

Abteilung Neuroanatomie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Medizinische Fakultät
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar



Immunhistochemische Charakterisierung des Expressionsmuster von TIAM1 in der Mausretina

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2020

Vorgelegt von: Alexander Bernhard **geb. am:** 04.07.1990 in Landstuhl

Tag der Promotion:

25.02.2021

Dekan:

Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter

Prof. Dr. med. Frank Schmitz

Prof. Dr. med. Berthold Seitz

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1 Summary	3
2 Einleitung	5
2.1. Anatomie	5
2.1.1 Allgemein.....	5
2.1.2 Anatomie	5
2.1.3 Histologie.....	6
2.1.4 Schichten der Retina	7
2.1.5 Aufbau der Photorezeptorzelle.....	9
2.2 Synapsen	11
2.3 Phototransduktion und Informationsmodulation in der Retina	12
2.3.1 Phototransduktion und Lichtreaktion.....	12
2.3.2 Informationsmodulation in der Retina	13
2.3.2.1 On- und Off-Signalwege.....	13
2.3.2.2 Rezeptive Felder	13
2.4 Die Ribbonsynapse als essenzieller Bestandteil der Retina	15
2.4.1 Funktion	19
2.5 TIAM1:	20
2.5.1 Rac (Rho-ähnliche GTPase)	20
2.5.2 TIAM1: Ein Rac-spezifischer Aktivator	22
2.5.3 Struktur.....	23
2.5.4 Regulation	25
2.5.5 Funktionelle Relevanz des TIAM1/Rac-Signalwegs	25
2.6 Fragestellung dieser Arbeit	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Antikörper:	28
3.1.2 Gewebe	30
3.1.3 Weitere Lösungen und Materialien	31
3.2 Methoden	33
3.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	33
3.2.2 SDS-Page und Western Blot	37
3.2.3 Dotblot-Experimente.....	40
4 Ergebnisse	41
4.1 Immunfluoreszenzexperimente	41
4.1.1 Epifluoreszenzmikroskopie	41

4.1.2 Konfokalmikroskopie.....	44
4.1.3 Präabsorptionsexperimente.....	58
4.2 Western-Blot	59
4.3 Dotblot	61
5 Diskussion	62
6 Literaturverzeichnis	67
7 Abkürzungsverzeichnis	73
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	75
Abbildungsverzeichnis	75
Tabellenverzeichnis.....	76
9 Danksagung.....	77

1 Zusammenfassung

Die Ribbonsynapse ist eine spezialisierte, kontinuierlich aktive, chemische Synapse, die außer in der Retina nur noch in der Cochlea, im Vestibularorgan und in der Epiphyse zu finden ist. Sie zeichnet sich durch das Vorhandensein eines besonderen Zellorganells aus: dem synaptischen Ribbon. Das synaptische Ribbon kann man sich dabei als eine Art „Förderband“ für neurotransmittergefüllte Vesikel in Richtung der präsynaptischen Membran vorstellen. Dadurch kann der hohe Bedarf an Neurotransmittern im synaptischen Spalt der Photorezeptorzelle für einen optimalen Ablauf der Signalweiterleitung gewährleistet werden.

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Schmitz (Anjum et al. 2014) konnte in diesem Zusammenhang die Proteine CASK und Caskin1 im Bereich der aktiven Zone der Photorezeptorzellsynapse nachweisen. Die aktive Zone der präsynaptischen Membran ist ein Bereich, in dem die Exozytose in unmittelbarer Nähe zu Calciumkanälen stattfindet. Die Ribbons sind mit dieser aktiven Zone assoziiert, wo es über verschiedene intra- und extrazelluläre Signale zu einem besonders intensiven Umbau des Aktinzytoskeletts kommt. Dadurch kann der optimale Ablauf der zahlreichen exo- und endozytotischen Prozesse gewährleistet werden. Durch die Fähigkeit der Steuerung der Aktinpolymerisation kann davon ausgegangen werden, dass CASK und sein Interaktionspartner Caskin1 in diesem Zusammenhang eine wesentliche Rolle innehaben. Caskin1 interagiert dabei über eine bestimmte Proteinsequenz mit CASK, die nur noch in wenig anderen Proteinen vorhanden ist. Stafford et al. (2011) konnte durch Proteindatenbankuntersuchungen die gleiche Sequenz in TIAM1 identifizieren und nachweisen, dass zumindest in vitro eine Interaktion mit CASK möglich ist und beide zudem überlappende Funktionen haben.

TIAM1 ist als Rac-spezifischer Austauschfaktor (GEF) an der Steuerung der Rho-ähnlichen GTPase beteiligt und somit in der Lage die Aktinpolymerisation spezifisch zu steuern. Dies ist beispielsweise essenziell für Zellmigration, Invasion und Adhäsion. Das Protein wurde erstmals durch die Arbeitsgruppe Habets et al. 1994 in murinen T-Lymphomzelllinien beschrieben. Dort waren sehr hohe TIAM1 Proteinlevel und verkürzte Varianten, denen die regulatorischen Domänen fehlen, zu finden. Aufgrund der vorhandenen Proteinsequenz und der überlappenden Funktion ist auch eine Interaktion von TIAM1 und CASK in vivo vorstellbar, wodurch die Idee entstand die Expression dieses Proteins in den synaptischen Schichten der Retina zu untersuchen.

Um die Anreicherung von TIAM1 in der präsynaptischen Membran zu untersuchen, verwendete ich die für diesen Zweck im anatomischen Institut der Universität des Saarlandes hergestellten, monoklonalen Antikörper gegen TIAM1 (Klon 7F11, 4D2 und 2D8). Mithilfe Einzel- und Doppelfluoreszenzverfahren konnte ich durch epifluoreszenz- und konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass TIAM1 in der präsynaptischen Terminalen der äußeren und inneren plexiformen Schicht in unmittelbarer

Nachbarschaft zu den synaptischen Ribbons zu finden ist. Hierbei verwendete ich Referenzantikörper, die entweder prä-, oder postsynaptische Signale zeigen. Im Unterschied dazu waren in den nukleären Schichten der Retina keinerlei Signale erkennbar. Durch Western-Blot-Untersuchungen konnte ich das Vorhandensein von TIAM1 in der murinen Retina bestätigen. Die Spezifität der Antikörper für das Protein TIAM1 wurden durch Präabsorptions- und DotBlot-Experimente bewiesen. Die Vermutung, dass TIAM1 in der Präsynapse der Photorezeptorzelle vorhanden sein könnte, konnte ich hiermit bestätigen. Ob und wie eine Interaktion mit CASK oder anderen Proteinen stattfindet und wie dadurch genau die Aktinpolymerisation und Morphologie des synaptischen Endknöpfchens beeinflusst wird, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

1 Summary

The ribbon synapse is a specialized, continually active chemical synapse that is found only in the retina, the cochlea, the vestibular organ and the pineal gland. It is characterized by the presence of a special organelle called the synaptic ribbon. This synaptic ribbon can be considered as a "conveyor belt" of that guides neurotransmitter-filled vesicles towards the presynaptic membrane. In doing so, the high demand for neurotransmitters in the synaptic cleft of the photoreceptor cell can be met, ultimately ensuring optimal signal transduction.

In this context, the research group of Prof. Dr. Schmitz (Anjum et al. 2014) was able to show CASK and Caskin1 in the active zone of the photoreceptor cell synapse. This active zone of the presynaptic membrane is an area where exocytosis takes place in close proximity to calcium channels. The synaptic ribbons are associated with the active zone, where a variety of intracellular and extracellular signals lead to an especially intense restructuring of the actin cytoskeleton, which in turn enables optimal execution of exocytotic and endocytotic processes. Because of their ability to control actin polymerization, it can be assumed that CASK and its interaction partner Caskin1 might play an important role in this context. Caskin1 hereby interacts with CASK through a specific protein sequence found only in a few other proteins. Through the use of protein database analyses, Stafford et al. (2011) were able to identify this same sequence in TIAM1, additionally proving that *in vitro* interaction with CASK is possible and that the two proteins possess overlapping functions.

TIAM1 is involved in the control of the Rho-like GTPase as a Rac-specific exchange factor (GEF) and thus able to deliberately control actin polymerization. This is essential for cell migration, invasion and adhesion. The protein was first described in 1994 by Habets et al., who had discovered high levels of TIAM1 as well as shortened variants thereof within murine T-lymphoma cell lines. Due to their protein sequences and overlapping functions, an *in vivo* interaction between TIAM1 and CASK is at least plausible, which gave rise to the idea of analyzing the expression of TIAM1 in the synaptic layers of the retina.

To examine the enrichment of TIAM1 in the presynaptic membrane, I used monoclonal antibodies for TIAM1 (clone 7F11, 4D2 and 2D8). These antibodies were developed at the anatomical institute of the University of Saarland for precisely this purpose. Through single and double fluorescence methods, I was able to show by confocal and epifluorescence microscopy that TIAM1 can be found in presynaptic axon terminals of the inner and outer plexiform layer – TIAM1 is therefore present in close proximity to synaptic ribbons. Reference antibodies showed either pre- or postsynaptic signals whereas, in contrast, no signals were visible in the nuclear layers of the retina. Western blot analyses confirmed the presence of TIAM1 in the murine retina and the specificity of the antibodies for TIAM1 was established by pre-absorption and DotBlot experiments. In doing so, I confirmed the assumption that TIAM1 is present in

the presynaptic photoreceptor cell. If and how an interaction with Casin1 or other proteins takes place and how this influences actin polymerization and morphology of the axon terminal must be further investigated.

2 Einleitung

2.1. Anatomie

2.1.1 Allgemein

Mit kaum einem anderen Organ können wir unsere Umwelt in solcher Vielfalt wahrnehmen wie mit dem Auge. Hierfür ist ein genaues Zusammenspiel vieler Komponenten, die entweder lichtbrechende oder lichtwahrnehmende Aufgaben haben, essenziell. Der lichtbrechende Teil des Auges besteht aus Hornhaut, Linse und Glaskörper, während der lichtwahrnehmende Teil durch die Retina gebildet wird. In der Retina wird aus dem physikalischen Reiz des Lichts über verschiedene photochemische Prozesse ein neuronales Signal, welches über die einzelnen Zellen innerhalb der Retina moduliert und schlussendlich als Aktionspotential zum Gehirn weitergeleitet wird. Entwicklungsgeschichtlich gehört die Retina, ebenso wie der Sehnerv zum Zwischenhirn. Dies lässt sich beispielweise an der Myelinisierung des N. opticus durch Oligodendrozyten statt Schwannschen Zellen erkennen. Die Augen entstehen als Augenbläschen aus dem unteren Teil des Prosencephalon, aus dem später das Diencephalon hervorgeht. Sie nähern sich dem Oberflächenektoderm und induzieren dort die Ausbildung der Linsenplakode (Anlage der Linse).

2.1.2 Anatomie

Der in der Orbita liegende Augapfel (Bulbus oculi) besteht aus 3 Schichten. Die äußere Schicht, die auch als Tunica fibrosa bulbi bezeichnet wird, besteht aus Sklera und Cornea. Während die Sklera lichtundurchlässig ist, ermöglicht die lichtdurchlässige Cornea den Einfall des Lichts in den Augapfel. Nach innen lagert sich nun die zweite Schicht, die sogenannte Tunica vasculosa bulbi oder einfach Uvea an. Sie ist mit Gefäßen durchzogen, die v.a. für die Versorgung der äußeren Retina-Schichten essenziell sind. Darüber hinaus bildet die Uvea die nicht-epithelialen Anteile von Iris und Corpus ciliare, die zum einen den Lichteinfall und zum anderen die Brechkraft der Linse steuern. Der Uvea lagert sich von Innen nun die Retina oder auch Tunica interna bulbi an. Sie enthält in ihrer Pars optica die lichtwahrnehmenden Sinneszellen.

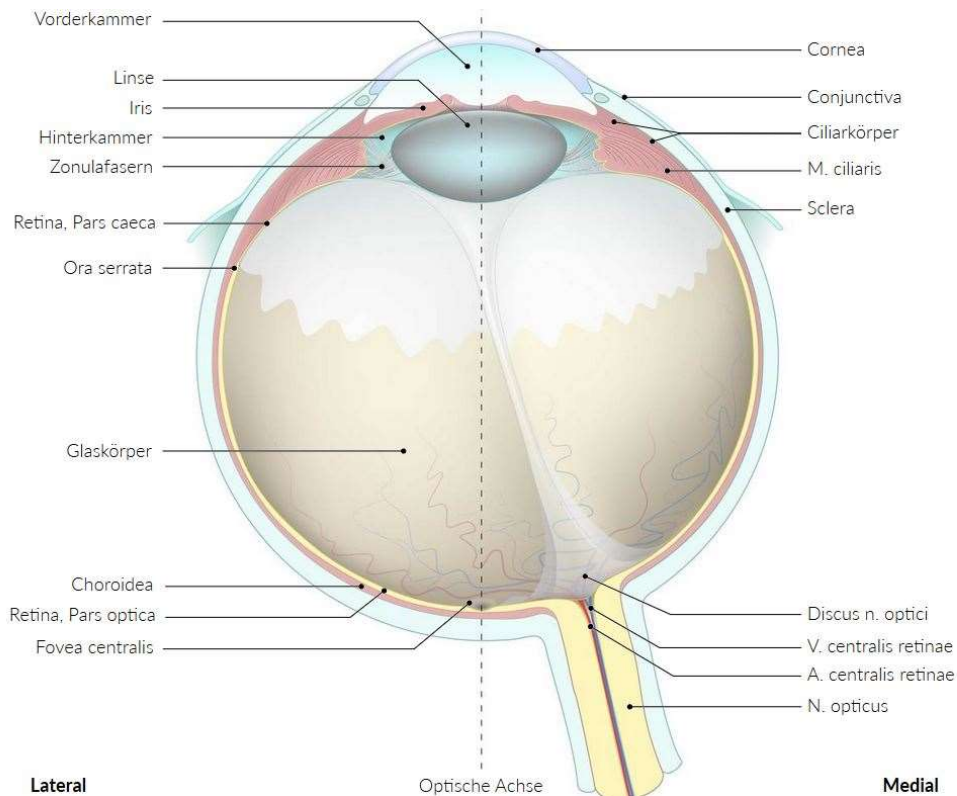


Abbildung 1: Aufbau des Augapfels
Amboss Miamed 2019

2.1.3 Histologie

Die Retina kann weiter in zwei Anteile unterteilt werden: die Pars caeca (oder blinde Teil) und die pars optica (oder sehende Teil). Beide Anteile gehen im Bereich der Ora serrata ineinander über. Dies ist auch der einzige Ort neben dem Austrittsbereich des Sehnervs („blinde“ Fleck), in dem die Retina mit den außen liegenden Schichten des Augapfels fest verwachsen ist.

Das Stratum nervosum stellt den nicht pigmentierten Teil der Retina dar und hat etwa eine Dicke von 0,2 mm. Es enthält die an das Pigmentepithel grenzenden Lichtsinneszellen: die helligkeitswahrnehmenden Stäbchen (skotopische Sehen) und die farbwahrnehmenden Zapfen (photopische Sehen). In den darunter liegenden Zellschichten befinden sich neben den retinalen Gliazellen (Müller-Zellen) die den Photorezeptoren nachgeschalteten bipolaren Zellen, die darauffolgenden Ganglienzellen, welche mit ihren Axonen den Sehnerv bilden und die für die Querverschaltung wichtigen amakrinen und horizontalen Zellen. Insgesamt kann das stratum nervosum in weitere 10 Schichten unterteilt werden.

2.1.4 Schichten der Retina

1. Schicht: Pigmentepithel (Stratum pigmentosum)

Das Pigmentepithel besteht aus einschichtigen und kubisch geformten Epithelzellen, in denen melaninhaltige Pigmentkörnchen enthalten sind. Durch die sogenannte Bruch-Membran wird es von der Uvea getrennt. Zu dessen Aufgabe gehört es, die für die Versorgung der Retina wichtige Verbindung zur Aderhaut herzustellen, ohne dass dabei schädliche Substanzen in die Retina übertreten. Es stellt damit einen Teil der sogenannten Blut-Retina-Schranke dar. Darüber hinaus gehören die Phagozytose abgestoßener Zellmembranteile der Stäbchen und Zapfen, sowie die Sekretion von Wachstumsfaktoren, die für den Stoffwechsel und die Differenzierung der Retina von entscheidender Bedeutung sind, zu seinen Aufgaben.

2. Schicht: Photorezeptorschicht (Stratum segmentorum)

Diese Schicht besteht aus den Zapfen- und Stäbchenzellen mit ihrer klassischen Unterteilung in Außensegmente (hier findet die Lichtrezeption statt) und die Innensegmente (hier befindet sich der stoffwechselaktive Bereich der Sinneszelle). Verbunden werden beide durch das sogenannte Verbindungszilium.

3. Schicht: Äußere Grenzmembran (Stratum limitans externum)

Entspricht einer Zonula adhaerens zwischen Photorezeptoren und Müllerzellen.

4. Schicht: Äußere Körnerschicht (Stratum nucleare externum)

Hier liegen die Perikaryen der Zapfen- und Stäbchenzellen.

5. Schicht: Äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum)

In dieser Schicht liegen die in Richtung Glaskörper gerichteten axonalen Fortsätze der Photorezeptorzellen, sowie die dendritischen Fortsätze der den Sinneszellen nachgeschalteten Bipolarzellen. Zum Teil greifen auf dieser Ebene die Horizontalzellen schon in die Signalverarbeitung ein. Die Fortsätze der postsynaptischen Bipolarzellen, sowie die Fortsätze der Horizontalzellen sind zusammen in die synaptischen Terminalen der Photorezeptoren invaginiert und bilden eine sogenannte Triade (Schmitz 2009).

6. Schicht: Innere Körnerschicht (Stratum nucleare internum)

Hier befinden sich neben den glutamatergen bipolaren Zellen auch die Perikaryen der Horizontal- und amakrinen Zellen. Darüber hinaus finden sich hier ebenfalls die Zellkörper der Müller-Zellen, deren Fortsätze sich in alle Retinaschichten erstrecken. Bei den Müller-Zellen handelt es sich um große, retinale Gliazellen, die zahlreiche Funktionen übernehmen, die im Gehirn sonst von Astrozyten übernommen werden.

7. Schicht: Innere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme internum)

Sie besteht aus den Axonen der bipolaren Zellen und den Dendriten der Ganglienzellen, die hier gemeinsam Synapsen bilden. Zusätzlich bilden die amakrinen Zellen hier ihre Synapsen aus.

8. Schicht: Ganglienzellschicht (Stratum ganglionicum)

Enthält die Perikaryen der ebenfalls glutamatergen Ganglienzellen.

9. Schicht: Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum)

Hierbei handelt es sich um die Axone der Ganglienzellen, die sich innerhalb der Retina noch als marklose Fasern darstellen. Der Grund dafür ist ein möglichst störungsfreies Durchtreten des Lichts durch die verschiedenen Schichten der Retina. Zudem befinden sich in dieser Schicht Blutgefäße.

10. Schicht: Innere Grenzmembran (Stratum limitans internum)

Durch diese Schicht wird die Retina vom Glaskörper getrennt. Sie wird ebenfalls durch die langen Fortsätze der retinalen Gliazellen gebildet. Außerdem befindet sich hier die Basalmembran auf der die Müllerzellfüße aufsitzen.

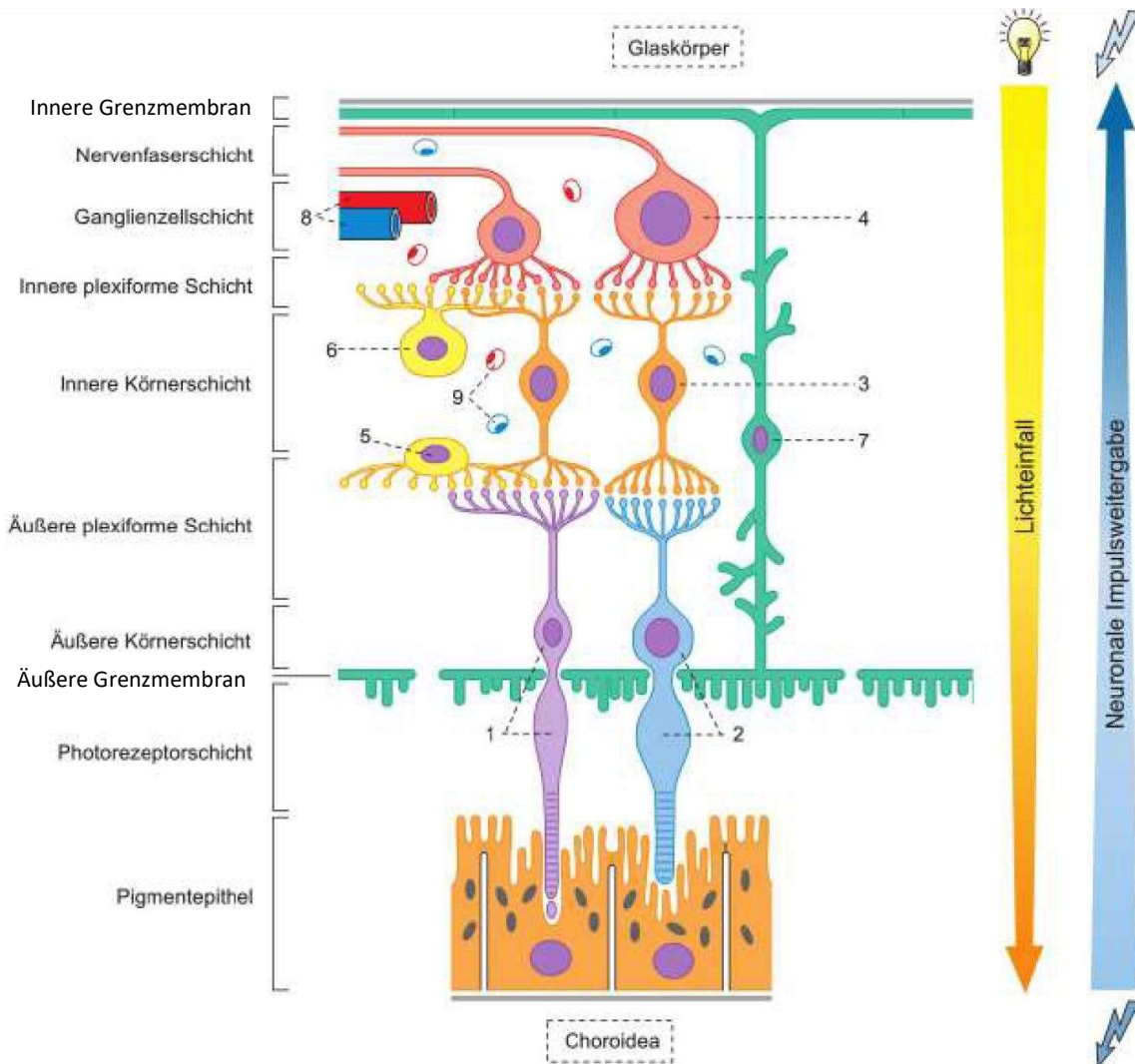


Abbildung 2: Die Zellen der Retina mit ihren Verbindungen

1: Stäbchenzellen, 2: Zapfenzellen, 3: Bipolarzellen, 4: Ganglienzellen, 5: Horizontalzellen, 6: Amakrinzellen, 7: Müller-Zellen, 8: retinale Blutgefäße, 9: Kapillaren (Abbildung aus Trepel 2017)

2.1.5 Aufbau der Photorezeptorzelle

Die Photorezeptoren werden anatomischer Sicht zu den primären Sinneszellen gezählt. Sie bestehen aus einem dem Pigmentepithel zugewandten Außensegment und einem Innensegment, die über ein Zilium miteinander verbunden sind. 6 Millionen Zapfen stehen ca. 120 Millionen Stäbchen gegenüber.

Das Außensegment bildet den lichtwahrnehmenden Teil und enthält die molekularen Bestandteile zur Absorption und photoelektrischen Transduktion. Im Außensegment der Stäbchen liegen ca. 1000 flache Membransäckchen (Disci), die wie Münzen in einer Geldrolle gestapelt sind. In ihrer Lipiddoppelschicht ist das Rhodopsin eingelagert. An der Basis werden ständig neue Disks aus den Innensegmenten übernommen, von wo aus sie in Richtung Spitze der Außensegmente wandern. In den

Stäbchen haben die Diskmembran und die Plasmamembran keinen Kontakt zueinander, während in den Zapfen nicht immer eine isolierte Anordnung zu finden ist.

Das Innensegment stellt den stoffwechselaktiven Bereich der Photorezeptorzelle dar. Hier wird das mitochondrienreiche Ellipsoid, welches für die Energiegewinnung der Zelle verantwortlich ist, und das sogenannte Myoid mit dem endoplasmatischen Retikulum unterschieden. Hier findet die Bildung der photosensiblen Membranen statt. Darüber hinaus finden sich in diesem Bereich kontraktile Strukturen aus parallel angeordneten Aktin und Myosin Filamenten, die je nach Lichtverhältnissen die relative Position von Stäbchen und Zapfen regulieren können, um so die Erregbarkeit bzw. den Arbeitsbereich der verschiedenen Zellen zu beeinflussen (Eckmiller 2014).

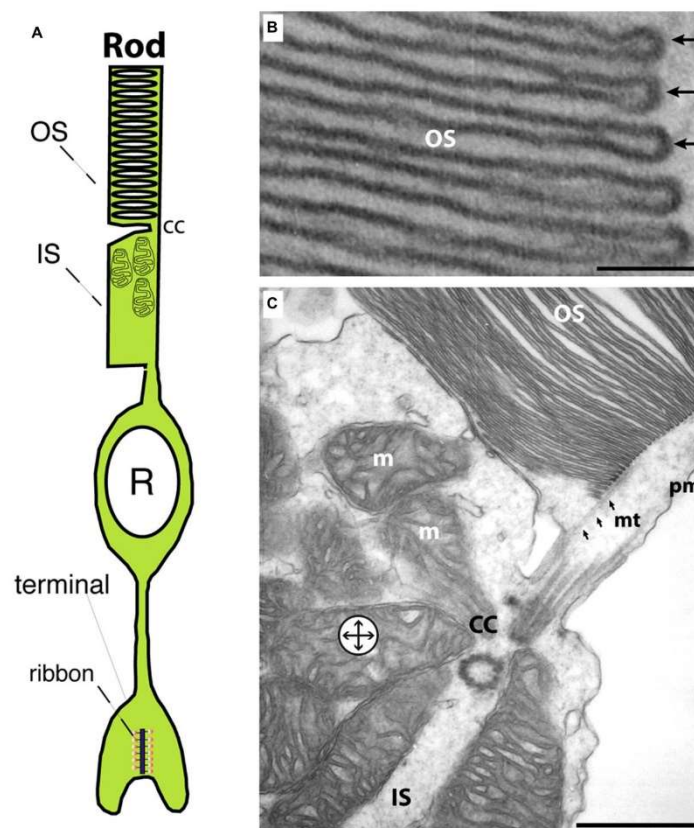


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung eines Stäbchen mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen

A: Schematischer Aufbau einer Stäbchen-Zelle, **B:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Außensegments mit den eng gepackten Membrandisks (Skalierungsbalken: 50 nm), **C:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Übergangsbereich zwischen Außen- und Innensegment (Skalierungsbalken: 250 nm)

OS: Außensegment, **IS:** Innensegment, **cc:** Verbindungszilium, **m:** Mitochondrium, **mt:** Mikrotubuli, **pm:** Plasmamembran (Abbildung aus Schmitz 2014)

2.2 Synapsen

Grundsätzlich werden 2 Arten von Synapsen unterschieden: die elektrische und die chemische Synapse (Meier und Dermietzel 2006). Elektrische Synapsen (Gap junction) leiten die Erregung durch einen engen Zellkontakt (Ionenkanal) direkt von einer Nervenzelle zur Anderen. Elektrische Synapsen arbeiten nahezu latenzfrei. Eine weitere Besonderheit ist die Möglichkeit der bidirektionalen Weiterleitung von Informationen, also einer möglichen Übertragung in beide Richtungen. In der Retina finden wir diese Synapsenart in der OPL (äußere plexiforme Schicht, engl. „outer plexiforme layer) als Verbindung der Zapfen untereinander und in der IPL, als Verbindung der Stäbchenbipolarzellen mit Amakrinzellen und Amakrinzellen untereinander (Wässle und Baykott 1991, Veruki und Hartveit 2002). Chemische Synapsen bestehen klassischerweise aus einem präsynaptischen Endknöpfchen, einem synaptischen Spalt mit einer Breite von ca. 20 nm und einer postsynaptischen Membran. Kommt nun ein Aktionspotential in der Präsynapse an, werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, durch die nun verstärkt Calcium in die Zelle hineinströmen kann. Dieser Calciumeinstrom bewirkt eine Verschmelzung der in der Präsynapse gelegenen Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Der Calciumsensor der Vesikel ist dabei das Protein Synaptotagmin, welches die Aktivierung des Fusionsprozesses initiiert. Eine weitere wichtige Rolle spielen dabei die SNARE-Proteine (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor). Sie befinden sich in der Membran der Vesikel und der Plasmamembran und werden normalerweise von Synaptotagmin auf Abstand gehalten. Durch die Aktivierung kommt es zur Konformationsänderung und Interaktion der SNARE-Komplexe. Dabei interagieren das vesikuläre Synaptobrevin (v-SNARE) mit dem in der Plasmamembran gelegenen Syntaxin oder SNAP-25 (t-SNARE) und bilden eine stabile Einheit, wodurch die Verschmelzung ermöglicht wird (Han und Jackson 2006, Südhof 2012). In den Vesikeln befinden sich Neurotransmitter, die dadurch in den synaptischen Spalt abgegeben werden. Sie können nun zur gegenüberliegenden Seite diffundieren und dort an entsprechende Rezeptoren binden. Aufgrund dieses Systems ist nur eine Weiterleitung von Informationen in eine Richtung möglich (unidirektional). Zudem kommt es zu einer geringen Verzögerung der Informationsweitergabe von ca. 1ms. Grundsätzlich werden die Signale über 2 Arten von Rezeptoren weitergeleitet: Ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Je nach Neurotransmitter werden somit in der postsynaptischen Membran exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) oder inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP) ausgelöst. Im Falle der später beschriebenen Ribbonsynapse spielt vor allem der G-Protein gekoppelte Glutamat-Rezeptor eine wichtige Rolle (Krishnan und Schiöth 2015).

2.3 Phototransduktion und Informationsmodulation in der Retina

2.3.1 Phototransduktion und Lichtreaktion

Der Photorezeptor verwendet cGMP als second messenger. Hierüber kann er zwischen der Diskmembran (Aufnahme des Lichtreizes) und der Plasmamembran (Entstehung des elektrischen Signals) vermitteln. Im Dunklen bildet die Guanylatzyklase permanent cGMP. In der Plasmamembran der Außensegmente befinden sich Ionenkanäle, die öffnen, wenn cGMP an sie bindet (cyclic nucleotide gated channels – CNG-Kanäle). Im Dunklen fließen durch diese CNG-Kanäle positiv geladene Ionen (hauptsächlich Natrium und Calcium) in die Außensegmente. Daraus resultiert ein erhöhtes Ruhemembranpotential und eine permanente Freisetzung von Glutamat an der nachgeschalteten Synapse. Im Falle der Photorezeptoren wird die Antwort auf den ankommenden Lichtreiz durch eine G-Protein-gekoppelte Enzymkaskade gesteuert, die in abgewandelter Form auch in anderen Sinneszellen zu finden ist. Bei den Stäbchen heißt dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptor Rhodopsin (zusammengesetzt aus Opsin und dem photosensitiven 11-cis-Retinal). Das zugehörige G-Protein heißt Transducin und der Effektor ist die Phosphodiesterase (PDE). Bei der Absorption eines Photons entsteht aus dem 11-cis-Retinal das all-trans-Retinal, wodurch über mehrere Zwischenschritte das Rhodopsin in Metarhodopsin II umgewandelt wird, welches seinerseits das Transducin aktiviert. Dies geschieht über den Austausch von GDP gegen GTP. Dabei zerfällt das Transducin in seine Untereinheiten. Die α -Untereinheit aktiviert die PDE, die nun verstärkt cGMP Moleküle zu 5'GMP spaltet. Durch den dabei entstehenden Mangel an cGMP werden die CNG-Kanäle geschlossen. Die Zelle hyperpolarisiert und die Freisetzung von Glutamat in der Photorezeptorzellsynapse wird reduziert. Die Signalkaskade der Zapfenzellen funktioniert im Prinzip genauso, wobei hier teilweise die beteiligten Proteine durch Isoformen ersetzt sind.

Absorptionsmaxima der Sehpigmente:

Stäbchen:	~ 498 nm
Zapfen:	Blau: ~ 420 nm
	Grün: ~ 534 nm
	Rot: ~ 564 nm

Tabelle 1 (Quelle: Bowmaker and Dartnall 1980)

2.3.2 Informationsmodulation in der Retina

Wie in Abbildung 2 gezeigt, findet der Lichteinfall in entgegengesetzter Richtung zur neuronalen Informationsweiterleitung statt. Die Photorezeptoren nehmen den Lichtreiz auf und wandeln ihn über biochemische Prozesse in ein neuronales Signal um, das zuerst auf die Bipolar- und später auf die Ganglienzellen weitergeleitet wird. Schon in der Retina findet eine Modulation der Informationen durch verschiedene Systeme statt. Diese Verarbeitung beruht auf abstuftbaren Abwandlungen des Membranpotentials, synaptischer Übertragung mit chemischen und elektrischen Synapsen und der Erzeugung hemmender und erregender postsynaptischer Potentiale, die über den Sehnerv zum visuellen Cortex weitergeleitet werden.

2.3.2.1 On- und Off-Signalwege

Zapfen übertragen ihre Informationen auf Zapfenbipolarzellen, welche wiederum auf Zapfenganglienzellen weiterleiten. Dabei gibt es 2 Wege der Informationsweitergabe: Zum einen haben wir die sogenannten Off-Bipolarzellen, die durch Glutamat, welches die Zapfen bei Dunkelheit freisetzen, erregt werden (ionotrope Glutamatrezeptoren GluR). Man spricht hierbei vom Dunkelsystem. Daneben gibt es die On-Bipolarzellen, die eine andere Art von Glutamatrezeptoren besitzen und durch Glutamat im Dunkeln gehemmt werden (metabotrope Glutamatrezeptoren mGluR6). Im Hellen, also wenn kein Glutamat freigesetzt wird, sind sie erregt. Hierdurch findet eine erste Aufspaltung des Lichtsignals statt (Wässle et al 2004).

Stäbchen besitzen im Unterschied zu den Zapfen nur eine Art von Bipolarzellen (On-Bipolarzellen). Die Stäbchen Bipolarzelle erregt bei Belichtung eine Stäbchenamakrinzelle, die ihr Signal entweder über eine inhibitorisch wirkende Synapse in den Off-Weg der Zapfenbipolarzelle, oder über eine exzitatorisch wirkende Synapse in den On-Weg speist (Tian et al. 2004, Lukasiewicz et al. 2005, Euler et al. 2014, Behrens et al. 2016, Franke et al. 2017).

2.3.2.2 Rezeptive Felder

Bei den Horizontal- und Amakrinzellen handelt es sich um inhibitorische Interneurone (Transmitter: GABA oder Glycin). Erstere bilden dabei Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht, während die amakrinen Zellen ihre hemmenden Synapsen in der inneren plexiformen Schicht haben. Durch laterale Inhibition entsteht somit ein Hemmungsbereich um ein durch einen Reiz erregtes Neuron. Es entstehen konzentrisch aufgebaute rezeptive Felder. Hierdurch wird der Kontrast gesteigert (Schmidt und Thews 2013). Dabei wird wichtig zu verstehen, dass aufgrund der rezeptiven Felder die Aktivität der Ganglienzellen unabhängig von der absoluten Intensität des Lichtreizes wird. Es werden vielmehr

Informationen über Kontrast zwischen Zentrum und Umfeld, als über die Helligkeit selbst, weitergeleitet. Rezeptive Felder sind also Netzhautbezirke, die über ein bestimmtes visuelles Neuron erregt oder gehemmt werden. Kleinere Felder ermöglichen ein besseres Auflösungsvermögen, während größere Felder sich durch eine bessere Kontrastfähigkeit auszeichnen.

Das Verhältnis von Photorezeptorzelle zu Bipolar- und Ganglienzelle liegt außerhalb der macula lutea (gelber Fleck) bei 125:30:1. Es folgt also dem Konvergenzprinzip (Graumann und Sasse 2005).

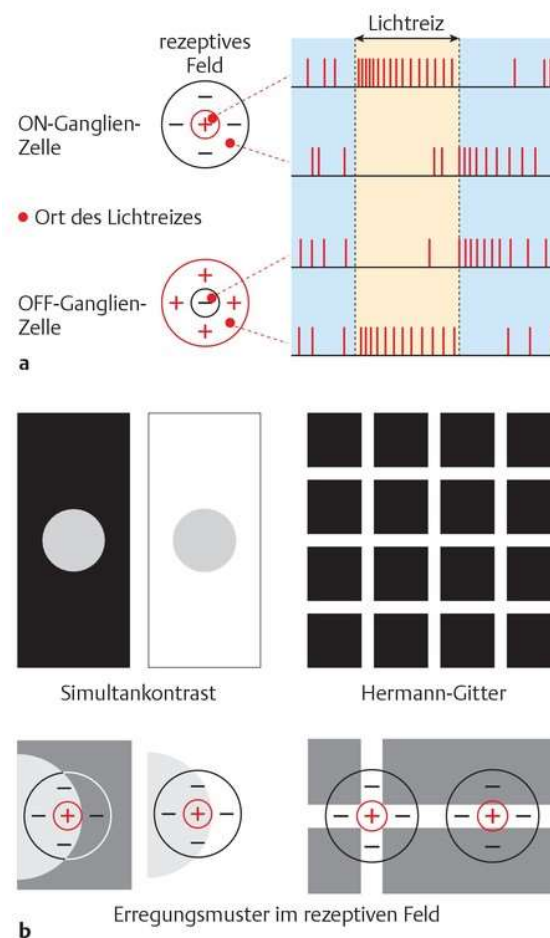


Abbildung 4: Verrechnung erregender und hemmender Informationen im Bereich von rezeptiven Feldern
a: Ganglienzellen besitzen konzentrische und antagonistische rezeptive Felder: ON-Ganglienzellen werden durch Licht im Zentrum angeregt (Signalrate steigt an) und im Umfeld gehemmt (Signalrate sinkt), OFF-Ganglienzellen reagieren hierzu genau entgegengesetzt. **b:** Bei Lichteinfall auf Zentrum und Umfeld werden Erregung und Hemmung verarbeitet, die Folge ist der Simultankontrast: Dadurch erscheint das graue Feld auf schwarzem Grund heller als auf weißem Grund. Beim Hermann-Gitter ist die Hemmung an den „Kreuzungen“ stärker als im Bereich der Straßen, wodurch sie dunkler erscheinen. Maßgeblich abhängig ist dieser Effekt allerdings besonders von der Größe der rezeptiven Felder: So sind die rezeptiven Felder im Bereich der Fovea centralis (dem Ort des schärfsten Sehens) so klein, dass das Zentrum und das Umfeld meistens gleich belichtet werden und dadurch der Effekt nicht zum Tragen kommt. Dies wird deutlich, wenn man eine der „Kreuzungen“ fixiert. (aus Duale Reihe Physiologie 2012)

2.4 Die Ribbonsynapse als essenzieller Bestandteil der Retina

Ribbons sind in der präsynaptischen Terminalen gelegene, elektronendichte, bandförmige Strukturen (Sjöstrand 1958, Dowling 1987). In gewöhnlichen elektronenmikroskopischen Aufnahmen haben diese speziellen Strukturen ein balkenähnliches Aussehen, mit einem Ende in der Plasmamembran verankert und dem anderen Ende ins Zytoplasma ragend (Dowling 1987), (Abbildung 5). Weitere Untersuchungen an ultradünnen Schnitten haben gezeigt, dass das balkenähnliche Profil von Querschnitten tellerähnlicher Strukturen entsteht (Sjöstrand 1958, McCartney und Dickson 1985, Rao-Mirotnik et al 1995), wie in Abbildung 6 gezeigt. Außerdem entsteht durch das Beugen entlang des synaptischen Endknöpfchens eine hufeisenförmige Optik. Im Unterschied dazu zeigen sie in der IPL (innere plexiforme Schicht, engl. „inner plexiforme layer“) eine eher kugelige Gestalt (tom Dieck und Brandstätter 2006, Matthews & Fuchs 2010, Maxeiner 2016, Moser & Grabner & Schmitz 2019).

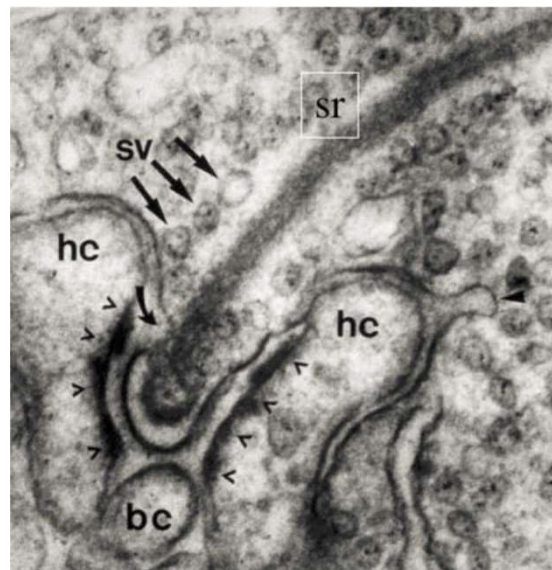


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Ribbonsynapse in der OPL von *carassius carassius*

sr: Ribbonsynapse, **sv:** synaptische Vesikel, **hc:** Horizontalzelle, **bc:** Bipolarzelle
Pfeilköpfe markieren die Endozytose, gebogene Pfeil zeigt die Exozytose-Zone (Schmitz 2009)

Ribbonsynapsen stellen eine auf die Anforderungen des Sehvorgangs spezialisierte Synapse dar, die außer in der Retina nur noch in der Cochlea, im Vestibularorgan und der Epiphyse zu finden sind (Smith und Sjöstrand 1961, Hopsu und Arstila 1964, Dowling 1987, Jastrow et al. 1997, Sterling 1998, Lenzi et al. 1999). Wie bereits weiter oben beschrieben, bestehen die besonderen Anforderungen der Synapsen

Die Vesikel im Bereich des synaptischen Ribbons können in 3 wesentliche Depots oder Pools unterschieden werden. Der erste Pool ist verhältnismäßig klein, dafür aber unmittelbar freisetzbar, da hier die Vesikel schon mit der Membran der aktiven Zone in Kontakt stehen (=Rapidly releasable pool, ca. 100 Vesikel). Ihm folgt ein größerer Reservepool (Releasable and first reserve pool). Hier stehen die Vesikel schon mit dem Ribbon in Kontakt und können bei Bedarf schnell in Richtung aktive Zone transportiert werden (ca. 600 Vesikel; Sterling und Matthews 2005). Als letzten Pool haben wir die Vesikel die noch keinen Kontakt zum synaptischen Ribbon haben (Reserve pool). So beobachtet man bei einem moderaten Calcium Level in der Präsynapse eine Verschmelzung von ca. 50 Vesikel/Sekunde, während bei maximaler Calciumkonzentration teilweise bis zu 500 Vesikelverschmelzungen pro Sekunde möglich sind (Parson et al. 1994, Rieke und Schwartz 1996, von Gersdorff et al. 1996). Diese hohe Rate an freigegebenen Vesikeln ist besonders vor dem Hintergrund bemerkenswert, dass bei einer Synapse des Hippocampus (als Beispiel für eine herkömmliche Release-Rate) im Vergleich nur eine maximale Release-Rate von ca. 20 Vesikeln/Sekunde erreicht werden kann (Juusola et al. 1996).

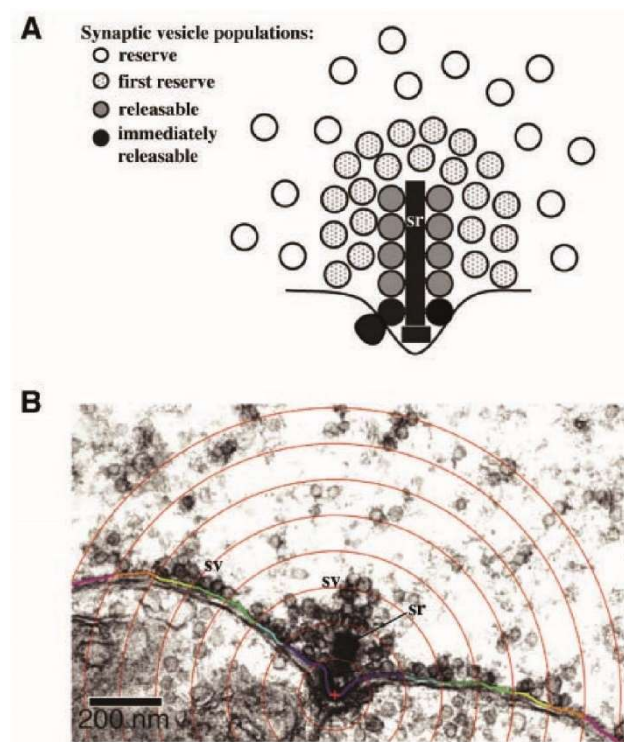


Abbildung 7: Synaptic vesicle population

A: Schemadarstellung, **B:** Elektronenmikroskopische Aufnahme
sr: synaptic ribbon, **sv:** synaptic vesicle (Schmitz 2009)

Die Verbindung des synaptischen Ribbons mit der präsynaptischen Membran geschieht über die sogenannte „arciform density“ (McLaughlin 1976). Sie sind umgeben von L-Typ-Calcium-Kanälen (Cav1.4), ein weiterer Unterschied der Ribbonsynapse zu „herkömmlichen“ Synapsen, die andere

Calciumkanalsubtypen (N-, P/Q- oder R-Typ Kanäle) in der präsynaptischen Membran besitzen (Heidelberger und Matthews 1992, Nachman-Clewner et al. 1999).

Grundsätzlich unterscheidet sich eine Ribbonsynapse von ihrer Proteinzusammenstellung nicht von einer herkömmlichen Synapse (von Kriegstein et al. 1999) mit Ausnahme des von Schmitz et al. (2000) beschriebenen, einzigen ribbonspezifischen Proteins RIBEYE (Zusammensetzung der Worte „Ribbon“ und „Eye“). Es spielt eine zentrale Rolle in der Funktionsweise dieser Synapsen und stellt zudem mit knapp 67% die wesentliche Komponente des Ribbons dar (Zenisek et al. 2004). RIBEYE besteht aus 2 Domänen. Einer A-Domäne, die so vorher nicht bekannt war und spezifisch für verschiedene Arten ist, und einer B-Domäne, die bis auf ca. 20 Aminosäuren identisch zu dem Protein CtBP2 ist. In einem Arbeitsmodell von Schmitz 2000 wird RIBEYE als das Schlüsselprotein des Transportprozesses vermutet, welches über seine A-Domäne große Aggregate bildet und mit seiner NAD(H) bindenden B-Domäne auf der Oberfläche mit den Vesikeln interagiert.

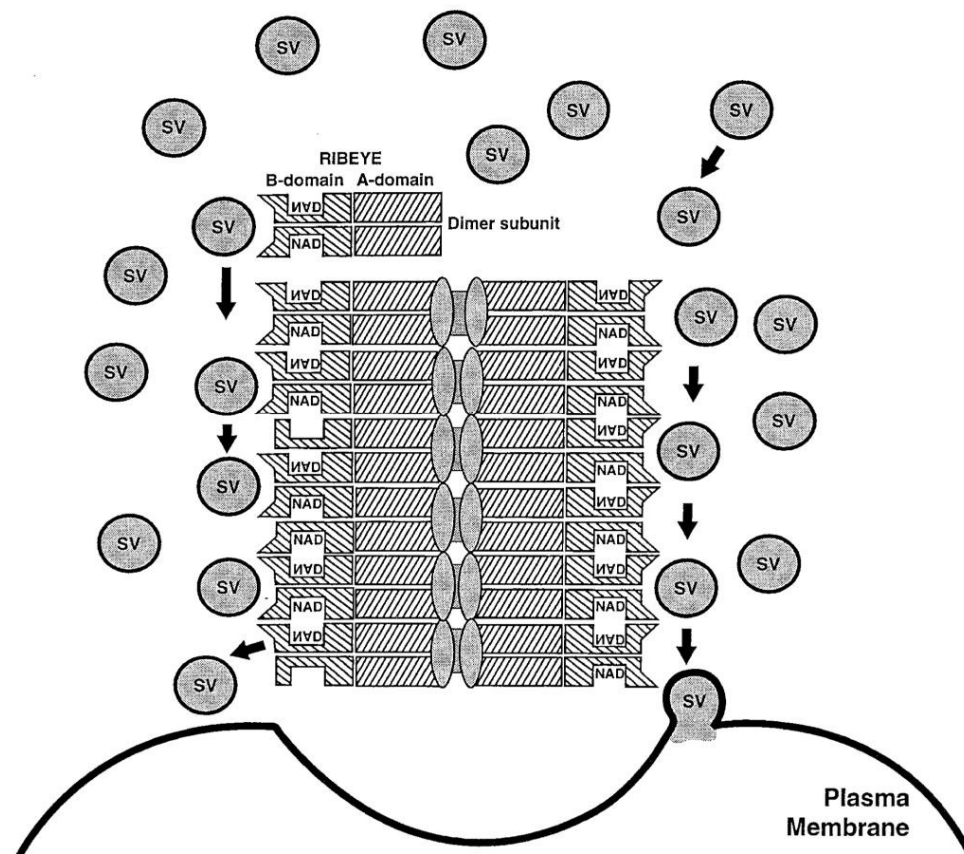


Abbildung 8: Arbeitsmodell für RIBEYE
 Sv: synaptic ribbon (Schmitz et al 2000)

Zusätzlich finden wir an der Basis des synaptischen Ribbons das Protein RIM2 (Rab3-interacting molecule). Andere gehäuft im synaptischen Ribbon vorkommende Proteine sind KIF3A (Muresan et al. 1999), Piccolo und Bassoon (Brandstätter et al. 1999, Dick et al. 2001), sowie CASK und Caskin1. CASK (Calcium/calmodulin- dependent serine protein kinase) ist ein Gerüstprotein, welches verstärkt im Gehirn angereichert vorkommt und dort vor allem in den synaptischen Membranen (Hsueh et al. 1998) lokalisiert ist. Dort ist dieses Protein an zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen, beispielsweise in der Gehirnentwicklung, Formation und Adhäsion von Synapsen, sowie der Aufrechterhaltung der Zellpolarität beteiligt (Atasoy et al. 2007, Hsueh et al. 2006 + 2009). Caskin1 ist dagegen ein Protein, das noch nicht lange bekannt ist und dessen Funktion noch größtenteils unbekannt ist. Allerdings ist Caskin1 in der Lage mit CASK über eine spezifische Peptidsequenz zu interagieren.

2.4.1 Funktion

Wie bereits erwähnt, stellt die Ribbonsynapse eine Spezialisierung gewöhnlicher Synapsen dar, die durch eine kontinuierliche Freisetzung von Neurotransmitter gekennzeichnet ist. Es handelt sich um dynamische Strukturen, die in der Lage sind, ihre Anzahl und Struktur sowohl an die Lichtverhältnisse, als auch an innere Gegebenheiten wie den zirkadianen Rhythmus anzupassen (Wagner 1996, Vollrath und Spiwox-Becker 1996, Schmitz 2009). So wird beispielsweise in Stäbchenzellsynapsen der Mausretina während der Belichtungsphase Material des synaptischen Ribbons entfernt. In Dunkelphasen wird Material hinzugefügt. Die strukturellen Veränderungen widerspiegeln auch funktionelle Veränderungen, die sich auf die Aktivität der Synapse auswirken. So sind beispielsweise bei hohen Release-Raten (in der Dunkelheit) die synaptischen Ribbons eher lang, und werden kürzer, wenn die Release-Rate abnimmt (Balkema et al. 2001, Spiwox-Becker et al. 2004, Schmitz et al. 2009). Der Transportmechanismus der Vesikel entlang des synaptischen Ribbons ist bislang noch nicht endgültig verstanden.

2.5 TIAM1:

2.5.1 Rac (Rho-ähnliche GTPase)

Rac-Proteine gehören genau wie RhoA und Cdc42 zur Gruppe der Rho-ähnlichen GTPasen. Diese Rho-ähnlichen GTPasen sind eine Untergruppe der Ras-Superfamilie. Rho steht dabei für „Ras homologous“. Ihre Aufgaben bestehen vor allem darin verschiedene zelluläre Prozesse zu steuern, besonders die Bildung und Organisation des Aktin-Zytoskeletts, die Regulation der Gentranskription und Kontrolle von Zellwachstum, Zelladhäsion sowie Zellmigration (Van Aelst und D’Souza-Schorey 1997, Hall 1998, Jaffe 2009, Sadock und Marshall 2014, Svensmark und Brakebusch 2019). Aufgrund ihrer Funktion, die wesentlichen Einfluss auf die Zellmorphologie und Zell-Zell-Interaktion hat, spielen sie eine wichtige Rolle in Bezug auf onkogene Transformation, Tumordinvasion und Metastasierung (Habets et al. 1994, Michielis et al. 1997, Malliri und Collard 2003, Ridley 2004, Baugher et al. 2005, Chan et al. 2005, Engers et al. 2007). Hier werden sie auch immer häufiger als diagnostisch relevante Markerproteine eingesetzt.

Rho-GTPasen agieren als eine Art molekularer Schalter, über den zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenem Zustand gewechselt werden kann. Die Aktivität der Rho-Proteine wird im Wesentlichen durch 3 verschiedene Proteingruppen reguliert.

Es gibt Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factors, GEFs), über die der Austausch von GDP durch GTP katalysiert wird. Diese Rho-GEFs können durch die Stimulation von Oberflächenrezeptoren, wie z.B. Rezeptor-Tyrosinkinasen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Adhäsionsrezeptoren (Cadherine und Integrine) aktiviert werden (Ridley und Hall 1992, Hall 1998). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und damit verbunden zur Bindung verschiedener Effektormoleküle und letztendlich zur Aktivierung zahlreicher nachgeschalteter Signalwege.

Daneben gibt es GAPs (GTPase-aktivierende Proteine). Diese Proteine steigern die intrinsische Hydrolyserate und führen damit zu einer Inaktivierung bzw. Aufhebung der Signalübertragung (Hall 1998, Malliri und Collard 2003).

Ebenfalls beteiligt sind GDIs (Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren). Diese können an inaktive GDP-gebundene Rho-GTPasen binden, wodurch jene von der Zellmembran abgekoppelt werden können. Im Zytoplasma ist der Austausch der Nukleotide durch die membranassoziierten Rho-GEFs allerdings nicht mehr möglich (Sander und Collard 1999, Hall und Nobes 2000, Etienne-Manneville und Hall 2002, Malliri und Collard 2003, Mertens et al. 2006).

Auf die Aktivität der Rho-ähnlichen GTPasen kann also auf verschiedenen Wegen Einfluss genommen werden. So besteht beispielsweise die Möglichkeit die Aktivität durch Hochregulation der GEF-Aktivität oder eben durch Herunterregulation der GDI-Level zu steigern (Sun et al. 2006). Ebenfalls wäre eine Senkung der GAP-Proteinlevel vorstellbar (Mira et al. 2000). Allerdings ist nicht nur eine

Regulation über die Veränderung der eben erwähnten Regulator-Proteinlevel möglich. Auch Veränderung der Expression und der Lokalisation der Rho-ähnlichen GTPase, sowie Mutationen (beispielweise aktivierend) sind vorstellbar (Sun et al. 2006, Bustelo et al. 2007).

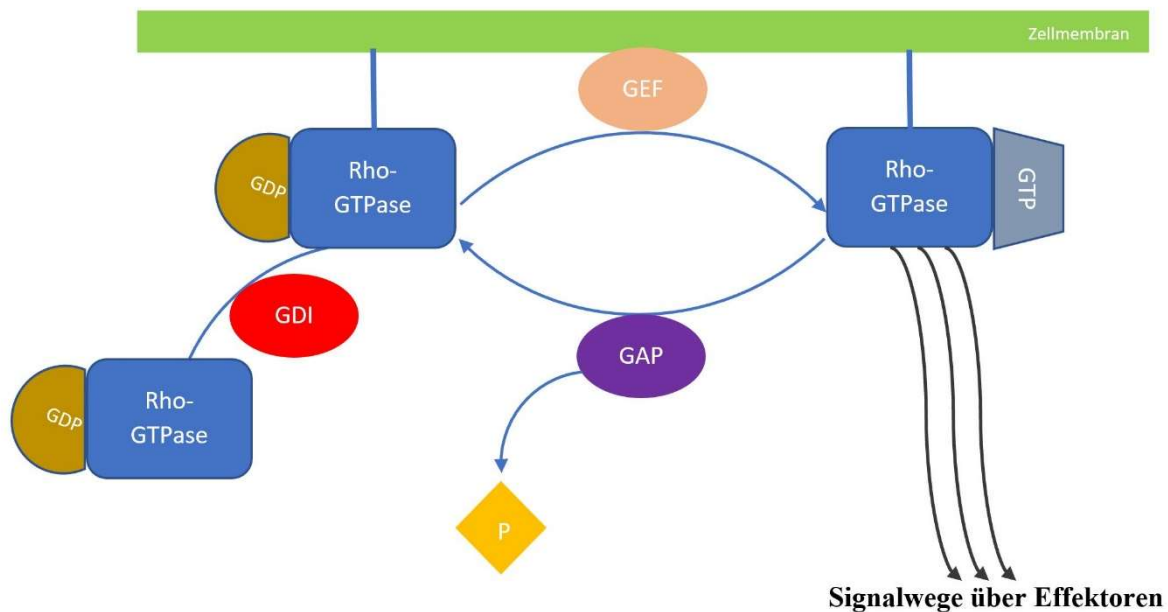


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Regulation von Rho-GTPase

GEF: Guaninnukleotid-Austauschfaktor), **GAP:** GTPase-aktivierendes Protein, **GDI:** Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor, **GTP:** Guanosintriphosphat, **GDP:** Guanosindiphosphat, **P:** Phosphat (Abbildung Bernhard 2020)

Es sind momentan 3 verschiedene Rac-Proteine bekannt (Rac1-3). Rac1 wird ubiquitär exprimiert, Rac2 ist hämatopoesespezifisch und Rac3 wird am stärksten im Gehirn, geringfügig auch in Plazenta, Herz oder Pankreas, exprimiert. Obwohl sie alle von verschiedenen Genen kodiert werden, ist die Aminosäuresequenz dieser 3 Proteine im hohen Maße identisch (Haataja et al. 1997, Hajdo-Milasinovic et al. 2007). Vor allem Rac1 und Rac3 ähneln sich in Bezug auf ihre Effektorbindungsstellen und jene Regionen, die für den Nukleotidaustausch verantwortlich sind. Allerdings unterscheiden sie sich im Bereich ihres carboxyterminalen Endes. Dort werden die letzten 3 Aminosäuren als CAAX-Region bezeichnet. Diese CAAX-Region ist für die Isoprenylierung und die damit verbundene Membranlokalisierung verantwortlich. In direkter Nachbarschaft zur CAAX-Region liegt die sogenannte polybasische Region (PBR). Sie dient als zusätzliche Bindungsstelle für Effektoren oder GEFs. Auch diese Region unterscheidet sich zwischen Rac1 und Rac 3 (Haataja et al. 1997, Hajdo-Milasinovic et al. 2007). Beide Rac-Proteine zeigen hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften (Effektorinteraktion,

Nukleotidbindung etc.) starke Ähnlichkeiten, besonders vergleichbar ist hierbei der TIAM1-induzierte Nukleotidaustausch (Haeusler et al. 2003).

2.5.2 TIAM1: Ein Rac-spezifischer Aktivator

TIAM1, als zentrales Protein dieser Arbeit, ist ein solcher Rac-spezifischer Austauschfaktor (GEF). Dieses Protein und das zugehörige Gen wurden erstmals von der Arbeitsgruppe Habets et al. 1994 in einer murinen T-Lymphomzelllinie beschrieben. TIAM1 steht dabei für „T-Lymphoma invasion and metastasis“. 1995 wurde das humane TIAM1-Gen auf Chromosom 21 (21q22.1) beschrieben, welches in hohem Maße mit dem murinen TIAM1-Gen übereinstimmt (Habets et al. 1995, Mertens et al. 2003). Die entsprechenden Lymphomazellen zeigten eine erhöhte Volllängen-TIAM1-Expression (FL-TIAM1) oder die Expression einer am N-Terminus verkürzten Mutante von TIAM1. Diese verkürzte Variante wird auch als C1199-TIAM1 bezeichnet, da es sich dabei um die 1199 Aminosäuren, vom C-Terminalen Ende aus gezählt (das Volllängeprotein besitzt 1591 AS), handelt (Habets et al. 1994, Michielis et al. 1997, Engers et al. 2000, Engers et al. 2001).

TIAM1 wird aber nicht nur in Lymphomzellen oder damit verwandten Geweben gebildet, sondern im Prinzip in fast allen adulten Geweben exprimiert. Besonders hohe Expressionen finden wir dabei im Gehirn, Hoden und der Epidermis. Verschiedene maligne Tumorzelllinien (beispielsweise Retinoblastom, Lungezell-CA, Nierenzell-CA, Prostata-CA) zeigen eine erhöhte Expression an TIAM1 (Engers et al. 2000, Minard et al. 2004, Mertens et al. 2006, Wang et al. 2012).

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei TIAM1 um einen Rac-spezifischen Austauschfaktor (GEF) und damit verbunden um einen wichtigen Regulator und Aktivator dieser Rho-ähnlichen GTPase. Normale TIAM1 Proteinlevel in der Zelle sind essenziell für verschiedene zelluläre Funktionen. Dazu gehören beispielsweise die Regulation von Zellmigration, Invasion und Adhäsion. In diesem Zusammenhang steht die Steuerung der Aktinpolymerisation, die gerade in der Ribbonsynapse von großer Bedeutung ist.

Bei malignen Tumorzelllinien ist diese empfindliche Regulation durch erhöhte TIAM1 Expressionslevel gestört. Neben den bereits erwähnten Aufgaben spielt TIAM1 eine wichtige Rolle in der Regulation von endozytotischen Prozessen. Hierbei kann es beispielsweise durch vermehrte Internalisierung von in der Zellmembran lokalisierten Proteinen wie beispielsweise E-Cadherin zur Loslösung der Zelle aus dem umliegenden Gewebeverband kommen. Durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten kommt es auch zum Verlust der Polarität der Zelle, wodurch aus der Epithelzelle eine Zelle mit mesenchymalen Eigenschaften entsteht. Dieser Vorgang wird als *epithelial-mesenchymale Transition* (EMT) bezeichnet. Die Zelle ist nun unter anderem in der Lage die Basalmembran zu durchwandern, eine Eigenschaft, die charakteristisch für maligne Tumorzellen ist.

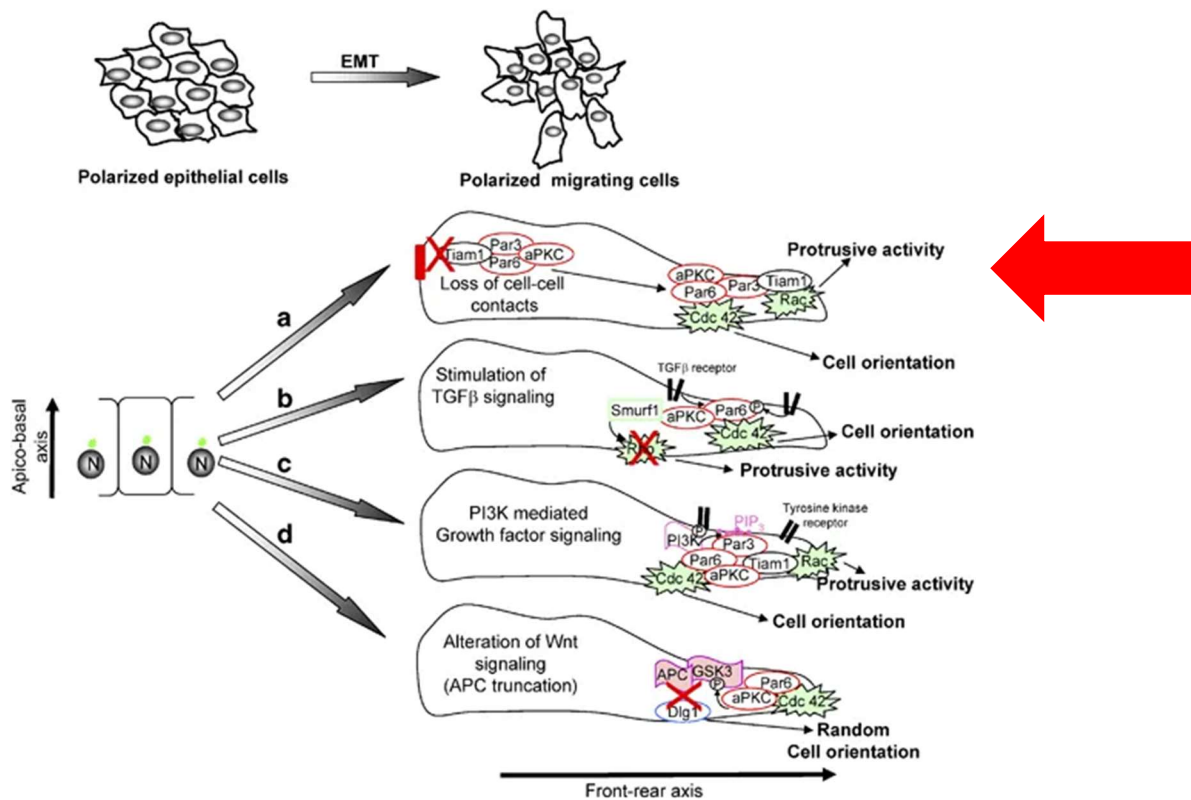


Abbildung 10: Stark vereinfachte Darstellung von Störungen der Zellorientierung

(a) Änderung der Zell-Zell-Kontakte führt zur Relokalisation polaritätsbestimmender Proteine. Der Par3-TIAM1-Rac Signalweg spielt dadurch eine wesentliche Rolle in der Zellorientierung und nachfolgend in der malignen Entartung (Abbildung von Manneville 2008)

2.5.3 Struktur

Das Volllängenprotein von TIAM1 besteht aus insgesamt 1591 AS und besitzt dabei ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 177 kDa (Habets et al. 1994). TIAM1 besitzt mehrere funktionelle Domänen, wobei vor allem die C-terminal lokalisierte Kombination aus Dbl-homologen (DH) und Pleckstrin-homologen (PH) Domänen für Rac-GEFs spezifisch ist (Michielis et al. 1997, Mertens et al. 2006). Über diese Domänen wird der Guaninnukleotidaustausch gesteuert (Mertens et al. 2003).

Neben diesen vor allem katalytisch aktiven Domänen, die als Einheit bezeichnet werden können (DH-PHc), gibt es noch weitere wichtige, in Richtung N-Terminales Ende gelegene Domänen, die essenzielle Aufgaben übernehmen. So besitzt TIAM1 eine weitere PH-Domäne (PHn), die zusammen mit einer angrenzenden Coiled-Coil-Region (CC) und einer sich daran anschließenden sogenannten Extended-Domäne (Ex) eine wichtige Funktionseinheit bildet. Diese als PHn-CC-Ex bezeichnete Region ist für die Lokalisation von TIAM1 in der Plasmamembran verantwortlich (Michielis et al. 1997, Mertens et al. 2003, Fleming et al. 2004). Diese Lokalisation ist zum einen für die Induktion der Rac-vermittelten Aktin-angereicherten Membranausstülpungen („membrane rufflings“) und zum anderen für die Stimulation der c-Jun NH₂-terminalen Kinase (JNK) notwendig (Michielis et al. 1997).

Weitere Domänen sind die N-terminal gelegenen PEST-Domänen und eine potenzielle Myristoylierungsstelle, die als Lipidanker TIAM1 vermutlich in der Plasmamembran einbettet (Mertens et al. 2003). „PEST“ steht für die Abfolge von Aminosäuren: Prolin (**P**), Glutamat (**E**), Serin (**S**), Threonin (**T**). Diese Domäne führt zu einer geringeren Halbwertszeit des Proteins und führt zu einem schnelleren Abbau im Proteasom. Die Aktivität der PEST-Sequenzen wird durch Phosphorylierung benachbarter Domänen reguliert. So kommt es beispielsweise bei der verkürzten Mutante von TIAM1 (C1199-TIAM1) zum Verlust der PEST-Sequenzen und damit zu einer höheren Stabilität dieses Proteins (Mertens et al. 2003, Minard et al. 2004).

Weiterhin besitzt TIAM1 eine Ras-bindende-Domäne (RBD), durch die TIAM1 direkt mit aktiviertem Ras interagieren kann (Mertens et al. 2003). In direkter Nachbarschaft zur RBD befindet sich zu schließlich eine „PSD95/DlgA/ZO-1“-Domäne (PDZ), die auch als „Discs large homology region“ (DHR) bezeichnet wird und bei vielen Zytoskelettproteinen vorhanden ist, welche mit Zell-Zell-Kontakten verbunden sind (Minard et al. 2004)

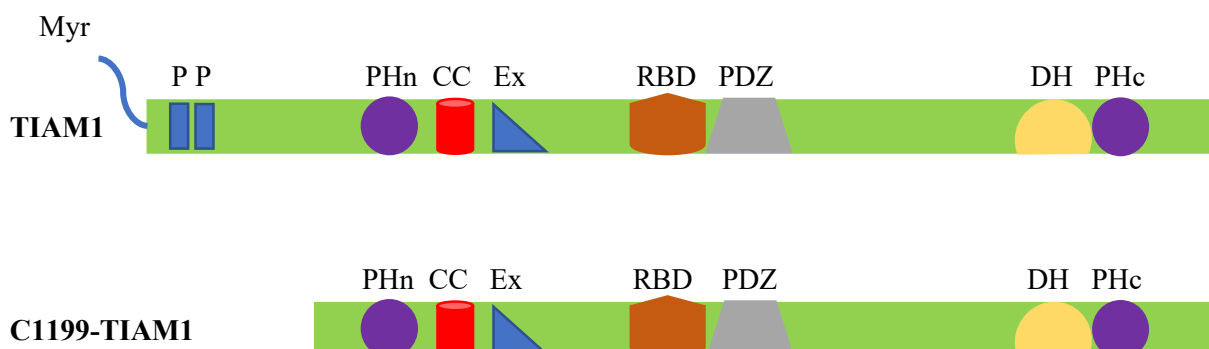


Abbildung 11: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von TIAM1

Myr: Myristoylierungsstelle, **P:** PEST-Sequenz, **PHn:** N-terminale Pleckstrin-homology-Domäne, **CC:** coiled-coil-Region, **Ex:** Extended-Domäne, **RBD:** Ras-Bindungsdomäne, **PDZ:** PSD95/DlgA/ZO-1-Domäne, **DH:** Dbl-homology-Domäne, **PHc:** C-terminale Pleckstrin-homology-Domäne (Abbildung Bernhard 2020)

2.5.4 Regulation

Die Aktivität von TIAM1 wird durch verschiedene Regulationsmechanismen gesteuert. Hierzu zählen die Änderung der Expressionsmenge, die Regulation durch intramolekulare Inhibition, die Veränderung der intrazellulären Lokalisation, die posttranslationale Modifikation und die Interaktion mit anderen Proteinen (Mertens et al. 2003). Eine fehlerhafte Regulation kann genauso wie eine Mutation im Gen zur Störung der Rho-GTPase-Aktivität führen, wodurch die Entstehung verschiedener anormaler zellulärer Phänotypen möglich ist (Malliri und Collard 2003, Mertens et al. 2003).

TIAM1 kann neben der Verankerung in der Zellmembran, wo es vor allem zur Interaktion mit Substraten der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und damit verbunden zur Rac-Aktivierung kommt, auch frei im Zytoplasma vorliegen (Mertens et al. 2003, Minard et al. 2004). Als zytoplasmatisches Protein kann es Membranphospholipide bzw. Phosphoinositole über die PH-Domäne binden. Hier unterscheiden sich Bindungsaffinitäten und Wirkungen deutlich zwischen der PHc- und PHn- Domäne (Mertens et al. 2003). Die Membranassoziation kommt durch die Bindung von Phosphoinositolen an der PHn-Domäne zustande und ist die Grundlage für die Induktion der Aktin-angereicherten Membranausstülpungen und die Aktivierung der JNK. Ebenfalls wichtig ist die Membranassoziation von TIAM1 für den Guaninnukleotid-Austausch von Rac1. Dadurch kommt die katalytische Domäne von TIAM1 in Kontakt mit membrangebundenen Phospholipiden, wodurch der Nukleotidaustausch erleichtert wird (Mertens et al. 2003). Es kommt zur Bindung spezifischer Lipide an die PHc-Domäne und damit zum allosterischen Umbau, der für die Regulation der angrenzenden katalytischen DH-Domäne und damit der Aktivität verantwortlich ist (Crompton et al. 2000). Ebenfalls Einfluss auf die Translokation an die Zellmembran hat die Phosphorylierung von TIAM1.

TIAM1 kann auch direkt an verschiedene membranassoziierte und im Zytoplasma gelegene Proteine binden. Dadurch wird die TIAM1-Rac-Aktivität direkt an spezifische Signalwege gekoppelt (Mertens et al. 2003). So ist z.B. eine direkte Bindung an Ras durch die Ras-bindende-Domäne (RBD) möglich. Diese Interaktion von Ras und TIAM1 konnte auch durch TIAM1-Knock-Out-Mäuse bestätigt werden, da sie resistent gegenüber Ras-induzierten Hauttumoren waren (Malliri et al. 2002).

2.5.5 Funktionelle Relevanz des TIAM1/Rac-Signalwegs

Rac1 ist ein wichtiger Bestandteil in der Regulation zellulärer Prozesse. Hier ist vor allem die Polymerisation und Reorganisation des Aktinzytoskeletts zu nennen. Darüber hinaus spielt es ebenfalls eine wichtige Rolle in der Zellmigration und steuert auch die Gentranskription. Gerade die Wirkung auf das Aktinzytoskelett könnte einer der zentralen Mechanismen in der Ribbonsynapse der Retina sein, der für den Transport der Vesikel wichtig ist.

Im Gegensatz zu Rac1 ist über die Funktionsweise von Rac3 wenig bekannt. Es wurde erst viel später identifiziert (Haataja et al. 1997). Während Rac1 Knock-Out-Mäuse die Embryogenese nicht überleben,

überstehen die Rac3 Knock-Out-Mäuse diese ohne offensichtliche Entwicklungsdefekte (Engers et al. 2007). Rac3 kann an viele Rac1 Effektoren binden und diese aktivieren. Allerdings ist die Wirkung auf das Aktinzytoskelett deutlich geringer ausgeprägt als bei Rac1, wodurch es als Ziel von TIAM1 in der nachfolgenden Arbeit eine eher untergeordnete Rolle spielt.

2.6 Fragestellung dieser Arbeit

Wie in der Einleitung beschrieben gibt es im Bereich des synaptischen Ribbons zahlreiche Proteine, die die unterschiedlichsten Aufgaben in der synaptischen Signalmaschinerie übernehmen. Dazu zählen unter anderem auch CASK und Caskin1, deren Funktion ich bereits näher beschrieben habe. Interessanterweise besitzt Caskin1 ein ganz bestimmtes Proteinmotiv (*EEIWVLRK*) mit dem es an CASK bindet und dadurch den Weg für weitere Proteininteraktionen bereitet. Die Arbeitsgruppe um Stafford et al. beschrieb 2011 dieses Proteinmotiv und konnte in weiteren Untersuchungen zeigen, dass nur wenige andere Proteine diese Sequenz in ihrer Peptidkette aufweisen. Als weitere verwandte Peptidsequenz konnte das Motiv *EPIWVMRQ* in dem Protein Mint1 gefunden werden, dass ebenfalls in der Lage ist CASK zu binden. Danach wurden durch Proteindatenbankuntersuchungen alle bekannten menschlichen Proteine nach diesen Motiven abgesucht, wobei es lediglich einen Treffer gab: TIAM1. TIAM1 besitzt ein *EEVIWVRRE* Motiv, welches sich zumindest bei *in vitro* Untersuchungen zum Binden von CASK eignet. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Bindung von CASK und TIAM1, welche beide zudem überlappende, zelluläre und neurologische Funktionen aufweisen, auch *in vivo* möglich ist.

Durch die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Schmitz (Anjum et al. 2014) wurde bereits die Lokalisation von CASK und Caskin1 in der bovinen Retina näher untersucht. Dabei konnte durch spezifische Antikörper in Immunfluoreszenzuntersuchungen nachgewiesen werden, dass CASK in nahezu allen retinalen Synapsen, sowohl in der inneren, als auch der äußeren plexiformen Schicht zu finden ist. Caskin1 ist ebenfalls in den retinalen Synapsen zu finden, allerdings nicht in allen CASK-positiven Synapsen. Dadurch kann die Vermutung angestellt werden, dass CASK eine wichtige Rolle in allen retinalen Synapsen spielt, während Caskin1 eine eher spezialisiere Funktion innerhalb des retinalen Verschaltungssystems einnimmt. Die Untersuchungen zeigten weiterhin eine enge Kolokalisation von CASK und RIBEYE, einer der Hauptkomponenten des synaptischen Ribbons. CASK konnte hier vor allem in der Konkavität der hufeisenförmigen synaptischen Ribbons dargestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse entstand die Fragestellung, ob auch TIAM1, ähnlich wie Caskin1, verstärkt in retinalen Synapsen zu finden ist. Im Folgenden werden meine verwendeten Materialien und Methoden, sowie im Anschluss die Ergebnisse meiner Untersuchungen dargestellt und diskutiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper:

3.1.1.1 Primärantikörper

Anti-TIAM1 Antikörper (7F11, 4D2, 2D8): Monoklonaler Antikörper, der spezifisch an die letzten 12 Aminosäuren des carboxyterminalen Endes von TIAM1 bindet (DFAPSRKLNTEI). Das carboxyterminale Ende ist auch bei der verkürzten Splicevariation von TIAM1 nicht verändert. Die TIAM1 Antikörper stammen aus eigener Herstellung und wurden in der Immunfluoreszenzfärbung 1:50 (mit PBS) und in den Western Blot Experimenten 1:100 (mit Milchpulverlösung 5%) verdünnt. Das Blockierungspeptid stammt von pepMic und ist gegen die 25 carboxyterminal gelegenen Aminosäuren gerichtet (CSASEEVIWVRREDFAPSRKLNTEI).

Anti-RIBEYE (B)-Domäne/CtBP2 Antikörper (U2656, Schmitz, Königstorfer, Südhof 2000): Hierbei handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen Serum. Der Antikörper wurde für die Immunfluoreszenz in der Verdünnung 1:1000 (mit PBS) verwendet.

Anti-RIBEYE (B)-Domäne/CtBP2 Antikörper (2D9, Dembla et al. 2018): Monoklonaler Antikörper, der gegen die letzten 12 carboxyterminal gelegenen Aminosäuren der B-Domäne von RIBEYE gerichtet ist (KHGDNREHPNEQ). Der Antikörper wurde für die Immunfluoreszenz in der Verdünnung 1:1000 (mit PBS) und im Western Blot in der Verdünnung 1:5000 (mit Milchpulverlösung 5%) verwendet.

Anti-Synaptotagmin 1 Antikörper (V216, Perin et al. 1990, Pang et al. 2006, Bacaj et al. 2015): Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen Serum. Der Antikörper wurde für die Immunfluoreszenz in der Verdünnung 1:1000 (mit PBS) verwendet.

Anti-PSD95 Antikörper (L667, Irie et al. 1997): Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Thomas Südhof (Stanford University, Palo Alto, CA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen Serum. Der Antikörper wurde für die Immunfluoreszenz in einer Verdünnung 1:1000 (mit PBS) verwendet.

Anti-mGluR6 Antikörper (ab1205, Katiyar et al. 2015): Dieser Antikörper wurde von Herrn Prof. Dr. Veit Flockerzi (Präklinisches Zentrum für molekulare Signalverarbeitung der Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um einen polyklonalen Antikörper aus Kaninchen Serum. Der Antikörper wurde für die Immunfluoreszenz in einer Verdünnung 1:500 (mit PBS) verwendet.

Kontrollpeptid (MSESEVKGDTTPEPSPANGTC, Liu 2013): Dieses Peptid ist gegen die ersten 20 Aminosäuren des Cav1.4 Proteins gerichtet. Es wurde in dieser Arbeit als Kontrollpeptid in den Dot Blot- und Präabsorptionsexperimenten verwendet.

3.1.1.2 Sekundärantikörper

Immunfluoreszenz:

1. Chicken Anti Mouse Alexa 488
2. Donkey Anti Rabbit Alexa 568

Beide Antikörper wurden in einer Verdünnung 1:1000 (mit PBS) über Nacht bei 4°C verwendet. Sie stammen von Molecular Probes/Invitrogen.

WesternBlot:

1. Sigma GAM-Pox (A3673) Anti-Mouse IgG (gebildet in Ziege) in einer Verdünnung 1:3000 (mit Milchpulverlösung 5%)

3.1.2 Gewebe

Alle Experimente wurden mit Mäusen des Anzuchtstammes C57BL/6J durchgeführt. Dabei wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet. Die erwachsenen Versuchstiere wurden aus der Tierhaltung der experimentellen Chirurgie der Universität des Saarlandes bezogen und in die Abteilung Neuroanatomie des anatomischen Instituts gebracht. Sie werden immer in einem konstanten 12 Stunden hell/dunkel Zyklus gehalten. Alle Prozeduren und Experimente wurden gemäß den Richtlinien des tierethischen Komitees der Universität des Saarlandes durchgeführt.

3.1.3 Weitere Lösungen und Materialien

Bezeichnung	Inhalt
PBS (Phosphate-Buffered-Saline)	40 g NaCl 1 g KCl 7,2 g Na ₂ HPO ₄ 1,2 g KH ₂ PO ₄ Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen
NPG	1,5% n-Propyl-gallat 60% Glycerol In PBS
Natriummethylat	30%ige Lösung in Methanol (Fluka)
Xylol/Methanol	1:1 Lösung
ECL-1	5 ml 1M Tris pH 8,5 500 µl Luminol 220 µl PCA Mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen
ECL-2	5 ml 1M Tris pH 8,5 32 µl H ₂ O ₂ (30%) Mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen
SDS-Elektrophorese Puffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 1,0 g SDS
SDS-Probenpuffer	1,6 g SDS 4 ml β-Mercaptoethanol 2 ml Glycerol 2 ml 1M Tris, pH 7,0 4 mg Bromphenolblau 2 ml destilliertes Wasser
Transfer Puffer Western Blot	15,125 g Tris 72,05 g Glycin 1000 ml Methanol Mit destilliertem Wasser auf 5 Liter auffüllen

Bezeichnung	Inhalt
Milchpulverlösung 5%	10 g Milchpulver 200 ml Aqua dest.

Tabelle 2

Produkt	Hersteller
Acrylamid	Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth
Glycerol	Roth
Magermilchpulver	Roth
Panceau S	Roth
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck
Bromphenolblau	Roth
Luminol	Roth
Thermomixer	Eppendorf
Kryostat	Leica
Kühlkammer	Heraeus
Axiovert 200M (Floureszenzmikroskop)	Zeiss
Axiocam MRm (Floureszenzkamera)	Zeiss
Oligochrome	Till Photomics
Konfokalmikroskop A1R	Nikon
60x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, numerische Apertur: 1,4)	Nikon
GelDoc Chemilumineszenzdetektor	Bio-Rad
Biofuge fresco (Kühlzentrifuge)	Heraeus
Blot Papier	GE healthcare
Chemiedoc XRS System	Bio-Rad
Deckgläser	Roth
Dosierpipette	Eppendorf
Magnetrührer	Neolab
Präzisionswaage	Sartorius
Schüttelapparat	Behr
Western Blot Transfer Apparat	Hoefer scientific instruments

Tabelle 3

3.2 Methoden

3.2.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.2.1.1 Fixierung und Anfertigung Kryoschnitte (7µm)

Für die Immunfluoreszenz wurden aus den Maus-Retinae sowohl Kryo- als auch 0,5 µm dicke Epoxidharz-infiltrierte/eingebettete Schnitte angefertigt. Um die Schnitte im Kryostat anfertigen zu können, müssen zuvor die Proben in flüssigem Stickstoff (-196°C, über Isopentan als Intermediärmedium) schockgefroren werden. Danach können Schnitte mit einer Dicke von etwa 7µm angefertigt werden. Die Schnitte werden im Anschluss auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Danach erst werden sie mit Aceton oder Methanol für ca. 10 Minuten fixiert. Die Schnitte wurden bei ca. -20°C gelagert.

3.2.1.2 Harz-Einbettung für Semidünnschnitte (0,5µm)

Die Methode zur Gewebeeinbettung ist eine von der AG Schmitz etablierte Methode (Wahl et al. 2013, Dembla et al. 2014) und stellt eine Abwandlung der Originalmethode von Drenckhahn und Franz dar (Drenckhahn und Franz 1986).

Hierbei werden zuerst die Maus-Retinae entnommen und in Stickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren. Danach folgt eine Gefriertrocknung (Lyophilisation) bei konstanter Gewebekühlung mit Hilfe von flüssigem Stickstoff für 24 Stunden. Das Vorvakuum wird dabei von einer Öl-Diffusionspumpe erzeugt (Typ DUO 004B; Arthur-Pfeiffer-Vakuumtechnik, Wetzlar/Aßlar). Danach wird das für die Gefriertrocknung benötigte Vakuum von 10^{-7} mbar durch eine TCP270 Turbomolekular-Pumpe (Arthur-Pfeiffer-Vakuumtechnik, Wetzlar/Aßlar) erzeugt. Überprüft wird das benötigte Vakuum über ein Pirani-Gold-Kathodenmanometer (PKG020). Im Anschluss muss das Gewebe für 24 Stunden bei angelegtem Vakuum inkubieren. Danach kann das Gewebe bei Raumtemperatur mit Epon Harzgemisch infiltriert werden. Dabei werden die Proben in Epon Harz bei 27°C auf ein Drehrad gegeben (für 24 h). Die Aushärtung des Harzes findet anschließend bei 60°C für 24 Stunden statt. Danach werden mit einem Reichert Ultramikrotom 0,5 µm dünne Schnitte angefertigt.

Epon Harz:

- 13g 812 Epon
- 5,5g DDSA (Dodeceny Succinic Anhydride)
- 8g MNA (Methyl-5-Norbornene-2,3- Dicarboxylic-Anhydride)
- 0,2g DMP 30 Epoxy Accelator [2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol]

3.2.1.3 Grundlagen der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode bei der Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden können. Somit können beispielweise in einem Gewebeschnitt (hier: Retina Maus) Proteinanhäufungen lokalisiert werden, wodurch auf ihre Funktion geschlossen werden kann. Optimal ist eine starke Bindung zwischen Epitop und Antikörper. Damit der Antikörper in der späteren Betrachtung unter einem Mikroskop sichtbar wird, muss er mit einem fluoreszierenden Farbstoff verbunden werden. Der Antikörper, der gegen das gewünschte Epitop gerichtet ist, sollte sich durch eine hohe Spezifität auszeichnen und keine Kreuzreaktionen mit anderen Epitopen zulassen. Als mögliche Methoden der Fluoreszenzmarkierung kommen die direkte und die indirekte Fluoreszenz infrage, wobei in dieser Arbeit nur die indirekte Variante verwendet wurde. Bei dieser Variante ist das Markermolekül an einen gegen den Primärantikörper gerichteten sogenannten Sekundärantikörper gebunden. Die Fluoreszenz ist also nur bei vorhandenem „Epitop-Primärantikörper-Komplex“ zu erkennen (Renz und de Gruyter 2009). Bei der Negativkontrolle wird der Primärantikörper weggelassen und der Schnitt nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Dabei sollten idealerweise keine Signale oder unspezifische Hintergrundsignale zu erkennen sein.

3.2.1.4 Immunfluoreszenzmarkierung von Kryo- und Semidünnschnitten

Während bei den Kryoschnitten lediglich ein kurzes Auftauen auf einer Wärmplatte notwendig ist, mussten bei den Semidünnschnitten vor der Inkubation mit Primärantikörpern zuerst das Epon Harz herausgelöst werden. Dabei wurde eine leicht veränderte Variante der Methode von Mayor et al. angewendet (Mayor, Hampton und Rosario 1961).

Zuerst werden die Schnitte 12 Minuten lang mit Natriummethylat inkubiert. Anschließend erfolgt ebenfalls 12 Minuten lang eine Inkubation mit einer 1:1 Mischung aus Xylol und Methanol. Danach werden die Schnitte zum Abschluss 2-mal für jeweils 10 Minuten mit Aceton inkubiert. Bevor die Primärantikörper auf die Schnitte gegeben werden können, müssen diese zuerst 5-mal mit Aqua dest.

und danach 5-mal mit PBS gewaschen werden. Das weitere Vorgehen ist für beide Arten von Schnitten identisch.

Die Schnitte werden in eine feuchte Kammer gelegt, die mit Wasser bzw. PBS gefüllt ist, um eine feuchte Atmosphäre innerhalb der Kammer zu gewährleisten. Die Primärantikörper werden in der entsprechenden Verdünnung (siehe oben) auf die Präparate gegeben. Danach kommt die Kammer mit den Schnitten für 2 Tage in einen Kühlraum (4°C). Nach der 2-tägigen Inkubation werden die Schnitte 5-mal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Nun werden die Sekundärantikörper in der oben bereits beschriebenen Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Hier hat sich gezeigt, dass die besten Ergebnisse für die Immunfluoreszenz mit einem weiteren Tag Inkubation bei 4°C im Kühlraum erreicht werden. Im Anschluss daran erfolgt wieder das Waschen der Schnitte mit PBS (5-mal für jeweils 5 Minuten). Dabei werden die überschüssigen Sekundärantikörper entfernt.

Um die Kryoschnitte mikroskopieren zu können, wird zuerst ein Einbettmedium (NPG, N-Propylgallat in 10% Glycerin), welches zuvor auf 38°C erwärmt wurde, auf die Schnitte aufgebracht. NPG verhindert das vorzeitige Ausbleichen der Präparate. Ein Deckglas wird aufgelegt und mit Nagellack umrandet, um ein Verrutschen der Deckgläser auf der einen, und ein Austrocknen der Schnitte auf der anderen Seite zu verhindern (Schmitz, Königstorfer und Südhof 2000).

Da sich die Semidünnschnitte schon bereits auf dem Deckglas befinden, wird ein Tropfen NPG auf einen leeren Objektträger aufgebracht und das Deckglas mit der Gewebeseite auf den Objektträger gelegt. Das Deckglas wird ebenfalls mit Nagellack versiegelt.

Bei der Doppelfluoreszenzmethode, also dem Einsatz zweier Primärantikörper, ist der Ablauf analog. Hierbei muss nur darauf geachtet werden, dass die Primärantikörper in unterschiedlichen Spezies gebildet wurden und die Sekundärkörper spezifisch gegen diese gerichtet sind. Es besteht auch die Möglichkeit 2 Primärantikörper aus der gleichen Spezies zu verwenden, allerdings wurde dieses Verfahren in dieser Arbeit nicht angewendet.

Zur Lagerung wurden die versiegelte Schnitte bei 4°C aufbewahrt.

3.2.1.5 Kontrollinkubation

Es wurden bei den einzelnen Versuchen stets eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle angefertigt. Die Positivkontrolle wurde mit Anti-RIBEYE 2D9 als Primärantikörper inkubiert, während die Negativkontrolle ohne Primärantikörper mit PBS inkubiert wurde. An der Inkubation der Sekundärantikörper wurde im Vergleich zu oben nichts verändert. Bei Doppelfluoreszenzen wurde im grünen Kanal (Alexa 488) lediglich mit Anti-RIBEYE 2D9 bzw. PBS inkubiert, während im roten Kanal (Alexa 568) weiterhin abwechselnd mit Anti-Synaptotagmin, Anti-RIBEYE U2656, Anti-mGluR6 oder

Anti-PSD95 inkubiert wurde. Da die Anti-TIAM1 Antikörper stets im grünen Kanal getestet wurden, konnte somit ein eventuelles Durchscheinen der anderen Antikörper ausgeschlossen werden.

3.2.1.6 Präabsorptionsexperimente

Die Antikörperseren von TIAM1 wurden in eine geeignete Arbeitslösung verdünnt (1:50) und danach entweder mit 20 µg des spezifischen Peptids, oder mit 20 µg eines irrelevanten Peptids über Nacht bei 4°C kopfrotierend inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Immunfluoreszenzexperimente, wie bereits oben beschrieben, durchgeführt.

3.2.1.7 Epifluoreszenzmikroskopie

Zuerst wurden die verschiedenen Gewebeschnitte mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Axiovert 200M) der Firma Zeiss betrachtet. Als Lichtquelle diente dabei ein Oligochrome der Firma Till Photomics. Hier wurden die Schnitte zuerst bei geringer Vergrößerung und Durchlicht mit Hilfe eines 10x Objektivs aufgesucht und danach ohne Durchlicht und Anregung der entsprechenden Wellenlängen mit einer 40x Immersions-Öl Objektiv (Plan Neofluar, Firma Zeiss, numerische Apertur: 1,3) betrachtet. Die Immunfluoreszenzsignale konnten durch Anregung mit verschiedenen Wellenlängen registriert werden. Die Anregung des grünen Kanals (Alexa 488) erfolgte bei einer Wellenlänge von 450-490 nm (Anregungsfilter). Die wahrgenommene Emission lag bei 515-565 nm (Emissionsfilter). Der rote Kanal (Alexa 568) wurde mit einer Wellenlänge von 540-552 nm angeregt (Anregungsfilter). Hier lag die wahrgenommene Emission bei ca. 590 nm (Emissionsfilter). Die verwendete Software zur Dokumentation war AxioVision release 4.8 von Zeiss. Bei diesen Untersuchungen wurden die Immunfluoreszenzfärbungen, sowie die Kontrollexperimente unter gleichen Bedingungen (gleiche Expositionszeit, gleiche Vergrößerung, gleiche Gamma- und Kontrastwerte) aufgenommen. Ein Durchschlagen der Signale in andere Kanäle wurde nicht beobachtet.

3.2.1.8 Konfokalmikroskopie

Die Präparate wurden nach den Immunfluoreszenzexperimenten mit Hilfe des Konfokalmikroskops A1R der Firma Nikon begutachtet. Zuerst werden dabei mit einem klassischen 10x Objektiv die Gewebeschnitte unter Durchlicht und Bestrahlung mit einem grünen Festkörperlaser aufgesucht und zentral im Sichtfeld eingestellt. Danach wird Immersions-Öl auf den Objektträger gegeben und ein 60x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, Nikon, numerische Apertur: 1,4) eingeschwenkt. Die Immunfluoreszenzsignale werden dabei je nach Kanal von einem grünen Festkörperlaser (Alexa 568 → rotes Signal) oder einem blauen Festkörperlaser (Alexa 488 → grünes Signal) angeregt. Zur Sicherung der Ergebnisse wurden die Immunfluoreszenzfärbungen und die Kontrollexperimente unter gleichen

Bedingungen (gleiche Laserleistung, gleicher Offset, gleicher Kontrast und gleiche Gamma Werte) durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit der NIS elements software. Ein Durchschlagen der Signale in andere Kanäle wurde nicht beobachtet.

3.2.2 SDS-Page und Western Blot

3.2.2.1 Gewinnung der Proteinproben (Maus Retina)

Zur Vorbereitung von SDS-PAGE und Western Blot mussten frische Retina Proben aus Mäusen gewonnen werden. Dazu wurden die Standard Wildtyp Mäuse (siehe Punkt 2.1.2 Gewebe) des anatomischen Instituts verwendet. Die schmerzfreie Tötung der Mäuse fand nach vorheriger Gasnarkose mit Isofluran und Eintreten völliger Areflexie statt. Dazu wurde die Standardmethode, welche von dem tierethischen Komitee der Universität des Saarlandes beschlossen wurde, verwendet. Nach Eintritt des Todes wurden die Augen der Mäuse entnommen und in einer Petrischale unter mikroskopischer Kontrolle präpariert. Die Retinae wurden entnommen und in 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen gefüllt (immer 2 Retinae pro Gefäß). Danach wurden 100 µl einer vorher auf 92°C aufgeheizten Pufferlösung (SDS LD) zu den Proben gegeben. Mithilfe der Pipettenspitze wurden die Retinae mechanisch zerkleinert und anschließend in einem Heizblock bei 92°C erhitzt. Nach dem Aufkochen der Proben wurden nun durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die DNA Strukturen weiter zerstört. Im Anschluss wurden die Proben bis zu den Versuchen bei -20°C gelagert.

3.2.2.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE Experimente wurden, wie von Schmitz et al. (2000) beschrieben, durchgeführt. Zur Gelelektrophorese mussten zuerst das Trenn- und Sammelgel hergestellt werden. Dazu wurde ein Hoefer System, welches später zur SDS-Page genutzt wurde, verwendet. Hierfür werden 2 aufeinanderpassende Glasplatten, eine mit Einkerbung und eine ohne, zuerst mit Ethanol gesäubert und dann mit 2 Spacern in das System eingespannt. Als nächstes folgte die Herstellung des 7%igen Trenngels:

Trenngel	2,2 ml Aqua dest. 1,9 ml 1M Tris pH 8,8 1,75 ml Acrylamid
----------	---

	75 μ l 10% SDS 1,5 ml 30% Glycerol 5 μ l TEMED 38 μ l 10% APS
--	--

Tabelle 4

Das Trenngel wird anschließend vorsichtig zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Um den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden, schichtet man entweder H₂O oder Isopropanol auf das Trenngel. Danach muss das Gel für ca. 30 - 45 Minuten polymerisieren. Im Anschluss daran wird das Sammelgel hergestellt:

Sammelgel	2,4 ml H ₂ O 940 μ l 1 M Tris pH 6,8 0,5 ml 30% Acrylamid 50 μ l 10% SDS 10 μ l TEMED 50 μ l 10% APS
-----------	--

Tabelle 5

Das über das Trenngel geschichtete Wasser/Isopropanol kann nach Auspolymerisation des Gels vorsichtig abgekippt werden. Danach wird das Sammelgel mit einer Pipette darüber geschichtet bis zum Rand der Einkerbung einer der beiden Glasplatten. Ein Kamm mit 10 Zähnen wird von oben in das Gel eingeführt, um die späteren Ladungstaschen zu bilden. Erneut muss das Gel für ca. 30 – 45 Minuten auspolymerisieren.

Nach der Auspolymerisation des Sammelgels wird der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt. In die entsprechenden Taschen können die zuvor noch einmal aufgekochten Proteinproben der Retina (siehe Punkt 2.2.2.1) und zusätzlich einen Marker für Molekulargewichtsstandards eingefüllt werden. Anschließend werden die Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe, zuerst bei 80 Volt für ca. 3 Stunden, dann bei 150 Volt für ca. 30 – 45 Minuten, getrennt. Während des Trennvorgangs ist das System von SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer umgeben (siehe 2.1.3).

3.2.2.3 Western Blot

Die Western Blot Experimente wurden wie bei Schmitz et al. (2000) durchgeführt.

Nachdem die Proteine im Gel nach Größe aufgetrennt wurden, werden diese in einer Blotkammer auf Nitrozellulosemembran übertragen. Dieser Vorgang wird bei 50 Volt für 7 Stunden bei 4°C Umgebungstemperatur durchgeführt. Während des Blottings ist die Kammer von Western Blot Puffer umgeben (siehe 2.1.3).

Anschließend befreit man die Nitrozellulosemembran vorsichtig aus dem Sandwich und benetzt sie mit Aqua dest., um sie feucht zu halten. Um abschätzen zu können, ob eine Proteinübertragung auf die Membran stattgefunden hat, wird eine Ponceau S Färbung durchgeführt. Mit dieser Färbung kann die Proteinbeladung/Marker der Membran reversibel angefärbt werden. Danach wird die Nitrozellulosemembran entsprechend der 5 unterschiedlichen Beladungszonen in Streifen geschnitten und mit PBS entfärbt. Im Anschluss werden bei Raumtemperatur für ca. 45 min. die unspezifischen Bindungsstellen mithilfe 5% Magermilchpulverlösung blockiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern. Die Primärantikörper wurden wie oben erwähnt verdünnt (1x Anti-RIBEYE 2D9, 1x Anti-TIAM1 7F11, 1x Anti-TIAM1 4D2, 1x Anti-TIAM1 2D8). Als Pufferlösung diente hierbei Magermilchpulverlösung (5%) anstelle von PBS. Die Inkubation lief für 24 Stunden bei 4 °C. Im Anschluss daran wurden die Streifen 5-mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nun wurde mit den Sekundärantikörper (GAM Pox Sigma A3673, ebenfalls in Magermilchpulverlösung entsprechend der oben genannten Verdünnung angesetzt) inkubiert. Diese Inkubation lief für ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut mit PBS 5-mal für 5 Minuten gewaschen, bevor ECL (enhanced chemoluminescence) zum sichtbar machen der Sekundärantikörper auf die Streifen gegeben wurde. Dabei wird direkt vor dem Scannen der Streifen das ECL als Gemisch aus ECL-1 und ECL-2 im Verhältnis 1:1 hergestellt, da hier ein zu langer Zeitraum zwischen Anmischen und Scan zu deutlichen Einbußen in der Lumineszenz führen würde. Die ECL-Signale wurden mit einem Bio-Rad Geldoc Chemilumineszenzdetektor gescannt und dokumentiert.

3.2.3 Dotblot-Experimente

Hierfür wurden zuerst 25 mg des TIAM1-Peptids der Firma pepMic abgewogen und in 1 ml Aqua dest. aufgelöst. Die gleiche Verdünnung wurde mit BSA hergestellt. Im Anschluss daran wurden 40 µl dieser Lösung mit 40 µl BSA und 4 µl Glutaraldehyd gemischt. Nach 1-stündiger Inkubation wurden die restlichen Aldehydgruppen mit NaBH₄ (0.1 %) abgesättigt. Das Kontrollpeptid ist in gleicher Weise mit BSA und Glutaraldehyd inkubiert und mit NaBH₄ (0.1 %) abgesättigt worden. Nach Herstellung der Pipettierlösungen wurde das kreuzverlinkte TIAM1 Peptid, sowie das Kontrollpeptid in verschiedenen Konzentrationen auf eine Nitrozellulosemembran gegeben (10 µg, 5 µg, 1 µg, 0,5 µg, 100 ng, 50 ng, 10 ng).

Die Lösungen werden bei Raumtemperatur für ca. 15 Minuten trocknen gelassen. Ähnlich wie bei einem Western Blot wurde nun eine Ponceau S Färbung durchgeführt und das Ergebnis dokumentiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS entfärbt. Nach dem Entfärben wird auch hier Magermilchpulverlösung (5%) dazugegeben um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Im Anschluss daran wurde die Bahnen jeweils mit einem der drei TIAM1 Antikörper benetzt (Verdünnung 1:50). Die Inkubation lief bei 4°C für 24 Stunden. Danach wurde die Membran 5-mal 5 Minuten mit PBS gewaschen, um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Nun wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (GAM Pox Sigma A3673) in der Verdünnung 1:3000 inkubiert. Diese Inkubation lief für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Überschüssiger Sekundär-AK wurde im Anschluss abgewaschen. Zum sichtbar machen der Signale wurden die Streifen mit ECL benetzt und im Bio-Rad Geldoc Chemilumineszenzdetektor gescannt und dokumentiert.

4 Ergebnisse

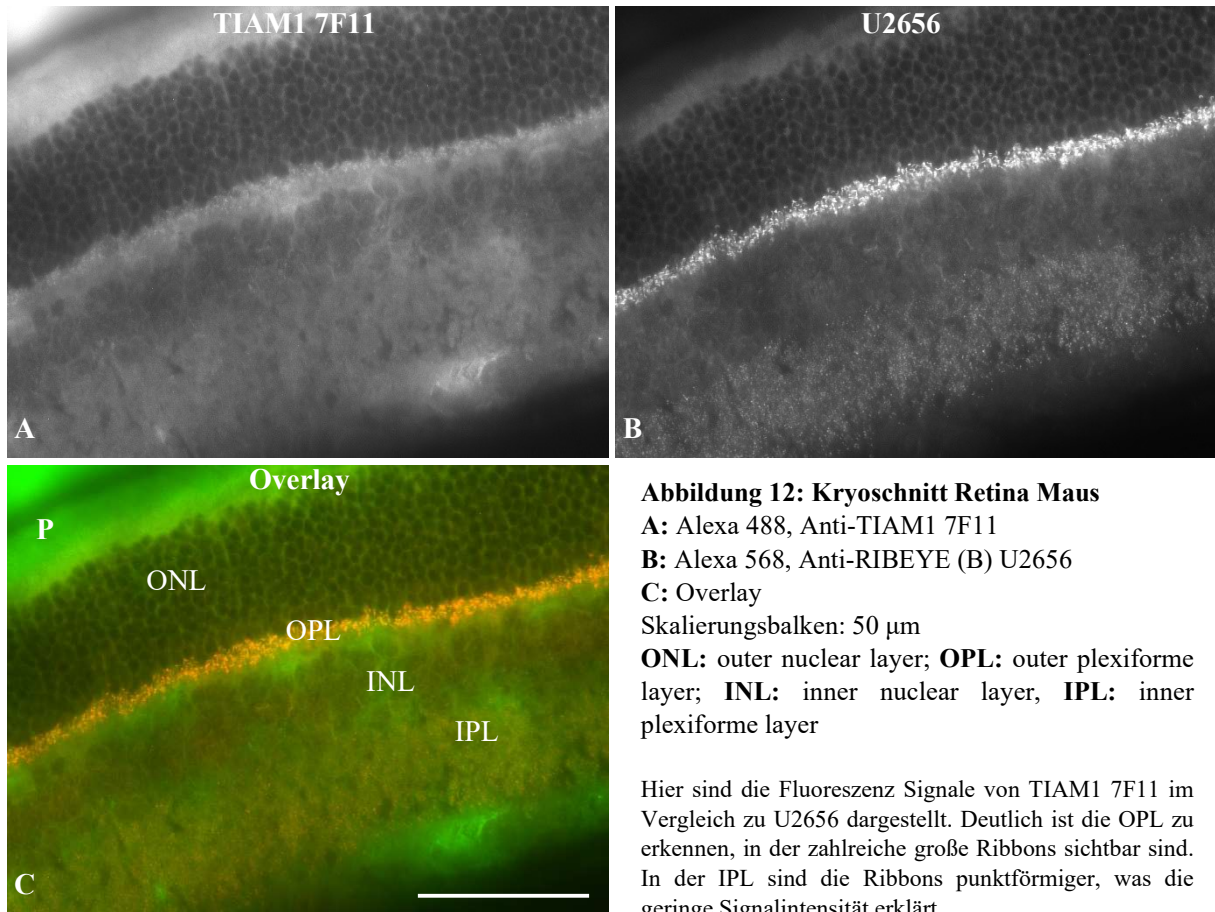
Zuerst testete ich die hier vorgestellten Antikörper auf ihre Fähigkeit hin Strukturen in der Retina anzufärben, um diese dann in Epifluoreszenz- und konfokaler Mikroskopie zu begutachten. Hierbei konnte ich in den erwähnten mikroskopischen Untersuchungen Fluoreszenzen detektieren. Um diese Fluoreszenzen in Kontext zu dem synaptischen Ribbon zu setzen, habe ich im nächsten Schritt Doppelfluoreszenzanfärbungen mit bereits in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Schmitz gut etablierten Antikörpern angefertigt. Diese Antikörper sind entweder gegen prä- oder postsynaptische Strukturen gerichtet und erlauben dadurch eine Einschätzung der Lage/Lokalisation der hier erzeugten TIAM1 Signale.

4.1 Immunfluoreszenzexperimente

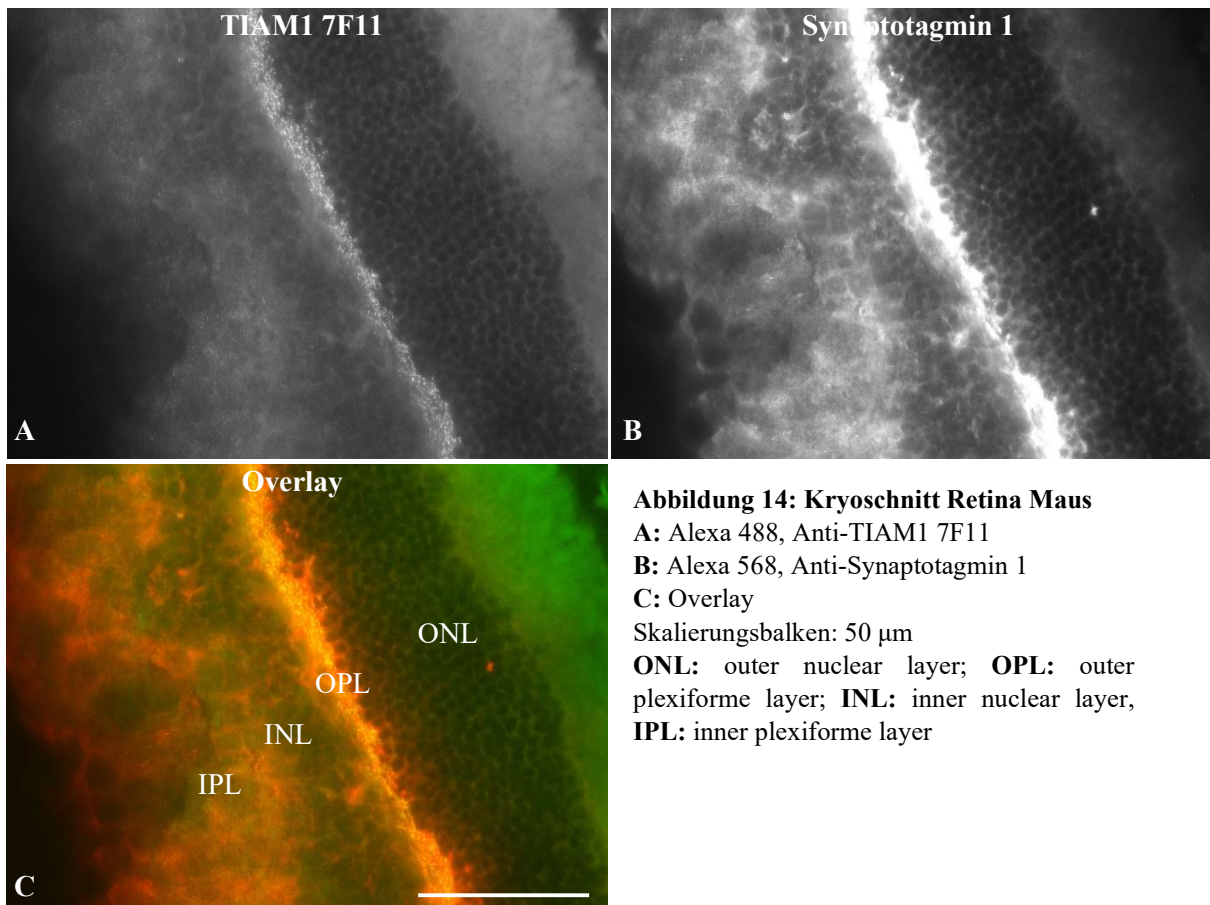
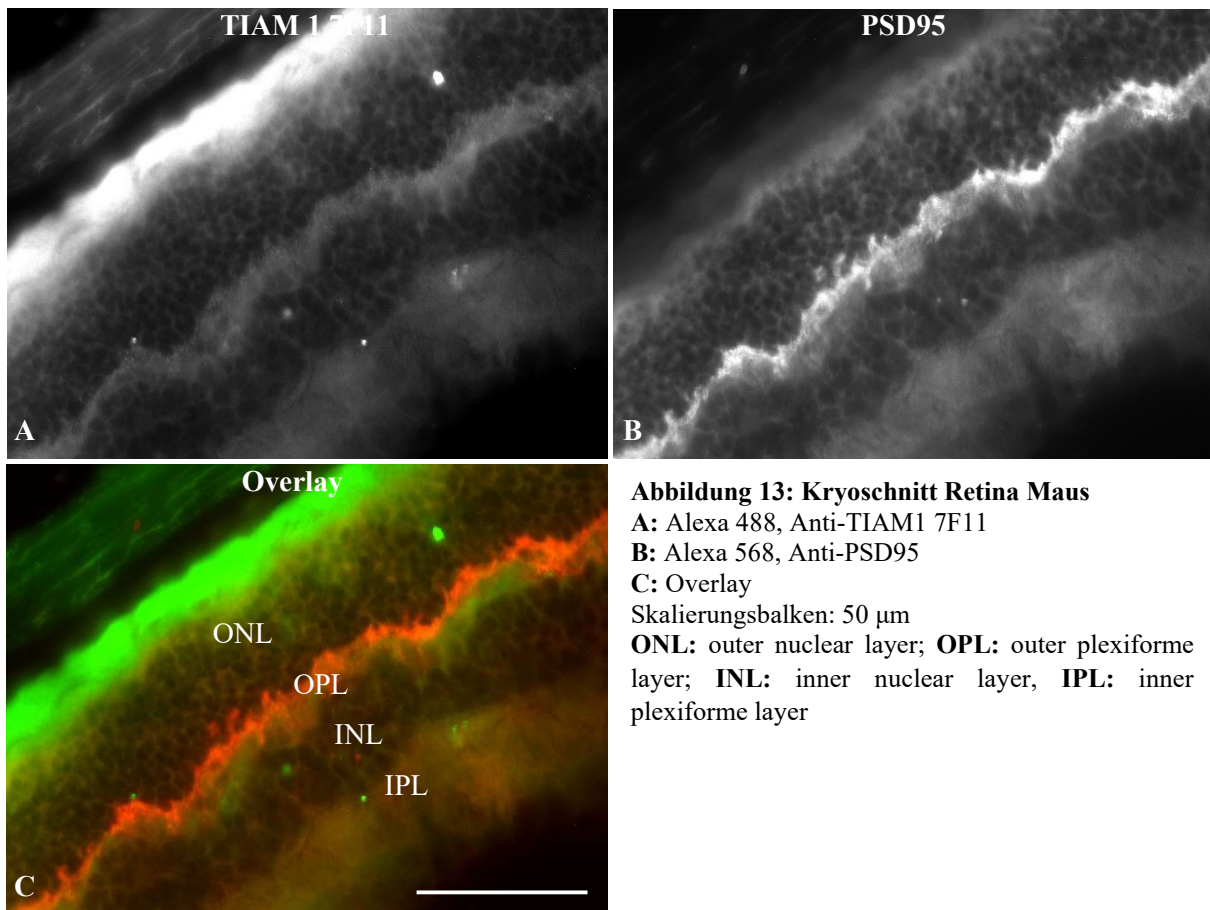
4.1.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Die monoklonalen TIAM1 Antikörper (Klon 7F11, 2D8 und 4D2) stammen aus eigener Herstellung. Die Klone sind dabei alle gegen die letzten 12 Aminosäuren des C-terminalen Endes des Volllängen-Proteins gerichtet. Um die geeignete Verdünnung der Antikörper zu evaluieren, wurde mit der Epifluoreszenz und Kryoschnitten begonnen. Durch die Dicke der Kryoschnitte ergibt sich der Vorteil, dass entsprechend sehr viel Proteine übereinander gelagert in der gleichen Retina Schicht zu finden sind. Als Orientierungshilfe zur Lokalisation wurde Anti-RIBEYE (B) – U2656 verwendet. Mit diesem hoch spezifischen und starken Antikörper kann das präsynaptisch gelegene Ribbon, genauer gesagt die B-Domäne des dort vorherrschenden Proteins RIBEYE sehr gut dargestellt werden. Da wir vermuteten, dass TIAM1 vor allem in der Präsynapse lokalisiert sein könnte, war also eine Doppelfluoreszenz mit U2656 sinnvoll. Mit der richtigen Verdünnung konnten Signale im Bereich der OPL und teilweise der IPL detektiert werden. Diese Signale waren nahezu deckungsgleich zu den U2656 Signalen im roten Kanal. Ein Durscheinen der Anti-RIBEYE (B) Signale in den grünen Kanal konnte allerdings durch die Negativkontrolle (Einfachfluoreszenz; d.h. Inkubation ohne TIAM1 Antikörper, nur mit RIBEYE Antikörper) wiederlegt werden. Im Anschluss wurden zur weiteren Sicherung der vermuteten Lokalisation Antikörper gegen das in der Retina ebenfalls präsynaptisch gelegene PSD 95 und Synaptotagmin 1 eingesetzt.

Exemplarisch wird in diesem Kapitel nur auf TIAM1 7F11 als affinster Antikörper der 3 Klone eingegangen. Ab 3.1.2 Konfokalmikroskopie werden auch TIAM1 4D2 und TIAM1 2D8 beschrieben.



Weitere Abbildungen auf der nächsten Seite

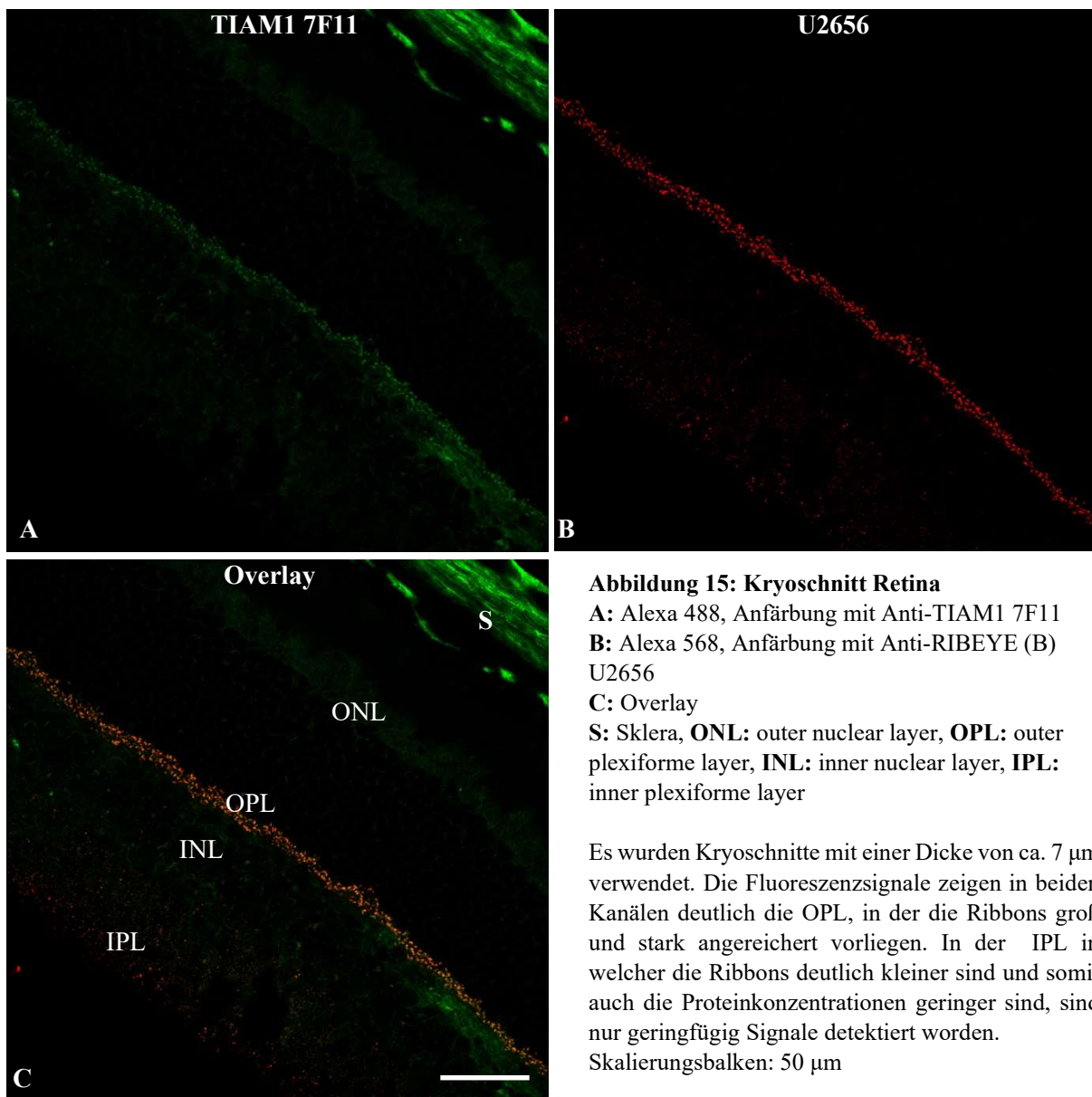


4.1.2 Konfokalmikroskopie

Für eine genauere Betrachtung der Schnitte wurde im nächsten Schritt die Konfokalmikroskopie genutzt. Diese Form der Lichtmikroskopie beleuchtet im Unterschied zu den klassischen Verfahren nicht das gesamte Präparat, sondern nur einen Bruchteil davon. Diese Beleuchtung wird dabei Stück für Stück über das Präparat gerastert. Zusätzlich befindet sich im Strahlengang des zu detektierenden Lichts eine Lochblende, die das Licht quasi nur aus dem scharf abgebildeten Bereich durchlässt und das Licht aus anderen Ebenen blockiert. Dadurch gelangt nahezu nur Licht aus einem kleinen Volumen um den Fokus zum Detektor, während die anderen Schichten des Präparats nicht detektiert werden. Sämtliche Aufnahmen in diesem Kapitel wurden mit dem Konfokalmikroskop AIR von Nikon und einem 60x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, numerische Apertur 1,4) aufgenommen.

4.1.2.1 Lokalisation von TIAM1 Klon 7F11 in der Retina der Maus

Hierbei wurden zuerst Kryoschnitte mit TIAM1 Antikörpern und RIBEYE (B) Antikörpern (U2656) in einer Doppelfluoreszenz angefärbt. TIAM1 7F11 zeigt dabei vor allem Signale im Bereich der OPL und schwächer in der IPL.



Im nächsten Schritt wurde die OPL vergrößert, um die Signalmorphologie genauer betrachten zu können und so mögliche Unterschiede der Fluoreszenzsignale in den beiden Kanälen zu erkennen.

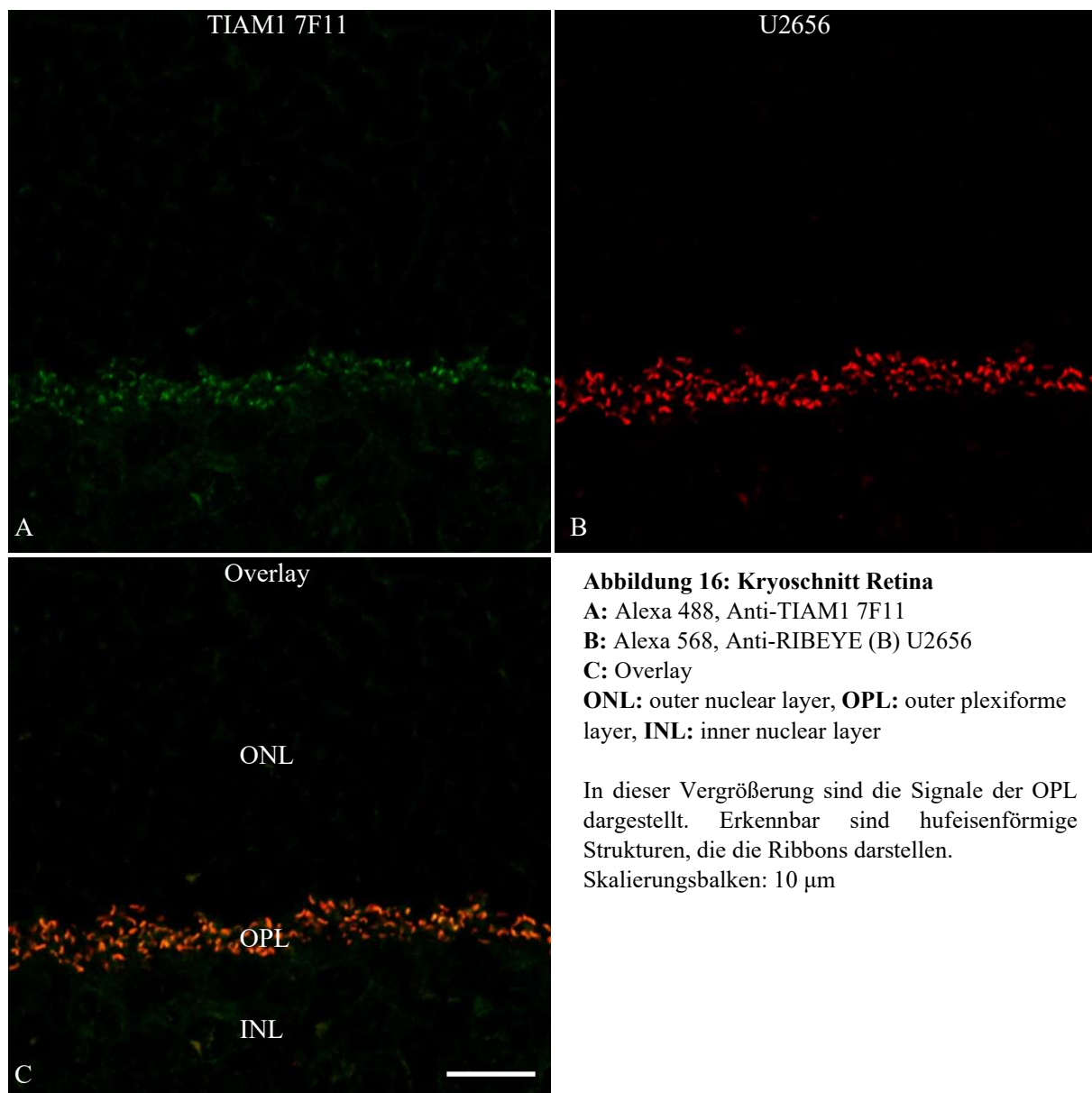


Abbildung 16: Kryoschnitt Retina

A: Alexa 488, Anti-TIAM1 7F11

B: Alexa 568, Anti-RIBEYE (B) U2656

C: Overlay

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

In dieser Vergrößerung sind die Signale der OPL dargestellt. Erkennbar sind hufeisenförmige Strukturen, die die Ribbons darstellen.

Skalierungsbalken: 10 μ m

Um die Lokalisation zu bestätigen wurden Anti-PSD 95 Antikörper (L667, Irie et al. 1997) und Anti-Synaptotagmin 1 Antikörper (V216, Perin et al. 1990, Pang et al. 2006, Bacaj et al. 2015) als weiteren präsynaptischen Marker verwendet.

PSD95 steht für „postsynaptic density protein“ ist aber im Falle der Photorezeptorzellsynapse in der Präsynapse lokalisiert (Koulen et al. 1998). PSD95 steuert die Bildung eines multimeren Gerüsts für die Zusammenlagerung von Rezeptoren, Ionenkanälen und den damit verbundenen Signalproteinen.

Synaptotagmin 1 ist der in der Präsynapse lokalisierte Calciumsensor von Vesikeln, der die Freisetzung von Neurotransmittern steuert. Außerdem ist Synaptotagmin durch seine Bindung an AP2 und Stonin auch an der Clathrin-abhängigen Endozytose beteiligt (Yao et al. 2012).

Abbildung auf nächster Seite

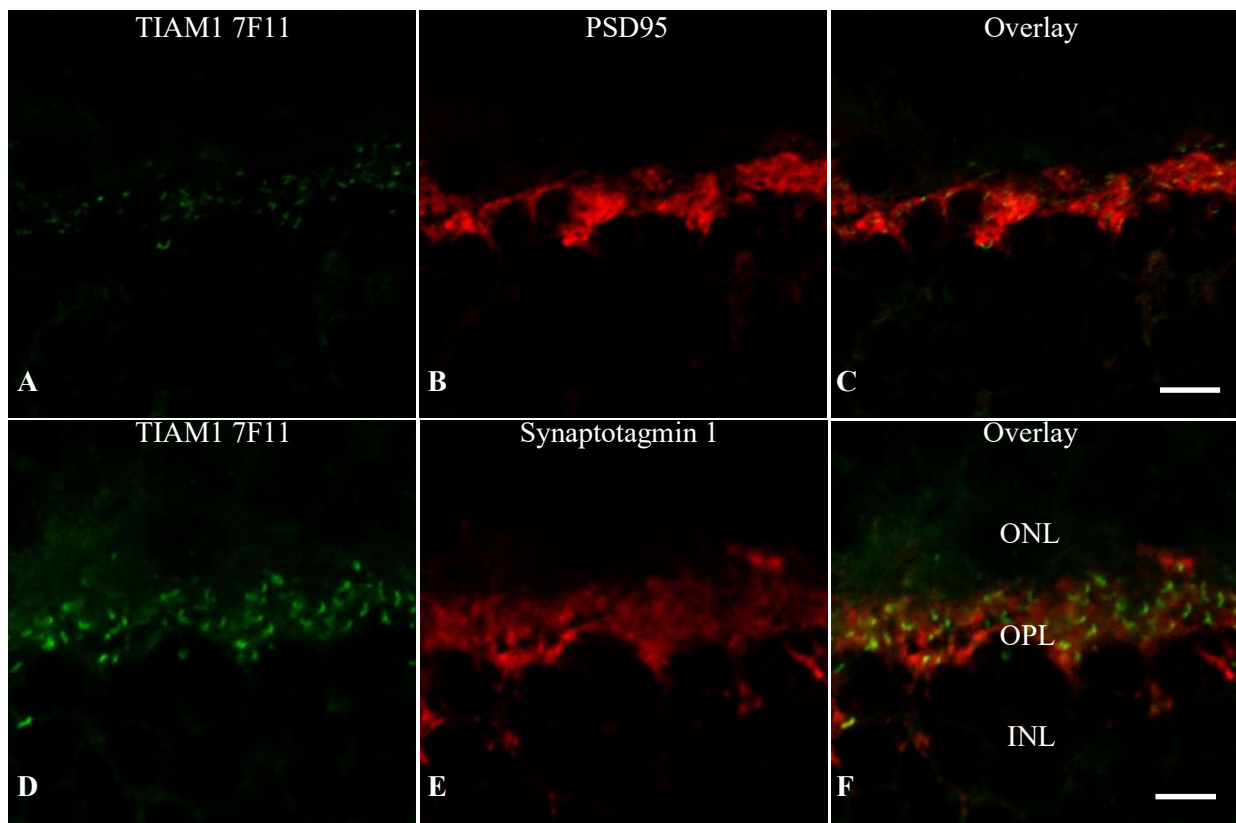


Abbildung 17: Kryoschnitt Retina

A: Alexa 488, Anti-TIAM1 7F11; **B:** Alexa 568, Anti-PSD-95; **C:** Overlay; **D:** Alexa 488, Anti-TIAM1 7F11; **E:** Alexa 568, Anti-Synaptotagmin 1; **F:** Overlay

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

In der ersten Reihe sind die TIAM1 (7F11) Signale im Vergleich zu Anti-PSD95 Antikörper dargestellt. In der zweiten Reihe sind die TIAM1 (7F11) Signale im Vergleich zu Anti-Synaptotagmin 1 Antikörpern dargestellt.

Skalierungsbalken: 10 μ m

Im nächsten Schritt wurde TIAM1 7F11 mit einem postsynaptischen Marker verglichen. Wie bereits in der Einleitung näher erklärt spielt das Protein mGluR6 als postsynaptischer und metabotroper Glutamatrezeptor an ON-Bipolarzellen eine wichtige Rolle. Nach Bindung von Glutamat erfolgt eine Konformationsänderung, die eine Signaltransduktion auslöst.

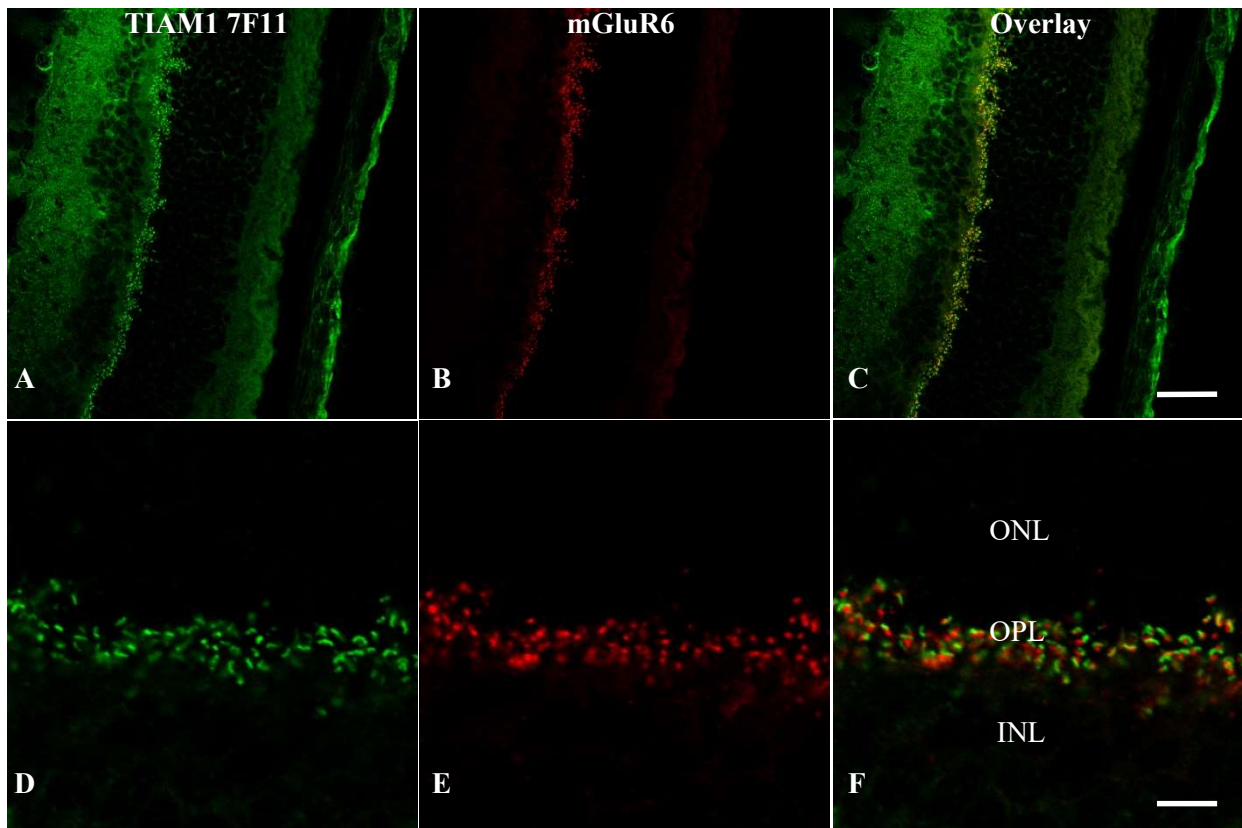


Abbildung 18: Kryoschnitte Mausretina

A: Alexa 488, Anti-TIAM1 (7F11); **B:** Alexa 568, Anti-mGluR6; **C:** Overlay; **D:** Alexa 488, Anti-TIAM1 (7F11); **E:** Alexa 568, Anti-mGluR6; **F:** Overlay

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μm

Um die Problematik der Überlagerung, die durch die Dicke der Kryoschnitte bedingt ist, zu minimieren, wurden im nächsten Schritt Doppelfluoreszenzen mit Semidünnschnitten gemacht. Diese Schnitte werden ebenfalls in Anatomischen Institut der Universität des Saarlandes hergestellt und haben eine Dicke von ca. 0,5 μm . Die geringe Schichtdicke erlaubt eine hohe räumliche Auflösung der jeweiligen Fluoreszenzsignale.

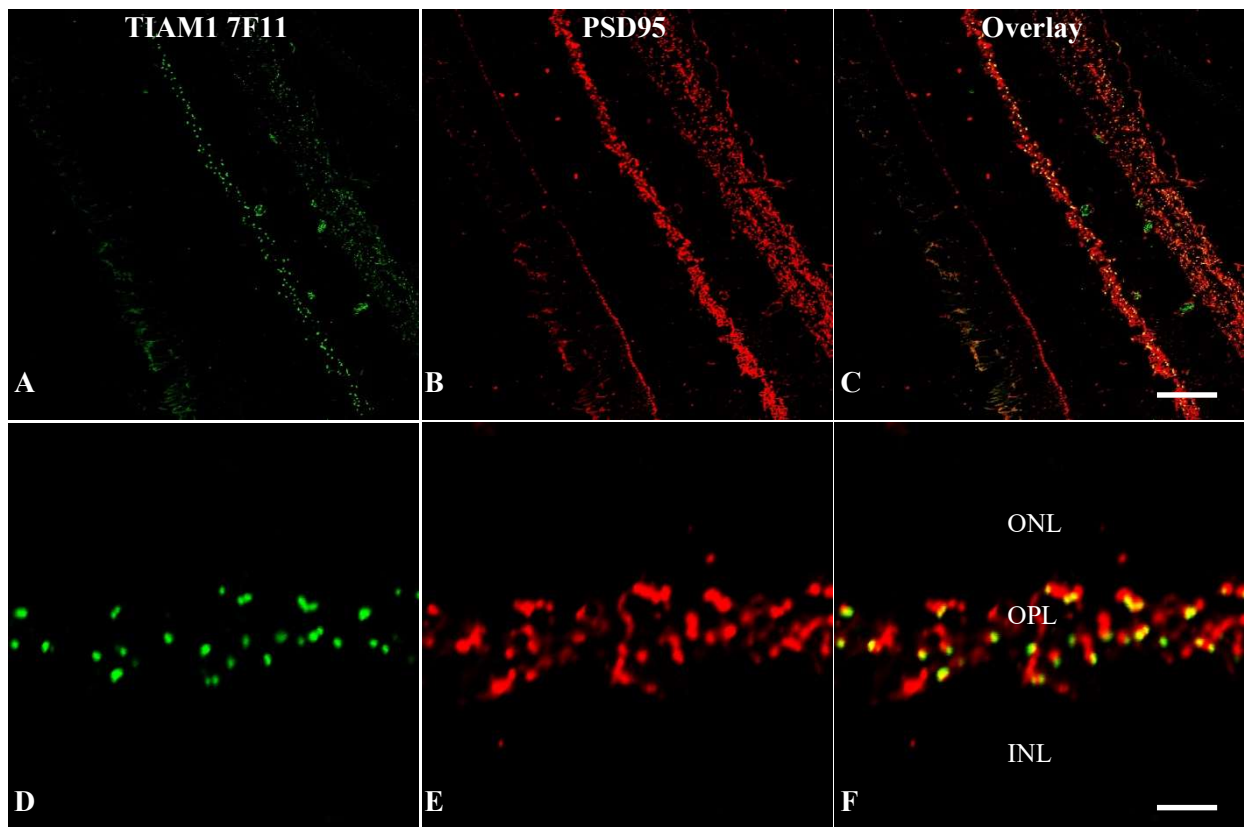


Abbildung 19: Semidünnschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 7F11 + Anti-PSD95)

ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, INL: inner nuclear layer

Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μm

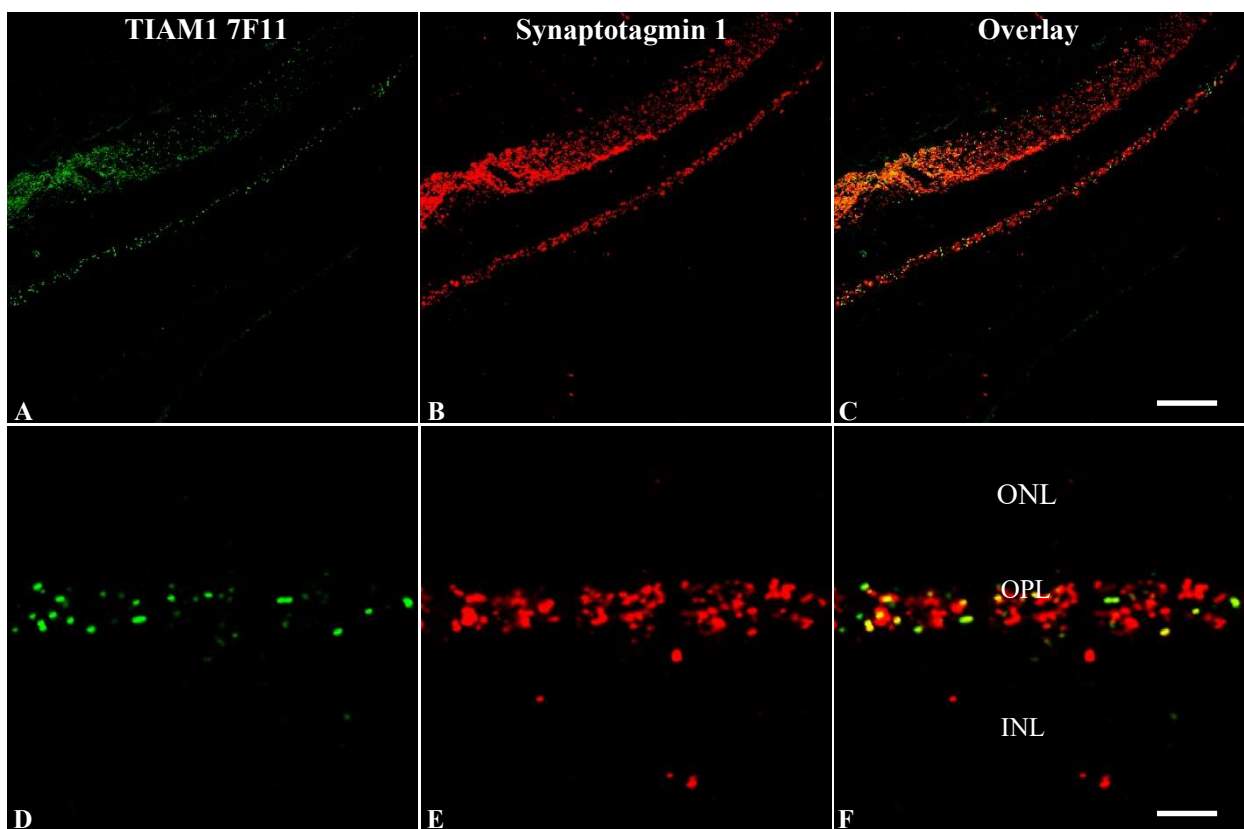


Abbildung 20: Semidünnschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 7F11 + Anti-Synaptotagmin1)

Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μm

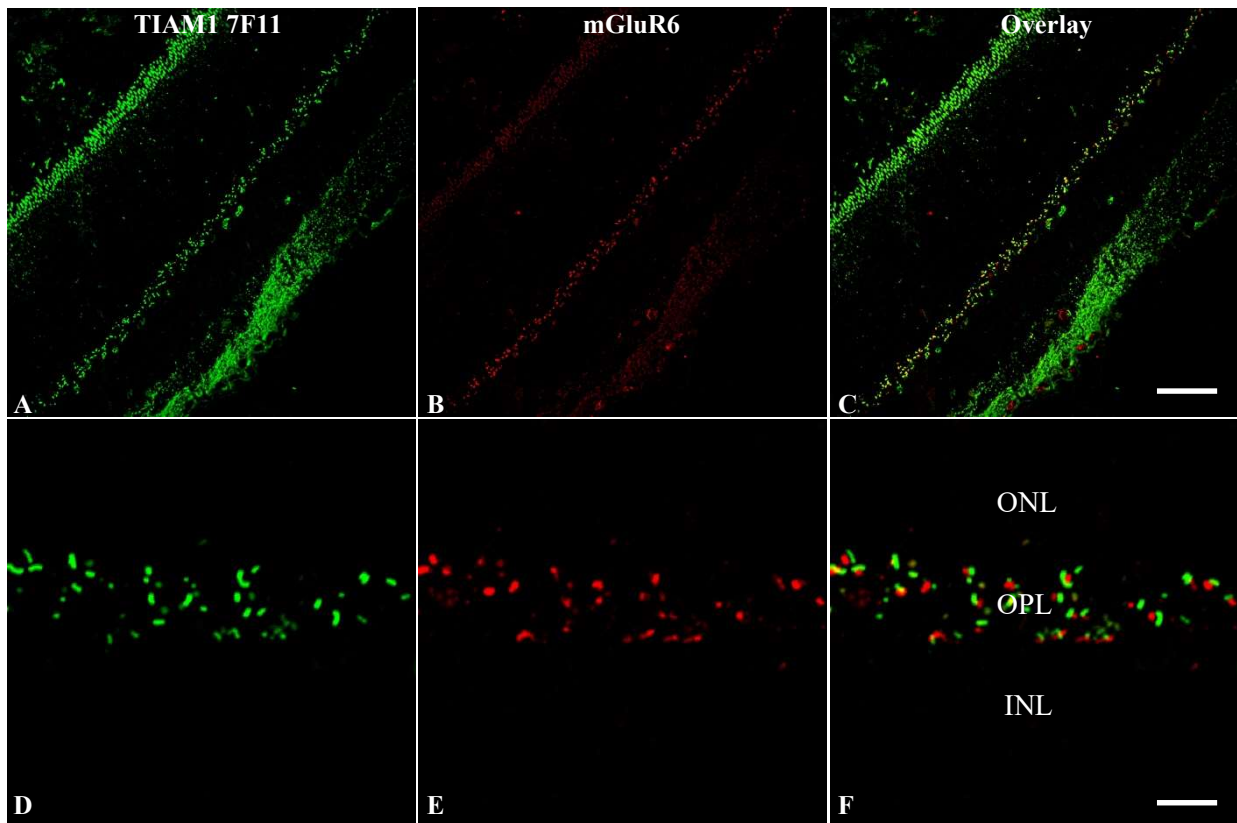


Abbildung 21: Semidünnschnitt Mause retina (markiert mit Anti-TIAM1 7F11 + Anti-mGluR6)
ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiform layer, **INL:** inner nuclear layer
 Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μm

4.1.2.2 Lokalisation von TIAM1 Klon 4D2 in der Retina der Maus

Genau wie bei Klon 7F11 wurde zuerst eine Lokalisation der 4D2 Signale in einer Doppelfluoreszenz mit Anti-RIBEYE (B) U2656 im Kryoschnitt vorgenommen. Im Anschluss daran wurden ebenfalls, zuerst weiterhin in Kryoschnitten, Doppelfluoreszenzen mit PSD95, Synaptotagmin 1 und mGluR6 durchgeführt. Anti-TIAM1 4D2 zeigt deutliche Signale im Bereich der OPL, geringfügig in der IPL. Die Stärke dieser Signale ist mit Anti-TIAM1 7F11 vergleichbar.

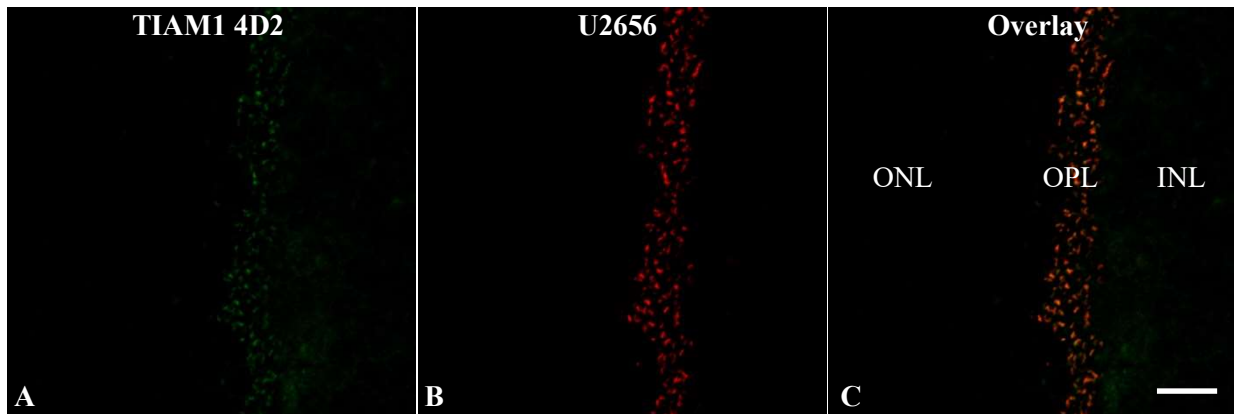


Abbildung 22: Kryoschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 4D2 + Anti-RIBEYE (B) U2656)
ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer
 Skalierungsbalken: 10 μ m

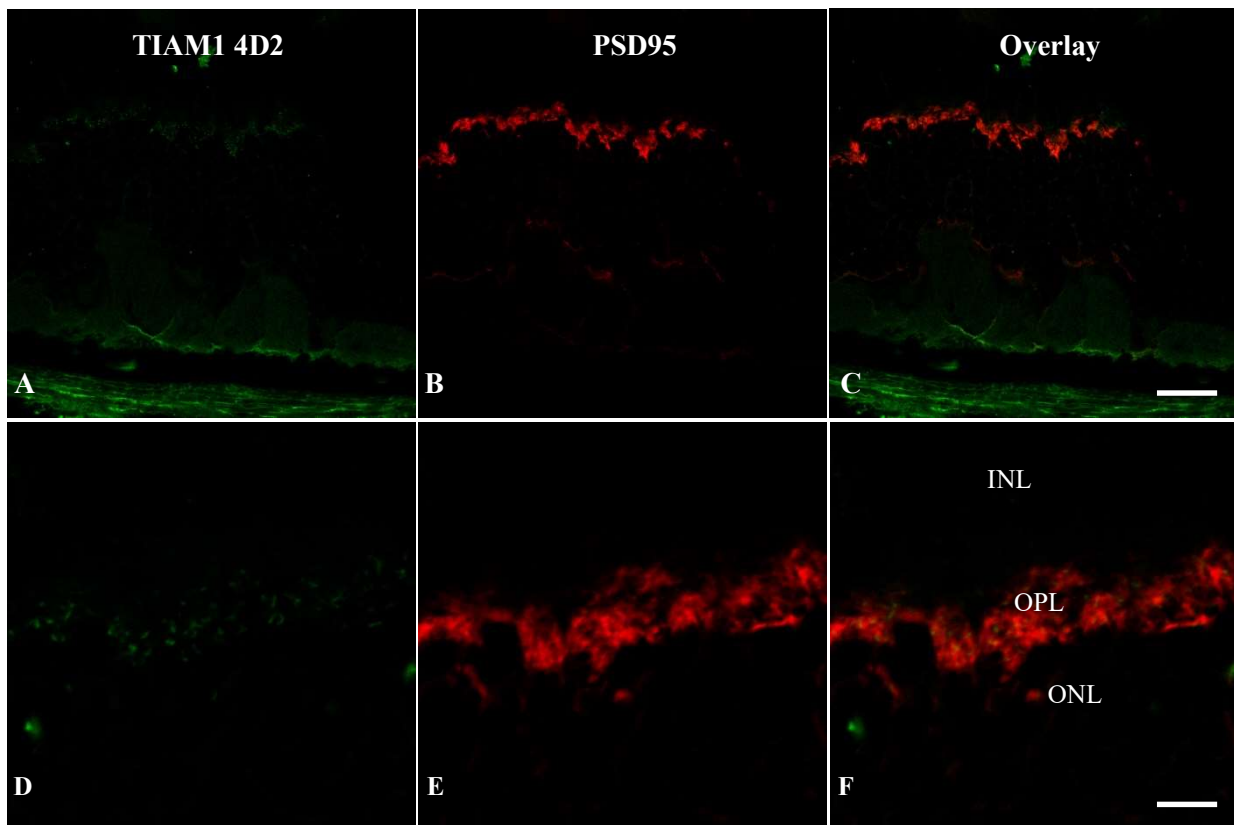


Abbildung 23: Kryoschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 4D2 + PSD95)
ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer
 Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μ m; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μ m

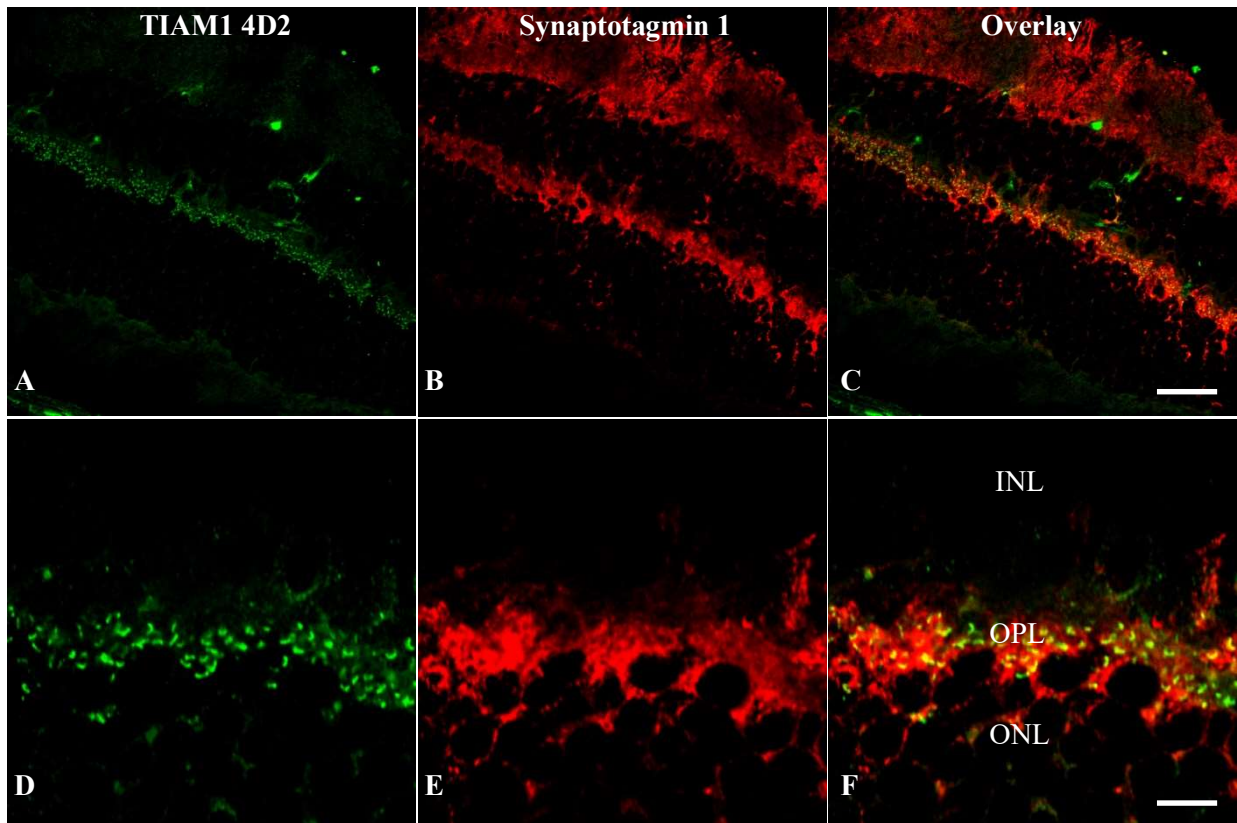


Abbildung 24: Kryoschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 4D2 + Anti-Synaptotagmin 1)

ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, INL: inner nuclear layer

Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μm

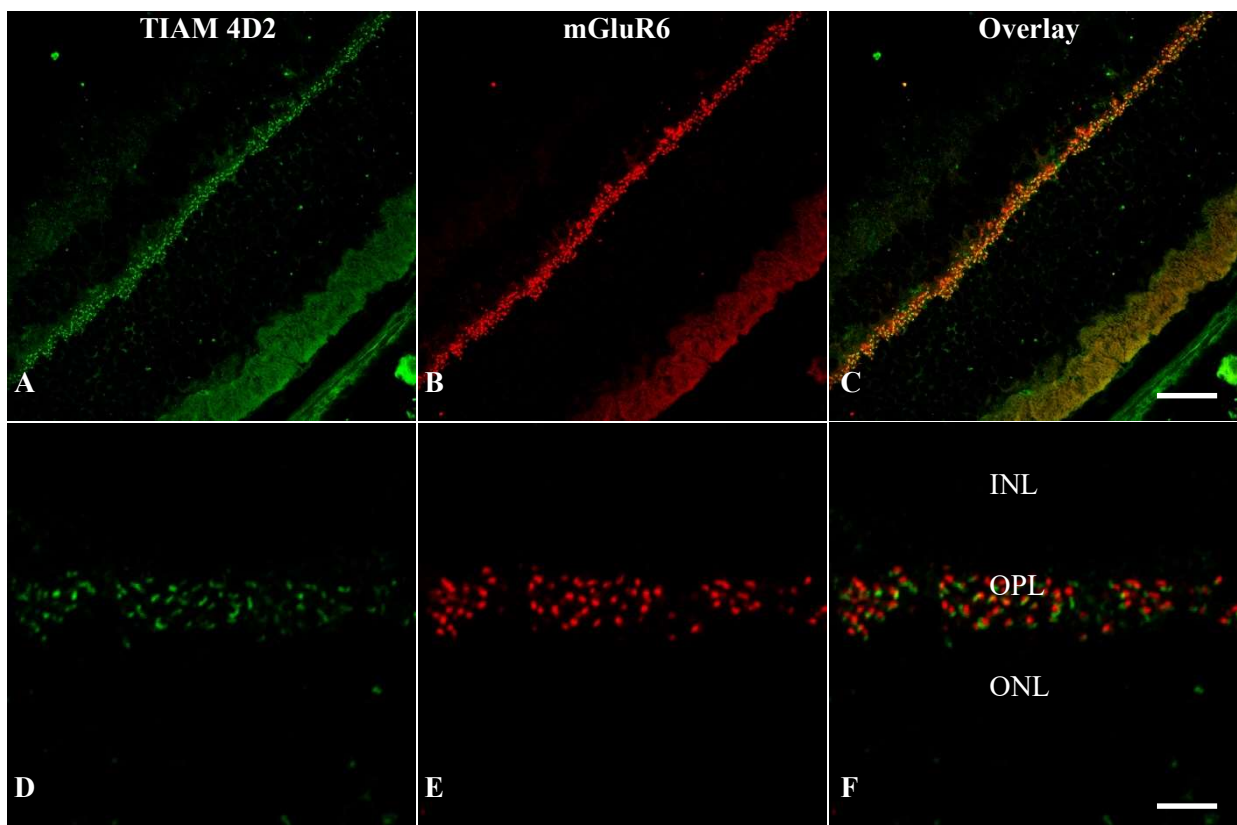
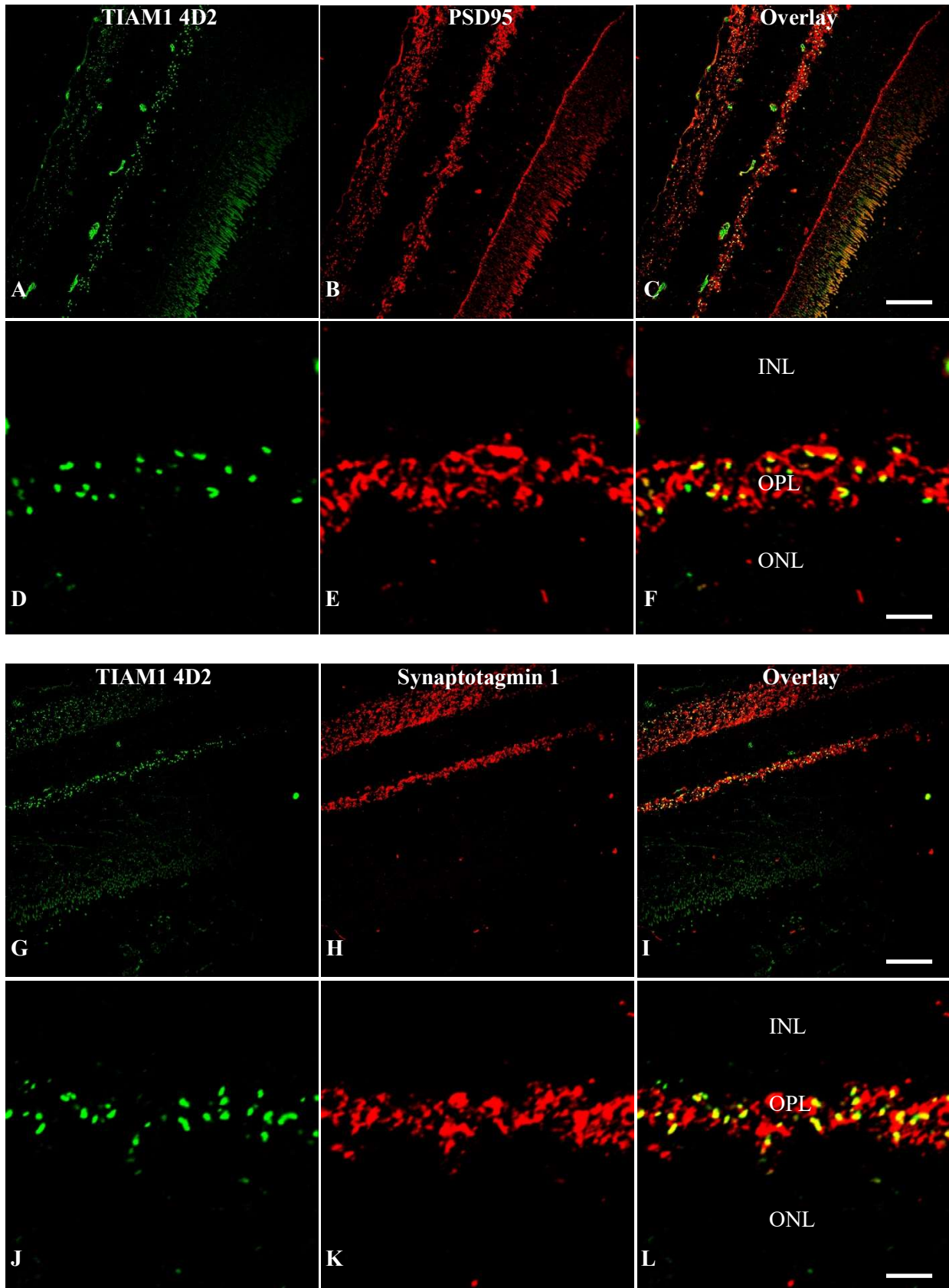


Abbildung 25: Kryoschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 4D2 + Anti-mGluR6)

Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μm

Im nächsten Schritt wurden Semidünnschnitte mit den bereits in den Kryoschnitten verwendeten Antikörpern inkubiert.



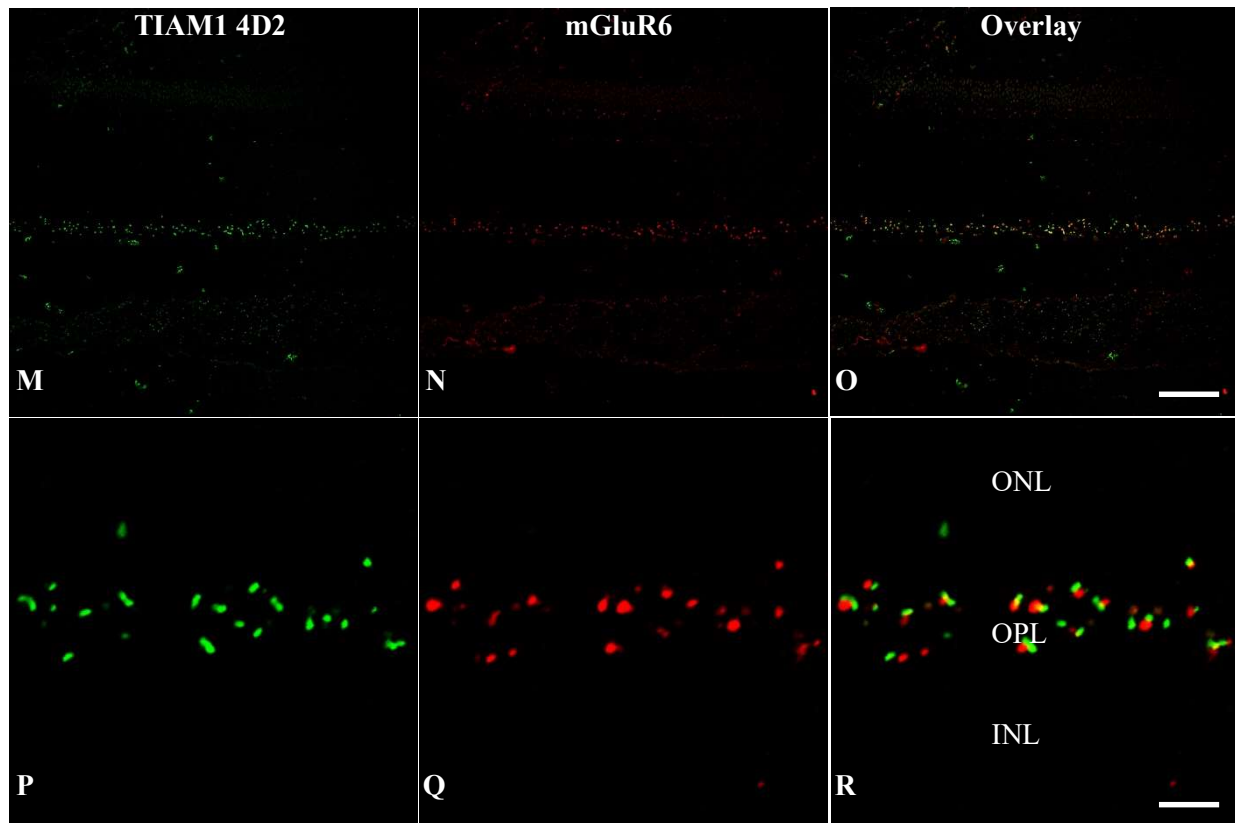


Abbildung 26: Semidünnschnitt Mausretina

A – F: Markiert mit Anti-TIAM1 4D2 + Anti-PSD95

G – L: Markiert mit Anti-TIAM1 4D2 + Anti-Synaptotagmin 1

M – R: Markiert mit Anti-TIAM1 4D2 + Anti-mGluR6

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

Skalierungsbalken jeweils obere Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken jeweils untere Reihe: 10 μm

4.1.2.3 Lokalisation von TIAM1 Klon 2D8 in der Retina der Maus

Der Ablauf ist hier analog zu den Versuchen mit dem Klon 4D2 und 7F11. Der Unterschied zu den beiden vorherigen Klonen ist, dass die Signale insgesamt deutlich schwächer sind. Deshalb musste die Laserintensität für Alexa 488 bei diesen Fluoreszenzen von ca. 1,5% (bei 4D2 und 7F11) auf ca. 2,8% gesteigert werden.

Begonnen wurde auch bei diesem Klon mit Kryoschnitten.

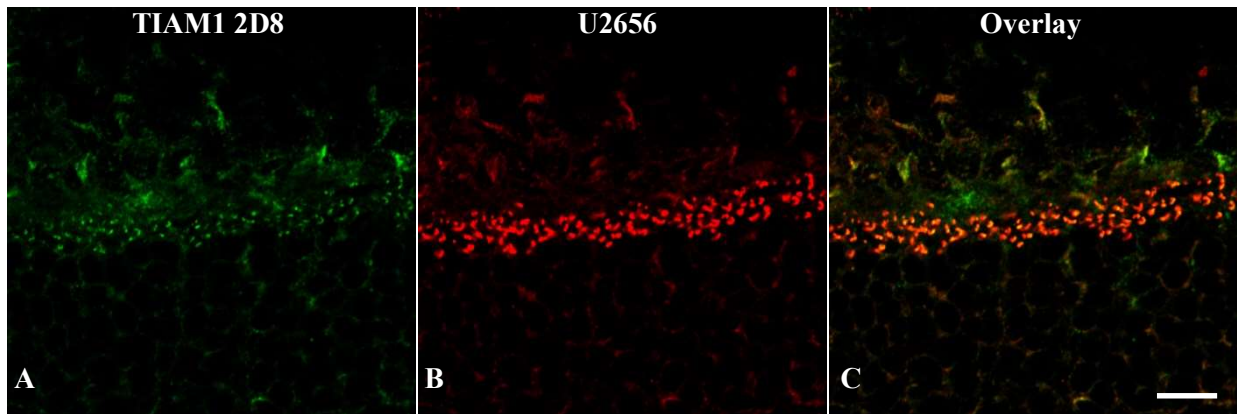


Abbildung 27: Kryoschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 2D8 + Anti-RIBEYE (B) U2656)
ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer
 Skalierungsbalken: 10 μm

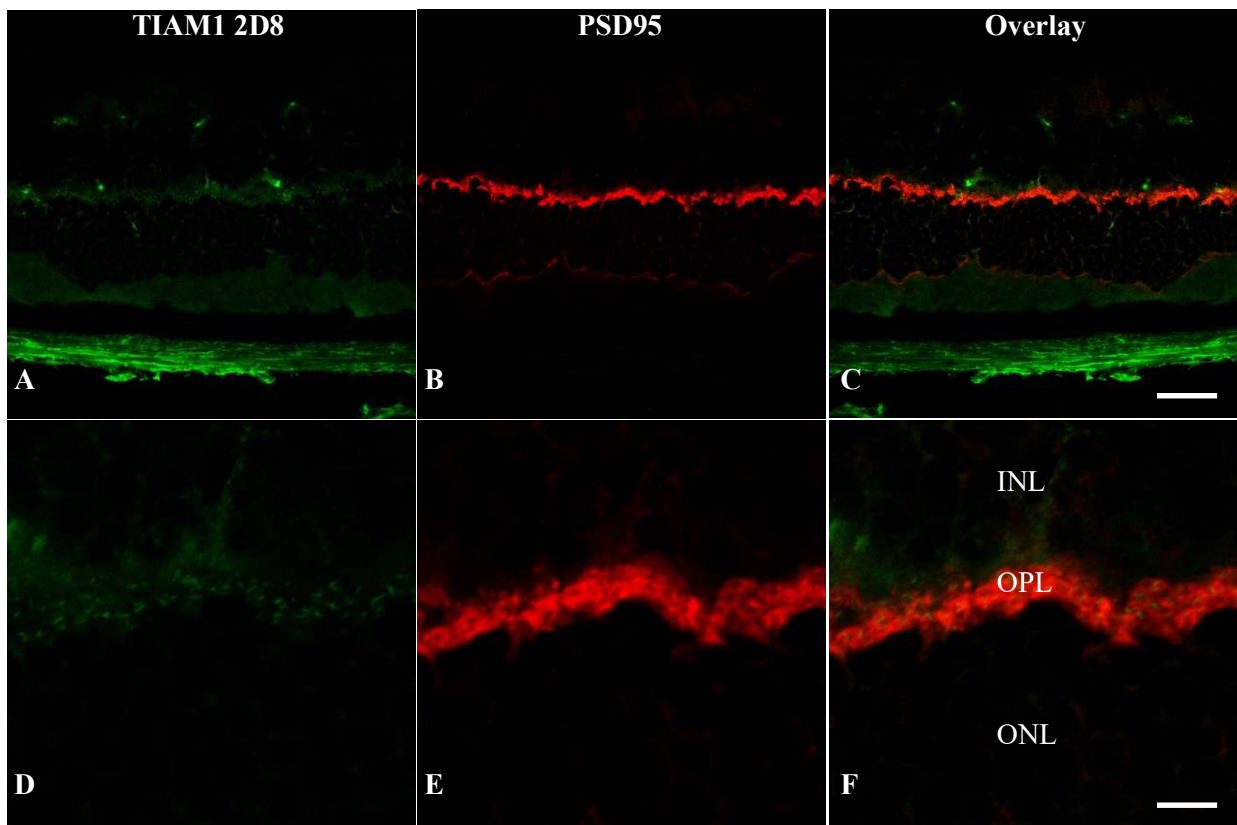


Abbildung 28: Kryoschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 2D8 + Anti-PSD95)
ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer
 Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μm

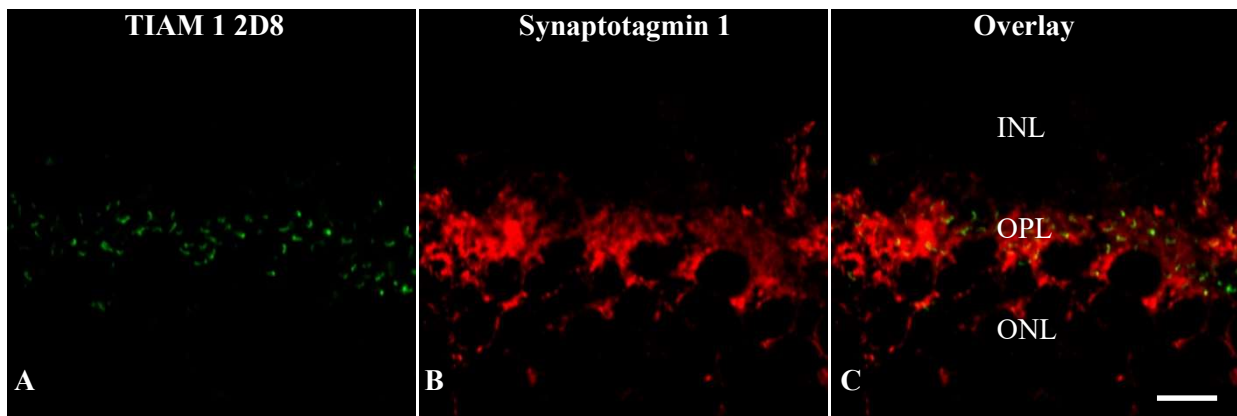


Abbildung 29: Kryoschnitt Mause retina (markiert mit Anti-TIAM1 2D8 + Anti-Synaptotagmin 1)
ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiform layer, **INL:** inner nuclear layer
 Skalierungsbalken: 10 μm

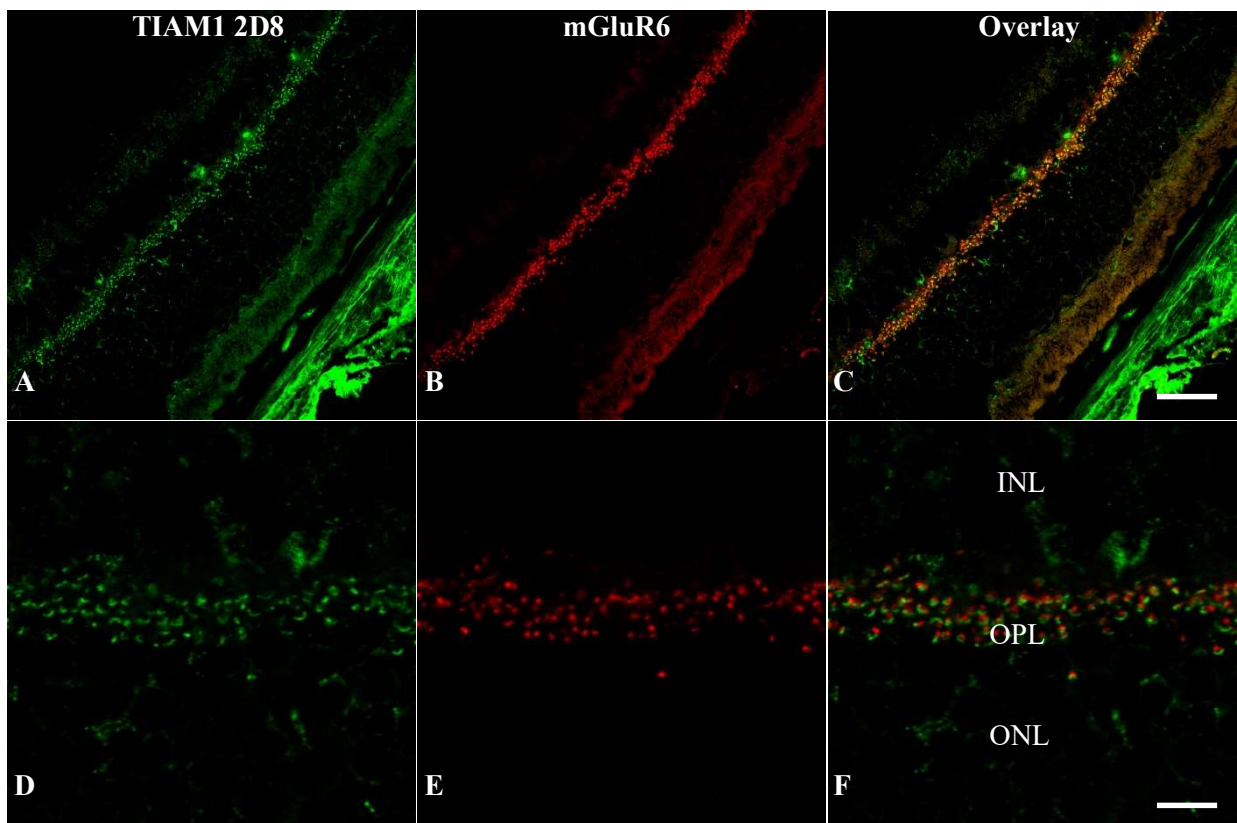


Abbildung 30: Kryoschnitt Mause retina (markiert mit Anti-TIAM1 2D8 + Anti-mGluR6)
ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiform layer, **INL:** inner nuclear layer
 Skalierungsbalken 1. Reihe: 50 μm ; Skalierungsbalken 2. Reihe: 10 μm

Nach den Kryoschnitten wurden die gleichen Fluoreszenzen mit Semidünnschnitten durchgeführt.

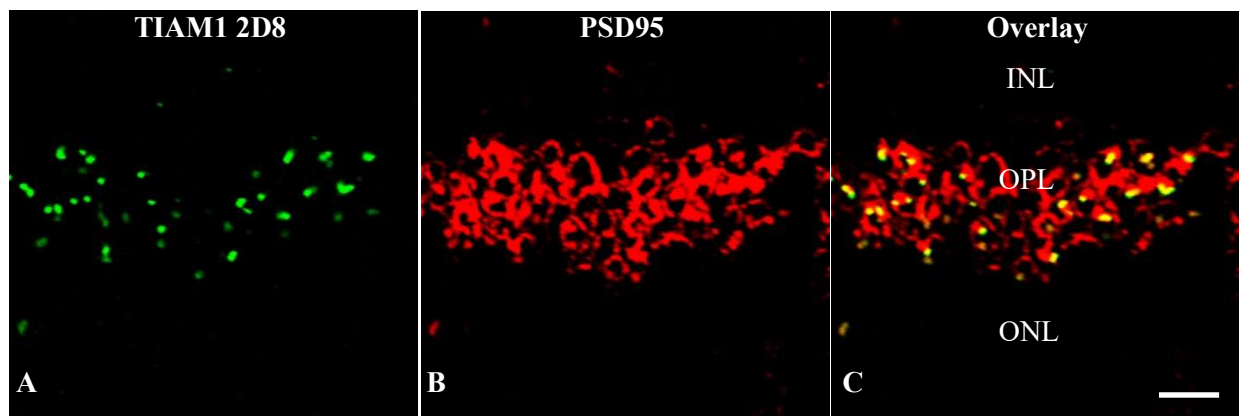


Abbildung 31: Semidünnschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 2D8 + Anti-PSD95)

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

Skalierungsbalken: 10 μ m

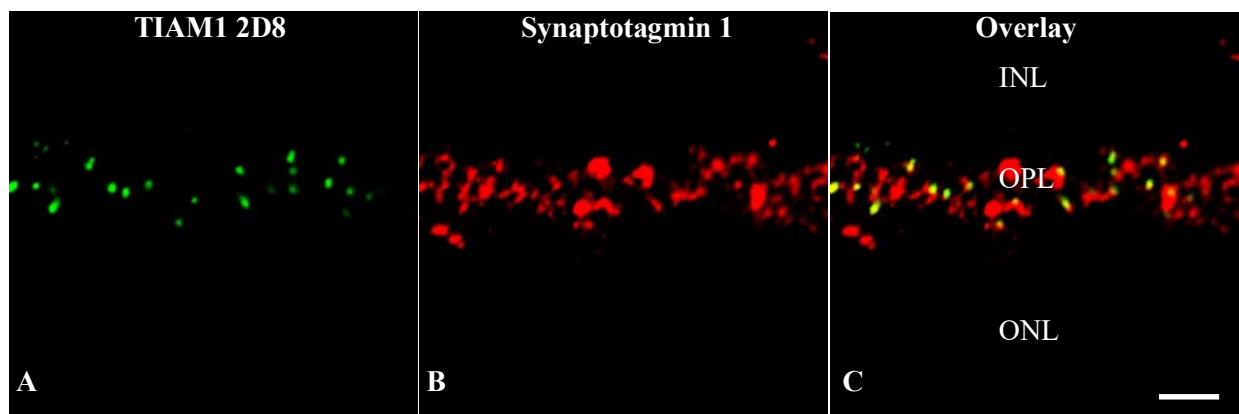


Abbildung 32: Semidünnschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 2D8 + Anti-Synaptotagmin 1)

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

Skalierungsbalken: 10 μ m

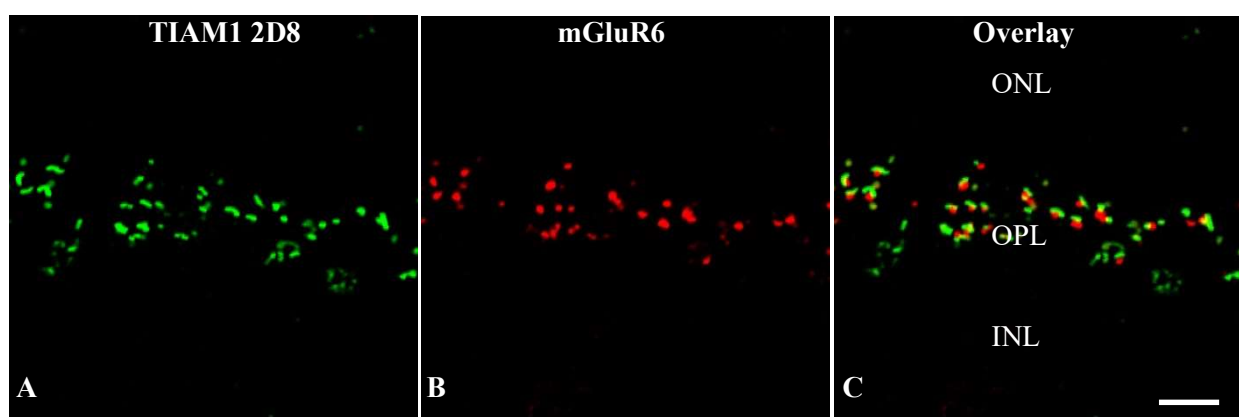


Abbildung 33: Semidünnschnitt Mausretina (markiert mit Anti-TIAM1 2D8 + Anti-mGluR6)

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

Skalierungsbalken: 10 μ m

4.1.3 Präabsorptionsexperimente

Diese Experimente wurden ebenfalls mit dem Konfokalmikroskop A1R von Nikon und einem 60x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, numerische Apertur 1,4) aufgenommen. Hierbei wurden die Antikörper mit einem spezifischen (TIAM1-Peptid) bzw. einem unspezifischen Antikörper (Kontrollpeptid) inkubiert, bevor die Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt wurden. Der sonstige Ablauf war identisch. Verdünnung der Antikörper siehe „Material und Methoden“. Die Aufnahmen mit dem Kontrollpeptid, sowie die Aufnahmen mit dem TIAM1 Peptid wurden unter identischen Bedingungen angefertigt.

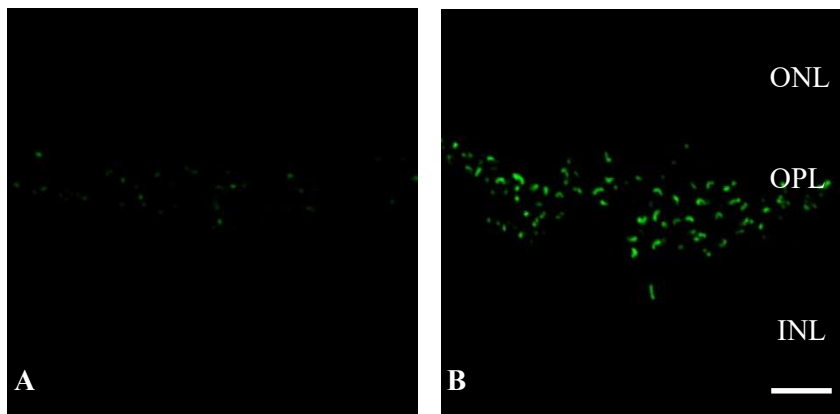


Abbildung 34: Präabsorption mit Anti-TIAM1 7F11

A: Inkubation mit Anti-TIAM1 7F11 + 20 µg TIAM1 Peptid

B: Inkubation mit Anti-TIAM1 7F11 + 20 µg Kontrollpeptid

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

Skalierungsbalken: 10 µm

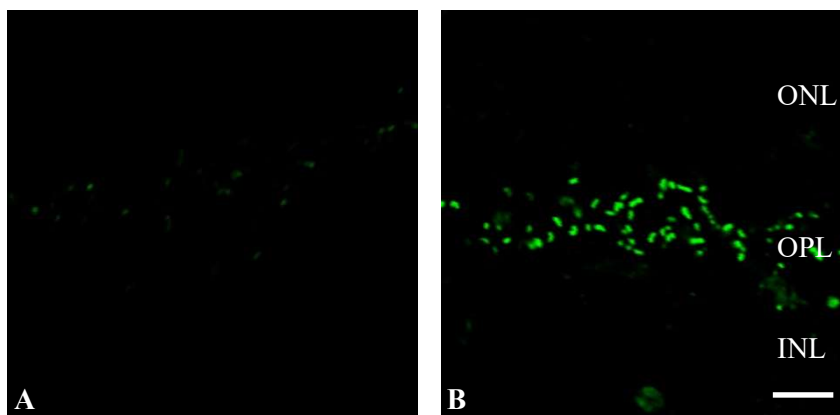


Abbildung 35: Präabsorption mit Anti-TIAM1 4D2

A: Inkubation mit Anti-TIAM1 4D2 + 20 µg TIAM1 Peptid

B: Inkubation mit Anti-TIAM1 4D2 + 20 µg Kontrollpeptid

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

Skalierungsbalken: 10 µm

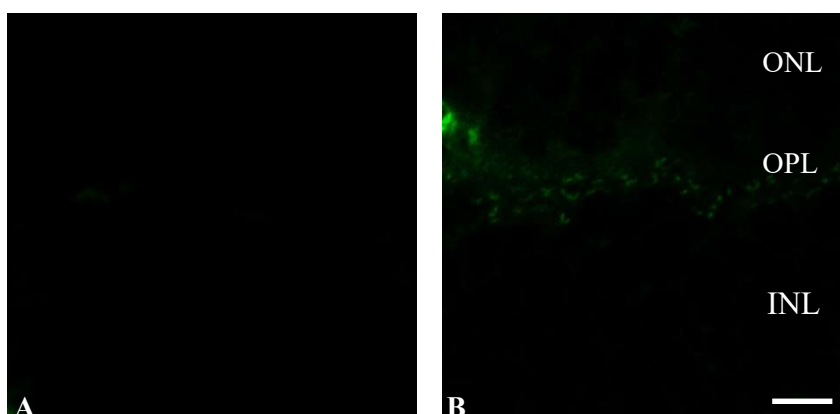


Abbildung 36: Präabsorption mit Anti-TIAM1 2D8

A: Inkubation mit Anti-TIAM1 2D8 + 20 µg TIAM1 Peptid

B: Inkubation mit Anti-TIAM1 2D8 + 20 µg Kontrollpeptid

ONL: outer nuclear layer, **OPL:** outer plexiforme layer, **INL:** inner nuclear layer

Skalierungsbalken: 10 µm

4.2 Western-Blot

Durch Western-Blot Experimente können über unterschiedliche Reaktionen Proteine in einem Gewebe sowohl qualitativ als auch semiquantitativ nachgewiesen werden. Nachdem wir in den Immunfluoreszenzexperimenten nachweisen konnten, dass die Klone aus eigener Herstellung Signale in der OPL und IPL zeigen, ist nun der Nachweis der Spezifität der Antikörper für das TIAM1 Protein von großer Bedeutung. Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Proteinen könnten sonst in der Immunfluoreszenz falsche Ergebnisse liefern. Dazu wurden, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, frische Mausretinae entnommen und aufbereitet. Mit den daraus entstandenen Gewebelysaten wurden dann die Western Blot Analysen durchgeführt. Zur Ladungskontrolle wurde ein Streifen mit Anti-RIBEYE (B) 2D9 (siehe Material und Methoden) und zur weiteren Orientierung zusätzlich ein Marker für Molekulargewichtsstandards verwendet. Nachdem die Streifen mit den Primärantikörper inkubiert wurden, wurde im nächsten Schritt der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (GAM Pox SIGMA A3673) dazugegeben. Begutachtet wurden die Streifen danach im BioRad Geldoc Chemilumineszenzdetektor nach vorheriger Inkubation mit ECL.

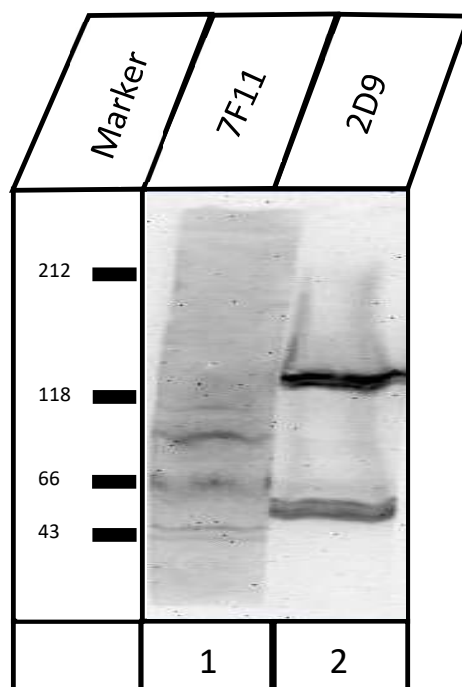


Abbildung 37: Western-Blot Maus Retina mit Anti-TIAM1 7F11 und Anti-RIBEYE (B) 2D9

1: Banden sind hier bei ca. 110 kDa, 80 kDa, 65 kDa und 40 kDa erkennbar.

2: Anti-RIBEYE (B) 2D9 zeigt die typischen Banden bei ca. 120 kDa und bei 55 kDa (CtBP 2)

Laut Habets et al. (1994) hat das Volllänge TIAM1 Protein ein Molekulargewicht von ca. 177 kDa. Eine Bande in diesem Bereich konnten durch den Antikörper nicht detektiert werden, allerdings ist bekannt, dass Proteine, die in der Zellmembran integriert oder verankert sind, in Bruchstücke mit niedrigerem Molekulargewicht zerfallen können. Gute Ergebnisse ließen sich zudem nur mit TIAM1 7F11 erbringen, der als stärkster Antikörper der einzige mit erkennbaren Banden war.

4.3 Dotblot

Wie bereits im Methodenteil näher beschrieben, wurden hier die erfolgreiche Proteinübertragungen zuerst mit einer Ponceau S Färbung dokumentiert und danach die erfolgreiche Fluoreszenzreaktion mit dem Bio-Rad Geldoc Chemilumineszenzdetektor aufgenommen.



Abbildung 38: DotBlot mit Anti-TIAM1 7F11

Links: Ponceau S Färbung; obere Reihe = TIAM1 Peptid, untere Reihe Kontrollpeptid

Rechts: Fluoreszenzreaktion mit Anti-TIAM1 7F11; obere Reihe = TIAM1 Peptid, untere Reihe = Kontrollpeptid

Verdünnungsreihe: 10 µg, 5 µg, 1 µg, 0,5 µg, 100 ng, 50 ng, 10 ng

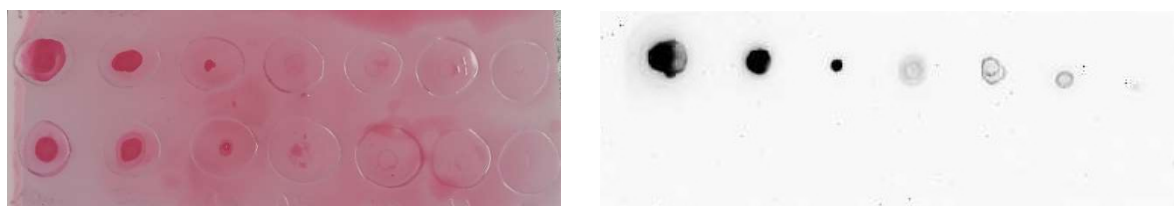


Abbildung 39: Dotblot mit Anti-TIAM1 4D2

Links: Ponceau S Färbung; obere Reihe = TIAM1 Peptid, untere Reihe Kontrollpeptid

Rechts: Fluoreszenzreaktion mit Anti-TIAM1 4D2; obere Reihe = TIAM1 Peptid, untere Reihe = Kontrollpeptid

Verdünnungsreihe: 10 µg, 5 µg, 1 µg, 0,5 µg, 100 ng, 50 ng, 10 ng

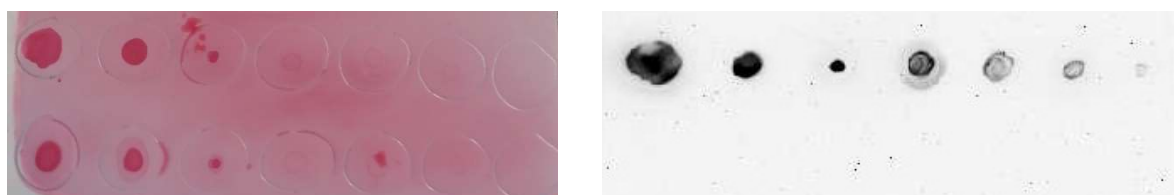


Abbildung 40: Dotblot mit Anti-TIAM1 2D8

Links: Ponceau S Färbung; obere Reihe = TIAM1 Peptid, untere Reihe Kontrollpeptid

Rechts: Fluoreszenzreaktion mit Anti-TIAM1 2D8; obere Reihe = TIAM1 Peptid, untere Reihe = Kontrollpeptid

Verdünnungsreihe: 10 µg, 5 µg, 1 µg, 0,5 µg, 100 ng, 50 ng, 10 ng

5 Diskussion

Immunfluoreszenz:

Mithilfe der spezifischen Antikörper (Klon 7F11, 4D2 und 2D8), die gegen die letzten 12 Aminosäuren des carboxyterminalen Endes von TIAM1 gerichtet sind, konnte das Protein in der präsynaptischen Terminalen der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Retina nachgewiesen werden. Zur genauen Lagebestimmung wurden dazu in Doppelfluoreszenzen Antikörper gegen bereits klar lokalisierte und gut untersuchte Proteine verwendet. PSD95 und Synaptotagmin 1 dienten dabei als präsynaptische Marker (Perrin et al. 1990, Irie et al. 1997, Pang et al. 2006), während mGluR6 als postsynaptischer Marker verwendet wurde (Katiyar et al. 2015). Ebenso verwendete ich mit Anti-RIBEYE U2656 einen Antikörper, der das synaptische Ribbon als Komplex (durch die Bindung an die B-Domäne des dort vorherrschende Proteins RIBEYE) in der präsynaptischen Terminalen deutlich darstellt (Schmitz, Königstorfer, Südhof 2000).

Die Doppelfluoreszenzbilder zeigen eine Kolo-kalisation von Anti-TIAM1 mit den präsynaptischen Markern, während die räumliche Trennung zu den mGluR6 Signalen in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen deutlich zu erkennen ist. Somit lässt sich die Annahme bestätigen, dass es sich bei TIAM1 um ein Protein handelt, dass in der Retina vor allem in der präsynaptischen Terminalen von OPL und IPL zu finden ist. Die Signale in der äußeren plexiformen Schicht stellen sich als hufeisenförmige Gebilde dar, was den Verdacht der räumlichen Nähe zu den synaptischen Ribbons bestätigt. In der inneren plexiformen Schicht, wo die Dichte an synaptischen Ribbons deutlich geringer ist als in der OPL, konnten im Unterschied meist nur schwache, punktförmige Signale gefunden werden. Diese Signale waren ausschließlich bei höheren Laserintensitäten darzustellen, sodass es in der OPL zu Überstrahlungen kam. Aus diesem Grund beschränkte ich mich in der Auswahl der Bilder auf die Darstellung der OPL.

In den Immunfluoreszenzfärbungen hatte ich dabei 3 Klone für die TIAM1 Antikörper zu Verfügung. Mit allen 3 Klonen konnten vergleichbare Ergebnisse in der konfokalen Mikroskopie erzielt werden, wobei sich hier vor allem Anti-TIAM1 7F11 als besonders geeignet zeigte.

Präabsorptionsexperimente:

Die Präabsorptionsexperimente wurden mit einem spezifischen TIAM1 Peptid der Firma PepMic (siehe „Material und Methoden“) durchgeführt. Dabei zeigten Ergebnisse der danach durchgeführten Immunfluoreszenzexperimente, dass mithilfe des Peptids, welches die letzten 25 Aminosäuren des carboxyterminalen Endes von TIAM1 umfasst, die Anfärbung des Proteins in der Retina weitestgehend blockiert werden konnte. In den Versuchen mit dem Kontrollpeptid sind im Unterschied dazu die

Signale eindeutig zu erkennen. Dadurch konnte die hohe Spezifität der hier verwendeten Antikörper nachgewiesen werden.

Dot Blot – Experimente

Ein weiteres Verfahren zur Überprüfung der Spezifität der 3 Anti-TIAM1 Antikörper konnte mithilfe der Dot Blot – Experimente gefunden werden. Hier konnte ich nachweisen, dass selbst kleinste Mengen des Peptids (dargestellt bis 10 ng) durch die hier verwendeten Antikörper detektiert werden konnten. Ähnlich den Präabsorptionsexperimenten wurden das TIAM1- Peptid der Firma PepMic und das im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebene Kontrollpeptid verwendet. Während eine deutliche Bindung der Antikörper an das TIAM1 Peptid stattfand und somit klar erkennbare Fluoreszenzen nachweisbar waren, konnten keinerlei Signale bzw. Fluoreszenzen mit der Kombination aus Kontrollpeptid und Antikörper erzeugt werden. Auch diese Untersuchungen zeigen somit die hohe Spezifität der hier verwendeten Antikörper gegen TIAM1.

Western Blot:

Mithilfe der Western Blot Experimente konnte ich nachweisen, dass die vom anatomischen Institut der Universität des Saarlandes hergestellten, monoklonalen Antikörper, das Protein TIAM1 in der Retina von Mäusen des Anzuchtstammes C57BL/6J nachweisen können. Da es sich hierbei um ein Protein handelt, das höchstwahrscheinlich in der präsynaptischen Membran von OPL und IPL lokalisiert und verankert ist, kam es nicht zur Ausbildung einer Bande bei 177 kDa (dem Molekulargewicht des Volllänge Proteins nach Habets et al. 1994), sondern zum Nachweis kleinerer Bruchstücke. Dies ist aufgrund des Verfahrens der Aufbereitung der Proteinproben durch mechanische, thermische und chemische Zerkleinerung zu erklären, durch die die Zellmembranstrukturen zerstört und sämtliche zellulären Proteine freigegeben werden. Die Bruchstücke lagen stets bei einem Molekulargewicht von 110 kDa, 80 kDa, 65 kDa und 40 kDa. Wichtig war vor allem der Ausschluss einer Kreuzreaktion mit RIBEYE. Die TIAM1 Signale haben sich in den doppelfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit den Signalen von Anti-RIBEYE U2656 größtenteils gleich dargestellt, sodass eine Kreuzreaktion als mögliche Ursache experimentell ausgeschlossen werden musste. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich hierbei nicht um eine solche Kreuzreaktion handelt. Auch hier konnten die deutlichsten Ergebnisse mit Anti-TIAM1 7F11 erzielt werden.

Bewertung der Ergebnisse und Ausblick:

Meine Untersuchungen zeigen, dass TIAM1 als Protein in der Retina lokalisiert ist. Hier ist es vor allem in der äußeren und inneren plexiformen Schicht zu finden. Diese Ergebnisse konnten durch verschiedene Antikörper und verschiedene Doppelimmunfluoreszenzen bestätigt werden. Dort zeigt die

Signalmorphologie der hier untersuchten Antikörper eine nahe Lage zu den synaptischen Ribbons, da sich sowohl die Signale der RIBEYE Antikörper, als auch die Signale der TIAM1 Antikörper hufeisenförmig darstellen. Durch die Verwendung von Antikörpern, die verschiedene Strukturen in der Prä- oder Postsynapse markieren, konnte zudem gezeigt werden, dass TIAM1 vor allem im Bereich der präsynaptischen Terminalen nachweisbar ist. Allerdings ist die räumliche Auflösung der in dieser Arbeit verwendeten konfokalen Mikroskopie zu gering, um eine genauere Abschätzung der Lage des TIAM1 Proteins vorzunehmen. Hier sind weitere Untersuchungen, beispielsweise mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen und deutlich höherer Auflösung der präsynaptischen Terminalen notwendig, um TIAM1 im Kontext des synaptischen Ribbons klarer zu lokalisieren.

Wie sind diese Ergebnisse nun interpretierbar? Durch die hier gewonnenen Erkenntnisse ist es gut vorstellbar, dass TIAM1 durch seine Funktionsweise als GEF (*guanine nucleotide exchange factor* - Austausch von GDP zu GTP), in der Lage ist Rac-spezifische GTPasen zu steuern und darüber die Aktinpolymerisation zu beeinflussen. Dies ist ein wichtiger und essenzieller Bestandteil in der Funktionsweise der präsynaptischen Terminalen. Proteininteraktionen mit anderen für die synaptische Signalmaschinerie wichtigen Proteine sind dadurch eine wichtige Voraussetzung für eine zielgerichtete Steuerung.

In den retinalen Synapsen findet aufgrund der vielen endozytotischen und exozytotischen Prozesse ein ständiger Auf- und Abbau von Aktinfilamenten statt. Aktinfilamente sind unter anderem beteiligt am Aufbau der Zellmorphologie als wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts, der Zellteilung, bei der sie wichtige Aufgaben übernehmen, sowie der Zellbeweglichkeit, bei der Aktinfilamente die Zelle beispielsweise dazu befähigen, Pseudopodien auszubilden. Die Filamente interagieren dabei mit den verschiedensten Proteinen, wie z.B. Cadherine (wichtig für den Zellkontakt von Gewebeverbänden), Talin (verbindet die Aktinfilamente mit Integrinen, die den Kontakt zur extrazellulären Matrix herstellen) oder Spectrin (bildet mit Aktinfilamenten ausgedehnte Netzwerke auf der Innenseite der Zellmembran) (Holmes et al. 1990, Oda et al. 2009, Gunning et al. 2015). Marie Guillet et al. (2016) konnte zudem nachweisen, dass in den Haarzell Ribbon Synapsen Aktinfilamente an der Regulation der Exozytose maßgeblichen Anteil haben und deutliche Aktinanreicherungen nahe dem synaptischen Ribbon zu finden sind. Der Auf- und Abbau der Aktinfilamente ist zudem ein Prozess, der äußerst schnell abläuft und deshalb für die besonderen Anforderungen der Ribbonsynapse (mit einem besonders hohen Transmitterverbrauch – bis zu 500 Vesikel/Sekunde) geeignet ist.

Ein Beispiel für eine mögliche und sinnvolle Proteininteraktion von TIAM1 ist das in dieser Arbeit bereits erwähnte Protein CASK. Eine Interaktion mit CASK ist auch *in vivo* naheliegend, da hierüber die Organisation des juxtamembranösen Aktinzytoskeletts gesteuert werden könnte. Hier ist das Aktinzytoskelett besonders dicht, um unerwünschte Verschmelzungen von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran zu verhindern. Dieser Zustand wurde erstmals 1988 von Dominique Aunis und Marie-France Bader in sekretorischen Zellen beschrieben und später auch auf synaptische Verbindungen von Nervenzellen übertragen. Dieses sogenannte Aktin-Barrieren-Modell basiert vor

allem auf der besonders hohen Anreicherung von F-Aktin im untersuchten Bereich. Filamentöses Aktin sind aneinandergereihte G-Aktinmoleküle (Einzelmoleküle), die dadurch die für Aktinfilamente charakteristische dynamische Verlängerungen und Verkürzung ermöglichen (Holmes et al. 1990).

Ein weiteres Protein, welches in diesem Zusammenhang als Interaktionspartner mit TIAM1 gut vorstellbar ist, ist SynCAM. SynCAM ist auch unter zahlreichen anderen Namen wie beispielsweise CADM1 (cell adhesion molecule 1), IGSF4A, RA175 oder SgIGSF bekannt, je nachdem welches seiner vielfältigen Funktionen beschrieben wird. Es konnte gezeigt werden, dass auch SynCAM unter anderem in der präsynaptischen Membran der retinalen Synapsen lokalisiert ist (Ribic et al. 2014). Dabei handelt es sich um ein Transmembranprotein, dass auf der äußeren Seite ein Immunglobulin-ähnliches Aussehen zeigt. Nach innen gerichtet hat es dabei zwei Protein-Interaktionsdomänen zur Verfügung (Kuramochi et al. 2001). Die erste Domäne ist ein submembranöses Protein 4.1 Bindemotiv (Protein 4.1-BM) an welches verschiedene Vertreter der Protein 4.1 Familie binden können und damit SynCAM mit dem Aktinzytoskelett verbinden (Yageta et al. 2002). Bei der zweiten Interaktionsdomäne handelt es sich um ein PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) bindendes Motiv, das mit anderen Proteinen mit entsprechender PDZ-Domäne interagieren kann (Shingai et al. 2003, Fukuhara et al. 2003). Denkbar ist hierbei eine Interaktion mit der PDZ-Domäne von TIAM1. SynCAM ist ebenfalls ein Protein, dass für die Umgestaltung des Aktinzytoskeletts im synaptischen System verantwortlich ist. Laut Masuda et al. 2009 ist davon auszugehen, dass zusätzlich zu seiner Rolle als Anker des Aktinzytoskeletts an der Zellmembran über Protein 4.1, SynCAM dazu in der Lage ist das Rac-spezifische GEF TIAM1 zu rekrutieren und darüber die Reorganisation des Aktinzytoskeletts vor allem im juxtamembranösen Bereich zu steuern.

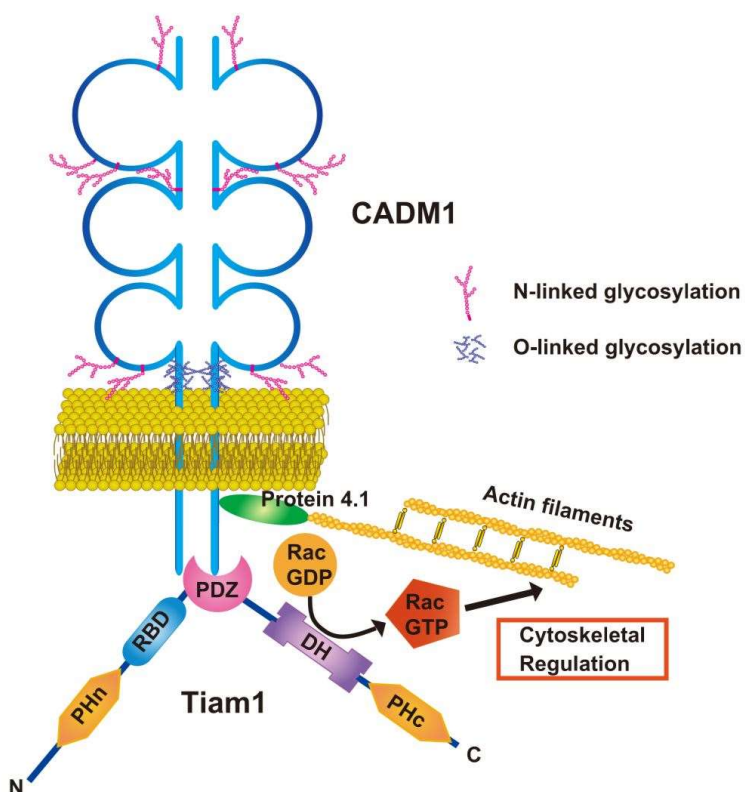


Abbildung 41: SynCAM Interaktionsschema

Extrazellulär ist der immunglobulinähnliche Aufbau des Transmembranproteins dargestellt. Intrazellulär besitzt SynCAM 2 Protein-interaktionsmotive:

- (1) Interaktion mit Mitgliedern der Protein 4.1 Familie, Verankerung des Aktinzytoskeletts in der Zellmembran
- (2) Interaktion mit TIAM1, Reorganisation des juxtamembranös gelegenen Aktinzytoskeletts (Abbildung aus Masuda et al. 2009)

Aufgrund dessen macht das Vorhandensein von TIAM1 in den retinalen Synapsen als mögliches Steuerelement der Aktinpolymerisation und somit als essenzieller Bestandteil des präsynaptischen Endo- und Exozytose Apparats durchaus Sinn. Weitere Untersuchungen müssen durchgeführt werden, um die Möglichkeit dieser und weiterer Interaktionen in der Retina näher zu ergründen.

Erstmalig beschrieben und nachgewiesen wurde TIAM1 im T-Lymphomzelllinien. Hier sind besonders hohe Konzentration von TIAM1 oder alternativ verkürzte Varianten, denen die regulatorischen Domänen fehlen, zu finden. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch Überexpressionen von beispielsweise SynCAM ursächlich für die Invasivität sein können (Masuda et al. 2009). Hier spielen unter Anderem der Verlust der Zellpolarität und der Zelladhäsion eine essenziell wichtige Rolle. Diese Veränderungen können dazu führen, dass es zu einer epithelial-mesenchymalen Transition der Zellen und damit verbunden zum Übertritt der Basalmembran kommt (Manneville et al. 2008). Auch Störungen der CASK Expression und Steuerung könnten hierbei eine Rolle spielen. Diese Möglichkeiten müssen noch in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Darüber hinaus müssen die grundlegende Steuerung der Aktinpolymerisation in der präsynaptischen Terminalen und die Interaktionen mit weiteren Proteinen wissenschaftlich untersucht werden. Aufgrund der calciumabhängigen Steuerung der Exozytose der neurotransmittergefüllten Vesikel ist eine calciumabhängige Steuerung der Aktinpolymerisation durch TIAM1 und seiner Interaktionspartner denkbar.

Die hier in dieser Arbeit vorgestellten monoklonalen Antikörper, allen voran Klon 7F11, des anatomischen Instituts der Universität des Saarlandes eignen sich für weitere Experimente außerordentlich gut.

6 Literaturverzeichnis

Adithi, Kandalam, Biswas, Krishnakumar. 2006: „Expression of Rac1, Tiam1 and Cdc42 in retinoblastoma“ *Experimental Eye Research, Science Direct*, 83 1446-1452

Anjum, Ayoubian, Schmitz. 2014: „Differential synaptic distribution of the scaffold proteins Cask and Caskin in the bovine retina“ *Molecular and Cellular Neuroscience*, 62 (2014) 19-29

Aunis, Bader. 1988: „The Cytoskeleton as a Barrier to Exocytosis in secretory Cells“ *The company of Biologists* 139, 253-266

Bacaj, Wu, Burré, Malenka, Liu, Südhof. 2015: „Synaptotagmin-1 and -7 Are Redundantly Essential for Maintaining the Capacity of the Readily-Releasable Pool of Synaptic Vesicles“ *PLOS Biology*

Bader, Doussau, Chasserot-Golaz, Vitale, Gasman. 2004: „Coupling actin and membrane dynamics during calcium regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases“ *Biochimica et Biophysica Acta* 1742 (2004) 37-49

Baughner, Krishnamoorthy, Price, Dharmawardhane. 2005: „Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells“ *Breast Cancer Research*, 7, Article Number R965(2005)

Biederer, Sara, Mozhayeva, Atasoy, Liu, Kavalali, Südhof. 2002: „SynCAM, a Synaptic Adhesion Molecule That Drives Synapse Assembly“ *ScienceMag*, Vol 297

Biederer, Südhof. 2001: „CASK and Protein 4.1 Support F-actin Nucleation on Neurexins“ *The Journal of Biological Chemistry*, DOI: 10.1074/jbc.M105287200

Boycott, Wässle. 1991: „Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina“ *European Journal of Neuroscience*, doi: 10.1111/j.1460-9568.1991.tb00043.x

Bowmaker, Dartnall. 1980: „Visual pigments of rods and cones in a human retina“ *The Journal of Physiology*, doi: 10.1113/jphysiol.1980.sp013097

Brandstätter, Fletcher, Garner, Gundelfinger, Wässle. 1999: „Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina“ *European Journal of Neuroscience*, doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00793.x

Butz, Fernandez-Chacon, Schmitz, Jahn, Südhof. 1999: „The Subcellular Localization of Atypical Synaptotagmins III and VI“ *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 274, No. 26, pp. 18290-18296

Bustelo, Sauzeau, Berenjeno. 2007: „GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo“ *BioEssays / Volume 29, Issue 4*

Chen, Antonarakis. 1995: „Localization of a Human Homolog of the Mouse TIAM1 Gene to Chromosome 21q22.1“ *short communication*

Dembla, Wahl, Katiyar, Schmitz. 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*, 34(15)5245-5260

Deng, Kaeser, Xu, Südhof. 2011: „RIM Proteins Activate Vesicle Priming by Reversing Autoinhibitory Homodimerization of Munc13“ *Neuron*, doi 10.1016/j.neuron.2011.01.005

- Dowling. 1987:** „The Retina: An Approachable Part of the Brain“ *Harvard University Press*
- Drenckhahn, Franz. 1986:** „Identification of actin-, alpha-actinin-, and vinculin- containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells“ *Journal of Cell Biology*, doi: 10.1083/jcb.102.5.1843
- Eich, Dembla, Wahl, Dembla, Schwarz, Schmitz. 2017:** „The Calcineurin-Binding-Activity-Dependent Splice Variant Dynamin1xb Is Highly Enriched in Synapses in Various Regions of the Central Nervous System“ *frontiers in Molecular Neuroscience*, doi: 10.3389/fnmol.2017.00230
- Engers, Zwaka, Gohr, Weber, Gerharz, Gabbert. 2000:** „Tiam1 Mutations in human renal-cell carcinomas“ *Int. J. Cancer*: 88,369-376
- Engers, Mueller, Walter, Collard, Willers, Gabbert. 2006:** „Prognostic relevance of TIAM1 protein expression in prostate carcinomas“ *British Journal of Cancer* 95, 1081-1086 (2006)
- Engers, Ziegler, Mueller, Walter, Willers, Gabbert. 2007:** „Prognostic relevance of increased GTPase expression in prostate carcinomas“ *Endocrine related cancer*, doi: 10.1677/ERC-06-0036
- Etienne-Manneville, Hall. 2002:** „Rho GTPases in cell biology“ *NATURE*, 420, 629-635
- Etienne-Manneville. 2008:** „Polarity proteins in migration and invasion“ *Oncogene*, 27, 6970-6980
- Fukuhara, Masuda, Yageta, Fukami, Kuramochi, Murakami. 2003:** „Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of Drosophila tumor suppressor Dlg“ *Oncogene*, 22, 6160-6165
- Guillet, Sendin, Bourien, Puel, Nouvian. 2016:** „Actin Filaments Regulate Exocytosis at the Hair Cell Ribbon Synapse“ *The Journal of Neuroscience*, January 20, 2016, 36(3):649 – 654
- Gunning, Ghoshdastider, Whitaker, Popp, Robinson. 2015:** „The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments“ *Journal of Cell Science*, Band 128, Nr.11, 2015, 2009-2019
- Graumann und Sasse. 2005:** „Compact Lehrbuch der Anatomie“ *Schattauer Verlag*
- Habets, Scholtes, Zuydgeest, van der Kammen, Stam, Berns, Collard. 1994:** „Identification of an Invasion-Inducing Gene, TIAM1, that Encodes a Protein with Homology to GDP-GTP Exchangers for Rho-like Proteins“ *Cell*, Vol. 77, 537-549
- Hall. 1997:** „Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton“ *Frontiers in cell biology*, *SCIENCE*, Vol. 279
- Hall, Nobes, 2000:** „Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton“ *The Royal Society*, doi: 10.1098/rstb.2000.0632
- Haataja; Groffen, Heisterkamp. 1997:** „Characterization of RAC3, a Novel Member of the Rho Family“ *Journal of Biological Chemistry*
- Hajdo-Milasinovic, Ellenbroek, Van Es, van der Vaart, Collard. 2007:** „Rac1 und Rac3 have opposing functions in cell adhesion and differentiation of neuronal cells“ *Journal of Cell Science*, doi: 10.1242/jcs.03364
- Haverkamp, Wässle. 2000:** „Immunocytochemical analysis of the mouse retina“ *Journal of Comparative Neurology*, doi: 10.1002/1096-9861(20000814)424:1
- Holmes, Popp, Gebhard, Kabsch. 1990:** „Atomic model of the actin filament“ *Nature*, PMID 2395461

- Hsueh. 2006:** „The Role of the MAGUK Protein CASK in Neural Development and Synaptic Function“ *Current Medicinal Chemistry*, 2006, 13, 1915-1927
- Irie, Hata, Takeuchi, Ichtchenko, Toyoda, Hirao, Takai, Rosahl, Südhof. 1997:** „Binding of Neuroligins to PSD-95“ *SCIENCE*, doi:10.1126/science.277.5331.1511
- Jastrow, Mach, Vollrath. 1997:** „The shape of synaptic ribbons in the rat pineal gland“ *Springer, Cell and Tissue Research*, 287
- Juusola, French, Weckström. 1996:** „Information processing by graded-potential transmission through tonially active synapses“ *Trends in Neurosciences*, doi: 10.1016/S0166-2236(96)10028-X
- Katiyar, Weissgerber, Roth, Dörr, Sothilingam, Garrido, Beck, Seeliger, Beck, Schmitz, Flockerzi. 2015:** „Influence of the Beta2-Subunit of L-type Voltage Gated Cav Channels on the Structural and Functional Development of Photoreceptor Ribbon Synapses“ *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, doi:10.1167/iovs.15-16654
- Kuramochi, Fukuhara, Kanbe, Maruyama, Ghosh, Plecher, Isomura, Onizuka, Kitamura, Sekiya, Reeves, Murakami. 2001:** “TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer” *nature genetics*, 27, 427-430
- Von Kriegstein, Schmitz, Link, Südhof. 1999:** „Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses“ *European Journal of Neuroscience*, doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00542.x
- Krishnan, Schiöth. 2015:** „The Role of G-protein-coupled receptors in the early evolution of neurotransmission and the nervous system“ *Journal of experimental Biology*, doi:10.1242/jeb.110312
- Lagnado, Schmitz. 2015:** „Ribbon Synapses and Visual Processing in the Retina“ *Annual Review of Vision Science*, 2015.1:235-262
- Lenzi, Runyeon, Crum, Ellisman, Roberts. 1999:** „Synaptic Vesicle Population in Saccular Hair Cells Reconstructed by Electron Tomography“ *JNeurosci, The Journal of Neuroscience*, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-01-00119-1999
- Malliri, Klooster, Olivo, Collard. 2002:** „Determination of the Activity of Rho-Like GTPases in Cells“ *Methods in molecular biology*, Volume 189
- Malliri, Collard. 2003:** „Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer“ *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 15, Issue 5
- Masuda, Maruyama, Ohta, Ito, Hayashi, Tsukasaki, Kamihira, Yamaoka, Hoshino, Yoshida, Watanabe, Standbridge, Murakami. 2009:** „CADM1 Interacts with TIAM1 and Promotes Invasive Phenotype of Human T-cell Leukemia Virus Type I-transformed Cells and Adult T-cell Leukemia Cells“ *The Journal of Biological Chemistry*, Doi: 10.1074/jbc.M109.076653
- Matthews, Fuchs. 2010:** “The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission” *Nature Reviews Neuroscience*, 11, pages 812–822(2010)
- Matsuo, Terao, Nabeshima, Hoshino 2002:** „Roles of STEF/TIAM1, guanine nucleotide exchange factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology“ *Molecular and Cellular Neuroscience* 24
- Maxeiner, Luo, Tan, Schmitz, Südhof. 2016:** „How to make a synaptic ribbon: RIBEYE deletion abolished ribbons in retinal synapses and disrupts neurotransmitter release“ *The Embo Journal*, doi 10.15252/embj.201592701

- McCartney, Dickson. 1985:** „Photoreceptor synaptic ribbons: Three dimensional shape, orientation and diurnal (non) variation“ *Experimental Eye Research*, doi:10.1016/S0014-4835(85)80022-1
- Meier, Dermietzel. 2006:** „Electrical Synapses – Gap Junctions in the Brain“ *Cell Communication in Nervous and Immune System*, pp 99 – 128
- Mertens, Roovers, Collard. 2003:** „Regulation of Tiam1-Rac signalling“ *Minireview FEBS Letters*, 27252
- Mertens, Pegtel, Collard. 2006:** „Tiam1 takes PART in cell polarity“ *Trends in Cell Biology*, Vol. 16 No. 6 June 2006
- Mertens, Collard. 2008:** „The Rac activator Tiam1 prevents keratinocyte apoptosis by controlling ROS-mediated ERK phosphorylation“ *Journal of Cell Science*, doi: 10.1242/jcs.017194
- Michiels, Stam, Hordijk, van der Kammen, Feltkamp, Collard. 1997:** „Regulated Membrane Localization of TIAM1, Mediated by the NH2-terminal Pleckstrin Homology Domain, Is Required for Rac-dependent Membrane Ruffling and C-Jun NH2-terminal Kinase Activation“ *jcb.rupress.org*, doi: 10.1083/jcb.137.2.387
- Minard, Kim, Price, Gallik. 2004:** „The Role of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Tiam1 in Cellular Migration, Invasion, Adhesion, and Tumor Progression“ *Breast Cancer Research and Treatment*, 84, 21-32
- Mittelstaedt, Baron. 2010:** „RIM Proteins and their role in synapse function“ *Biological Chemistry*, Doi: 10.1515/BC.2010.064
- Miyamoto, Yamauchi, Tanoue, Wu, Mobley. 2006:** „TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1, leading to activation of Rac1 and induction of changes in cellular morphology“ *PNAS*, doi:10.1073/pnas.0603914103
- Moser, Grabner, Schmitz. 2019:** “Sensory processing at ribbon synapses in the retina and the cochlea” *Physiol Rev.* 100(1),103-144
- Muresan, Lyass, Schnapp. 1999:** „The Kinesin Motor KIF3A Is a Component of the Presynaptic Ribbon in Vertebrate Photoreceptors“ *JNeurosci, The Journal of Neuroscience*, doi.10.1523/JNEUROSCI.19-03-01027.1999
- Oda, Iwasa, Aihara, Maéda, Narita. 2009:** „The nature of the globular-to fibrous actin transition“ *Nature*, January 2009
- Okawa, Yu, Matti, Schwarz, Odermatt, Zhong, Tsukamoto, Lagnado, Rieke, Schmitz, Wong. 2019:** „Dynamic assembly of ribbon synapses and circuit maintenance in a vertebrate sensory system“ *nature communications*, doi: 10.1038/s41467-019-10123-1
- Paliwal, Ho, Parker, Grossman. 2012:** „CtBP2 Promotes Human Cancer Cell Migration by Transcriptional Activation of Tiam1“ *Genes and Cancer*, doi: 10.1177/1947601912463695
- Rao-Mirotznik, Harkins, Buchsbaum, Sterling. 1995:** „Mammalian rod terminal: Architecture of a binary synapse“ *Neuron*, doi: 10.1016/0896-6273(95)90312-7
- Ridley, Hall. 1992:** „The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesion and actin stress fibers in response to growth factors“ *Cell*, doi: 10.1016/0092-8674(92)90163-7
- Ridley. 2004:** „Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility“ *Experimental Cell Research*, Volume 301, Issue 1

Rieke, Schwartz. 1996: „Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse“ *The Journal of Physiology*, doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp.021360

Ribic, Liu, Crair, Biederer. 2014: „Structural organization and function of mouse photoreceptor ribbon synapses involve the immunoglobulin protein synaptic cell adhesion molecule 1“ *J Comp. Neurol.* 2014, 522(4):900-20

Sander, Klooster, Delft, Van der Kammen, Collard. 1999: „Rac Downregulates Rho Activity: Reciprocal Balance between Both Gtpases Determines Cellular Morphology and Migratory Behavior“ *Journal of Cell Biology* 147 (5): 1009-1022

Schmidt, Thews. 2017: „Physiologie des Menschen“ *Springer Verlag*

Schmitz, Bechmann, Drenckhahn. 1996: „Purification of Synaptic Ribbons, Structural Components of the Photoreceptor Active Zone Complex“ *The Journal of Neuroscience*, 16(22):7109-7116

Schmitz, Königstorfer, Südhof. 2000: „RIBEYE, a Component of Synaptic Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight into Synaptic Ribbon Function“ *Neuron*, Vol. 28, 872

Schmitz. 2009: „The Making of Synaptic Ribbons: How They Are Built and What They Do“ *The Neuroscientist*, 10.1177/1073858409340253

Schmitz. 2014: „Presynaptic [Ca²⁺] and GCAPs: aspects on the structure and function of photoreceptor ribbon synapses“ *frontiers in molecular neuroscience*, doi: 10.3389/fnmol.2014.00003

Schwarz, Natarajan, Kassas, Vitale, Schmitz. 2011: „The Synaptic Ribbon Is a Site of Phosphatidic Acid Generation in Ribbon Synapses“ *The Journal of Neuroscience*, 31(44):15996-16011

Schwarz, Schmitz. 2017: „RIBEYE(B)-domain binds to lipid components of synaptic vesicles in an NAD(H)-dependent, redox-sensitive manner“ *Biochemical Journal*, doi: 10.1042/BCJ20160886

Shepherd, Klaus, Liu, Ramaswamy, DeMali, Fuentes. 2010: „The Tiam1 PDZ Domain Couples to Syndecan1 and Promotes Cell-Matrix Adhesion“ *Science direct*, doi: 10.1016/j.jmb.2010.03.047

Sherry, Blackburn. 2013: „P-Rex2, a Rac-guanine nucleotide exchange factor, is expressed selectively in ribbon synaptic terminals of the mouse retina“ *BMC Neuroscience*, 1471-2202/14/70

Shingai, Ikeda, Kakunaga, Morimoto, Takekuni, Itoh, Satoh, Takai. 2003: “Implications of Nectin-like Molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in Cell-Cell Adhesion and Transmembrane Protein Localization in Epithelial Cells” *Journal of Biological Chemistry*, 278, 35421-35427

Sone, Hoshino, Suzuki, Kuroda, Kaibuchi, Nakagoshi, Saigo, Nabeshima, Hama. 1997: „Still life, a Protein in Synaptic Terminals of Drosophila Homologous to GDP-GTP Exchangers“ *SCIENCE*, Vol, 275

Stafford, Ear, Knight, Bowie. 2011: „The Molecular Basis of the Caskin1 and Mint1 Interaction with Cask“ *Journal of Molecular Biology*, *J. Mol. Biol.* (2011), 412, 3-13

Sun, Deng, Levick, He: „ON direction-selective ganglion cells in the mouse retina“ *The Journal of Physiology*, Volume 576, Issue 1

Südhof. 2004: „The Synaptic Vesicle Cycle“ *Annual Review of Neuroscience*, doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412

Südhof. 2012: „The Presynaptic Active Zone“ *Neuro*, doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.012

- Spiwoкс-Becker, Glas, Lasarzik, Vollrath. 2004:** „Mouse photoreceptor synaptic ribbons lose and regain material in response to illumination changes“ *European Journal of Neuroscience*, doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03198.x
- Svensmark, Brakebush. 2019:** „Rho-GTPases in cancer: friend or foe?“ *Oncogene*, 38, 7447-7456(2019)
- Trepel. 2017:** „Neuroanatomie – Struktur und Funktion“ *ELSEVIER, Urban und Fischer*
- Tom Dieck, Brandstätter. 2006:** „Ribbon synapses of the retina“ *Springer*, 326, 339-346
- Van Aelst, D’Souza-Schorey. 1997:** „Rho-GTPases and signaling networks“ *Genes and Development*, doi: 10.1101/gad.11.18.2295
- Veruki, Hartveit. 2002:** „Electrical Synapses Mediate Signal Transmission in the Rod Pathway of the Mammalian Retina“ *JNeurosci*, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-24-10558.2002
- Von Gersdorff, Vardi, Matthews, Sterling. 1996:** „Evidence That Vesicles on the Synaptic Ribbon of Retinal Bipolar Neurons Can Be Rapidly Released“ *Neuron*, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80148-8
- Von Gersdorff. 2001:** „Synaptic Ribbons: Versatile Signal Transducers“ *Neuron*, Vol. 29, 7-10
- Vollrath, Spiwoкс-Becker. 1996:** „Plasticity of retinal ribbon synapses“ *Microscopy Research and Technique/Volume 35, Issue 6*
- Wahl, Katiyar, Schmitz. 2013:** „A Local, Periaxial Zone Endocytic Machinery at Photoreceptor Synapses in Close Vicinity to Synaptic Ribbons“ *The Journal of Neuroscience*, 33(25):10278-10300
- Wahl, Magupalli, Dembla, Katiyar, Schwarz, Köblitz, Alpadi, Krause, Rettig, Sung, Goldberg, Schmitz. 2016:** „The Disease Protein Tulp1 Is Essential for Periaxial Zone Endocytosis in Photoreceptor Ribbon Synapses“ *The Journal of Neuroscience*, 36(8):2473-2493
- Wässle. 2004:** „Parallel processing in the mammalian retina“ *natural Reviews Neuroscience*
- Wong. 2000:** „Rapid Dendritic Remodeling in the Developing Retina: Dependence on Neurotransmission and Reciprocal Regulation by Rac and Rho“ *The Journal of Neuroscience*, 20(13):5024-5036
- Yageta, Kuramochi, Masuda, Fukami, Fukuhara, Shibuya, Murakami. 2002:** „Direct Association of TSLC1 and DAL-1, Two Distinct Tumor Suppressor Proteins in Lung Cancer“ *Cancer Research*, 63, 5129-5133
- Yamauchi, Miyamoto, Tanoue, Shooter, Chan. 2005:** „Ras activation of a Rac1 exchange factor, Tiam1, mediates neurotrophin-3-induced Schwann cell migration“ *PNAS*, doi: 10.1073/pnas.0507125102
- Zenisek, Horst, Merrifield, Sterling, Matthews. 2004:** „Visualizing Synaptic Ribbons in the Living Cell“ *JNeurosci, The Journal of Neuroscience*, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2886-04.2004

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AS	Aminosäure/n
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Ca.	circa
CA	Carcinom
CC	Coiled-Coil
c-	cyclic (zyklisch)
cterminal-	carboxyterminal
CNG	cyclic nucleotide gated
CtBP	C-terminales Bindeprotein
DH	Dbl-homologe Domäne
DHR	Discs large homology region
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potentiale
Et al.	„et alii“ – und andere
Etc.	et cetera – und die übrigen Dinge
FL	Full length
G-	Guanosintriphosphat
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAP	Guanin-Austausch-Faktor
GDI	Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor
GEF	Guanin Nucleotide Exchange Factor
GMP	Guanosinmonophosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GluR	Glutamatrezeptor
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
INL	inner nuclear layer
IPL	inner plexiforme layer
IPSP	inhibitorische postsynaptische Potentiale

kDa	kilo Dalton
mm	Milimeter
nterminal-	Aminoterminal-
nm	Nanometer
N.	Nervus
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
ONL	outer nuclear layer
OPL	outer plexiforme layer
PBS	Phosphat Buffered Saline
PEST	Prolin, Glutamat, Serin, Threonin
PH	Pleckstrin-homologen Domäne
P	Phosphat
PBR	Polybasische Region
PDE	Phosphodiesterase
RBD	Rac bindende Domäne
Rho	Ras homologous
S	Sklera
TIAM1	T-lymphoma invasion and metastasis
v.a.	vor allem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Augapfels.....	4
Abbildung 2: Die Zellen der Retina mit ihren Verbindungen.....	7
Abbildung 3: Exemplarische Darstellung eines Stäbchens.....	8
Abbildung 4: Verrechnung erreg. und hemmender Informationen im Bereich v. rezeptiven Feldern.....	12
Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Ribbonsynapse in der OPL.....	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Ribbonsynapse der Stäbchenzelle.....	14
Abbildung 7: Synaptic vesicle population.....	15
Abbildung 8: Arbeitsmodell für RIBEYE.....	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Regulation von Rho-GTPase durch seine Regulatoren...	19
Abbildung 10: Stark vereinfachte Darstellung von Störungen der Zellorientierung.....	21
Abbildung 11: Schematische Darstellung der strukturellen Aufbaus von TIAM1.....	22
Abbildung 12: Kryoschnitte Retina Maus.....	39
Abbildung 13: Kryoschnitte Retina Maus.....	39
Abbildung 14: Kryoschnitte Retina Maus.....	40
Abbildung 15: Kryoschnitt Retina.....	42
Abbildung 16: Kryoschnitt Retina.....	43
Abbildung 17: Kryoschnitt Retina 7F11/PSD95 7F11/Synaptotagmin1.....	44
Abbildung 18: Kryoschnitt Retina 7F11/mGluR6.....	45
Abbildung 19: Semidünnschnitt Retina (Anti-TIAM1 7F11/Anti-PSD95).....	46
Abbildung 20: Semidünnschnitt Retina (Anti-TIAM1 7F11/Anti-Synaptotagmin1).....	46
Abbildung 21: Semidünnschnitte Retina (Anti-TIAM1 7F11/Anti-mGluR6).....	47
Abbildung 22: Kryoschnitt Retina (Anti-TIAM1 4D2/Anti-RIBEYE U2656).....	48
Abbildung 23: Kryoschnitt Retina (Anti-TIAM1 4D2/Anti-PSD95).....	48
Abbildung 24: Kryoschnitt Retina (Anti-TIAM1 4D2/Anti-Synaptotagmin1).....	49
Abbildung 25: Kryoschnitt Retina (Anti-TIAM1 4D2/Anti-mGluR6).....	49
Abbildung 26: Semidünnschnitt Retina (4D2/PSD95, 4D2/Synaptotagmin1, 4D2/mGluR6).....	51
Abbildung 27: Kryoschnitt Retina (Anti-TIAM1 2D8/Anti-RIBEYE U2656).....	52
Abbildung 28: Kryoschnitt Retina (Anti-TIAM1 2D8/Anti-PSD95).....	52
Abbildung 29: Kryoschnitt Retina (Anti-TIAM1 2D8/Anti-Synaptotagmin1).....	53
Abbildung 30: Kryoschnitt Retina (Anti-TIAM1 2D8/Anti-mGluR6).....	53
Abbildung 31: Semidünnschnitt Retina (Anti-TIAM1 2D8/Anti-PSD95).....	54

Abbildung 32: Semidünnschnitt Retina (Anti-TIAM1 2D8/Anti-Synaptotagmin 1).....	54
Abbildung 33: Semidünnschnitt Retina (Anti-TIAM1 2D8/Anti-mGluR6).....	54
Abbildung 34: Präabsorption mit Anti-TIAM1 7F11.....	55
Abbildung 35: Präabsorption mit Anti-TIAM1 4D2.....	55
Abbildung 36: Präabsorption mit Anti-TIAM1 2D8.....	55
Abbildung 37: Western-Blot Maus Retina (Anti-TIAM1 7F11/Anti-RIBEYE 2D9).....	56
Abbildung 38: DotBlot mit Anti-TIAM1 7F11.....	57
Abbildung 39: DotBlot mit Anti-TIAM1 4D2.....	57
Abbildung 40: DotBlot mit Anti-TIAM1 2D8.....	58
Abbildung 41: SynCAM Interaktionsschema.....	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Absorptionsmaxima der Sehpigmente.....	10
Tabelle 2: verwendete Lösungen.....	28
Tabelle 3: Materialien und Produkte.....	29
Tabelle 4: Trenngel SDS-Page.....	35
Tabelle 5: Sammelgel SDS-Page.....	35

9 Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Frank Schmitz für die außerordentlich gute Betreuung bedanken. Er stand mir bei Fragen oder Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite, wodurch er mir den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten sehr leicht gemacht hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Karin Schwarz, Frau Dr. rer. nat. Ekta Dembla und Herrn Dr. rer. nat. Mayur Dembla für die Hilfe und Unterstützung im Labor, sowie für den ein oder anderen sehr hilfreichen Tipp im Umgang mit den Materialien und Geräten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Tamara Brück, Gabriele Kiefer und Sabine Schmidt, sowie allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Schmitz für die labortechnische Unterstützung und die sehr liebevolle Aufnahme ins Team.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Yvonne Dzierma für die vielen hilfreichen Anregungen bei der Ausarbeitung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich zudem bei allen Unterstützern, die mir in dieser Zeit mit anregenden Gesprächen, ihren Erfahrungen und Ratschlägen, sowohl wissenschaftlich, als auch persönlich weitergeholfen haben.

Meine tiefe Dankbarkeit gilt zu guter Letzt meiner Ehefrau Alicia Harling-Bernhard, meinen Eltern Herrn Michael Bernhard und Frau Christa Bernhard, sowie meiner Schwester Loreen Bernhard. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung und Liebe wären das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.