reaktivität in der Western-Blot-Analyse erklären würde.

Sollte sich der Antikörper gegen ein Epitop in seiner Sekundär- oder Tertiärstruktur richten, ließe sich möglicherweise seine Bindungsaffinität durch die Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit einem Renaturierungspuffer vor der Inkubation mit dem Antikörper erhöhen und so sein Bindungsverhalten weiter untersuchen. Eine Möglichkeit bildet dabei die Aufbereitung der Proteinprobe durch eine schrittweise Dialyse mit einem Puffer, der unter anderem Harnsäure enthält (Shi et al. 2015). Daneben wurde beschrieben, dass durch die Inkubation der Nitrocellulose-Membran mit Calcium-Ionen (Kurien and Bachmann 2015) oder mit Nonidet P-40 (Octylphenoxypolyethoxyethanol) (Muro et al. 1996) eine Renaturierung der Proteine erreicht werden kann. Der unterschiedliche Befund in der Western-Blot-Analyse des bovinen Gewebes und der RIBEYE(A)mCherry-transfizierten HEK293-Zellen wäre möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Konformation in der Retina stabil ist, nicht jedoch in den transfizierten HEK293-Zellen.

4.3 Bindungsaffinität des Anti-AktinC4 Antikörpers

In der Epifluoreszenzmikroskopie des Anti-AktinC4 Antikörpers im Schnittpräparat der bovinen Retina zeigt sich, dass der Antikörper die Synaptischen Ribbons und damit RIBEYE sehr deutlich markiert. Dahingegen ist das umgebende Aktin nicht angefärbt, obwohl sein Vorhandensein in der OPL gut dokumentiert ist (Schmitz und Drenckhahn 1993; Nagle et al. 1986; Woodford und Blanks 1989). Ähnliches ist in einer Anfärbung der in HEK293-Zellen exprimierten A-Domäne von RIBEYE mit dem Anti-AktinC4 Antikörper zu beobachten. Auch hier zeigt der Antikörper ein klares Signal, das RIBEYE(A)mCherry entspricht. Das Aktin in der eukaryotischen HEK-Zelle wird allerdings nahezu nicht dargestellt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungsaffinität des Anti-AktinC4 Antikörpers zu RIBEYE bzw. RIBEYE(A) höher ist als zu seiner ursprünglichen Zielstruktur, Aktin.

4.4 Bedeutung der Kreuzreaktivität

Warum könnte die Charakterisierung des Antigens, das durch Anti-AktinC4 erkannt wird, wichtig für das Verständnis der synaptischen Funktionsweise sein?

An der Basis der Synaptic Ribbons findet die schnelle Vesikelexozytose statt. Nachdem die Vesikel fusioniert sind, müssen diese ersetzt werden. Zu diesem Zweck gleiten wahrscheinlich die Vesikel, die am Ribbon gebunden sind, den Synaptischen Ribbon »herunter«. Wie dies geschieht, ist allerdings noch unbekannt. Es gibt die Theorie um einen passiven Mechanismus über Diffusion oder um den aktiven Vorgang der sogenannten Verbundexozytose (*»compund exocytosis«*) (Parsons and Sterling 2003). Möglicherweise spielen hierbei Motorproteine eine Rolle. In diesem Zusammenhang könnte die Kreuzreaktivität mit einem Aktinepitop interessant sein. Wenn die A-Domäne möglicherweise ein Konformationsepitop bildet, das ähnlich einem Epitop von Aktin ist, könnte dieses Epitop womöglich von einem Myosin-abhängigen Motorprotein genutzt werden, um synaptische Vesikel hin zur aktiven Zone zu transportieren.

Die Funktion der Strukturgebung und des Gerüsts übernimmt im Synaptischen Ribbon RIBEYE. Außerhalb des Synaptischen Ribbons kommt diese Aufgabe Aktin als Gerüstprotein in eukaryotischen Zellen zu, das innerhalb der synaptischen Ribbons aber nicht zu finden ist. In weiterer Analogie zu Aktin, das auch am innerzellulären Transport beteiligt ist, ist es denkbar, dass das Epitop, das von dem Anti-AktinC4 erkannt wird, innerhalb der A-Domäne von RIBEYE eine ähnliche Konformation wie eine Andockstelle für ein Motorprotein darstellen könnte. Auch die Tatsache, dass der Anti-AktinC4 Antikörper alle 6 Isoformen des Aktins bindet, trägt zu diesen Überlegungen bei, denn allen Isoformen ist auch die Interaktion mit Motorproteinen gemeinsam. Somit kommt es in Betracht, dass die Antikörperbindungsstelle ebenfalls eine Stelle ist, mit der ein Motorprotein interagiert.

Letztendlich wird das Ziel sein, das Epitop weiter hinsichtlich seiner Morphologie und seines genauen Ortes innerhalb der A-Domäne von RIBEYE zu untersuchen. Die nähere Charakterisierung des Epitops könnte Aufschlüsse über den Mechanismus der Vesikelexozytose geben und somit helfen, den Mechanismus der Ribbonsynapse weiter zu verstehen.

5 Literaturverzeichnis

- Aktorics K.**, Lang A. E., Schwan C., Mannherz H. G. (2011) Actin as Target for Modification by Bacterial Protein Toxins. *The FEBS Journal* 278 (23): 4526–43.
- Babai N.**, Bartoletti T. M., Thoreson W. B. (2010) Calcium Regulates Vesicle Replenishment at the Cone Ribbon Synapse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(47): 15866–15877.
- Bartoletti T. M.**, Babai N., Thoreson W. B. (2010) Vesicle Pool Size at the Salamander Cone Ribbon Synapse. *Journal of Neurophysiology* 103(1): 419–423.
- Bertani G.** (1951) Studies on Lysogenesis I. *Journal of Bacteriology* 62(3): 293–300.
- Bertani G.** (2004) Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Journal of Bacteriology* 186(3): 595–600.
- Brandstätter J. H.**, Fletcher E. L., Garner C. C., Gundelfinger E. D., Wässle H. (1999) Differential Expression of the Presynaptic Cytomatrix Protein Bassoon among Ribbon Synapses in the Mammalian Retina. *European Journal of Neuroscience* 11(10): 3683–3693.
- Bringmann A.**, Pannicke T., Grosche J., Francke M., Wiedemann P., Skatchkov S. N., Osborne N. N., Reichenbach A., (2006) Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 25(4): 397–424.
- Bringmann A.**, Wiedemann P. (2012) Müller Glial Cells in Retinal Disease. *Ophthalmologica* 227(1): 1–19.
- Bruzzone R.**, White T. Wl, Paul D. L. (1996) Connections with Connexins: The Molecular Basis of Direct Intercellular Signaling. *European Journal of Biochemistry* 238 (1): 1–27.
- Burnside B.** (1976) Microtubules and Actin Filaments in Teleost Visual Cone Elongation and Contraction. *Journal of Supramolecular Structure* 5 (3): 257–75.
- Chaitin M. H.**, Bok D. (1986) Immunoferritin Localization of Actin in Retinal Photoreceptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27(12): 1764–1767.
- Dembla M.**, Wahl S., Katiyar R., Schmitz F. (2014) ArfGAP3 Is a Component of the Photoreceptor Synaptic Ribbon Complex and Forms an NAD(H)-Regulated, Redox-Sensitive Complex with RIBEYE That Is Important for Endocytosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34(15): 5245–5260.
- Dick O.**, tom Dieck S., Altroch W. D., (2003) The Presynaptic Active Zone Protein Bassoon Is Essential for Photoreceptor Ribbon Synapse Formation in the Retina. *Neuron* 37(5): 775–786.
- Dick O.**, Hack I., Altroch W. D., Garner C. C., Gundelfinger E. D., Brandstätter J. H. (2001) Localization of the Presynaptic Cytomatrix Protein Piccolo at Ribbon and Conventional Synapses in the Rat Retina: Comparison with Bassoon. *The Journal of Comparative Neurology* 439(2): 224–234.

- Dominguez R.**, Graceffa P. (2003) Solution Properties of TMR-Actin: When Biochemical and Crystal Data Agree. *Biophysical Journal* 85(4): 2073–2074.
- Dowling, J. E.** (1987) *The Retina: An Approachable Part of the Brain*. Harvard University Press.
- Drenckhahn D.**, Wagner H. J. (1985) Relation of Retinomotor Responses and Contractile Proteins in Vertebrate Retinas. *European Journal of Cell Biology* 37 (May): 156–68.
- Eckmiller M. S.** (2004) Defective Cone Photoreceptor Cytoskeleton, Alignment, Feedback, and Energetics Can Lead to Energy Depletion in Macular Degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* 23(5): 495–522.
- Fitzgerald K. M.**, Cibis G. W., Gettel A. H., Rinaldi R., Harris D. J., White R. A. (1999) ERG Phenotype of a Dystrophin Mutation in Heterozygous Female Carriers of Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Medical Genetics* 36(4): 316–322.
- Fuchs P. A.**, Glowatzki E., Moser T. (2003) The Afferent Synapse of Cochlear Hair Cells. *Current Opinion in Neurobiology* 13(4): 452–458.
- Ge Y.**, Rajkumar L., Guzman R. C., Nandi S., Patton W. F., Agnew B. J. (2004) Multiplexed Fluorescence Detection of Phosphorylation, Glycosylation, and Total Protein in the Proteomic Analysis of Breast Cancer Refractoriness. *PROTEOMICS* 4(11): 3464–3467.
- Giloh H.**, Sedat J. W. (1982) Fluorescence Microscopy: Reduced Photobleaching of Rhodamine and Fluorescein Protein Conjugates by N-Propyl Gallate. *Science (New York, N.Y.)* 217(4566): 1252–1255.
- Glenney J. R.**, Zokas L., Kamps M. P. (1988) Monoclonal Antibodies to Phosphotyrosine. *Journal of Immunological Methods* 109(2): 277–285.
- Graham F. L.**, Smiley J., Russell W. C., Nairn R. (1977) Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *The Journal of General Virology* 36(1): 59–74.
- Gressner A. M.**, Arndt T. (2013) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer-Verlag.
- Gunning P. W.**, Ghoshdastider U., Whitaker S., Popp D., Robinson R. C. (2015) The Evolution of Compositionally and Functionally Distinct Actin Filaments. *Journal of Cell Science* 128(11): 2009–2019.
- Halliburton W. D.** (1887) On Muscle-Plasma. *The Journal of Physiology* 8(3–4): 133–202.
- Han X.**, Jackson M. B. (2006) Structural Transitions in the Synaptic SNARE Complex during Ca²⁺-Triggered Exocytosis. *The Journal of Cell Biology* 172 (2): 281–93.
- Haverkamp S.**, Grünert U., Wässle H. (2000) The Cone Pedicle, a Complex Synapse in the Retina. *Neuron* 27(1): 85–95.

- Heidelberger R.**, Sterling P., Matthews G. (2002) Roles of ATP in Depletion and Replenishment of the Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *Journal of Neurophysiology* 88(1): 98–106.
- Heidelberger R.**, Thoreson W. B., Witkovsky P. (2005) Synaptic Transmission at Retinal Ribbon Synapses. *Progress in Retinal and Eye Research* 24(6): 682–720.
- Jackson S. P.**, Durocher D. (2013) Regulation of DNA Damage Responses by Ubiquitin and SUMO. *Molecular Cell* 49(5): 795–807.
- Kabsch W.**, Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F., Holmes K. C. (1990) Atomic Structure of the actin:DNase I Complex. *Nature* 347(6288): 37–44.
- Krishnan A.**, Schiöth H. B. (2015) The Role of G Protein-Coupled Receptors in the Early Evolution of Neurotransmission and the Nervous System. *The Journal of Experimental Biology* 218 (Pt 4): 562–71.
- Kurien B.T.**, Bachmann M. P. (2015) On-Membrane Renaturation of Recombinant Ro60 Autoantigen by Calcium Ions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1314: 255–261.
- Landsteiner K.** (1936) *The Specificity of Serological Reactions*. Courier Corporation.
- Lessard J. L.** (1988) Two Monoclonal Antibodies to Actin: One Muscle Selective and One Generally Reactive. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 10(3): 349–362.
- Lim W.**, Mayer B., Pawson T. (2014) *Cell Signaling: Principles and Mechanisms*. Taylor & Francis.
- LoGiudice L.**, Matthews G. (2009) The Role of Ribbons at Sensory Synapses. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 15(4): 380–391.
- Lv C.**, Gould T. J., Bewersdorf J., Zenisek D. (2012) High-Resolution Optical Imaging of Zebrafish Larval Ribbon Synapse Protein RIBEYE, RIM2, and CaV 1.4 by Stimulation Emission Depletion Microscopy. *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 18(4): 745–752.
- 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 Ribbons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28(32): 7954–7967.
- Matthews G.**, Fuchs P. (2010) The Diverse Roles of Ribbon Synapses in Sensory Neurotransmission. *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (12): 812–22.
- Maxeiner S.**, Luo F., Tan A., Schmitz F., Südhof T. C. (2016) How to Make a Synaptic Ribbon: RIBEYE Deletion Abolishes Ribbons in Retinal Synapses and Disrupts Neurotransmitter Release. *The EMBO Journal*: 35 (10): 1098–1114.

- McLaughlin B. J.** (1976) A Fine Structural and E-PTA Study of Photoreceptor Synaptogenesis in the Chick Retina. *The Journal of Comparative Neurology* 170(3): 347–364.
- McNulty J. A., Fox L. M.** (1992) Pinealocyte Synaptic Ribbons and Neuroendocrine Function. *Microscopy Research and Technique* 21(3): 175–187.
- Meier C., Dermietzel R.** (2006) Electrical Synapses--Gap Junctions in the Brain. *Results and Problems in Cell Differentiation* 43: 99–128.
- Mercer A. J., Szalewski R. J., Jackman S. L., Van Hook M. J., Thoreson W. B.** (2012) Regulation of Presynaptic Strength by Controlling Ca²⁺ Channel Mobility: Effects of Cholesterol Depletion on Release at the Cone Ribbon Synapse. *Journal of Neurophysiology* 107(12): 3468–3478.
- Muresan V., Lyass A., Schnapp B. C.** (1999) The Kinesin Motor KIF3A Is a Component of the Presynaptic Ribbon in Vertebrate Photoreceptors. *The Journal of Neuroscience* 19(3): 1027–1037.
- Muro M. D., Fernández C., Moneo I.** (1996) Renaturation of Blotted Allergens Increases the Sensitivity of Specific IgE Detection. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 6(3): 166–171.
- Nagle B. W., Okamoto C., Taggart B., Burnside B.** (1986) The Teleost Cone Cytoskeleton. Localization of Actin, Microtubules, and Intermediate Filaments. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27(5): 689–701.
- Ohkuni K., Takahashi Y., Basrai M. A.** (2015) Protein Purification Technique That Allows Detection of Sumoylation and Ubiquitination of Budding Yeast Kinetochore Proteins Ndc10 and Ndc80. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*(99): e52482.
- Okazaki I. J., Moss J.** (1999) Characterization of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored, Secreted, and Intracellular Vertebrate Mono-ADP-Ribosyltransferases. *Annual Review of Nutrition* 19: 485–509.
- Pagh-Roehl K., Wang E., Burnside B.** (1992) Shortening of the Calycal Process Actin Cytoskeleton Is Correlated with Myoid Elongation in Teleost Rods. *Experimental Eye Research* 55(5): 735–746.
- Parsons T. D., Sterling P.** (2003) Synaptic Ribbon. Conveyor Belt or Safety Belt? *Neuron* 37(3): 379–382.
- Parsons T. D., Lenzi D., Almers W., Roberts W. M.** (1994) Calcium-Triggered Exocytosis and Endocytosis in an Isolated Presynaptic Cell: Capacitance Measurements in Saccular Hair Cells. *Neuron* 13(4): 875–883.
- Perrin B. J., Ervasti J. M.** (2010) The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67 (10): 630–34.
- Pickett J. A., Edwardson J. M.** (2006) Compound Exocytosis: Mechanisms and Functional Significance. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7(2): 109–116.

- Pietzsch-Rohrschneider I.** (1976) Scanning Electron Microscopy of Photoreceptor Cells in the Light- and Dark-Adapted Retina of Haplochromis Burtoni (Cichlidae, Teleostei). *Cell and Tissue Research* 175(1): 123–130.
- Pollard T. D.,** Cooper J. A. (2009) Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326(5957): 1208–1212.
- Puller C.,** de Sevilla Müller L. P., Janssen-Bienhold U., Haverkamp S. (2009) ZO-1 and the Spatial Organization of Gap Junctions and Glutamate Receptors in the Outer Plexiform Layer of the Mammalian Retina. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (19): 6266–75.
- Rajakylä E. K.,** Vartiainen M. K. (2014) Rho, Nuclear Actin, and Actin-Binding Proteins in the Regulation of Transcription and Gene Expression. *Small GTPases* 5: e27539.
- Rao R.,** Buchsbaum G., Sterling P. (1994) Rate of Quantal Transmitter Release at the Mammalian Rod Synapse. *Biophysical Journal* 67(1): 57–63.
- Rao-Mirotznik R.,** Harkins A. B., Buchsbaum G., Sterling P. (1995) Mammalian Rod Terminal: Architecture of a Binary Synapse. *Neuron* 14(3): 561–569.
- Regus-Leidig H.,** tom Dieck S., Specht D., Meyer L., Brandstätter J. H. (2009) Early Steps in the Assembly of Photoreceptor Ribbon Synapses in the Mouse Retina: The Involvement of Precursor Spheres. *The Journal of Comparative Neurology* 512(6): 814–824.
- Ribic A.,** Liu X., Crair M. C., Biederer T. (2014) Structural Organization and Function of Mouse Photoreceptor Ribbon Synapses Involve the Immunoglobulin Adhesion Protein Syncam 1. *The Journal of Comparative Neurology* 522(4): 900–920.
- Sanger F.,** Nicklen S., Coulson A. R. (1977) DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12): 5463–5467.
- Schmidt R. F.,** Thews G. (2013) *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag.
- Schmitz F.** (2009) The Making of Synaptic Ribbons: How They Are Built and What They Do. *The Neuroscientist* 15(6): 611–624.
- Schmitz F.,** Bechmann M., Drenckhahn D. (1996) Purification of synaptic ribbons, structural components of the photoreceptor active zone complex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 16:7109–7116.
- Schmitz F.,** Drenckhahn D. (1993) Distribution of Actin in Cone Photoreceptor Synapses. *Histochemistry* 100(1): 35–40.
- Schmitz F.,** Drenckhahn D. (1997) Dystrophin in the Retina. *Progress in Neurobiology* 53(5): 547–560.

- Schmitz F.**, Holbach M., Drenckhahn D. (1993) Colocalization of Retinal Dystrophin and Actin in Postsynaptic Dendrites of Rod and Cone Photoreceptor Synapses. *Histochemistry* 100(6): 473–479.
- Schmitz F.**, Königstorfer A., Südhof T. C. (2000) RIBEYE, a Component of Synaptic Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight into Synaptic Ribbon Function. *Neuron* 28(3): 857–872.
- Schulenberg B.**, Beechem J. M., Patton W. F. (2003) Mapping Glycosylation Changes Related to Cancer Using the Multiplexed Proteomics Technology: A Protein Differential Display Approach. *Journal of Chromatography B* 793(1). Derivatization of Large Biomolecules: 127–139.
- Shi T.**, Zhang L., Li Z., Newton I. P., Zhang Q. (2015) Expression, Purification and Renaturation of Truncated Human Integrin β 1 from Inclusion Bodies of Escherichia Coli. *Protein Expression and Purification* 107: 13–19.
- Silva A. M. N.**, Vitorino R., Domingues M. R. M., Spickett C. M., Domingues P. (2013) Post-Translational Modifications and Mass Spectrometry Detection. *Free Radical Biology and Medicine* 65: 925–941.
- Sjöstrand F. S.** (1953) The Ultrastructure of the Inner Segments of the Retinal Rods of the Guinea Pig Eye as Revealed by Electron Microscopy. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 42(1): 45–70.
- Smith S. M.**, Renden R., von Gersdorff H. (2008) Synaptic Vesicle Endocytosis: Fast and Slow Modes of Membrane Retrieval. *Trends in Neurosciences* 31(11): 559–568.
- Spiwoкс-Becker I.**, Glas M., Lasarzik I., Vollrath L. (2004) Mouse Photoreceptor Synaptic Ribbons Lose and Regain Material in Response to Illumination Changes. *The European Journal of Neuroscience* 19(6): 1559–1571.
- Steinberg T. H.**, Agnew B. J., Gee K. J., Leung W.-Y., Goodman T., Schulenberg B., Hendrickson J., Beechem J. M., Haugland R. P., Patton W. F. (2003) Global Quantitative Phosphoprotein Analysis Using Multiplexed Proteomics Technology. *PROTEOMICS* 3(7): 1128–1144.
- Sterling P.**, Matthews G. (2005) Structure and Function of Ribbon Synapses. *Trends in Neurosciences* 28(1): 20–29.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(3): 846–849.
- Strauss O.** (2005) The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews* 85(3): 845–881.
- Südhof T. C.** (2004) The Synaptic Vesicle Cycle. *Annual Review of Neuroscience* 27: 509–547.
- Südhof, T. C.** (2012) The Presynaptic Active Zone. *Neuron* 75 (1): 11–25.

Terman J. R., Kashina A. (2013) Post-Translational Modification and Regulation of Actin. *Current Opinion in Cell Biology* 25 (1): 30–38.

Thoreson W. B., Van Hook M. J., Parmelee C., Curto C. (2016) Modeling and Measurement of Vesicle Pools at the Cone Ribbon Synapse: Changes in Release Probability Are Solely Responsible for Voltage-Dependent Changes in Release. *Synapse (New York, N.Y.)* 70(1): 1–14.

tom Dieck S., Altroch W. D., Kessels M. M., Qualmann B., Regus H., Brauner D., Fejtová A., Bracko O., Gundelfinger E. D., Brandstätter J. H. (2005) Molecular Dissection of the Photoreceptor Ribbon Synapse Physical Interaction of Bassoon and RIBEYE Is Essential for the Assembly of the Ribbon Complex. *The Journal of Cell Biology* 168(5): 825–836.

tom Dieck S., Brandstätter J. H. (2006) Ribbon Synapses of the Retina. *Cell and Tissue Research* 326(2): 339–346.

Trepel M. (2011) *Neuroanatomie: Struktur Und Funktion*. Elsevier, Urban&FischerVerlag.

Vollrath L., Spiwox-Becker I. (1996) Plasticity of Retinal Ribbon Synapses. *Microscopy Research and Technique* 35 (6): 472–87.

van den Bogaart G., Thutupalli S., Risselada J. H., Meyenberg K., Holt M., Ridel D., Diederichsen U., (2011) Synaptotagmin-1 May Be a Distance Regulator Acting Upstream of SNARE Nucleation. *Nature Structural & Molecular Biology* 18(7): 805–812.

von Gersdorff H. (2001) Synaptic Ribbons: Versatile Signal Transducers. *Neuron* 29(1): 7–10.

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(6): 1221–1227.

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. *The European Journal of Neuroscience* 11(4): 1335–1348.

Wagner H. J. (1997) Presynaptic Bodies (“ribbons”): From Ultrastructural Observations to Molecular Perspectives. *Cell and Tissue Research* 287(3): 435–446.

Watanabe M., Kono T., Matsushima-Hibiya Y., Kanazawa T., Nishisaka N., Kishimoto T., Koyama K., Sugimura T., Wakabayashi K. (1999) Molecular Cloning of an Apoptosis-Inducing Protein, Pierisin, from Cabbage Butterfly: Possible Involvement of ADP-Ribosylation in Its Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(19): 10608–10613.

West M. C., McDermott B. M. (2011) Ribeye a-mCherry Fusion Protein: A Novel Tool for Labeling Synaptic Ribbons of the Hair Cell. *Journal of Neuroscience Methods* 197(2): 274–278.

Witze E. S., Old W. M., Resing K. A., Ahn N. G. (2007) Mapping Protein Post-Translational Modifications with Mass Spectrometry. *Nature Methods* 4(10): 798–806.

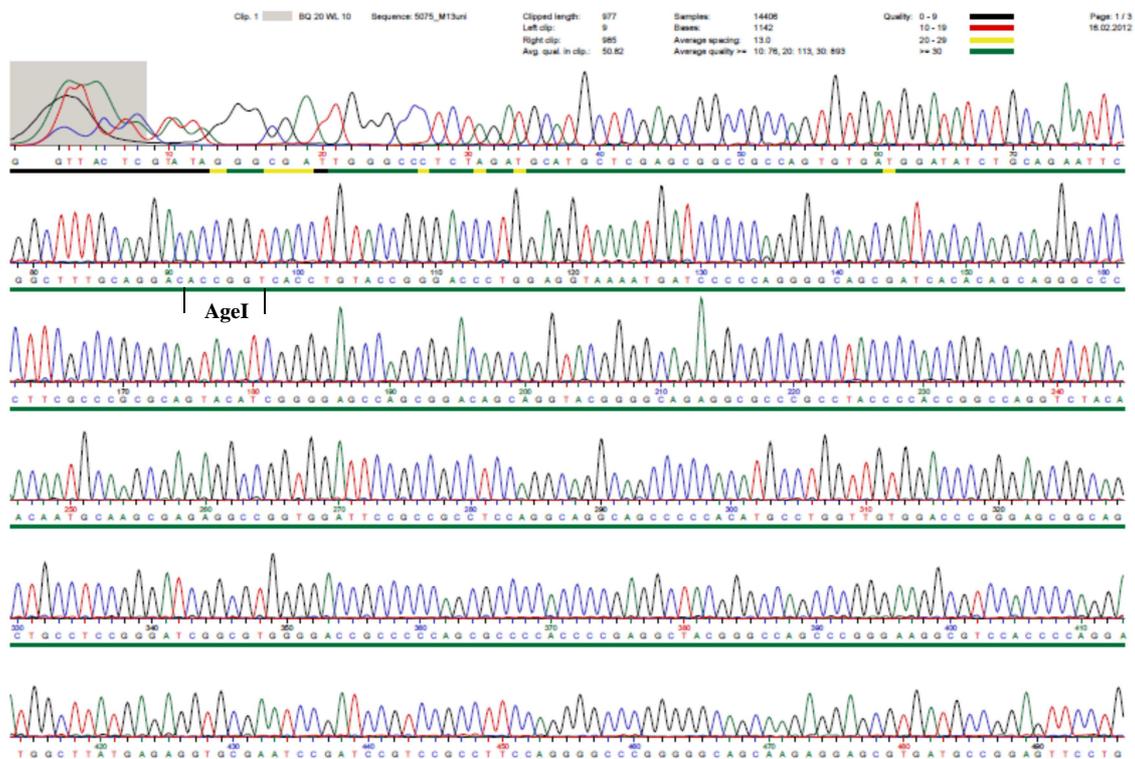
Woodford B. J., Blanks J. C. (1989) Localization of Actin and Tubulin in Developing and Adult Mammalian Photoreceptors. *Cell and Tissue Research* 256(3): 495–505.

Zenisek D., Steyer J. A., Almers W. (2000) Transport, Capture and Exocytosis of Single Synaptic Vesicles at Active Zones. *Nature* 406(6798): 849–854.

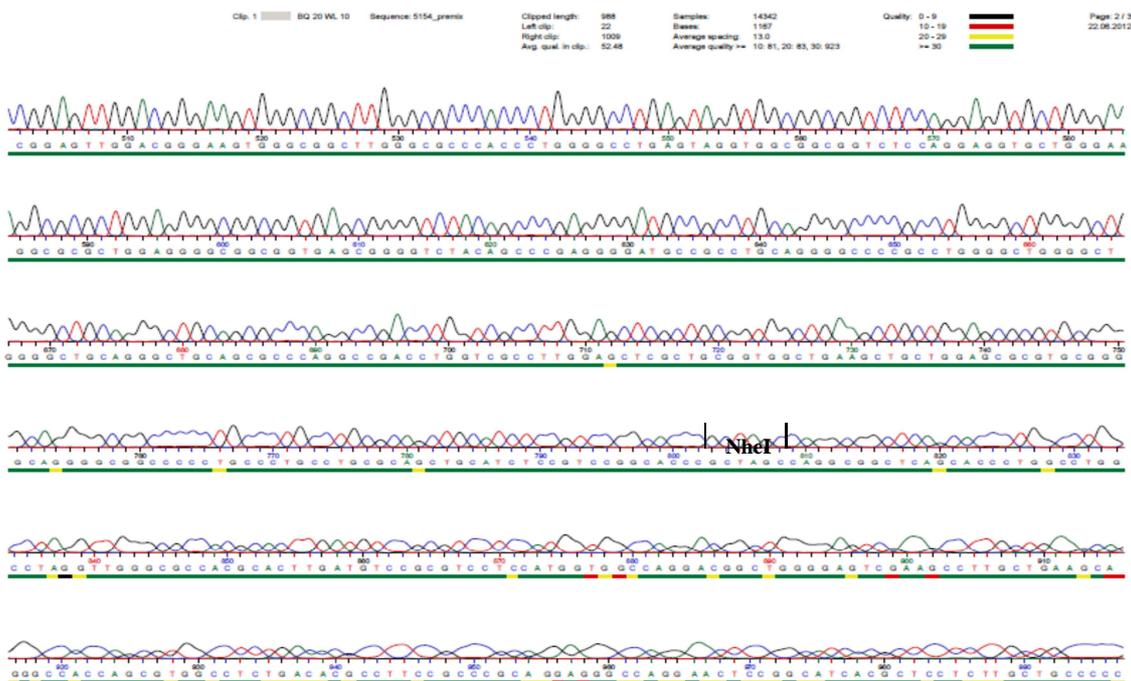
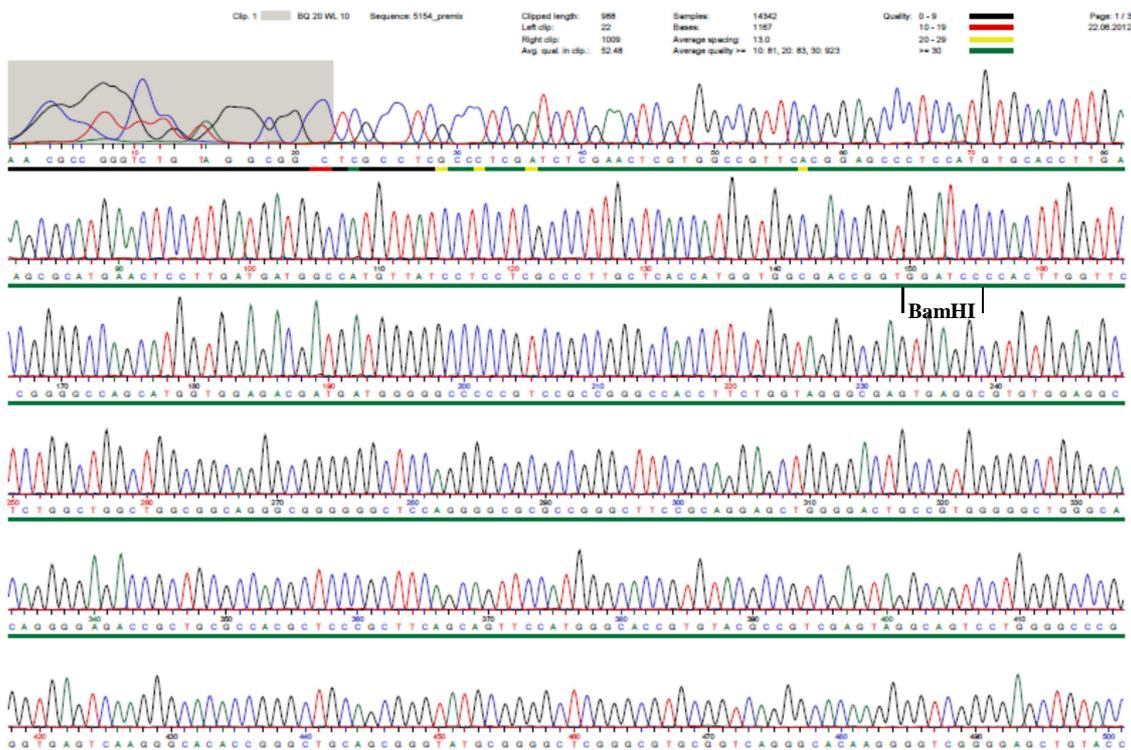
Zenisek D., Horst N. K., Merrifield C., Sterling P., Matthews G. (2004) Visualizing Synaptic Ribbons in the Living Cell. *The Journal of Neuroscience* 24(44): 9752–9759.

Zilles K., Tillmann B. (2010) *Anatomie*. Springer-Verlag.

Inserts 2: AgeI – NheI (forward)



Insert 3: BamHI – NheI (reverse)



7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Anatomischer Aufbau des Auges eines Säugetieres
- Abbildung 2: Schematische Zeichnung der histologischen Gliederung der Retina im Längsschnitt
- Abbildung 3: Schematische Zeichnung der Photorezeptorterminale einer Zapfenzelle in der äußeren plexiformen Schicht der Vertebratenretina
- Abbildung 4: Kryostatschnitt der bovinen Retina (Querschnitt) immunmarkiert mit einem Antikörper gegen RIBEYE
- Abbildung 5: Schematische Illustration einer Ribbonsynapse der Stäbchenzelle
- Abbildung 6: Ultrastrukturelle Darstellung einer retinalen Ribbonsynapse der Karpfenfischart *Carassius carassius*
- Abbildung 7: Aufbau von RIBEYE mit Bindungsstellen von Antikörpern gegen die A- bzw. B-Domäne
- Abbildung 8: Schematische Zeichnung der Verteilung von Aktinfilamenten in der Zapfenzelle
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise der indirekten Immunfluoreszenz
- Abbildung 10: Expressionsmuster von Synaptischen Ribbons in der bovinen Retina mit Anti-AktinC4-Antikörper & Alexa 488 chicken anti mouse (CAM)
- Abbildung 11: Expressionsmuster der Synaptischen Ribbons in der bovinen Retina
- Abbildung 12: Expressionsmuster von Aktin im Kryostatschnitt der Maus-Retina
- Abbildung 13: Immunelektronenmikroskopie eines Schnitts durch die bovine Netzhaut mit Anti-AktinC4 und einem 1 nm-Gold konjugierten Zweitantikörper
- Abbildung 14: Western-Blot-Analysen verschiedener Proteinfractionen aus bovinem Gewebe mit Anti-AktinC4
- Abbildung 15: Kryostatschnitt der Maus-Retina A) und bovinen Retina B) im Vergleich bei Behandlung mit Anti-AktinC4
- Abbildung 16: Schematische Genkarte des bovinen RIBEYE(A) mit Restriktionsschnittstellen und verwendeten Primern
- Abbildung 17: Gelelektrophorese des Restriktionsverdau der in den pJET1.2/blunt – Vektor klonierten PCR-Produkte
- Abbildung 18: Karten der Inserts 1-3 im jeweiligen Klonierungs-Vektor pJET1.2/blunt
- Abbildung 19: Schematische Karte des pRIBEYE(A)mCherry-Plasmids
- Abbildung 20: Das pRIBEYE(A)mCherry-Plasmid

Abbildung 21: Gelelektrophorese des Plasmids RIBEYE(A)mCherry nach Vierfach-Restriktionsverdau mit XhoI, AgeI, NheI und BamHI in regulärer und invertierter Farbgebung

Abbildung 22: Immunfluoreszenz von bovines RIBEYE(A)mCherry exprimierenden HEK293-Zellen

Abbildung 23: Expression von RIBEYE(A)mCherry und RIBEYE(A)EGFP in transfizierten HEK293-Zellen

Abbildung 24: Immunfluoreszenz von RIBEYE(A)mCherry (bovin) transfizierten HEK293-Zellen mit Anti-AktinC4

Abbildung 25: Western-Blot-Analyse von HEK293-Zelllysaten entsprechend transfizierter Zellen

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primär- & Sekundärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Geräte und sonstige Hilfsmittel

Tabelle 5: Reaktionsprotokoll der Polymerasekettenreaktion

Tabelle 6: Primer-Sequenzen

Tabelle 7: Verwendete Restriktionsenzyme und die Länge des resultierenden DNS-Abschnittes

Tabelle 8: Länge der PCR-Produkte

Tabelle 9: Länge der klonierten Fragmente von RIBEYE(A)

9 Danksagung

Mein großer Dank gilt vor allem Herr Prof. Dr. med. Frank Schmitz für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, für seine Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für das konstruktive Interesse, welches er meiner Arbeit entgegengebracht hat. Besonders sind zahlreiche Anregungen zu erwähnen, mit denen er meine Dissertation maßgeblich beeinflusst hat.

Ein herzlicher Dank geht an alle ehemaligen und aktuellen Mitglieder der Arbeitsgruppe Schmitz. Die einzigartige Atmosphäre und die große gegenseitige Unterstützung der Mitglieder haben zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Mayur Dembla und Dr. rer. nat. Ulf Matti, die in verschiedenen Phasen meiner experimentellen Laborarbeit als Betreuer maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dankbar anerkennen will ich ihre immer freundliche und geduldige Bereitschaft, mir unermüdlich mit Rat und Tat beigestanden zu haben.

Ein großer Dank geht an Dr. med. Rizwana Anjum, Ekta Dembla, Dr. rer. nat. Rashmi Katiyar, Dr. rer. nat. Karin Schwarz, Shweta Suiwal, Dr. rer. nat. Silke Wahl, die mich jederzeit unterstützt haben, sei es auf fachlicher, als auch auf moralischer Ebene. Dr. rer. nat. Karin Schwarz bin ich außerdem sehr dankbar für die Durchsicht meiner Arbeit.

Gabriele Kiefer danke ich ganz herzlich für die stets gute Stimmung, die hilfreichen Tipps und die Anleitung für die Arbeit mit Zellkulturen. Außerdem bedanke ich mich bei Silvia Brundaler und Gerlinde Kühnreich für ihre Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Brüdern, meiner Mutter, meinen Großeltern, sowie meinem Partner und meinen Freunden für die Anteilnahme, die Motivation und die wundervollen Stunden jenseits der Arbeit an der Dissertation.

Nicht zuletzt danke ich meinem Vater, der sicher dazu beitragen hat, dass ich diesen Weg eingeschlagen habe.