

Aus dem Bereich der Neuroanatomie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

CHARAKTERISIERUNG ZWEIER NEUER ANTIKÖRPER GEGEN DAS SYNAPTISCHE RIBBONPROTEIN RIBEYE

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2022

vorgelegt von Carina Döring,
geboren am 02.05.1987 in Schleswig

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	1
Summary.....	3
1 Einleitung	5
1.1 Auge	5
1.1.1 Retina.....	6
1.1.2 Photorezeptoren.....	8
1.1.3 Neuronale Verschaltung	9
1.2 Synapsen.....	10
1.2.1 Elektrische Synapsen	10
1.2.2 Chemische Synapsen.....	10
1.2.3 Ribbonsynapsen.....	11
1.3 Cerebellum	17
1.3.1 Aufbau.....	17
1.3.2 Neuronentypen.....	18
1.3.3 Neuronale Verschaltung	18
1.4 Zielstellung dieser Arbeit.....	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Primäre Antikörper.....	21
2.1.2 Sekundäre Antikörper.....	22
2.1.3 Chemikalien und Lösungen	22
2.1.4 Gewebe.....	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Einbettung der Semidünnschnitte	26
2.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung.....	26
2.2.3 Negativkontrollen.....	29
2.2.4 SDS-Page und Western Blot	29
2.2.5 Pepsin Blot	31
2.2.6 Fusionsproteine	32
2.2.7 Mikroskopie	34

3 Ergebnisse	37
3.1 Resultate der Immunfluoreszenz in der Retina.....	37
3.1.1 Der Antikörper 10F8 in der Einzelfluoreszenz.....	37
3.1.2 Der Antikörper 10F8 in der Doppelfluoreszenz	41
3.1.3 Der Antikörper 13B5 in der Einzelfluoreszenz.....	49
3.1.4 Der Antikörper 13B5 in der Doppelimmunfluoreszenz	52
3.1.5 Kontrollversuche.....	60
3.2 Resultate der Immunfluoreszenz im Cerebellum	70
3.3 Elektronenmikroskopie.....	74
3.4 Western Blot Nachweise	75
3.5 Pepspot-Analysen.....	79
4 Diskussion.....	82
5 Abkürzungsverzeichnis.....	87
6 Literaturverzeichnis	88
7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	99
7.1 Tabellenverzeichnis	99
7.2 Abbildungsverzeichnis	99
8 Danksagung	101
9 Lebenslauf.....	102

Zusammenfassung

CHARAKTERISIERUNG ZWEIER NEUER ANTIKÖRPER GEGEN DAS SYNAPTISCHE RIBBONPROTEIN RIBEYE

Unsere Augen verbinden die visuelle Umgebung mit dem Gehirn mittels spezialisierter chemischer Synapsen, die Ribbonsynapsen genannt werden. Ribbonsynapsen sind kontinuierlich aktive Synapsen, die eine tonische Transmitterfreisetzung auf einem hohen Niveau durchführen (Heidelberger *et al.*, 2005; Schmitz, 2009; Lagnado und Schmitz, 2015). Für diese Aufgabe benötigen Ribbonsynapsen eine permanente Bereitstellung von aktivierten synaptischen Vesikeln, die dann ihren Neurotransmitterinhalt mittels Exozytose in den synaptischen Spalt freisetzen. Das synaptische Ribbon (deutsch: „synaptische Band“) ist die charakteristische, namensgebende Strukturspezialisierung der Ribbonsynapsen, welche an der aktiven Zone verankert ist (Sjostrand, 1953; Sterling *et al.*, 2005). Dabei ist das synaptische Ribbon mit einer großen Anzahl von synaptischen Vesikeln assoziiert, die in der aktiven Zone für die kontinuierliche Exozytose zur Verfügung gestellt werden und ist zudem für die Organisation des synaptischen Vesikelzyklus sowie für die Aktivierung („Primen“) von synaptischen Vesikeln wichtig (Zenisek *et al.*, 2000; Jackman *et al.*, 2009; Joselevitch und Zenisek, 2020). Ribeye ist die Hauptkomponente des synaptischen Ribbons und findet sich in seiner spezifischen Zusammensetzung ausschließlich bei Ribbonsynapsen, wobei es essenziell für den Aufbau der synaptischen Ribbons ist (Schmitz *et al.*, 2000; Maxeiner *et al.*, 2016; Shankhwar *et al.*, 2022). Das Protein Ribeye kann unterteilt werden in eine für Ribeye-spezifische aminoterminal A-Domäne, die primär strukturelle Aufgaben besitzt, und eine carboxyterminale B-Domäne, welche zu großen Teilen identisch mit CtBP2 ist, einem ubiquitär exprimierten Co-Repressor-Protein im Zellkern (Schmitz *et al.*, 2000; Schmitz, 2009; Maxeiner *et al.*, 2016).

Während der letzten Jahre wurde Ribeye als Ziel für verschiedenste Interaktionen innerhalb des synaptischen Ribbons identifiziert und ist vermutlich der wichtigste Faktor, um die exakte Funktion der namensgebenden synaptischen Ribbons der Ribbonsynapsen zu verstehen (tom Dieck *et al.*, 2005; Alpadi *et al.*, 2008; Magupalli *et al.*, 2008; Sheets *et al.*, 2011; Schwarz und Schmitz, 2017; Müller *et al.*, 2019). Ribbonsynapsen sind nicht nur in den Augen zu finden, sie sind ebenso wichtig fürs Hören und das Gleichgewicht. Deshalb sind Ribbonsynapsen ebenfalls in der Cochlea und dem Vestibularorgan zu finden, sie kommen aber ebenso in Photorezeptor-ähnlichen Zellen der Zirbeldrüse vor sowie im lateralen Seitenorgan und Elektrozeporen bei Fischen (Sterling *et al.*, 2005; Moser, Brandt, *et al.*, 2006; Nouvian *et al.*, 2006; Matthews und Fuchs, 2010). Neben dem Hauptstrukturprotein Ribeye sind darüber

hinaus noch weitere Proteine am synaptischen Ribbon zu erwarten, die spezifische Funktionen an der Oberfläche der Ribbons ausführen.

Um diese und auch verwandte Fragen bezüglich der Molekularanatomie und funktionellen Rolle der Ribbons durch morphologische, biochemische und molekulare Techniken zu klären, sind Antikörper gegen Ribeye als funktionelle Werkzeuge von enormer Bedeutung. In meiner Dissertationsarbeit habe ich daher zwei neue monoklonale Antikörper, 10F8 und 13B5, gegen die B-Domäne von Ribeye analysiert und dabei die Funktionalität und Spezifität beider Antikörper für Ribeye durch verschiedene morphologische und biochemische Untersuchungen charakterisiert und belegt. Ich konnte zeigen, dass beide Antikörper Ribeye innerhalb der Augen von Mäusen und Rindern spezifisch erkennen, wobei starke und selektive Signale mit der Immunfluoreszenz-Technik gezeigt werden konnten. Für den Ribeye-Antikörper 10F8 konnte ich auch auf ultrastruktureller, elektronenmikroskopischer Ebene seine Bindung an die synaptischen Ribbons zeigen. Beide Antikörper zeigten im Western Blot die charakteristischen Ribeye-Banden. Die Spezifität der Antikörper für Ribeye wurde durch Untersuchungen an der Ribeye Knockout Maus ultimativ belegt.

Um die Bindungsstelle weiter zu charakterisieren, habe ich Fusionsproteine der Untereinheiten der B-Domäne hergestellt. Beide Antikörper reagierten hierbei ausschließlich mit der sogenannten Substrat-bindenden (SBD)-Untereinheit der B-Domäne von Ribeye. Zur Bestimmung des exakten Epitops innerhalb SBD-Untereinheit der B-Domäne habe ich die Dot Blot-Methode mit überlappenden Peptidsequenzen benutzt und konnte dadurch die genaue Bindungsstelle der beiden Antikörper bestimmen. Diese Antikörper können nun eingesetzt werden, um eine mögliche Expression von Ribeye in den verschiedenen Regionen des ZNS im Detail zu untersuchen. Eine bereits ausgetestete mögliche Expression von Ribeye im Cerebellum konnte nicht verifiziert werden. Weiterhin können die neuen Antikörper von großer Bedeutung für die weitere biochemische Charakterisierung des synaptischen Ribbonkomplexes in Retina und Innenohr sowie der Zirbeldrüse sein.

Summary

CHARACTERIZATION OF TWO NEW ANTIBODIES AGAINST THE SYNAPTIC RIBBON PROTEIN RIBEYE

Our eyes connect the visual environment to the brain using specialized chemical synapses called ribbon synapses. Ribbon synapses are continuously active synapses which perform tonical release of transmitters at high rates (Heidelberger *et al.*, 2005; Schmitz, 2009; Lagnado and Schmitz, 2015). Therefore, ribbon synapses need a permanent supply of release-ready synaptic vesicles to perform continuous exocytosis. Exocytosis of synaptic vesicles and release of neurotransmitter occurs at the active zone. The synaptic ribbon is the unique characteristic structural specialization of ribbon synapses and is anchored to the active zone (Sjostrand, 1953; Sterling and Matthews, 2005). It is associated with a large number of synaptic vesicles that support continuous exocytosis at the active zone. The synaptic ribbon is also important for the organization of the synaptic vesicle cycle, including priming synaptic vesicles to provide release-ready vesicles (Zenisek *et al.*, 2000; Jackman *et al.*, 2009; Joselevitch and Zenisek, 2020). Ribeye is the main and essential component of the synaptic ribbon, a specific synapse protein only found at ribbon synapses (Schmitz *et al.*, 2000; Maxeiner *et al.*, 2016; Shankwar *et al.*, 2022). The Ribeye protein consists of a unique amino-terminal A-domain that mainly serves structural roles and a carboxyterminal B-domain that is largely similar to CtBP2, an ubiquitously nuclear co-repressor protein (Schmitz *et al.*, 2000; Schmitz, 2009; Maxeiner *et al.*, 2016).

During the last years, Ribeye was identified as a target for many interactions inside the synaptic ribbon and is probably the most important factor to understand the accurate function of synaptic ribbons and ribbon synapses (tom Dieck *et al.*, 2005; Alpadi *et al.*, 2008; Magupalli *et al.*, 2008; Sheets *et al.*, 2011; Schwarz and Schmitz, 2017; Müller *et al.*, 2019). Ribbon synapses are not exclusively found within the eye. They are also important for hearing and balance. Hence, ribbon synapses are located within the cochlea and vestibular organ. Ribbon synapses are also found in pineal photoreceptors, the lateral line system and electroreceptors in fish (Sterling *et al.*, 2005; Moser, Brandt, *et al.*, 2006; Nouvian *et al.*, 2006; Matthews and Fuchs, 2010). Aside from Ribeye as the main structural component, other proteins are supposed to perform specialized functions at the surface of synaptic ribbons.

Antibodies against Ribeye are important functional tools to answer this and other related questions concerning the molecular anatomy and functional role of ribbons using morphological, biochemical and molecular techniques. In my dissertation, I characterized two new mouse monoclonal antibodies against Ribeye, 10F8 and 13B5. I analyzed and proved the functionality and specificity of both antibodies using different morphological and biochemical

methods. I demonstrated at the light microscopical level that both antibodies readily detect Ribeye/synaptic ribbons in the mouse and bovine retina. Both antibodies showed strong and selective signals by using immunofluorescence microscopy. For the monoclonal Ribeye antibody 10F8 I could also determine its binding at the ultrastructural electron microscopical level and demonstrated that it binds to the synaptic ribbon by post-embedding immunogold electron microscopy. In Western blot (WB) analyses, both antibodies detected the characteristic WB bands of Ribeye. Furthermore, experiments using Ribeye knockout mice ultimately proved the specificity of both antibodies for Ribeye. To further characterize the binding sites of the two novel Ribeye antibodies, I created fusion proteins encoding subunits of the B-domain of Ribeye. Both antibodies only bind to the so-called substrate-binding sub-domain (SBD) of the B-domain of Ribeye. To further map the exact epitope inside the B-domain that is detected by the antibodies I also performed dot blot analyses with overlapping peptides covering the B-domain of Ribeye and determined the precise binding sites. These new antibodies can now be used to further investigate various important questions in the field, including a possible expression of Ribeye in different areas of the CNS. A possible expression of Ribeye in the cerebellum could not be verified. Moreover, the new antibodies may have an utmost importance for the further biochemical characterization of the synaptic ribbon complex in the retina, inner ear and the pineal gland.

1 Einleitung

1.1 Auge

In der knöchernen Orbita befindet sich das Auge, in dem Sinnesreize aus der Umgebung aufgefangen und umgewandelt werden, bevor sie schließlich an die verschiedenen „höheren“ Zentren der visuellen Wahrnehmung im ZNS weitergeleitet und verarbeitet werden können. Somit ist das Auge die entscheidende Schnittstelle zwischen Umwelt und Gehirn für unsere visuelle Wahrnehmung.

Anatomisch besteht der Augapfel aus drei Teilen. Außen bilden die weiße Sklera (Lederhaut) und die transparente Cornea (Hornhaut) die Tunica fibrosa bulbi. Sie gibt dem Augapfel Stabilität und bestimmt die äußere Formgebung. Die lichtdurchlässige Hornhaut stellt zudem eine wichtige lichtbrechende Struktur dar, die hilft die Lichtstrahlen auf die Netzhaut zu bündeln. In der Schicht darunter bilden Iris (Regenbogenhaut), Corpus ciliaris (Ziliarkörper) und Choroidea (Aderhaut) die Tunica vasculosa bulbi. Diese auch als Uvea bezeichnete Schicht dient zum einen der Versorgung der angrenzenden Schichten mit Nährstoffen und Sauerstoff, zum anderen verformt der Ziliarkörper mittels Kontraktionen die Linse und produziert das Kammerwasser. Die innerste Schicht (Tunica interna bulbi) wird von der Retina gebildet. Über die Retina werden die Lichtempfindungen wahrgenommen und schließlich über den Sehnerven (Nervus opticus) an das Gehirn weitergeleitet.

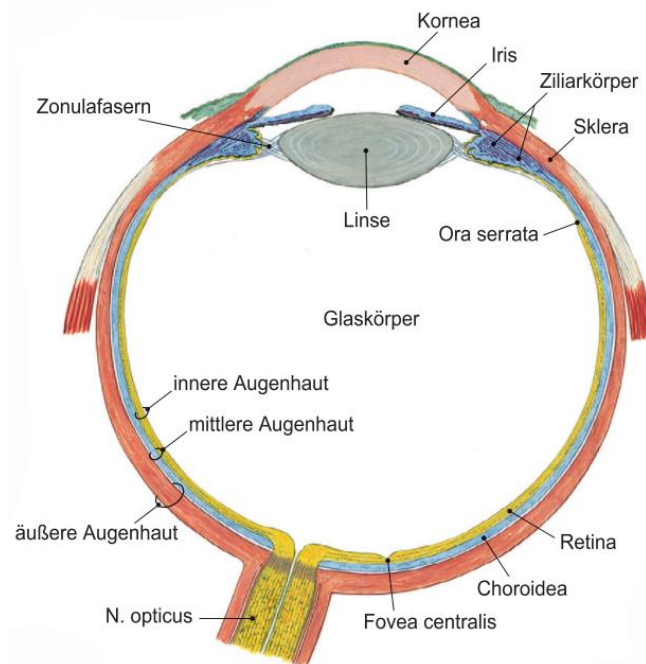


Abbildung 1 Aufbau des Auges

Gezeigt wird der schematische Aufbau des Auges eines Säugetieres. (Abbildung, modifiziert nach Paulsen et al., 2010)

1.1.1 Retina

Die Retina (Netzhaut) ist der Teil des Auges, der optische Signale in elektrische Signale umwandelt und diese dann über den Nervus opticus an höhere Zentren des Gehirnes weiterleitet. Für das Sehen ist die Retina daher essenziell, weshalb auch die zahlreichen Erkrankungen der Netzhaut zu Sehstörungen führen können.

Im vorderen Teil des Auges befindet sich die Pars caeca der Retina, welche aus nur zwei Epithelschichten besteht und keine Lichtsinneszellen enthält. An der Ora serrata befindet sich der Übergang von der Pars caeca in die Pars optica. Die Pars optica besteht aus mehreren Schichten, die sich jeweils noch weiter einteilen lassen. Histologisch besteht die Retina aus zehn Schichten, von denen neun zum Stratum nervosum gehören und die Pigmentepithelschicht zum äußeren Stratum pigmentosum zählt. Die lichtwahrnehmenden Stäbchen und Zapfen (Photorezeptoren) sitzen in der äußersten Schicht. Das Licht muss also alle vorherigen Schichten erst durchdringen, bevor es die Stäbchen und Zapfen erreicht. Die zuerst durchdrungenen Schichten enthalten unter anderem Zellkörper von Bipolarzellen, Ganglienzellen, Amakrinzellen und Horizontalzellen sowie deren jeweiligen Fortsätze.

Die genaue Einteilung der zehn Schichten beginnt mit der äußersten Schicht, dem Pigmentepithel. Dieses stellt die Verbindung zwischen Aderhaut und Netzhaut her, außerdem verstoffwechselt sie Stoffwechselprodukte der Photorezeptoren. Darunter liegt die Photorezeptorschicht (Stratum segmentorum), in der sich die Fortsätze der Zapfen und Stäbchen befinden. Die darauffolgende Schicht (Stratum limitans externum), auch als äußere Gliagrenzmembran bezeichnet, enthält die Fortsätze der retinalen Gliazellen. Danach folgt die äußere Körnerschicht (Stratum nucleare externum), welche die Perikaryen der Sinneszellen beinhaltet. In der folgenden äußeren plexiformen Schicht befinden sich die Dendriten der bipolaren Zellen sowie die axonalen Fortsätze der Stäbchen und Zapfen, sie ist daher sehr synapsenreich. Als Stratum nucleare internum oder innere Körnerschicht wird die sechste Schicht bezeichnet, die die Zellkerne von Horizontalzellen, amakrinen Zellen und Bipolarzellen enthält. Die siebte Schicht besteht wiederum aus den Axonen der Bipolarzellen und wird mit innerer plexiformer Schicht benannt. Zudem finden sich hier die Dendriten der Ganglienzellen, die hier wie die amakrinen Zellen Synapsen ausbilden. Darauffolgend bilden die Perikaryen der Ganglienzellen die nächste Schicht, die Ganglienzellschicht (Stratum ganglionicum). Ihre Axone bilden die neunte Schicht aus, die Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum), zudem sind in dieser Schicht die großen Blutgefäße der Netzhaut zu finden. Schließlich wird die zehnte Schicht aus den langen Fortsätzen der Müller-Zellen gebildet.

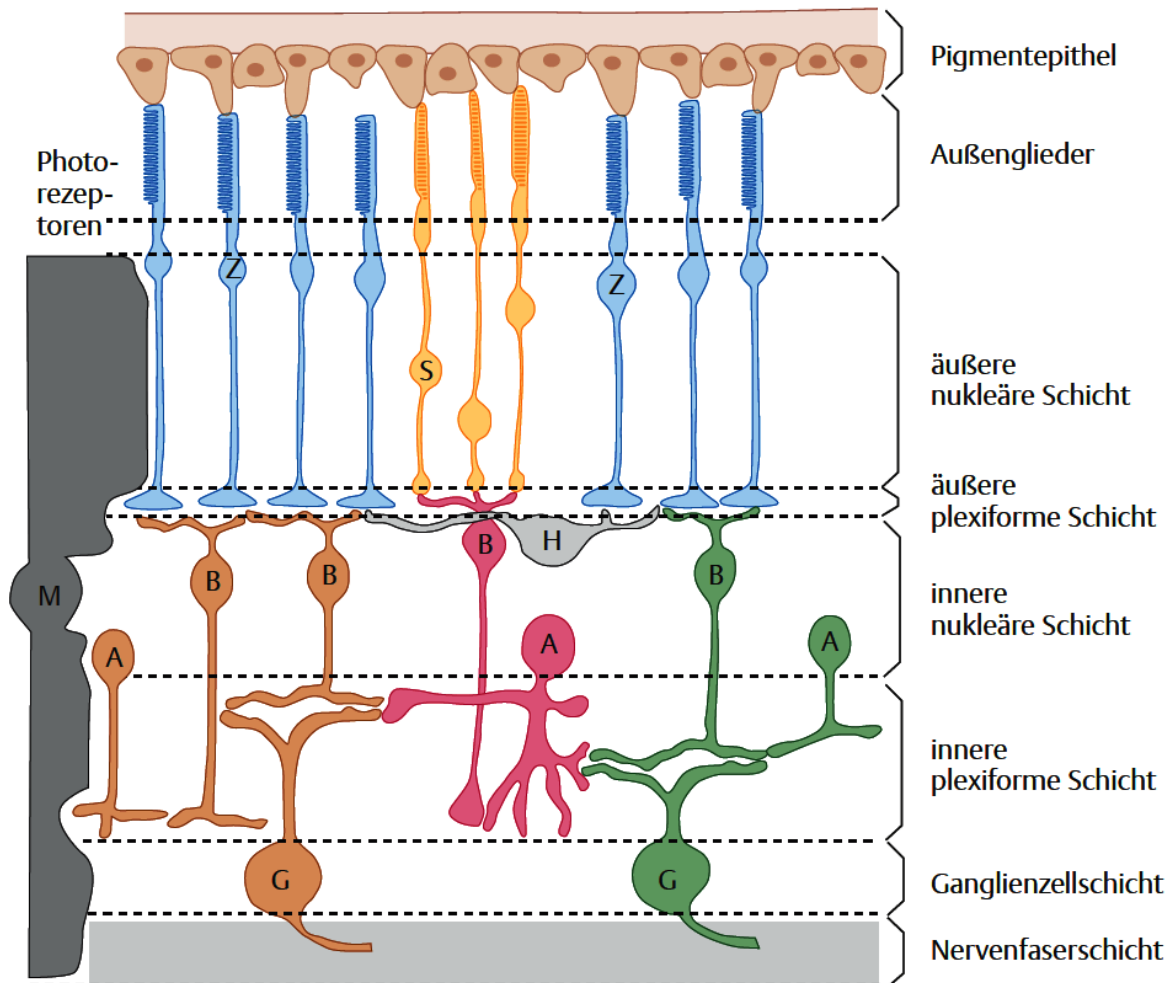


Abbildung 2 Vereinfachte Schemazeichnung der Retina

In der Abbildung werden die wichtigsten Schichten der Retina mit den darin enthaltenen entscheidenden Zelltypen dargestellt. Das Licht muss somit zunächst alle Schichten der Retina beginnend mit der Nervenfaserschicht durchdringen, bevor es an den Photorezeptoren wahrgenommen wird. Die Signalverarbeitung läuft anschließend in die entgegengesetzte Richtung ab. A = Amakrinzelle, B = Bipolarzelle, G = Ganglienzelle, H = Horizontalzelle, M = Müller-Zelle, S = Stäbchen, SB = Stäbchenbipolarzelle, Z = Zapfen. (Abbildung: modifiziert nach Behrends *et al.*, 2021)

Die dargestellten Müller-Zellen entsprechen hierbei spezialisierten Gliazellen der Retina, die den Astrozyten im ZNS gleichen und vielseitige Ernährungs- sowie Homöostase-Funktionen aufweisen. Zudem sollen sie das Licht zu den Photorezeptoren leiten und somit die Lichtstreuung reduzieren. Amakrinzellen, Horizontalzellen und Bipolarzellen sind hingegen Interneurone, somit bilden sie nur Verschaltungen innerhalb der Retina. Dabei sind die Amakrin- und Horizontalzellen für die Kontrastverstärkung verantwortlich, die Bipolarzellen hingegen für den Informationsfluss zwischen Photorezeptoren und Ganglienzellen.

Im nächsten Abschnitt wird weiter auf die Photorezeptoren eingegangen, im Anschluss wird die neuronale Verschaltung dargestellt.

1.1.2 Photorezeptoren

Die Photorezeptoren nehmen Sinnesreize wahr und wandeln diese in neuronale Signale um, daher werden sie auch primäre Sinneszellen genannt. Dabei wird zwischen Stäbchen und Zapfen unterschieden. Während die Stäbchen vor allem für die Hell-Dunkel-Wahrnehmung zuständig sind, werden Zapfen für die Farbwahrnehmung benötigt. Entsprechend sind die Stäbchen auch weitaus lichtempfindlicher als die Zapfen. Es gibt in der Retina des Menschen etwa 120 Mio. Stäbchen und damit 20mal mehr als Zapfen, von denen nur ca. 6 Mio. existieren. In der Retina finden sich die Stäbchen eher in der Peripherie, die Zapfen v.a. in der Fovea centralis, dem Ort des schärfsten Sehens beim Menschen. Bei Mäusen hingegen befindet sich in der Area centralis hingegen eine höhere Dichte an Photorezeptoren (sowohl Zapfen als auch Stäbchen) im Vergleich zur Peripherie (Brown *et al.*, 2008).

Die Stäbchen-Photorezeptoren sind darauf spezialisiert bei geringen Lichteinfällen einzelne Photonen wahrzunehmen und sind daher im hellen Tageslicht gesättigt und nicht responsiv (Pahlberg und Sampath, 2011). Bei höheren Lichtintensitäten sorgen die Zapfen-Photorezeptoren für das Farbsehen, wobei es drei verschiedene Arten von Zapfen bei Primaten wie dem Menschen gibt, welche auf unterschiedliche (lang, mittel, kurz) Wellenlängen reagieren. Mäuse enthalten nur zwei Arten von Zapfen, ihnen fehlt die mittlere Wellenlänge (Abramov und Gordon, 1994).

Generell sind Photorezeptoren von schmaler Gestalt mit einem Außensegment, einem Innensegment, einem Perikaryon und einer präsynaptischen Terminale am vitrealen Ende. Der lichtempfindliche Teil, das Außensegment, ist Richtung Epithelschicht gewandt. In den Membranscheiben (auch Disks genannt) des Außensegmentes wird der Sehfärbstoff gespeichert. Dieser Sehfärbstoff entspricht Rhodopsin bei Stäbchen, Jodopsin bei Zapfen. Bei Lichteinfall wird die chemische Konformation dieses Farbstoffes verändert, wodurch über eine Signalkaskade die Hyperpolarisation der Nervenzelle erreicht wird und das neuronale Signal entsteht. Dieser Vorgang wird als Phototransduktion bezeichnet. Die Disks sind bei Zapfen und Stäbchen etwas unterschiedlich aufgebaut. Bei Stäbchen sind sie übereinandergestapelt und komplett von der Plasmamembran abgeschnürt, bei Zapfen finden sich hingegen eher Membraneinfaltungen. Durch diese Anordnung unterscheidet sich die Gestalt des Außensegmentes bei Zapfen und Stäbchen.

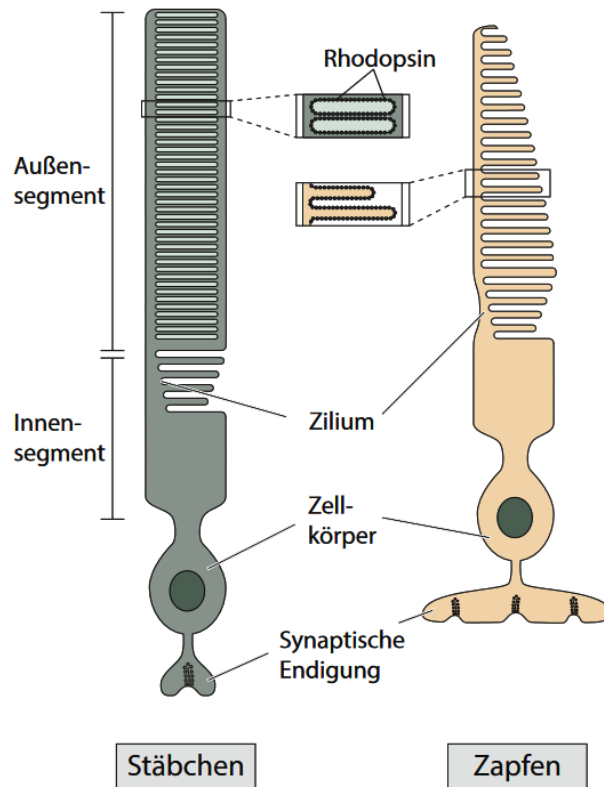


Abbildung 3 Unterschiede zwischen Zapfen und Stäbchen

In der Abbildung wird der unterschiedliche Aufbau von Zapfen und Stäbchen gezeigt. Grundsätzlich bestehen beide Formen der Photorezeptoren aus einem Außensegment, einem Innensegment, einem Zellkörper und einer synaptischen Endigung, wobei das Außensegment sich in der Gestalt unterscheidet. (Abbildung: Feigenspan, 2017)

1.1.3 Neuronale Verschaltung

Die Photorezeptoren bilden das 1. Neuron der Sehbahn und geben ihre Signale an die Bipolarzellen weiter, welche das 2. Neuron bilden. Über die Axone der Bipolarzellen werden die Signale an die Ganglienzellen weitergeleitet, welche im einfachsten Fall das 3. Neuron der Sehbahn ausbilden. Wenn zuvor noch eine amakrine Zelle oder Horizontalzelle zwischengeschaltet ist, sind sie entsprechend das 4. Neuron. Dabei konvergieren die Informationen mehrerer Photorezeptoren auf jeweils eine Ganglienzelle in der Peripherie, in der Fovea Centralis hingegen existiert eine 1:1-Verschaltung. Die Axone der Ganglienzellen ziehen durch die Sehnervenpapille und vereinigen sich dort zum Nervus opticus.

Auf molekularer Ebene sind die Photorezeptorzellen bei Dunkelheit depolarisiert und setzen hierbei beständig mit Hilfe von geöffneten cGMP-gesteuerte Kationen-Kanäle an der Ribbonsynapse Glutamat frei. Die lichtinduzierte Signalkaskade sorgt dafür, dass sich die cGMP-gesteuerte Kationen-Kanäle schließen und dadurch die Zelle hyperpolarisiert (Burns und Baylor, 2001; Chen *et al.*, 2005). Am anderen Ende der Zelle wird die Information über die

präsynaptische Terminale mit Hilfe von Ribbonsynapsen an die Dendriten der sekundären Neuronen weitergegeben. (Wässle, 2004; Heidelberger *et al.*, 2005; Schmitz, 2009; Matthews und Fuchs, 2010; Regus-Leidig und Brandstätter, 2012). Die Antwort der Zapfen auf Licht ist hierbei etwa 5-10mal schneller als bei Stäbchen (Pasino und Marchiafava, 1976; Schnapf und Copenhagen, 1982).

1.2 Synapsen

Als funktionelle Kontaktstellen zwischen Nervenzellen und anderen Zellen dienen Synapsen. Mögliche beteiligte Zellen sind dabei andere Nervenzellen, aber auch Drüsenzellen, Sinneszellen oder Muskelzellen. Die Erregung wird hierbei nicht bloß übertragen, sondern kann sogar moduliert werden. Oftmals handelt es sich bei den Synapsen um chemische Synapsen. Zu den strukturellen Elementen gehört die Präsynapse, der synaptische Spalt und die Postsynapse.

In der Regel befindet sich die Präsynapse am Ende eines Axons, von hier geht das Signal aus, durchquert den synaptischen Spalt und wird von der Postsynapse empfangen.

1.2.1 Elektrische Synapsen

Diese Art von Synapse überträgt ihre Signale durch direkte Koppelung von Zellen, indem sich ihre Membranen auf wenige Nanometer annähern und durch große Kanäle miteinander verbunden werden. Über diese „gap junction channels“ werden die intrazellulären Räume gekoppelt, dadurch können sich Potentialänderungen auf die Nachbarzelle übertragen, auch eine Übertragung von biochemischen Signalen wie z.B. cAMP sind möglich. Aufgrund der direkten Koppelung der Zellen miteinander, erfolgt die Übertragung verzögerungsfrei und ist in beide Richtungen möglich.

1.2.2 Chemische Synapsen

Bei chemischen Synapsen wird der ursprüngliche elektrische Reiz in eine chemische Antwort in Form von Neurotransmitter verwandelt. Für diesen Vorgang wird in der Präsynapse Neurotransmitter gespeichert und entsprechend der Aktivität der Zelle freigesetzt. Die Speicherung des Transmitters geschieht in Form von synaptischen Vesikeln, welche bei der Depolarisation der präsynaptischen Membran durch den Einstrom von Calciumionen mit dieser fusionieren und den gespeicherten Transmitter mittels Exozytose freisetzen. Dabei geht dem Calciumeinstrom eine Öffnung durch die Calciumkanäle voraus, die durch das eingehende Aktionspotential induziert wird. Auf der anderen Seite des synaptischen Spaltes befindet sich die Postsynapse, die zahlreiche Rezeptoren für den Neurotransmitter besitzt.

Durch Bindung der Transmitter an die entsprechenden Rezeptoren kommt es im Anschluss entweder zu einer Depolarisation oder einer Hyperpolarisation der nachfolgenden Synapse. Die synaptischen Vesikel werden anschließend wieder aufgenommen mittels Endozytose und recycelt, wobei sie erneut mit Neurotransmitter gefüllt werden (Südhof, 2004).

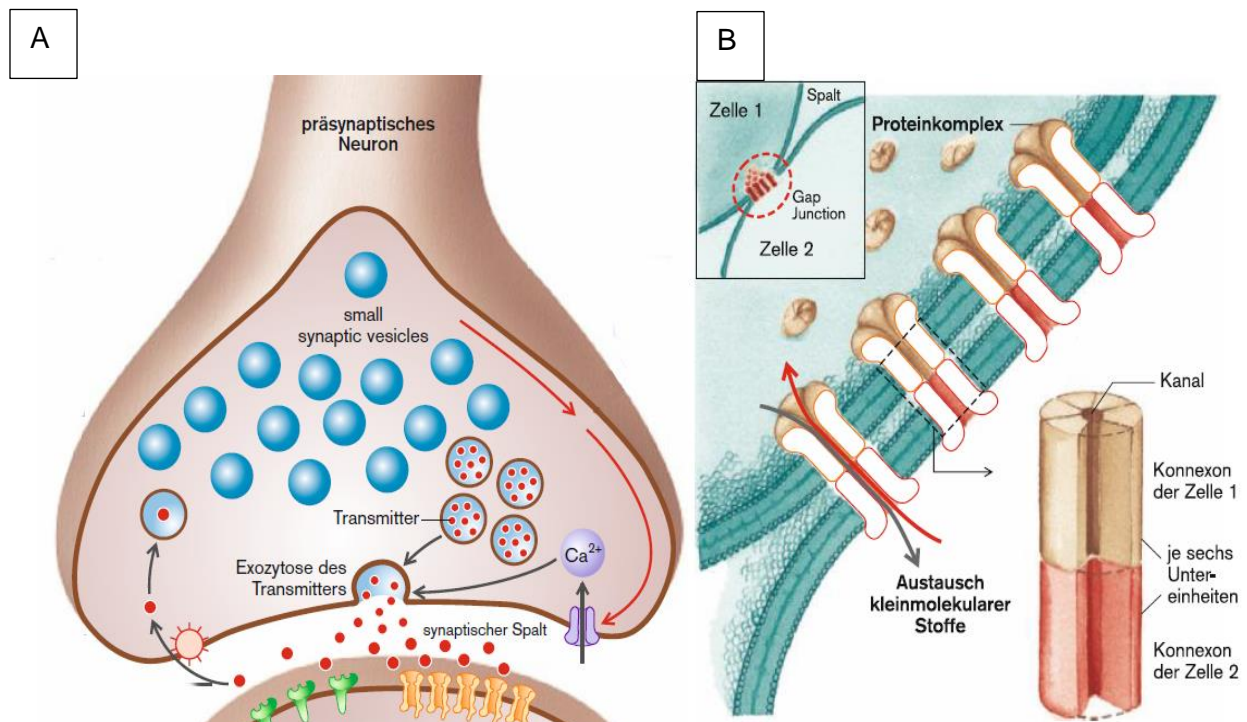


Abbildung 4 Schematischer Aufbau von Synapsen

A zeigt eine chemische Synapse. Im präsynaptischen Neuron werden Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert und freigesetzt. Durch ein Aktionspotential kommt es zu einem Calciumeinstrom, die daraus folgende Depolarisation der Zellmembran führt zu einer Fusion der Membran mit dem Vesikel. Dadurch wird der Transmitter freigesetzt, diffundiert durch den synaptischen Spalt und wird an der Postsynapse von Rezeptoren gebunden.

B stellt das Schema einer elektrischen Synapse dar. Die verbundenen Zellen liegen dicht zusammen und ihre Proteinkomplexe (Konnexone) lagern sich zusammen. Dadurch entsteht ein Kanal, der den Austausch der Zellen miteinander ermöglicht. (Abbildung: Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, 2019)

1.2.3 Ribbonsynapsen

Eine Sonderform der chemischen Synapse stellen die Ribbonsynapsen dar. Im Gegensatz zu konventionellen Synapsen können Ribbonsynapsen eine kontinuierliche Transmitterfreisetzung erzeugen. Die Anpassung der Vesikelfusion geschieht hierbei durch depolarisierende und hyperpolarisierende Veränderungen im Membranpotential, sodass der Transmitterstrom die Weitergabe der Informationen steuert (Dowling und Ripps, 1973; Lagnado *et al.*, 1996; Rieke und Schwartz, 1996, Von Gersdorff, 2001). Für einen dauerhaften Transmitterstrom müssen stets genügend Vesikel zur Verfügung stehen. Dabei werden während der Depolarisation die synaptischen Vesikel anhaltend freigesetzt, um dann von der Oberflächenmembran entfernt zu werden und zurück zur aktiven Zone zu kehren, wo sie

wiederverwertet werden (Von Gersdorff und Matthews, 1994; Lagnado *et al.*, 1996; Neves und Lagnado, 1999). Dieser schnelle Vorgang von Exozytose und anschließender Endozytose sowie rascher Wiederverwertung der Vesikel wird durch schnelle Transportwege der Vesikel erreicht. (Sterling und Matthews, 2005; tom Dieck *et al.*, 2006)

In der äußeren plexiformen Schicht bilden Ribbonsynapsen den Kontakt zwischen Photorezeptorzellen und Bipolarzellen, außerdem werden sie ebenfalls von Bipolarzellen innerhalb der inneren plexiformen Schicht ausgebildet (tom Dieck und Brandstätter, 2006). Außerhalb der Retina sind Ribbonsynapsen noch an weiteren Orten lokalisiert. So wurden auch in licht-sensiblen Neuronen der Pinealorgane, in mechanosensitiven Haarzellen der Cochlea und des Vestibularorgans Ribbonsynapsen entdeckt, zudem wurde sie z.B. im Seitenlinienorgan bei Fischen gefunden (Moser, Brandt, *et al.*, 2006; Moser, Neef, *et al.*, 2006; Matthews und Fuchs, 2010).

Ribbonsynapsen enthalten eine spezielle Organelle, das Ribbon, welches synaptische Vesikel gefüllt mit dem Neurotransmitter Glutamat nah an der aktiven Zone hält (Schmitz, 2009). Diese großen, elektrodichten Strukturen sind über die „arciforme Density“ in der aktiven Zone der präsynaptischen Plasmamembran verankert (Schmitz, 2009; Matthews und Fuchs, 2010; Regus-Leidig und Brandstätter, 2012). Vor allem an der Basis des synaptischen Ribbons findet massenhaft Exozytose statt (Chen *et al.*, 2013). Die synaptischen Ribbons scheinen somit eine entscheidende Rolle zu spielen, indem sie einen Vorrat an Vesikeln halten, die zur Freisetzung des Transmitters direkt bereit sind. Dabei sind die Vesikel in der basalen Reihe des Ribbons am schnellsten zur direkten Transmitterfreisetzung einsetzbar, wobei auch mehrere Vesikel koordiniert synchron fusionieren können (Singer *et al.*, 2004; Khimich *et al.*, 2005; Graydon *et al.*, 2011). Zusätzlich existieren sogenannte „tethered vesicles“, also angebundene Vesikel, die sich in einiger Entfernung zum synaptischen Ribbon befinden und von dort aus langsam zur aktiven Zone gelangen könnten (Lenzi und Von Gersdorff, 2001; Heidelberger *et al.*, 2005; Mercer und Thoreson, 2011). Die Transportmechanismen entlang des synaptischen Ribbons sind allerdings noch nicht abschließend geklärt (Parsons und Sterling, 2003).

Stäbchen enthalten in ihren Synapsen üblicherweise ein synaptisches Ribbon in einer einzigen aktiven Zone, während bei Zapfen 20-50 aktive Zonen mit mehreren synaptischen Ribbons existieren (Wässle, 2004; Regus-Leidig und Brandstätter, 2012). In der äußeren plexiformen Schicht der Retina konnte mithilfe von 3D-Rekonstruktionen gezeigt werden, dass synaptische Ribbons plattenartige Strukturen sind, die sich der Form der invaginierten präsynaptischen Plasmamembrane der Photorezeptorterminale anpassen und somit eine Art hufeisenförmiges Erscheinungsbild erlangen (Schmitz, Königstorfer und Südhof, 2000). Die Synapse wird mit

drei nachgeschalteten Zellen ausgebildet, zwei Horizontalzellen und einem dendritischen Fortsatz einer Bipolarzelle.

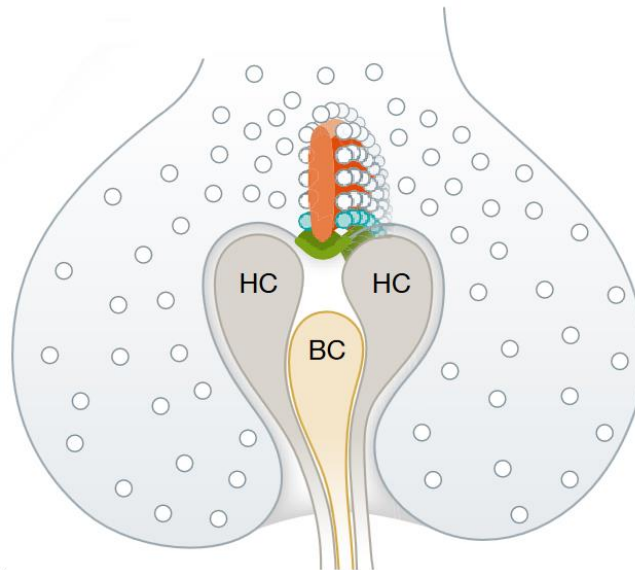


Abbildung 5 Schematischer Aufbau einer Ribbonsynapse

Gezeigt wird der standardisierte Aufbau einer Ribbonsynapse einer Stäbchen-Photozeptorzelle. Orange eingefärbt ist das synaptische Ribbon zu erkennen, an dem sich schon einige Vesikel befinden. Nachgeschaltet befinden sich zwei Horizontalzellen sowie eine Bipolarzelle. HC = Horizontalzelle; BC = Bipolarzelle (Abbildung: modifiziert nach Moser, 2016).

In der aktiven Zone von Ribbonsynapsen sind vor allem Calciumkanäle vom L-Typ zu finden, die durch hohe Spannungen aktiviert werden und zudem nur über gering ausgeprägte Inaktivierungsmerkmale verfügen. Damit sind sie gut geeignet für die schnelle, präzise und kontinuierliche Regulierung der Freisetzung von Glutamat (Heidelberger *et al.*, 1992, 2005; Mennerick und Matthews, 1996; Doering *et al.*, 2007; Thoreson *et al.*, 2013; Lagnado und Schmitz, 2015). Die L-Typ Cav1.4-Kanäle, die durch ihre namensgebende Cav1.4 porenbildende Untereinheit definiert sind, bilden die überwiegende Art von Calciumkanälen in Stäbchen bei Säugetieren (Buraei *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 2011; Schmitz *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Lagnado und Schmitz, 2015). Die relative Unempfindlichkeit dieser Kanäle gegenüber spannungs- und calcium-abhängiger Inaktivierung ermöglicht eine kontinuierliche Nutzung der Kanäle, womit sie gut geeignet sind, die kontinuierliche Exozytose zu unterstützen (Singh *et al.*, 2006; Striessnig *et al.*, 2010; Catterall, 2011; Shaltiel *et al.*, 2012). Hinzukommt, dass die Transmitterfreisetzung schon durch sehr geringe Calciumkonzentrationen ausgelöst wird (Thoreson *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2008; Jarsky, Tian und Singer, 2010).

Zu den präsynaptischen Proteinen, die die Synapse organisieren, gehört vor allem Ribeye. Des Weiteren gibt es aber noch eine Reihe anderer Synapsenproteine, deren Funktion nicht immer bereits abschließend geklärt werden konnte. Bassoon sitzt in der aktiven Zone der Photorezeptoren und scheint als eine Art Anker zu fungieren, der das synaptische Ribbon fixiert und für die Ausbildung des Ribbonkomplexes im Zusammenspiel mit Ribeye verantwortlich ist sowie die Funktion der präsynaptischen Cav-Kanäle modifizieren kann (Khimich *et al.*, 2005; tom Dieck *et al.*, 2005; Nishimune *et al.*, 2012). Piccolo kommt ebenso in konventionellen Synapsen wie auch bei Ribbonsynapsen vor, allerdings bevorzugt in einer Splicevariante, die Piccolino genannt wurde und zusammen mit Ribeye für die strukturelle Form der Ribbons verantwortlich ist (Regus-Leidig *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2019). Die Proteinfamilie der „rab3-interacting molecule“ (RIM) hat in konventionellen Synapsen eine Vielzahl von wichtigen Aufgaben wie z.B. die Kontrolle über die Ankopplung der Vesikel an die präsynaptische Membran und die Verknüpfung der Calciumkanäle mit der aktiven Zone (Kaeser *et al.*, 2011; Südhof, 2012). In Photorezeptorzellen ist vorherrschend RIM2, eine Isoform von RIM, an der Basis der synaptischen Ribbons lokalisiert, wobei ein Knockout von RIM1/2 den Calciumeinstrom deutlich reduziert und weitere Studien eine Beteiligung von RIM an der Vorbereitung der Vesikel sehen (Grabner *et al.*, 2015; Löhner *et al.*, 2017). Weitere Synapsenproteine, die auch immer noch Gegenstand der Forschung sind, sind z.B. das Kinesin-Motorprotein KIF3A und die Zytomatrixproteine ERC/CAST (Muresan *et al.*, 1999; Deguchi-Tawarada *et al.*, 2006; tom Dieck *et al.*, 2012; Raghupathy *et al.*, 2016).

1.2.3.1 Ribeye

Der Hauptbestandteil der synaptischen Ribbons ist Ribeye (Schmitz *et al.*, 2000; Maxeiner *et al.*, 2016). Seine Einzigartigkeit beruht auf der Tatsache, dass alle anderen bisher entdeckten Synapsenproteine der Ribbonsynapse auch bei anderen chemischen Synapsen vorkommen, Ribeye jedoch nicht (Schmitz *et al.*, 2000; Kriegstein *et al.*, 2003; Wan *et al.*, 2005; Mercer und Thoreson, 2011). Ribeye besteht aus zwei Einheiten, einer großen aminoterminalen A-Domäne, die spezifisch für Ribeye ist, und einer carboxyterminalen B-Domäne, die zu großen Teilen identisch mit dem nukleären C-terminalen Bindungsprotein-2 (CtBP2) ist (Schmitz *et al.*, 2000; Schmitz, 2009). Diese Domänen enthalten mehrere Interaktionsstellen, die sowohl eine Interaktion untereinander als auch mit anderen Ribeye-Proteinen ermöglichen (Magupalli *et al.*, 2008). Durch Ribeye-Ribeye-Interaktionen insbesondere durch die A-Domäne können sich mehrere Ribeye-Moleküle zusammenlagern und so bandartige Strukturen entstehen lassen, die dann wiederum zusammen mit weiteren Proteinen zu ausgereiften synaptischen Ribbons in Photorezeptoren verschmelzen (Magupalli *et al.*, 2008; Schmitz, 2009; Mercer und Thoreson, 2011).

Ribeye und CtBP2 entstammen vom selben Gen, werden aber durch unterschiedliche Promoter transkribiert und unterscheiden sich lediglich in 20 Aminosäuren (Schmitz, 2009). Allerdings kommt CtBP2 in nahezu allen Zellen vor, Ribeye hingegen nur in Ribbonsynapsen. Dennoch können sowohl CtBP2 als auch Ribeye-B NAD(H) binden, wobei dadurch jeweils Interaktionen mit anderen Proteinen reguliert werden. Bei Ribeye-B handelt es sich dabei z.B. um das Calciumsensorprotein GCAP2 (Guanylatcyclase-aktivierendes-Protein-2), wobei diese Wechselwirkung wichtig zu sein scheint für die Regulation von calciumabhängigen Effekten innerhalb der synaptischen Ribbons und damit für den Sehvorgang (Schmitz, 2014). Neuere Studien zeigen außerdem, dass Ribeye NAD(H)-abhängig mit den Liposomen der synaptischen Vesikel interagiert (Schwarz und Schmitz, 2017). Andere Proteininteraktionen von Ribeye sind hingegen nicht abhängig von NAD(H) wie z.B. Ribeye-Munc119 bzw. im Fall von Ribeye-Bassoon noch ungeklärt (tom Dieck *et al.*, 2005; Alpadi *et al.*, 2008; Schmitz, 2014). Ebenfalls konnte eine Interaktion von Ribeye-B mit Piccolino nachgewiesen werden, wodurch die runde Struktur der synaptischen Ribbons stabilisiert werden soll (Müller *et al.*, 2019). Durch diese Vielzahl von Proteininteraktionen wird vermutet, dass Ribeye-B eher an der Oberfläche der synaptischen Ribbons exprimiert wird. Wie bei anderen Mitgliedern der CtBP-Proteinfamilie lassen sich auch bei Ribeye weitere Subdomänen unterscheiden (Kumar *et al.*, 2002; Nardini *et al.*, 2003). Die Ribeye B-Domäne lässt sich somit noch weiter unterteilen in eine substratbindende Domäne (SBD) und eine NAD(H)-bindende Domäne (NBD), wobei die NBD auf beiden Seiten von der SBD umgeben ist (Alpadi *et al.*, 2008; Magupalli *et al.*, 2008).

Versuche mit Ribeye-Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass durch eine komplette Abwesenheit von Ribeye keine synaptischen Ribbons in der Retina oder dem Innenohr ausgebildet werden (Maxeiner *et al.*, 2016; Jean *et al.*, 2018). Zudem konnte in der Retina eine starke Abnahme sowohl bei der schnellen Transmitterfreisetzung als auch bei der anhaltenden, langsamen Freisetzung beobachtet werden, wobei generell weniger Calciumkanäle in der aktiven Zone nachweisbar waren (Maxeiner *et al.*, 2016). Bei den inneren Haarzellen hingegen veränderten sich die aktiven Zonen kompensatorisch, wodurch ein ausgedehnteres präsynaptisches Calciumsignal entstand und die Aktivierung der Calciumkanäle sich in Richtung depolarisierende Potentiale verschob (Becker *et al.*, 2018; Jean *et al.*, 2018). Somit könnte für die inneren Haarzellen Ribeye eine Rolle in der Regulation des Calciumeinstroms spielen und für die Struktur der aktiven Zone mitverantwortlich sein.

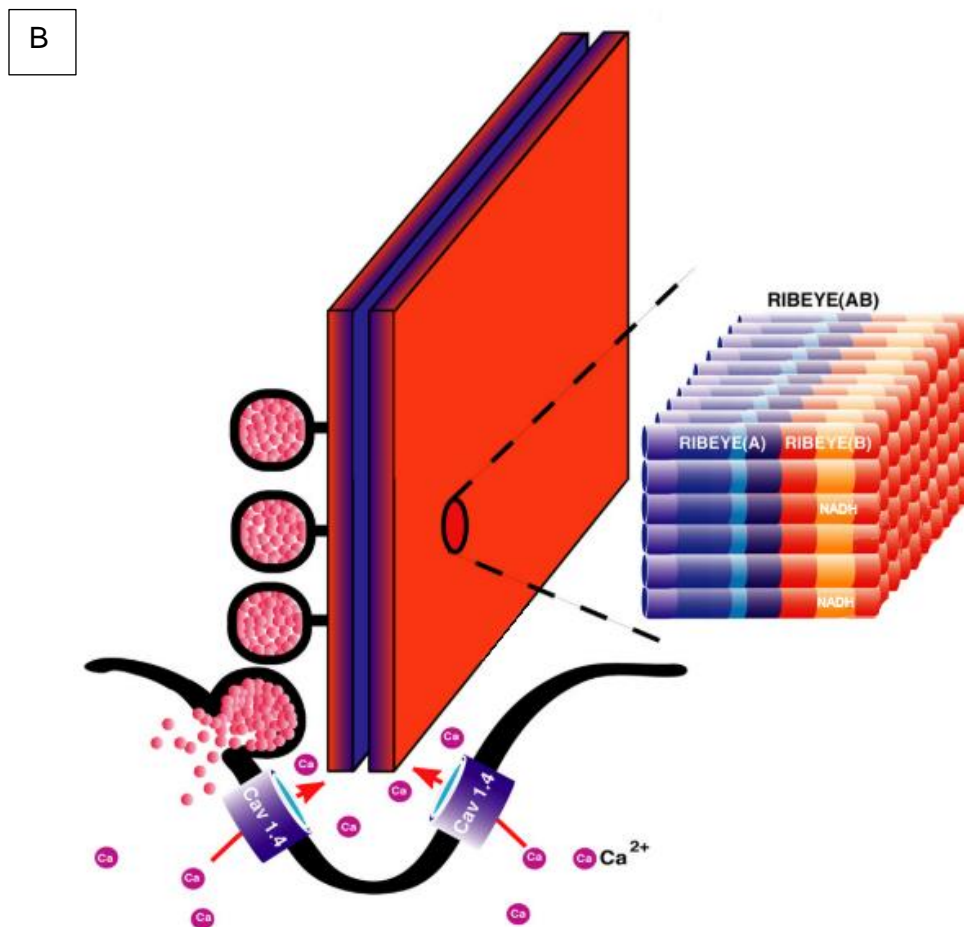
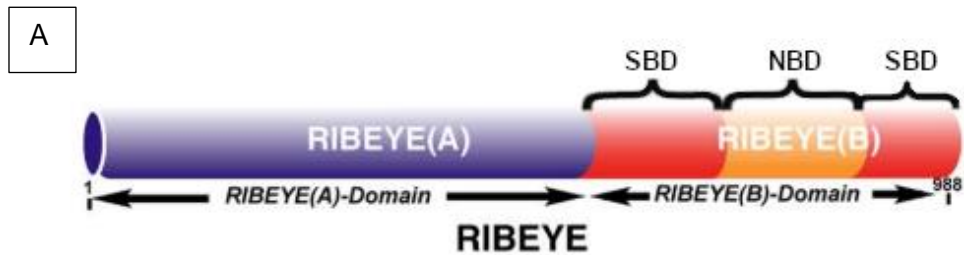


Abbildung 6 Aufbau von Ribeye

In Abbildung A wird die Zusammensetzung des Ribeye-Proteins gezeigt, es existiert hierbei eine einzigartige A-Domäne und eine NAD(H)-bindende B-Domäne. Abbildung B zeigt die hypothetische Zusammenlagerung der Ribeye-Proteine über Ribeye-Ribeye-Interaktionen zu einem synaptischen Ribbon, wobei vermutet wird, dass Ribeye-B zur Oberfläche gewandt ist und die A-Domäne im Zentrum des Ribbons liegt. (Abbildungen modifiziert nach (Magupalli *et al.*, 2008; Schmitz, 2009))

1.3 Cerebellum

Das Kleinhirn (Cerebellum) ist in der hinteren Schädelgrube lokalisiert und Teil des Mesencephalons. Als wichtige Kontrollinstanz dient es der Feinabstimmung und Koordination sowie dem Erlernen von Bewegungsabläufen.

1.3.1 Aufbau

Gliedern kann man das Cerebellum in den Vermis (Wurm), die beiden Hemisphären, den Lobus flocculonodularis und die zwei Kleinhirntonsillen. Ergänzend zu dieser anatomischen Einteilung lässt sich das Cerebellum auch entsprechend seiner Funktion weiter unterteilen in das Spinocerebellum, das Pontocerebellum und das Vestibulocerebellum. Im Wesentlichen besteht das Vestibulocerebellum aus dem Lobus flocculonodularis und ist verantwortlich für den Bereich Stützmotorik, das heißt es sorgt über die Koordination mit dem Gleichgewichtsorgan für einen sicheren Stand. Zudem werden Augenbewegungen damit fein abgestimmt. Der Vermis und der daran angrenzende Bereich (paravermale Zone) bilden das Spinocerebellum, welches für den unwillkürlichen Teil der Stand- und Gangmotorik verantwortlich ist und eine Rolle beim Muskeltonus spielt. Das Pontocerebellum wird von den beiden Hemisphären gebildet und ist wichtig für das Erlernen und die Feinabstimmung von willkürlichen Bewegungen

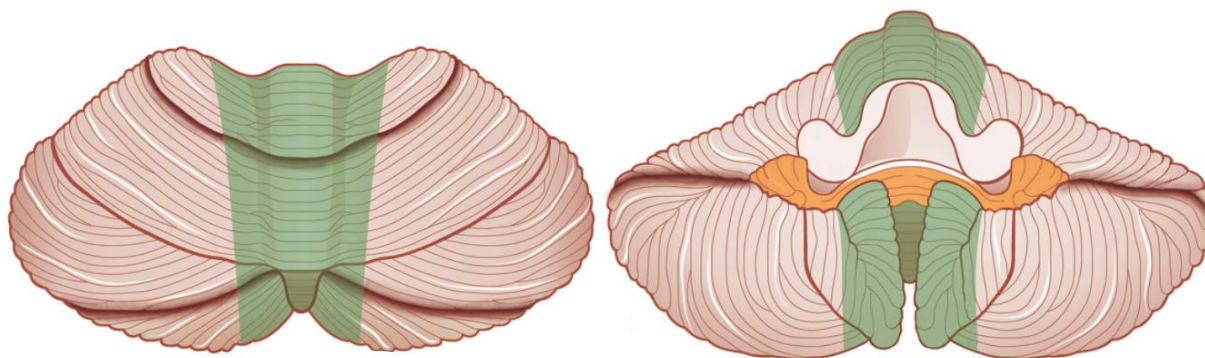


Abbildung 7 Schematische Außenansichten des Cerebellums

Die linke Abbildung zeigt die schematische Ansicht des Kleinhirns von rostrodorsal, die rechts Abbildung zeigt die Ansicht von ventral. Vereinfachend ist das Vestibulocerebellum orange und das Spinocerebellum grün eingefärbt. (Abbildung: modifiziert nach Trepel, 2017)

Über drei Kleinhirnstiele laufen die Afferenzen und Efferenzen, die das Kleinhirn mit anderen Hirnregionen verbinden und somit dessen Funktionalität gewährleisten. Es bestehen dabei vor allem Verbindungen zum Telencephalon, dem Hirnstamm und dem Rückenmark, womit es dem Kleinhirn ermöglicht wird, regulierend in Bewegungsprozesse einzugreifen.

Auf der Oberfläche des Kleinhirnes befinden sich zahlreiche Windungen (Folia), die durch dazwischen liegende Fissurae cerebelli abgrenzt werden, und der Oberflächenvergrößerung dienen. Obwohl das Kleinhirn relativ klein ist, enthält es mit ca. 50 Milliarden Nervenzellen die Hälfte aller Neuronen des gesamten Hirnes, wobei die meisten Neurone in der cerebellären Rinde zu finden sind.

Histologisch kann man neben dem Mark im Inneren als weiße Substanz des Kleinhirns auch eine Rinde (Cortex cerebelli) als graue Substanz unterscheiden. Innerhalb des cerebellären Kortexes lassen sich hierbei drei Schichten differenzieren. Von außen betrachtet, ist die erste Schicht das Stratum moleculare, darauf folgt das Stratum purkinjense und ganz innen befindet sich das Stratum granulosum.

1.3.2 Neuronentypen

In der Purkinje-Zellschicht finden sich die Zellkörper der namensgebenden Purkinje-Zellen, die über einen weit verzweigten Dendritenbaum flach in einer Ebene in der Molekularschicht verfügen. Dabei bilden die Dendriten in ihren Verästelungen ungefähr 180.000 Dornen aus, die wiederum Synapsen ausbilden. Mit ca. 30 µm im Durchmesser sind die Purkinje-Zellen die größten Zellen im Kleinhirn, die zudem sehr stoffwechselaktiv sind. Zusätzlich befinden sich die Gliazellen wie die Bergmann-Gliazellen im Stratum purkinjense, die den Astrozyten gleichen und deren Fortsätze die Gliagrenzmembran in der Molekularzellschicht bilden. Der vorherrschende Zelltyp in der Körnerschicht ist die Körnerzelle, deren kurze Dendriten Synapsen mit den Moosfasern formen. Außerdem gibt es noch Interneurone wie Golgi-Zellen, Stern- und Korbzellen, die jeweils inhibitorische Synapsen mit den Purkinje-Zellen entwickeln.

1.3.3 Neuronale Verschaltung

Parallel zum Telencephalon (Endhirn) werden im Kleinhirn Informationen für die benötigten Bewegungsabläufe verarbeitet. Alle Informationen erreichen das Kleinhirn entweder über die Moosfasern, die zu den Körnerzellen ziehen oder den Kletterfasern, die sich an den Dendriten der Purkinje-Zellen entlang hangeln. Ursprünglich stammen die Moosfasern vor allem aus den Brückenkernen und die Kletterfasern aus dem unteren Olivenkernkomplex. Die Efferenzen der Körnerzellen sind die Parallelfasern, die dann ebenfalls unter anderem am Dendritenbaum der Purkinje-Zellen Synapsen ausbilden. Moosfasern wirken erregend über ihren Neurotransmitter Glutamat auf die Körnerzellen, deren Parallelfasern ebenfalls erregend auf die Dendritenbäume der nachgeschalteten Neurone einwirken. Zu diesen Neuronen zählen neben den Purkinje-Zellen auch die inhibitorischen Golgi-, Stern- und Korbzellen. Die Fortsätze der Korbzellen formen Faserkörbe um die Perikaryen der Purkinje-Zellen; die Sternzellen enden hingegen an den Dendriten der Purkinje-Zellen. Somit ergibt die Summe aus Erregungen und Hemmungen, die an einer Purkinje-Zelle eintreffen, den Erregungszustand einer einzelnen

Purkinje-Zelle. Zusätzlich wirken noch die Kletterfasern auf die Purkinje-Zelle ein, wobei immer eine Purkinje-Zelle die Afferenz einer Kletterfaser erhält und durch eine Vielzahl von Synapsen dafür sorgt, dass jede Erregung der Kletterfaser zu einer Erregung der Purkinje-Zelle führt. Die einzigen Axone, die die Kleinhirnrinde verlassen, gehören zu den Purkinje-Zellen und ergeben die Informationen für die nachgeschalteten Systeme.

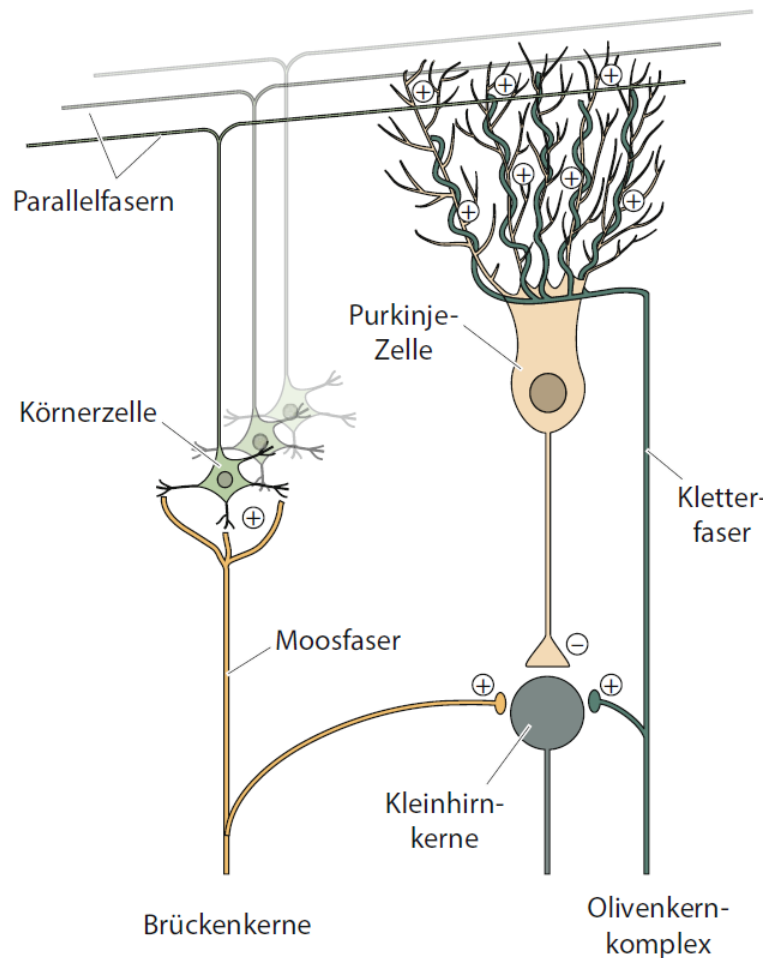


Abbildung 8 Vereinfachte Verschaltungsprinzipien im Kleinhirn

Dargestellt ist eine vereinfachte Form der Verschaltung ohne die Berücksichtigung von Golgi-, Korb- und Sternzellen. Die Moosfasern bilden erregende Synapsen an den Körnerzellen, die dann über Parallelfasern auf die Dendriten der Purkinje-Zellen einwirken. Ebenfalls wirken die Kletterfasern aus den Olivenkernen auf die Purkinje-Zelle ein. Das Axon der Purkinje-Zelle verlässt als einziges wieder die Kleinhirnrinde. (Abbildung: Feigenspan, 2017)

1.4 Zielstellung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Ausarbeitung war die umfassende Charakterisierung der beiden neuen Antikörper 10F8 und 13B5 gegen die Ribeye B-Domäne. Die Antikörper sollten dabei umfassend morphologisch auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene und im Western Blot charakterisiert werden. Nach Möglichkeit sollte auch die elektronenmikroskopische Lokalisation mittels Postembedding Immunogold-Markierung bestimmt werden. Dabei sollte die genaue Bindung innerhalb des Ribeye-Proteins dargestellt werden, wofür immunhistochemische Techniken zum Einsatz kommen. Die Position der gefundenen Signale wurde dabei im Zusammenhang zu bereits vorbeschriebenen Antikörpern gesetzt. Die Spezifität der durch 10F8 und 13B5 erzielten Immunsignale bezüglich Ribeye sollten mit Hilfe von Ribeye Knock-Out-Gewebe unzweifelhaft verifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Primäre Antikörper

Als primäre Antikörper wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Antikörper genutzt.

Name	Ursprung	Verdünnung
10F8 Anti-Ribeye B-Domäne (IgG1 Isotyp)	Maus, monoklonal	1:10
13B5 Anti-Ribeye B-Domäne (IgG1 Isotyp)	Maus, monoklonal	1:10
2D9 Anti-Ribeye B-Domäne (Dembla <i>et al.</i> , 2018)	Maus, monoklonal	1:10
Anti-Synaptotagmin 1 Antikörper V216 (Perin <i>et al.</i> , 1990; Perin <i>et al.</i> , 1991; Pang <i>et al.</i> , 2006; Bacaj <i>et al.</i> , 2015)	Kaninchen, polyklonal	1:250
Cav1.4 C-Term (Dembla <i>et al.</i> , 2020)	Kaninchen, polyklonal	1:500
PSD-95, L667 (Irie <i>et al.</i> , 1997)	Kaninchen, polyklonal	1:500
SV2 synaptisches Vesikelprotein 2 (Buckley und Kelly, 1985)	Maus, monoklonal	1:10
U2656 Anti-Ribeye (B)-Domäne/CtBP2 Antikörper (Schmitz <i>et al.</i> , 2000)	Kaninchen, polyklonal	1:500

Tabelle 1: verwendete Primärantikörper

2.1.2 Sekundäre Antikörper

Folgende sekundäre Antikörper wurden im Rahmen dieser Ausarbeitung verwendet.

Name	Verdünnung
Dapi (4',6-Diamidin-2-phenylindol) <i>Sigma-Aldrich</i>	3:1000 (Stocklösung: 1 mg in 1 ml Aqua dest.)
Donkey anti-Mouse Dylight 488 <i>Jackson ImmunoResearch Lab. Inc.</i>	1:500
Donkey anti-Rabbit Alexa 568 <i>Invitrogen</i>	1:500
GaM-Pox (Goat anti-Mouse, konjugiert mit Peroxidase) <i>Sigma-Aldrich</i>	1:5000 in Magermilch

Tabelle 2: verwendete Sekundärantikörper

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Nachfolgend werden zunächst die Chemikalien und anschließend die Lösungen beschrieben, die für die vorliegende Ausarbeitung verwendet wurden.

2.1.3.1 Chemikalien

Name	Bezugsquelle
Aceton	Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken
Acrylamid	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
BSA (bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich; A7906-100G, St. Louis (USA)
Coomassie Brilliant Blue R 250	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid)	Sigma-Aldrich; St. Louis (USA)
DMP-30 (2,4,6-Tridimethylaminomethylphenol)	Sigma-Aldrich; St. Louis (USA)
Epoxy Harz	Sigma-Aldrich; St. Louis (USA)
Glycerol	Carl Roth GmbH; Karlsruhe

Magermilchpulver	Sucofin, Supermarkt
Methanol	Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken
MNA (methyl nadic anhydride)	Sigma-Aldrich; St. Louis (USA)
Natriummethylat (30% Lösung in Methanol)	Merck-Schuchardt OHG; Hohenbrunn
NPG (N-Propylgallat in 10% Glycerin)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin)	Merck-Schuchardt OHG; Hohenbrunn
Tris	Merck-Schuchardt OHG; Hohenbrunn
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Xylol	Zentrales Chemikalienlager Universität Saarbrücken

Tabelle 3: verwendete Chemikalien

2.1.3.2 Lösungen

Name	Zusammensetzung
Ponceau S-Färbelösung	30 g Trichloressigsäure 5 g Ponceau S mit Aqua dest. auf 1 Liter Gesamtvolumen aufgefüllt
5 % Magermilch	5 g Magermilchpulver in 100 ml PBS
SDS-Ladungspuffer 4x	1,6 g SDS 4 ml β -Mercaptoethanol 2 ml Glycerol 2 ml 1 M Tris pH 7 4 mg Bromphenol Blau 2 ml destilliertes Wasser

Phosphatgepufferte Salzlösung 1x PBS	8 g Natriumchlorid (NaCl) 0,2 g Kaliumchlorid (KCl) 1,3 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) mit Aqua dest. auf 1 Liter Gesamtvolumen aufgefüllt
Trenngel 8% für SDS-PAGE	1,96 ml H ₂ O 1,9 ml 1M Tris pH 8,8 1,995 ml 30% Acrylamid 75 µl 10% SDS 1,5 ml 50% Glycerol 5 µl TEMED 38 µl 10% APS
Sammelgel für SDS-PAGE	4,73 ml H ₂ O 1,88 ml 0,5 M Tris pH 8,8 0,75 ml 30% Acrylamid 75 µl 10% SDS 7,5 µl TEMED 56,3 µl 10% APS
Elektrophoresepuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 1,0 g SDS mit Aqua dest. auf 1 Liter Gesamtvolumen aufgefüllt
Transferpuffer	15,125 g Tris 72,05 g Glycin 1 Liter Methanol mit Aqua dest. auf 5 Liter Gesamtvolumen aufgefüllt

ECL-Lösungen	<p>ECL-I: 5 ml 1M Tris pH 8,5 500 µl Luminolstock (250 mM in Dimethylsulfoxid) 220 µl Para-hydroxy Coumarinsäure (PCA) mit Aqua dest. auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt</p> <p>ECL-II: 5 ml 1M Tris pH 8,5 32 µl Wasserstoffperoxid mit Aqua dest. auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt</p>
--------------	--

Tabelle 4: verwendete Lösungen

2.1.4 Gewebe

Die Tierhaltung und sämtliche Experimente erfolgten unter Einhaltung der Vorgaben des Tierethik-Komitees der Universität des Saarlandes. Alle Mäuse basieren auf dem C57Bl/6J-genetischen Hintergrund, wobei beide Geschlechter vertreten sind. Hierbei wurden sowohl Wildtyp-Mäuse als auch in getrennten Experimenten Ribeye-Knockout-Mäuse verwendet, um das Ergebnis zu validieren. Die Tiere wurden bei einem standardisierten Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden hell und 12 Stunden dunkel) gehalten und am frühen Nachmittag durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden zunächst die Augen entnommen, bevor die Entnahme des Cerebellums erfolgte.

Zudem wurde zum Datenabgleich das gleiche Experiment einmalig an Rinderaugen aus dem Schlachthaus durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Einbettung der Semidünnschnitte

Um das Gewebe für Semidünnschnitte nutzen zu können, muss es dafür zunächst in ein Harz eingebettet werden, damit die geringe Stärke der Schnitte von 0,5 µm beim Schneiden erreicht werden kann. Vor der Lyophilisation mit flüssigem Stickstoff wurde das entnommene Gewebe hierfür zunächst schockgefroren unter der Verwendung von tiefgekühltem Isopentan. Dieses Vorgehen verhindert in dem unfixierten Gewebe eine Bildung von Eiskristallen.

Im Anschluss wurde die Probe in einen Kolben gegeben und an eine Vakuumpumpe gehängt. Dabei wurde zunächst über eine Öl-Diffusionspumpe (Typ DUO 004B; Arthur-Pfeiffer-Vakuumtechnik, Wetzlar/Aßlar) ein Vorvakuum erreicht, das durch eine zweite Pumpe (Typ TCP270 Turbomolekular-Pumpe, Arthur-Pfeiffer-Vakuumtechnik, Wetzlar/Aßlar) schließlich auf ein Vakuum von ca. 10^{-7} mbar verstärkt wurde. In diesem Vakuum wurde dem Gewebe ca. zwölf Stunden lang, durch Umspülen des Kolbens mit flüssigem Stickstoff, Wasser entzogen. Danach wurde der Stickstoff entfernt und die Gewebeproben für weitere zwölf Stunden im Vakuum belassen.

Für das Harz wurden 6,5 g Epoxy-Harz, 2,75 g DDSA und 4 g MNA in einem Zentrifugenröhrchen vermengt und anschließend nach Zugabe von 0,1 g des Beschleunigers DMP-30 im Exsikkator unter Vakuum für 30 Minuten belassen. Diese Epon-Mischung wurde zu den Gewebeproben gegeben, das Harz infiltrierte das Gewebe über Nacht auf dem Drehrad bei 28° C. Zum Schluss wurden die Proben in vorgefertigte Mulden gedrückt, in denen sie bei 60° C für 24 Stunden polymerisiert sind.

Die genannte Methode zur Einbettung des Gewebes ist eine Abwandlung der Originalmethode von Drenckhahn und Franz (1986), wie sie von Wahl et al. (2013) beschrieben wurde.

2.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung

Zum Nachweis eines Antigenes eignen sich sowohl die direkte als auch die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung. Diese Methode macht sich die Affinität eines Antikörpers zu einer bestimmten molekularen Struktur des Antigens, dem sogenannten Epitop, zunutze. Während bei der direkten Markierweise der primäre Antikörper bereits mit einem fluoreszierenden Marker gekoppelt ist, ist dieser Marker bei der indirekten Methode an den sekundären Antikörper gebunden, der sich wiederum gegen den primären Antikörper richtet.

Da die direkte Variante durch Interaktion zwischen Marker und primärem Antikörper zu Funktionsverlusten des Antikörpers führen kann, ist die indirekte Variante im Rahmen dieser

Ausarbeitung bevorzugt worden. Zudem können sich bei der indirekten Methode mehrere sekundäre Antikörper an die Epitope des primären Antikörpers binden und somit ein stärkeres Signal erzeugen.

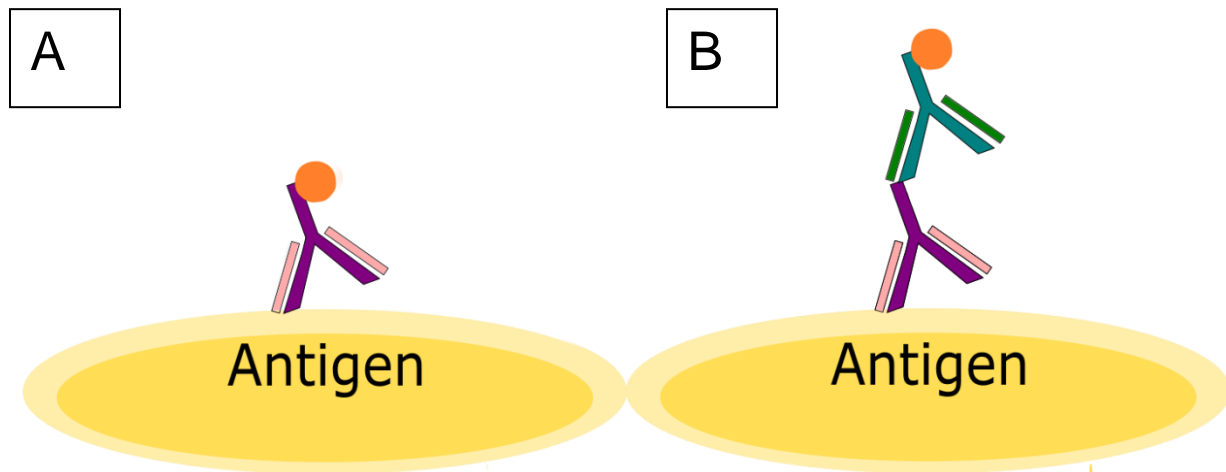


Abbildung 9: Direkte und indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Bei der direkten Immunfluoreszenzmarkierung (A) ist der primäre Antikörper gegen das Antigen selbst mit einem entsprechenden Farbstoff markiert, während bei der indirekten Methode (B) ein weiterer Antikörper mit einem Farbstoff markiert ist und gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. (Abbildung: eigene Darstellung)

2.2.2.1 Immunfluoreszenzmarkierung bei Semidünnschnitten

Für die Immunfluoreszenzmarkierung bei Semidünnschnitten werden besonders dünne Schnitte mit einer Stärke von 0,5 μm benötigt. Dafür wurden die Proben in Epon Harz eingebettet, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, bevor die Schnitte mit einem Reichert Ultramikrotom angefertigt wurden. Um die Schnitte weiter bearbeiten zu können, musste dieses Harz nun im ersten Arbeitsschritt zunächst gelöst werden, wofür die von Mayor et al. (1961) benutzte Methode in leichter Abwandlung verwendet wurde.

In speziellen Glas-Küvetten (Firma Ted Pella Inc., Bestellnummer: 21036) wurden die Semidünnschnitte unter einem Abzug für zwölf Minuten mit Natriummethylat bedeckt und, mit einer Glasplatte abgedeckt, inkubiert. Die Inkubation mit Natriummethylat dient hierbei der Auflösung des Epon-Harzes. Der Vorgang wurde im Anschluss für ebenfalls zwölf Minuten mit einer Mischung zu gleichen Teilen aus Xylol und Methanol wiederholt. Zuletzt wurde Aceton in die Küvetten zu den Schnitten gegeben und diese zweimal unter Austausch des Acetons für jeweils zehn Minuten inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser und danach für insgesamt zehn Minuten einige Male mit PBS gewaschen. Bei Einzelmarkierungen wird ein

einzigem primärem Antikörper, in der unter Kapitel 2.1.1. aufgeführten Verdünnung, auf die Semidünnschnitte aufgetragen und im Kühlraum bei 4° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst fünfmal eine Waschung mit PBS für insgesamt zehn Minuten, bevor der sekundäre Antikörper sowie oftmals Dapi hinzugegeben und die Schnitte erneut über Nacht inkubiert wurden. Als sekundärer Antikörper fungierte hierbei stets Donkey anti-Mouse (konjugiert mit Dylight 488). Anschließend wurden die Schnitte nochmals fünfmal für zehn Minuten gewaschen und mit N-Propyl-Gallat (NPG) zum Schutz gegen Ausbleichung auf einen Objektträger gegeben, auf dem sie dann fixiert wurden. Diese Fixierung erfolgte durch eine Umrandung mit Nagellack, womit sowohl das Austrocknen der Schnitte als auch ein Verrutschen dieser verhindert wurde.

Zur gleichzeitigen Darstellung von Referenzstrukturen wurden zudem Doppelimmunfluoreszenzen mit zwei primären Antikörpern durchgeführt. Entscheidend ist hierbei, dass die unterschiedlichen primären Antikörper aus verschiedenen Spezies entstammen. Der passende Sekundärantikörper detektiert spezifisch nur eine Spezies, wobei darauf geachtet wurde, dass die jeweils gekoppelten Fluorophore viel Abstand in der Wellenlänge zueinander haben. Für sämtliche Doppelmarkierungen wurde hierbei die Kombination aus Donkey anti-Mouse (konjugiert mit Dylight 488) und Donkey anti-Rabbit (konjugiert mit Alexa 568) verwendet. Somit konnten die Bindungen der primären Antikörper unabhängig voneinander in unterschiedlichen Kanälen durch die verschiedenen Anregungslängen aufgezeigt werden.

Die beschriebene Prozedur von Einzel- und Doppelmarkierungen folgte hierbei, mit leichten Veränderungen, den Arbeiten von Schmitz und Drenckhahn (1993) und Schmitz, Königstorfer und Südhof (2000), wie sie auch von Wahl et al. (2013) angewandt wurden.

2.2.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung bei Kryostatschnitten

Ergänzend zu den Semidünnschnitten wurden Kryostatschnitte benutzt, wobei das unfixierte Gewebe bei der Herstellung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend am Kryostaten in ca. 10 µm dicke Schnitte geschnitten wurde. Die Kryostatschnitte wurden für die Immunfluoreszenzmarkierung auf einer vorgeheizten Platte (40° C) für 30 Minuten erhitzt, bevor die Kryostatschnitte, wie oben für die Semidünnschnitte beschrieben (Kapitel 2.2.2.1), für die indirekte Immunfluoreszenz aufgearbeitet wurden. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper blieben dabei unverändert.

2.2.3 Negativkontrollen

Sowohl bei den Semidünnschnitten als auch bei den Kryostatschnitten erfolgte neben einer Positivkontrolle mit Ribeye (2D9) auch eine Negativkontrolle für jede Versuchsreihe. Hierbei wurde anstatt eines primären Antikörpers PBS benutzt unter Beibehaltung aller anderen Schritte. Unter dem Mikroskop waren in diesem Fall nur unspezifische Strukturen wie Blutgefäße oder Hintergrund zu erkennen.

2.2.4 SDS-Page und Western Blot

Mit einem Western Blot lassen sich Proteine nachweisen, die dafür zuvor mittels SDS-Page aufgetrennt wurden. Die Proteine werden dafür zunächst stark negativ geladen, um ihre Eigenladung zu überdecken und im Anschluss fast vollständig denaturiert, sodass ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Gel schließlich nur noch von ihrer Molekülmasse abhängig ist. Durch zusätzlich verwendete Markerproteine mit bekannter Größe lassen sich die Molekülmassen der zu untersuchenden Proteine abschätzen. Die Übertragung (Blotting) der Proteine auf eine Membran wird als Western Blot bezeichnet, in dessen Verlauf man einzelne Proteine mittels Antikörper-Bindung nachweisen kann.

Zur Herstellung des Probenmaterials wurde ein Cerebellum der Maus bzw. eine halbe Rinderretina in PBS unter Zuhilfenahme eines Sonifikators durch hochfrequente Schallwellen (Ultraschall) in mehreren kurzen Intervallen von jeweils ca. zehn Sekunden zerkleinert und homogenisiert. Das Verfahren macht sich hierbei die Kavitationskräfte zunutze, wobei Blasen in der Flüssigkeit entstehen, die nach Größenzunahme implodieren. In der Folge führt dies zu rasch wechselnden Druckänderungen, wodurch die Zellwände und Zellmembranen der beschallten Zellen aufreißen. Anschließend wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt und für zehn Minuten bei 96° C aufgekocht.

Entsprechend der Verwendung von Amersham-Gelgießapparaturen wurden zwei Glasplatten mit T-Spacern an den Seiten bündig eingespannt und ein 8%iges Trenngel hergestellt. Mit dem Trenngel wurde der schmale Spalt zwischen den Glasplatten bis zu einer Höhe von 2/3 der Gesamthöhe aufgefüllt und mit Ethanol bedeckt, bevor eine halbstündige Polymerisierung des Gels erfolgte. Der Alkohol wurde nach Ablauf der Zeit entsorgt und durch ein 3%iges Sammelgel ersetzt, wobei oben ein Kamm als Abschluss eingesteckt wurde, um Taschen im entstehenden Gel zu erhalten. Diese erleichtert das spätere Auftragen der Proben. Nach erneuter Polymerisation für 30 Minuten wurde die Apparatur in die Elektrophoresekammer eingehängt und SDS-PAGE-Elektrophoresepuffer in beide Kammern gefüllt, sodass das Gel davon umgeben war. In die Taschen wurde zum Vergleich zunächst ein geeigneter Marker für die Molekulargewichtsstandards eingebracht, alle anderen Taschen wurden mit dem Probenmaterial befüllt und das System bei 80 V gestartet. Die Auftrennung der Proteine

dauerte insgesamt ca. vier Stunden und folgte der Methode wie von Johnston et al. (1989) und Schmitz et al. (2000) beschrieben. Nach dem SDS-PAGE folgte der Elektrotransfer (Western Blot).

In einer Blotkammer zwischen Schwämmen und Filterpapier wurden im elektrischen Feld die durch SDS-Page negativ geladenen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, dabei war die Membran ständig von Transferpuffer umgeben. Der Vorgang dauerte bei 50 V sechs Stunden und fand bei einer Temperatur von 4° C statt. In dieser Zeit wanderten die Proteine im elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol.

Die Membranen wurden danach für zehn Minuten mit Ponceau S-Färbelösung rot gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen, um den Hintergrund zu entfärben für die Dokumentation mit dem GelDoc. Hiernach wurden die Banden entsprechend beschriftet und in Streifen geschnitten, bevor alle Blotstreifen ohne den Markerstreifen in PBS für 15 Minuten gewaschen und dabei entfärbt wurden. Der Markerstreifen wurde hingegen an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte eine Inkubation der übrigen Membranstreifen für 45 Minuten in 5%iger Magermilchlösung, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Aus Magermilch und den Antikörpern wurde für Ribeye (2D9) eine 1:300- bzw. für 10F8 und 13B5 eine 1:100-Lösung hergestellt, womit die Streifen bei 4°C Umgebungstemperatur über Nacht inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden die Streifen dann dreimal für jeweils acht Minuten mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde Goat anti-Mouse konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (GaM-Pox) verwendet und ebenfalls in Magermilch verdünnt in einer Konzentration von 1:5000. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde, anschließend wurden die Streifen erneut mit PBS dreimal für jeweils acht Minuten gewaschen.

Unter Zugabe gleicher Mengen ECL-I und ECL-II wurden die Streifen mit dem Bio-Rad GelDoc Chemilumineszenz-Detektionssystem gescannt und fotografiert, dabei wurde der bereits gefärbte Marker an die Membranstreifen angelegt, um den Standard dokumentieren zu können.

2.2.5 Pepspot Blot

Zur Identifizierung des Epitops, welches von Antikörpern gebunden wird, eignen sich Peptide Arrays (Pepspots) besonders gut, außerdem lassen sich somit mögliche Kreuzreaktionen der Antikörper durch ähnliche Epitope aufzeigen. Das Grundprinzip ähnelt hierbei dem Western Blot. Es werden Peptid-Fragmente des zu untersuchenden Proteins aufgetragen, wobei sie über ihren C-Terminus an die Zellulose-Membran immobilisierend gebunden sind.

Die Peptidstücke werden pro Fragment um eine gewisse Zahl an Aminosäuren der Gesamtsequenz verschoben. Damit ist ein Peptid immer nur um einige Aminosäuren anders als das nachfolgende Peptid, womit ein genaues Eingrenzen des Epitops möglich ist. Ein Schema dieses Prinzips ist in Abbildung 10 zu sehen.

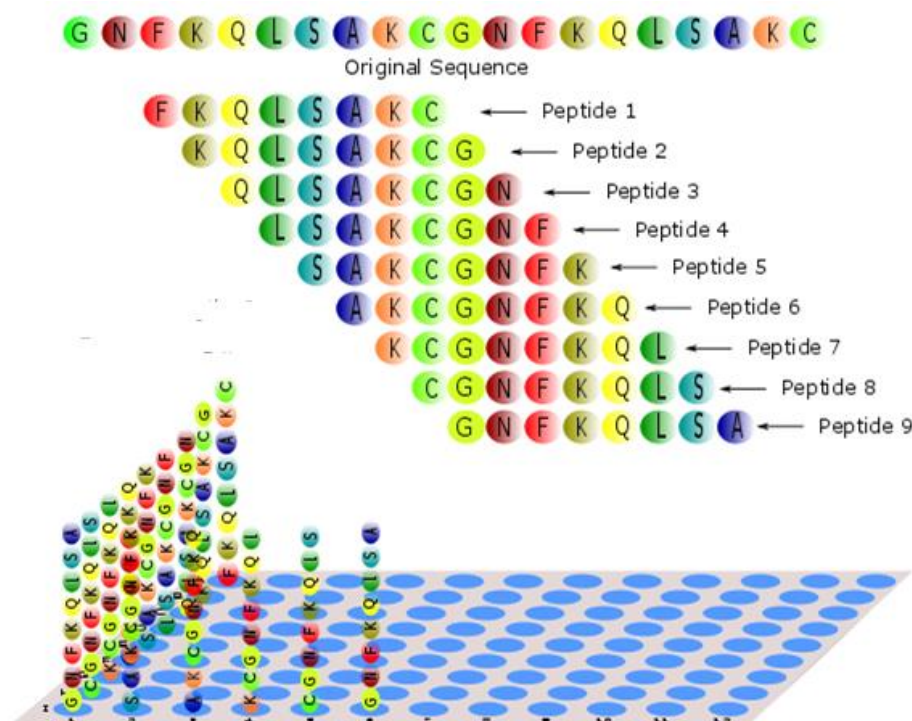


Abbildung 10 Schema eines überlappenden Pepspots

Die Abbildung zeigt ein Beispiel für einen überlappenden Pepspot. Oben ist die Sequenz des Proteins abgebildet, darunter die Peptid-Fragmente, wobei sich die Position in diesem Beispiel immer um eine Position verschiebt. Die Buchstaben entsprechen dem Einbuchstabencode für Aminosäuren. Im unteren Teil der Abbildung wird eine Membran mit den verankerten Peptid-Fragmenten visualisiert. (Abbildung: Alpha Lifetech, o.J.)

Bei den im Experiment verwendeten Membranen bestanden die Fragmente aus jeweils 18 Aminosäuren, die überlappend aufgetragen wurden. Jede Aminosäuresequenz wurde pro Fragment um fünf Positionen verschoben. Somit waren die letzten fünf Aminosäuren des ersten Peptids die ersten fünf Aminosäuren des folgenden Peptids. Bei der Entwicklung des Blots wird sichtbar, bei welchem Epitop das vom Antikörper markierte Peptid sich befindet.

Die hier verwendeten Pepspot-Membranen wurden mir durch Professor Martin Jungs Labor freundlicherweise zur Verfügung gestellt und dort, wie von Hilpert et al. (2007) und Harsman et al. (2011) beschrieben, hergestellt. Auf den Pepspots wurden überlappende Peptide von Rim-BP1 und Ribeye B-Domäne immobilisiert.

Die Membranen wurden nach dem Zurechtschneiden für vier Minuten in Methanol gewaschen, um sie zu aktivieren und danach in einer Mischung aus 1 ml Triton X-100 und 100 ml PBS für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Membranen jeweils in 20 ml PBS, in dem 1,2 g BSA gelöst war, nochmals eine Stunde inkubiert, bevor schließlich die primären Antikörper 10F8 in einer Verdünnung von 1: 20.000 und 13B5 in einer Verdünnung von 1:10.000 hinzugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte hierbei über Nacht.

Im Anschluss wurden die Membranen dreimal mit PBS gewaschen und erneut ein Blockierungspuffer aus BSA und PBS (20 ml PBS mit 1,2 g BSA) hergestellt, welcher im Verhältnis 1:2000 mit GaM-Pox als sekundären Antikörper versetzt wurde. Die Membranen wurden damit für eine Stunde inkubiert und danach erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Auswertung erfolgte analog zur Western Blot-Analyse unter Zugabe gleicher Mengen ECL-I und ECL-II mit dem Bio-Rad GelDoc Chemilumineszenz-Detektionssystem.

2.2.6 Fusionsproteine

Durch die Verwendung von Fusionsproteinen sollte es ermöglicht werden, die exakte Bindungsdomäne der untersuchten Antikörper aufzuzeigen. Die Methode folgte dem Standardprotokoll wie von Schmitz et al. (2000) beschrieben.

Zur Herstellung der Fusionsproteine wurden laboreigene Plasmide verwendet, die jeweils eine Untereinheit der Ribeye B-Domäne enthalten. Es wurden drei verschiedene Plasmide eingesetzt, die jeweils für die nachfolgenden Proteinabschnitte kodieren: NAD(H)-bindende Domäne (NBD), Substratbindungsdomäne (SBD) und die Ribeye B-Domäne ohne den carboxyterminalen Abschnitt, im Folgenden als Δ C-Term Domäne bezeichnet (Alpadi *et al.*, 2008; Magupalli *et al.*, 2008).

Von diesen Plasmiden wurde jeweils 1 μ l zu BL21(DE3)-Bakterien gegeben und im Kondensator mittels eines Stromstoßes von 1250 V für 5 ms durch Elektroporation in die Bakterien eingeschleust. Bei dieser Technik sorgt der Stromstoß dafür, dass die Membran der Bakterien kurzfristig durchlässig wird, sodass Makromoleküle ins Zellinnere gelangen können. Durch das Plasmid erhalten die Bakterien zusätzlich die Resistenz gegenüber Ampicillin, wodurch die Bakterien mit dem aufgenommenen Plasmid einen Selektionsvorteil haben. Die Bakterien wurden mit 1 ml LB-Medium bei 37° C eine Stunde lang unter Schwenkbewegungen (1200 rpm) inkubiert und anschließend auf Ampicillinplatten dünn aufgetragen. Auf diesen

Platten wuchsen nun über Nacht bei 37° C nur die Bakterien an, die das Plasmid und somit die Resistenz gegen Ampicillin enthielten.

Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Zusatz von 20 µl Ampicillin in sterilen Kolben im Bakterieninkubator über Nacht bei 37° C inkubiert. Das Volumen wurde am folgenden Tag vergrößert, indem 200 ml des LB-Mediums mit 200 µl Ampicillin versetzt und anschließend 2 ml der Bakterien hinzugegeben wurden. Im Inkubator bei 37° C wurden diese Kulturen nun so lange bei 160 rpm inkubiert bis im Photometer bei 600 nm Absorption in 1 ml Probe eine optische Dichte zwischen 0,9 und 1,0 erreicht wurde. Daraufhin wurde die Kultur noch eine halbe Stunde bei Raumtemperatur weiter inkubiert, bevor 200 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) hinzugegeben wurde. Durch die Zugabe des IPTGs erfolgte die Induktion und die Proteinsynthese startete. Die Kultur wurde anschließend für 4-6 Stunden bei Raumtemperatur weiter inkubiert und darauffolgend bei 3500 rpm für 20 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entfernt und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C, um die Proteine nicht zu beschädigen.

In 50 ml kaltem PBS wurde das Pellet resuspendiert und erneut zentrifugiert für 15 Minuten bei 3500 rpm, um weitere etwaige Rückstände zu entfernen. Nach diesem Waschschritt wurde das Pellet erneut resuspendiert, diesmal in 10 ml kaltem PBS unter der Zugabe von 200 µl Lysozym. Lysozym bricht die Zellwände der Bakterien auf und leitet somit die Lyse der Bakterien ein. Dazu wurde die Probe eine Stunde bei 4 °C und zusätzlich auf Eis geschwenkt und anschließend mit Hilfe von Ultraschall in kurzen Intervallen von 5x20 Sekunden homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 13000 rpm für eine Stunde, danach wurde der Überstand gesammelt.

1 ml GST-Beads wurden in 14 ml PBS gewaschen, indem sie darin zunächst aufgelöst wurden und danach bei 4 °C für eine Minute bei 8500 rpm zentrifugiert wurden. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um den Alkohol der Lagerungsflüssigkeit aus den GST-Beads zu entfernen. Danach wurden die GST-Beads zu den Fusionsproteinen gegeben und für mindestens vier Stunden auf dem Drehrad inkubiert. Bei 1500 rpm wurden die Proben hiernach zentrifugiert für zwei Minuten, der erste Überstand wurde behalten und im Kühlraum gelagert, falls sich noch Protein darin befindet. Die Beads wurden nach gleicher Vorgehensweise noch weitere Male mit kaltem PBS gewaschen und nachfolgend zentrifugiert. Mit den gereinigten Beads, die nun das Fusionsprotein enthalten, konnte nun eine SDS-Page mit anschließendem Western Blot durchgeführt werden.

2.2.7 Mikroskopie

2.2.7.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Technik der Epifluoreszenzmikroskopie erlaubt eine gute Auflösung der Immunsignale. Dabei wird das Licht von einer Hochleistungslichtquelle generiert und zum Anregungsfilter geleitet. Die kurzwellige Anregungsstrahlung wird zum Objektiv reflektiert von einem Strahlteiler und vom Objektiv auf dem Präparat fokussiert. Das Präparat absorbiert die kurzwellige Strahlung und entsendet stattdessen langwellige Fluoreszenzstrahlung (Stokes-Verschiebung). Nachdem diese Strahlen einen dichroitischen Strahlteiler passiert haben, erreichen sie schließlich den Detektionsfilters, der nur die langwellige Strahlung durchlässt. Vor diesem befindet sich noch ein Emissionsfilter, um ggf. restliches Anregungslicht zu eliminieren. Durch dieses Prinzip wird nur Licht einer bestimmten Wellenlänge durchgelassen, das dann das Fluorophor des entsprechenden Zweitantikörpers anregt.

Die Auswertung der verschiedenen Schnitte erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M der Firma Zeiss mit dazugehöriger Fluoreszenzkamera AxioCam MRm. Die Lichtquelle entstammte der Firma Till Photomics, dabei handelte es sich um das Modell Oligochrom. Bei den Objektiven wurden das 20x Objektiv (LD-Plan-Neofluar, Firma Zeiss), das 40x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Neofluar, Firma Zeiss), das 63x Öl-Immersion-Objektiv (Plan-Apochromat, Firma Zeiss) und teilweise auch das 100x Öl-Immersion-Objektiv (α Plan-Fluar, Firma Zeiss) verwendet. Für die Dokumentation wurde die Software AxioVision release 4.8 von Zeiss eingesetzt, dabei wurde darauf geachtet, dass die zu vergleichenden Präparate einer Serie bei gleichen Bedingungen (wie z. B. Expositionszeit) dokumentiert wurden. Dies gilt ebenso für die dazugehörigen Kontrollexperimente.

Die primären Antikörper 10F8 und 13B5 wurden unter Verwendung von Donkey anti-Mouse Dylight 488 als sekundären Antikörper im grünen Kanal dokumentiert und dafür mit einer Wellenlänge von 450-490 nm angeregt. Bei Doppelimmunfluoreszenzmarkierung wurde für den zweiten primären Antikörper zur Unterscheidung Donkey anti-Rabbit Alexa 568 als sekundärer Antikörper verwendet, der mit einer Wellenlänge von 540-552 nm angeregt wurde. Zusätzlich wurde Dapi eingesetzt, welches die Zellkerne anfärbt und mit einer Wellenlänge von 395-440 nm angeregt wurde. Bei den verwendeten Präparaten konnte kein Durchschlagen der Signale in einen der anderen Kanäle beobachtet werden.

2.2.7.2 Konfokalmikroskopie

Ergänzend zur Epifluoreszenzmikroskopie wurden einige Präparate zusätzlich im Konfokalmikroskop (Zwei-Photonen-Mikroskop A1R) der Firma Nikon betrachtet, um weitere Details dokumentieren zu können. Bei der Konfokalmikroskopie wird nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern nur ein Lichtpunkt. Somit wird die Fluoreszenz im Präparat auch punktgenau aktiviert und die Anregung umgebender Bereiche minimiert. Dadurch ist oftmals eine schärfere Abbildung möglich und etwaiger vorhandener Hintergrund kann reduziert werden.

Für alle Aufnahmen wurde hierfür das 60x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, Firma Nikon) benutzt, wobei hier die Anregung im grünen Kanal mit einem blauen Festkörperlaser bei 488 nm und im roten Kanal mit einem blauen Festkörperlaser bei 568 nm erfolgte. Mit der Möglichkeit, die Funktion „reuse camera settings“ in der Dokumentationssoftware NIS elements software zu benutzen, konnte gewährleistet werden, dass bei der Dokumentation der Präparate die gleichen Bedingungen gegeben waren.

2.2.7.3 Elektronenmikroskopie nach Immungoldmarkierung

(durchgeführt von Gabriele Kiefer)

Das Grundprinzip der Immungoldmarkierung entspricht der Markierung von Antigenen mit Antikörpern, allerdings werden die sekundären Antikörper mit Goldpartikeln in einer Größe von 10 nm gekoppelt. Die relativ hohe Elektronendichte der Goldpartikel lässt die Partikel dann im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) als schwarze Punkte erscheinen.

Für diese post-embedding Methode wurden Ultradünnschnitte mit einer Stärke von ca. 50-70 nm angefertigt, für die das Probematerial nach Tieftemperatureinbettung bei -20° C mit UV-Licht polymerisiert und auf Gold-Grids geschnitten wurde. Unspezifische Bindungen wurden blockiert durch die Absättigung mit einer 1%igen BSA-Lösung in PBS für eine Stunde, bevor der affinitätsgereinigte primäre Antikörper in verschiedenen Verdünnungen (1:50, 1:100, 1:1000) zum Gewebe gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Nach dem Waschen der Proben in einer 1%igen BSA-Lösung in PBS, erfolgte die Zugabe des mit 10 nm Goldpartikeln konjugierten sekundären Antikörpers Goat anti-Mouse in der Verdünnung 1:100. Im Anschluss an die zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Proben sehr vorsichtig erneut gewaschen und anschließend 10 Minuten lang mit 2,5%igen Glutaraldehyd die Bindungen fixiert. Zum Schluss wurde nach einem erneuten Waschvorgang zur

Kontrastierung im Strahlengang Uranylacetat verwendet und die Proben unter Verwendung von Filterpapier getrocknet.

Für die Dokumentation der so aufbereiteten Proben wurde das Transmissionselektronenmikroskop der Firma FEI, Typ Tecnai 12, verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Resultate der Immunfluoreszenz in der Retina

Zunächst wurden alle gewonnenen Antikörper-Klone als Einzelfluoreszenz an der Retina getestet, um zu überprüfen, ob sich ein Signal in den Gewebeproben erzeugen lässt. Dabei zeigten sich bei den monoklonalen Antikörpern 10F8 und 13B5 positive Ergebnisse. In einem zweiten Schritt wurden die beiden Antikörper dann in mehreren Doppelfluoreszenz-Experimenten mit verschiedenen Antikörpern getestet, um die Detektion des Antikörpers mit anderen Strukturen in Beziehung setzen zu können. 10F8 und 13B5 wurden dabei sowohl in den Einzelfluoreszenz- als auch in den Doppelfluoreszenz-Experimenten stets in der Verdünnung 1:10 verwendet. Als Positivkontrolle wurde jeweils Ribeye (2D9) eingesetzt, die Negativkontrolle erfolgte mit PBS anstelle der jeweiligen primären Antikörper. Diese Kontrollexperimente sind gesammelt in Kapitel 3.1.5. zusammengetragen.

3.1.1 Der Antikörper 10F8 in der Einzelfluoreszenz

Initial wurden Einzelfluoreszenz-Experimente mit 10F8 durchgeführt, um die Lokalisation ohne Störung durch andere primäre Antikörper zu dokumentieren. Hierbei zeigte sich eine markante Anreicherung der Signale in der inneren und äußeren plexiformen Schicht. Durch das intensive Signal ist dieses auch schon in der geringen 20er-Vergrößerung problemlos zu erkennen. Das Signal ist in der äußeren plexiformen Schicht hufeisenförmig, wohingegen es in der inneren plexiformen Schicht punktförmig detektiert wird. Diese Art der Signaldetektion ist charakteristisch für bereits vorbeschriebene Ribeye-Antikörper wie beispielsweise den monoklonalen Antikörper 2D9 oder auch den polyklonalen Antikörper U2656.

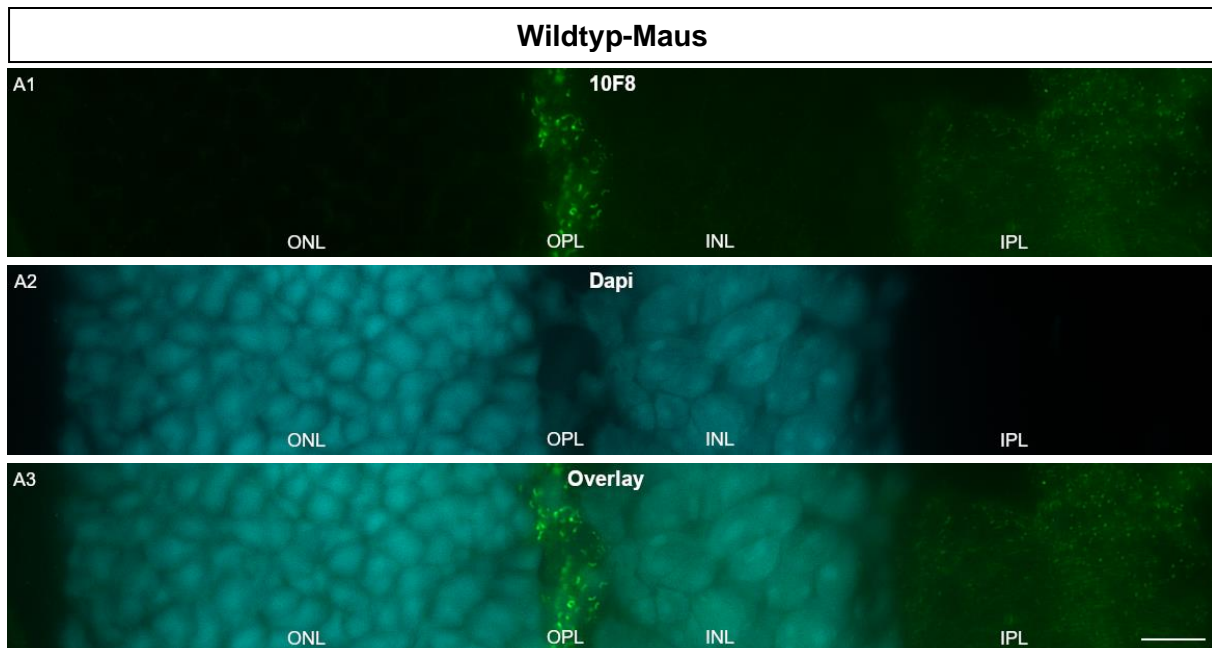


Abbildung 11 Übersichtsaufnahme der Verteilung von 10F8 in der Retina

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina immunmarkiert mit dem Antikörper 10F8. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. In der OPL zeigt sich ein deutliches Signal des Antikörpers 10F8 in charakteristischer Hufeisenform. Dokumentation mit dem 20er Objektiv des Zeiss Axioverts. ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht. A1: Antikörper 10F8; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μm

In der Vergrößerung lassen sich die bogenförmigen Signale in der OPL noch deutlicher erkennen. In den anderen Schichten der Retina ist kein Signal auszumachen.

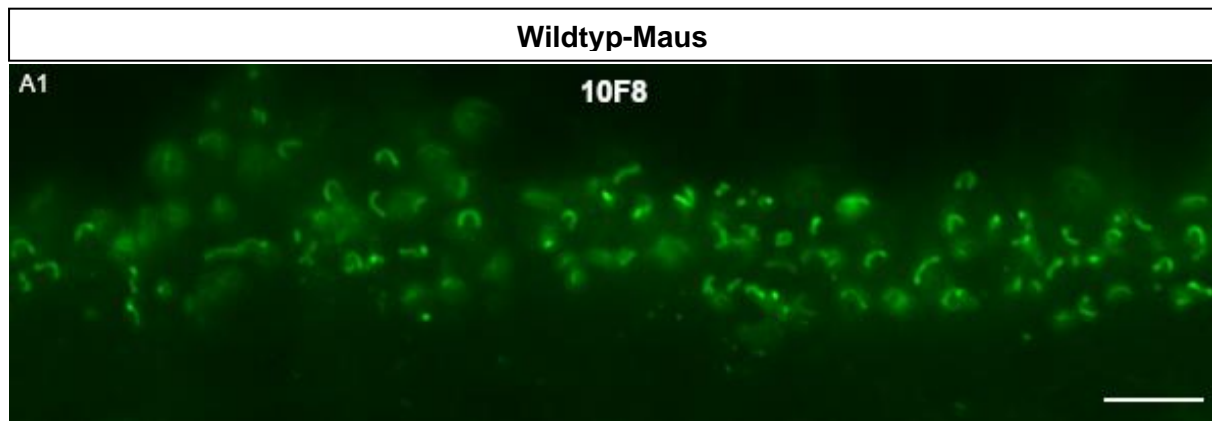


Abbildung 12 Vergrößerung der Signale von 10F8 in der OPL

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit dem Antikörper 10F8. In der OPL ist ein charakteristisches hufeisenförmiges Signal des Antikörpers 10F8 problemlos auszumachen. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. A1: Antikörper 10F8. Maßbalken: 5 μm

Um sicher zu stellen, dass die Ergebnisse auch in anderen Gewebeproben zu validieren sind, wurde der Versuch unter Verwendung von Rinderretina wiederholt. Die Rinderretina wurde dabei identisch inkubiert wie zuvor die Retina der Maus, daher wurde auch hier die Verdünnung des primären Antikörpers von 1:10 beibehalten. Hierbei zeigte sich eine identische Verteilung des Expressionsmuster wie bei der Maus.

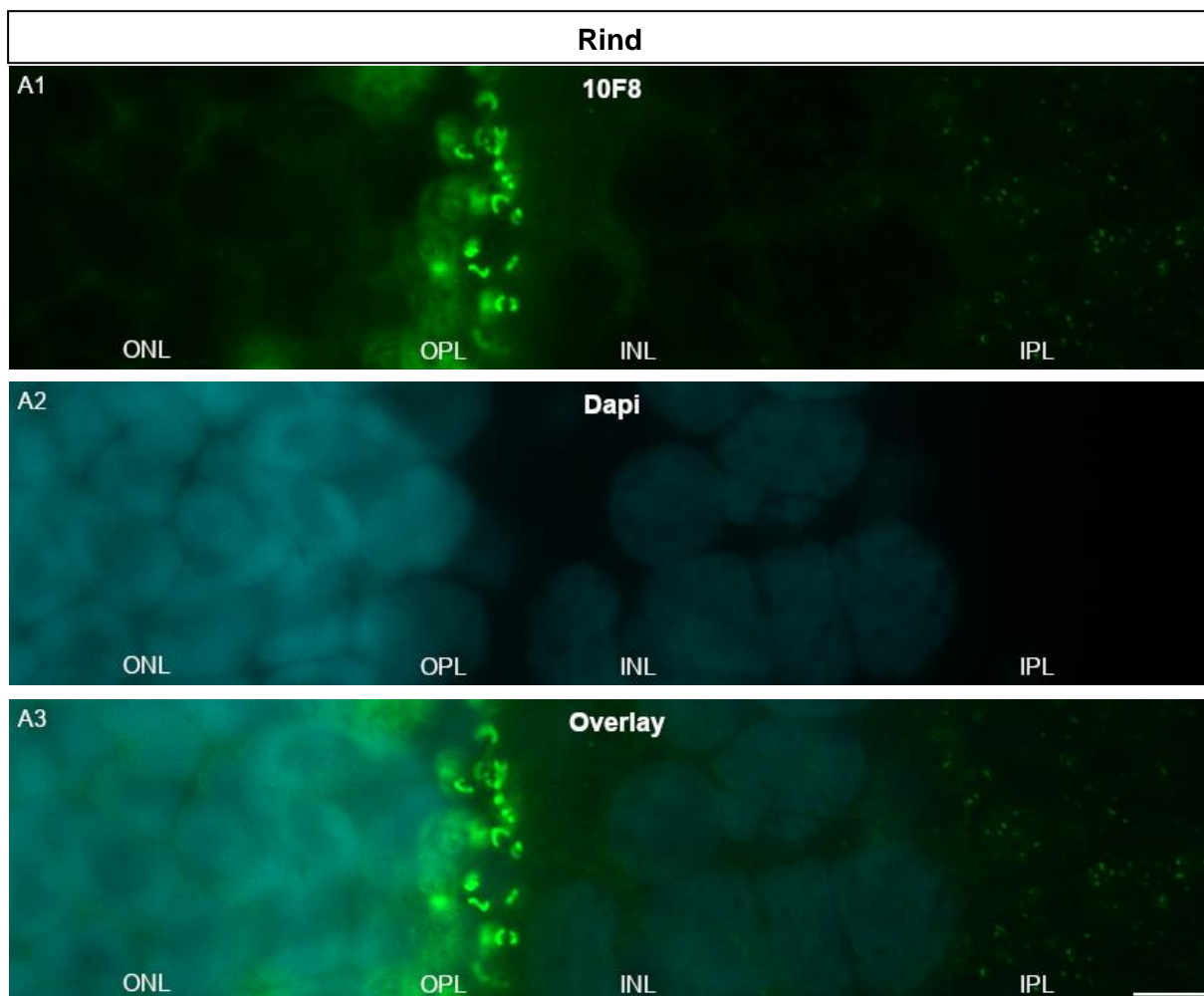


Abbildung 13 Signalverteilung von 10F8 in der Rinderretina

Es wurden Kryoschnitte der Rinderretina immunmarkiert mit dem Antikörper 10F8, zusätzlich wurde Dapi eingesetzt. In der OPL zeigt sich ein deutliches Signal des Antikörpers 10F8 in charakteristischer Hufeisenform. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; IPL: innere plexiforme Schicht. A1: Antikörper 10F8; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

Schließlich wurde das Experiment zu Vergleichszwecken auch an Gewebeschnitten der Retina von Ribeye-Knockout-Mäusen durchgeführt. Mittels gentechnischer Veränderungen wird bei diesen Mäusen Ribeye nicht mehr exprimiert, daher wird kein Ribbon ausgebildet, während alle anderen präsynaptischen Strukturen unverändert erscheinen (Maxeiner *et al.*, 2016). Bei gleicher Expositionszeit wie im Kontrollversuch mit einer Wildtyp-Maus zeigte sich im Knockout kein Signal mehr in der äußeren oder inneren plexiformen Schicht, die anderen Schichten blieben wie zuvor ohne Signal. Außer ein wenig Hintergrund sind im Gewebe keine Signale auszumachen. Da bei Verwendung dieser Mäuse kein Signal mehr durch 10F8 zu erkennen ist, lässt sich daraus schließen, dass 10F8 ausschließlich Ribeye detektiert und es sich nicht um unspezifische Signale handelt.

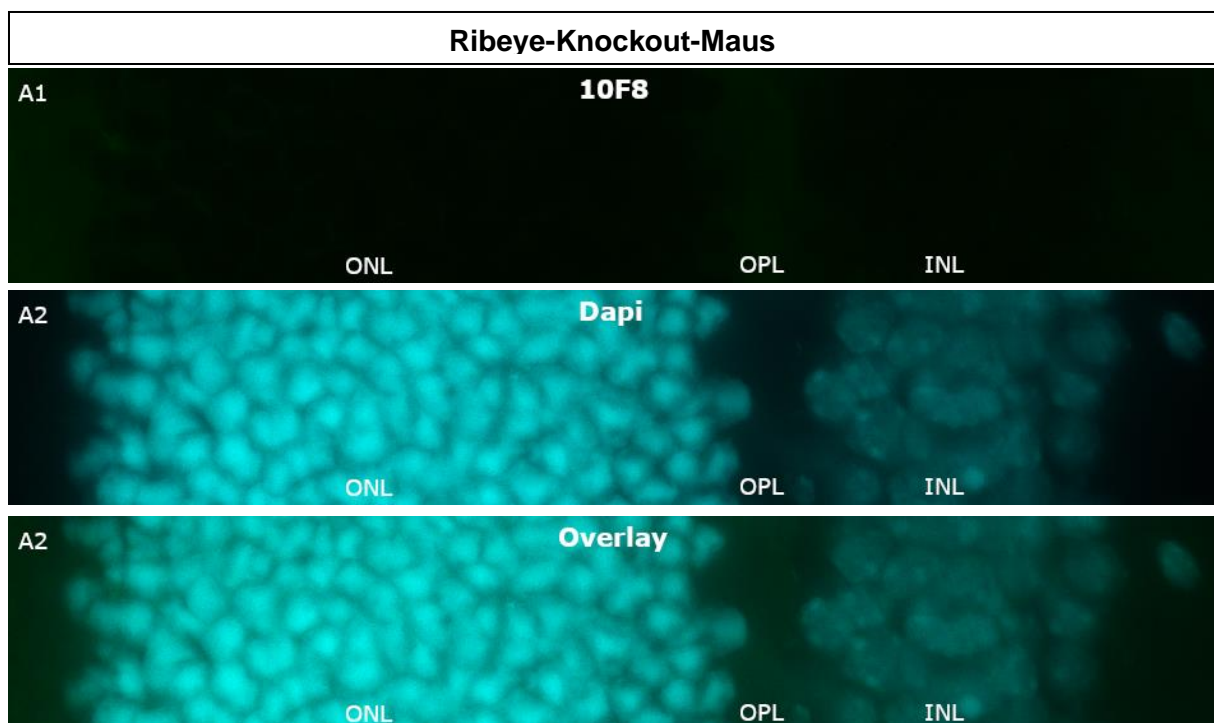


Abbildung 14 Knockout-Kontrolle von 10F8 in der Retina

Es wurden Kryoschnitte der Ribeye-Knockout-Maus immunmarkiert mit dem Antikörper 10F8. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. In der OPL und IPL sind keine Signale durch den Antikörper zu erkennen, es ist jedoch Hintergrund vorhanden. Dokumentation mit dem 40er Objektiv des Zeiss Axioverts. INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 10F8; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μ m

3.1.2 Der Antikörper 10F8 in der Doppelfluoreszenz

Um die Lokalisation von 10F8 innerhalb der Netzhaut noch genauer bestimmen zu können, wurden weitere Experimente mit anderen bereits bekannten primären Antikörpern in einer Doppelfluoreszenz durchgeführt. Somit kann die Detektion von 10F8 jeweils in Verbindung zu den Signalen der anderen verwendeten Antikörper gesetzt werden. Hierfür wurden als weitere primäre Antikörper Synaptotagmin 1 (V216), Ribeye (U2656), Cav1.4 C-Term und PSD-95 eingesetzt und im Folgenden ausführlicher beschrieben.

3.1.2.1 Doppelimmunfluoreszenzmarkierung mit 10F8 und Anti-Synaptotagmin

Bei Anti-Synaptotagmin 1 (V216) handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper gegen Synaptotagmin 1, welches sich in der Membran synaptischer Vesikel befindet und dort als Calciumsensor fungiert. Dabei erfolgt die Bindung bei entsprechender Calciumkonzentration an den SNARE-Komplex, aber ebenso an Lipide der Plasmamembran. Durch diese Bindung wird die Exozytose der synaptischen Vesikel eingeleitet (Shin, 2014). Insbesondere für die schnelle synchrone Transmitterfreisetzung ist Synaptotagmin 1 ein entscheidender Faktor (Fernández-Chacón *et al.*, 2001). Außerdem spielt Synaptotagmin 1 für die clathrinabhängige Endozytose eine wichtige Rolle, indem es an AP2 und Stonin bindet (Zhang *et al.*, 1994; Haucke, 2000; Yao *et al.*, 2012).

Bei der Doppelimmunfluoreszenz von 10F8 und V216 wurde V216 in der Verdünnung 1:250 benutzt. Es zeigte sich eine Anreicherung der beiden Proteine in der äußeren und inneren plexiformen Schicht bereits in einer geringen Vergrößerung. Da Synaptotagmin 1 sich in der Membran der Vesikel befindet, kann die Position der Vesikel so sichtbar gemacht werden und die Korrelation von 10F8 zu diesen Vesikeln dargestellt werden. Dabei ist zu erkennen, dass V216 sich nicht nur in unmittelbarer Nachbarschaft zu den durch 10F8 markierten Ribbons befindet, sondern in den gesamten plexiformen Schichten vorhanden ist.

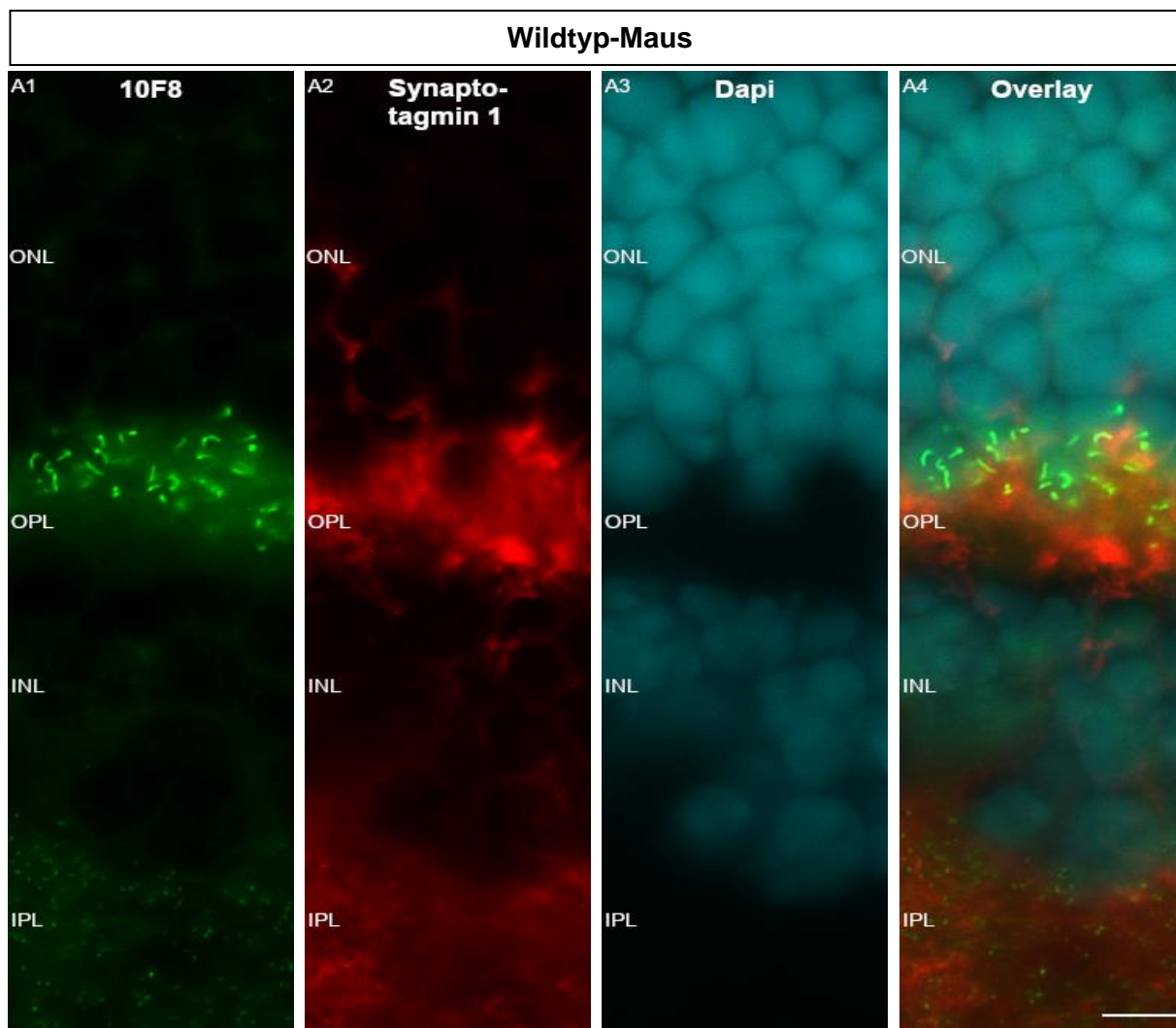


Abbildung 15 Expressionsmuster 10F8 und Synaptotagmin 1

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 10F8 und Synaptotagmin 1 (V216). Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Beide Antikörper zeigen deutliche Signale sowohl in der äußeren plexiformen Schicht als auch in der inneren plexiformen Schicht. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 10F8; A2: Synaptotagmin 1; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

3.1.2.2 Doppelimmunmarkierung mit 10F8 und Anti-Ribeye (U2656)

U2656 richtet sich gegen die Ribeye-B-Domäne und wurde aus Kaninchen-Antiserum gewonnen. Ribeye besteht auf einer A-Domäne, die einzigartig für das Protein ist und einer B-Domäne, die mit CtBP2 nahezu identisch ist. Die detaillierte Beschreibung zu Ribeye ist in Kapitel 1.2.3.1 zu finden. Da Ribeye die Hauptkomponente synaptischer Ribbons ist (Schmitz *et al.*, 2000), lassen sich diese Ribbons somit gut nachweisen und ihre Beziehung zum untersuchten Antikörper 10F8 darstellen.

Für die Immunfluoreszenzversuche wurde der Ribeye-Antikörper U2656 im Verhältnis 1:500 eingesetzt. Zusätzlich wurde Dapi verwendet, um die Kerne der äußeren und inneren

Zellkernschicht anzufärben, sodass die Lokalisation eindeutig zu bestimmen ist. Schon in geringer Vergrößerung wurde die identische Signalverteilung in OPL und IPL von 10F8 und U2656 deutlich. Typischerweise zeigen sich in der OPL kräftige bogenförmige Signale, wohingegen das Signal in der IPL punktförmig ist.

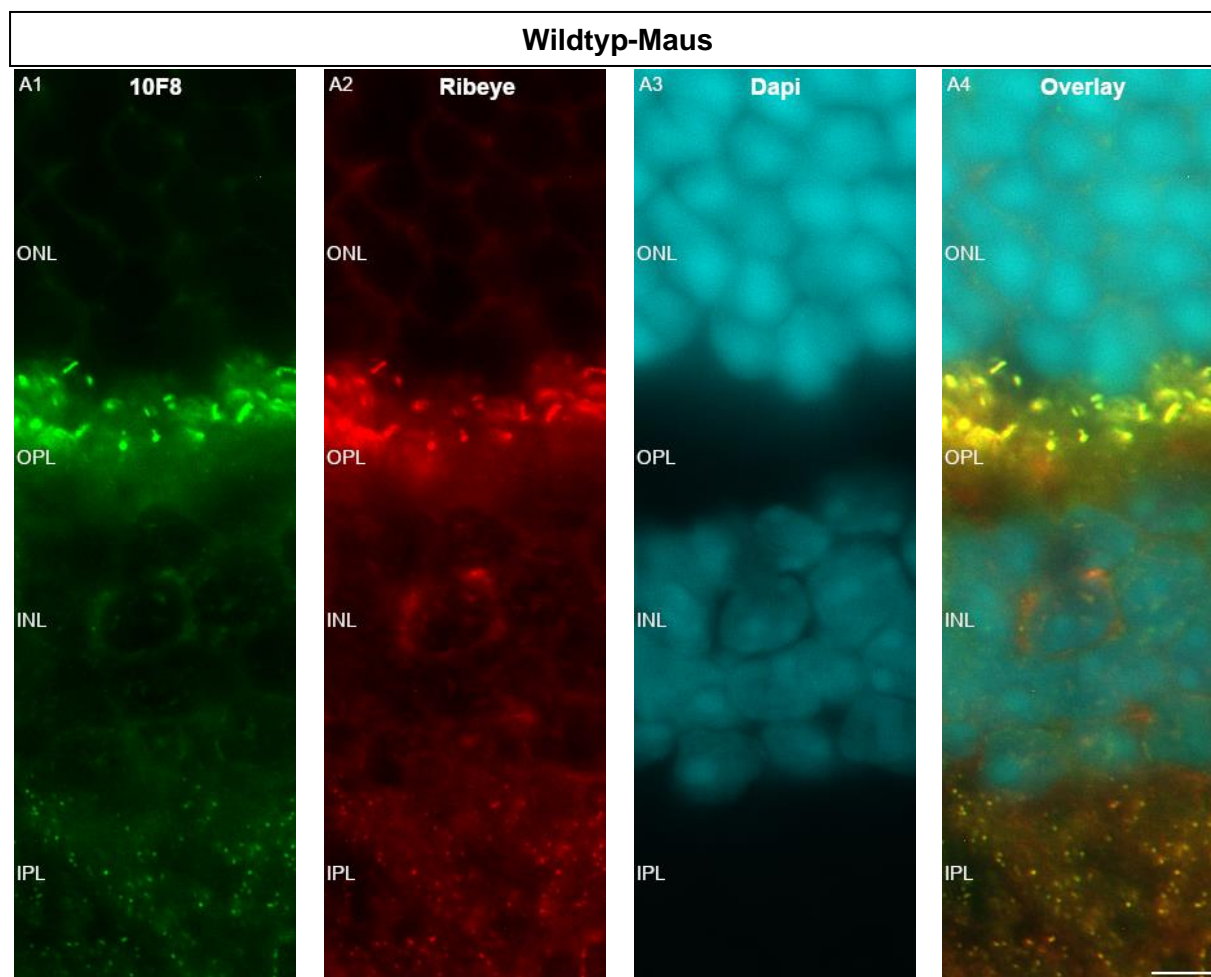


Abbildung 16 Expressionsmuster 10F8 und Ribeye (U2656)

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 10F8 und Ribeye (U2656). Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Beide Antikörper zeigen identische Signale sowohl in beiden plexiformen Schichten. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 10F8; A2: Ribeye; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 5 μm

In der weiteren Vergrößerung lassen sich die hufeisenförmigen Strukturen in beiden Kanälen noch besser erkennen. Diese Form ist typisch für Ribeye und zeigte sich auch bei 10F8. Die übereinstimmende Signalverteilung durch beide Antikörper spricht auch weiterhin dafür, dass auch 10F8 eine Ribeye-Untereinheit detektiert. Das Präparat wurde im Anschluss zusätzlich im konfokalen Mikroskop untersucht und entsprechend dokumentiert, um etwaiges Hintergrundrauschen noch weiter zu reduzieren.

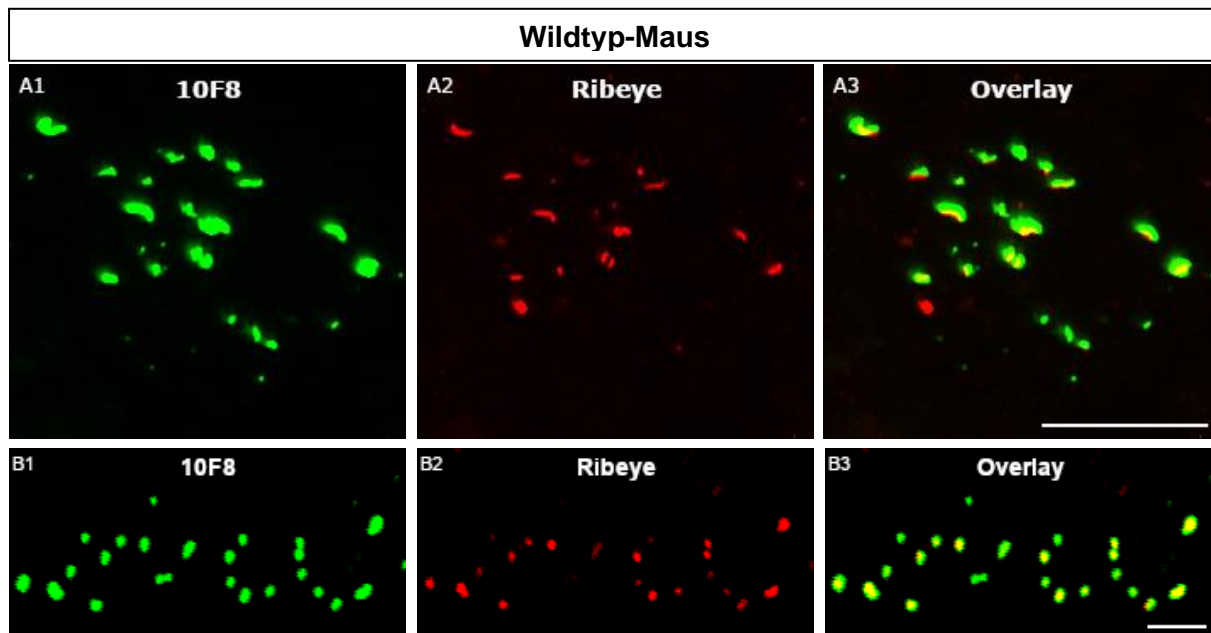


Abbildung 17 Ausschnittsvergrößerung der Detektion von 10F8 und Ribeye (U2656) im Semidünnschnitt der Retina

Es wurden 0,5 μm dicke Schnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 10F8 und Ribeye (U2656). Zusätzlich wurde Dapi eingesetzt. Die Abbildung ist eine Detailvergrößerung der OPL der Mäuseretina, in dieser finden sich hufeisenförmige Strukturen in beiden Kanälen. Dokumentiert mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. A1: Antikörper 10F8; A2: Ribeye; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μm

B1-B3: Dokumentiert mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop A1R von Zeiss. B1: Antikörper 10F8; B2: Ribeye; B3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μm

3.1.2.3 Doppelimmunmarkierung mit 10F8 und Anti-Cav1.4

Der polyklonale Antikörper Cav1.4 richtet sich gegen spannungsgesteuerte Calciumkanäle (Cav1.4), die sich in den Membranen der meisten erregbaren Zellen befinden. Dabei richtet sich dieser spezifische Antikörper gegen die carboxyterminale Peptidregion der Calciumkanäle (Dembla *et al.*, 2020). In Photorezeptorsynapsen ist Cav1.4 in der aktiven Zone an der Basis des Ribbons angereichert (Grabner *et al.*, 2015; Lagnado und Schmitz, 2015; Moser *et al.*, 2020). Damit ist Cav1.4 ein guter Marker für die aktive Zone der Ribbonsynapsen und zeigt den Bezug des untersuchten Antikörpers 10F8 zur aktiven Zone. In den Experimenten wurde Cav1.4 C-Term in der Verdünnung 1:500 verwendet.

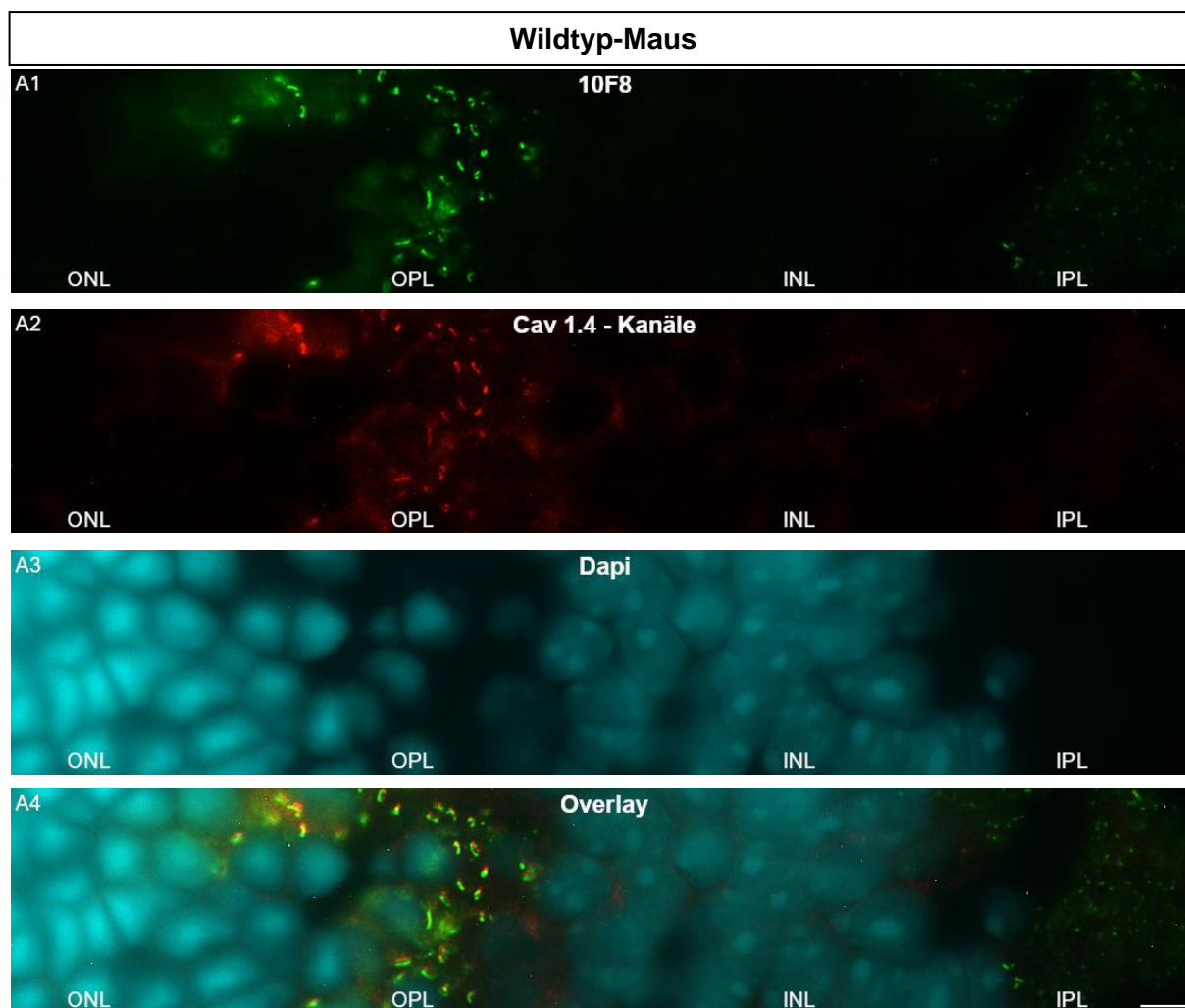


Abbildung 18 Übersicht der Signalverteilung von 10F8 und Cav1.4 in der Retina

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 10F8 und Anti-Cav1.4 C-Term. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Für Cav1.4 zeigen sich ausschließlich Signale in der OPL, die sich in direkter Nachbarschaft zu den Signalen von 10F8 befinden. In der IPL sind hingegen nur punktförmige Signale von 10F8 auszumachen. Dokumentiert mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 10F8; A2: Cav1.4; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

Bei einer Vergrößerung eines Ausschnitts aus der OPL der Retina sind beide Signale deutlich zu erkennen. Dabei wird sichtbar, dass die Signale eher parallel nebeneinander liegen, anstatt sich komplett zu überlappen. Dieses Ergebnis passt zu der Annahme, dass es sich bei 10F8 um einen Ribeye-Antikörper handelt, da die spannungsgesteuerten Calciumkanäle sich am unteren Rand der Ribbons befinden.

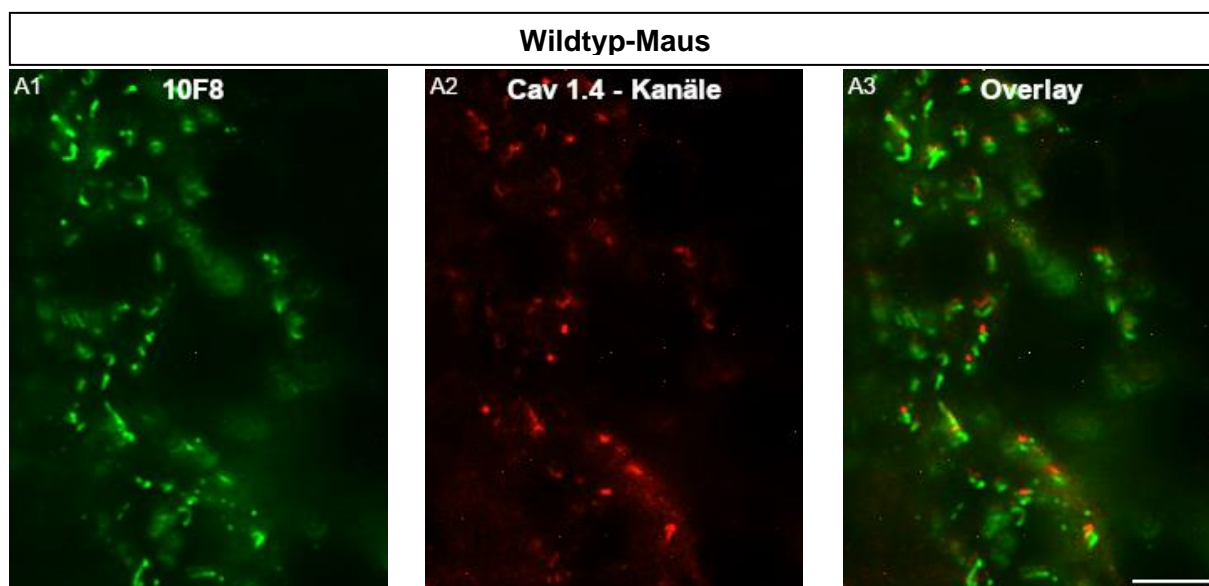


Abbildung 19 Ausschnittsvergrößerung Signalverteilung 10F8 und Cav1.4 in der OPL

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 10F8 und Cav1.4 C-Term. Zusätzlich wurde Dapi eingesetzt. Die Vergrößerung der OPL zeigt, dass die Signale benachbart sind, aber eher parallel zueinander liegen, anstatt sich vollständig zu überlappen. Dokumentiert mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. A1: Antikörper 10F8; A2: Cav1.4; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 5 µm

3.1.2.4 Doppelimmunmarkierung mit 10F8 und Anti-PSD-95

Die postsynaptische Density ist ein netzartiger Verbund von Proteinen, die miteinander agieren und so die Signalübertragung und normale Funktion der Synapse aufrechterhalten. Dies geschieht, indem sie synaptische Rezeptoren, Ionenkanäle, Strukturproteine und Signalmoleküle organisieren und stabilisieren (Chen et al., 2005; DeGiorgis et al., 2006; Feng und Zhang, 2009). Eines dieser Proteine im Verbund der postsynaptische Density ist das postsynaptische Density-Protein 95 (PSD-95). Es ist ein Hauptelement von chemischen Synapsen und interagiert mit Glutamatrezeptoren, Zelladhäsions-Molekülen und Elementen des Zytoskeletts. Dadurch reguliert es die strukturelle Organisation der postsynaptischen Density und somit auch die Entwicklung und Plastizität der Synapse (Kornau et al., 1993; Irie et al., 1997; Kim et al., 1997; Sheng und Kim, 2011)

Durch einen Antikörper gegen PSD-95 werden insbesondere die axonalen Terminalen der Zapfen und Stäbchen stark markiert. Im Elektronenmikroskop konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass PSD-95 bei Photorezeptoren präsynaptisch liegt. (Koulen *et al.*, 1998)

In den Doppelfluoreszenzexperimenten wurde PSD-95 in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt, als sekundärer Antikörper wurde Donkey anti-Rabbit Alexa568 verwendet.

Als Übersichtsaufnahme wurde eine Aufnahme mit dem 20er-Objektiv gewählt, da schon in dieser geringen Vergrößerung Signale in der Retina zu erkennen sind. Kräftige Signale von 10F8 befinden sich hierbei vor allem in der äußeren plexiformen Schicht, jedoch sind auch in

der inneren plexiformen Schicht deutliche Signale sichtbar. PSD-95 konnte in dieser Vergrößerung vor allem in der äußeren plexiformen Schicht detektiert werden, wirkt aber insgesamt vor allem in der IPL deutlich schwächer als 10F8.

Erst in der Vergrößerung lässt sich für PSD-95 das ringartige Expressionsmuster dann gut erkennen, während bei 10F8 das typische hufeisenförmiges Muster gut auszumachen ist.

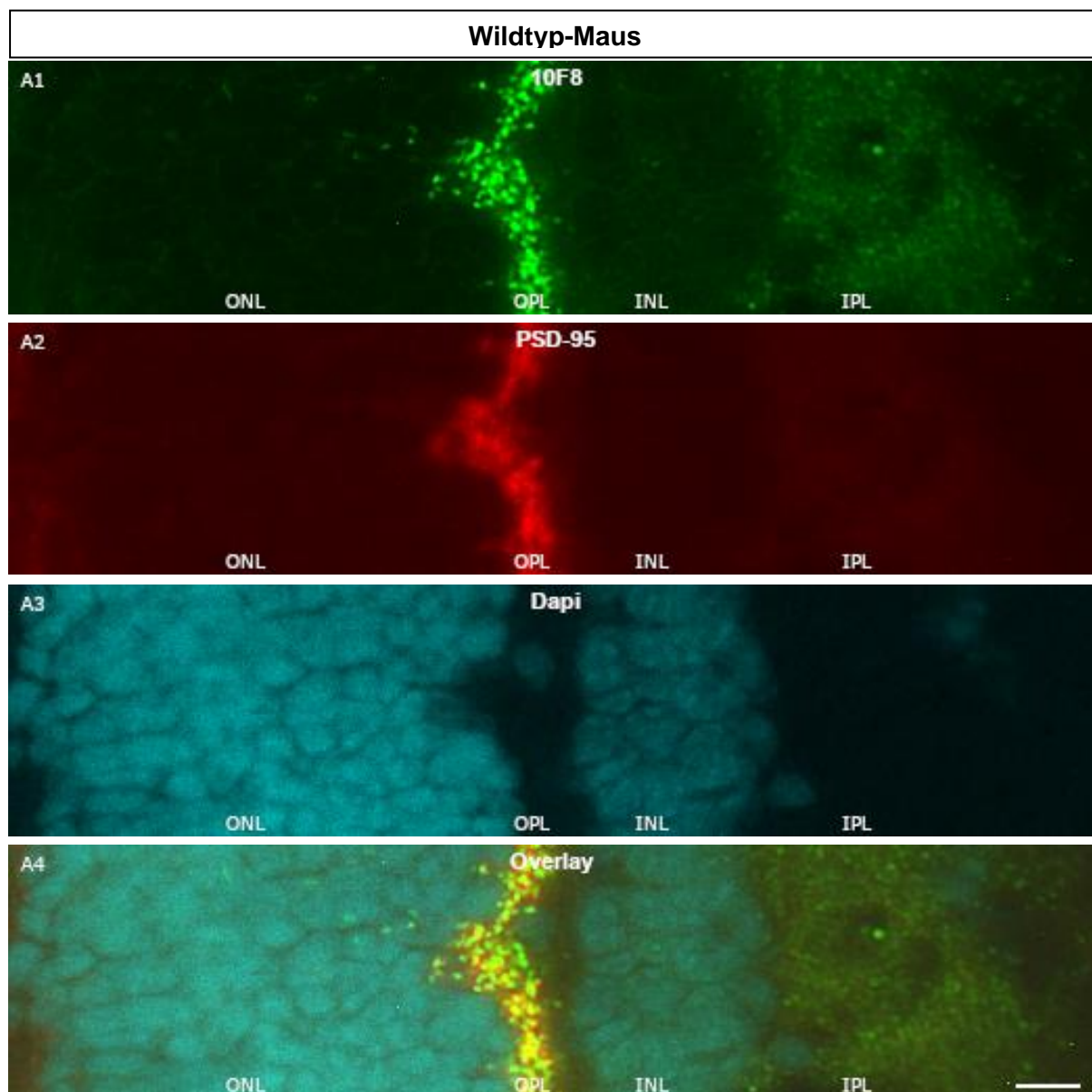
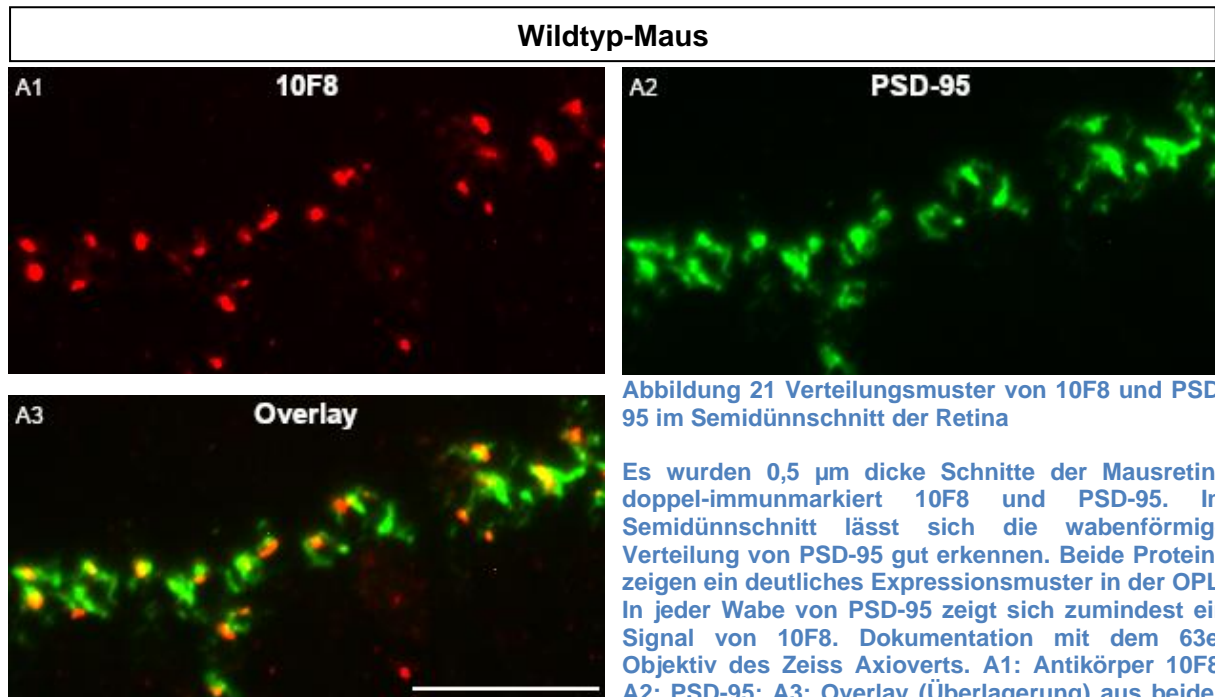


Abbildung 20 Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters für 10F9 und Anti-PSD-95

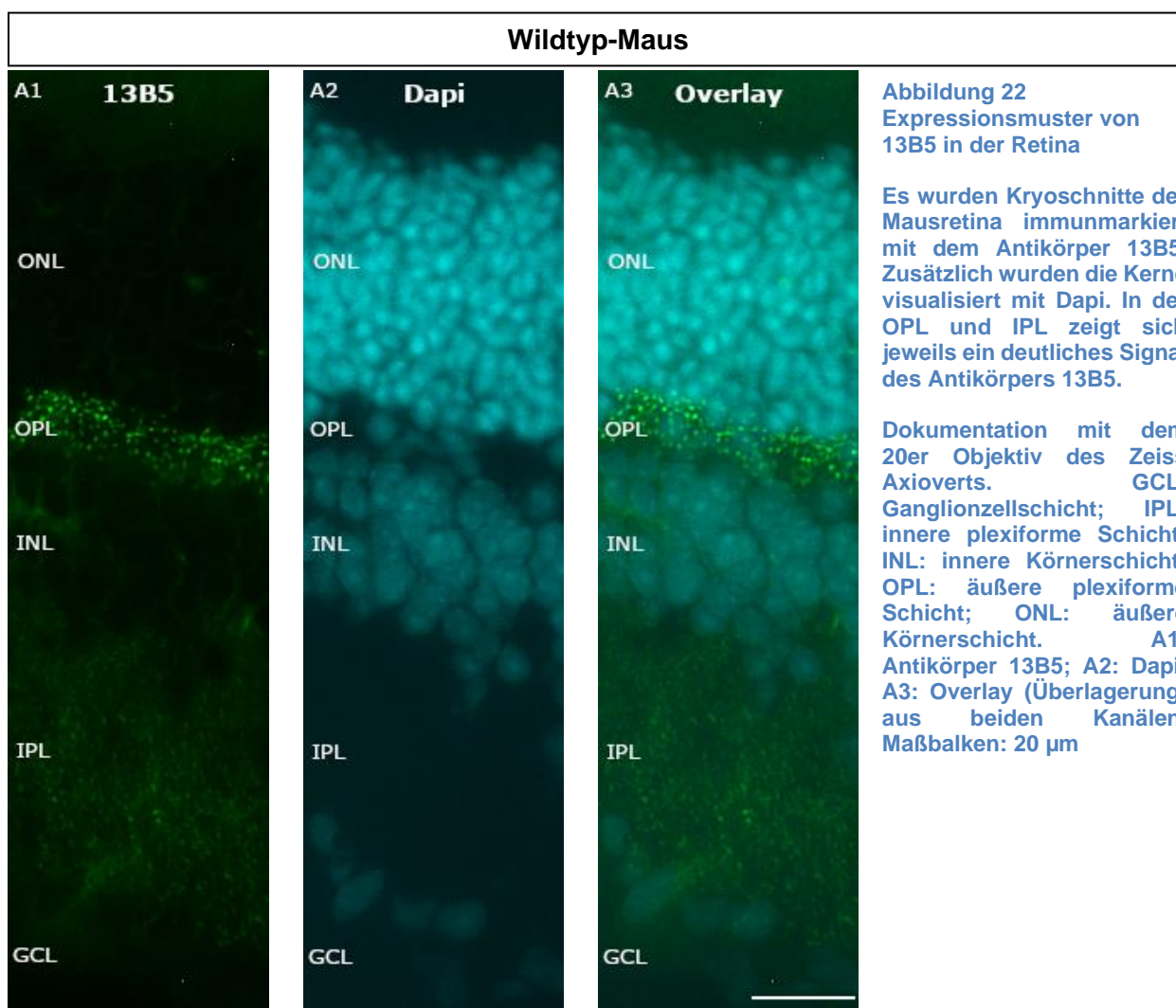
Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 10F8 und Anti-PSD-95. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Beide Proteine finden sich in der äußeren plexiformen Schicht angereichert, 10F8 ist zudem noch in der IPL deutlich zu erkennen. Dokumentation mit dem 20er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 10F8; A2: PSD-95; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 10 µm

Der Versuch wurde zusätzlich auch mit 0,5 µm dicken Semidünnschnitten wiederholt, wobei das Signal für 10F8 sich nicht verändert, das ringförmige Muster von PSD-95 jedoch noch deutlicher zu erkennen ist. Das gleiche Präparat wurde schließlich auch im konfokalen Zwei-Photonen-Mikroskop A1R von Zeiss dokumentiert, um die Beziehung der beiden Proteine zueinander besonders deutlich darstellen zu können. In A1-A3 ist die OPL der Retina abgebildet, in jedem von PSD-95 gebildeten Ring lässt sich ein einzelnes Ribbon-Signal durch 10F8 erkennen.



3.1.3 Der Antikörper 13B5 in der Einzelfluoreszenz

Zunächst wurde das Verteilungsmuster in der Retina von 13B5 in Einzelfluoreszenzexperimenten untersucht wie auch schon bei 10F8. Hierzu wurden die verschiedenen Schnitte mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert, außerdem wurde zur besseren Übersicht Dapi eingesetzt. Es zeigte sich eine starke Anreicherung des Antikörpers in der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Retina bereits in einer niedrigen Vergrößerung des Präparates. In anderen Schichten ist kein ähnlich starkes Signal auszumachen.



In der Vergrößerung des Präparates lassen sich insbesondere mit dem 63er-Objektiv schließlich deutliche hufeisenförmige Signale in der äußeren plexiformen Schicht erkennen. Das Expressionsmuster in der IPL bleibt punktförmig.

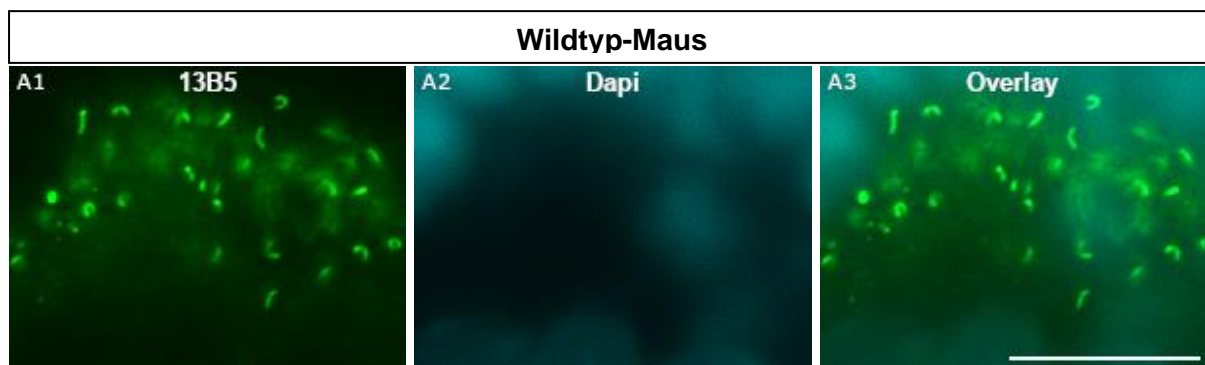


Abbildung 23 Vergrößerung der Expression von 13B5 in der OPL der Retina

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina immunmarkiert mit dem Antikörper 13B5, zusätzlich wurde Dapi eingesetzt. Abgebildet ist ausschließlich die OPL, in der sich die charakteristischen Signale in Hufeisenform zeigen. A1-A3: Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. OPL: äußere plexiforme Schicht. A1: Antikörper 13B5; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 µm

Das Experiment wurde unter gleichen Bedingungen auch an Rinderretina wiederholt, um einen Zufallsbefund bei der Maus auszuschließen. Das Expressionsmuster ist beim Rind identisch zu den vorherigen Ergebnissen an Mäusen.

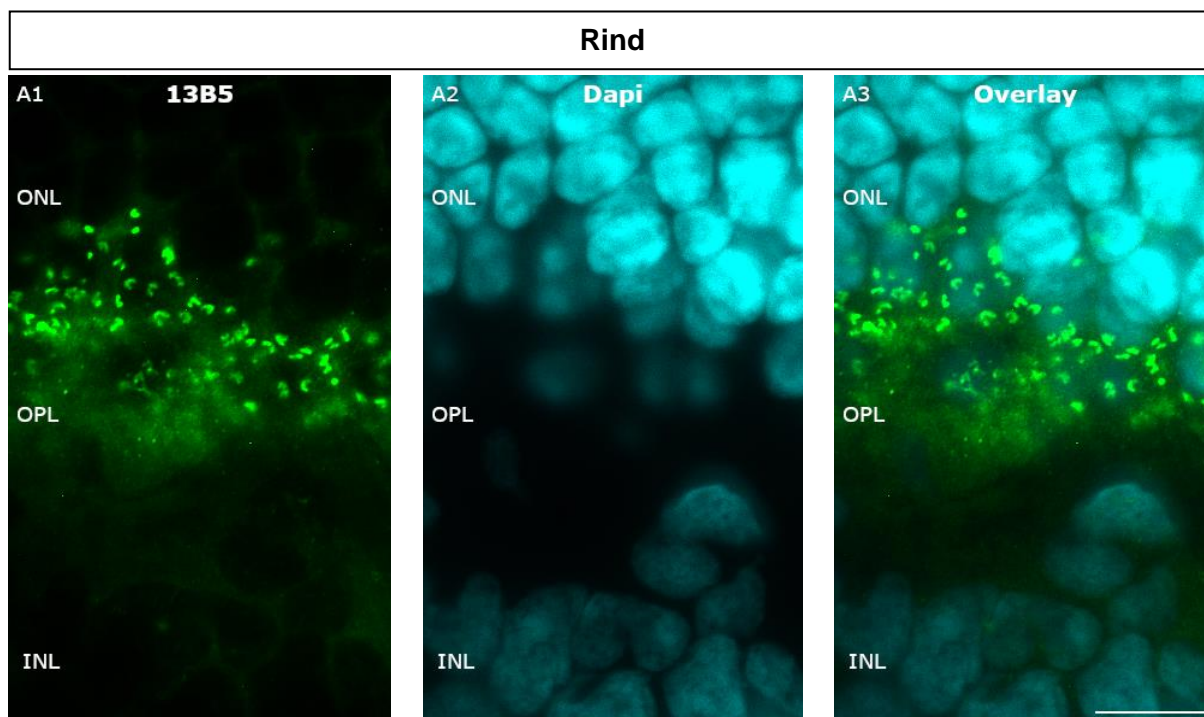


Abbildung 24 Signalverteilung von 13B5 in der Rinderretina

Es wurden Kryoschnitte der Rinderretina immunmarkiert mit dem Antikörper 13B5, zusätzlich wurde Dapi eingesetzt. In der OPL zeigt sich ein deutliches Signal des Antikörpers 13B5 in charakteristischer Hufeisenform. Dokumentation mit dem 40er Objektiv des Zeiss Axioverts. ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht. A1: Antikörper 13B5; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 µm

Zum Vergleich wurde das identische Experiment auch an Gewebeschnitten aus Ribeye-Knockout-Mäusen durchgeführt. Die Besonderheit dieser Mäuse liegt darin, dass Ribeye nicht mehr exprimiert wird über eine Ausschaltung des entsprechenden Ribeye-Gens. Durch die Abwesenheit von Ribeye wird kein Ribbon mehr gebildet, die anderen präsynaptischen Strukturen scheinen davon jedoch nicht betroffen zu sein. (Maxeiner *et al.*, 2016). Bei gleicher Expositionszeit zeigte sich kein Signal mehr in der äußeren oder inneren plexiformen Schicht, die anderen Schichten zeigen wie zuvor kein Signal. Mit diesem Ergebnis kann ein unspezifisches Signal ausgeschlossen werden und im nächsten Schritt dieses Signal daher weiter untersucht werden.

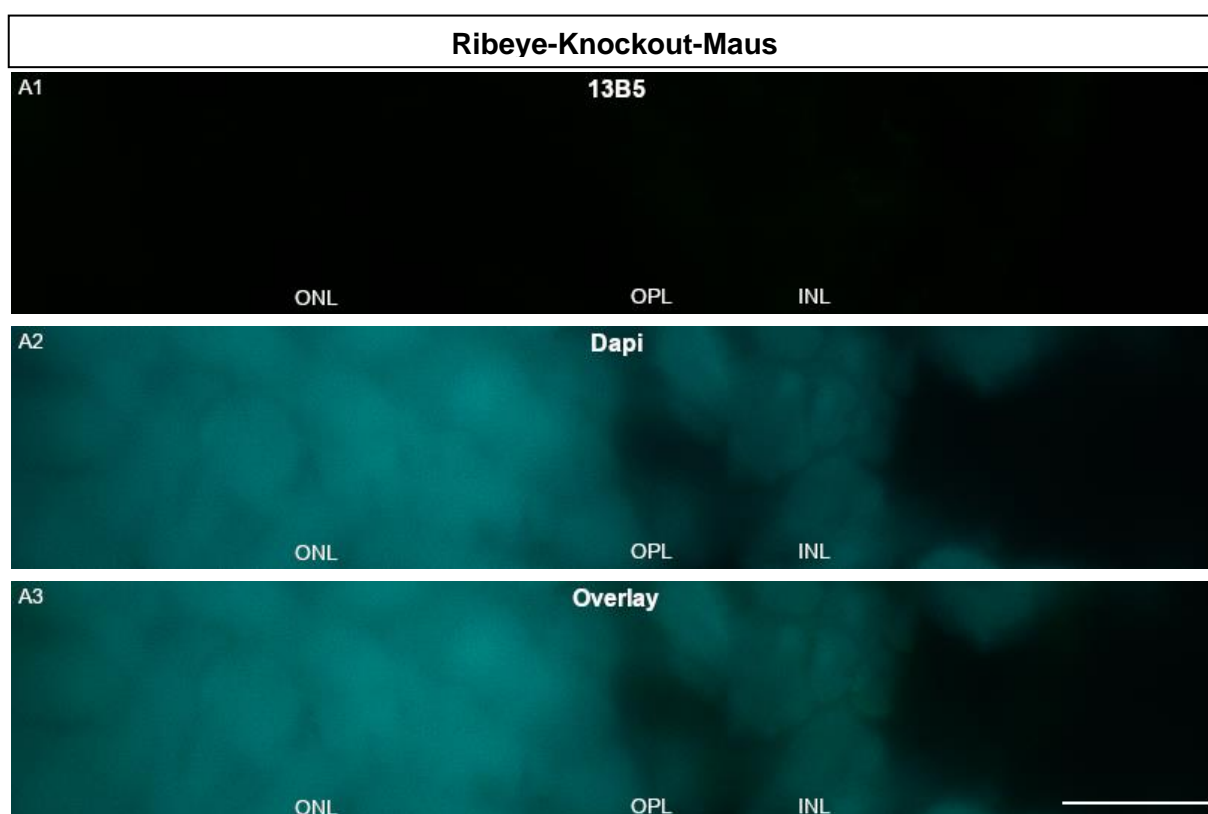


Abbildung 25 Knockout-Kontrolle von 13B5 in der Retina

Es wurden Kryoschnitte der Ribeye-Knockout-Maus immunmarkiert mit dem Antikörper 13B5. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. In keiner der Schichten sind Signale durch den Antikörper zu erkennen. Dokumentation mit dem 40er Objektiv des Zeiss Axioverts. INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 13B5; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μm

3.1.4 Der Antikörper 13B5 in der Doppelimmunfluoreszenz

Nach den Experimenten mit Einzelfluoreszenzen wurden mehrere Doppelfluoreszenz-Experimente mit verschiedenen weiteren primären Antikörpern zusätzlich zu 13B5 durchgeführt. Dadurch konnte die Signalposition des experimentellen Antikörpers 13B5 in Relation zu den bereits dokumentierten Antikörpern gesetzt werden, sodass weitere Aussagen zur genauen Position von 13B5 möglich sind. Als weitere primäre Antikörper wurden neben 13B5 noch Synaptotagmin 1 (V216), Ribeye (U2656), Cav1.4 C-Term und PSD-95 eingesetzt. Außerdem wurde Dapi benutzt, um die Kerne anzufärben.

3.1.4.1 Doppelimmunfluoreszenzmarkierung mit 13B5 und Anti-Synaptotagmin

Der Antikörper V216 richtet sich gegen Synaptotagmin 1 in der Membran von Vesikeln. Das synaptische Vesikelprotein mit zwei C2-Domänen bindet Calcium und ist somit ein wichtiger Calciumsensor für die schnelle Transmitterfreisetzung (Geppert et al., 1994; Fernández-Chacón et al., 2001; Xu, Mashimo und Südhof, 2007). Die Synaptotagminfamilie besteht aus 15 Mitgliedern, wobei Synaptotagmin 1 bei Synapsen in Vesikeln lokalisiert ist. (Chapman et al., 1995; Sugita et al., 2001; Han et al., 2004)

Im hier beschriebenen Experiment wurde V216 in einer Verdünnung von 1:250 benutzt. Die Bestimmung der Doppelfloreszenz mit 13B5 erlaubt durch die bekannte Position von Synaptotagmin 1 eine Beurteilung der Beziehung von 13B5 zu den synaptischen Vesikeln. Es zeigt sich, dass beide Antikörper Signale in den plexiformen Schichten ausbilden. Da durch V216 die Vesikel markiert werden, ist ein zahlreiches Vorkommen nahe der Synapsen typisch.

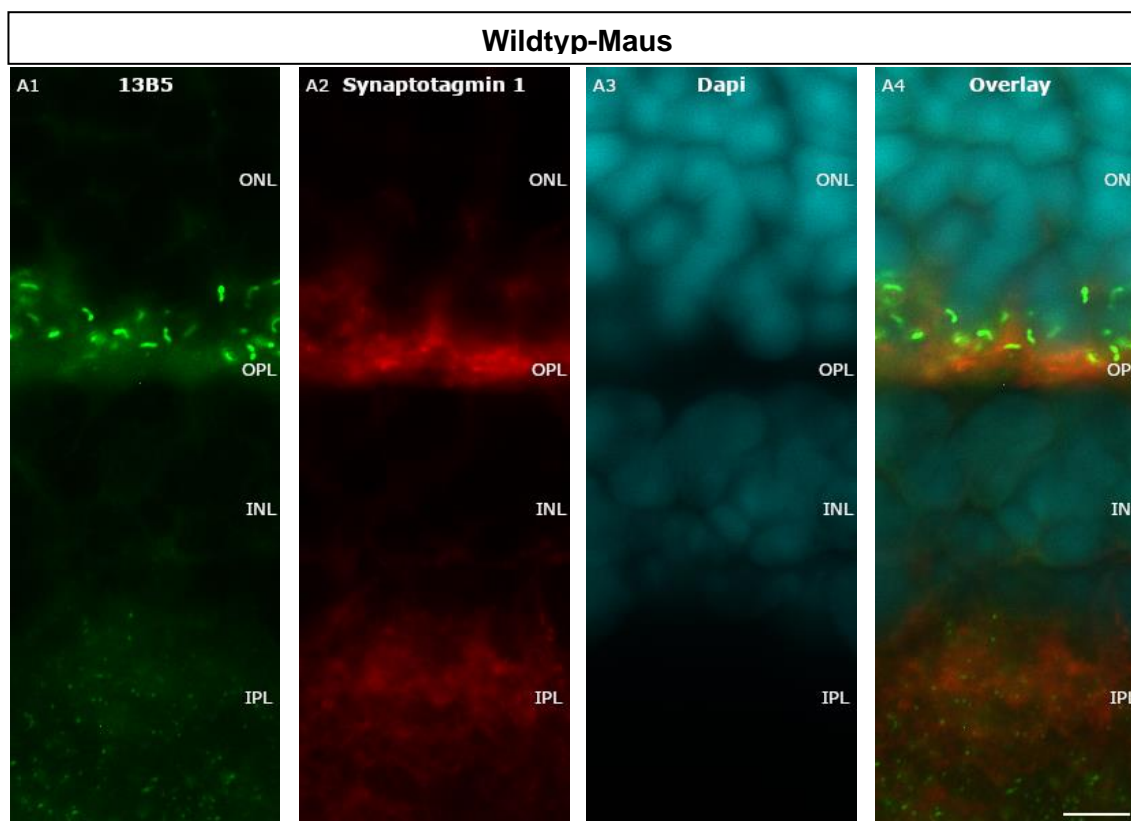


Abbildung 26 Expressionsmuster 13B5 und Anti-Synaptotagmin 1 (V216)

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 13B5 und Synaptotagmin 1 (V216), zusätzlich wurde Dapi eingesetzt. Beide Proteine finden sich in beiden plexiformen Schichten angereichert. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 13B5; A2: V216; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

3.1.4.2 Doppelimmunfluoreszenzmarkierung mit 13B5 und Anti-Ribeye (U2656)

Der polyklonale Antikörper U2656 aus dem Kaninchenserum richtet sich gegen die Ribeye-B-Domäne und wurde von Schmitz, Königstorfer und Südhof (2000) schon vorher beschrieben. Neben einer einzigartigen A-Domäne enthält Ribeye auch eine B-Domäne, die sich bis auf 20 Aminosäuren mit CtBP2 gleicht. Als Hauptbestandteil der synaptischen Ribbons ist Ribeye in allen Wirbeltieren vorhanden und kann in der Mikroskopie als Marker für die synaptischen Ribbons im Vergleich zu 13B5 genutzt werden. In Ribbonsynapsen dienen synaptische Ribbons der schnellen Transmitterfreisetzung, wobei ein Knockout von Ribeye zu einer Reduktion der synaptischen Vesikel direkt am synaptischen Spalt führt (Oesch und Diamond, 2011; Snellman et al., 2011; Maxeiner et al., 2016)

Für die Experimente mit 13B5 wurde U2656 in der Verdünnung 1:500 eingesetzt und entspricht damit der Verdünnung, die auch bei 10F8 verwendet wurde. In der Auswertung der doppel-immunmarkierten Schnitte zeigte sich für beide Antikörper ein gleiches Expressionsmuster. Dies deutet auf eine Ribeye-Komponente von 13B5 hin. In der Vergrößerung bleibt das identische Expressionsmuster erhalten.

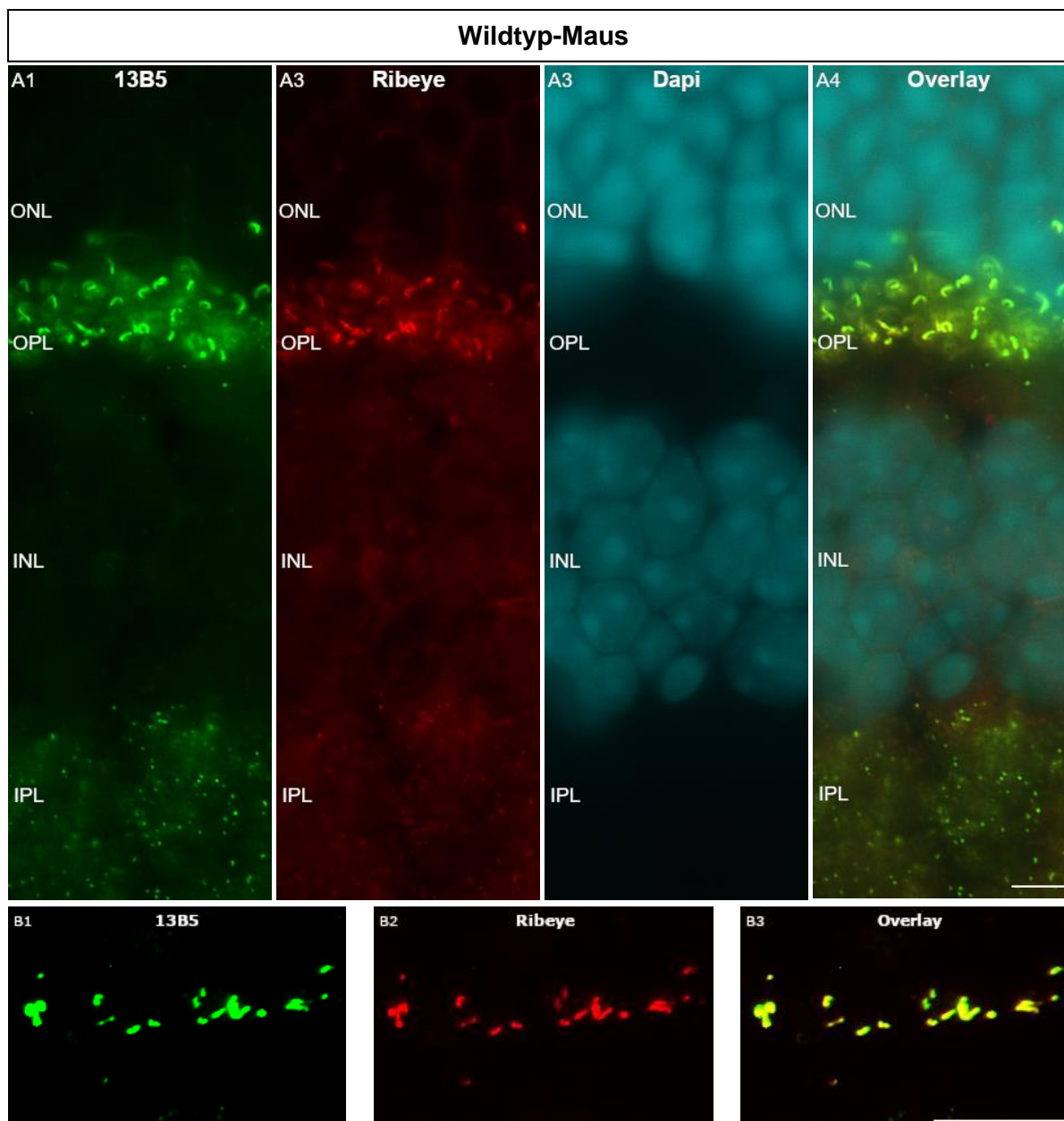


Abbildung 27 Expressionsmuster von 13B5 und Ribeye (U2656)

A1-A4: Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 13B5 und Anti-Ribeye (U2656). Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Beide Proteine finden sich in beiden plexiformen Schichten angereichert. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 13B5; A2: U2656; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

B1-B3: Es wurden 0,5 μ m dicke Semidünnschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 13B5 und U2656. Beide Proteine zeigen ein identisches Verteilungsmuster. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. B1: Antikörper 13B5; B2: U2656; B3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μ m

3.1.4.3 Doppelimmunfluoreszenzmarkierung mit 13B5 und Anti-Cav1.4

Bei dem Antikörper Cav1.4 handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, der sich gegen spannungsgesteuerte Calciumkanäle (Cav1.4) richtet. Diese Art von Kanälen ist wichtig für den Einstrom von Calciumionen in Zellen und somit der Erregung der Zelle. Der hier verwendete Antikörper richtet sich gegen die carboxyterminale Peptidregion dieser Calciumkanäle, spezifischer gegen einen Abschnitt daraus bestehend aus 259 Aminosäuren (Dembla *et al.*, 2020). An der Basis der Ribbons ist Cav1.4 in der aktiven Zone der Photorezeptoren lokalisiert (Grabner *et al.*, 2015; Lagnado und Schmitz, 2015; Moser *et al.*, 2020). Das Signal von Cav1.4 in Immunfluoreszenzen entspricht somit die Position der aktiven Zone der Ribbonsynapsen und ist daher dafür geeignet die Position der aktiven Zone mit der Position der Signale des experimentellen Antikörpers 13B5 zu vergleichen. Dabei wurde Cav1.4 in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

In der Übersichtsaufnahme sind in der äußeren plexiformen Schicht der Retina sowohl Signale von 13B5 als auch Cav1.4 gut zu erkennen. Dabei sind die Signale von 13B5 gewohnt bogenförmig, wohingegen die Signale von Cav1.4 eher punktförmig erscheinen. Während sich bei 13B5 wie zuvor auch punktförmige Signale in der IPL zeigen, beschränkt sich das Signal von Cav1.4 nur auf die OPL.

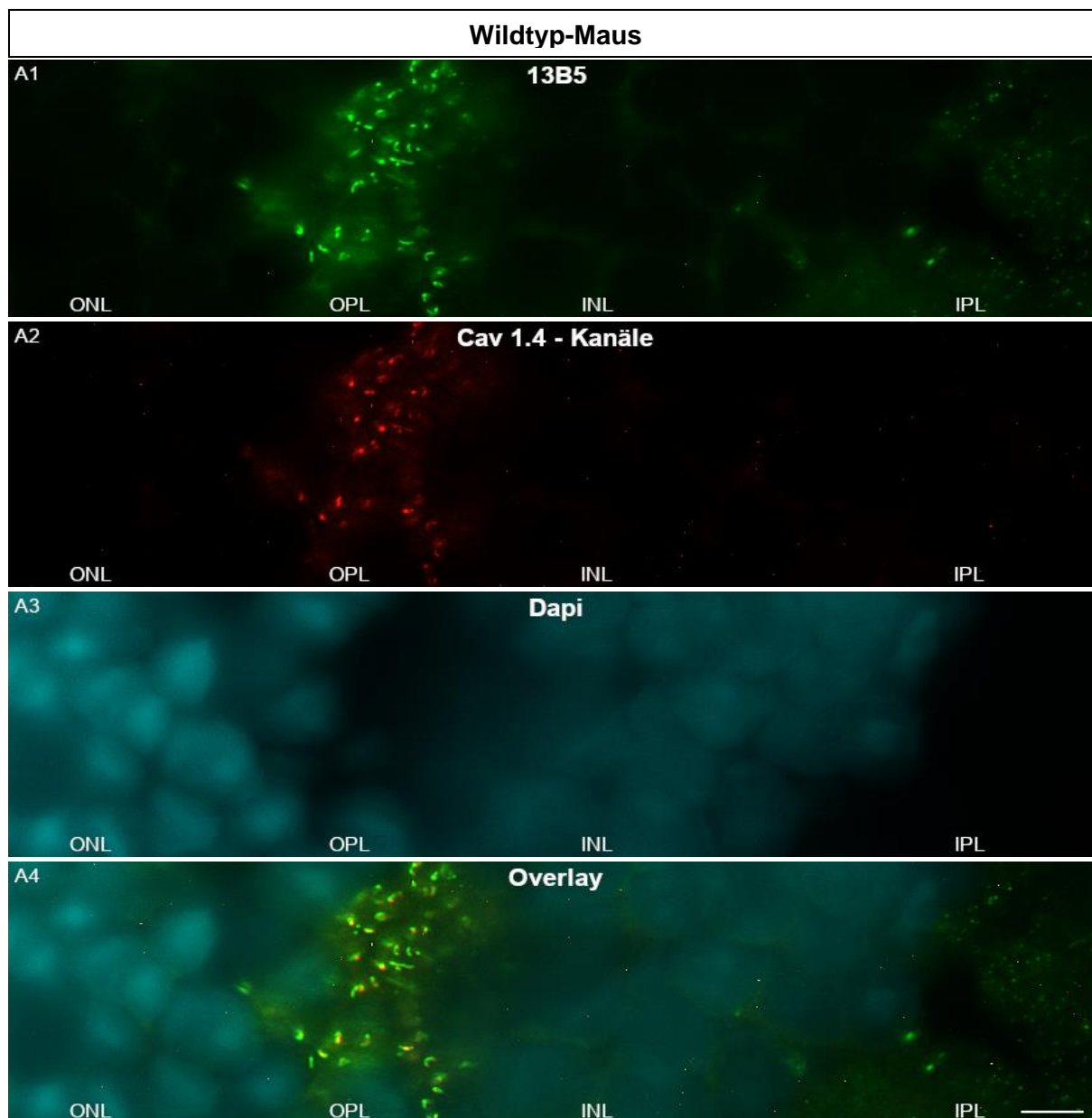


Abbildung 28 Expressionsmuster 13B5 und Cav1.4

Es wurden Kryoschnitte der Mause retina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 13B5 und Cav1.4 C-Term, zusätzlich wurde Dapi eingesetzt. Für beide Antikörper sind deutliche Signale in der OPL auszumachen, für 13B5 zusätzlich noch in der IPL. Die Signale der beiden Antikörper stehen dabei in enger räumlicher Beziehung zueinander. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 13B5; A2: Cav1.4; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

In der Detailaufnahme der äußeren plexiformen Schicht lässt sich die enge räumliche Beziehung der beiden untersuchten Antikörpersignale noch besser beurteilen. So sind die Signale nicht deckungsgleich, sondern liegen nebeneinander in enger Nachbarschaft.

Da sich Ribbons der aktiven Zone anschließen und Cav1.4 ein guter Marker für die aktive Zone ist, lässt sich deswegen weiterhin annehmen, dass es sich bei 13B5 um einen Antikörper gegen Ribeye, der Hauptkomponente der Ribbons, handelt.

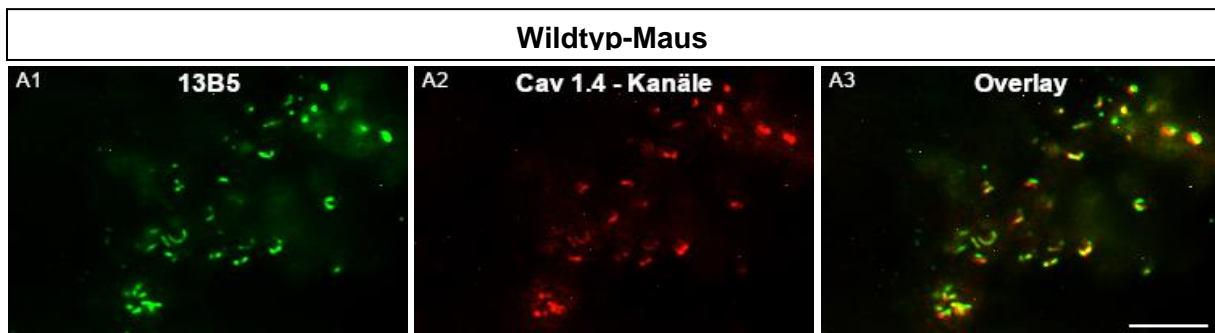


Abbildung 29 Vergrößerung der Signalverteilung von 13B5 und Cav1.4-Kanälen

Es wurden Kryoschnitte der Mause retina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 13B5 und Cav1.4 C-Term. Die Signale von 13B5 und Cav1.4 in der OPL liegen nahezu parallel zueinander, auch wenn sich ein Teil der Signale überlappt. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. A1: Antikörper 13B5; A2: Cav1.4 C-Term; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 5 µm

3.1.4.4 Doppelimmunfluoreszenzmarkierung mit 13B5 und Anti-PSD-95

Das „postsynaptic density protein 95“ (PSD-95) zeigt ein wabenartiges Muster und ist als wichtige Komponente von chemischen Synapsen unter anderem für die synaptische Plastizität und die Heranreifung von Synapsen wichtig. Als Teil der PSD-Familie hat PSD-95 ebenfalls eine Art Stützfunktion für die postsynaptische Density (Kornau et al., 1995; Irie et al., 1997; Kim et al., 1997; Sheng und Kim, 2011). In der Arbeit von Koulen et al. (1998) wurde gezeigt, dass der Antikörper gegen PSD-95 insbesondere die präsynaptischen Endigungen der Photorezeptoren anfärbt, sodass die stärkste Anreicherung der Signale in der OPL der Retina zu finden ist.

In den hier durchgeführten Experimenten mit 13B5 wurde der polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Verteilung der Signale in den unterschiedlichen Schichten der Retina ist bereits in der relativ geringen Vergrößerung mit dem 20er-Objektiv gut zu erkennen. Dabei zeigte sich ein deutliches Signal von beiden Antikörpern in der äußeren plexiformen Schicht. 13B5 ist zudem noch in der inneren plexiformen Schicht detektiert worden.

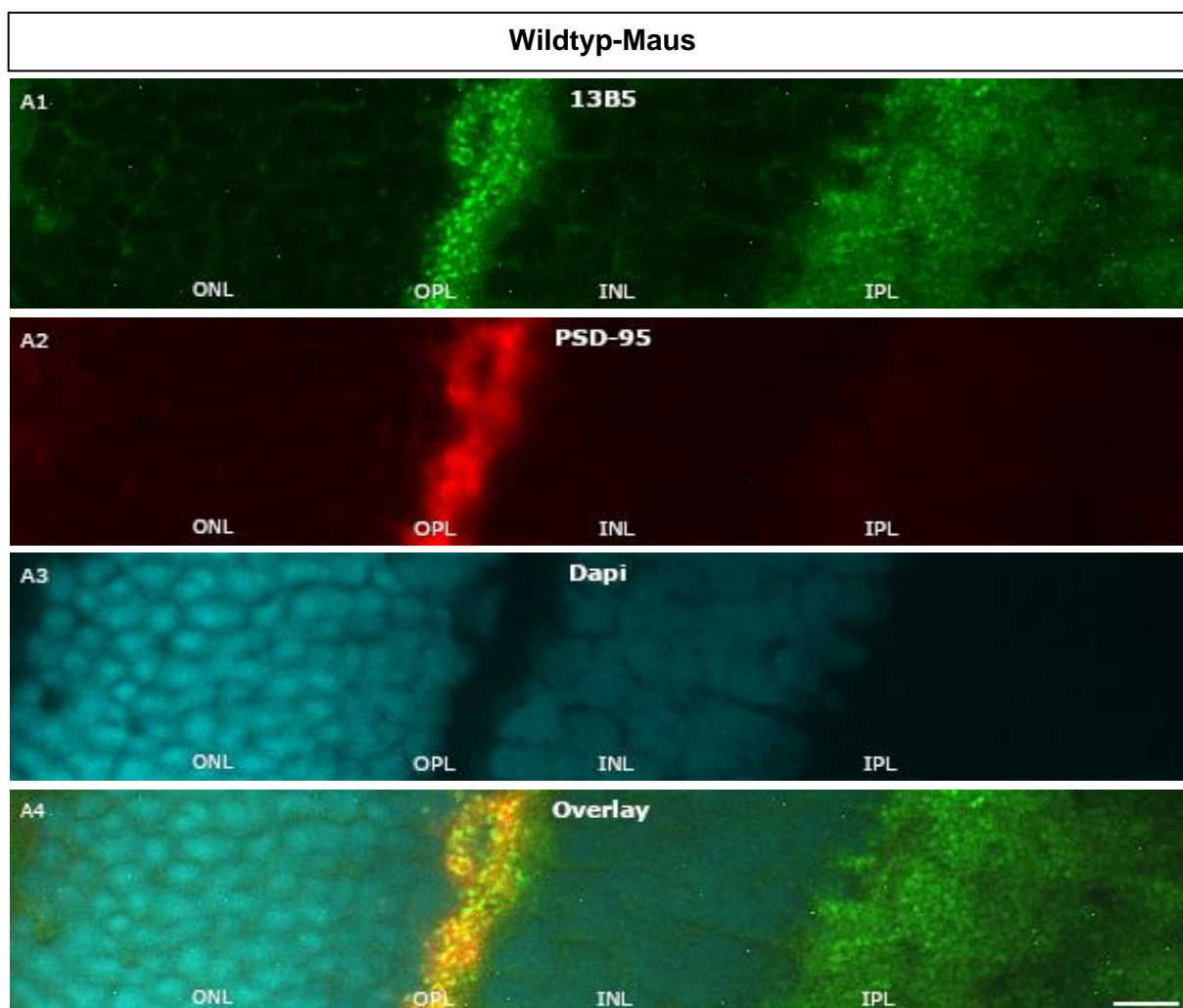


Abbildung 30 Expressionsmuster von 13B5 und PSD-95 in der Retina

Es wurden Kryoschnitte der Mause retina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 13B5 und PSD-95. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Beide Proteine finden sich in der äußeren plexiformen Schicht angereichert, 13B5 ist zudem noch in der IPL deutlich zu erkennen. Dokumentation mit dem 20er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: Antikörper 13B5; A2: PSD-95; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 10 μ m

In der Vergrößerung ist für PSD-95 das typische ringartige Verteilungsmuster, besonders bei Semidünnschnitten, in der äußeren plexiformen Schicht gut zu erkennen, das sonstige Expressionsmuster bleibt dabei unverändert. Die Überlappung der beiden Signale wurde weiterhin vergrößert, um die Beziehung der eingesetzten Antikörper genauer zu untersuchen. Dabei lässt sich erkennen, dass jeweils ein hufeisenförmiges Signal von 13B5 an einen Ring von PSD-95 angelagert zu sein scheint. Bei starker Vergrößerung im konfokalen Mikroskop wird diese Beobachtung ebenfalls bestätigt. Es lassen sich wabenartige Strukturen für PSD-95 ausmachen, denen sich jeweils ein Signal von 13B5 anlagert.

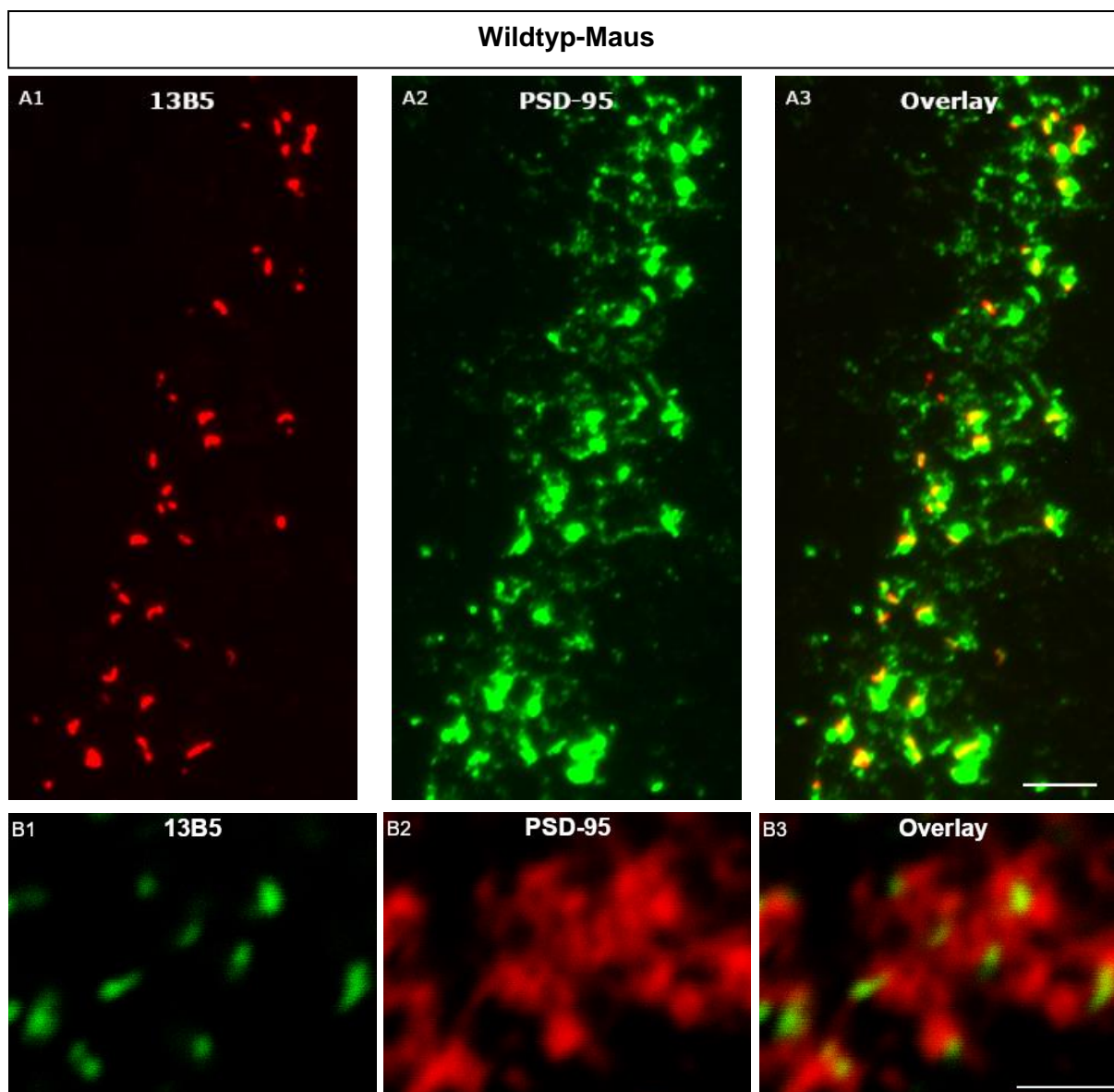


Abbildung 31 Vergrößerung der Detektion von 13B5 und PSD-95 in der Retina

Es wurden 0,5 μm dicke Semidünnschnitte bzw. bei B1-B3 Kryoschnitte der Mausretina doppelimmunmarkiert mit den Antikörpern 13B5 und PSD-95. Während das Signal von 13B5 eher bohnenförmig ist, zeigt sich für PSD-95 ein wabenartiges Signal, an das sich jeweils ein Signal von 13B5 anzulagern scheint.

A1-A3: Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. A1: Antikörper 13B5; A2: PSD-95; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 5 μm

B1-B3: Dokumentiert mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop A1R von Zeiss. B1: Antikörper 13B5; B2: PSD-95; B3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μm

3.1.5 Kontrollversuche

In jedem Durchlauf eines Experimentes wurden sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Negativkontrolle durchgeführt. In der Retina wurde als positive Kontrolle durchgängig ein Ribeye(B)-Antikörper namens 2D9 benutzt, welcher von Dembla et al. (2018) schon gut vorbeschrieben ist. Bei 2D9 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen die B-Domäne von Ribeye, dem Hauptbestandteil von synaptischen Ribbons. 2D9 richtet sich dabei gegen zwölf Aminosäuren des C-Terminus der B-Domäne von Ribeye.

Bei den Negativkontrollen wurde statt der jeweiligen primären Antikörper PBS eingesetzt, die sekundären Antikörper in der gleichen Konzentration blieben erhalten. Alle Negativkontrollen wurden genauso lange inkubiert wie die Schnitte, auf denen primäre Antikörper eingesetzt wurden und mit gleicher Expositionszeit dokumentiert.

3.1.5.1 Einzelfluoreszenzen der Kontrollgruppe

In den Einzelfluoreszenzexperimenten mit Wildtyp-Mäusen bei 2D9 lassen sich die hufeisenförmigen Signale in der OPL sowie die punkartigen Signale in der IPL bei der Positivkontrolle sehr gut erkennen, in der Negativkontrolle ist kein Signal sichtbar. Die Signale von 2D9 in der OPL beruhen dabei auf den synaptischen Verbindungen mittels Ribbonsynapsen zwischen den Photorezeptoren und Bipolarzellen, die Signale der IPL weisen die synaptischen Verbindungen zwischen Bipolar- und Ganglienzellen nach.

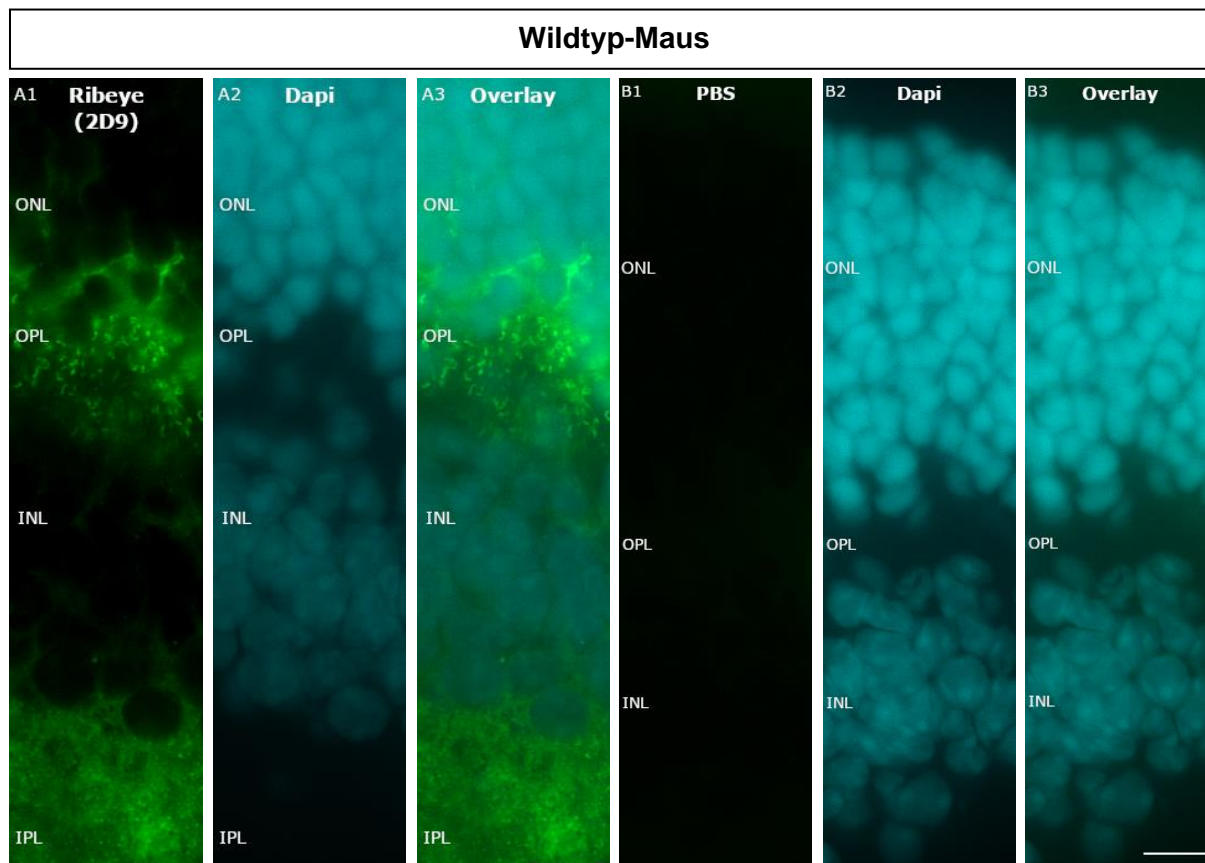


Abbildung 32 Kontrollversuche zu 2D9 in der Retina

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina immunmarkiert in A1-A3 mit dem Antikörper 2D9, bei B1-B3 wurde PBS statt des primären Antikörpers verwendet. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Es zeigt sich in der Positivkontrolle (A1-A3) das klassische Verteilungsmuster von 2D9 in der OPL und der IPL. In der Negativkontrolle lässt sich im grünen Kanal ein wenig Hintergrund erkennen, aber es werden keine Signale abgebildet. Dokumentation mit dem 40er Objektiv des Zeiss Axioverts. INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht.

A1: 2D9; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. B1: PBS; B2: Dapi; B3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μ m

In der Versuchsreihe mit der Rinderretina sind auch für 2D9 schöne Signale zu erkennen, die sich typischerweise bogenförmig in der OPL und punktförmig in der IPL anreichern. Somit gleichen sich die Signale für 2D9, 10F8 und 13B5 auch beim Rind, deswegen ist ein Zufallsbefund bei der Maus auszuschließen. Bei der dazugehörigen Negativkontrolle sind keine Signale auszumachen.

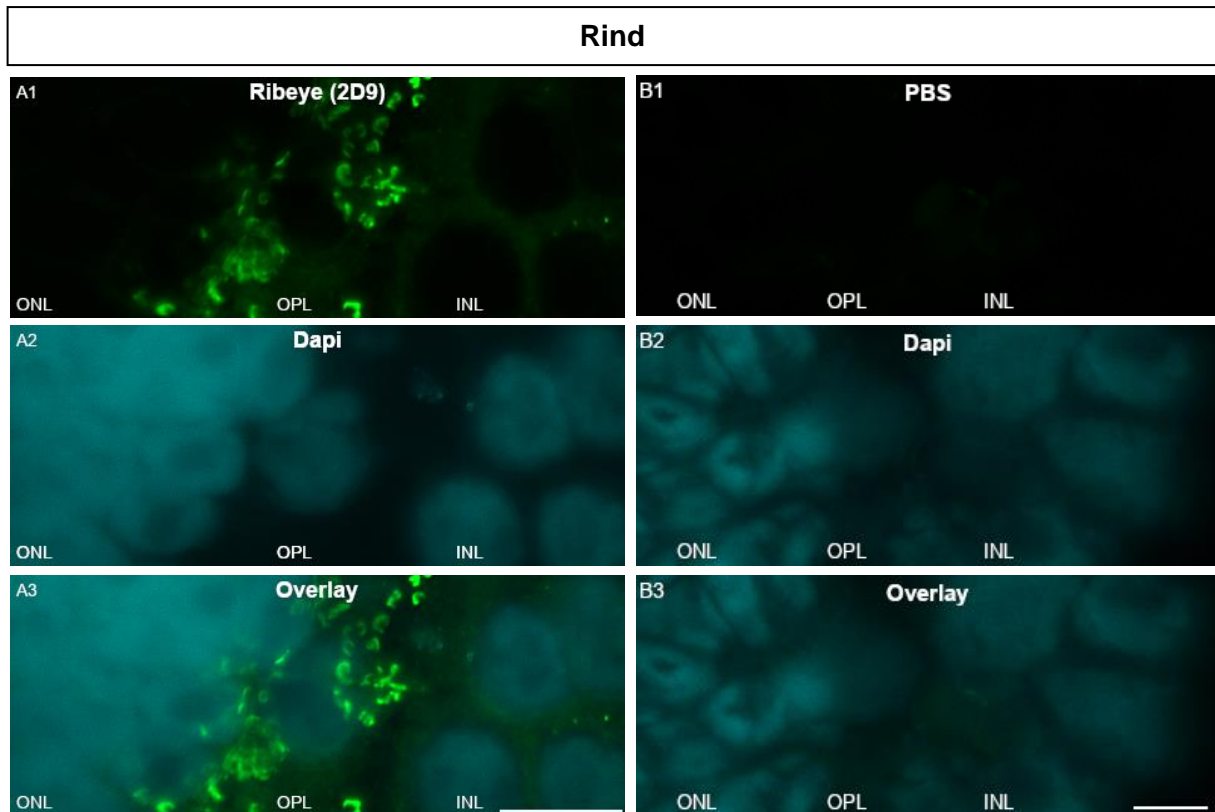


Abbildung 33 Signalverteilung von 2D9 in der Rinderretina

Es wurden Kryoschnitte der Rinderretina immunmarkiert in A1-A3 mit dem Antikörper 2D9, bei B1-B3 wurde PBS statt des primären Antikörpers verwendet, zusätzlich wurde auf allen Schnitten Dapi eingesetzt. In der OPL zeigt sich ein deutliches Signal des Antikörpers 2D9 in charakteristischer Hufeisenform. In der Negativkontrolle sind keine Signale zu erkennen. ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht.

A1-A3: Dokumentation mit dem 40er Objektiv des Zeiss Axioverts. A1: 2D9; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μm

B1-B3: Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. B1: PBS; B2: Dapi; B3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 5 μm

Zu der Experimentreihe bei Einzelfluoreszenzen gehörte auch ein Versuch mit Ribeye-Knockout-Mäusen, bei denen das Ribeye-Gen ausgeschaltet war (Maxeiner *et al.*, 2016). Daher konnten sich keine synaptischen Ribbons mit dem Hauptbestandteil Ribeye ausbilden und deswegen auch von 2D9 nicht detektiert werden. Wie daher zu erwarten war, zeigen sich in diesem Experiment aus diesem Grund keine Signale im Präparat.

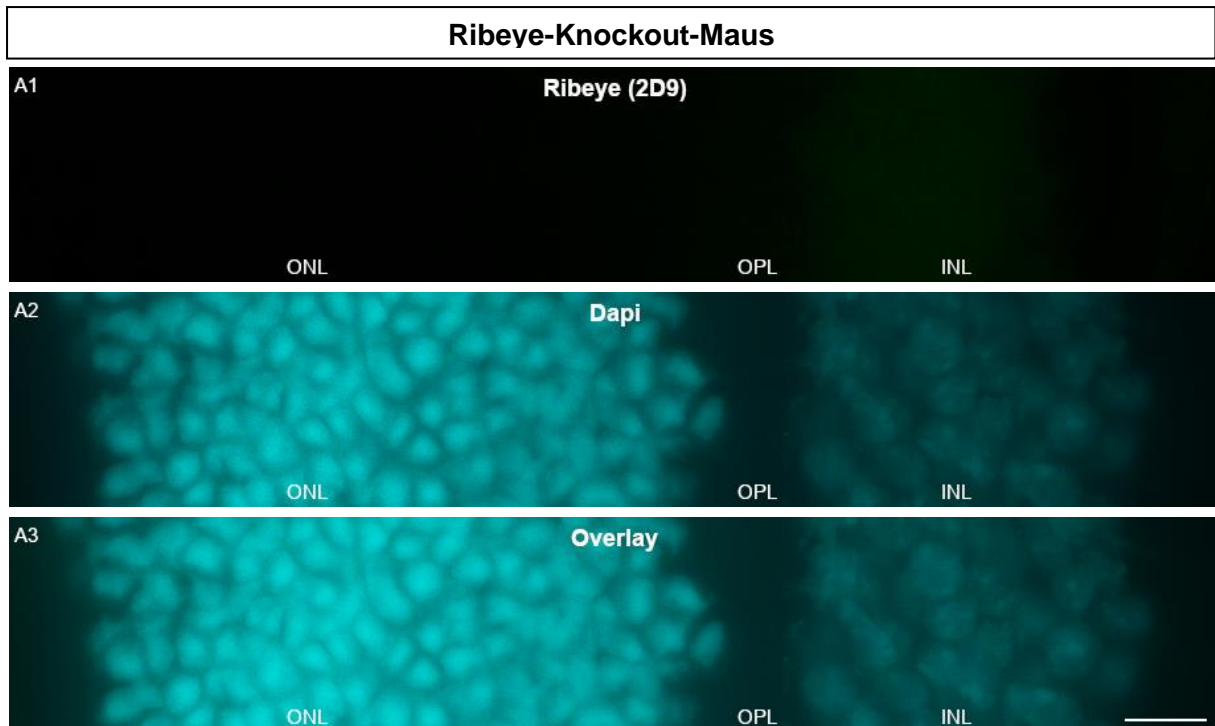


Abbildung 34 Knockout-Kontrolle von 2D9 in der Retina

Es wurden Kryoschnitte der Ribeye-Knockout-Maus immunmarkiert mit dem Antikörper 2D9. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. In der OPL und IPL sind keine Signale durch den Antikörper zu erkennen. Dokumentation mit dem 40er Objektiv des Zeiss Axioverts. INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: 2D9; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μ m

3.1.5.2 Doppelfluoreszenzen der Kontrollgruppe

Bei den doppel-immunmarkierten Experimenten wurde statt 10F8 bzw. 13B5 als primärer Antikörper ebenfalls 2D9 als Ribeye-Antikörper eingesetzt zur Kontrolle des Versuchs. Alle Kontrollexperimente mit 2D9 wurden stets unter gleichen Bedingungen zeitgleich zu den jeweiligen Experimenten mit 10F8 und 13B5 sowie der Negativkontrolle durchgeführt. Die verwendeten weiteren primären Antikörper wurden schon zuvor in den Kapiteln zu 10F8 und 13B5 besprochen. Bei der Negativkontrolle wurde anstatt der primären Antikörper PBS eingesetzt, der sekundäre Antikörper blieb unverändert.

Das folgende Kontrollexperiment gehört zur Versuchsreihe mit V216, dem Marker für Synaptotagmin 1, welcher die synaptischen Vesikel markiert. Die Markierungen sind in der OPL und IPL sowohl bei 2D9 als auch bei V216 gut zu erkennen, wobei bei 2D9 die markanten Hufeisen in der OPL deutlich festzustellen sind.

In der Negativkontrolle fehlen die Signale hingegen vollständig und es gibt nur wenige einzelne Punkte als Hintergrund zu bestimmen.

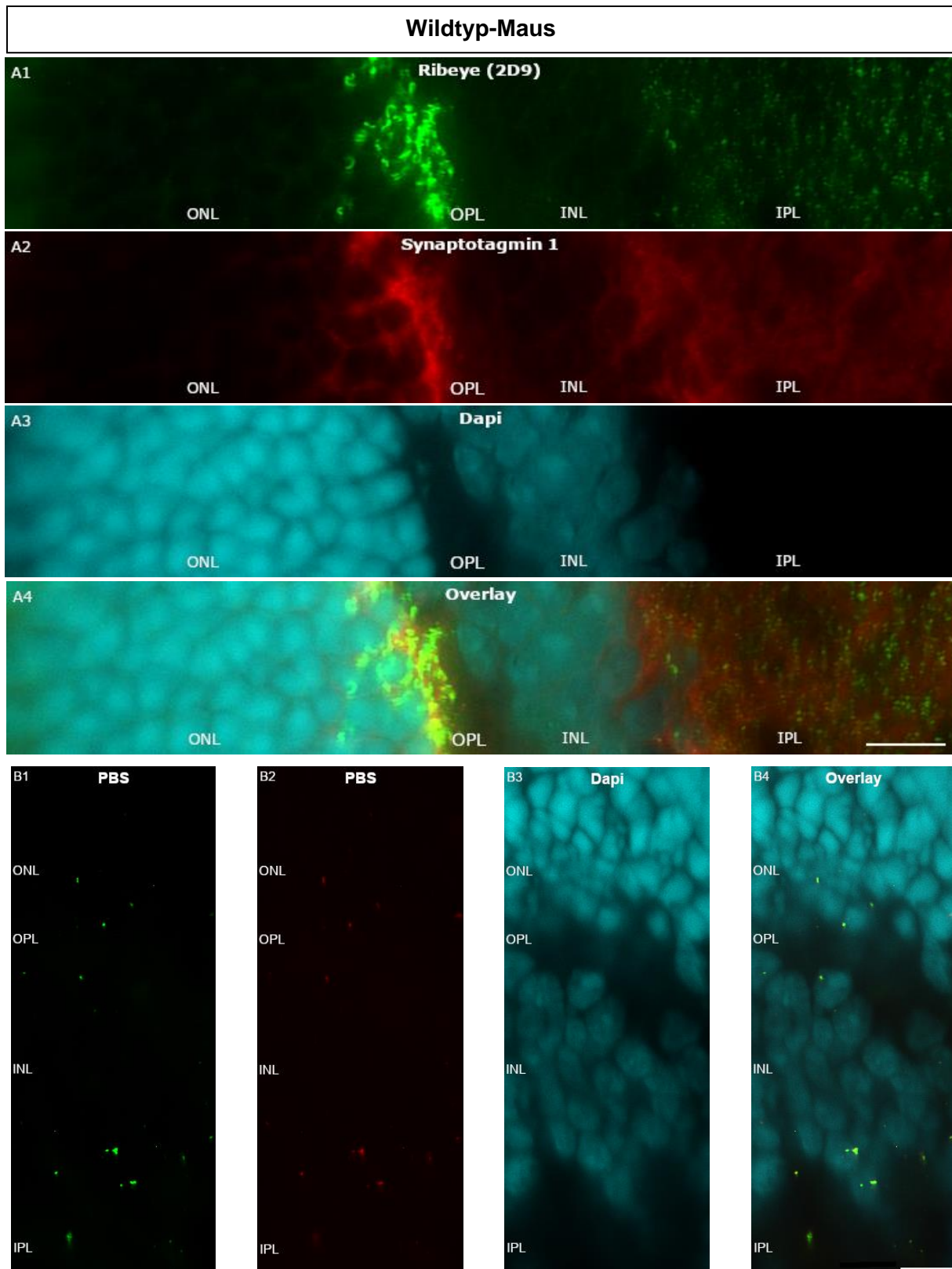


Abbildung 35 Kontrollversuche von Ribeye (2D9) und Synaptotagmin 1 (V216)

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert in A1-A3 mit den Antikörpern 2D9 und V216, bei B1-B3 wurde PBS statt der primären Antikörper verwendet, zusätzlich wurde Dapi verwendet. Beide Antikörper zeigen in der Positivkontrolle deutliche Signale in der inneren und äußeren plexiformen Schicht. In der Negativkontrolle sind keine Signale zu erkennen, es gibt nur einige unspezifische Punkte als Hintergrund. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: 2D9; A2: V216; A3: Dapi; A4: Overlay aus allen Kanälen; B1: PBS; B2: PBS; B3: Dapi; B4: Overlay (Überlagerung) aus allen Kanälen. Maßbalken: 10 μ m

Als nächstes Kontrollexperiment ist die Doppelfluoreszenz von 2D9 und U2656 aufgeführt.

Beide Antikörper markieren den C-Terminus am Ende der B-Domäne von Ribeye, der Hauptkomponente von synaptischen Ribbons (Schmitz et al., 2000; Dembla et al., 2018). Somit sind für beide Antikörper identische hufeisenförmige Signale zu erwarten innerhalb der OPL, die sich auch im Experiment gezeigt haben. In der entsprechenden Negativkontrolle fehlen die Signale vollständig, es ist, außer etwas Hintergrund, kein Signal zu erkennen.

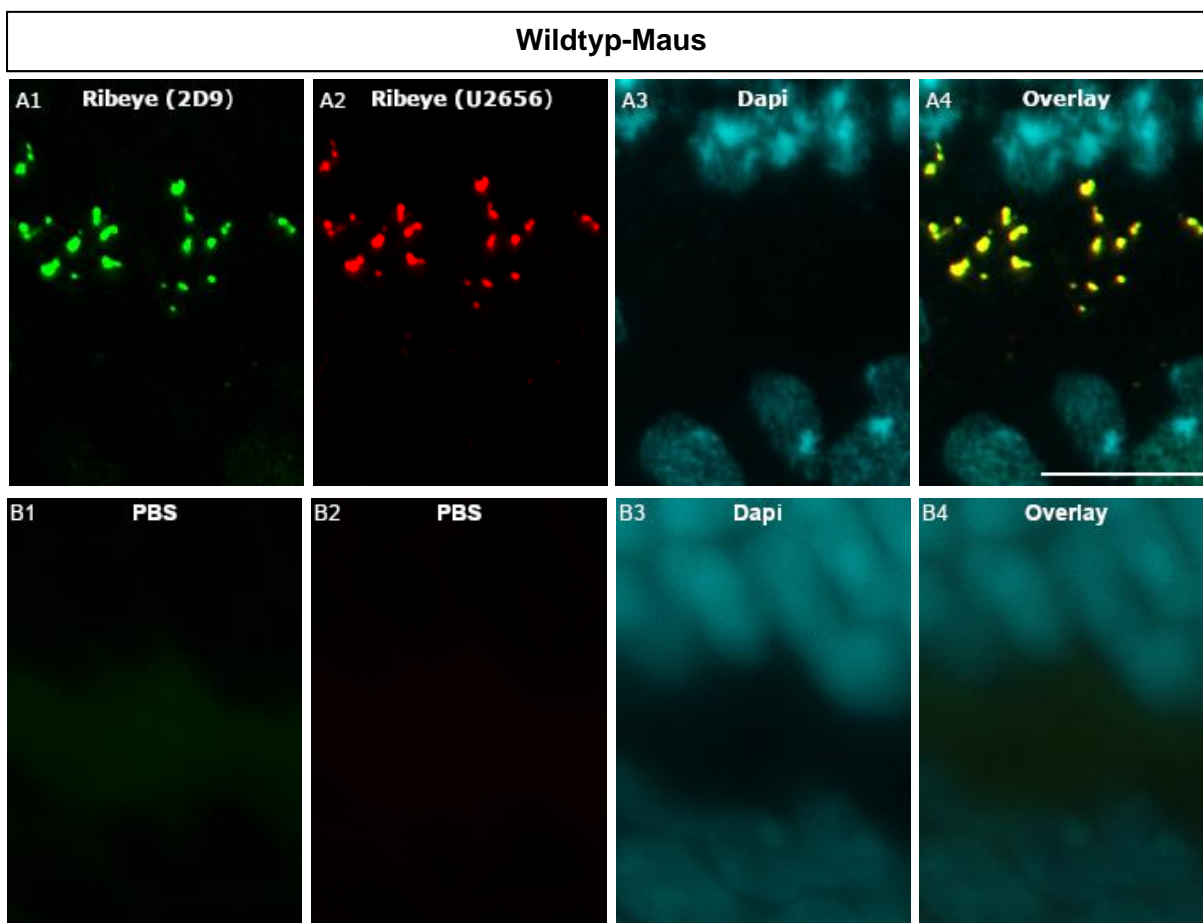


Abbildung 36 Kontrollversuch zu 2D9 und U2656

In A1-A3 wurden 0,5 μm dicke Semidünnschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit zwei verschiedenen Ribeye-Antikörpern. Es zeigt sich ein identisches Verteilungsmuster für die beiden Antikörper. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. A1: 2D9; A2: U2656; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen Kanälen. Maßbalken: 10 μm

In der Negativkontrolle (B1-B3) wurden Kryoschnitte der Mausretina immunmarkiert mit PBS, zusätzlich wurde Dapi verwendet. Im grünen und roten Kanal lässt sich ein wenig Hintergrund erkennen, aber es werden keine Signale abgebildet. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. B1: PBS; B2: PBS; B3: Dapi; B4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 5 μm

Das nächste Kontrollexperiment gehört zur Versuchsreihe mit PSD-95, einem Protein der postsynaptischen Density. Wie auch bei 10F8 und 13B5 zuvor, sind bei 2D9 und PSD-95 sehr schöne Signale in beiden plexiformen Schichten zu erkennen, in anderen Schichten der Retina jedoch nicht. PSD-95 zeigt auch hier innerhalb der äußeren plexiformen Schicht deutlich ein wabenartiges Muster, während die Signale von 2D9 gewohnt hufeisenförmig sind.

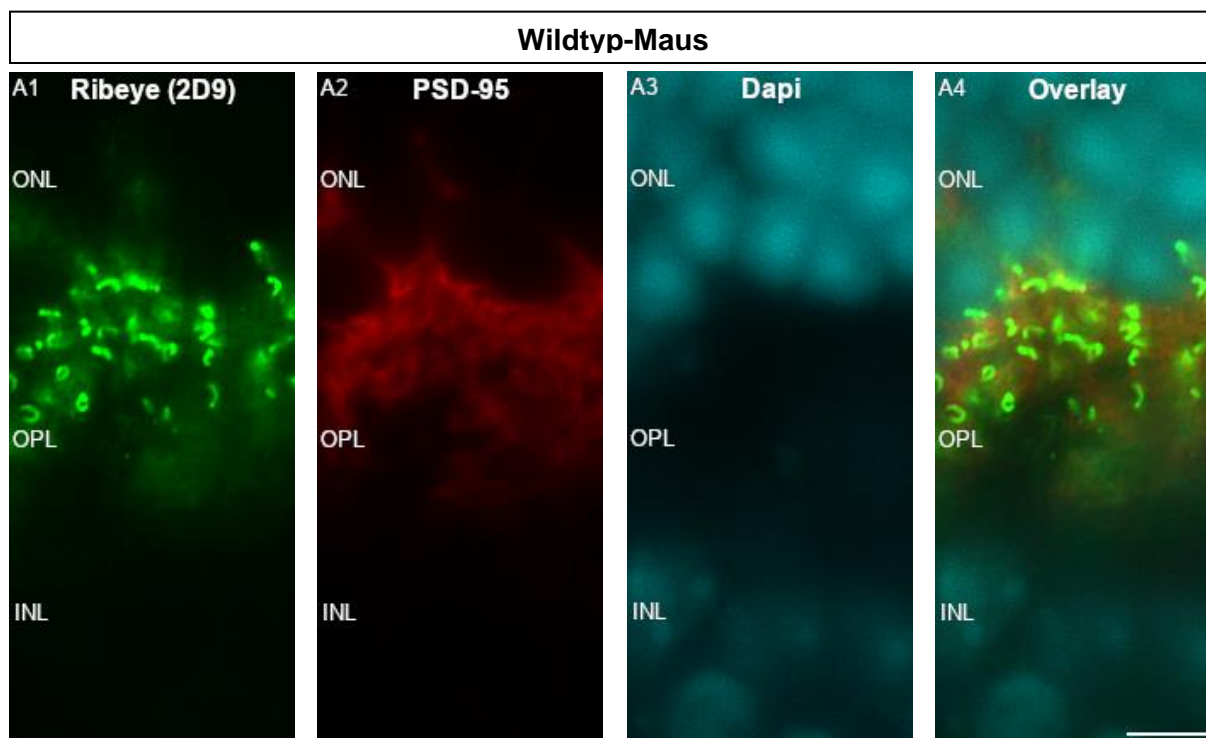


Abbildung 37 Positivkontrolle von 2D9 und PSD-95

Es wurden Kryoschnitte der Mause retina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 2D9 und PSD-95, zusätzlich wurde Dapi verwendet. 2D9 zeigt die bekannte Hufeisenform in der OPL, PSD-95 hingegen zeigt ein wabenartiges Muster. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: 2D9; A2: PSD-95; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

In der dazu gehörigen Negativkontrolle lassen sich erneut keine Signale feststellen, lediglich einige kleine einzelne Punkte sind im grünen und roten Kanal auszumachen.

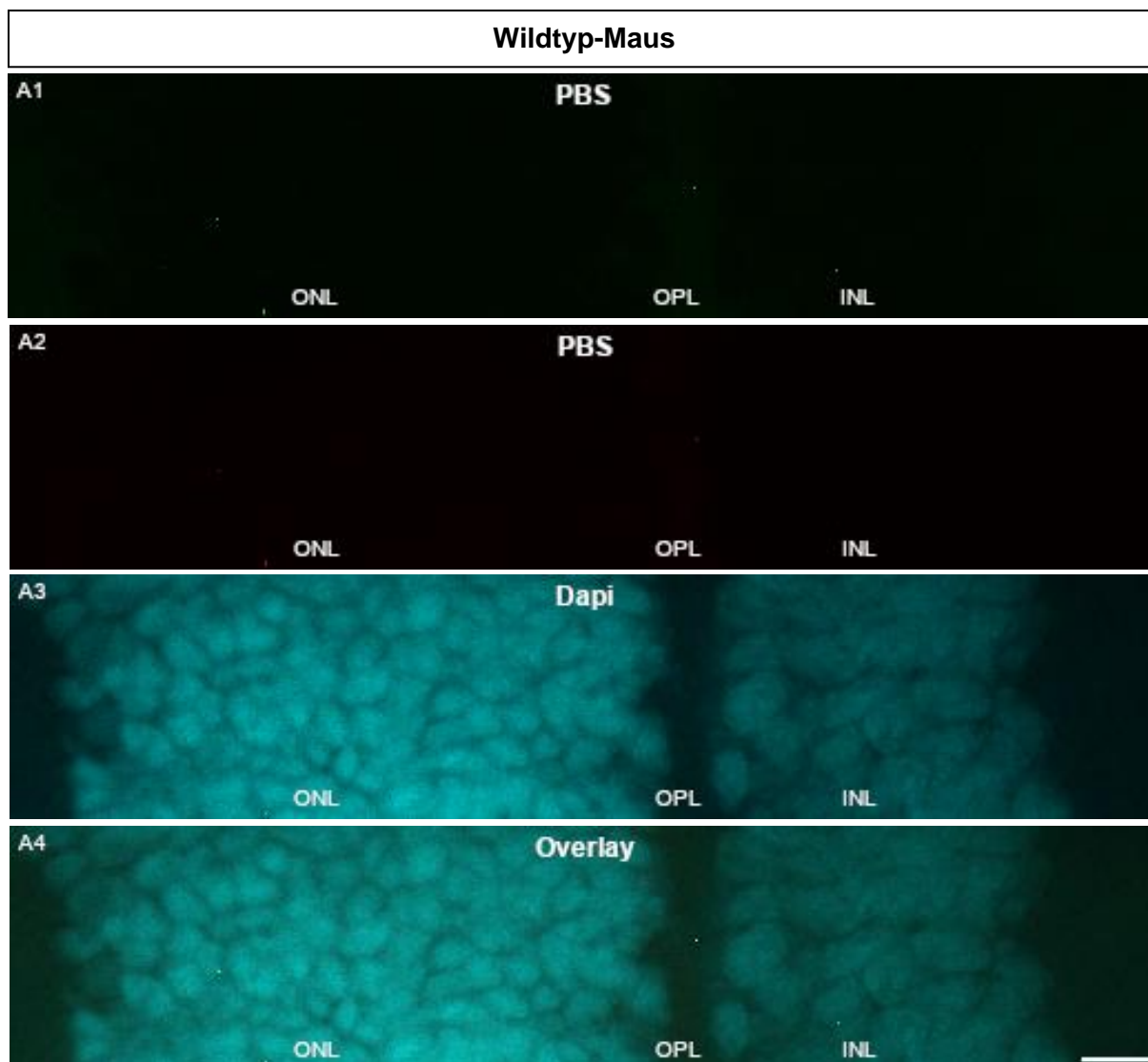


Abbildung 38 Negativkontrolle zur PSD-95-Versuchsreihe

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit PBS. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Im grünen und roten Kanal sind wenige einzelne kleine Punkte auszumachen, es wird jedoch kein Signal erkannt. Dokumentation mit dem 20er Objektiv des Zeiss Axioverts. INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. B1: PBS; B2: PBS; B3: Dapi; B4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 10 μm

In den Versuchen mit dem Antikörper Cav1.4 C-Term, einem Antikörper gegen Calciumkanäle, zeigt sich das gleiche Bild wie zuvor bei den getesteten Antikörpern 10F8 und 13B5. Die Signale liegen in der äußeren plexiformen Schicht in direkter Nachbarschaft zueinander, überlappen sich allerdings nicht vollständig. Stattdessen befinden sie ein wenig versetzt zueinander, dieses passt zu der Tatsache, dass sich diese Art von Calciumkanälen an der Basis der synaptischen Ribbons befinden (Grabner *et al.*, 2015; Lagnado und Schmitz, 2015; Moser *et al.*, 2020).

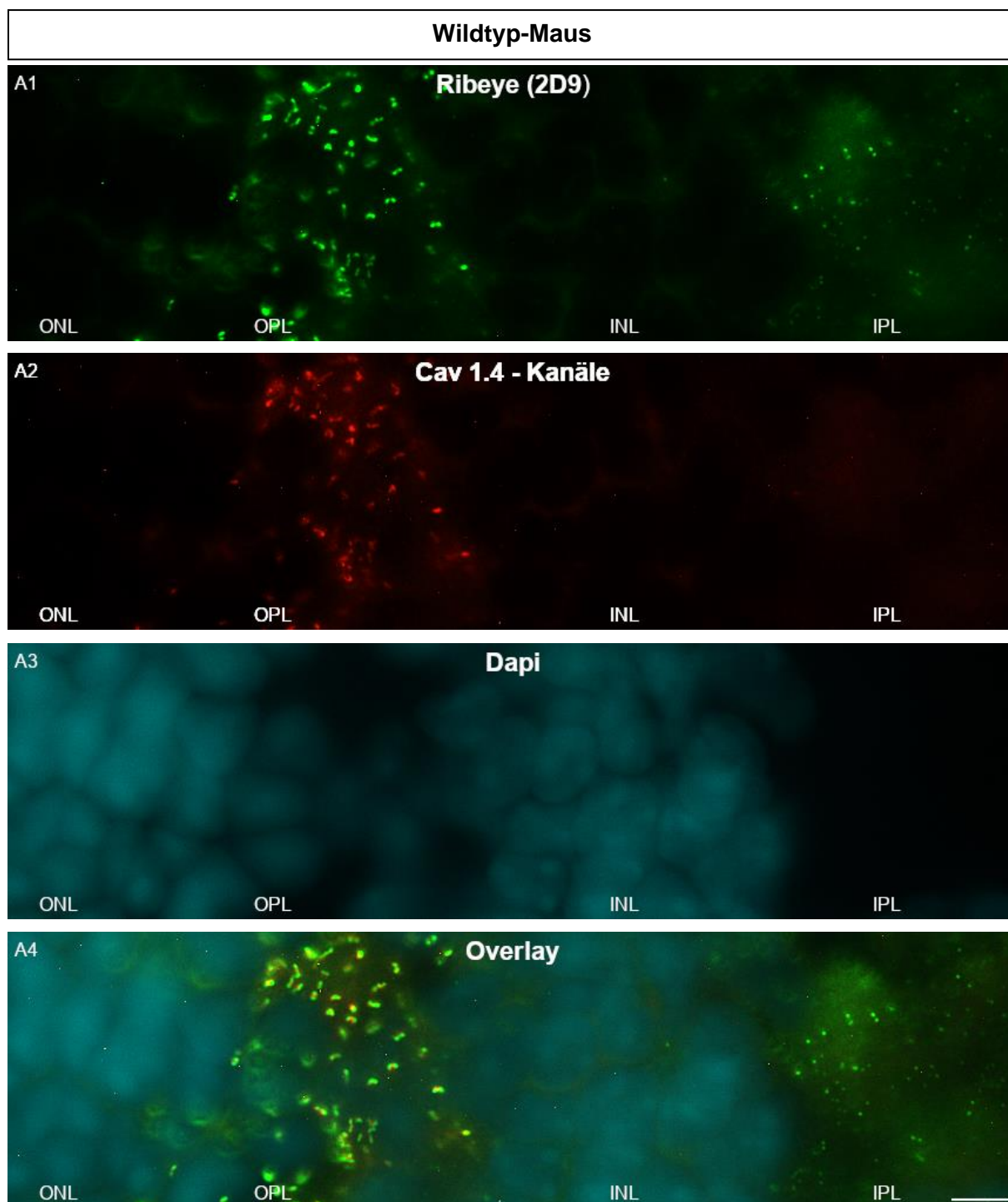


Abbildung 39 Positivkontrolle Ribeye (2D9) und Cav1.4-Kanäle

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina doppel-immunmarkiert mit den Antikörpern 2D9 und Cav1.4 C-Term, zusätzlich wurde Dapi verwendet. 2D9 zeigt die bekannte Hufeisenform in der OPL und punktförmige Signale in der IPL, bei Cav1.4 beschränken sich die punktförmigen Muster auf die OPL. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: 2D9; A2: Cav1.4 C-Term; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

In der Negativkontrolle ist wie zu erwarten kein Signal zu erkennen, im grünen Kanal lässt sich lediglich ein wenig Durchlicht ausmachen.

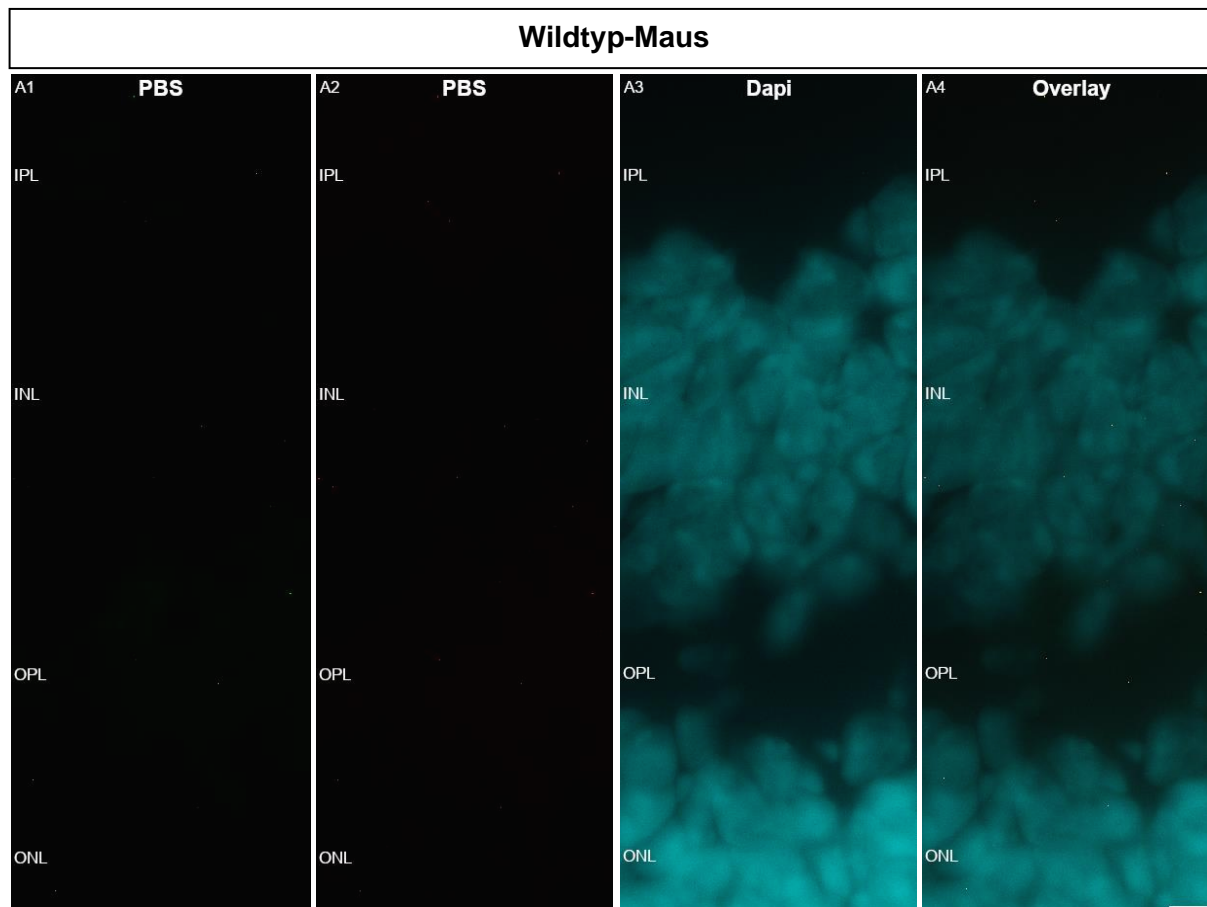


Abbildung 40 Negativkontrolle zur Cav1.4-Versuchsreihe

Es wurden Kryoschnitte der Mausretina für die Negativkontrolle mit PBS statt primärer Antikörper inkubiert. Die sekundären Antikörper blieben unverändert, zusätzlich wurde Dapi verwendet. Im grünen und roten Kanal sind vereinzelt kleine Punkte auszumachen, es wird jedoch kein Signal erkannt. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht. A1: PBS; A2: PBS; A3: Dapi; A4: Overlay (Überlagerung) aus allen drei Kanälen. Maßbalken: 5 μ m

3.2 Resultate der Immunfluoreszenz im Cerebellum

Bislang wurden Ribbonsynapsen außer in der Retina auch noch innerhalb der Pinealorgane, in den Haarzellen der Cochlea und des Vestibularorgans sowie im Seitenlinienorgan bei Fischen gefunden (Sterling *et al.*, 2005; Moser *et al.*, 2006; Nouvian *et al.*, 2006; Matthews und Fuchs, 2010). Da die Funktion von Ribeye jedoch noch nicht abschließend geklärt und weiterhin Gegenstand der Forschung ist, könnten Komponenten oder Untereinheiten von Ribeye auch an weiteren Stellen im Organismus vorhanden sein, insbesondere im Nervensystem. Daher wurden in dieser Arbeit die beiden experimentellen Antikörper auch am Cerebellum getestet, um eventuell Ribeye-Komponenten zu entdecken.

Zunächst wurden analog zum Vorgehen bei der Retina Einzelfluoreszenz-Experimente durchgeführt, dabei wurde erneut Dapi zusätzlich verwendet, um die Lokalisation der möglichen Signale gut eingrenzen zu können. Die experimentellen Antikörper 10F8 und 13B5 wurden in dieser Versuchsreihe erneut in einer Verdünnung 1:10 eingesetzt, als sekundärer Antikörper diente Donkey anti-Mouse (konjugiert mit Dylight 488). Dabei zeigte sich eine Anreicherung der beiden Antikörper in der Rinde des Kleinhirns, wobei vor allem die Molekularschicht, insbesondere für 13B5, punktförmige Signale zu enthalten schien. Außerdem konnte man eine Anreicherung zwischen den Kernen der Körnerschicht erkennen. Die Signalstärke für 10F8 war schwächer als für 13B5, jedoch konnten auch für diesen Antikörper in höheren Vergrößerungen zunächst punktförmige Signale detektiert werden.

In jedem Durchlauf eines Experimentes wurden sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Beim Cerebellum wurde als positive Kontrolle das synaptische Vesikelprotein 2 (SV2) verwendet. SV2 ist bereits mehrfach vorbeschrieben, z.B. von Buckley und Kelly (1985). Es richtet sich gegen ein transmembranes Glykoprotein, das in allen synaptischen Vesikeln vorkommt und eignet sich gut, um die präsynaptische Terminale darzustellen.

Bei den Negativkontrollen wurde statt der jeweiligen primären Antikörper PBS eingesetzt, die sekundären Antikörper in der gleichen Konzentration blieben erhalten. Alle Negativkontrollen wurden genauso lange inkubiert wie die Schnitte, auf denen primäre Antikörper eingesetzt wurden und die Entwicklung erfolgte bei gleicher Expositionszeit.

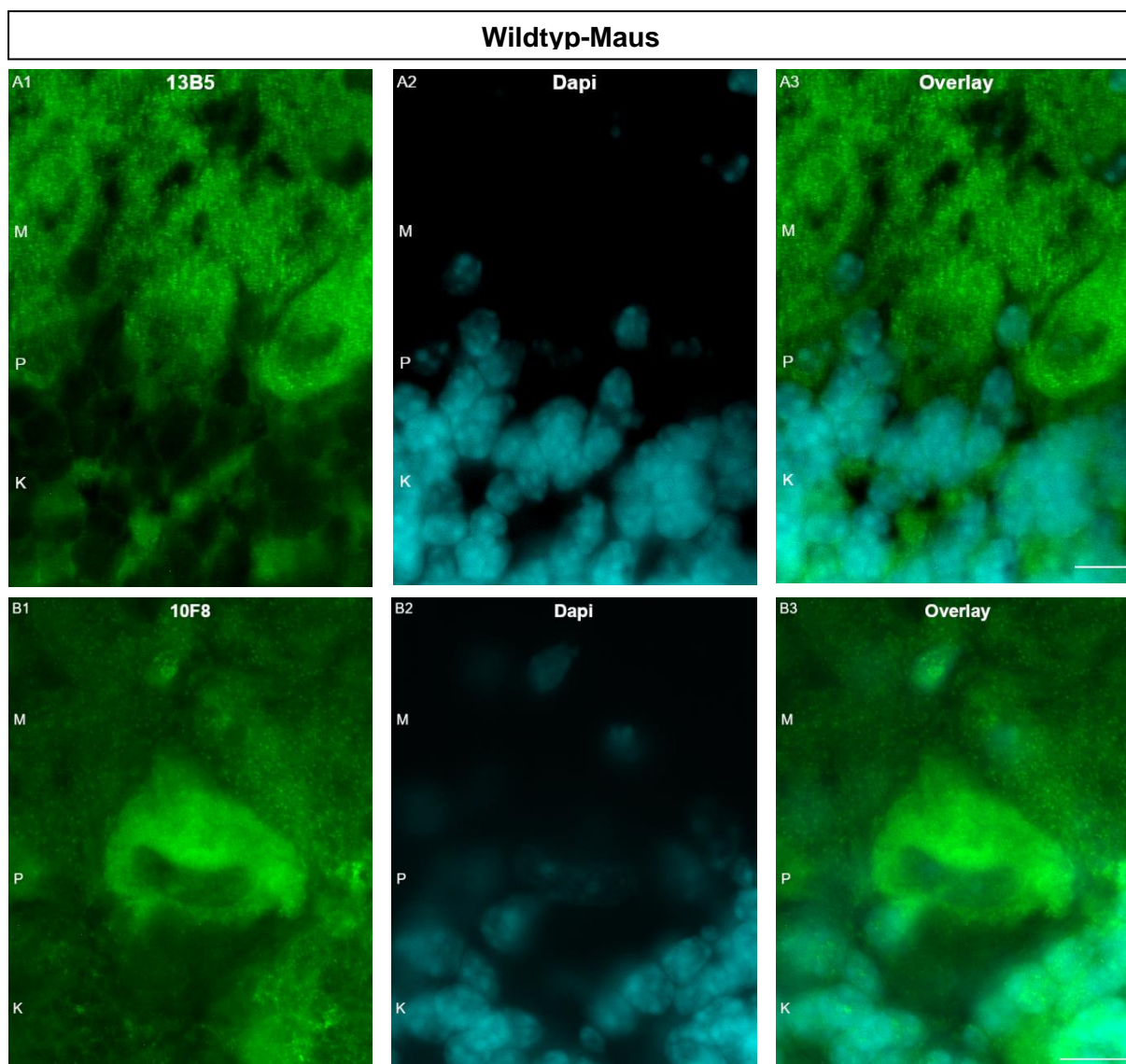


Abbildung 41 Signalverteilung von 10F8 und 13B5 im Cerebellum

Es wurden Kryoschnitte des Kleinhirns der Maus immunmarkiert mit den Antikörpern 13B5 und 10F8. Zusätzlich wurden die Kerne visualisiert mit Dapi. Beide Antikörper finden sich in allen Schichten der Rinde des Cerebellums. Dabei werden von beiden Antikörpern auch Purkinje-Zellen angefärbt, bei 13B5 ist besonders deutlich ein scheinbar punktförmiges Muster auszumachen. M: Molekularzellschicht; P: Purkinjezellschicht; K: Körnerzellschicht.

A1-A3: Dokumentation mit dem 40er Objektiv des Zeiss Axioverts. A1: Antikörper 13B5; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen.

B1-B3: Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. B1: Antikörper 10F8; B2: Dapi; B3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen. Maßbalken: 10 μ m

In den Kontrollexperimenten mit SV2 als primären Antikörper war die Signalverteilung ähnlich wie bei den verwendeten experimentellen Antikörpern, während in der Negativkontrolle lediglich Hintergrund auszumachen war. Daher wurde zunächst weiterhin von einem echten Signal ausgegangen.

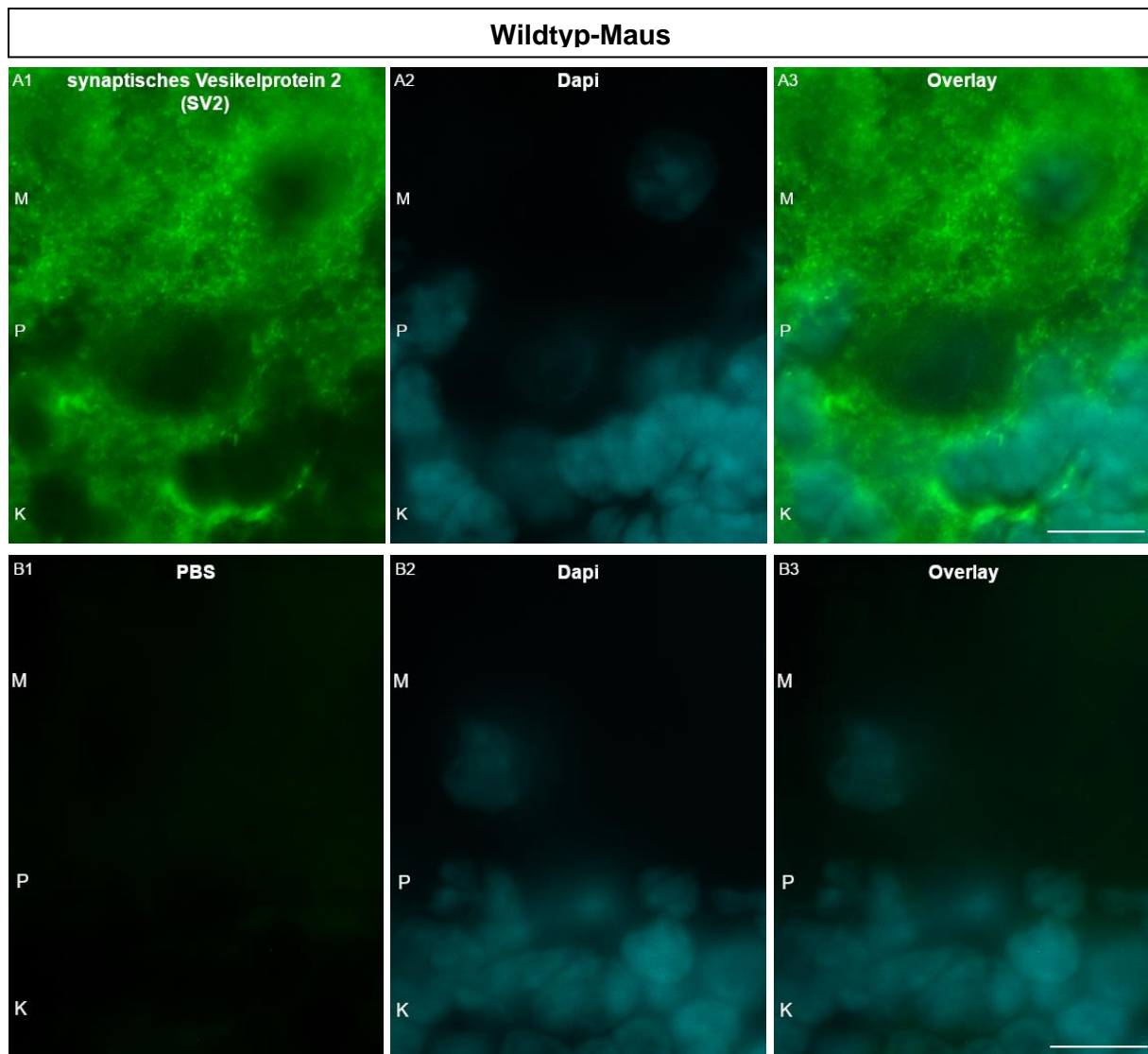


Abbildung 42 Kontrollexperimente zum Cerebellum

Es wurden Kryoschnitte des Kleinhirns der Maus immunmarkiert in A1-A3 mit dem Antikörper SV2, bei B1-B3 wurde PBS statt des primären Antikörpers verwendet. SV2 zeigt in allen Schichten der Kleinhirnrinde Signale, im Gegensatz zu den experimentellen Antikörpern sind hierbei die Purkinje-Zellen eher ausgespart. In der Negativkontrolle lässt sich nur ein Hintergrundleuchten im grünen Kanal feststellen. M: Molekularzellschicht; P: Purkinjezellschicht; K: Körnerzellschicht. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. Maßbalken: 10 μm

A1: Antikörper 13B5; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen.

B1: PBS; B2: Dapi; B3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen.

In der darauffolgenden Knockout-Kontrolle mit mehreren Kleinhirnen aus Ribeye-Knockout-Mäusen zeigte sich allerdings das gleiche Bild wie zuvor bei den Wildtyp-Mäusen. Bei beiden Antikörpern war das punktartige Signalmuster auch im Knockout sehr ausgeprägt, wobei auffällig ist, dass sich die Purkinje-Zellen nicht besonders darstellen und abgrenzen lassen. Allerdings muss bei der Signalverteilung von einem unspezifischen Signal ausgegangen werden, weil sich die Signale insgesamt zu sehr ähneln.

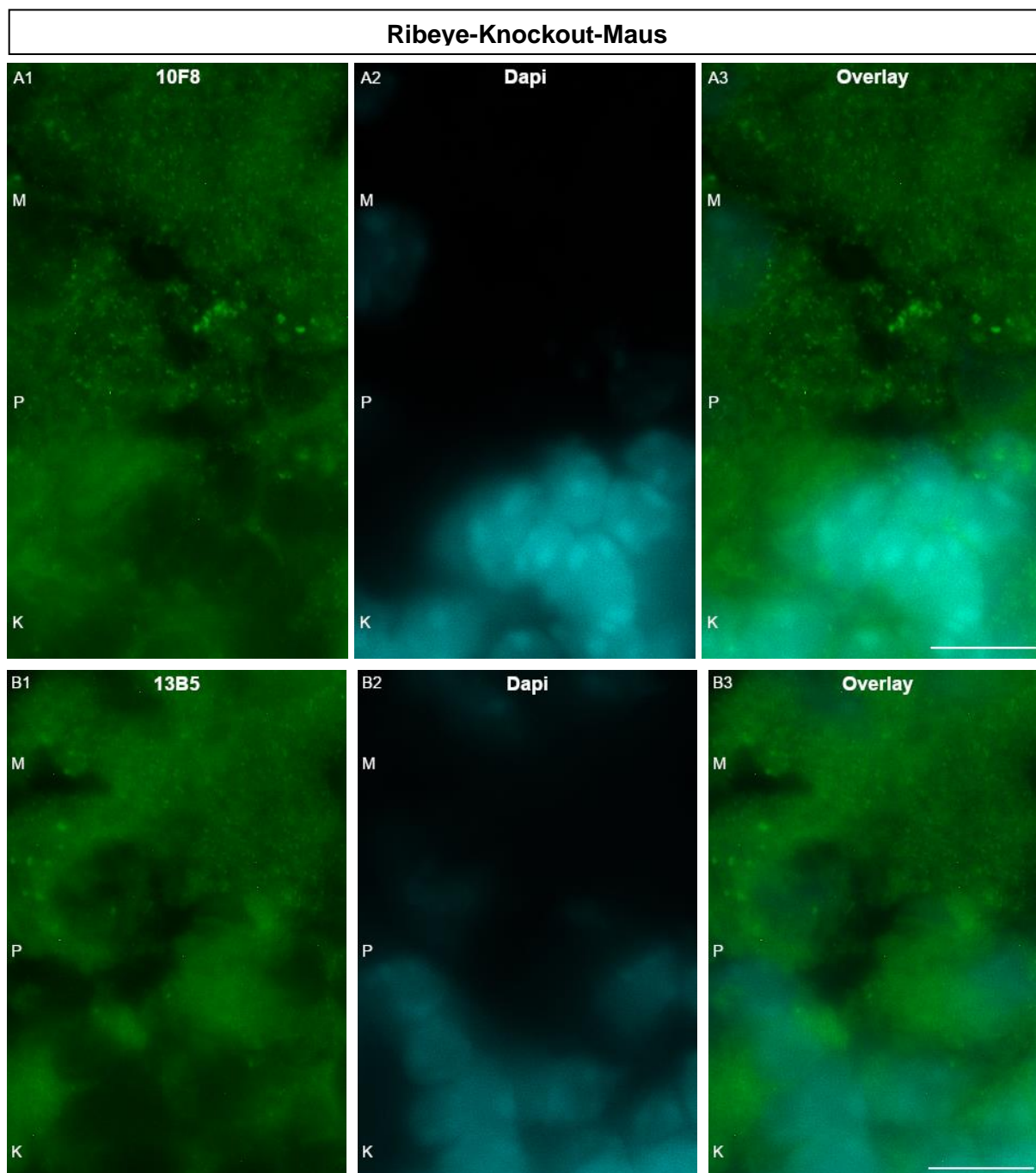


Abbildung 43 Knockout-Kontrolle im Cerebellum

Es wurden Kryoschnitte des Cerebellums der Ribeye-Knockout-Maus immunmarkiert mit den Antikörpern 10F8 und 13B5, zusätzlich wurde Dapi eingesetzt. Es zeigt sich das gleiche punkartige Signal in allen Schichten der Kleinhirnrinde, lediglich die Purkinje-Zellen werden nicht mehr prominent abgebildet. Dokumentation mit dem 63er Objektiv des Zeiss Axioverts. M: Molekularzellschicht; P: Purkinjezellschicht; K: Körnerzellschicht; Maßbalken: 10 μ m

A1: Antikörper 10F8; A2: Dapi; A3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen.

B1: Antikörper 13B5; B2: Dapi; B3: Overlay (Überlagerung) aus beiden Kanälen.

3.3 Elektronenmikroskopie

Zur abschließenden Dokumentation der genauen Lokalisation wurden beide Antikörper auch mit der Immunogold-Methode bei postembedding für TEMs an der Retina getestet. Für diese Methode wurden aus der Retina Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 50-70 nm von Wildtyp-Mäusen angefertigt und diese anschließend mit dem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper Goat anti-Mouse, gekoppelt an 10 nm große Goldpartikel, inkubiert und fixiert wie in Kapitel 2.2.7.3. beschrieben.

In diesem Experiment wurden jeweils verschiedene Verdünnungen für die primären Antikörper verwendet. Für 10F8 zeigten sich in allen Verdünnungen von 1:50, 1:100 und auch 1:1000 hierbei deutliche Signale. Diese Signale sind in großer Zahl nahezu ausschließlich innerhalb der synaptischen Ribbons zu finden.

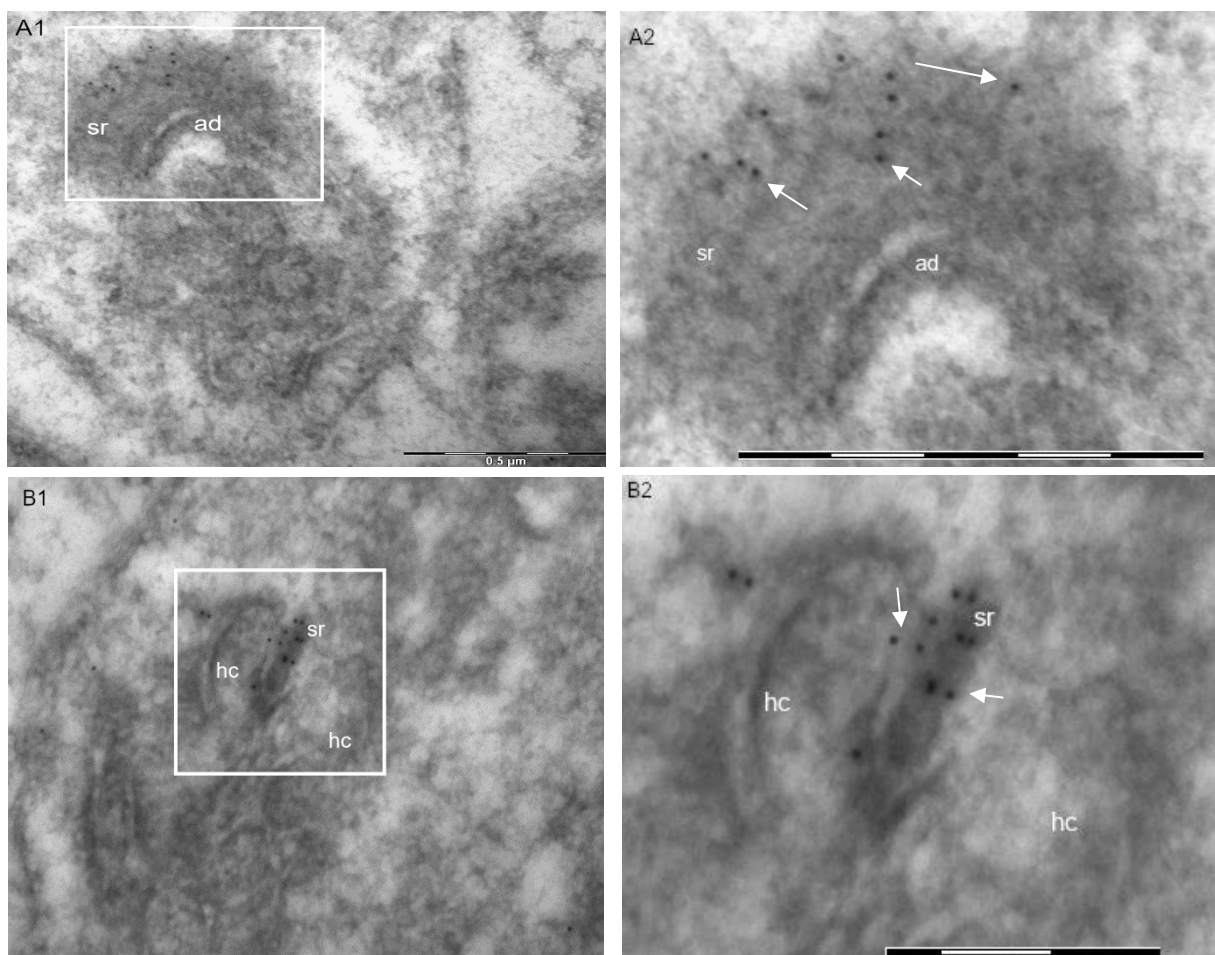


Abbildung 44: Verteilung von 10F8 im TEM in der Ribbonsynapse

Es wurden Ultradünnschnitte immunogold-markiert mit dem Antikörper 10F8, als sekundärer Antikörper wurde Goat Anti Mouse gekoppelt an 10 nm große Goldpartikel verwendet. A2 und B2 stellen eine Ausschnittsvergrößerung des weiß umrahmten Bereichs in A1 bzw. B1 dar. Das runde Kontrastsignal von 10F8 ist gut sichtbar innerhalb der synaptischen Ribbons lokalisiert, die weißen Pfeile markieren einige diese Signale. Sr: synaptic ribbon; hc: Horizontalzelle; ad: archifome density; Maßstabsbalken A1, A2, B1: 0,5 µm, B2: 0,25 µm

3.4 Western Blot Nachweise

Das Verfahren des Western Blots ist für den Nachweis von Proteinen geeignet, dadurch konnte die Anwesenheit der Proteine, gegen die sich die monoklonalen Antikörper 10F8 bzw. 13B5 richten, in den untersuchten Gewebearten bestätigt werden. Da in der Immunfluoreszenz alle Versuche entweder mit der Retina oder dem Cerebellum durchgeführt wurden, wurden auch für die Western Blots diese Gewebetypen herangezogen. Wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, wurden dabei ein Cerebellum der Maus bzw. eine halbe Rinderretina in Laemmli SDS-Probenpuffer aufgelöst und in gleichen Mengen für den Western Blot verwendet. Die Membranstreifen wurden im Anschluss mit den primären Antikörpern 10F8 oder 13B5 über Nacht inkubiert. Nach der einstündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper GaM-Pox, einem mit Peroxidase konjugierten Antikörper aus der Ziege, zeigten sich Proteinbanden auf der Membran.

Für Ribeye wird eine Proteinbande bei rund 120 kDa erwartet, für CtBP2 ist eine Proteinbande bei rund 50 kDa bekannt (Schmitz *et al.*, 2000). Da die bisherigen Ergebnisse für die experimentellen Antikörper 10F8 und 13B5 dafürsprechen, dass es sich um Ribeye-Antikörper handelt, werden an dieser Stelle in der Retina ebenfalls Banden erwartet. Im Blot sind für 10F8 und 13B5 die gleichen Proteinfractionen zu erkennen, die auch durch Ribeye (2D9) erkannt werden. Des Weiteren werden auch weitere Bruchstücke des Proteins von 10F8 und 13B5 detektiert. Durch die hohe Übereinstimmung lässt sich davon ausgehen, dass es sich bei 10F8 und 13B5 jeweils um Ribeye-Antikörper handelt.

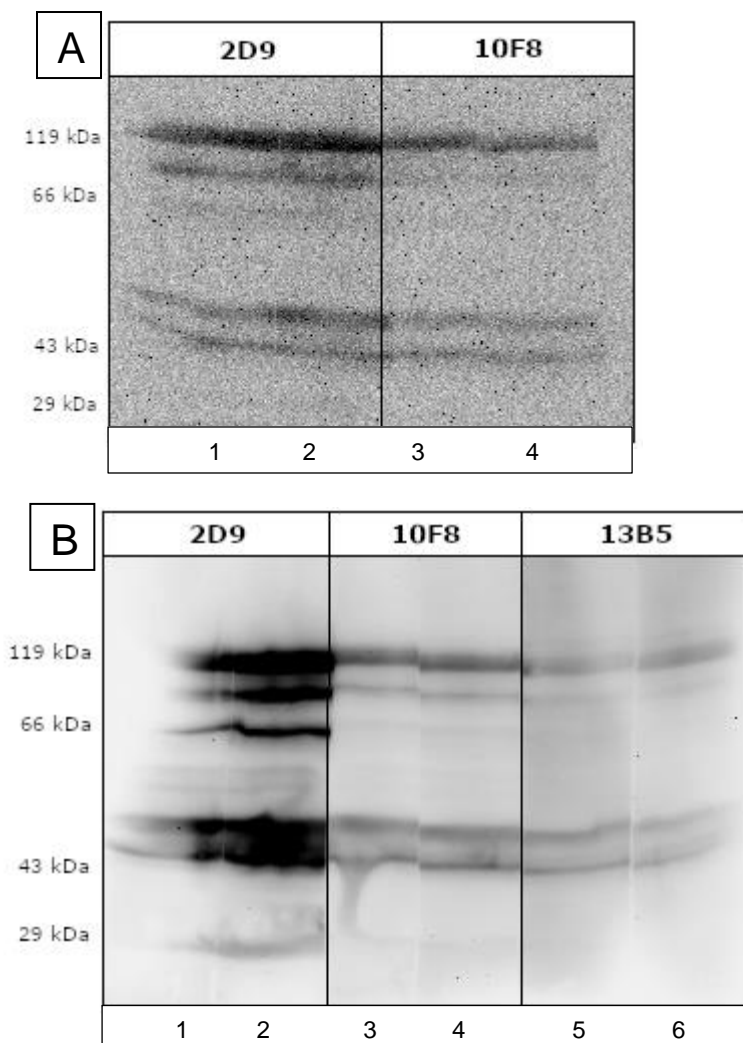


Abbildung 45 Western Blot der Retina

Ein bovines Retinalysat wurde im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose durch Elektrottransfer übertragen. Der Ribeye-Antikörper 2D9 diente als Positivkontrolle und zeigt die charakteristischen Ribeye-Banden. Parallel dazu wurden die Antikörper 10F8 und 13B5 ausgetestet und zeigen ein sehr ähnliches Bandenmuster wie der 2D9 Ribeye-Antikörper.

Zusätzlich wurde ein weiterer Western Blot unter Verwendung eines bakteriell exprimierten und gereinigten Fusionsproteines der Ribeye B-Domäne, das an Glutathion-S-Transferase (GST) gebunden wurde, durchgeführt. Mit diesem Western Blot sollte die spezifische Bindung der experimentellen Antikörper an die B-Domäne von Ribeye nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass die monoklonalen Antikörper 10F8 und 13B5 das gebundene GST statt Ribeye nachweisen, wurde außerdem jeweils auch eine Bande mit GST allein als Negativkontrolle im Western Blot aufgetragen. Nach der Inkubation der Nitrozellulosemembran mit 10F8 bzw. 13B5 in einer Verdünnung von jeweils 1:100 über Nacht und einstündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper GaM-Pox, erfolgte die Dokumentation der Proteinbanden mittels GelDoc. Dabei zeigten sich deutliche Banden lediglich auf dem Abschnitt, auf dem Ribeye-GST aufgetragen war, nicht aber auf den reinen GST-Abschnitten

der Membran. Zur Kontrolle wurde die ganze Membran ohne Entfernung (Stripping) der Antikörper nach erneuter Absättigung in Magermilchpuffer im Anschluss mit Anti-GST in einer Verdünnung 1:10.000 über Nacht inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach einstündiger Inkubation mit GaM-Pox und zeigte nun erwartungsgemäß auch Banden in den Abschnitten, in denen GST aufgetragen wurde. Damit konnte bewiesen werden, dass die experimentellen Antikörper 10F8 und 13B5 spezifisch an die Ribeye B-Domäne binden.

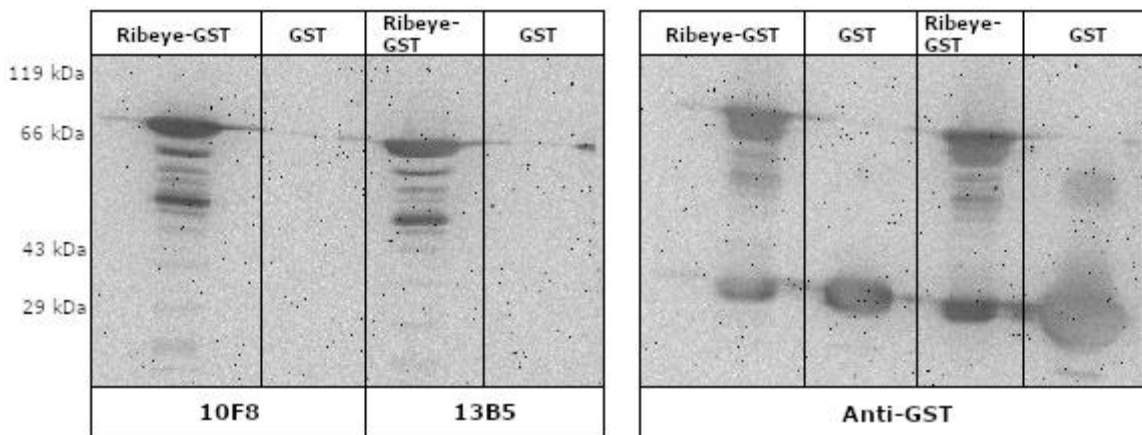


Abbildung 46 GST-Affinitätsanalyse im Western Blot

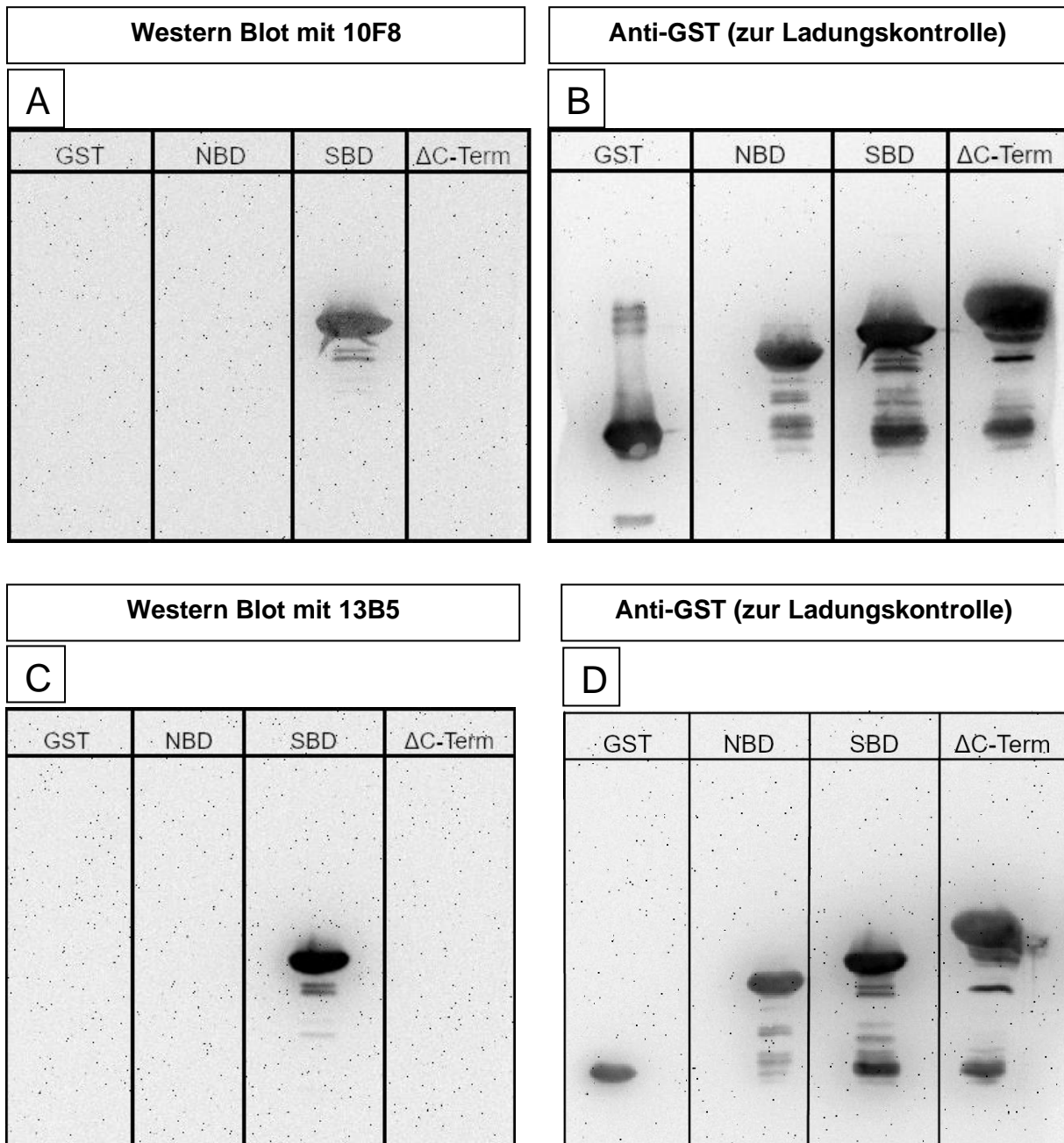
A: Lediglich auf den Membranstücken, auf denen Ribeye-GST aufgetragen wurde, lassen sich für beide verwendete Antikörper deutliche Proteinsignale erkennen. Die Abschnitte mit purem GST geben kein Signal.

B: Ohne Stripping wurde die Membran nachfolgend mit Anti-GST inkubiert. Dabei ergeben sich nun auch für die reinen GST-Abschnitte Signale.

Im Anschluss sollte die gebundene Untereinheit der B-Domäne noch weiter eingegrenzt werden. Dafür wurden Fusionsproteine eingesetzt, die einmal entweder die Substratbindungsdomäne (SBD) oder die NADH-Bindungsdomäne (NBD) enthalten oder ein Ribeye-Konstrukt ohne den C-Terminus von Ribeye, im nachfolgenden ΔC -Term genannt, enthielten. Diese Proteine wurden als Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und gereinigt, wie Kapitel 2.2.6. beschrieben. Durch Inkubation mit den beiden experimentellen Antikörpern 10F8 und 13B5 sollte so nachgewiesen werden, an welche der Subdomänen diese Antikörper binden.

Dafür wurden diese Proteine für Western Blot Untersuchungen eingesetzt. GST allein diente als Kontrollprotein, um Kreuzreaktionen mit GST weiterhin auszuschließen. Eine der beiden Nitrozellulosemembranen wurde mit 10F8 über Nacht inkubiert, die andere Membran mit 13B5, jeweils in einer Verdünnung 1:100. Nach einstündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper GaM-Pox und anschließendem Waschvorgang wurden die beiden Membranen unter Verwendung von ECL-Lösungen im GelDoc entwickelt. Hierbei konnte für beide Antikörper eine Bindung ausschließlich an die SBD-Domäne gezeigt werden, da nur dort eine

kräftige Bande und weitere Bruchstücke des Proteins zu erkennen sind. Alle anderen Untereinheiten der B-Domäne von Ribeye haben keine Bindung mit den beiden Antikörpern gezeigt. Die Membranen wurden im Anschluss ohne Stripping mit dem primären Antikörper Anti-GST über Nacht inkubiert und erneut nach Inkubation mit GaM-Pox entwickelt, um zu zeigen, dass überall Protein aufgetragen wurde und dort keine Bindung mit dem jeweiligen experimentellen Antikörper 10F8 bzw. 13B5 entstanden ist.



Legende auf der nächsten Seite

Abbildung 47 Bindungsexperimente mit Fusionsproteinen im Western Blot

Es wurden die Untereinheiten von Ribeye(B): GST, NBD, SBD und der gesamten B-Domäne mit Ausnahme des C-Terms, im nachfolgenden Δ C-Term genannt, aufgetragen. Im Anschluss wurde die komplette Membran mit den experimentellen Antikörpern 10F8 und 13B5 inkubiert. Nach Dokumentation der jeweiligen Bindungen wurde die gesamte Membran mit Anti-GST (als Ladungskontrolle) inkubiert und erneut entwickelt.

A: Es wird die Membran nach Inkubation mit dem Antikörper 10F8 gezeigt, dieser bindet nur an den SBD-Teil der B-Domäne, es sind ansonsten keine Signale zu erkennen.

B: Diese Membran wurde nach der Inkubation mit 10F8 ohne Stripping mit Anti-GST inkubiert und erneut entwickelt. Dabei ergeben sich nun auch für die Signale der GST-Abschnitte. Somit kann gezeigt werden, dass überall Protein aufgetragen war.

C: Es wird die Membran nach Inkubation mit dem Antikörper 13B5 gezeigt, dieser bindet nur an den SBD-Teil der B-Domäne, es sind ansonsten keine Signale zu erkennen.

D: Diese Membran wurde nach der Inkubation mit 13B5 ohne Stripping mit Anti-GST inkubiert und erneut entwickelt. Dabei ergeben sich nun auch für die Signale der GST-Abschnitte. Somit kann gezeigt werden, dass überall Protein aufgetragen war.

Da in den Immunfluoreszenzen des Cerebellums für die primären Antikörper 10F8 und 13B5 zunächst Signale zu sehen waren, wurde ebenfalls ein Western Blot mit dem Lysat eines Cerebellums der Maus durchgeführt. Zur Kontrolle wurde 2D9 eingesetzt, der die B-Domäne von Ribeye und damit auch CtBP2 erkennt (siehe Einleitung). Allerdings zeigten sich hierbei keine Banden für die beiden experimentellen Antikörper.

3.5 Pepspot-Analysen

Durch eine exakte Bestimmung des Epitops sollte gezeigt werden, ob die Aminosäuresequenz, die vom Antikörper erkannt wird, eventuell sowohl in Ribeye- als auch in RIM-Bindungsprotein-Epitopen vorkommt. Außerdem lässt sich durch den Einsatz von Peptide Arrays (Pepspots) besonders gut mögliche Kreuzreaktionen durch ähnliche Epitope der Antikörper beweisen. Beim RIM-Bindungsprotein (Rim-BP) handelt es sich um ein Protein innerhalb eines großen, präsynaptischen Proteinkomplexes der Synapse, wo es mit anderen Proteinen wie Bassoon, weiteren Teilen der Rim-Familie, aber auch Calciumkanälen interagiert (Kaeser *et al.*, 2011; Davydova *et al.*, 2014; Acuna *et al.*, 2015). Rim-BP wurde als Vergleichskontrolle eingesetzt.

Die aufgetragenen Peptidfragmente waren jeweils 18 Aminosäuren lang und überlappend aufgetragen, wobei diese Überlappung immer fünf Aminosäuren betrug. Nach der Aktivierung mit Methanol werden die Membranen zunächst für zwei Stunden in einer Mischung aus Triton X-100 und PBS inkubiert. Danach folgt eine Absättigung der Membranen in einer Lösung von BSA in PBS, bevor die Membranen über Nacht mit den jeweiligen primären Antikörpern 10F8 bzw. 13B5 inkubiert wurden. Für 10F8 betrug die Verdünnung hierbei 1:20000 und für 13B5

1:10000. Die Auswertung erfolgte nach einstündiger Inkubation mit GaM-Pox (1:2000) mit dem GelDoc unter Einsatz von beiden ECL-Lösungen.

Sowohl für 10F8 als auch für 13B5 wird bei der Entwicklung des Blots sichtbar, dass das Hauptpeptid im C-Terminus beim Peptidfragment mit der Nummer A64 liegt und damit im Bereich der B-Domäne von Ribeye liegt.

Bei 10F8 reagieren keine weiteren Peptidspots mit dem Antikörper, bei den RIM-BP Peptiden zeigt der Antikörper keinerlei Reaktivität auf.

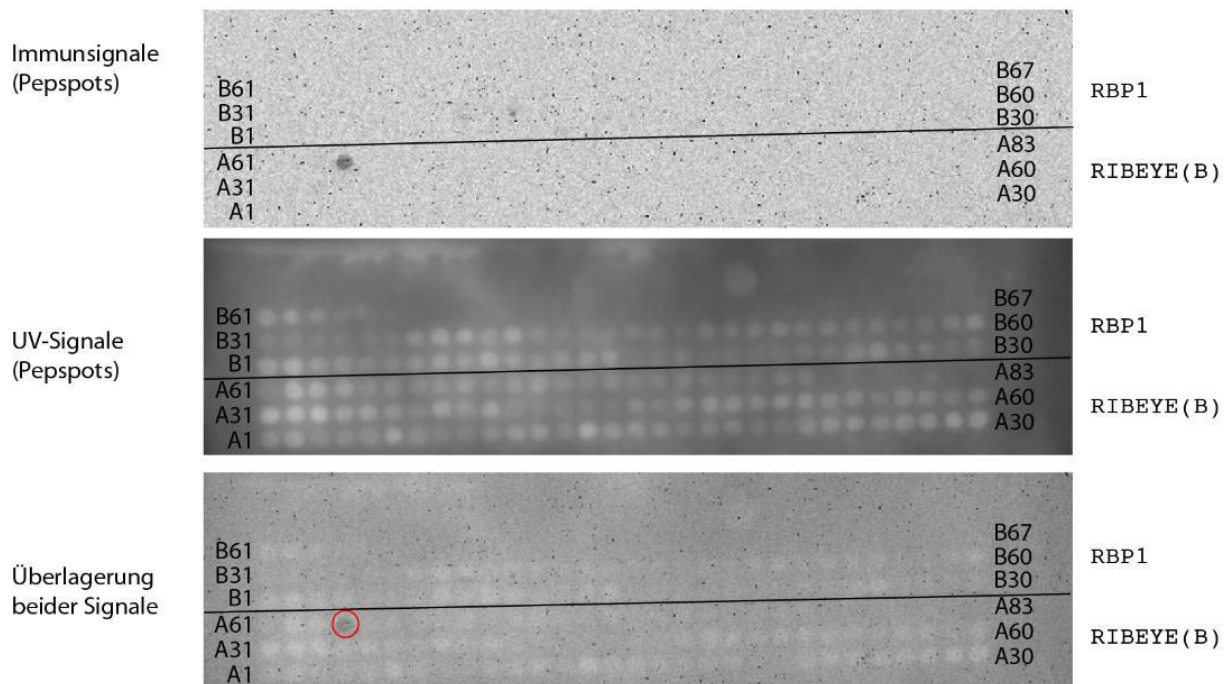


Abbildung 48 Ergebnisse des Pepsots für 10F8 in der Verdünnung 1:20.000

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Immunsignale des Pepsots für den monoklonalen Antikörper 10F8. In jeder Zeile sind mehrere Spots aufgetragen, die aus Platzgründen nur am Anfang und Ende der jeweiligen Zeile beschriftet sind. Es zeigt sich ein deutliches Signal auf dem Platz A64. Im mittleren Abschnitt sind die Ergebnisse der UV-Signale zu sehen, die an verschiedenen Stellen reagieren. Eine Überlagerung beider Signale führt zu dem unteren Abschnitt des Bildes. A64 zeigt hierbei die deutlichste Reaktion.

Die Immunsignale bei 13B5 zeigen noch eine weitere Reaktivität mit Peptid A38, jedoch ist auch hier das kräftigste Signal nach Überlagerung beider Expositionen (Immunsignal und UV-Signal) ebenfalls bei A64 auszumachen. Damit binden beide Proteine an das gleiche Epitop innerhalb von Ribeye(B). Die Sequenz des entsprechenden Epitops lautet AAATEIRRAITGRIPESL in der gängigen Einbuchstabencodierung der Aminosäuren.

Kürzel	Name	Kürzel	Name	Kürzel	Name
A	Alanin	G	Glycin	P	Prolin
R	Arginin	H	Histidin	S	Serin
N	Asparagin	I	Isoleucin	T	Threonin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	W	Tryptophan
C	Cystein	K	Lysin	Y	Tyrosin
Q	Glutamin	M	Methionin	V	Valin
E	Glutaminsäure	F	Phenylalanin		

Tabelle 5 Einbuchstabencodierung der Aminosäuren

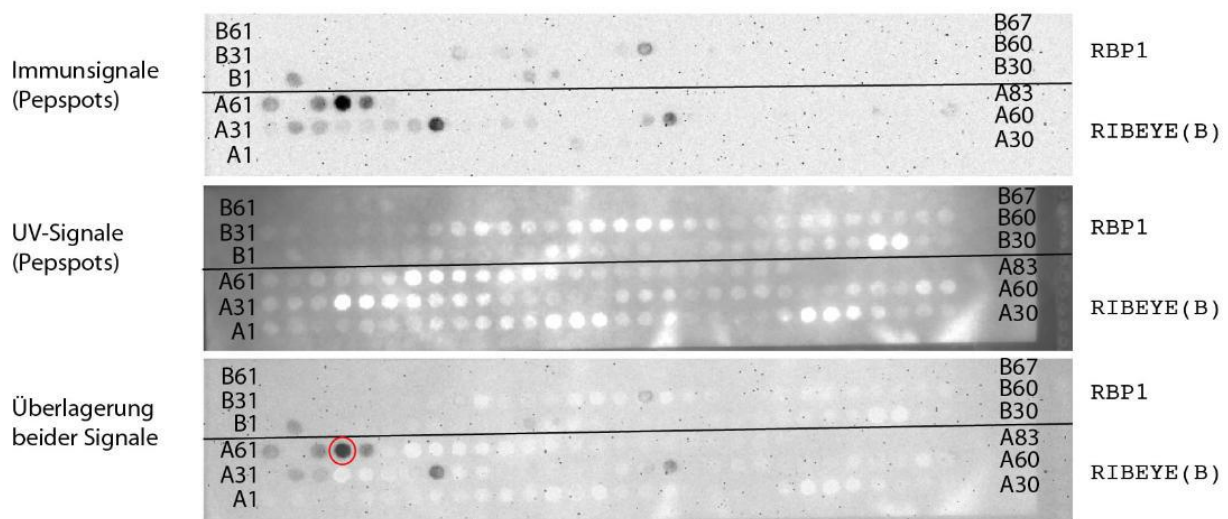


Abbildung 49: Pepsot-Ergebnis von 13B5 in einer Verdünnung von 1:10.000

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Immunsignale des Pepsots für den monoklonalen Antikörper 13B5. In jeder Zeile sind mehrere Spots aufgetragen, die aus Platzgründen nur am Anfang und Ende der jeweiligen Zeile beschriftet sind. Es zeigen sich leichte Reaktionen auf einigen Spots, jedoch sind kräftige Signale bei A64 und A38 zu erkennen. Im mittleren Abschnitt sind die Ergebnisse der UV-Signale zu sehen, die an verschiedenen Stellen reagieren. Eine Überlagerung beider Signale führt zu dem unteren Abschnitt des Bildes. A64 zeigt hierbei die deutlichste Reaktion.

4 Diskussion

Damit so wichtige Funktionen wie Sehen und Hören problemlos ablaufen können, sind Ribbonsynapsen und deren korrekte Funktionsweise entscheidend. Ribbonsynapsen sind eine Sonderform von chemischen Synapsen, die tonische Transmitterfreisetzung auf einem konstant hohen Niveau durchführen (Heidelberger *et al.*, 2005; Schmitz, 2009). Um die genauen Abläufe verstehen zu können, ist es wichtig, den genauen Aufbau und die Funktion der einzelnen synaptischen Komponenten zu kennen. Als präsynaptische Spezialisierung innerhalb der Ribbonsynapse fungieren synaptische Ribbons, die an der aktiven Zone verankert sind (Sterling und Matthews, 2005). Die dauerhaft aktive Ribbonsynapse benötigt einen ständigen Nachschub an mit Neurotransmitter gefüllten Vesikeln, um die Transmitterausschüttung konstant aufrecht zu erhalten. Die synaptischen Ribbons sind in diesen Funktionskreislauf stark eingebunden und scheinen unter anderem den Nachschub an synaptischen Vesikeln zu garantieren (Jackman *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Maxeiner *et al.*, 2016). Als Hauptkomponente der synaptischen Ribbons ist Ribeye dabei ein elementares Ziel vieler Forschungsansätze und konnte in den letzten Jahren immer wieder als Interaktionspartner für verschiedenste Prozesse innerhalb der Ribbonsynapse identifiziert werden (Schmitz *et al.*, 2000; Magupalli *et al.*, 2008; Sheets *et al.*, 2011; Schwarz und Schmitz, 2017; Müller *et al.*, 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neue, weitere Ribeye-Antikörper namens 10F8 und 13B5 charakterisiert. Zunächst konnten in Immunfluoreszenz-Experimenten auf Semidünnschnitten sowie auf Kryostatschnitten von Retinagewebe aus der Maus Immunfluoreszenzmarkierungen lokalisiert werden. Es konnte dabei gezeigt werden, dass beide Antikörper in der Retina zu deutlichen und kräftigen Signalen innerhalb der beiden plexiformen Synapsenschichten führen. Wie auch bei den bereits vorbeschriebenen Ribeye-Antikörpern 2D9 und U2656 kommt es hierbei sowohl zur Ausbildung des charakteristischen hufeisenförmigen Signals innerhalb der äußeren plexiformen Schicht als auch zu den punktförmigen Signalen in der inneren plexiformen Schicht. In eben diesen Schichten befinden sich innerhalb der Retina die Ribbonsynapsen.

Um die untersuchten Antikörper exakt zu charakterisieren, wurden zusätzlich noch Doppelfluoreszenz-Experimente durchgeführt. Somit konnte die Position der beiden Antikörper mit den Signalen anderer bereits vorbeschriebener Antikörper verglichen werden. Als zusätzliche Antikörper wurden Antikörper gegen Synaptotagmin 1 (V216), PSD-95, Cav1.4 C-Term und Ribeye (U2656) eingesetzt. Die Kollokationen der eingesetzten Antikörper in Bezug auf 10F8 bzw. 13B5 sprechen für funktionelle Interaktionen der markierten Proteine

untereinander und entsprechen dem bisherigen Forschungsstand bezüglich der Kolo­kalisierung mit Ribeye.

Zusätzlich wurden bei allen Experimenten eine Positivkontrolle mit dem monoklonalen Ribeye-Antikörper 2D9 und eine Negativkontrolle mit PBS statt eines primären Antikörpers mitgeführt, die verwendeten sekundären Antikörper blieben dabei unverändert. Durch diese Kontrollexperimente konnte im Falle der Positivkontrolle gewährleistet werden, dass das Experiment an sich funktioniert hat, im Falle der Negativkontrolle wurde ein reines Signal durch die sekundären Antikörper bzw. andere Kontaminationen ausgeschlossen. Zudem wurden die gleichen Experimente nicht nur an Retinae von Mäusen durchgeführt, sondern auch Retinae von Rindern verwendet. Die Untersuchungen an den beiden verschiedenen Spezies führten übereinstimmend zu sehr vergleichbaren Ergebnissen, nämlich zu einer kräftigen Markierung der synaptischen Ribbons.

Schließlich wurden die Experimente an der Retina auch mit Ribeye-KO-Mäusen wiederholt. Bei diesen Mäusen wurde mittels gentechnischer Veränderungen das Ribeye-Gen ausgeschaltet, sodass keine Ribbons im Versuchstier ausgebildet werden. Alle anderen präsynaptischen Strukturen erscheinen jedoch unverändert (Maxeiner *et al.*, 2016). Ein Immunfluoreszenzsignal in der Retina einer dieser Mäuse mit ausgeschaltetem Ribeye-Gen würde folglich gegen eine Bindung des verwendeten Antikörpers an Ribeye sprechen. In den Versuchen konnte allerdings gezeigt werden, dass in den Knockout-Mäusen kein Signal für beide Antikörper in der Synapse mehr zu beobachten ist. Mit diesem Ergebnis konnte somit die Spezifität der beiden Antikörper für Ribeye zweifelsfrei bewiesen werden. Mit diesem Ergebnis ist es daher ausgeschlossen, dass es sich bei dem gezeigten Signal um ein unspezifisches oder falsches Signal handelt. Die Antikörper 10F8 und 13B5 binden beide mit großer Affinität spezifisch an Ribeye.

Beide Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen auch in Immungoldfärbung in der Elektronenmikroskopie getestet, wobei für 10F8 ein starkes Signal innerhalb der Ribbons nachgewiesen werden konnte. Daher ist 10F8 auch für weitere Experimente innerhalb der Elektronenmikroskopie von Bedeutung, da nicht jeder Antikörper bei dieser Art von Färbung funktioniert, die Elektronenmikroskopie aber eine hochauflösende Darstellung erlaubt. 10F8 könnte daher auch als Alternative zu dem monoklonalen Ribeye(B)-Antikörper 2D9 eingesetzt werden.

Durch Western Blot-Analysen mit Retinalysat vom Rind konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass beide Antikörper tatsächlich Ribeye nachweisen. Ribeye besteht aus zwei Domänen, der einzigartigen aminoterminalen A-Domäne und der carboxyterminalen B-Domäne, die zu großen Teilen mit CtBP2 identisch ist (Schmitz *et al.*, 2000). Während die A-

Domäne eher eine strukturelle Rolle übernimmt, bindet die B-Domäne NAD(H) und interagiert mit verschiedenen Proteinen innerhalb der präsynaptischen Terminale (Schmitz *et al.*, 2000; tom Dieck *et al.*, 2005; Alpadi *et al.*, 2008; Magupalli *et al.*, 2008).

In den weiteren Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die beiden neuen Antikörper 10F8 und 13B5 an die Ribeye-B-Domäne binden. Dabei wurde ebenfalls belegt, dass es sich nicht um eine Bindung an das an Ribeye(B) gekoppelte GST handelt, indem dieses in reiner Form ebenfalls aufgetragen wurde, wobei keine Bindung zu verzeichnen war. Daher konnte auch im Western Blot bestätigt werden, dass die Antikörper spezifisch an die Ribeye B-Domäne binden. Strukturanalysen haben gezeigt, dass sich innerhalb der B-Domäne eine Substratbindungsdomäne (SBD) und eine NADH-Bindungsdomäne (NBD) voneinander unterscheiden lassen (Kumar *et al.*, 2002; Nardini *et al.*, 2003). Daher wurden diese Untereinheiten von Ribeye(B) als Fusionsprotein exprimiert und im Western Blot auf ihre Reaktivität mit den neuen Antikörpern getestet. Nur für SBD, also der substratbindenden Domäne, konnte eine Reaktion bei Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern gezeigt werden. 10F8 und 13B5 können somit als Ribeye-Antikörper charakterisiert werden, die an die SB-Domäne binden. In weiteren zukünftigen Experimenten könnte noch untersucht werden, an welche spezifische Region von SBD die Antikörper binden und hierbei eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Antikörpern aufgezeigt werden.

Abschließend wurde in Pepspot-Analysen das Epitop der Bindung bestimmt. Dabei wurde außer der Aminosäuresequenz von Ribeye(B) auch für den Vergleich die Aminosäuresequenz von Rim-Bindungsprotein als zusätzliche Kontrolle (Rim-BP) aufgetragen. Rim-BP ist Teil eines großen, präsynaptischen Proteinkomplexes, wo es mit anderen Proteinen wie Bassoon, aber auch Calciumkanälen interagiert (Kaeser *et al.*, 2011; Davydova *et al.*, 2014; Acuna *et al.*, 2015). Im Pepspot wurden beide Membranstreifen unter gleichen Bedingungen inkubiert, die deutlichste Übereinstimmung fand sich dabei für beide Antikörper wie schon zuvor im Bereich der B-Domäne von Ribeye. Im Overlay der Immun- und UV-Signale gab es im Bereich des Epitops AAATEIRRAITGRIPESL eine deutliche Markierung durch die Antikörper.

Um eventuell bisher unentdeckte Komponenten oder Untereinheiten von Ribeye auch in anderen Organsystemen zu identifizieren, wurden die gleichen Experimente wie zuvor an der Retina auch an Gewebe aus dem Cerebellum durchgeführt. Zunächst konnten dabei auch punktförmige Signale innerhalb aller Schichten der Kleinhirnrinde gefunden werden. Darüber hinaus waren vor allem die Purkinje-Zellen in dieser experimentellen Reihe gut zu erkennen. In der mitgeführten Negativkontrolle wurden die punktförmigen Signale nicht detektiert und auch die Purkinje-Zellen waren nicht angefärbt. Dementsprechend wurde zunächst davon ausgegangen, dass auch im Cerebellum eine Untereinheit von Ribeye zu finden ist. Allerdings

konnte in der Knockout-Kontrolle die Spezifität des Signals leider nicht bestätigt werden. Dabei ist jedoch auffällig, dass in der Knockout-Kontrolle keine Purkinje-Zellen angefärbt werden, obwohl die gleichen primären und sekundären Antikörper verwendet wurden, wie in Abbildung 41 zu sehen.

Interessant ist hierbei, dass bei der Anfärbung mit den experimentellen Antikörpern der Zellkern der Purkinje-Zellen nicht angefärbt wurde. Die B-Domäne von Ribeye weist große Ähnlichkeit mit CtBP2 auf. Dabei handelt es sich um ein C-terminales Bindungsprotein (CtBP), das als Transkriptionsregulator in Zellkernen fungiert und mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert (Turner und Crossley, 1998; Grootclaes und Frisch, 2000; Chinnadurai, 2002; Stankiewicz *et al.*, 2014). In einer Untersuchung von Hübler *et al.* (2012) wurden die Expressionsmuster von Mitgliedern der CtBP-Familie in Gehirnen von Nagetieren dokumentiert. Dabei wurde ebenfalls im Cerebellum festgestellt, dass CtBP2 sich nicht im Kern von Purkinje-Zellen nachweisen lässt. Somit könnte eine mögliche Erklärung für die Signale im Kleinhirn der Maus sein, dass die Antikörper 10F8 bzw. 13B5 innerhalb des Cerebellums aufgrund der Abwesenheit von Ribeye stattdessen das sehr ähnliche CtBP2 markieren. In den Western Blot-Analysen mithilfe von Cerebellumlysat aus der Maus konnte jedoch keine Proteinbande innerhalb des Cerebellums von den Antikörpern markiert werden, was wiederum für eine unspezifische Reaktion spricht.

Weitere Studien müssen zeigen, ob durch die Antikörper tatsächlich bei Abwesenheit von Ribeye stattdessen CtBP2 markiert wird. Eine CtBP2-Knockout-Kontrolle ist jedoch nicht möglich, da die Tiere nicht lebensfähig wären. Statt eines Western Blots könnte beispielsweise die ELISA-Methode genutzt werden, die bereits geringe Proteinmengen nachweisen kann und als sensitiver gilt. Zusätzlich könnten ultrastrukturelle Untersuchungen beispielsweise mithilfe der Elektronenmikroskopie weitere Aufschlüsse zu dieser Fragestellung liefern. Zusammengefasst sprechen die bisherigen Befunde der fehlenden Proteinbande sowie die nahezu identischen Signale in der Knockout-Kontrolle des Kleinhirns allerdings insgesamt für ein unspezifisches Signal im Cerebellum. Insgesamt ist davon auszugehen, dass die Signale im Cerebellum aufgrund der Immunmarkierungen im Ribeye-Knockout keine Verbindung zu Ribeye haben.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die neu entdeckten Antikörper 10F8 und 13B5 zu charakterisieren und analysieren. Dies ist für die Retina abschließend gelungen, womit die Antikörper zukünftig als Alternative beispielsweise für den Ribeye-Antikörper 2D9 genutzt werden können. Durch ihr starkes Signal sowohl in der inneren als auch äußeren plexiformen Schicht sind gute Ergebnisse möglich, insbesondere in weiteren Doppelimmunfluoreszenz-Experimenten. 10F8 kann zudem in hochauflösenden Darstellungen in der

Elektronenmikroskopie eingesetzt werden. Somit können mit den beiden neuen Antikörpern die Mechanismen innerhalb der Ribbonsynapsen weiter erforscht werden und daher bei der weiteren Charakterisierung des Ribbonkomplexes in der Retina von Nutzen sein.

5 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	circa
C-Terminale	Carboxyterminale
CtBP2	C-terminales Bindungsprotein 2
et al.	et alii (und andere)
g	Gramm
ggf.	Gegebenenfalls
H ₂ O	Wasser
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
NPG	N-Propylgallat
N-Terminale	Aminoternale
PBS	Phosphate Buffered Saline
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV2	synaptisches Vesikelprotein 2
V	Volt
ZNS/CNS	Zentrales Nervensystem / central nervous system
pl	

6 Literaturverzeichnis

Abramov, I. und Gordon, J. (1994) 'Color appearance: On seeing red-or yellow, or green, or blue', *Annu.Rev.Psychol.*, 45, pp. 451–485. doi:10.1146/annurev.ps.45.020194.002315.

Acuna, C. *et al.* (2015) 'RIM-BPs Mediate Tight Coupling of Action Potentials to Ca²⁺-Triggered Neurotransmitter Release', *Neuron*, 87(6), pp. 1234–1247. doi:10.1016/j.neuron.2015.08.027.

Alpadi, K. *et al.* (2008) 'RIBEYE recruits Munc119, a mammalian ortholog of the *Caenorhabditis elegans* protein unc119, to synaptic ribbons of photoreceptor synapses', *Journal of Biological Chemistry*, 283(39), pp. 26461–26467. doi:10.1074/jbc.M801625200.

Alpha Lifetech (Verwendung mit freundlicher Genehmigung) *Abbildung Schema eines überlappenden Pepsots*. verfügbar auf: <http://www.alpha-lifetech.com/lifetech/pg-Overlapping-Peptide-Array-Service> (aufgerufen am 22.02.2020)

Bacaj, T. *et al.* (2015) 'Synaptotagmin-1 and -7 Are Redundantly Essential for Maintaining the Capacity of the Readily-Releasable Pool of Synaptic Vesicles', *PLoS Biology*, 13(10), pp. 1–26. doi:10.1371/journal.pbio.1002267.

Becker, L. *et al.* (2018) 'The presynaptic ribbon maintains vesicle populations at the hair cell afferent fiber synapse', *eLife*, 7, pp. 1–26. doi:10.7554/eLife.30241.

Behrends, J. *et al.* (2021) *Duale Reihe Physiologie*. 4. Thieme.

Brown, R.E. *et al.* (2008) *Eye, Retina, and Visual System of the Mouse*. 1. MIT Press Ltd.

Buckley, K. und Kelly, R.B. (1985) 'Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells', *Journal of Cell Biology*, 100(4), pp. 1284–1294. doi:10.1083/jcb.100.4.1284.

Buraei, Z. und Yang, J. (2010) 'The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels', *Physiological Reviews*, 90(4), pp. 1461–1506. doi:10.1152/physrev.00057.2009.

Burns, M.E. und Baylor, D.A. (2001) 'Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells', *Annu Rev Neurosci*, 24, pp. 779–805.

Catterall, W.A. (2011) 'Voltage-gated calcium channels', *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 3, pp. 1–4. doi:10.1016/B978-008055232-3.60392-7.

- Chapman, E.R. *et al.* (1995) 'Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1', *Journal of Biological Chemistry*, 270(40), pp. 23667–23671. doi:10.1074/jbc.270.40.23667.
- Chen, M. *et al.* (2013) 'Properties of ribbon and non-ribbon release from rod photoreceptors revealed by visualizing individual synaptic vesicles', *Journal of Neuroscience*, 33(5), pp. 2071–2086. doi:10.1523/JNEUROSCI.3426-12.2013.
- Chen, X. *et al.* (2005) 'Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32), pp. 11551–11556. doi:10.1073/pnas.0505359102.
- Chinnadurai, G. (2002) 'CtBP, an unconventional transcriptional repressor in development and oncogenesis', *Molecular Cell*, 9(2), pp. 213–224. doi:10.1016/S1097-2765(02)00443-4.
- Choi, S. *et al.* (2008) 'Light regulation of Ca²⁺ in the cone photoreceptor synaptic terminal', *Visual Neuroscience*, 25, pp. 693–700.
- Davydova, D. *et al.* (2014) 'Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca²⁺ channels via RIM-binding protein', *Neuron*, 82(1), pp. 181–194. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.012.
- DeGiorgis, J.A. *et al.* (2006) 'Distribution of the scaffolding proteins PSD-95, PSD-93, and SAP97 in isolated PSDs', *Brain Cell Biology*, 35(4–6), pp. 239–250. doi:10.1007/s11068-007-9017-0.
- Deguchi-Tawarada, M. *et al.* (2006) 'Active zone protein CAST is a component of conventional and ribbon synapses in mouse retina', *Journal of Comparative Neurology*, 495(4), pp. 480–496. doi:10.1002/cne.20893.
- Dembla, E. *et al.* (2020) 'Synaptic ribbons foster active zone stability and illumination-dependent active zone enrichment of RIM2 and Cav1.4 in photoreceptor synapses', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–20. doi:10.1038/s41598-020-62734-0.
- Dembla, M. *et al.* (2018) 'Early auto-immune targeting of photoreceptor ribbon synapses in mouse models of multiple sclerosis', *EMBO Molecular Medicine*, 10(11). doi:10.15252/emmm.201808926.
- Doering, C.J., Peloquin, J.B. and McRory, J.E. (2007) 'The CaV1.4 calcium channel: More than meets the eye', *Channels*, 1(1), pp. 4–11. doi:10.4161/chan.3938.
- Dowling, J.E. and Hipsps, H. (1973) 'Effect of magnesium on horizontal cell activity in the skate retina', *Nature*, 241, pp. 101–103. doi:10.1038/242101a0.

- Drenckhahn, D. und Franz, H. (1986) 'Identification of actin-, α -actinin-, and vinculin-containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells', *Journal of Cell Biology*, 102(5), pp. 1843–1852. doi:10.1083/jcb.102.5.1843.
- Feigenspan, A. (2017) *Prinzipien der Physiologie*. Springer Spektrum.
- Feng, W. und Zhang, M. (2009) 'Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density', *Nature Reviews Neuroscience*, 10(2), pp. 87–99. doi:10.1038/nrn2540.
- Fernández-Chacón, R. *et al.* (2001) 'Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability', *Nature*, 410(6824), pp. 41–49. doi:10.1038/35065004.
- Geppert, M. *et al.* (1994) 'Synaptotagmin I: A major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse', *Cell*, 79(4), pp. 717–727. doi:10.1016/0092-8674(94)90556-8.
- Von Gersdorff, H. (2001) 'Synaptic ribbons: Versatile signal transducers', *Neuron*, 29(1), pp. 7–10. doi:10.1016/S0896-6273(01)00175-1.
- Von Gersdorff, H. und Mathews, G. (1994) 'Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals', *Nature*, 367(6465), pp. 735–739. doi:10.1038/367735a0.
- Grabner, C.P. *et al.* (2015) 'RIM1/2-mediated facilitation of *cav1.4* channel opening is required for Ca^{2+} -stimulated release in mouse rod photoreceptors', *Journal of Neuroscience*, 35(38), pp. 13133–13147. doi:10.1523/JNEUROSCI.0658-15.2015.
- Graydon, C.W. *et al.* (2011) 'Sharp Ca^{2+} Nanodomains beneath the ribbon promote highly synchronous multivesicular release at hair cell synapses', *Journal of Neuroscience*, 31(46), pp. 16637–16650. doi:10.1523/JNEUROSCI.1866-11.2011.
- Grooteclaes, M.L. und Frisch, S.M. (2000) 'Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis', *Oncogene*, 19(33), pp. 3823–3828. doi:10.1038/sj.onc.1203721.
- Han, W. *et al.* (2004) 'N-Glycosylation Is Essential for Vesicular Targeting of Synaptotagmin 1', *Neuron*, 41(1), pp. 85–99. doi:10.1016/S0896-6273(03)00820-1.
- Harsman, A. *et al.* (2011) 'Calmodulin regulation of the calcium-leak channel Sec61 is unique to vertebrates', *Channels*, 5(4). doi:10.4161/chan.5.4.16160.
- Haucke, V. (2000) 'Dual interaction of synaptotagmin with micro2- and alpha-adaptin facilitates clathrin-coated pit nucleation', *The EMBO Journal*, 19(22), pp. 6011–6019. doi:10.1093/emboj/19.22.6011.

- Heidelberger, R. und Matthews, G. (1992) 'Calcium Influx and Calcium Current in Single Synaptic', *Journal of Physiology*, 447, pp. 235–256.
- Heidelberger, R., Thoreson, W.B. und Witkovsky, P. (2005) 'Synaptic transmission at retinal ribbon synapses', *Progress in Retinal and Eye Research*, 24(6), pp. 682–720. doi:10.1016/j.preteyeres.2005.04.002.
- Hilpert, K., Winkler, D.F.H. und Hancock, R.E.W. (2007) 'Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion', *Nature Protocols*, 2(6), pp. 1333–1349. doi:10.1038/nprot.2007.160.
- Hübner, D. *et al.* (2012) 'Differential spatial expression and subcellular localization of CtBP family members in Rodent Brain', *PLoS ONE*, 7(6). doi:10.1371/journal.pone.0039710.
- Irie, M. *et al.* (1997) 'Binding of neuroligins to PSD-95', *Science*, 277(5331), pp. 1511–1515. doi:10.1126/science.277.5331.1511.
- Jackman, S.L. *et al.* (2009) 'Role of the synaptic ribbon in transmitting the cone light response', *Nature Neuroscience*, 12(3), pp. 303–310. doi:10.1038/nn.2267.
- Jarsky, T., Tian, M. und Singer, J.H. (2010) 'Nanodomain control of exocytosis is responsible for the signaling capability of a retinal ribbon synapse', *Journal of Neuroscience*, 30(36), pp. 11885–11895. doi:10.1523/JNEUROSCI.1415-10.2010.
- Jean, P. *et al.* (2018) 'The synaptic ribbon is critical for sound encoding at high rates and with temporal precision', *eLife*, 7, pp. 1–39. doi:10.7554/eLife.29275.
- Johnston, P.A., Jahn, R. und Südhof, T.C. (1989) 'Transmembrane topography and evolutionary conservation of synaptophysin', *Journal of Biological Chemistry*, 264(2), pp. 1268–1273.
- Joselevitch, C. und Zenisek, D. (2020) 'Direct observation of vesicle transport on the synaptic ribbon provides evidence that vesicles are mobilized and prepared rapidly for release', *Journal of Neuroscience*, 40(39), pp. 7390–7404. doi:10.1523/JNEUROSCI.1257-20.2020.
- Kaesler, P.S. *et al.* (2011) 'RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction', *Cell*, 144(2), pp. 282–295. doi:10.1016/j.cell.2010.12.029.
- Khimich, D. *et al.* (2005) 'Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling', *Nature*, 434(7035), pp. 886–889. doi:10.1038/nature03393.

- Kim, E. *et al.* (1997) 'GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules', *Journal of Cell Biology*, 136(3), pp. 669–678. doi:10.1083/jcb.136.3.669.
- Kornau, H. *et al.* (1995) 'Domain Interaction Between NMDA Receptor Subunits and the Postsynaptic Density Protein PSD-95', *Science*, pp. 28–31.
- Koulen, P. *et al.* (1998) 'Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina', *Journal of Neuroscience*, 18(23), pp. 10136–10149. doi:10.1523/jneurosci.18-23-10136.1998.
- Kriegstein, K. und Schmitz, F. (2003) 'The expression pattern and assembly profile of synaptic membrane proteins in ribbon synapses of the developing mouse retina', *Cell and Tissue Research* [Preprint]. doi:10.1007/s00441-002-0674-0.
- Kumar, V. *et al.* (2002) 'Transcription corepressor CtBP is an NAD⁺-regulated dehydrogenase', *Molecular Cell*, 10(4), pp. 857–869. doi:10.1016/S1097-2765(02)00650-0.
- Lagnado, L., Gomis, A. und Job, C. (1996) 'Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells', *Neuron*, 17(5), pp. 957–967. doi:10.1016/S0896-6273(00)80226-3.
- Lagnado, L. und Schmitz, F. (2015) 'Ribbon Synapses and Visual Processing in the Retina', *Annual Review of Vision Science* [Preprint]. doi:10.1146/annurev-vision-082114-035709.
- Lenzi, D. und Von Gersdorff, H. (2001) 'Structure suggests function: The case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines', *BioEssays*, 23(9), pp. 831–840. doi:10.1002/bies.1118.
- Liu, X. *et al.* (2013) 'Dysregulation of Cav1.4 channels disrupts the maturation of photoreceptor synaptic ribbons in congenital stationary night blindness type 2', *Channels*, 7(6), pp. 514–523. doi:10.4161/chan.26376.
- Löhner, M. *et al.* (2017) 'Analysis of RIM expression and function at mouse photoreceptor ribbon synapses', *Journal of Neuroscience*, 37(33), pp. 7848–7863. doi:10.1523/JNEUROSCI.2795-16.2017.
- Magupalli, V.G. *et al.* (2008) 'Multiple RIBEYE-RIBEYE interactions create a dynamic scaffold for the formation of synaptic ribbons', *Journal of Neuroscience*, 28(32), pp. 7954–7967. doi:10.1523/JNEUROSCI.1964-08.2008.
- Matthews, G. und Fuchs, P. (2010) 'The diverse role of ribbon synapses in sensory neurotransmission', *Nat Rev Neurosci.*, 83(1), pp. 1–11. doi:10.1016/j.earlhumdev.2006.05.022.

- Maxeiner, S. *et al.* (2016) 'How to make a synaptic ribbon: RIBEYE deletion abolishes ribbons in retinal synapses and disrupts neurotransmitter release', *The EMBO Journal*, 35(10), pp. 1098–1114. doi:10.15252/embj.201592701.
- Mayor, D.; Hampton, J.; Rosario, B. (1961) 'A SIMPLE METHOD FOR REMOVING THE RESIN FROM EPOXY-EMBEDDED TISSUE', *J Biophys Biochem Cytol*, pp. 909–910.
- Mennerick, S. und Matthews, G. (1996) 'Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons', *Neuron*, 17(6), pp. 1241–1249. doi:10.1016/S0896-6273(00)80254-8.
- Mercer, A.J., Chen, M. und Thoreson, W.B. (2011) 'Lateral mobility of presynaptic L-Type calcium channels at photoreceptor ribbon synapses', *Journal of Neuroscience*, 31(12), pp. 4397–4406. doi:10.1523/JNEUROSCI.5921-10.2011.
- Mercer, A.J. und Thoreson, W.B. (2011) 'The dynamic architecture of photoreceptor ribbon synapses: Cytoskeletal, extracellular matrix, and intramembrane proteins', *Visual Neuroscience*, 28(6), pp. 453–471. doi:10.1017/S0952523811000356.
- Moser, T. (2016) 'Eyes without a ribbon', *The EMBO Journal*, 35(10), pp. 1018–1020. doi:10.15252/embj.201694205.
- Moser, T., Brandt, A. und Lysakowski, A. (2006) 'Hair cell ribbon synapses', *Cell Tissue Res.*, 23(1), pp. 347–359. doi:10.1007/s00441-006-0276-3.Hair.
- Moser, T., Grabner, C.P. und Schmitz, F. (2020) 'Sensory processing at ribbon synapses in the retina and the cochlea', *Physiological Reviews*, 100(1), pp. 103–144. doi:10.1152/physrev.00026.2018.
- Moser, T., Neef, A. und Khimich, D. (2006) 'Mechanisms underlying the temporal precision of sound coding at the inner hair cell ribbon synapse', *Journal of Physiology*, 576(1), pp. 55–62. doi:10.1113/jphysiol.2006.114835.
- Müller, T.M. *et al.* (2019) 'A multiple piccolo-RIBEYE interaction supports plate-shaped synaptic ribbons in retinal neurons', *Journal of Neuroscience*, 39(14), pp. 2606–2619. doi:10.1523/JNEUROSCI.2038-18.2019.
- Muresan, V., Lyass, A. und Schnapp, B.J. (1999) 'The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate photoreceptors', *Journal of Neuroscience*, 19(3), pp. 1027–1037. doi:10.1523/jneurosci.19-03-01027.1999.

- Nardini, M. *et al.* (2003) 'CtBP/BARS: A dual-function protein involved in transcription co-repression and Golgi membrane fission', *EMBO Journal*, 22(12), pp. 3122–3130. doi:10.1093/emboj/cdg283.
- Neves, G. und Lagnado, L. (1999) 'The kinetics of exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish retinal bipolar cells', *Journal of Physiology*, 515(1), pp. 181–202. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.181ad.x.
- Nishimune, H. *et al.* (2012) 'Active zone protein Bassoon co-localizes with presynaptic calcium channel, modifies channel function, and recovers from aging related loss by exercise', *PLoS ONE*, 7(6), pp. 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0038029.
- Nouvian, R. *et al.* (2006) 'Structure and function of the hair cell ribbon synapse', *Journal of Membrane Biology*, 209(2–3), pp. 153–165. doi:10.1007/s00232-005-0854-4.
- Oesch, Nicholas W.; Diamond, J.S. (2011) 'Ribbon synapses compute temporal contrast and encode luminance in retinal rod bipolar cells', *Nat Neurosci*, 176(12), pp. 139–148. doi:10.1038/nn.2945.Ribbon.
- Pahlberg, J. und Sampath, A.P. (2011) 'Visual threshold is set by linear and nonlinear mechanisms in the retina that mitigate noise', *Bioessays*, 23(1), pp. 1–7. doi:10.1002/bies.201100014.Visual.
- Pang, Z.P. *et al.* (2006) 'A gain-of-function mutation in synaptotagmin-1 reveals a critical role of Ca²⁺-dependent soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex binding in synaptic exocytosis', *Journal of Neuroscience*, 26(48), pp. 12556–12565. doi:10.1523/JNEUROSCI.3804-06.2006.
- Parsons, T.D. und Sterling, P. (2003) 'Synaptic ribbon: Conveyor belt or safety belt?', *Neuron*, 37(3), pp. 379–382. doi:10.1016/S0896-6273(03)00062-X.
- Pasino, E. und Marchiafava, P.L. (1976) 'Transfer properties of rod and cone cells in the retina of the tiger salamander', *Vision Research*, 16(4), pp. 381–386. doi:10.1016/0042-6989(76)90200-5.
- Paulsen, F. und Waschke, J. (2010) *Sobotta Atlas der Anatomie*. 23.
- Perin, Mark; Fried, Victor; Mignery, Gregory; Jahn, Reinhard; Südhof, T.C. (1990) 'Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C', *Nature*, 345, pp. 260–263.

- Perin, M.S. *et al.* (1991) 'Domain structure of synaptotagmin (p65)', *Journal of Biological Chemistry*, 266(1), pp. 623–629. doi:10.1016/s0021-9258(18)52480-7.
- Raghupathy, R.K. *et al.* (2016) 'Abnormal photoreceptor outer segment development and early retinal degeneration in kif3a mutant zebrafish', *Cell Biochemistry and Function*, 34(6), pp. 429–440. doi:10.1002/cbf.3205.
- Regus-Leidig, H. *et al.* (2013) 'Identification and Immunocytochemical Characterization of Piccolino, a Novel Piccolo Splice Variant Selectively Expressed at Sensory Ribbon Synapses of the Eye and Ear', *PLoS ONE*, 8(8). doi:10.1371/journal.pone.0070373.
- Regus-Leidig, H. und Brandstätter, J.H. (2012) 'Structure and function of a complex sensory synapse', *Acta Physiologica*, 204(4), pp. 479–486. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02355.x.
- Rieke, F. und Schwartz, E.A. (1996) 'Asynchronous transmitter release: Control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse', *Journal of Physiology*, 493(1), pp. 1–8. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021360.
- Schmitz, F. (2009) 'The making of synaptic ribbons: How they are built and what they do', *Neuroscientist*, 15(6), pp. 611–624. doi:10.1177/1073858409340253.
- Schmitz, F. *et al.* (2012) 'EF hand-mediated Ca²⁺- signalling in photoreceptor synaptic terminals', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(FEBRUARY 2012), pp. 1–15. doi:10.3389/fnmol.2012.00026.
- Schmitz, F. (2014) 'Presynaptic [Ca²⁺] and GCAPs: Aspects on the structure and function of photoreceptor ribbon synapses', *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Preprint]. doi:10.3389/fnmol.2014.00003.
- Schmitz, F. und Drenckhahn, D. (1993) 'Distribution of actin in cone photoreceptor synapses', *Histochemistry*, pp. 35–40.
- Schmitz, F., Königstorfer, A. und Südhof, T.C. (2000) 'RIBEYE, a component of synaptic ribbons: A protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function', *Neuron* [Preprint]. doi:10.1016/S0896-6273(00)00159-8.
- Schnapf, J.L. und Copenhagen, D.R. (1982) 'Differences in the kinetics of rod and cone synaptic transmission', *Nature*, pp. 862–864. doi:10.1038/296862a0.
- Schwarz, K. und Schmitz, F. (2017) 'RIBEYE(B)-domain binds to lipid components of synaptic vesicles in an NAD(H)-dependent, redoxsensitive manner', *Biochemical Journal*, 474(7), pp. 1205–1220. doi:10.1042/BCJ20160886.

- Shaltiel, L. *et al.* (2012) 'Complex regulation of voltage-dependent activation and inactivation properties of retinal voltage-gated Cav1.4 L-type Ca²⁺ channels by Ca²⁺-binding protein 4 (CaBP4)', *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), pp. 36312–36321. doi:10.1074/jbc.M112.392811.
- Shankhwar, S. *et al.* (2022) 'RIBEYE B-Domain Is Essential for RIBEYE A-Domain Stability and Assembly of Synaptic Ribbons', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15(January), pp. 1–26. doi:10.3389/fnmol.2022.838311.
- Sheets, L. *et al.* (2011) 'Ribeye is required for presynaptic CaV1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells', *Development*, 138(7), pp. 1309–1319. doi:10.1242/dev.059451.
- Sheng, M. und Kim, E. (2011) 'The postsynaptic organization of synapses', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), pp. 1–20. doi:10.1101/cshperspect.a005678.
- Shin, O.H. (2014) 'Exocytosis and synaptic vesicle function', *Comprehensive Physiology*, 4(1), pp. 149–175. doi:10.1002/cphy.c130021.
- Singer, J.H. *et al.* (2004) 'Coordinated multivesicular release at a mammalian ribbon synapse', *Nature Neuroscience*, 7(8), pp. 826–833. doi:10.1038/nn1280.
- Singh, A. *et al.* (2006) 'C-terminal modulator controls Ca²⁺-dependent gating of Ca v1.4 L-type Ca²⁺ channels', *Nature Neuroscience*, 9(9), pp. 1108–1116. doi:10.1038/nn1751.
- Sjostrand, F.S. (1953) 'The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope', *Journal of cellular and comparative physiology*, 42(1), pp. 15–44. doi:10.1002/jcp.1030420103.
- Snellman, J; Mehta, B; Babai, N; Bartoletti, TM; Akmentin, W; Francis, A; Matthews, G; Thoreson, W; Zenisek, D. (2011) 'Acute destruction of the synaptic ribbon reveals a role for the ribbon in vesicle priming', *Nat Neurosci*, 14(9), pp. 1135–1141. doi:10.1038/nn.2870.Acute.
- Stankiewicz, T.R. *et al.* (2014) 'C-terminal binding proteins: Central players in development and disease', *Biomolecular Concepts*, 5(6), pp. 489–511. doi:10.1515/bmc-2014-0027.
- Sterling, P. und Matthews, G. (2005) 'Structure and function of ribbon synapses', *Trends in Neurosciences*, 28(1), pp. 20–29. doi:10.1016/j.tins.2004.11.009.
- Striessnig, J., Bolz, H.J. und Koschak, A. (2010) 'Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Ca v1.4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 460(2), pp. 361–374. doi:10.1007/s00424-010-0800-x.

- Südhof, T.C. (2004) 'The synaptic vesicle cycle', *Annual Review of Neuroscience*, 27, pp. 509–547. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.
- Südhof, T.C. (2012) 'The Presynaptic Active Zone', *Neuron*, 75(1), pp. 11–25. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.012.The.
- Sugita, S. *et al.* (2001) 'Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca²⁺ sensor in exocytosis', *Neuron*, 30(2), pp. 459–473. doi:10.1016/S0896-6273(01)00290-2.
- Thoreson, W.B. *et al.* (2004) 'A Highly Ca²⁺ -Sensitive Pool of Vesicles Contributes to Linearity at the Rod Photoreceptor Ribbon Synapse', *Neuron*, 42(4), pp. 595–605.
- Thoreson, W.B. *et al.* (2013) 'Lateral mobility of L-type calcium channels in synaptic terminals of retinal bipolar cells', *Molecular Vision*, 19(May 2012), pp. 16–24.
- tom Dieck, S. *et al.* (2005) 'Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: Physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex', *Journal of Cell Biology*, 168(5), pp. 825–836. doi:10.1083/jcb.200408157.
- tom Dieck, S. *et al.* (2012) 'Deletion of the presynaptic scaffold cast reduces active zone size in rod photoreceptors and impairs visual processing', *Journal of Neuroscience*, 32(35), pp. 12192–12203. doi:10.1523/JNEUROSCI.0752-12.2012.
- tom Dieck, S. and Brandstätter, J.H. (2006) 'Ribbon synapses of the retina', *Cell and Tissue Research*, 326(2), pp. 339–346. doi:10.1007/s00441-006-0234-0.
- Trepel, M. (2017) *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*, 7. Auflage. Elsevier.
- Turner, J. und Crossley, M. (1998) 'Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators', *EMBO Journal*, 17(17), pp. 5129–5140. doi:10.1093/emboj/17.17.5129.
- Wahl, S., Katiyar, R. und Schmitz, F. (2013) 'A local, periaxonal endocytic machinery at photoreceptor synapses in close vicinity to synaptic ribbons', *Journal of Neuroscience*, 33(25), pp. 10278–10300. doi:10.1523/JNEUROSCI.5048-12.2013.
- Wan, L., Almers, W. und Chen, W. (2005) 'Two ribeye genes in teleosts: The role of ribeye in ribbon formation and bipolar cell development', *Journal of Neuroscience*, 25(4), pp. 941–949. doi:10.1523/JNEUROSCI.4657-04.2005.
- Wässle, H. (2004) 'Parallel processing in the mammalian retina', *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), pp. 747–757. doi:10.1038/nrn1497.

Xu, J., Mashimo, T. und Südhof, T.C. (2007) 'Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca²⁺ Sensors for Fast Release that Specify Distinct Presynaptic Properties in Subsets of Neurons', *Neuron*, 54(4), pp. 567–581. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.004.

Yao, L.H. *et al.* (2012) 'Synaptotagmin 1 is necessary for the Ca²⁺ dependence of clathrin-mediated endocytosis', *Journal of Neuroscience*, 32(11), pp. 3778–3785. doi:10.1523/JNEUROSCI.3540-11.2012.

Zenisek, D., Almers, W. und Steyer, J.A. (2000) 'Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones', *Nature*, 406(6798), pp. 849–854. doi:10.1038/35022500.

Zhang, J.Z. *et al.* (1994) 'Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: Implications for membrane recycling', *Cell*, 78(5), pp. 751–760. doi:10.1016/S0092-8674(94)90442-1.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Primärantikörper	21
Tabelle 2: verwendete Sekundärantikörper	22
Tabelle 3: verwendete Chemikalien.....	23
Tabelle 4: verwendete Lösungen.....	25
Tabelle 5 Einbuchstabencodierung der Aminosäuren.....	81

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau des Auges	5
Abbildung 2 Vereinfachte Schemazeichnung der Retina	7
Abbildung 3 Unterschiede zwischen Zapfen und Stäbchen	9
Abbildung 4 Schematischer Aufbau von Synapsen	11
Abbildung 5 Schematischer Aufbau einer Ribbonsynapse.....	13
Abbildung 6 Aufbau von Ribeye	16
Abbildung 7 Schematische Außenansichten des Cerebellums	17
Abbildung 8 Vereinfachte Verschaltungsprinzipien im Kleinhirn.....	19
Abbildung 9: Direkte und indirekte Immunfluoreszenzmarkierung	27
Abbildung 10 Schema eines überlappenden Pepsots.....	31
Abbildung 11 Übersichtsaufnahme der Verteilung von 10F8 in der Retina	38
Abbildung 12 Vergrößerung der Signale von 10F8 in der OPL	38
Abbildung 13 Signalverteilung von 10F8 in der Rinderretina.....	39
Abbildung 14 Knockout-Kontrolle von 10F8 in der Retina.....	40
Abbildung 15 Expressionsmuster 10F8 und Synaptotagmin 1	42
Abbildung 16 Expressionsmuster 10F8 und Ribeye (U2656).....	43
Abbildung 17 Ausschnittsvergrößerung der Detektion von 10F8 und Ribeye (U2656) im Semidünnschnitt der Retina.....	44
Abbildung 18 Übersicht der Signalverteilung von 10F8 und Cav1.4 in der Retina.....	45
Abbildung 19 Ausschnittsvergrößerung Signalverteilung 10F8 und Cav1.4 in der OPL	46
Abbildung 20 Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters für 10F9 und PSD-95	47
Abbildung 21 Verteilungsmuster von 10F8 und PSD-95 im Semidünnschnitt der Retina	48

Abbildung 22 Expressionsmuster von 13B5 in der Retina	49
Abbildung 23 Vergrößerung der Expression von 13B5 in der OPL der Retina	50
Abbildung 24 Signalverteilung von 13B5 in der Rinderretina	50
Abbildung 25 Knockout-Kontrolle von 13B5 in der Retina.....	51
Abbildung 26 Expressionsmuster 13B5 und Synaptotagmin 1 (V216)	53
Abbildung 27 Expressionsmuster von 13B5 und Ribeye (U2656).....	54
Abbildung 28 Expressionsmuster 13B5 und Cav1.4	56
Abbildung 29 Vergrößerung der Signalverteilung von 13B5 und Cav1.4-Kanälen	57
Abbildung 30 Expressionsmuster von 13B5 und PSD-95 in der Retina	58
Abbildung 31 Vergrößerung der Detektion von 13B5 und PSD-95 in der Retina.....	59
Abbildung 32 Kontrollversuche zu 2D9 in der Retina	61
Abbildung 33 Signalverteilung von 2D9 in der Rinderretina	62
Abbildung 34 Knockout-Kontrolle von 2D9 in der Retina	63
Abbildung 35 Kontrollversuche von Ribeye (2D9) und Synaptotagmin 1 (V216).....	64
Abbildung 36 Kontrollversuch zu 2D9 und U2656.....	65
Abbildung 37 Positivkontrolle von 2D9 und PSD-95	66
Abbildung 38 Negativkontrolle zur PSD-95-Versuchsreihe	67
Abbildung 39 Positivkontrolle Ribeye (2D9) und Cav1.4-Kanäle.....	68
Abbildung 40 Negativkontrolle zur Cav1.4-Versuchsreihe	69
Abbildung 41 Signalverteilung von 10F8 und 13B5 im Cerebellum.....	71
Abbildung 42 Kontrolleexperimente zum Cerebellum	72
Abbildung 43 Knockout-Kontrolle im Cerebellum.....	73
Abbildung 44: Verteilung von 10F8 im TEM in der Ribbonsynapse.....	74
Abbildung 45 Western Blot der Retina.....	76
Abbildung 46 GST-Affinitätsanalyse im Western Blot	77
Abbildung 47 Bindungsexperimente mit Fusionsproteinen im Western Blot.....	79
Abbildung 48 Ergebnisse des Pepspots für 10F8 in der Verdünnung 1:20.000	80
Abbildung 49: Pepspot-Ergebnis von 13B5 in einer Verdünnung von 1:10.000	81

8 Danksagung

Ganz besonders herzlich danken, möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Frank Schmitz, der es mir nicht nur ermöglicht hat zu diesem spannenden Thema meine Doktorarbeit zu verfassen, sondern auch selbst mit großem Interesse dabei war. Seine absolute Hilfsbereitschaft, Geduld, wissenschaftliche Kompetenz, Freundlichkeit und ständige Ansprechbarkeit sind absolut nicht selbstverständlich. Zudem ist sein Enthusiasmus so ansteckend, dass ich mich selbst in kleinen Krisen durch ihn neu motivieren ließ. Danke für alles, Frank.

Auch den anderen Labormitgliedern gilt mein Dank, bei jeglichen Fragen fand man immer ein offenes Ohr. Besonders hervorzuheben ist hierbei Dr. Karin Schwarz, die für alle Probleme eine passende Lösung parat hatte, ich danke Dir. Vielen Dank auch an Gabriele Kiefer für das Anfertigen der verschiedensten Schnitte und den technischen Support. Größere und kleinere Probleme konnten stets mit Hilfe der anderen Labormitglieder der AG Schmitz gelöst werden, daher auch meinen Dank an jeden von euch. Mit den anderen Doktoranden im Labor fand ein reger Austausch statt, es wurde sich gegenseitig geholfen und unterstützt, dafür vielen Dank an jeden von euch.

Außerdem möchte ich Professor Dr. Martin Jung aus der Biochemie für die Herstellung der Pepspot-Membranen danken.

Ohne meine Eltern hätte ich mein Studium nicht fortsetzen können, doch sie standen mir nicht nur in finanzieller Art zur Seite, sondern sind auch ansonsten immer Ansprechpartner für mich, danke.

Meine Schwestern sind meine wichtigsten Bezugspersonen und mehr wie beste Freundinnen für mich. Wenn ich ein Problem habe, sind meine Schwestern die erste Anlaufstelle und oft existiert danach gar kein Problem mehr. Auch für diese Arbeit konnte ich mich immer auf eure Unterstützung verlassen. Danke für alles, Tatjana und Arlena.

Nicht zu vergessen sind meine Freunde, denen ich mindestens wöchentlich mit meiner Dissertation in den Ohren lag und die trotzdem noch immer mit mir sprechen: Kerstin Lina Mengs, Mergim Shabani, Jeannine Kühnle, Manuela Puchalla, Theresa Bock, Anna Köller und Stefanie Stengel-Rutkowski. Danke für euren Beistand, jegliche Hilfe und eure Ideen.

9 Lebenslauf

Tag der Promotion: 06.10.2022
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger
Berichterstatter:
Prof. F. Schmitz
Prof. D. Bruns