

Institut für Anatomie und Zellbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
Medizinische Fakultät
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Frühe Veränderungen von Schlüsselproteinen der Endozytose in Photorezeptorsynapsen der CSP α -Knockout Maus

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

2022

Vorgelegt von: Sofia Rosa Stilianakis, geb. am 10.04.1997 in Reutlingen

Tag der Promotion	06.02.2023
Dekan:	Univ.-Prof. Dr.med. Michael D. Menger
Berichterstatter:	Prof . Dr. Frank Schmitz Prof. Dr. Ulrich Boehm

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung/Abstract.....	- 1 -
1.1 Zusammenfassung.....	- 1 -
1.2 Abstract.....	- 3 -
2. Einleitung.....	- 4 -
2.1 Ziel der Arbeit / Fragestellung	- 4 -
2.2 Die Retina.....	- 5 -
2.2.1 Der Aufbau der Retina	- 5 -
2.2.2 Aufbau der Photosensoren und die Reizweiterleitung.....	- 7 -
2.2.3 Die Entwicklung der Retina.....	- 10 -
2.3 Synapsen	- 13 -
2.3.1 Elektrische Synapsen	- 13 -
2.3.2 Chemische Synapsen	- 14 -
2.3.3 Die Synapsen der Photorezeptoren.....	- 16 -
2.4 Exozytose	- 18 -
2.4.1 Der SNARE-Komplex	- 18 -
2.5 Endozytose	- 22 -
2.6 Die Schlüsselproteine der Endozytose.....	- 28 -
2.6.1 Clathrin	- 28 -
2.6.2 Dynamin	- 30 -
2.7 CSPα.....	- 31 -
2.7.1 Die Funktion des CSP α in der Exozytose.....	- 32 -
2.7.2 Die Funktion des CSP α in der Endozytose	- 33 -
3. Material und Methoden	- 36 -
3.1 Untersuchungsmaterialien.....	- 36 -
3.1.1 Gewebe	- 36 -
3.1.2 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	- 36 -
3.1.3 Weitere Materialien	- 39 -
3.2 Methoden	- 40 -
3.2.1 Herstellung der Semidünnschnitte (0,5 μ m)	- 40 -
3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung	- 41 -
3.2.2.1 Prinzip der Immunfluoreszenz	- 41 -
3.2.2.2 Kontrollinkubationen.....	- 41 -
3.2.3 Durchführung der Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen.....	- 42 -
3.3 Mikroskopische Analyse	- 43 -
4. Ergebnisse.....	- 44 -
4.1 Postnataltag 14	- 45 -
4.1.1 Postnataltag 14, Referenzinkubation	- 45 -
4.1.2 Postnataltag 14, Dynamin	- 47 -
4.1.3 Postnataltag 14, Clathrin	- 49 -
4.2 Postnataltag 15	- 51 -
4.2.1 Postnataltag 15: Referenzinkubation	- 51 -
4.2.2 Postnataltag 15, Dynamin	- 53 -
4.2.3 Postnataltag 15, Clathrin	- 55 -

4.3	Postnataltag 16	- 57 -
4.3.1	Postnataltag 16, Referenzinkubation	- 57 -
4.3.2	Postnataltag 16, Dynamin	- 59 -
4.3.3	Postnataltag 16, Clathrin	- 61 -
5.	Diskussion	- 63 -
6.	Literaturverzeichnis	III
7.	Abbildungsverzeichnis	IX
8.	Tabellenverzeichnis	X
9.	Abkürzungsverzeichnis	XI
10.	Danksagung	XIII
11.	Lebenslauf	XIV

1. Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

CSP α ist ein präsynaptisches Vesikelprotein, welches als Chaperon (Proteinfaltungshelfer) in den präsynaptischen Terminalen von Nervenzellen von Bedeutung ist. Die Aufgabe des Chaperons CSP α besteht insbesondere darin, die kontinuierliche Funktionsfähigkeit synaptischer Proteine zu erhalten und damit die Vorgänge der präsynaptischen Terminalen zu gewährleisten. Für besonders aktive Synapsen, zu denen man die tonisch aktiven Photorezeptorsynapsen zählt, ist vor allem die Chaperonenfunktion wichtig. Die Abwesenheit von CSP α in der CSP α -Knockout-Maus führt zu schweren, schnell fortschreitenden neurodegenerativen Veränderungen in der Photorezeptorsynapse, durch die es bis zur Erblindung kommt.

Die Fähigkeit von CSP α , neurodegenerativen Prozessen vorzubeugen und die fortlaufende Aktivität von Synapsen zu sichern, wurde bisher vor allem bezüglich seiner Rolle in der Exozytose untersucht. Hierbei fördert CSP α den Einbau des Proteins SNAP-25 in den SNARE-Komplex der Exozytose. Im Fokus dieser Arbeit steht die Frage, ob CSP α vergleichbar wichtig für die Aufrechterhaltung der Endozytose in den besonders aktiven Photorezeptorsynapsen ist.

Um dies zu überprüfen wurden mithilfe von Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen Schlüsselproteine der Endozytose, Clathrin und Dynamin, in unterschiedlichen frühen Stadien der postnatalen Retinaentwicklung immunmarkiert (vom 14. postnatalen Tag bis zum 16. postnatalen Tag) und Retinapräparate von CSP α -Knockout-Mäusen und CSP α -Wildtyp-Mäusen vergleichend betrachtet. Bei den verwendeten Primärantikörpern handelte es sich um die Antikörper Anti-Clathrin 7A9, Anti-Dynamin 1E10 und Anti-PSD-95. Zur Positivkontrolle wurde ein Antikörper gegen das Ribbonsynapsenprotein Ribeye (Anti-Ribeye 2D9) als Primärantikörper eingesetzt. Ribeye ist die Hauptkomponente der Ribbonsynapsen, welche stark von einem CSP α -Defizit beeinträchtigt werden [59]. Die Immunmarkierung mit einem Antikörper gegen das Protein PSD-95 diente als Orientierung, um die Position der Photorezeptorsynapsen sichtbar zu machen und wurde als Referenzantikörper verwendet.

Zur Darstellung eines Verlaufes der Synapsenveränderungen wurden Semidünnschnitte (0,5 μ m) von Mäusen der postnatalen Tage 14 bis 16 jeweils im Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp-Maus aus dem gleichen Wurf analysiert. Die verwendeten Präparate stammten somit alle von einem Zeitpunkt nach der Augenöffnung, die meist zwischen dem 10. bis 12. postnatalen Tag stattfindet. In diesem frühen Zeitraum wurde die postnatale Entwicklung der genannten endozytotischen Proteine mittels Immunfluoreszenzmikroskopie der Photorezeptorsynapsen in der äußeren plexiformen Schicht vergleichend zwischen Knockout und Kontrolle untersucht.

Bereits ab dem postnatalen Tag 14 war eine verminderte Signalintensität in der mikroskopischen Analyse der endozytotischen Proteine Dynamin und Clathrin zu erkennen. Am postnatalen Tag 16

waren die Immunsignale für Dynamin in der OPL nahezu verschwunden. Für Clathrin ließ sich ebenfalls im Verlauf der drei untersuchten Tage ein deutlicher Abfall der entsprechenden Immunsignale erkennen.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich die Hypothese bestätigen, dass CSP α nicht nur auf die Exozytose, sondern auch auf die Endozytose einen Einfluss hat. Die endozytotischen Proteine Clathrin und Dynamin zeigen sich durch einen CSP α -Knockout deutlich beeinträchtigt und könnten somit neben vielen anderen Proteinen, wie zum Beispiel dem SNAP-25, auch Substrate des CSP α sein.

1.2 Abstract

CSP α is a presynaptic vesicle protein that plays an important role as a chaperone protein (protein folding helper) in the terminals of nerve endings. The main task of CSP α is to maintain the continuous functionality of synaptic proteins and, thus, of the processes in the presynaptic terminals. The chaperone function is especially important for highly active synapses, such as the tonically active photoreceptor synapses. The absence of CSP α in CSP α - knockout mice, therefore, leads to progressive neurodegenerative changes in the photoreceptor synapse which can lead to blindness.

The ability of CSP α to prevent neurodegenerative processes and to ensure the continuous functioning of synapses has so far been investigated primarily with regard to its role in exocytosis. CSP α promotes the incorporation of the protein SNAP-25 into the SNARE complex. The work presented in this paper focuses on the question of whether CSP α is equally important for maintaining endocytosis in the high-speed active photoreceptor synapses.

To investigate this, key endocytotic proteins, Clathrin and Dynamin, were immunolabeled at different early stages of postnatal retinal development (from postnatal day 14 to 16) using double immunofluorescence staining. Retinal specimen from CSP α knockout mice and CSP α wild-type mice were compared. The primary antibodies used were Anti-Clathrin 7A9, Anti-Dynamin 1E10 and Anti-PSD-95 antibodies. As a positive control, an antibody against the ribbon synapse protein Ribeye (Anti-Ribeye 2D9) was used as the primary antibody. It is known that the synaptic ribbons are severely affected by a CSP α deficit. Immune labeling with an antibody against the protein PSD-95 served as a guide to visualize the position of the photoreceptor synapses and to use it as a reference antibody.

To show the course of the synapse changes, semithin sections (0.5 μ m) of mice from postnatal days 14 to 16 were analyzed in comparison between knockout and wild-type mice from the same litter. The preparations used all derive from the time after the eyes have opened. Eye opening usually happens around the 10th-12th postnatal day. We examined the postnatal development of the mentioned endocytic proteins during this early period by means of immunofluorescence microscopy of the photoreceptor synapses in the outer plexiform layer, comparing knockout and control.

A reduced signal intensity was evident in the microscopic analysis of the endocytic proteins Dynamin and Clathrin as early as on postnatal day 14. The immune signals in the outer plexiform layer for Dynamin had almost disappeared by postnatal day 16. For Clathrin, a clear drop in the corresponding immune signals was evident over the course of the three days surveyed.

These observations confirm the hypothesis that CSP α actions are not limited to exocytosis but also comprise endocytotic processes. The endocytic proteins Clathrin and Dynamin are clearly affected by a CSP α knockout and could therefore be substrates of the CSP α along with many other proteins such as SNAP-25.

2. Einleitung

2.1 Ziel der Arbeit / Fragestellung

Das Protein CSP α ist ein für die Vesikelexozytose wichtiges Faltungshelferprotein (Chaperon), das die Ausbildung des für die Exozytose zentralen SNARE-Komplexes katalysiert [62]. Dies ist besonders in den tonischen, anhaltend aktiven Photorezeptorsynapsen von großer Bedeutung [59]. Eine Deletion des Proteins CSP α im Mausmodell des CSP α -Knockouts führt zur Erblindung [59].

In dieser Arbeit soll analysiert werden, ob das CSP α neben der Exozytose auch für die Endozytose von Bedeutung ist. Zu diesem Zweck wurde die Verteilung endozytotischer Schlüsselproteine in Photorezeptorsynapsen von CSP α -Knockout-Mäusen im Vergleich zu CSP α -Kontroll-Mäusen durch Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden Antikörper gegen Schlüsselproteine der Endozytose eingesetzt und deren Lokalisation vergleichend sichtbar gemacht.

2.2 Die Retina

2.2.1 Der Aufbau der Retina

Eine der fünf Sinneswahrnehmungen, die es Tieren ermöglichen, sich in ihrer Umwelt zu orientieren, ist die visuelle Wahrnehmung.

Die visuelle Wahrnehmung von Licht verschiedener Farben erfolgt durch die Übersetzung von elektromagnetischen Wellen der Größenordnung 400nm – 750nm in Membranpotenziale in der Netzhaut [27]. Entwicklungsgeschichtlich entsteht die Netzhaut aus dem Diencephalon (Zwischenhirn) und ist ein in das Auge vorgeschobener Teil des Gehirns [27]. Auf der Retina lässt sich ein als Pars optica bekannter lichtempfindlicher Teil von einem lichtunempfindlichen Teil, der Pars caeca, unterscheiden [27]. Die Pars optica besteht aus dem Stratum pigmentosum und dem Stratum nervosum, getrennt durch den kapillären Spalt [71].

Bei dem Stratum pigmentosum handelt es sich um ein einschichtiges, isoprismatisches Pigmentepithel, welches auf der Bruchmembran, der Abgrenzung zur Aderhaut, aufsitzt. Die Epithelzellen besitzen an ihrem apikalen Pol Vorwölbungen, welche die Spitzen der Photorezeptorzellen umfassen [71].

Das Stratum nervosum enthält die über Synapsen verbundenen ersten drei Neurone der Sehbahn: Photorezeptorzellen, Bipolarzellen und Ganglienzellen [71].

Wahrgenommen werden die Lichtsignale von Photorezeptoren, also von Stäbchen und Zapfen. Die von Photorezeptoren detektierten Signale werden dann über Synapsen zunächst zu Bipolarzellen und dann über eine weitere Synapse zu Ganglienzellen weitergeleitet, deren Axone den Sehnerv (N. opticus) bilden [27]. Die Photorezeptorzellen liegen dem Stratum pigmentosum an. Lichtreize müssen deshalb zunächst alle anderen Schichten durchdringen, ehe sie zu den lichtempfindlichen Photorezeptorzellen gelangen. Somit ist die Richtung der Informationsweiterleitung dem Lichteinfall gegenläufig [27]. Eine Veranschaulichung ist in Abbildung 1 zu sehen.

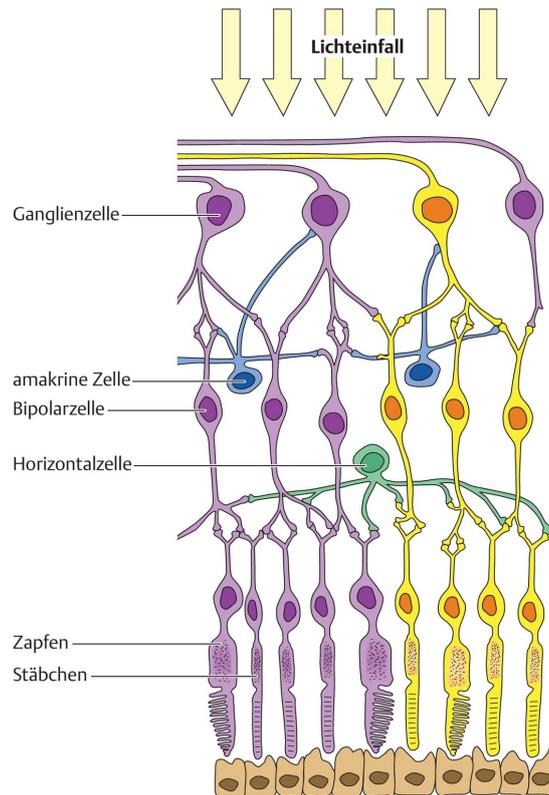


Abbildung 1 Aufbau der Retina

(gelb = Ganglienzellen mit ihrem rezeptiven Feld)

Entnommen aus Huppelsberg J et al (2013) „Kurzlehrbuch Physiologie“ 4. aktualisierte Auflage [27]

Abgesehen von diesen drei Zelltypen enthält das Stratum nervosum auch Interneurone und Gliazellen. Zu den Interneuronen zählen Horizontalzellen und amakrine Zellen, zu den Gliazellen gehören die Müller-Zellen, eine Sonderform der Astrozyten. Horizontalzellen verbinden Photorezeptorzellen untereinander, amakrine Zellen sind mit Ganglienzellen und bipolaren Zellen verknüpft [71]. Aufgrund der Anordnung all dieser Zelltypen entstehen neun charakteristische Schichten [71]:

1. Das Stratum neuroepitheliale, das die Fortsätze der Photorezeptorzellen enthält [71].
2. Das Stratum limitans externum (äußere Gliagrenzschicht), das die Verbindung zwischen Fortsätzen der Müller-Zellen und Photorezeptorzellen herstellt [71].
3. Das Stratum nucleare externum (äußere Körnerschicht), das die Kerne der Photorezeptorzellen (1. Neuron) enthält [71].
4. Das Stratum plexiforme externum (äußere plexiforme Schicht), das die Synapsen beinhaltet, welche die Fortsätze des 1. und 2. Neurons verbinden sowie die Synapsen zu den Horizontalzellen [71].
5. Das Stratum nucleare internum (innere Körnerschicht), das die Zellkerne der Bipolarzellen (2. Neuron), Zellkerne der Müller-Zellen sowie Zellkerne der Horizontal- und amakrinen Zellen beinhaltet [71].

6. Das Stratum plexiforme internum (innere plexiforme Schicht), das Synapsen enthält, welche die Fortsätze des 2. und 3. Neurons verbinden sowie Synapsen mit amakrinen Zellen [71].
7. Das Stratum ganglionare (Ganglienzellschicht), das die Zellkerne der Optikusganglienzellen (3. Neuron) enthält [71].
8. Das Stratum neurofibrorum (Nervenfaserschicht), das die Axone der Ganglienzellen beinhaltet [71].
9. Das Stratum limitans internum (Innere Gliagrenzschicht), das sich aus den Endfüßchen der Fortsätze von Müller- Zellen und Basallamina zusammensetzt [71].

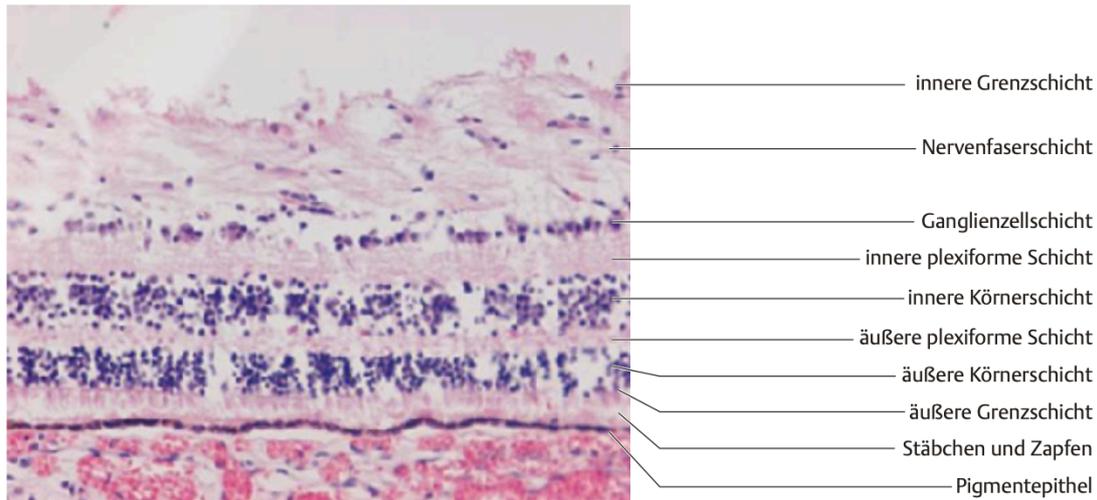


Abbildung 2 Schichten der menschlichen Retina

(Azan, Vergrößerung 200-fach)

Entnommen aus Ulfig N (2019) „Kurzlehrbuch Histologie“ 5. unveränderte Auflage [71]

2.2.2 Aufbau der Photosensoren und die Reizweiterleitung

Unter den Photosensoren gibt es zwei Typen: Zum einen die Stäbchenphotorezeptoren, die für das skotopische Sehen (Nachtsehen, Schwarz-Weiß-Sehen) verantwortlich sind, zum anderen die Zapfenphotorezeptoren, die für das photopische Sehen (Farbsehen) verantwortlich sind. Die Photosensoren setzen sich im Verhältnis 20:1 aus Stäbchen und Zapfen zusammen. Dabei sind die Zapfen in der Fovea centralis (Bereich des schärfsten Sehens) konzentriert, während die Stäbchen primär im Randbereich der Netzhaut zu finden sind [27].

Im Aufbau lassen sich beide Typen in ein Innen- und ein Außensegment aufteilen. In ihrem Außensegment enthalten sie Sehfärbstoffe, welche sich bei Lichteinfall durch eine photochemische Reaktion verändern und den Prozess der Phototransduktion in Gang setzen. Dieses Außensegment steht in engem Kontakt mit dem Pigmentepithel. Das Pigmentepithel trägt zur Regeneration der Außensegmente bei, indem es die überalterten Membranscheibchen der Außensegmente phagozytiert, in welchen sich der Sehfärbstoff befindet [27]. Die präsynaptische Terminale der Photorezeptoren bildet Synapsen mit Bipolarzellen [27]. Bipolarzellen wiederum leiten die erhaltene Information an

Ganglienzellen weiter, die in der inneren plexiformen Schicht (IPL) synaptisch kontaktiert werden [71][27]. Die Ganglienzellen bilden mit ihren Axonen in der Folge den Nervus Opticus, welcher an der Papilla N. optici aus dem Bulbus austritt und so die Weiterleitung in die nachgeschalteten visuellen Anteile des Zentralen Nervensystems ermöglicht [27]. In den Axonen der Ganglienzellen werden zum ersten Mal Aktionspotenziale gebildet. In allen anderen retinalen Neuronen wird die Information elektrotonisch und über chemische Synapsen weitergetragen [27]. Im Unterschied zur Übertragung mithilfe von Aktionspotenzialen kommt es bei der elektrotonischen Weiterleitung zu lokalen De-/Hyperpolarisationen, wobei die Erregung durch entstehende Potenzialunterschiede, passiv und ohne die Bildung von Aktionspotenzialen stattfindet [25].

(Siehe Abschnitt 2.3 zur Erläuterung chemischer und elektrischer Synapsen.)

Zapfen enthalten jeweils einen der drei Zapfen-Opsin-Sehfarbstoffe. Die verschiedenen Zapfenopsine unterscheiden sich durch ihre Absorptionsmaxima für verschiedene Wellenlängen. Sie reichen von 450nm – 565nm und entsprechen den Farben Blau, Grün und Rot [27].

Die Stäbchen enthalten alle Rhodopsin als Sehfarbstoff. Sein Absorptionsmaximum (ca. 500nm) entspricht Wellenlängen aus dem Bereich zwischen Blau-und Grün-Tönen [27].

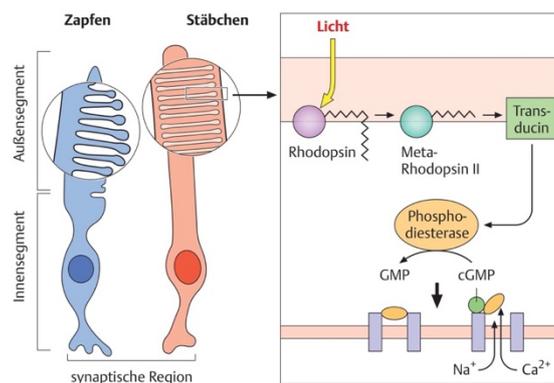


Abbildung 3 Signaltransduktion in der Photorezeptorzelle

Entnommen aus Huppelsberg J et al (2013) „Kurzlehrbuch Physiologie“ 4. aktualisierte Auflage [27]

Rhodopsin besteht aus Opsin und 11-cis-Retinal. Durch den Lichtreiz kommt es zu einer photochemischen Reaktion und einer Konformationsänderung des 11-cis-Retinals. Es entsteht ein gestrecktes All-trans-Retinal-Molekül und stufenweise das Meta-Rhodopsin II [27]. Meta-Rhodopsin II aktiviert das G-Protein Transducin, welches eine Phosphodiesterase aktiviert, die cGMP zu GMP hydrolysiert [27]. Der cGMP-Spiegel sinkt, die cGMP-abhängigen Na⁺-Ca²⁺-Kationenkanäle werden verschlossen [27]. Dadurch wird die Na⁺- und Ca²⁺-Leitfähigkeit reduziert [27]. Die unter Ruhebedingungen relativ stark depolarisierten Photorezeptoren werden durch diesen Mechanismus nun hyperpolarisiert [27]. Mit der Hyperpolarisation wird weniger Glutamat ausgeschüttet und auf

diese Weise kommt es in nachgeschalteten Zellen zu Potenzialänderungen [27]. In den Ganglienzellen wird das Sensorpotenzial dann in ein Aktionspotenzial umgewandelt [27].

Durch eine Neusynthese von cGMP erfolgt die Wiederöffnung der Na⁺- und Ca²⁺-Kanäle und die Zelle erreicht wieder die Depolarisation und ihr Dunkelpotenzial [27]. Das All-trans-Retinal wird nun im Pigmentepithel regeneriert und erneut in 11-cis-Retinal zurückgewandelt [27]. Schlussendlich verbindet es sich mit Opsin wieder zu Rhodopsin [27]. Die Lichtreaktion ist beendet [27]. Der Ablauf der Signaltransduktion, wie hier beschrieben, spielt sich ähnlich auch für die Zapfen ab, nur dass anstelle des Rhodopsins die Zapfen-Opsine ins Spiel kommen [27].

2.2.3 Die Entwicklung der Retina

Proliferierende Nervenzellen haben das Potential, sich in viele verschiedene Typen von Neuronen und Gliazellen zu entwickeln und nach diesem Muster entstehen auch die verschiedenen Schichten der Retina [1]. Die Entwicklung des Auges geht eng mit der Entwicklung des zentralen Nervensystems einher [69]. Die Neuroretina entsteht dabei aus dem Neuroektoderm des Neuralrohrs [69]. Das Neuralrohr, welches die Entwicklungsgrundlage von Gehirn und Rückenmark ist, bildet zunächst Augenbläschen aus und daraus dann die Augenbecher (siehe hierzu Abbildung 4) [69]. Zunächst verschließt sich das Neuralrohr, bis nur noch das kaudale und das rostrale Ende offen sind (rostraler und kaudaler Neuroporus) [69]. Aus einer Vertiefung, die sich kurz vor Verschluss des rostralen Neuroporus vor dessen Öffnung schiebt, entstehen zwei Vorwölbungen, die Augenbläschen [69]. Diese Augenbläschen formen sich schließlich zu den Augenbechern [69]. Der vordere Bereich des Augenbechers bildet die Pars caeca, der hintere Bereich die Pars optica [69]. Aus dem inneren Blatt des hinteren Bereichs des Augenbechers entsteht die Anlage der Neuroretina, aus dem äußeren die Anlage für das retinale Pigmentepithel [69]. Die verschiedenen Zelltypen der Retina gehen aus einer gemeinsamen multipotenten retinalen Progenitorzelle hervor, die sich im inneren Blatt des Augenbechers befindet [38]. Sie differenzieren sich einem genauen Ablauf folgend in die unterschiedlichen Neurone der Schichten der Retina [46] [1] [38].

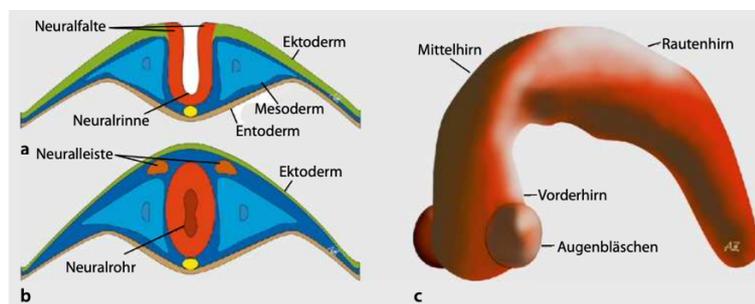


Abbildung 4 Entwicklung des Neuralrohrs und Augenbläschens

Entnommen aus Tamm E und Ohlmann A (2012) „Entwicklung des menschlichen Auges“ [69]

- a. Zunächst entsteht die Neuralrinne aus einer Vertiefung in der Neuralplatte. Hierbei bilden sich Falten, die sich annähern.
- b. Abgebildet ist hier das Neuralrohr, das bei der Vereinigung der Neuralfalten entsteht. Das Neuroektoderm bedeckt schließlich das Neuralrohr [69].
- c. Abbildung der Augenbläschen [69].

Das Muster, nach dem die Retina sich in Schichten gliedert und die Zellkörper sich anordnen, bezeichnet man als „Retina Mosaik“ [46]. Nachdem die Neurone sich von ihrer Progenitorzelle ausgehend spezifiziert haben, wandern sie an ihren Platz in dieser Ordnung. Bei der Maus geschieht dies in der Zeit zwischen dem embryonalen Tag 12 und dem postnatalen Tag 7 [46]. Die verschiedenen Areale der Retina der Maus erreichen unterschiedlich schnell ihre vollendete Struktur, zum Teil erst postnatal [46]. Ganglienzellen, Zapfen-Photorezeptorzellen und Horizontalzellen

entwickeln sich schon vor der Geburt, während amakrine Zellen sich pränatal zu bilden beginnen, aber erst postnatal ihre Entwicklung abschließen [46]. Stäbchen-Photorezeptorzellen, Müllergliazellen und Bipolarzellen entwickeln sich hauptsächlich postnatal [46].

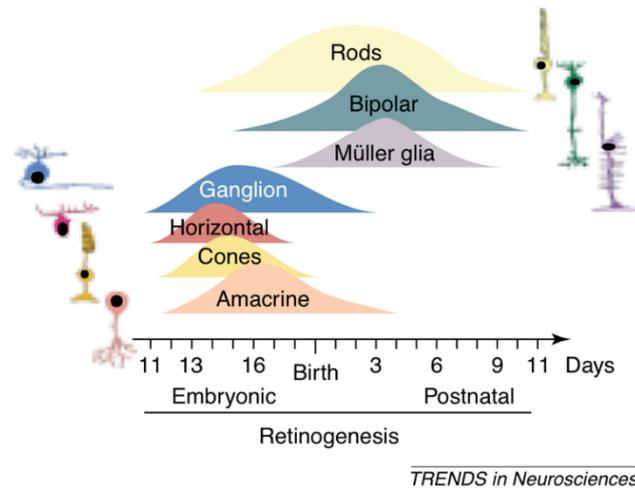


Abbildung 5 Neurogenese der Retina

Entnommen aus Marquardt T et al (2002) „Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all“ [38].

Im Mittelpunkt dieser Forschungsarbeit steht die OPL (äußere plexiforme Schicht), denn hier befinden sich die Ribbonsynapsen, die präsynaptisch von Photorezeptorzellen und postsynaptisch von Bipolarzellen gebildet werden [46].

Obwohl die Entwicklung der Photorezeptorzellen teils schon pränatal beginnt, bildet sich die OPL erst postnatal vollständig und gut sichtbar aus [46]. Während der postnatalen Tagen 4 und 5, in denen sich die OPL entwickelt, können allerdings bereits vereinzelt Ribbons zu finden sein [74][31]. Da sich zu diesem Zeitpunkt bereits viele synaptische Membranproteine in der sich entwickelnden OPL finden, welche wichtig für die Exozytose in Ribbonsynapsen sind, wurde von *von Kriegstein und Schmitz (2003)* [74] die Vermutung angestellt, dass diese prinzipiell bereits wie eine konventionelle Synapse arbeiten [74]. Ihre volle Funktionalität besitzen die Photorezeptorsynapsen der äußeren plexiformen Schicht aber noch nicht [31]. Die morphologisch vollständige Ausbildung der Ribbonsynapsen folgt erst mit einigen Tagen Abstand, zwischen dem 7. und 12. postnatalen Tag [74]. Die Assemblierung von reifen synaptischen Ribbon-Komplexen geschieht in der Regel um den 12. postnatalen Tag, sodass die Entwicklung des präsynaptischen Apparat bis zum postnatalen Tag 14 vollständig ist [51] [74]. Charakteristisch für die Ribbonsynapsen der Photorezeptoren sind die präsynaptische Ribbons, dichte Strukturen der aktiven Zone, wo hunderte von synaptischen Vesikeln haften [51]. Zunächst finden sich in den aktiven Zonen der sich entwickelnden Photorezeptorsynapsen kugelförmige Strukturen, deren Anzahl sinkt, während parallel dazu die Anzahl der verankerten Ribbons steigt. Zwischen dem 10. bis 14. postnatalen Tag erfolgt auch der Übergang von freibeweglichen, kugelförmigen, unreifen Ribbons in ihre ausgereifte, in der Membran verankerte Form [51]. Die

kugelförmigen Strukturen stellen sozusagen die Transporteinheit der Proteine der aktiven Zone dar und sind auf diese Weise am Zusammenbau der Ribbonsynapsen beteiligt [51]. Die Entwicklung der Ribbonsynapsen einschließlich der synaptischen Transmissionsfunktion ist bei der Augenöffnung abgeschlossen, wobei sich Zapfen-Photorezeptorzellen etwas früher zu entwickeln beginnen als Stäbchen [51].

Synaptische Aktivität der Photorezeptorsynapsen ist bereits in den ersten postnatalen Tagen vor Augenöffnung nachweisbar [31]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Synapsen der Photorezeptoren zu diesem frühen Zeitpunkt zwar schon wie eine klassische chemische Synapse fungieren können, sie ihre volle Funktionalität aber erst nach Augenöffnung entwickeln, sobald eine gezielte optische Wahrnehmung erforderlich ist [31]. Reife Ribbons mit ihren besonderen Ribbon-Eigenschaften entwickeln sich somit erst schrittweise aus konventionellen Synapsen (s.u. in Abschnitt 2.3.3) [74].

Bis zum 20. postnatalen Tag sind alle retinalen Schichten ausgereift [47].

2.3 Synapsen

Synapsen sind Verbindungen zwischen zwei Nervenzellen oder zwischen einer Nervenzelle und einer anderen Zelle, z.B. einer Muskelzelle. Man unterscheidet elektrische und chemischen Synapsen [6].

2.3.1 Elektrische Synapsen

Liegen die Membranen zweier Zellen dicht aneinander, ohne dass es zu einer Verschmelzung kommt, so entstehen „Gap Junctions“ [6]. Diese bestehen aus Konnexonen, welche jeweils aus sechs untereinander, kreisförmig angeordneten Connexin-Untereinheiten bestehen. Die Connexine bilden eine Pore in ihrer Mitte. Treten nun die Konnexone zweier benachbarter Zellmembranen in Kontakt, bilden diese Poren einen Kanal, durch welchen Ionen und andere niedermolekulare Stoffe ausgetauscht werden können [6].

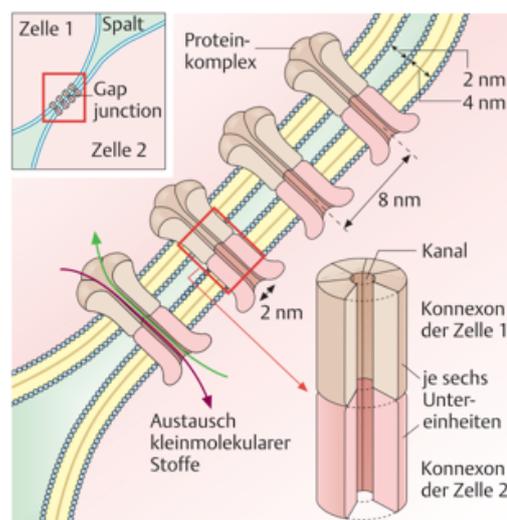


Abbildung 6 Aufbau einer Gap Junction

Entnommen aus Behrends J, et al (2016) „Duale Reihe Physiologie“ 3. Auflage [6]
Dargestellt sind die elementaren Bausteine einer Gap Junction, die Konnexone [6].

Kommt es in der präsynaptischen Zelle durch ein Aktionspotenzial zur Depolarisation, so führt dies zwischen der prä- und postsynaptischen Zelle zu einer Potenzialdifferenz [6]. Die postsynaptische Zelle ist nicht depolarisiert, somit entsteht ein Potenzialgefälle und dadurch ein Ionenstrom durch die Konnexone [6]. Dieser Ionenstrom depolarisiert die postsynaptische Zelle, und sobald hier eine Reizschwelle überschritten wird, entsteht auch hier ein Aktionspotenzial [6]. Diesen Vorgang nennt man die „elektrische Kopplung“ [6].

Das Besondere an diesen Synapsen ist, dass der Informationsaustausch in beide Richtungen erfolgen kann [6].

2.3.2 Chemische Synapsen

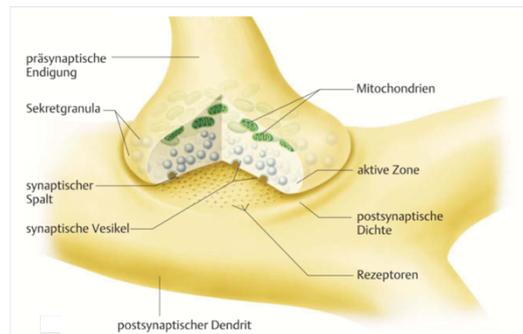


Abbildung 7 Die chemische Synapse

Entnommen aus Behrends J et al (2016) „Duale Reihe Physiologie“ 3. Auflage [6]

An chemischen Synapsen läuft die Übertragung mithilfe von Neurotransmittern ab [6]. Jede chemische Synapse besteht aus einer Präsynapse, einer Postsynapse und einem synaptischen Spalt [6]. In der Präsynapse finden sich zum einen Mitochondrien, welche für die Energieversorgung von Bedeutung sind, zum anderen eine Vielzahl an Vesikeln [6].

Diese Vesikel enthalten Transmittermoleküle und liegen vor allem in der „aktiven Zone“, dem Teil der Membran, der nahe am synaptischen Spalt liegt [6].

Die postsynaptische Dichte (PSD) ist eine Membranverdichtung, in der Neurotransmitterrezeptoren angereichert sind [6].

Der synaptische Spalt ist der Spalt zwischen diesen beiden Membrankompartimenten [6]. Durch ihn hindurch diffundieren die Neurotransmitter [6].

Neurotransmitter gelangen in den synaptischen Spalt, sobald es durch ein eintreffendes Aktionspotential zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran kommt und ein Fluss von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum in die Präsynapse entsteht [65][6]. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wird dann die Vesikelexozytose aktiviert und das Vesikel in den synaptischen Spalt ausgeschüttet [6][65]. Das leere Vesikel kann über Endozytose wieder aufgenommen und neu beladen werden [6]. Die Neurotransmitter binden an entsprechende Rezeptoren der Postsynapse, um hier die Öffnung von weiteren Ionenkanälen zu bewirken oder um über metabotrope Rezeptoren Signaltransduktionskaskaden zu regulieren [6][65][52]. Der metabotrope Glutamatrezeptor mGluR6 beispielsweise findet sich vor allem in den ON-Bipolarzellen der Retina, während diverse andere mGluRs im ganzen zentralen Nervensystem zu finden sind [52].

Die Rezeptoren befinden sich nicht nur auf der Postsynapse, sondern auch auf der Präsynapse, sodass die Neurotransmittermenge autoreguliert wird [65]. Im Anschluss werden die Neurotransmitter wieder in die Präsynapse oder von den umgebenden Gliazellen aufgenommen [6][65]. Sie können aber auch aus dem synaptischen Spalt diffundieren oder enzymatisch abgebaut werden [6].

Neben dieser direkten Informationsübertragung zwischen Prä- und Postsynapse gibt es noch weitere, in Abb. 8 dargestellte Formen [65].

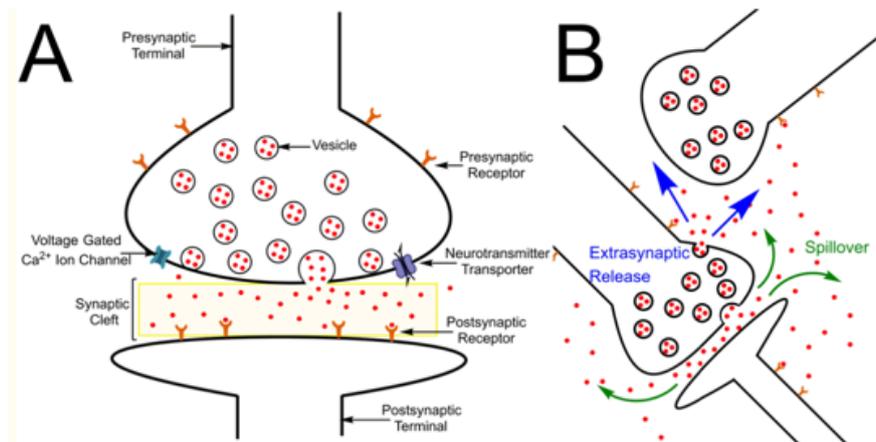


Abbildung 8 Neurotransmission an der chemischen Synapse

Entnommen aus *Shin M et al (2019) "Electrochemistry at the Synapse"*[65]

A: Direkte synaptische Informationsübertragung.

B: Blau stellt die extrasynaptische Freisetzung von Neurotransmittern dar; Grün stellt die Ausbreitung des Neurotransmitters vom synaptischen Spalt aus in den Extrazellulärraum zu anderen Neuronen dar, zu denen keine Synapsen bestehen [65].

Die Rezeptoren der chemischen Synapsen lassen sich in zwei Gruppen aufteilen: die ionotropen und die metabotropen Rezeptoren [6][52]. Metabotrope Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über das G-Protein diverse Signalwege aktivieren [52].

Die ionotropen Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, welche durch die Bindung eines Transmitters geöffnet werden und sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Effekte haben können [6]. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor gehört beispielsweise zu dieser Gruppe. Bei Bindung von Acetylcholin an den Rezeptor können Ionen wie Natrium und Kalium entlang des Konzentrationsgradienten durch den Ionenkanal gelangen [6].

Die metabotropen Rezeptoren sind in der Regel über die Membranoberfläche der Zielzelle verteilt und auch an der präsynaptischen Membran vorhanden [6]. Sobald ein Transmitter an einen solchen Rezeptor bindet, wird ein G-Protein aktiviert, welches dabei in seine Untereinheiten zerfällt: eine GTP-bindende α - und eine $\beta\gamma$ – Untereinheit [6]. Über eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade führen diese Untereinheiten zur Modulation der Ionenkanäle, was die Entstehung von Potenzialen erlaubt und damit die synaptische Übertragung [6]. Die entstehenden Potenziale können sowohl ein IPSP (inhibitorisches postsynaptisches Potenzial) oder ein EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potenzial) sein [6]. Zu diesen Rezeptoren gehören zum Beispiel der muskarinerge Acetylcholinrezeptor der Herzmuskelzelle sowie der Noradrenalinrezeptor der postganglionären Neuronen des Sympathikus [6].

2.3.3 Die Synapsen der Photorezeptoren

In der Retina finden sich verschiedene Typen von Synapsen wieder: die elektrische, die chemische (s.o.) und eine besondere Variante der chemischen Synapse: die Ribbonsynapse [70]. Letztere überträgt Signale in tonischer Form. Um dies zu ermöglichen, ist die Fähigkeit nötig, hunderte bis tausende Vesikel innerhalb einer Sekunde zu entleeren und deren Inhalt in den synaptischen Spalt freizugeben [70]. Daneben unterstützen Ribbonsynapsen auch den Nachschub an Vesikeln und dienen sozusagen als Lagerhaus für Vesikel, sodass während einer anhaltenden Depolarisation nicht nur eine schnelle, sondern auch eine kontinuierliche Freigabe derselben möglich ist [39]. Die Ribbonsynapse liegt insbesondere in Neuronen der Retina (Photorezeptorzellen und Bipolarzellen) und in den Haarzellen der Kochlea vor und übertrifft die konventionellen chemischen Synapsen in ihrer Geschwindigkeit [70]. Ribbonsynapsen übertragen Reize von Photorezeptoren in der OPL (äußeren plexiformen Schicht), und von Bipolarzellen in der IPL (inneren plexiformen Schicht) [70]. In der Regel befinden sich in den terminalen Enden der Stäbchenrezeptoren immer Ribbonsynapsen, die sich um die postsynaptische Invagination und die Dendriten der Bipolarzellen legen, sodass die lichtmikroskopisch typische Hufeisenform entsteht [70]. Die Terminalen der Zapfenrezeptoren sind deutlich größer und bieten so Platz für mehr als eine Ribbonsynapse, die sich punktförmig darstellen [70]. Eine bedeutende funktionale Besonderheit ist, dass in den Ribbonsynapsen der Photorezeptoren die Freisetzung von Glutamat kontinuierlich an wechselnde Reize angepasst wird [70]. Dies führt zu einer Optimierung des Informationstransfers zwischen Photorezeptorzellen, Bipolarzellen und Horizontalzellen [70].

Typisch für die klassischen chemischen Synapsen ist es, dass nur eine Minderheit der Vesikel freisetzbar ist und der Hauptteil mithilfe von Synapsinen an das Zytoskelett gebunden vorliegt. Synapsine kommen in Ribbonsynapsen nicht vor [70]. Bei Ribbonsynapsen ist die Überzahl der Vesikel frei beweglich und einsatzbereit, was die Voraussetzungen für eine kontinuierliche Exozytose verschafft, welche für den Informationstransfer an sensorischen Synapsen wie den Photorezeptorsynapsen und denen der Haarzellen der Kochlea wichtig ist [70]. Die große Anzahl der bereitstehenden Vesikel verhilft zu einer hohen Rate an freisetzbaren Vesikeln pro Sekunde über lange Zeiträume [39]. Die Informationsübertragung einer einzelnen Photorezeptorzelle an viele verschiedene, weiter entfernte postsynaptische Ziele, z.B. zu den Dendriten von Horizontalzellen und Bipolarzellen, wird durch „Spillover“ von Glutamat ermöglicht [39]. Die die Exozytose antreibenden Ca^{2+} -Kanäle liegen entlang der bogenförmigen Dichte der Ribbons, sodass die angedockten Vesikel hier bereit für eine schnelle Ausschüttung sind, sobald das Ca^{2+} präsynaptisch steigt [39]. Die Maschinerie der Exozytose, wie beispielweise SNARE-Komplexe, funktioniert ansonsten einer konventionellen Synapse ähnlich [39]. Von konventionellen Synapsen unterscheiden sich die Ribbonsynapsen in einigen Bausteinen durch andere, Ribbon-spezifische Isoformen der Komponenten

und variierenden Mengen der relevanten Proteine; es handelt sich aber nicht um fundamental andere Organellen [39][70].

Eines dieser Ribbon-spezifischen Proteine ist das Ribeye [70]. Es gehört in die Familie der CtBP (C-terminales Bindeprotein), die auch in konventionellen Synapsen vorkommen [70]. Ribeye taucht dort nicht auf [70]. Aufgebaut ist Ribeye aus einer N-terminalen A-Domäne, die spezifisch für die Ribbonsynapse ist und einer C-terminalen B-Domäne, die sich von dem NAD(H)-bindenden Protein CtBP2 bis auf 20 Aminosäuren nicht unterscheidet [61][58]. Sowohl die A- als auch die B-Domäne weisen Interaktionsstellen auf, durch die andere A- oder B-Domänen gebunden werden können [61]. In Knockout-Mäusen mit fehlender Kodierung für die A-Domäne konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Ribbons nicht zustande kam [61]. Die A-Domäne ist somit notwendig für den Aufbau von synaptischen Ribbons [61]. Auch der B-Domäne konnte in aktuellen Forschungen eine essentielle, stabilisierende Funktion zugeschrieben werden [61]. Die Vorstellung von Ribeye als zentralen Baustein von Ribbonsynapsen wurde damit bekräftigt [61].

Details zur molekularen Beschaffung der Ribbonsynapsen finden sich in „*Sensory Processing at Ribbons Synapses in the Retina and the Cochlea*“ von Moser et al (2020).

2.4 Exozytose

Wenn ein Aktionspotenzial eine präsynaptische Nervenendigung erreicht, kommt es zur Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen und zur Exozytose [6]. Die geleerten Vesikel werden dann mit Hilfe der Endozytose wieder aufgenommen und für die nächste Exozytose recycelt [6].

Die Exozytose ist der Mechanismus, durch welchen es zur Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern oder zum Transport von Makromolekülen aus der Zelle hinaus kommt [66].

Trifft ein Aktionspotenzial in der präsynaptischen Endigung ein, so öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in der aktiven Zone: Ca^{2+} strömt in die Präsynapse ein [6]. Das Ca^{2+} bindet an Synaptotagmin, ein Vesikelprotein, das als Ca^{2+} -Sensor fungiert und die Bildung des SNARE-Komplexes über die Aktivierung der SNARE-Proteine veranlasst [6]. Dieser SNARE-Komplex besteht aus verschiedenen SNARE-Proteinen [6]: dem Vesikelprotein Synaptobrevin (v-SNARE Protein) und den Membranproteinen Syntaxin und SNAP-25 (t-SNARE Proteine) [6]. Diese Proteine interagieren miteinander und gewährleisten die Verschmelzung von der Vesikelmembran mit der Plasmamembran. Auf diese Weise erreichen die Transmitter den synaptischen Spalt und gelangen durch Diffusion bis zu den postsynaptischen Rezeptoren [6].

2.4.1 Der SNARE-Komplex

Die SNARE-Proteine (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) sind für die Membranfusion bei Endozytose und Exozytose von essentieller Bedeutung, weshalb in diesem Abschnitt genauer auf sie eingegangen werden soll [78][79]. SNARE-Proteine finden sich auf der Membran der Vesikel und auf der Ziellmembran wieder, dementsprechend können sie als v-SNAREs oder t-SNAREs bezeichnet werden [79]. Je nachdem, ob die SNARE-Proteine in die Bildung des SNARE-Komplexes einen Arginin- oder einen Glutaminrest beitragen, lassen sie sich auch in Q-SNARE oder R-SNARE unterteilen [79]. Die Proteine sind über ihre Carboxylgruppe in einer der Membranen verankert und können sich über ihre Aminogruppen miteinander verbinden [62][79]. Diese Aminogruppenabschnitte werden als SNARE-Motive bezeichnet. Zur Formierung eines SNARE-Komplexes lagern sich die SNARE-Motive der verschiedenen SNARE-Proteine zu einem Bündel aus vier parallelen Helices an [62][79]. Hierbei tragen das Synaptobrevin und das Syntaxin jeweils eine, das SNAP-25 zwei SNARE-Motive bei [62]. Der hydrophobe Kern dieses Helix-Bündels enthält eine Schicht, den „0-Layer“, welcher aus einem Argininrest und drei Glutaminresten besteht [79]. Die Argininreste stammen von den sogenannten R-SNAREs, die Glutaminreste von den Q-SNAREs [79].

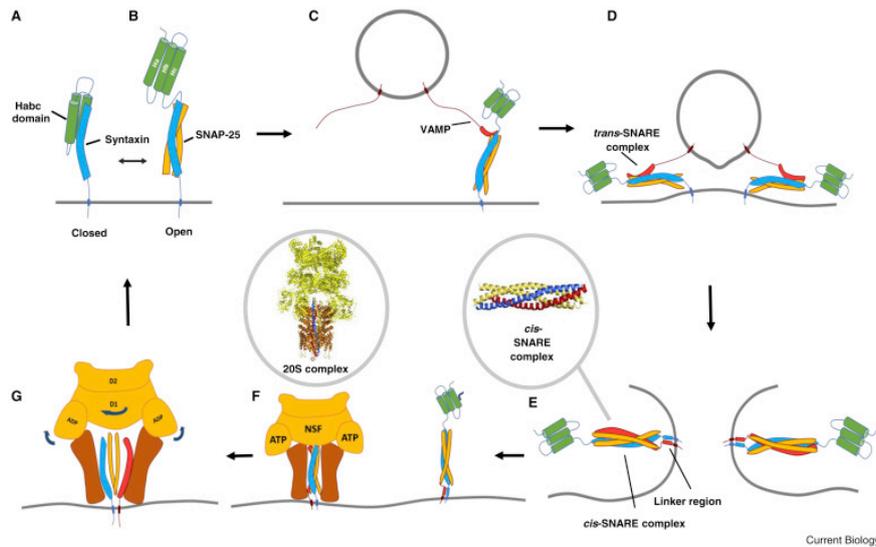


Abbildung 9 SNARE-Komplex: Ausbildung und Auflösung

Entnommen aus Yoon T et al (2018) „SNARE complex assembly and disassembly“ [79]

A/B: Die Konformationsänderung von Syntaxin erlaubt die Assoziation mit weiteren SNARE-Motiven [79].

C/D: Reißverschlussartig wird die Bildung des SNARE-Komplexes von den Aminoterminalen in Richtung transmembranösen Domänen eingeleitet. Hier sind die beteiligten SNARE-Proteine noch einander gegenüberliegend angeordnet, sodass der trans-SNARE-Komplex entsteht [79].

E: Die Fusion der Membranen ist durch die vollständige Ausbildung des cis-SNARE-Komplexes vollendet [79].

F: Bildung des 20S-Komplexes aus den SNAPS (braun), dem NSF (gelb) und dem SNARE-Komplex [79].

G: In der D1-Domäne des NSF kommt es durch die ATP-Hydrolyse zu Konformationsänderungen, wodurch der SNARE-Komplex „aufgesprengt“ wird. Die SNARE-Proteine können nun recycelt werden [79].

Syntaxin, Synaptobrevin und SNAP-25 spielen als SNARE-Proteine eine Hauptrolle beim Bau des SNARE-Komplexes [78][79]. Im Ruhezustand liegen SNARE-Proteine in ihren inaktiven Konformeren vor, sodass unangemessene Fusionsereignisse verhindert werden [79]. Die Habc-Domäne, eine Aminogruppe des Syntaxin, spielt eine wichtige Rolle, um diese Proteine in ihre aktive Form zu überführen [79]. Diese Domäne löst sich von einem SNARE-Motiv, sodass dieses für die SNARE-Motive anderer SNARE-Proteine wie dem SNAP-25 (Q-SNARE) und dem Synaptobrevin (R-SNARE) zugänglich wird (siehe Abbildung 9) [79]. Auf diese Weise kann es zur Vervollständigung der Struktur aus vier Helices kommen [79]. Den Zustand, in welchem sich die SNARE-Proteine gegenüberliegender Membranen als vier Helices anordnen, bezeichnet man als *trans*-SNARE-Komplex [67][24][12]. Nach einem Reißverschlussmuster fusionieren schließlich die Membran des Vesikels und die Ziellmembran, beginnend am Ende der Aminogruppe in die Richtung der Carboxylgruppe [79].

In neuronalen Synapsen ist die Regulation der Exozytose über SNARE-Komplexe auf Regulatoren angewiesen, welche diesen Reißverschlussmechanismus ermöglichen, indem sie die Calcium-Empfindlichkeit steigern [79]. Diese Regulatoren gehören zur Familie der Synaptotagmine [79]. Das Syt1, Syt2 und Syt9 sind an der Exozytose in neuronalen Synapsen besonders beteiligt [79]. Das Syt1,

welches in der Vesikelmembran lokalisiert ist, bindet Ca^{2+} -Ionen und führt darüber zu einer erhöhten Anziehungskraft zwischen den zwei fusionierenden Membranen [79].

Sobald die beteiligten SNARE-Proteine vollständig gefaltet und in derselben Membran liegen, wird der *trans*-SNARE als *cis*-SNARE-Komplex bezeichnet [24]. Mit der Assemblierung der Carboxyterminalen ist die SNARE-Komplex-Ausbildung komplettiert [79].

Nach einer Fusion dissoziiert der *cis*-SNARE-Komplex wieder, um für eine neue Runde bereit zu stehen (siehe Abbildung 10) [12]. Dieser Vorgang geschieht ATP-abhängig über die ATPase *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) und in Gegenwart von SNAPs (soluble NSF attachment Proteines) [12][62][48][50]. Hierbei lassen sich drei SNAP-Isoformen unterscheiden: α SNAP, β SNAP und γ SNAP [12]. Insbesondere α SNAP wird ubiquitär exprimiert und ist darum besonders relevant [73].

Zunächst bindet α SNAP an den SNARE-Komplex und rekrutiert das NSF dorthin [81][5]. Die SNAPs fungieren sozusagen als Adapter zwischen SNARE-Komplex und NSF und sorgen für eine stabile Verbindung [79]. Es entsteht der 20S-Superkomplex aus sechs NSF-Kopien, vier α SNAP-Kopien und den assemblierten SNARE-Motiven [4][82].

NSF ist ein AAA-Protein (ATPase mit verschiedenen zellulären Aktivitäten verknüpft), welches als SNARE-Chaperon funktioniert [82][81]. Ein NSF-Monomer besitzt drei wichtige Domänen [82]. Die N-Domäne ermöglicht die Bindung des SNAP-SNARE-Komplexes [81][82]. Hierzu assoziieren die SNAPs mit dem NSF über dessen Aminotermine [79]. Über die D2-Domäne erfolgt die Bildung eines NSF-Hexamers und die D1-Domäne stellt sozusagen den Motor zur SNARE-Dissoziation dar, denn hier wird die Energie der ATP-Hydrolyse umgesetzt [82][79][4].

Es wird vermutet, dass α SNAP durch die Bindung an eine Membran eine Konformationsänderung durchläuft, die es erlaubt, NSF zu binden [43][81]. Durch die Bindung wird die Affinität des NSF zu ATP erhöht [43] und somit über α SNAP die ATPase-Aktivität des NSF stimuliert [81]. Sobald die ATP-Hydrolyse erfolgt, durchläuft das NSF eine Konformationsveränderung [4]. Die Ringform der D1-Domäne öffnet sich, womit die sogenannte „split washer“ – Form in die „open flat washer“-Form übergeht [82]. Dabei kommt es zur Entwicklung von Rotations- und Scherkräften, die auf den SNARE-Komplex wirken, sodass dieser sich auflöst und die SNARE-Proteine an einer neuen Membranfusion teilnehmen können [4].

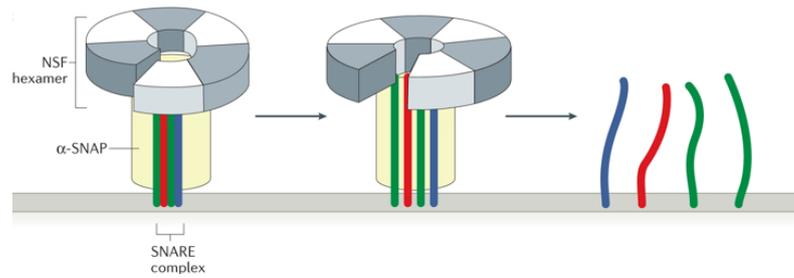


Abbildung 10 SNARE-Komplex-Dissassemblierung durch NSF und SNAPs

Entnommen aus Baker R et al (2016) „Chaperoning SNARE assembly and disassembly“ [4] Links im Bild ist die Interaktion des SNARE-Komplexes und des NSF-Hexamers dargestellt. Die D1-Domäne befindet sich in ihrer kompakten „split washer“ Form. In der Mitte kommt es durch die ATP-Hydrolyse zur Konformationsänderung, wodurch der SNARE-Komplex in seine einzelnen SNARE-Proteine zerlegt wird. Diese sind im rechten Teil des Bildes abgebildet [4].

2.5 Endozytose

Neuronen können, ohne den Pool an bereitstehenden synaptischen Vesikeln zu erschöpfen, hohe synaptische Aktivitäten aufrechterhalten [54]. Um dies zu gewährleisten, folgt auf die Exozytose in der Regel eine rasche Wiederaufnahme und das Recycling der synaptischen Vesikel [13][54].

Endozytose beschreibt eine Reihe von Mechanismen der Zelle, um kleine Moleküle, Makromoleküle und Partikel über Einstülpungen der Plasmamembran unter Bildung von intrazellulären Vesikeln in das Zytoplasma zu internalisieren [30][44]. In seiner breiten Begriffsdefinition schließt die Endozytose unter anderem die Clathrin-abhängige Endozytose, Clathrin-unabhängige Formen, die Phagozytose und die Pinozytose mit ein [44][41].

Wie konventionelle Synapsen können auch die Ribbonsynapsen verschiedene Arten und mehr als eine Form der Endozytose nutzen, um die Pools synaptischer Vesikel aufzufüllen, abhängig von den Anforderungen der entsprechenden Zelle [37].

In diesem Zusammenhang wurden vor allem die klassische Clathrin-abhängige Endozytose (CME), die Bulk-Endozytose und die Kiss-and-Run-Endozytose erforscht [37].

Die Clathrin-abhängige Endozytose stellt eine der bedeutendsten Arten des Vesikel-Recyclings dar und ist vor allem während einer milden neuronalen Stimulation relevant [54][13]. Bei erhöhter neuronaler Aktivität wird eine größere Menge an Neurotransmittern mithilfe der aktivitätsabhängigen Bulk-Endozytose zurückgewonnen [13]. Die „Kiss-And-Run“-Variante stellt eine besonders schnelle Art der Endozytose dar [54].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die klassischen Clathrin- und die Dynamamin-abhängigen Endozytoseformen, sodass zunächst darauf eingegangen werden soll.

In der Clathrin-abhängigen Endozytose werden über Einstülpungen der Plasmamembran sogenannte „Clathrin-coated pits“ gebildet, also mit Clathrin ummantelte Einbuchtungen [66]. Diese Clathrin-coated-pits können durch den Einsatz unterschiedlicher Adapterproteine verschiedenste Rezeptoren bündeln [42][66]. Dies steigert die Effizienz und Vielseitigkeit der Ligandenaufnahme [42][66].

Ursprünglich wurde Proteinen wie dem Adapterprotein AP2, AP180 und Epsin die Fähigkeit zugesprochen, das Clathrin an die entsprechende Plasmamembran zu locken und die Bildung der Einstülpungen zu initiieren [42]. In neueren Arbeiten zeigt sich, dass an der Einleitung der „Pit“-Formung mutmaßlich auch ein „Nukleationsmodul“ beteiligt ist [42]. Dazu sammeln sich an der Zielmembran FCHO Proteine (FCH-Domain Containing Only Protein), das EPS15 (Epidermal Growth Factor) und Intersectine [42]. Fehlt eines dieser drei Proteine, wird die Rekrutierung des Clathrin inhibiert [42].

Die Proteine des Nukleationsmoduls ziehen dann das AP2 und andere spezifische Adapterproteine an, die für die Auswahl der aufzunehmenden Stoffe verantwortlich sind [42]. Bestimmte aufzunehmende

Stoffe interagieren dafür direkt mit den spezifischen Adapterproteinen [32]. FCHO Proteine haben außerdem die Fähigkeit, Membranen zu binden und diese zu formen, sodass Einbuchtungen entstehen können [42].

Das AP2 ist neben Clathrin die am reichlichsten vorhandene Komponente der „Clathrin-coated Pits“ [42]. Ohne dieses Kernadapterprotein kommt es nicht zur Rekrutierung von Clathrin und zur unvollständigen Ausbildung der „Clathrin-coated-Vesicles“ [42]. Durch die Bindung an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) der Plasmamembran kommt es zu einer Konformationsänderung in AP2, dadurch wird eine Clathrin-Bindestelle freigelegt, sodass dieses angezogen werden kann [32].

Zur Formierung des Clathrin-Mantels, der um die Einbuchtung der Plasmamembran entsteht, polymerisieren Clathrin-Triskelia zu Hexagons und Pentagons und unterstützen so die Formung der Vesikel [42].

Die Abschnürung der Vesikel erfolgt mithilfe von Dynamin [42]. Über BAR-haltige Proteine (bin-amphiphysin-rvs -Domäne) wie das Amphiphysin oder Endophilin wird das Dynamin an das Vesikel rekrutiert [42]. Dieses polymerisiert um den Hals des abzuschneidenden Vesikels, wodurch die GTPase-Aktivität stimuliert wird [42][25]. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Dynamins, durch welche das Vesikel mechanisch abgetrennt wird [42][25].

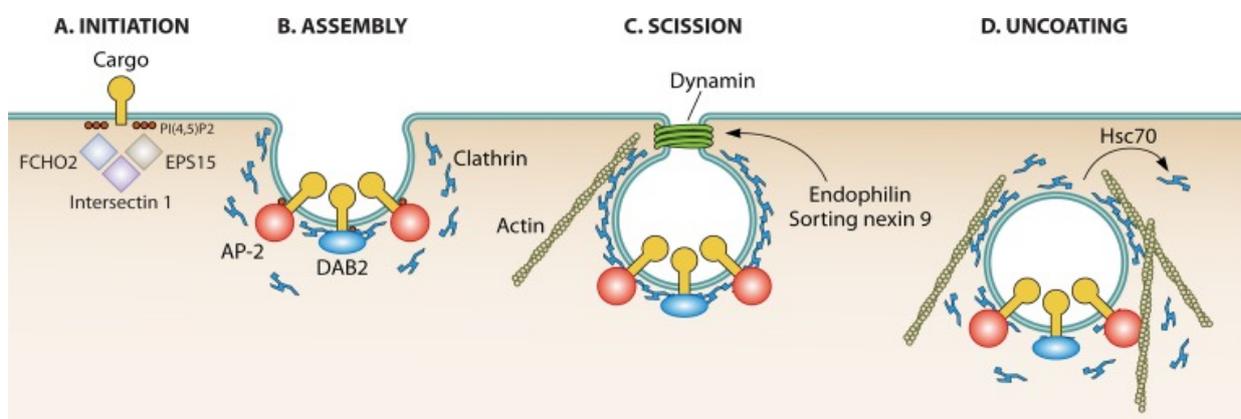


Abbildung 11 Clathrin-abhängige Endozytose

Entnommen aus *Latomanski E et al (2019), „Taming the Triskelion: Bacterial Manipulation of Clathrin“* [35]. Dargestellt ist der Ablauf der Clathrin-abhängigen Endozytose in seinen Einzelschritten, wie oben beschrieben. Zusätzlich ist hier das Aktin mitaufgeführt: es polymerisiert ebenfalls um den Stiel des abzutrennenden Vesikels und ist an der freien Beweglichkeit des Vesikels mitbeteiligt [42][35].

Sobald das Vesikel sich von der Membran gelöst hat, wird auch das Clathrin wieder gelöst [42]. Das Uncoating und die Zurückverwandlung in Triskelia erfolgt vor allem durch das Hitzeschockprotein Hsc70 [42][14]. Ein Triskelion besteht jeweils aus drei leichten und drei schweren Ketten, die sich zu hexagonalen Strukturen zusammenlagern und die biochemische Struktur des Clathrin bilden (siehe Abbildung 15 in Kapitel 2.6.1) [25]. Für das Uncoating rekrutiert Auxillin das Hsc70 an den

Zielwirkort und unterstützt selbst durch seine Bindung die Destabilisierung des Clathrin-Mantels, sodass ein freies endozytotisches Vesikel entsteht [42][21]. Der Inhalt kann nun erst in frühe Endosomen und dann entweder in andere Zellkompartimente aufgenommen werden oder zur erneuten Exozytose zurück an die Membranoberfläche geschickt werden [42]. Clathrin sowie die übrigen Komponenten des endozytotischen Apparats stehen nun für die erneute Bildung eines „Clathrin-coated Vesicles“ bereit [42].

Neben der klassischen Clathrin-abhängigen Endozytose (CME) soll außerdem auf die aktivitätsabhängige Bulk-Endozytose (ADBE) und die „Kiss-and-Run“- Endozytose eingegangen werden.

Wie in der Arbeit von *Arpino G et al (2022)* gezeigt werden konnte, kollaborieren die klassische Clathrin-abhängige Endozytose und die Bulk-Endozytose, um die endozytotische Kapazität bei aktiven Synapsen zu steigern [3].

Die aktivitätsabhängige Bulk-Endozytose kann über große Einbuchtungen der Plasmamembran noch größere Mengen an synaptischen Vesikeln internalisieren [13]. Dadurch ist sie im Stande, bei erhöhter neuronaler Aktivität die Endozytose aufrechtzuerhalten [13]. Der Trigger für diese Form der Endozytose ist die Calcium- und Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin [13]. Diese wird durch einen erhöhten Calciuminflux bei vermehrter synaptischer Aktivität stimuliert, woraufhin das Calcineurin eine Reihe von Proteinen, die Dephosphine dephosphoryliert, welche für die Endozytose essentiell sind [13]. Eines dieser Proteine ist die GTPase Dynamin 1. Dynamin 1 interagiert dann mit diversen weiteren Proteinen wie Amphiphysin, Endophilin und Syndapin [13]. Insbesondere dem Zusammenspiel von Syndapin und Dynamin 1 konnte in vorangegangenen Arbeiten [13] eine große Bedeutung in der Auslösung der Bulk-Endozytose beigemessen werden. Eine Störung des Zusammenspiels von Syndapin und Dynamin 1 zeigt nur in der Bulk-Endozytose eine Inhibition, nicht aber in der klassischen Clathrin-abhängigen Endozytose [13].

Sowohl die klassische Clathrin-vermittelte Endozytose als auch die Bulk-Endozytose sind somit Dynamin-abhängig [13]. Für die Clathrin-abhängige Endozytose ist der Phosphorylierungszustand des Dynamins nicht ausschlaggebend [13]. Zur Aktivierung der Bulk-Endozytose ist jedoch eine Dephosphorylierung des Dynamins notwendig, sodass Syndapin gebunden werden kann und dadurch ein Trigger für die Bulk-Endozytose gegeben ist [13].

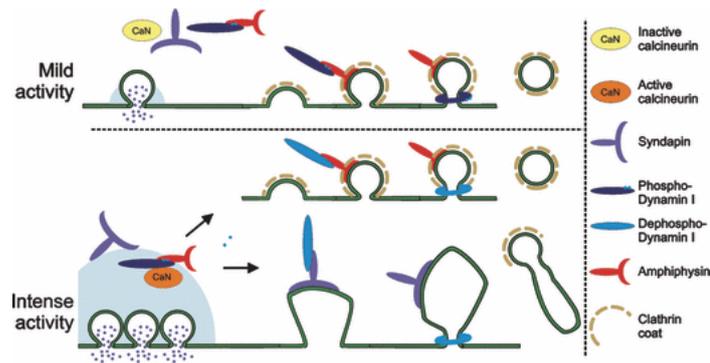


Abbildung 12 Gegenüberstellung der CME und der ADBE

Entnommen aus Clayton E et al (2009) „The molecular physiology of activity dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles” [13]. Oben ist die Exo- und Endozytose während milder Aktivität dargestellt, wobei die CME aktiv ist und nur wenige synaptische Vesikel recycelt werden. Unten ist dargestellt, wie es bei einer erhöhten synaptischen Aktivität zur Stimulierung der CME und der ADBE kommt, wobei in diesem Fall die CME auch mit dephosphoryliertem Dynamin funktioniert [13].

Ein Mechanismus der ultraschnellen Endozytose ist die „Kiss-and-Run“-Fusion [77]. Hierbei öffnet sich bei einem kurzen Kontakt mit der Plasmamembran eine kleine Pore, ohne dass das Vesikel gänzlich mit der Membran fusioniert [77]. Das Vesikel wird nach Verschluss der Pore schnell wieder zurückgewonnen, sodass es nur zu einer minimalen Unterbrechung der Freigabefunktion an Synapsen kommt [77]. Auf diese Weise unterstützt die Kiss-and-Run-Endozytose eine andauernde Transmitterfreisetzung [77]. Dies ist besonders für die schnellarbeitenden Ribbonsynapsen der Photorezeptoren eine wichtige Eigenschaft und in der Tat konnte gezeigt werden, dass die „Kiss-and-Run“-Endozytose hier bedeutsam am Vesikelrecycling beteiligt ist [77].

Obwohl diese Form der Endozytose schnell erfolgt, kann sie - wie die CME - immer nur einzelne synaptische Vesikel erneuern, sodass sie bei erhöhter synaptischer Aktivität zeitweise zwar unterstützend sein kann, ihre Kapazität alleine aber nicht ausreicht [13]. Hierfür eignet sich die ADBE [13].

Neben den Clathrin-abhängigen Mechanismen gibt es - wie oben erwähnt - auch Clathrin-unabhängige. Die Clathrin-unabhängige Endozytose lässt sich dann weiter einteilen, in die Dynamin-abhängigen und die Dynamin-unabhängigen Formen [56].

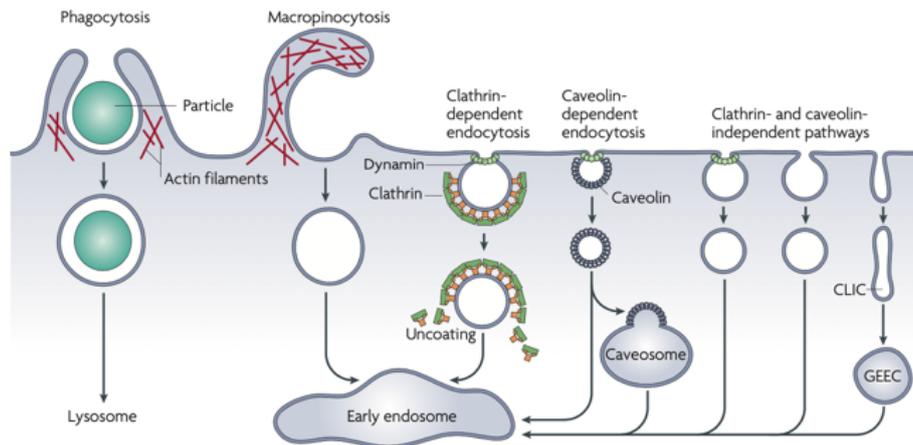


Abbildung 13 Formen der Endozytose

Entnommen aus Mayor S et al (2007) „Pathways of clathrin-independent endocytosis“ [41]
 Dargestellt ist eine Übersicht der verschiedenen Endozytoseformen.

Unter den Clathrin-unabhängigen aber Dynamin-abhängigen Formen ist die am besten untersuchte die Caveolae-vermittelte Endozytose [41].

Caveolae sind 50-80nm große, flaschenförmige Vertiefungen in der Plasmamembran, welche von einem aus Caveolin-1 bestehenden Mantel umgeben sind [49][41]. Die Caveoline sind - ebenso wie das Cholesterol und die Sphingolipide, die ein weiterer Bestandteil sind - wichtig für die Stabilität der Caveolae [49]. Darüber hinaus finden sich auch Glycosyl Phosphatidylinositol-Anker Proteine (GPIs) in der Membran [41]. Vergleichsweise machen die Caveolae eher einen kleineren Teil der endozytotischen Aktivität aus, sind aber immerhin befähigt, diverse Lipide und Proteine aufzunehmen [41][55]. Das als GTPase fungierende Dynamin findet sich am Hals der flaschenförmigen Invagination und wird zur Abschnürung der caveolären Vesikel benötigt [49].

Ein zweiter Dynamin-abhängiger Weg ist zusätzlich von der GTPase RhoA abhängig [41][55].

RhoA ist insbesondere für die Wiederaufnahme von Interleukin-2 verantwortlich [55]. Diese Form der Endozytose ist unabhängig von Caveolae und Clathrin [55]. Am wahrscheinlichsten wirkt RhoA in der Endozytose, indem es die Rekrutierung von Aktin vermittelt [41].

Endophilin besitzt die Fähigkeit, zum einen Rezeptoren mit aufzunehmenden Stoffen zu binden und zum anderen über seine BAR-Domäne die Krümmung der Membran zu vermitteln und Dynamin zur Abschnürung des Vesikels zu rekrutieren [7]. Ursprünglich wurde Endophilin eine Funktion in der Clathrin-abhängigen Endozytose zugeschrieben, in neueren Forschungsarbeiten wurde nun aber auch eine Clathrin-unabhängige und Dynamin-abhängige Form charakterisiert [7]. Die FEME (Fast Endophilin-Mediated Endocytosis) lässt sich durch etwas andere molekulare Mechanismen und vor allem einer schnellen Kinetik von der Clathrin-abhängigen Endozytose unterscheiden [36].

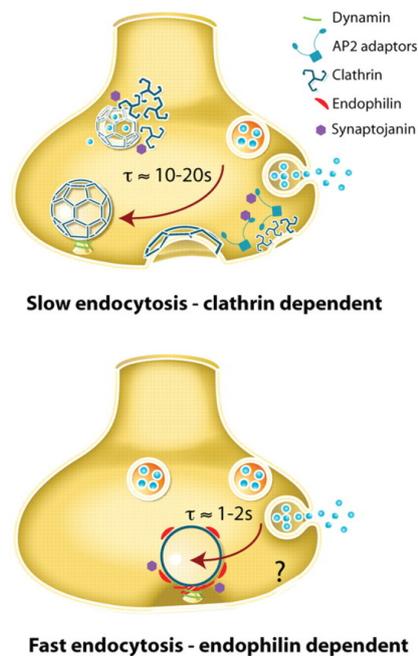


Abbildung 14 Die Clathrin-abhängige und die Endophilin-abhängige Endozytose

Entnommen aus Llobet A et al (2011) „Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse“ [36] Zwei verschiedene Endozytoseformen an der synaptischen Terminale von retinalen Bipolarzellen. Oben: Clathrin-abhängiger Pfad. Unten: Endophilin-abhängiger Pfad [36].

Darüber hinaus sind bei den Dynamin-unabhängigen Formen die CDC42- und die ARF6-regulierte Endozytose zu erwähnen [41]. Da sie aber für diese Arbeit eher weniger relevant sind, soll nur sehr kurz auf diese Clathrin- und Dynamin-unabhängigen Formen der Endozytose eingegangen werden.

Cdc42 ist eine GTPase, die für die Aufnahme von großen Flüssigkeitsmengen zuständig ist und als Teil der Phagozytose, der Makropinozytose und von FEME mitwirkt [56][55][41]. Mit der GTPase GRAF1 stellt CDC42 außerdem eine Komponente des CLIC/GEEC (clathrinindependent carrier/glycosylphosphatidylinositol - anchored protein-enriched endosomal compartments) pathway's dar [55]. Der GEEC- Pathway ist beispielsweise an der Aufnahme von GPI-Ankerproteinen beteiligt [55]. Die ARF6 ist in der Endozytose vor allem am Recycling beteiligt und an der Aufnahme von MHC- I Proteinen und Integrinen [55]

Die Phagozytose und Makropinozytose seien an dieser Stelle auch nur kurz erwähnt, da auch sie einer anderen, Clathrin-unabhängigen Gruppe angehören. Beide sind abhängig von Aktin-Polymerisationen zur Umformung der Plasmamembran [41].

Die Phagozytose beschreibt die Aufnahme von großen Partikeln, wie Bakterien, die $1 \mu m$ überschreiten [41]. In Zellen des Immunsystems wie den Makrophagen spielt die Phagozytose zum Beispiel eine bedeutsame Rolle [44].

Bei der Makropinozytose wird kontinuierlich und unspezifisch Extrazellulärflüssigkeit mit darin gelösten Molekülen in die Zelle aufgenommen [41][66]. Durch das Krümmen der Membran entstehen im Vergleich zu anderen Endozytoseformen recht großen Vesikel [55].

2.6 Die Schlüsselproteine der Endozytose

In dieser Arbeit stehen die Proteine Clathrin und Dynamin als Mitspieler der CME im Mittelpunkt, sodass im Folgenden auf diese Schlüsselproteine genauer eingegangen werden soll.

2.6.1 Clathrin

Clathrin ist ein Mantelprotein, welches in der Endozytose im Wesentlichen dazu dient, eine Einstülpung der Plasmamembran zu formen und die dort gebundenen Liganden zu einem Vesikel zu bündeln [25][66]. Abgesehen davon ist es auch am intrazellulären Transport zwischen Golgi-Apparat und Endosomen beteiligt sowie an bestimmten phagozytotischen Ereignissen [33]. In seiner biochemischen Struktur ist Clathrin ein Hexamer mit je drei schweren und drei leichten Ketten, die ein Triskelion formen (siehe Abbildung 15) [25]. Zahlreiche Triskelia können wiederum zu einer räumlichen, ballförmigen Struktur assoziieren, welche aus hexagonal und pentagonal angeordneten Triskelia besteht [25]. In der Clathrin-abhängigen Endozytose werden die Clathrinmoleküle von Adapterproteinen an die Membran gelotst [25]. Diese Adapterproteine binden an Transmembranproteine und „locken“ damit das Clathrin an die Stellen, wo Vesikel gebildet und verpackt werden [25].

Siehe hierzu Abbildung 15 auf der folgenden Seite und Kapitel 2.5 zur ausführlichen Beschreibung der Funktion von Clathrin in der Endozytose.

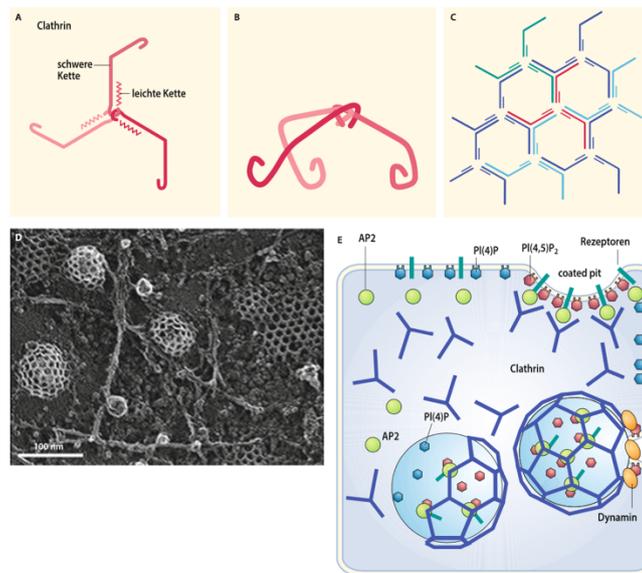


Abbildung 15 Struktur des Clathrins

Entnommen aus Heinrich P, Müller M, Graeve L (2014) „Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie“ 9. Auflage [25]

- A:** Abgebildet ist ein Clathrintriskelion, bestehend aus drei leichten und drei schweren Ketten [25].
- B:** Darstellung des Triskelions von der Seite [25].
- C:** Zusammenlagerung mehrerer Triskelien in ein hexagonales Muster [25].
- D:** In den wabenartigen Strukturen sind Hexa- und Pentagone in verschiedenen Stadien sichtbar, mit deren Hilfe es zu einer Vorwölbung der Plasmamembran kommt. Erkennbar sind auch Caveolae, als Ausstülpungen ohne Wabenmuster. Aktinfilamente finden sich als faserartige Strukturen. Diese Abbildung stammt ursprünglich aus Heuser JE et al (1989) [26][25].
- E:** Entstehung von Clathrin-ummantelten Vesikeln. Dargestellt ist zudem die Clathrin-abhängige Endozytose wie oben beschrieben (Abschnitt 2.5 Endozytose). Mit der Abschnürung des Vesikels durch Dynamin kommt es zur Dephosphorylierung von PI (4,5) P₂ zur PI(4) [25].

2.6.2 Dynamin

Die Dynamine gehören zur Familie der GTPasen, welche eine Schlüsselfunktion in der Endozytose von Vesikeln in Pflanzen- und Tierzellen haben [2]. Es sind Proteine, welche die Teilung oder Abschnürung von Membranen katalysieren können und somit wichtig für Endozytose und synaptische Übertragungen sind [2].

Jedes Dynamin-Protein besteht aus einer N-terminalen GTPase-Domäne gefolgt von einer α -helikalen mittleren Domäne (MD) und einer GTPase-Effektordomäne (GED), die miteinander interagieren [57][72]. Zwischen der MD und der GED findet sich außerdem eine variable Sequenz. Beim Dynamin handelt es sich um eine lipid-bindende Pleckstrin-Homologe (PH), deren Funktion darin besteht, Plasmamembranen zu binden [72]. Die carboxyterminale Prolin-reiche-Domäne (PRD) ist befähigt, andere an der Endozytose beteiligte Proteine zu binden [72].



Abbildung 16 Struktur des Dynamins

Entnommen aus *van der Bliek A et al (2010) „Dynamin subunit interactions revealed, Developmental Cell“* [72]
 Dargestellt sind die Proteindomänen des Dynamins.

Dynamin hat vor allem die Fähigkeit, sich in der Endozytose zu einem kontrahierenden helikalen Polymer zu assoziieren, welcher sich um die Hälse von neuen, abzuschnürenden Vesikeln legt [2]. Die MD und die GED können sich aneinander legen und einen Stiel zwischen der lipid-bindenden PH und der GTPase-Domäne bilden [57]. Durch das überkreuzte Zusammenfügen dieser Stiele entsteht die Funktionseinheit des Dynamins, welche ein Dimer ist [80][19].

Durch die Polymerisierung von Dynamin-Dimeren bildet sich ein Ring um die abzutrennende Membraneinstülpung [80]. Das Dynamin zieht sich in seiner helikalen Struktur durch die Energie, die bei der GTP Hydrolyse entsteht, zusammen und teilt damit die Membran [2].

Die GTP-Hydrolyse, die den Anstoß zu dieser Kontraktion liefert, wird vermutlich durch verschiedene Interaktionen eingeleitet, zum Beispiel durch den Kontakt mehrerer benachbarter GTPase-Domänen [72][80]. Über die PRD können außerdem Komponenten der Endozytose wie Endophilin und Amphiphysin gebunden werden, durch welche die Krümmung der Plasmamembran unterstützt wird [7][80].

2.7 CSP α

Im Mittelpunkt meiner Dissertation steht das synaptische Chaperon-Protein CSP α .

Spezifische Mechanismen sind erforderlich, um alte und denaturierte Proteine in ihrer physiologischen Faltung funktionsfähig zu halten und damit die kontinuierliche Funktion der synaptischen Exo- und Endozytose in Nervenendigungen bei hoher Geschwindigkeit zu gewährleisten [59].

Zu diesen Faltungshelferproteinen, die quasi als „Verjüngungsproteine“ fungieren, gehört das CSP α , ein im Nervensystem weitverbreitetes Co-Chaperon, das sich als präsynaptisches Vesikelprotein in den Terminalen von Nervenendigungen findet [80][9][59].

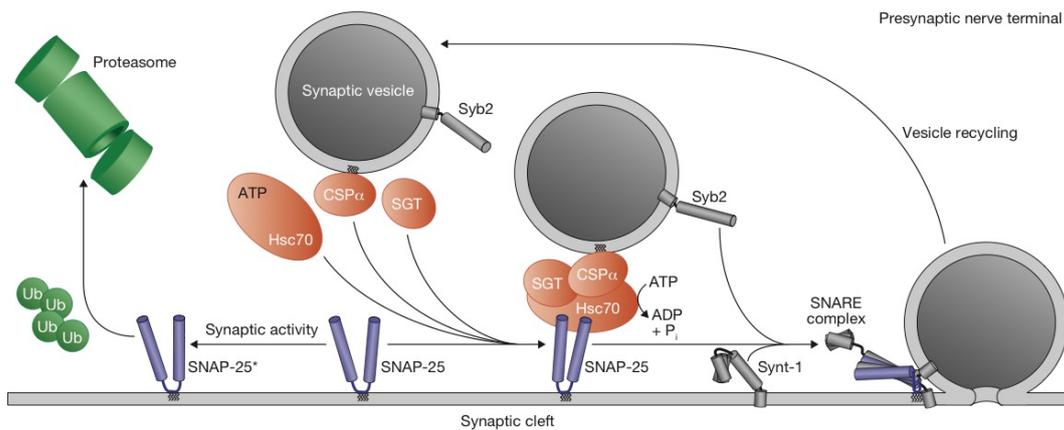


Abbildung 17 Funktion des CSP α /Hsc70/SGT-Chaperon-Komplexes

Entnommen aus *Sharma M et al (2011) „CSP α promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity“* [62] SNAP-25* steht hier für eine fehlgefaltete Form des SNAP-25 [62].

Säugetiere exprimieren CSP α , β und γ , kodiert durch die Gene Dnajc5a, b und c [9]. CSP β und γ spielen in dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle, da sie eher in den Hoden und CSP β zudem in den Neuronen der Haarzellen des auditorischen Systems zu finden sind [9]. Das CSP α ist verbreitet im Nervensystem zu finden und mit synaptischen Vesikeln assoziiert [9][80][23]. Es wird in der Retina in beiden Synapsenschichten, der inneren und der äußeren plexiformen Schicht, stark exprimiert [23].



Abbildung 18 Struktur des CSP α

Entnommen aus Burgoyne R et al (2015) „Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration“ [9] und angepasst. Dargestellt ist der allgemeine Aufbau des menschlichen CSP α Proteins [9].

Die N-Terminale des CSP α ist mit ihrer DNA-J Domäne charakteristisch für die Familie der DNA-J/Hsp40 Chaperonen [20][80]. Die J-Domäne besteht aus etwa 70 Aminosäuren [16]. Der HPD-Abschnitt innerhalb der J-Domäne erlaubt die Bindung an Hsc70/Hsp70 [9]. Durch die Interaktion der DNA-J Domäne mit der DNA-K Domäne des Hsc70 kommt es zur Aktivierung der ATPase-Aktivität des Hsc70 und dadurch zur Neufaltung von Substratproteinen [80] [59] [9]. Die aus 11-13 Cysteinen bestehende Region, welche sich in der Mitte der Struktur befindet, ist palmitoyliert und von Bedeutung für die Bindung an die Membranen der synaptischen Vesikeln [16][80]. Der C-Terminus bindet SGT und Hsc70 [80], wobei die genau physiologische Bedeutung der Interaktion mit SGT unklar ist [9]. Es entsteht ein trimere Komplex aus CSP α , Hcs70 und SGT Proteinen (small glutamine rich tetratricopeptide repeat-containing protein). Dieser trimere Komplex stellt den eigentlichen funktionellen Chaperonen-Komplex dar [80][59].

2.7.1 Die Funktion des CSP α in der Exozytose

Ein wichtiges Substrat des trimere Komplexes aus CSP α , Hcs70 und SGT ist das für die Exozytose relevante Protein SNAP-25 [64]. SNAP-25 ist ein t-SNARE Protein in der Plasmamembran, das zusammen mit Syntaxin und Synaptobrevin während der Exozytose den SNARE-Komplex ausbildet [62][64]. SNAP-25 ist ein ungefaltetes Protein, welches, um als Teil des SNARE-Komplexes zu funktionieren, in eine „coiled-coiled“-Struktur gebracht werden muss, sodass sich die Helices der beteiligten Proteine Syntaxin, SNAP-25 und Synaptobrevin verdrillen (s.o.) [80][62][79]. Während der synaptischen Aktivität kann das SNAP-25 spontan in eine abnormale Konformation übergehen [62]. Das SNAP-25 hat - anders als das Syntaxin und das Synaptobrevin - zwei SNARE Motive [62]. Aus diesem Grund durchläuft es mehr Konformationsänderungen, was eine Fehlkonformation wahrscheinlicher macht [62]. Zusätzlich steigt bei einer erhöhten synaptischen Aktivität die Anzahl der Auf- und Abbauzyklen des SNARE-Komplexes, was bei einem CSP α -Mangel in Synapsen den Effekt verstärkt, dass die Menge der nativen SNAP-25 Proteine sinkt und vermehrt Fehlkonformationen entstehen [62]. Diese abnormalen Konformere verhindern die SNARE-Komplexbildung und führen zu einem vermehrten Abbau von SNAP-25 über den Ubiquitin-Proteasom-Weg [62].

Der CSP α /Hsc70/SGT Komplex bindet über Hsc70 an SNAP-25 Proteine und hält sie in ihrem funktionsfähigen Konformer, was vor einer erhöhten Fehlerrate schützt und für den Fortgang der Vesikelfusion mit der präsynaptischen Plasmamembran durch die Bildung von SNARE-Komplexen essentiell ist [62][80].

Eine Deletion von CSP α führt somit zu einem Abfall in der Anzahl der nativen, funktionsfähigen Proteine und damit zur Formierung fehlerhafter SNARE-Komplexe [80][62]. Der synaptische SNARE-abhängige Mechanismus zur Vesikelfusion wird behindert und eine verminderte Exozytoseaktivität tritt ein [64][62]. Die Akkumulation von inkorrekten Proteinen bedingt abnormale Proteininteraktionen und führt zu einer synaptischen Dysfunktion [9]. Verlust und Degeneration verbleibender Synapsen sind die Konsequenz [64].

2.7.2 Die Funktion des CSP α in der Endozytose

Chaperone wie das CSP α sind essentiell, um die an synaptischen Prozessen beteiligten Proteine in ihren korrekten Konformeren und damit funktionsfähig zu halten [80].

Zum Verständnis der Mechanismen, die von der CSP α -Funktion abhängig sind, wurde nach weiteren Substraten des CSP α gesucht. Neben dem exozytotischen Protein SNAP-25 sind unter den CSP α Substraten auch mögliche endozytotische Substrate entdeckt worden, eines davon ist Dynamin 1 [64][80].

Dynamin 1 bindet direkt und ADP-abhängig nur an CSP α , anders als SNAP-25, welches auch an Hsc70 bindet [64][80]. Somit sind beide Proteine Substrate des CSP α /Hsc70-Komplexes, jedes interagiert an unterschiedlichen Verknüpfungen in der Synapsenfunktion, aber beide tragen zum funktionalen und strukturellen Erhalt der Synapsen bei [80].

In Abschnitt 2.6.2 dieser Dissertation ist der grundlegende Aufbau von Dynamin dargestellt. Die elementare Funktionseinheit des Dynamin 1 ist ein Dimer [19][80]. Diese Dimere formen durch Polymerisierung einen Ring, welcher sich um die Hälsen von clathrin-beschichteten Einstülpungen in der Membran legt und zur GTP-abhängigen Abtrennung dieser führt [80]. Dynamin 1 durchläuft eine Reihe unterschiedlicher Konformationsänderungen und Interaktionen mit diversen Proteinen, um diese Schritte durchführen zu können [80].

In CSP α -Knockout-Mäusen zeigte sich die Polymerisierung des Dynamins gestört [80]. Die Funktion des CSP α besteht somit wahrscheinlich darin, das Dynamin 1 in einen Konformer zu bringen, welcher die Selbstassemblierung des Dynamins erleichtert [80].

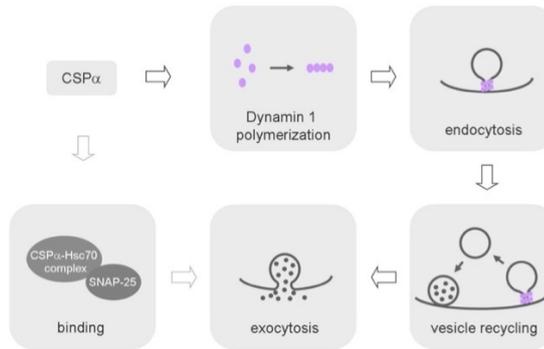


Abbildung 19 Funktion des CSPα

Entnommen aus Sheng J et al (2012) „Cysteine String Protein α : A New Role In Vesicle Recycling“ [64].
Dargestellt ist die regulierende Funktion des CSPα für Endozytose und Exozytose [64].

Darüber hinaus zeigt sich eine eingeschränkte Fähigkeit, während eines längeren Stimulus den Pool an verfügbaren Vesikeln durch die Endozytose zu erhalten, sodass in CSPα-Knockout-Mäusen das Vesikel-Recycling behindert ist [53]. (Beim Vesikel-Recycling werden mit der Plasmamembran fusionierte Vesikel wieder in den recycelbaren Pool an Vesikeln aufgenommen und können von dort erneut mobilisiert werden. Siehe Abbildung 19 [64]) Eine verringerte Menge an SNAP-25 senkt die Anzahl verfügbarer, recycelbarer Vesikeln für die Exozytose und beeinflusst damit die Rate endozytotischer Abläufe negativ [53]. Die Präsenz von fehlerhaftem Dynamin 1 stört zusätzlich den Aufnahmemechanismus, wodurch der Vorrat recycelbarer Vesikel weiter verkleinert wird [53].

Zusammenfassend zeigt die Abbildung 20 die Funktion des CSPα, Endo- und Exozytose zu koppeln, indem es sowohl das SNAP-25 als auch das Dynamin 1 in funktionsfähiger Konfiguration hält, um den Pool an verfügbaren Vesikeln während der Signaltransduktion aufrechtzuerhalten [80][53].

In der Arbeit „The synaptic vesicle cycle: A cascade of protein-protein interactions“ von Südhof T et al (1995) [68] wird die These aufgestellt, dass das CSP durch eine Interaktion mit Hsc70 am Uncoating der Clathrin-ummantelten Vesikel beteiligt ist, dieses beschleunigt und auf diese Weise ein weiterer Zusammenhang zwischen CSP und Clathrin in der Endozytose besteht [68]. Der Mechanismus des Uncoatings ist im Abschnitt 2.5 Endozytose dieser Dissertation dargestellt.

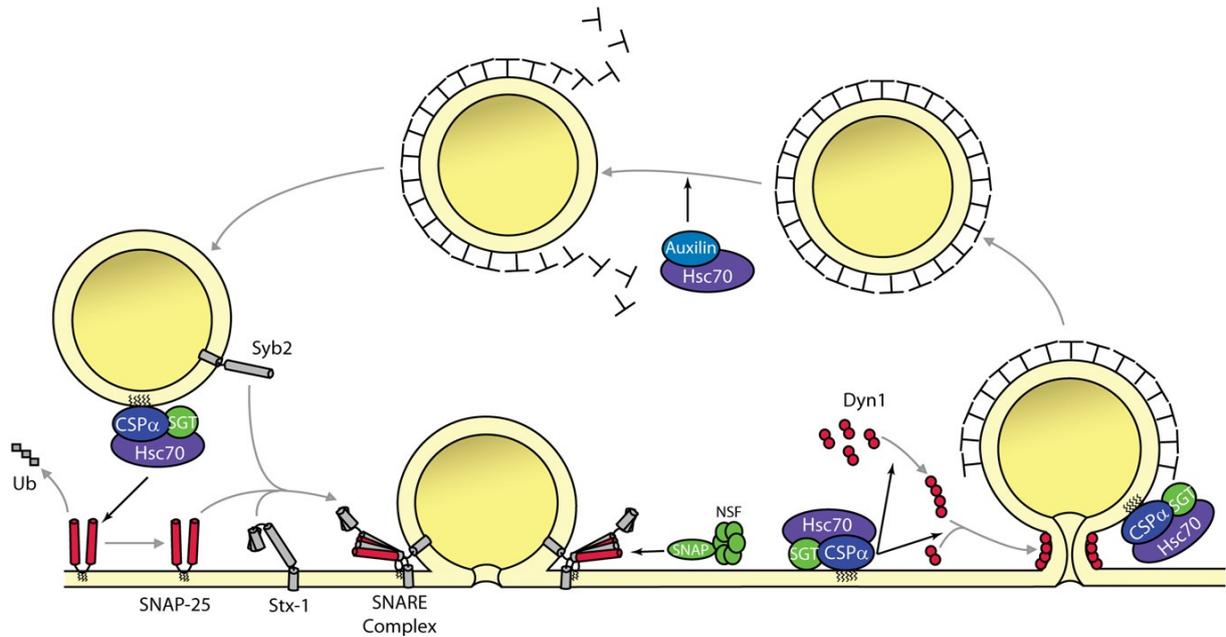


Abbildung 20 CSP α in Exozytose und Endozytose

Entnommen aus Zhang Y et al (2012) "Identification of CSP α Clients Reveals a Role in Dynamin 1 Regulation" [80]. Dargestellt sind exozytische und endozytische Funktionen des CSP α [80]. Links im Bild ist die Bildung des CSP α /Hsc70/SGT Komplexes dargestellt, welcher links unten an SNAP-25 bindet, um dessen Degradation zu verhindern [80]. Mit SNAP-25 als Teil des SNARE-Komplexes kann auf diese Weise die Exozytose erfolgen [64]. Rechts unten im Bild bindet CSP α an das Dynamin 1, sodass dessen Polymerisierung stattfindet und damit die Endozytose des Vesikels [80]. (Auch abgebildet ist NSF - eine AAA-ATPase, durch welche die Disassemblierung des SNARE-Komplexes stattfindet. Weiters wird das Auxilin dargestellt, mit dessen Hilfe das Clathrin wieder vom Vesikel gelöst wird [80].)

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterialien

3.1.1 Gewebe

CSP α -Knockout Tiere

Die Mäuse [20][59] wurden aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes bezogen. Die Tiere wurden ab der Geburt in konstanten 12 Stunden Hell-/ 12 Stunden Dunkel-Zyklen gehalten. Die Haltung und Zucht der Tiere wurde von den lokalen Behörden (Landesamt für Verbraucherschutz, amtstierärztlicher Dienst) sowie von der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes geprüft und bewilligt.

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Versuche wurden an Präparaten von Mäuseretinas durchgeführt. Es wurden jeweils 4 CSP α -Knockout-Mäuse und 4 Wildtyp-Mäuse pro postnatalem Entwicklungsstadium eingesetzt. Die Retinae stammten von Mäusen, die am 14., 15. und 16. Tag der postnatalen Entwicklung (P14, P15 und P16) präpariert wurden. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Zur Sicherung der Ergebnisse wurden zwei zusätzliche Versuche zu jedem dieser postnatalen Tage durchgeführt, also insgesamt 3 unterschiedliche Versuche. Die Präparate eines jeden Versuchs waren aus einer anderen Einbettung. Jede Einbettung enthielt die Retina von Mäusen aus demselben Wurf und beinhaltete sowohl Knockouttiere als auch die entsprechenden Kontrolltiere.

3.1.2 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle der verwendeten Primärantikörper und ihrer Verdünnungen

Name des Antikörpers	Tierart	Verwendete Verdünnung
Anti-Clathrin; Klon 7A9	Maus (monoklonal) [76]	1:200
Anti-Dynamin; Klon 1E10	Maus (monoklonal) [18]	1:200
Anti-PSD 95	Kaninchen (polyklonal) [29]	1:500
Anti- Ribeye; Klon 2D9	Maus (monoklonal) [15]	1:500

Tabelle 1 | Verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnungen

Tabelle der verwendeten Sekundärantikörper und ihrer Verdünnungen

Sekundärantikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Verwendete Verdünnung
Chicken-Anti-Mouse	Alexa488 (Invitrogen/Molecular Probes)	1:1000
Donkey-Anti-Rabbit	Alexa568 (Invitrogen/Molecular Probes)	1:1000

Tabelle 2 | Verwendete Sekundärantikörper und ihre VerdünnungenPositivkontrollen mit Anti-Ribeye 2D9

Ribbonsynapsen sind in Photorezeptorzellen von großer Bedeutung für die schnelle Freisetzung von Neurotransmittern sowie für die Übertragung von Signalen in hoher Auflösung [58]. Ribeye ist das Hauptprotein dieser Ribbonsynapsen [58][60]. In den Referenzinkubationen wurde der Anti-Ribeye-Antikörper 2D9 eingesetzt, um durch die Markierung der Ribbonsynapsen ihre Verteilung in den Synapsenschichten der Retina zu visualisieren [15][18][58]. Der monoklonale Anti-Ribeye-Antikörper 2D9 richtet sich gegen die letzten 12 Aminosäuren des Ribeyes, welche sich carboxyterminal vor der B-Domäne des Ribeyes befinden [15]. Die Spezifität dieses Antikörpers wurde bereits in der Forschungsarbeit *Dembla et al. (2018)* [15] mithilfe eines Western Blot von Ribeye-Knockout-Gewebe verifiziert [15].

Frühere Untersuchungen zeigten im CSP α -Knockout synaptische Veränderungen in Photorezeptorzellen und insbesondere eine hohe Empfindlichkeit der Ribbonsynapsen gegenüber dem CSP α -Defizit [59].

Somit konnte der Antikörper gegen Ribeye in dieser Dissertation als geeignete Positivkontrolle dienen, um weitere, von einem CSP α -Knockout betroffene Proteine zu untersuchen und um die bereits bekannten Veränderungen der Ribbonsynapsen mit den Veränderungen der von mir untersuchten Proteine zu vergleichen.

Doppelimmunfluoreszenz mit Anti-PSD-95

PSD-95 ist ein wichtiges Gerüstprotein in der exzitatorischen postsynaptischen Dichte (PSD) [11]. Als membranassoziierte Guanylatkinase gehört PSD-95 in eine Familie von Proteinen, welche für synaptische Aktivität und Plastizität wichtig sind [11][34].

Exprimiert wird das Protein PSD-95 in beiden Synapsenschichten der Retina [34]. In der äußeren plexiformen Schicht ist das Immunsignal etwas stärker als in der inneren plexiformen Schicht der Retina [34]. In der äußeren plexiformen Schicht findet sich das PSD-95 präsynaptisch in der terminalen Endigung der Photorezeptorzelle [34].

In jedem Versuch wurde zusätzlich eine Doppelimmunfluoreszenz mit einem gegen PSD-95 gerichteten Antikörper durchgeführt, um präsynaptisch die Plasmamembran der Photorezeptorzellen sichtbar zu machen [75]. Da das PSD-95 als Bestandteil der Präsynapse der Photorezeptoren in der

Retina die Ränder einzelner präsynaptischer Terminalen markiert, kann es die gesuchten Synapsen lokalisieren und als Referenz eingesetzt werden [76].

Anti-Dynamin 1 (Klon 1E10)

Dynamin 1 ist die am stärksten exprimierte Isoform von Dynamin in der Mausretina und den Photorezeptorzellen der Retina [22].

Der hier verwendete monoklonale Antikörper Anti-Dynamin 1E10 ist spezifisch gegen die Dynamin 1xb Variante des Dynamin 1 gerichtet [18]. Die Verteilung des Dynamins 1xb gleicht der Verteilung bei Markierung mit einem Antikörper (Hudy1), der nicht zwischen den Varianten Dynamin 1xa und 1xb unterscheidet [18][75]. Der Antikörper 1E10 lässt sich somit gut verwenden, um die Verteilung des Dynamin 1 darzustellen.

Anti-Clathrin (Klon 7A9)

Der Antikörper Anti-Clathrin 7A9 ist ein monoklonaler Antikörper, gerichtet gegen die schweren Ketten des Clathrins [76] und entspricht in seinen Signalen denen von anderen, polyklonalen, gegen Clathrin gerichteten Antikörpern [76].

Das Clathrin ist ähnlich wie das Dynamin in der periaktiven Zone von Photorezeptorsynapsen zu finden [76].

3.1.3 Weitere Materialien

Bezeichnung	Inhalt
PBS (Phosphate-Buffer-Saline)	40 g NaCl 1 g KCl 7,2 g Na ₂ HPO ₄ 1,2 g KH ₂ PO ₄ Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter
NPG	1,5% n- Propyl- Gallat 60% Glycerol Rest PBS
Natriummethylat	30% ige-Lösung in Methanol
Xylol/ Methanol	1:1 Lösung
Aceton	
Kühlkammer	Heraeus
Axiovert 200M (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss
Axiocam MRm (Fluoreszenzkamera)	Zeiss
63xImmersion-Öl-Objektiv,Plan Apochromat, numerische Apertur: 1,4	Zeiss
Oligochrome	Till Photomics
Immersionöl	Zeiss
Konfokalmikroskop A1R	Nikon
60x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, Numerische Apertur: 1,4)	Nikon
Deckgläser	Roth
Dosierpipetten	Eppendorf

Tabelle 3 | Auflistung weiterer Materialien

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der Semidünnschnitte (0,5 µm)

Basierend auf der Originalmethode von *Drenckhahn und Franz (1986)* [17] etablierte die Arbeitsgruppe Schmitz [75] eine Abwandlung dieser Technik, nach welcher auch die im Rahmen dieses Experimentes verwendeten Gewebeproben eingebettet und fixiert wurden [17][75]. Die Schnitte wurden vom Labor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde das entnommene Gewebe in mit Flüssigstickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren. Dann wurde es gefriergetrocknet (Lyophilisation) und dabei permanent mit Flüssigstickstoff gekühlt. Die Lyophilisation der Proben erfolgte in einem Vakuum von 10^{-7} mbar (10^{-4} Pa), welches mit Hilfe einer TCP270 Turbomolekular-Pumpe (Arthur-Pfeiffer- Vakuumtechnik) erzeugt und von einem Pirani-Gold-Kathodenmanometer (PKG020) kontrolliert wurde. Das Vorvakuum wurde von einer Öl-Diffusionspumpe (DUO 004B, Arthur-Pfeiffer- Vakuumtechnik) aufgebaut. Die Gewebeproben wurden für 24 Stunden auf diese Weise lyophilisiert und konnten im Anschluss bei Raumtemperatur mit EPON Harz infiltriert werden [75].

Die Infiltration der Proben durch den viskösen Harz wurde erleichtert, indem die Proben bei 28°C für 24 Stunden auf ein Drehrad gegeben wurden, danach erfolgte die Polymerisation des Epons (24 Stunden bei 60°) [15].

Mit einem Reichert Ultramikrotom wurden zuletzt die Semidünnschnitte gemacht.

Epon Harz bestehend aus folgenden Komponenten wurde verwendet:

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

3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

3.2.2.1 Prinzip der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine immunhistochemische Methode, bei welcher Proteine/ Antigene mithilfe von markierten, zumeist fluoreszierenden Antikörpern mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden [28]. In anderen Varianten dieser Methoden werden zur Antigenlokalisierung auch Enzyme, wie zum Beispiel die Peroxidase, als Antikörpermarker eingesetzt [45].

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die sogenannte *indirekte Immunfluoreszenz* verwendet. Indirekt bedeutet hierbei, dass der *Primärantikörper*, welcher direkt an das gesuchte Epitop bindet, selbst nicht mit einem Farbstoff markiert ist [28]. Stattdessen folgt ein an Fluorochrom gekoppelter *Sekundärantikörper*, der wiederum an den Primärantikörper bindet und diesen so sichtbar macht [28]. Mithilfe dieser Methode lassen sich Proteine lokalisieren und damit Rückschlüsse auf ihre Funktion treffen [28].

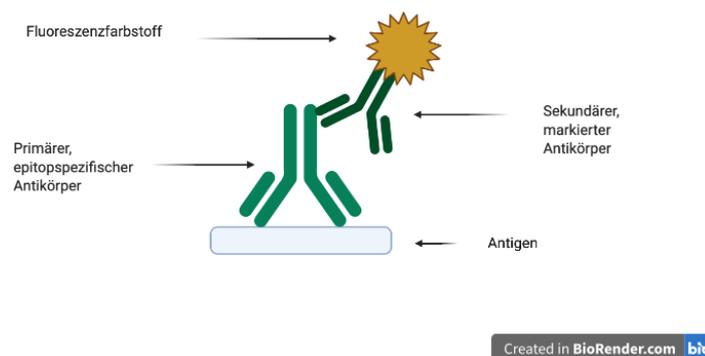


Abbildung 21 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Nach dem Vorbild aus Im K et al (2019) „An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining“ [28]

3.2.2.2 Kontrollinkubationen

Um möglichst gleiche Bedingungen herzustellen, wurden jeweils vier Knockout- und vier Wildtyp-Präparate parallel bearbeitet. Pro Versuch wurden immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle angefertigt. Die Negativkontrolle wurde hierfür nur mit PBS anstelle des Primärantikörpers inkubiert, aber ansonsten gleichbehandelt. Die Negativkontrolle sollte zeigen, ob unabhängig von der Anwesenheit des Primärantikörpers unspezifische Signale vorhanden sind. Damit ließ sich kontrollieren, ob die verwendeten Sekundärantikörper tatsächlich spezifisch die gewünschten Primärantikörper binden und keine weiteren Strukturen irrtümlich markiert werden.

Für die Positivkontrolle wurde der Anti-Ribeye (2D9), der gegen die B-Domäne von Ribeye gerichtet ist, als Primärantikörper eingesetzt [15].

3.2.3 Durchführung der Doppelimmunfluoreszenzuntersuchungen

Die Semidünnschnitte wurden schrittweise nach der Methode von *Mayor, Hampton, Rosario (1961)* aus ihrem Epon gelöst [40]. Zuerst wurden sie für 10 Minuten in Natriummethylat (30% Lösung), in der Folge 10 Minuten in 1:1 Xylol/Methanol und dann für jeweils zweimal 10 Minuten in Aceton inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte 15 Minuten in PBS gewaschen, um sie aus ihrem Epon zu lösen [40].

Währenddessen erfolgte die Herstellung der korrekten Verdünnungen der Primärantikörper, wie oben in den Tabellen aufgeführt (siehe Tabelle 1). Bei der hier angewendeten Doppelimmunfluoreszenzmethode werden immer zwei Primärantikörper, die von zwei verschiedenen Tierspezies stammen, gleichzeitig eingesetzt. Ich setzte bei meinen Untersuchungen ein polyklonales Anti-PSD-95-Kaninchenserum ein. Parallel dazu erfolgte die Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern (Anti-Clathrin, Anti-Dynamin) aus der Maus. Die Bindung der PSD-95-Antikörper aus dem Kaninchenserum wurde mit dem Sekundärantikörper Donkey-Anti-Rabbit A1568 visualisiert. Die Anti-Dynamin- und Anti-Clathrin- Antikörper der Maus wurden mit dem Sekundärantikörper Chicken-Anti-Mouse A1488 visualisiert.

Bei der Verdünnung der Antikörper wurde jeweils PBS vorgelegt und dann der Antikörper zupipettiert. Bis zur Verwendung wurde das Eppendorf-Gefäß in einem mit Eis gefüllten Behälter aufbewahrt. Die in PBS gespülten Präparate wurden vorsichtig von Hand um den Gewebeschnitt herum getrocknet und in eine feuchte Kammer gelegt. Auf die Präparate wurden nun jeweils 35µl des verdünnten Primärantikörpers aufpipettiert. Die feuchte Kammer diente dazu, das Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Feucht gehalten wurde diese Kammer, indem sie mit PBS gefüllt wurde. Die Inkubation der Präparate in den jeweiligen Antikörperlösungen erfolgte über Nacht in einem auf 4° C temperierten Kühlraum.

Am folgenden Tag wurden die Präparate fünfmal jeweils 5 Minuten mit PBS gespült, um nicht gebundene Antikörper zu beseitigen. Dann wurden die Schnitte mit den entsprechenden Zweitantikörpern in den angegebenen Verdünnungen inkubiert (1 Stunde, Raumtemperatur). Danach wurden die ungebundenen Sekundärantikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBS (fünfmal für jeweils 5 Minuten) entfernt.

Zuletzt wurden die Schnitte in NPG (N- Propyl-Gallat in 60% Glycerol in PBS) eingedeckelt. Das NPG soll ein Ausbleichen der Schnitte verhindern. Hierfür wurde ein Tropfen NPG-Lösung auf die immunmarkierte Schnitte gegeben, diese vorsichtig mit einem Deckglas abgedeckt und das Deckglas mit Nagellack fixiert.

3.3 Mikroskopische Analyse

Epifluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Analyse erfolgte zunächst am inversen Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Firma ZEISS. Aufnahmen waren hier ermöglicht durch die Ausstattung mit einem Oligochrom der Firma Till Photonics als Lichtquelle. Zur Dokumentation wurde die Software AxioVision (Release 4.8) von Zeiss eingesetzt. Die Immunfluoreszenzfärbungen der Knockoutversuche und die Kontrollexperimente wurden hier unter denselben Bedingungen (Exposition, Vergrößerung und Belichtungszeit) aufgenommen.

Die Schnitte wurden in den Vergrößerungen 40x und 63x mikroskopisch analysiert. Um die Einordnung der untersuchten Proteine in ihre Schichten innerhalb der Retina zu ermöglichen, wurde zunächst ein 40 x Immersions-Öl-Objektiv (Zeiss Plan Neofluar, numerische Apertur: 1,3) genutzt. In höherer Vergrößerung (63 x Immersions-Öl -Objektiv, Plan Apochromat, numerische Apertur: 1,4) konnte auf die Veränderungen innerhalb der äußeren plexiformen Schicht eingegangen werden.

Es erfolgte immer einmal die Durchleuchtung im grünen Kanal (Alexa 488) mit der Wellenlänge 450nm – 490nm (Anregungsfilter) und einmal im roten Kanal (Alexa 568) mit der Wellenlänge 540-552nm (Anregungsfilter). Wahrgenommen werden so eine Emission des grünen Kanals im Bereich von 515-565nm in Alexa 488 und von 590nm in Alexa 568, dem roten Kanal (Emissionsfilter).

Konfokalmikroskopie

Ergänzend wurden mit dem Konfokalmikroskop A1R der Firma Nikon besonders hochauflösende Aufnahmen gemacht. Zur Orientierung ist es hier notwendig, das Präparat zunächst mit einem 10x Objektiv unter Durchlicht aufzusuchen und zentral im Sichtfeld zu platzieren. Daraufhin wurde das 60x-Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, numerische Apertur: 1,4) eingesetzt. Ein blauer Festkörperlaser regt hier die Immunfluoreszenzsignale mit einer Wellenlänge von 488nm an, sodass ein grünes Signal erkennbar wird. Für den roten Kanal betrug die Wellenlänge zur Anregung durch einen grünen Festkörperlaser 568nm.

Mithilfe der NIS-Elements-Software konnten für Knockouttyp und Wildtyp die identischen Bedingungen hergestellt werden, sodass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben war.

Diese Software wurde ebenfalls zu Dokumentationszwecken eingesetzt.

4. Ergebnisse

Die fortschreitende Degeneration der Photorezeptorsynapsen in CSP α -Knockout-Mäusen kann durch Doppelimmunfluoreszenzen gut untersucht werden [59]. In früheren Untersuchungen wurden insbesondere Veränderungen von Proteinen untersucht, die für die Exozytose relevant sind (siehe Abschnitt 2.7.1 dieser Dissertation) [62][63]. In meinen Analysen habe ich mich im Speziellen auf Proteine konzentriert, die für die Endozytose relevant sind, nämlich Clathrin und Dynamin.

Zu diesem Zweck wurden Semidünnschnitte von Mäuseretinas von CSP α -Knockouttieren und Wildtyp-Kontrolltieren mit den monoklonalen Primärantikörpern Anti-Clathrin 7A9 und Anti-Dynamin 1E10 inkubiert und über die Immunfluoreszenzmikroskopie aufgearbeitet. Als Referenzantikörper habe ich in meiner Arbeit Antikörper gegen Ribeye (2D9), sowie Antikörper gegen PSD-95 verwendet. Veränderungen der Ribbons in CSP α -Knockouttieren wurden bereits in früheren Untersuchungen charakterisiert [59]. Der Antikörper gegen Ribeye ermöglichte somit, Veränderungen der Ribbons mit denen der endozytotischen Proteine zu vergleichen. Durch die Untersuchung verschiedener postnataler Tage sollte das zeitliche Muster der Veränderungen charakterisiert werden. Negativkontrollen, bei denen kein Primärantikörper eingesetzt wurde, dienten zur Erkennung von unspezifischen Signalen. Außer dem Einsatz von PBS anstelle eines Primärantikörpers wurden alle weiteren Inkubationsschritte unverändert beibehalten.

Die Auswertung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 2000M der Firma Zeiss) unter Verwendung der 40x und 63x Objektive. Das 40x Objektiv diente zur Anfertigung der Übersichten, das 63x Objektiv zur Herstellung der Detailaufnahmen. Um besonders auflösende Aufnahmen zu machen, wurde ergänzend das Konfokalmikroskop mit einem 60x-Öl-Immersionsobjektiv eingesetzt.

In den Abbildungen wurden jeweils die Ergebnisse des Wildtyps denen des Knockouttyps gegenübergestellt, um einen direkten Vergleich in der Verteilung, der Dichte und der Lokalisation der entsprechenden Proteine zu ermöglichen. Die Resultate wurden vom postnatalen Tag 14 bis 16 chronologisch geordnet, um die zeitliche Entwicklung darzustellen.

In meinen Untersuchungen stehen die Photorezeptorsynapsen der äußeren plexiformen Schicht im Fokus, da diese tonisch aktiven Synapsen besonders stark von den neurodegenerativen Veränderungen betroffen sind [59].

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden zu jedem untersuchten postnatalen Tag jeweils zwei zusätzliche, also insgesamt 3 verschiedene Einbettungen betrachtet. Um die Übersichtlichkeit zu erhalten, werden im Folgenden jeweils die Abbildungen der repräsentativen Ergebnisse der einzelnen Versuche jedes postnatalen Tages aus derselben Einbettung in der 63x-Vergrößerung aufgeführt. Zunächst finden sich die Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop, im Anschluss daran die Aufnahmen im Konfokalmikroskop.

4.1 Postnataltag 14

4.1.1 Postnataltag 14, Referenzinkubation

A1-A3: CSP α -Knockout
B1-B3: Kontrolle

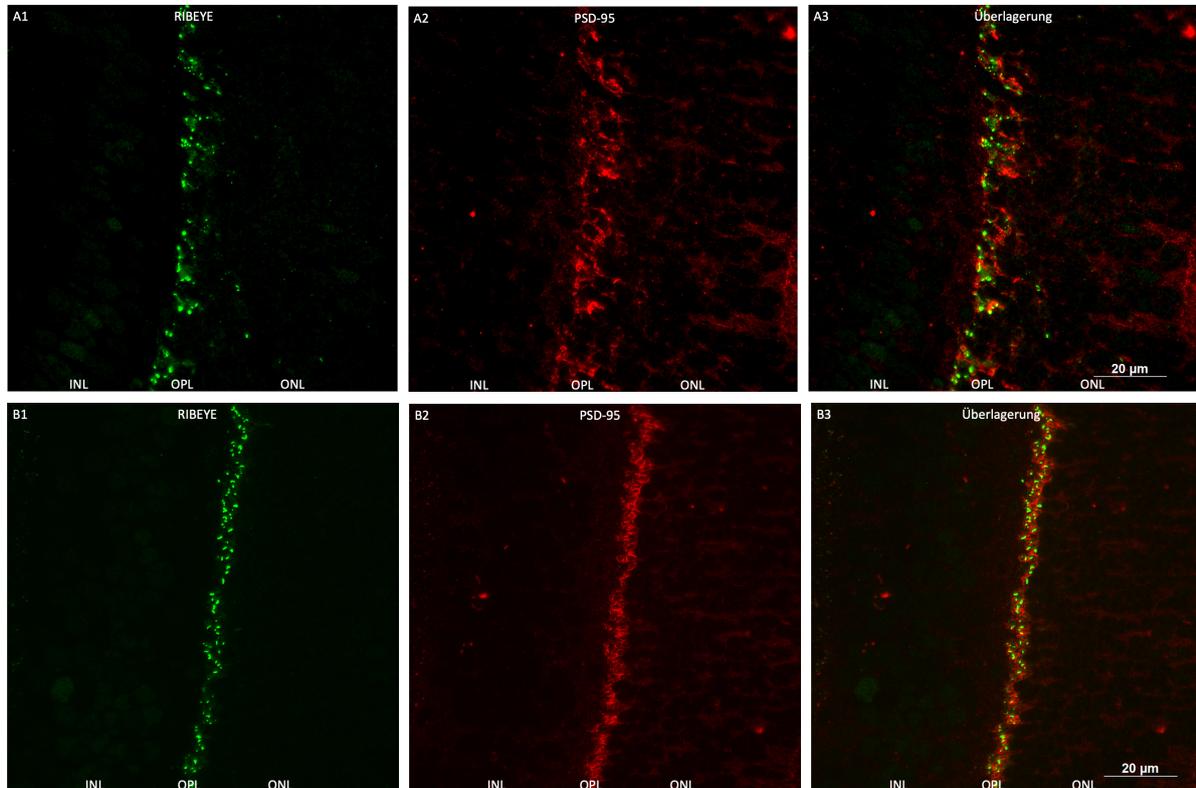


Abbildung 22 Referenzinkubation , postnataler Tag 14 (P14)

A1/B1: Anti-Ribeye 2D9 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD-95 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Ribeye 2D9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 88/17.

Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht

Im Wildtyp lag das Ribeye als Bestandteil der Synaptic Ribbons der Ribbonsynapse [58] punktförmig, dicht in der OPL zusammen (Abb. 22; A1, A3). Im Vergleich dazu zeigten sich die Signale im Knockout etwas rarefizierter (Abb. 22; B1, B3). Ebenso zeigten sich die Signale des PSD-95 in der äußeren plexiformen Schicht der Retina im Knockout aufgelockert (Abb. 22; A2). Es ließen sich also bereits am 14. postnatalen Tag Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockouttyp bei der Verteilung von PSD-95 und Ribeye in der OPL erkennen.

Negativkontrolle

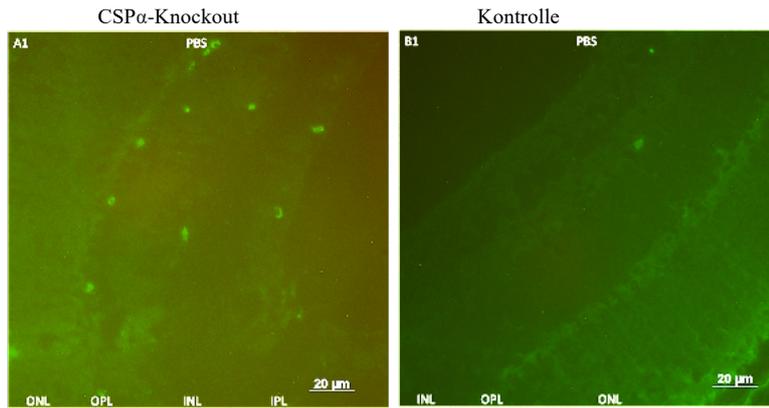


Abbildung 23 Negativkontrollen mit PBS, postnataler Tag 14 (P14)

A1/B1: Negativkontrolle mit PBS

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 88/17.

Die Negativkontrolle (Abwesenheit von Primärantikörpern) zeigte keine Signale (Abb. 23; A1, B1). Somit war davon auszugehen, dass die in den obigen Abbildungen beobachteten Signale spezifisch auf den Primärantikörper zurückzuführen waren und keine Antikörper-unabhängige Autofluoreszenz darstellten.

Die Negativkontrollen wurden in der 40x-Vergrößerung als Übersichtsaufnahmen aufgeführt.

4.1.2 Postnataltag 14, Dynamin

A1-A3: CSP α -Knockout
 B1-B3: Kontrolle

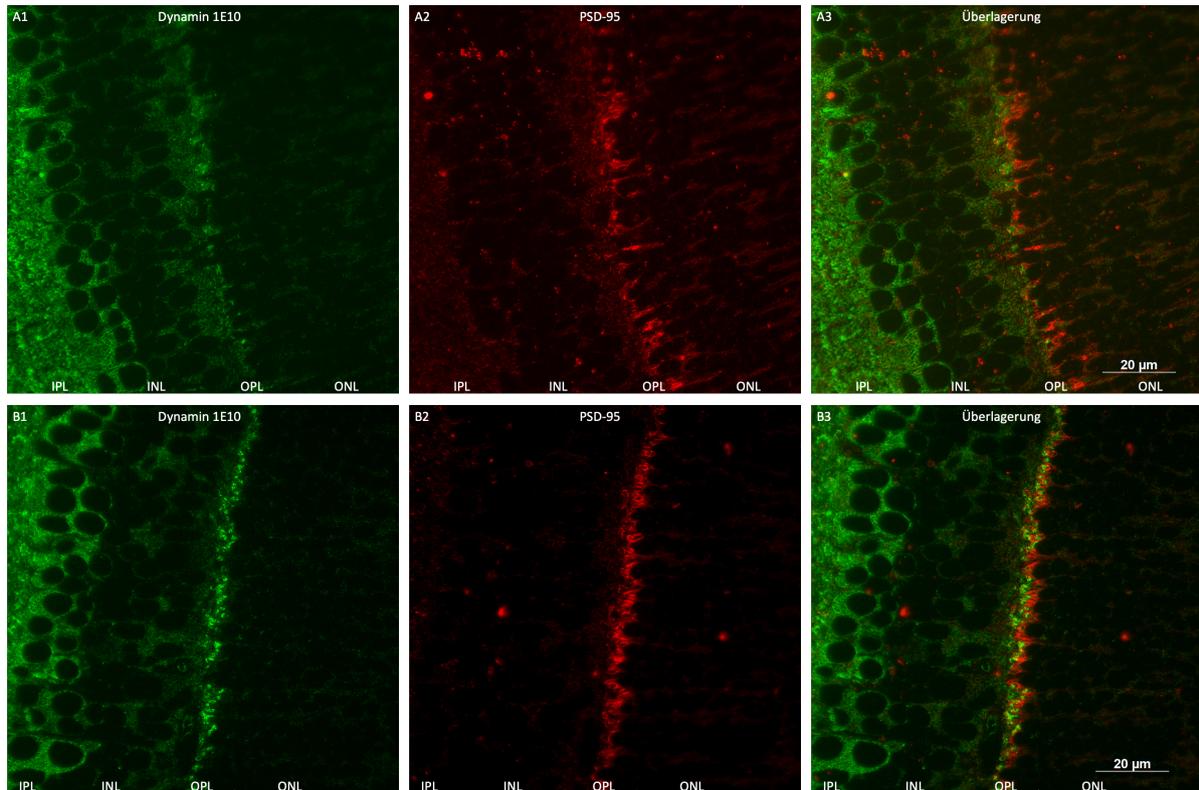


Abbildung 24 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 14 (P14)

A1/B1: Anti-Dynamin 1E10 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Dynamin 1E10 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 88/17. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

C1-C3: CSP α -Knockout
 D1-D3: Kontrolle

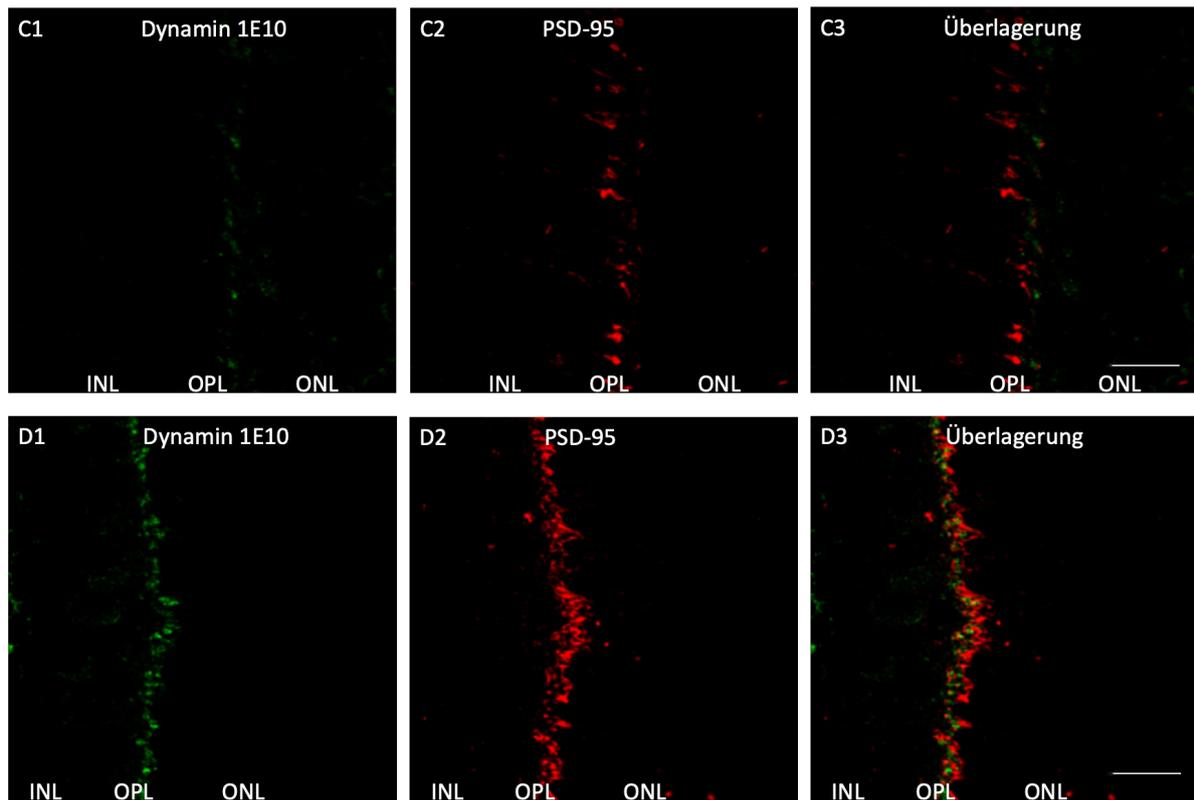


Abbildung 25 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 14 (P14)

C1/D1: Anti-Dynamin 1E10 im grünen Emissionskanal

C2/D2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

C3/D3: Überlagerung von Anti-Dynamin 1E10 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Konfokalmikroskop. Maßstab entspricht 10 μ m.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 88/17. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

Sehr deutlich war das Dynamin 1 in der äußeren plexiformen Schicht sowie der inneren plexiformen Schicht zu erkennen, wobei eine hohe Dichte in der Umgebung der Ribbonsynapsen der Photorezeptoren typisch ist [18][75]. Durch das PSD-95 konnte man hier die Synapsen der Photorezeptoren gut lokalisieren und damit erkennen, dass die Signale des Anti-Dynamin 1E10 im Wildtyp -Versuch wie zu erwarten in der OPL in direkter Nähe dazu lagen.

Im Versuch mit dem CSP α -Knockouttier waren bereits in dieser frühen Phase deutliche Abweichungen dieses Normalfalls erkennbar. Die Signalstärke im CSP α -Knockout-Versuch war im Vergleich zum Wildtyp-Versuch vermindert, sodass auf eine geringere Dichte des Dynamin 1 geschlossen werden konnte (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 24; A1, A3 und konfokalmikroskopisch: Abb. 25; C1, C3). Dies war vor allem in der OPL der Fall, in der sich die tonisch aktiven Photorezeptorsynapsen befinden, die besonders stark von den neurodegenerativen Veränderungen betroffen sind [59]. Außerdem waren in der OPL der CSP α -Knockout-Maus die Dynamin-Signale nicht mehr so stark konzentriert wie bei der Kontroll-Maus.

4.1.3 Postnataltag 14, Clathrin

A1-A3: CSP α -Knockout
 B1-B3: Kontrolle

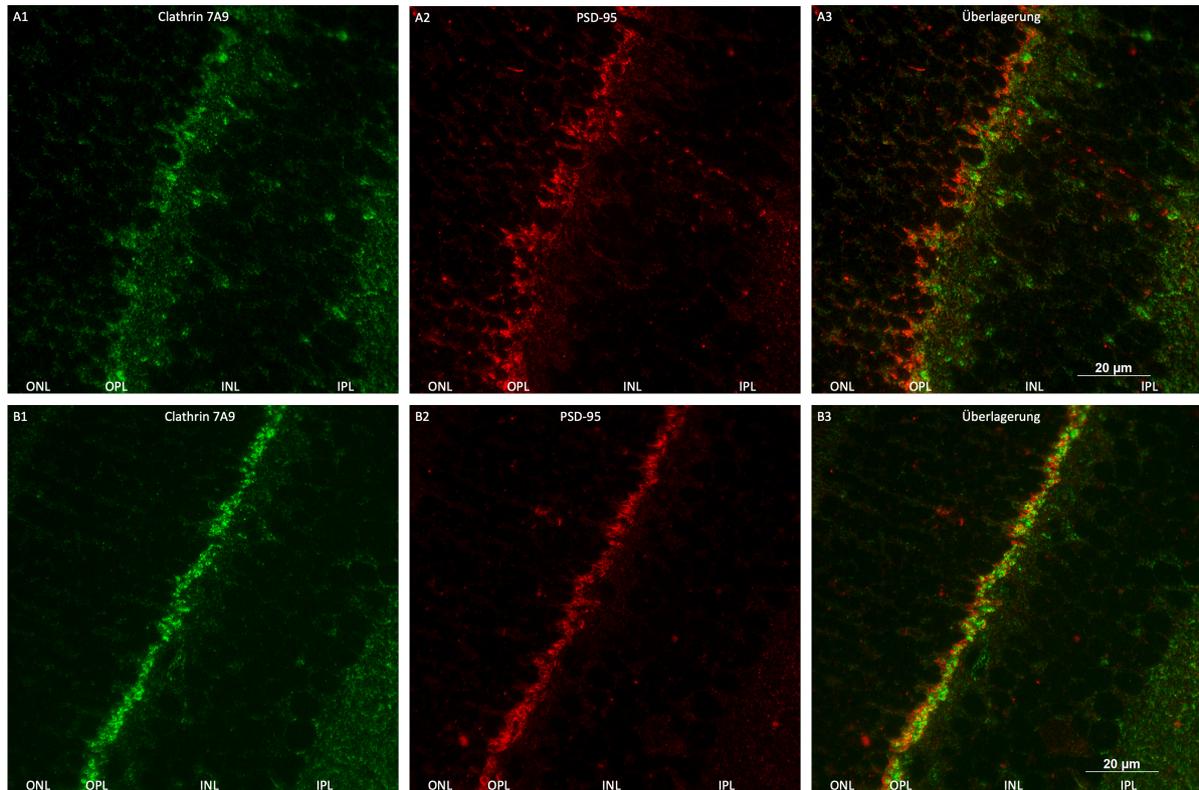


Abbildung 26 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 14 (P14)

A1/B1: Anti-Clathrin 7A9 im grünen Emmissionskanal

A2/B2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Clathrin 7A9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 88/17. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

C1-C3: CSP α - Knockout
 D1-D3: Kontrolle

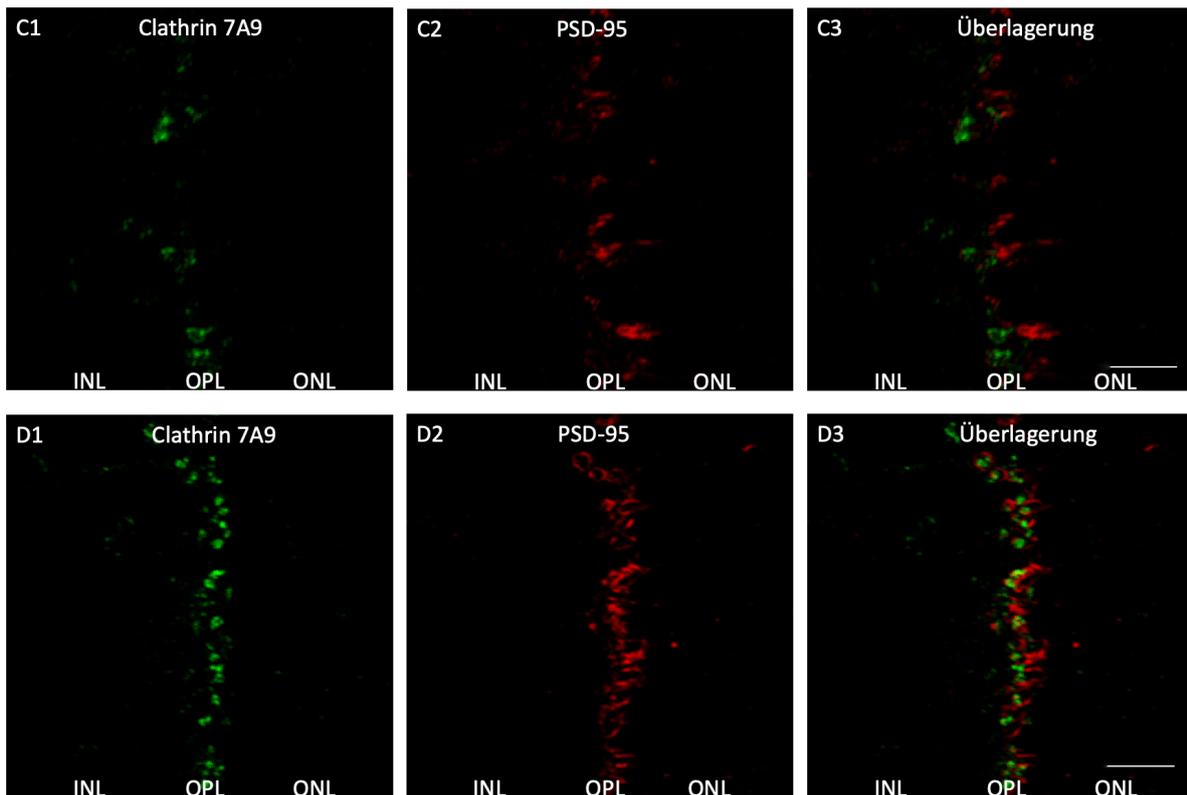


Abbildung 27 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 14 (P14)

C1/D1: Anti-Clathrin 7A9 im grünen Emissionskanal

C2/D2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

C3/D3: Überlagerung von Anti-Clathrin 7A9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Konfokalmikroskop. Maßstab entspricht 10 μ m.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 88/17. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

Clathrin ist typischerweise ähnlich wie Dynamin in der äußeren und inneren plexiformen Schicht und um das Ribeye der Ribbonsynapse herum besonders stark vertreten [75][76]. Diese klassische Verteilung der Clathrinsignale war besonders gut im Wildtyp-Versuch zu erkennen (Kontrollinkubation) (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 26; B1, B3 und konfokalmikroskopisch Abb. 27; D1, D3). Das Clathrin war am postnatalen Tag P14 stark in der OPL angereichert.

Im Vergleich dazu war in der Inkubation des CSP α -Knockouttyps mit dem Clathrin-Antikörper die Intensität der Signale in der OPL deutlich reduziert (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 26; A1, A3 und konfokalmikroskopisch: Abb. 27; C1, C3). Während im Wildtyp-Versuch die Signale dicht bei den PSD-95 Signalen innerhalb der OPL waren, war ihr Bereich im Knockout verbreitert und die Intensität der Clathrin-Signale stark verringert.

4.2 Postnataltag 15

4.2.1 Postnataltag 15: Referenzinkubation

A1-A3: CSP α -Knockout
B1-B3: Kontrolle

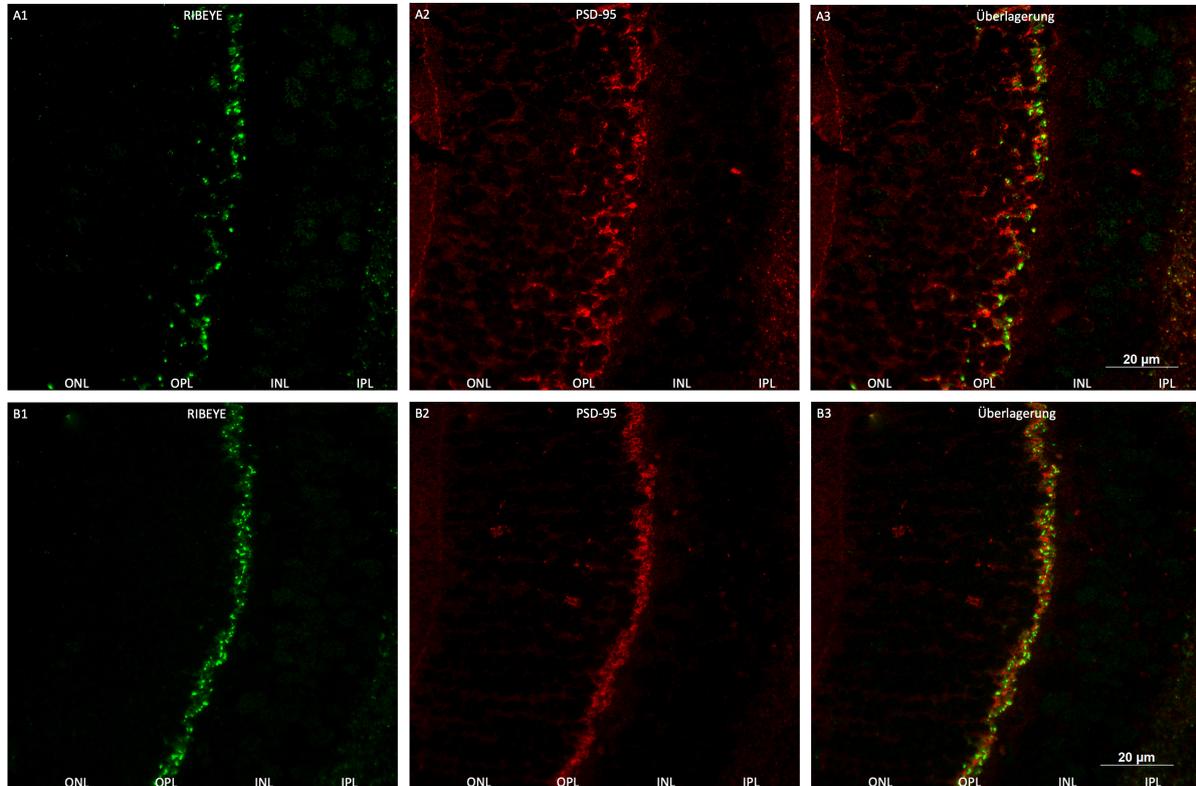


Abbildung 28 Referenzinkubation, postnataler Tag 15 (P15)

A1/B1: Anti-Ribeye 2D9 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD9 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Ribeye 2D9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 34/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

Am postnatalen Tag 15, also kurz nachdem die Augenöffnung (in der Regel um den 12. postnatalen Tag) erfolgte [31][51], schritten die an Tag 14 erkannten Veränderungen weiter fort. In der Positivkontrolle waren diese zunehmenden Abwandlungen anhand der Markierungen mit Anti-RIBEYE und Anti-PSD95 angedeutet (Abb. 28; A1-A3, B1-B3). Die Dichte der Ribeye-Signale stellte sich im Knockout verringert dar und einige tauchten abweichend von der OPL auf (Abb. 28; A1,A3). Das PSD-95 Signal war in der OPL des Knockouttyps (Abb. 28; A2) deutlich breiter als in der Wildtypkontrolle (Abb. 28; B2).

Negativkontrolle

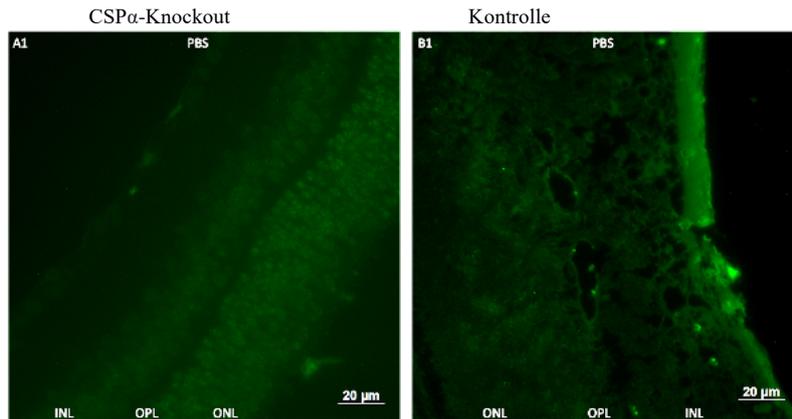


Abbildung 29 Negativkontrollen mit PBS, postnataler Tag 15 (15)

A1/B1: Negativkontrolle mit PBS

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 34/16.

Wie auch am postnatalen Tag 14 zeigte die Negativkontrolle lediglich ein schwaches, diffuses Hintergrundsignal. Somit ließen sich die oben dargestellten Antikörpersignale spezifisch auf den Primärantikörper zurückführen.

4.2.2 Postnataltag 15, Dynamin

A1-A3: CSP α -Knockout
 B1-B3: Kontrolle

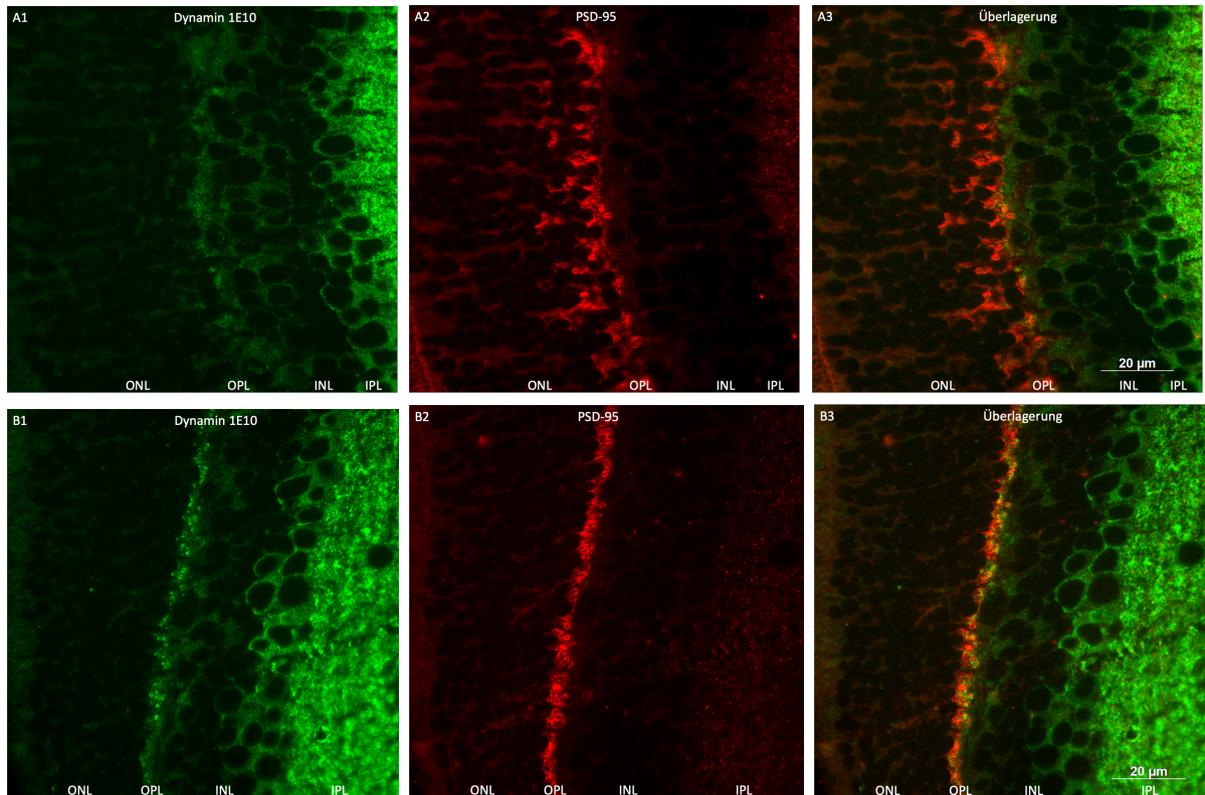


Abbildung 30 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 15 (P15)

A1/B1: Anti-Dynamin 1E10 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Dynamin 1E10 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 34/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

C1-C3: CSP α -Knockout
 D1-D3: Kontrolle

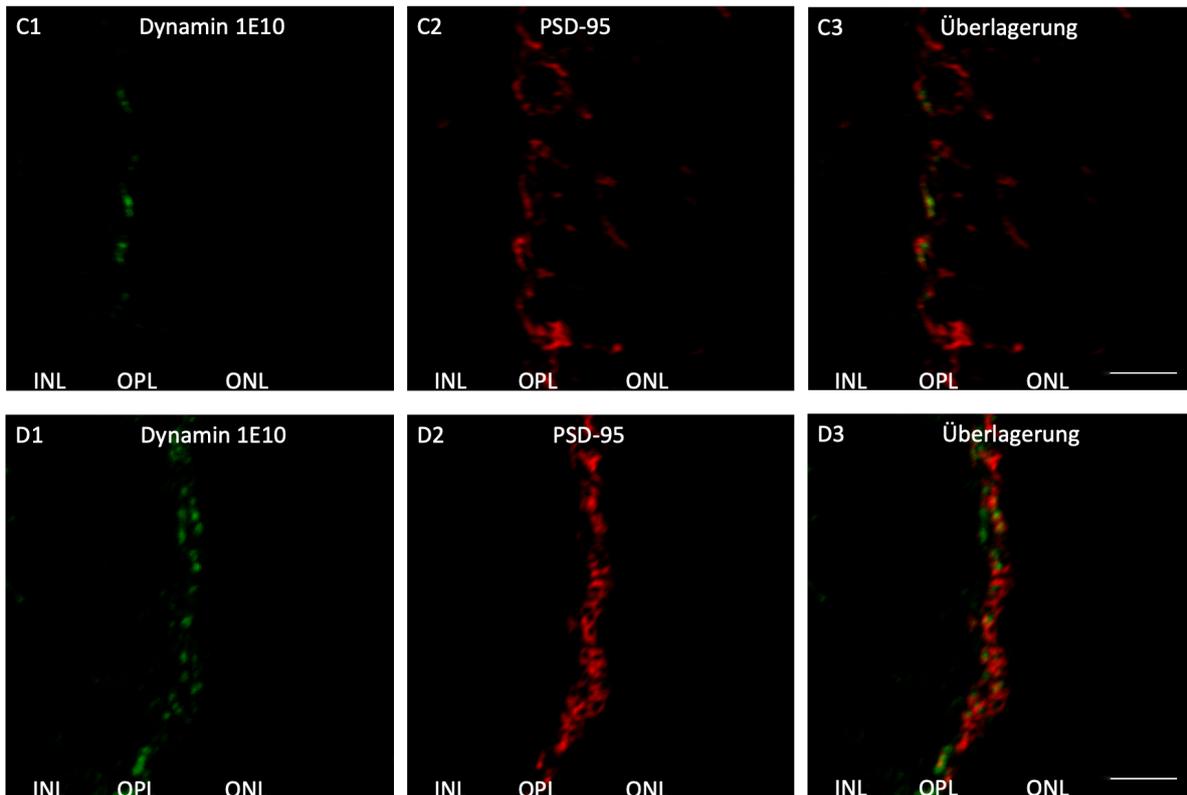


Abbildung 31 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 15 (P15)

C1/D1: Anti-Dynamin 1E10 im grünen Emissionskanal

C2/D2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

C3/D3: Überlagerung von Anti-Dynamin 1E10 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Konfokalmikroskop. Maßstab entspricht 10 µm.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 34/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

Am postnatalen Tag 15 nahmen Dichte und Intensität der Dynamin-Signale in der OPL im Vergleich zum 14. postnatalen Tag weiter ab. Es zeigte sich eine verringerte Expression von Dynamin 1 in der Photorezeptorsynapse in der OPL (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 30; A1, A3 und konfokalmikroskopisch: Abb. 31; C1, C3). In den entsprechenden Wildtyp-Versuchen waren weiterhin starke Signale zu beobachten (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 30; B1, B3 und konfokalmikroskopisch Abb. 31; D1, D3).

4.2.3 Postnataltag 15, Clathrin

A1-A3: CSP α -Knockout
 B1-B3: Kontrolle

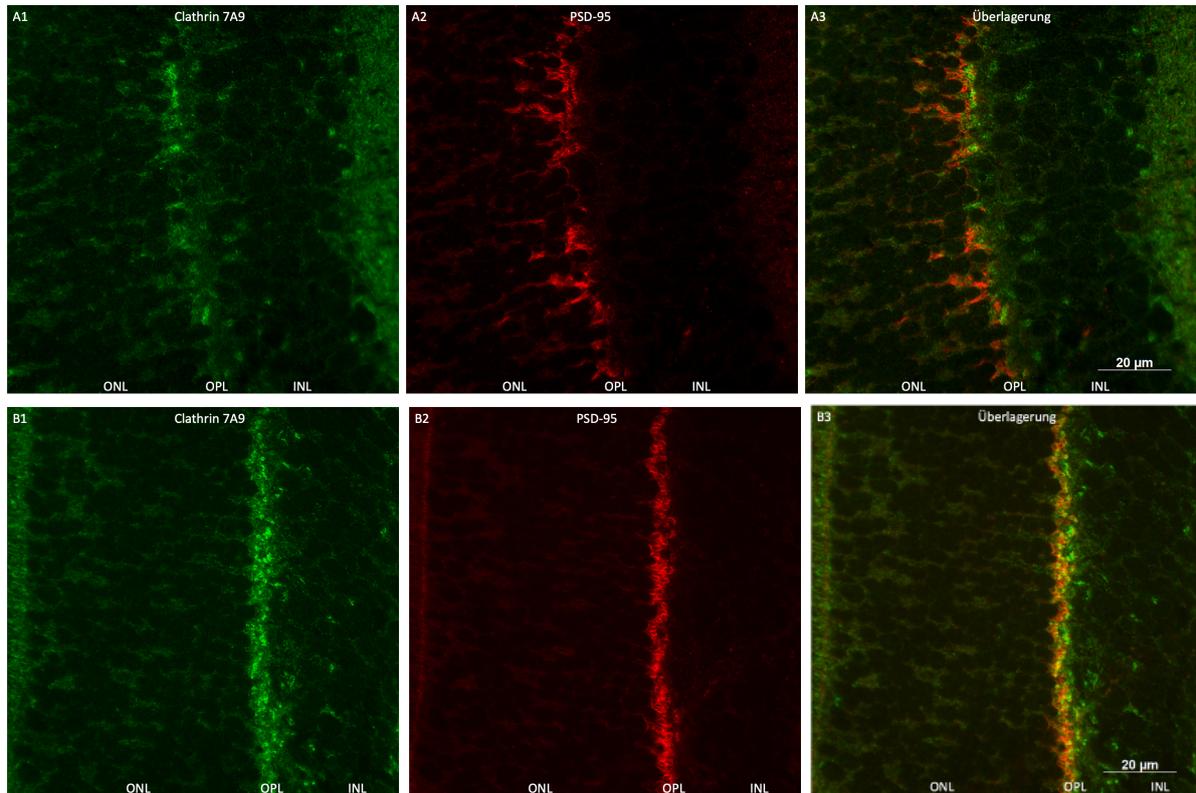


Abbildung 32 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 15 (P15)

A1/B1: Anti-Clathrin 7A9 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD5 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Clathrin 7A9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 34/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht

C1-C3: CSP α -Knockout
 D1-D3: Kontrolle

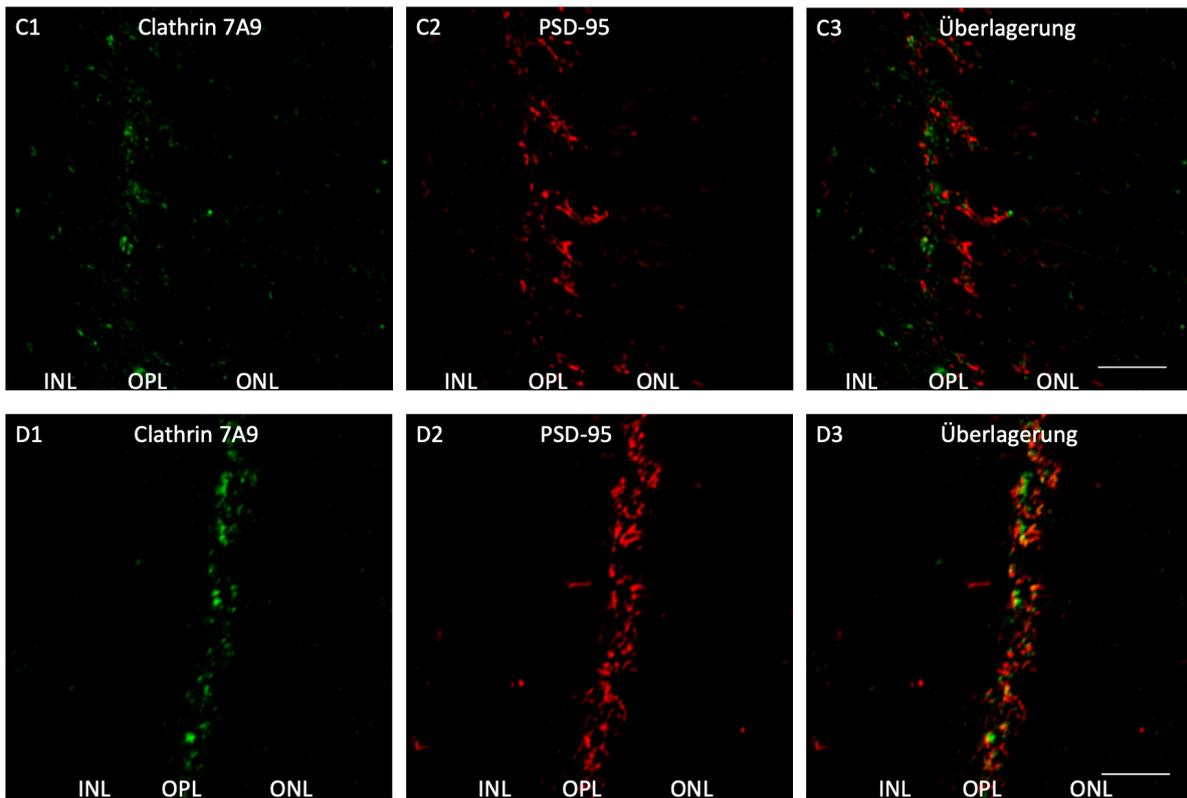


Abbildung 33 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 15 (P15)

A1/B1: Anti-Clathrin 7A9 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD5 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Clathrin 7A9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Konfokalmikroskop. Maßstab entspricht 10 μ m.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 34/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht

Am postnatalen Tag 15 war eine Ausdünnung der Anti-Clathrin-Signale im Knockouttyp (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 32; A1, A3 und konfokalmikroskopisch: Abb. 33; C1, C3) im Vergleich zum Wildtyp-Versuch (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 32 B1, B3 und konfokalmikroskopisch: Abb, 33 D1, D3) deutlich. Es zeigte sich eine starke Abnahme der Signalstärke und der Dichte in der OPL im Vergleich zum 14. postnatalen Tag.

4.3 Postnataltag 16

4.3.1 Postnataltag 16, Referenzinkubation

A1-A3: CSP α -Knockout
B1-B3: Kontrolle

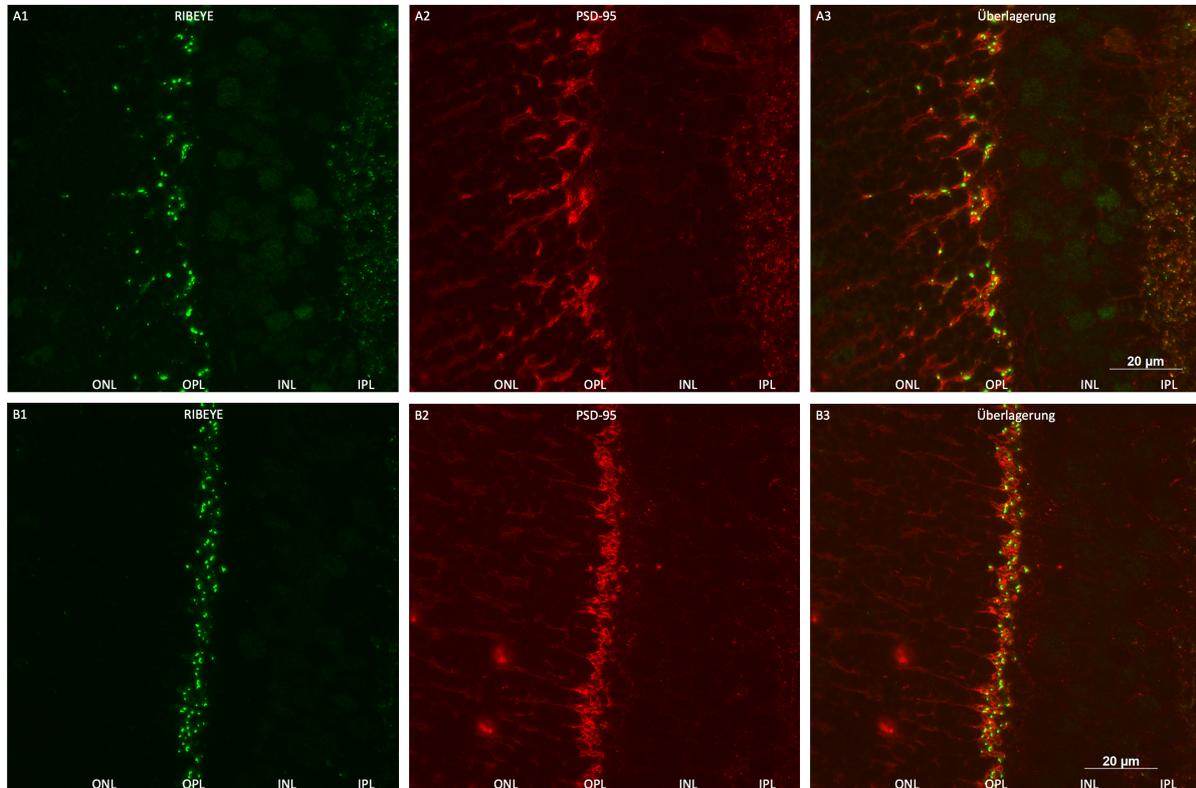


Abbildung 34 Referenzinkubation, postnataler Tag 16 (P16)

A1/B1: Anti-Ribeye 2D9 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Ribeye 2D9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 16/16. Abkürzung: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

Es zeigte sich bei der Betrachtung des Verlaufs bis zum 16. postnatalen Tag eine vermehrte Delokalisierung der synaptischen Signale in den vorgelegten Abbildungen. Die Fluoreszenzsignale des Anti-Ribeye-Antikörpers waren ektop und außerhalb der OPL zu finden, sodass eine feste Anordnung der Synapsen kaum noch erkennbar war (Abb. 34; A1, A3).

Die Immunmarkierung mit Anti-PSD95 zeigte eine Verbreiterung der OPL (Abb. 34; A2, A3).

Die hochkonzentrierte Anordnung der Synapsen in einer schmalen Schicht ist verloren gegangen (Abb. 34; A2, A3). Die durch die Anti-Ribeye- und Anti-PSD-95-Markierungen dargestellten Signale veranschaulichten bereits früh eine fortgeschrittene Degeneration der Photorezeptorsynapsen.

Negativkontrolle

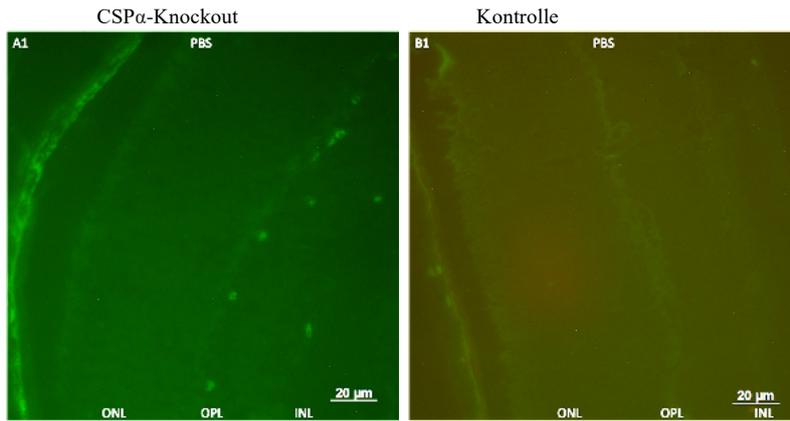


Abbildung 35 Negativkontrolle mit PBS, postnataler Tag 16 (P16)

A1/B1: Negativkontrolle mit PBS Einbettung 16/16,

Aufnahme im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 16/16.

Die Negativkontrolle zeigte auch hier keine Signale, sodass die oben gezeigten Immunsignal auf die entsprechenden Primärantikörper zurückzuführen waren.

4.3.2 Postnataltag 16, Dynamin

A1-A3: CSP α -Knockout

B1-B3: Kontrolle

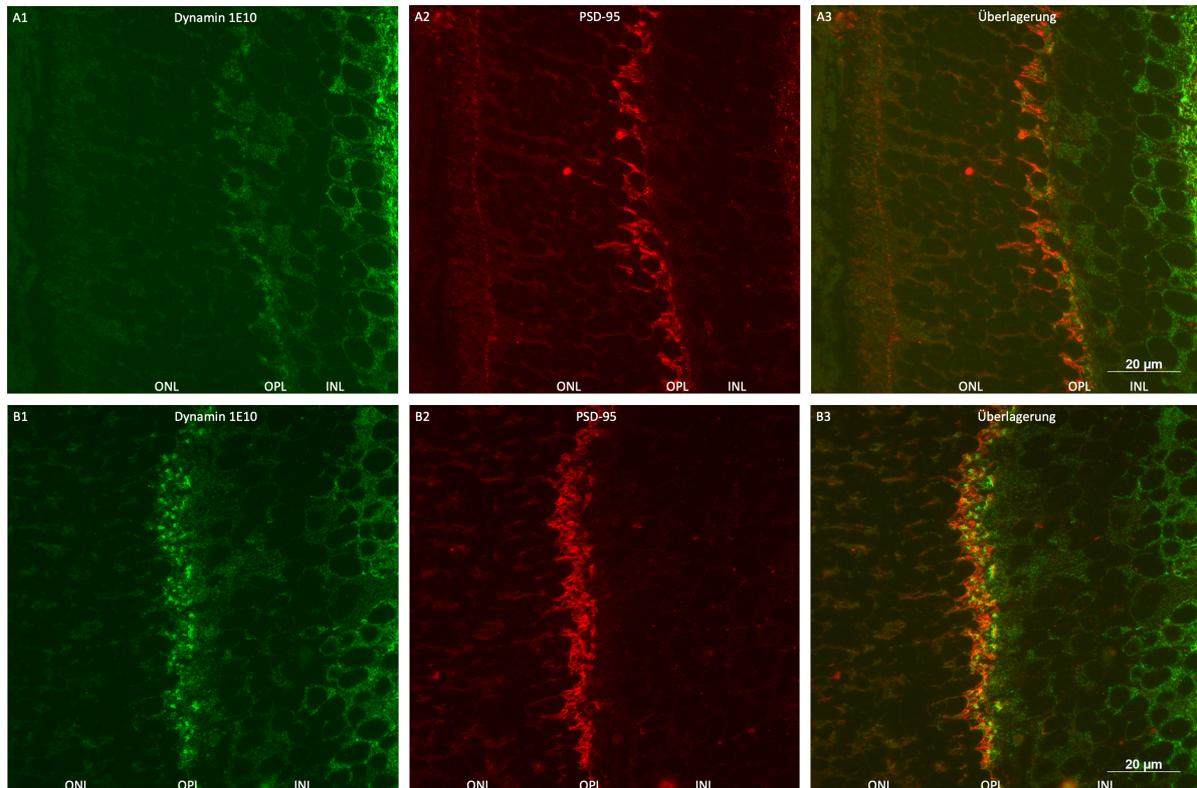


Abbildung 36 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 16 (P16)

A1/B1: Anti-Dynamin 1E10 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Dynamin 1E10 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 16/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

C1-C3: CSP α - Knockout
 D1-D3: Kontrolle

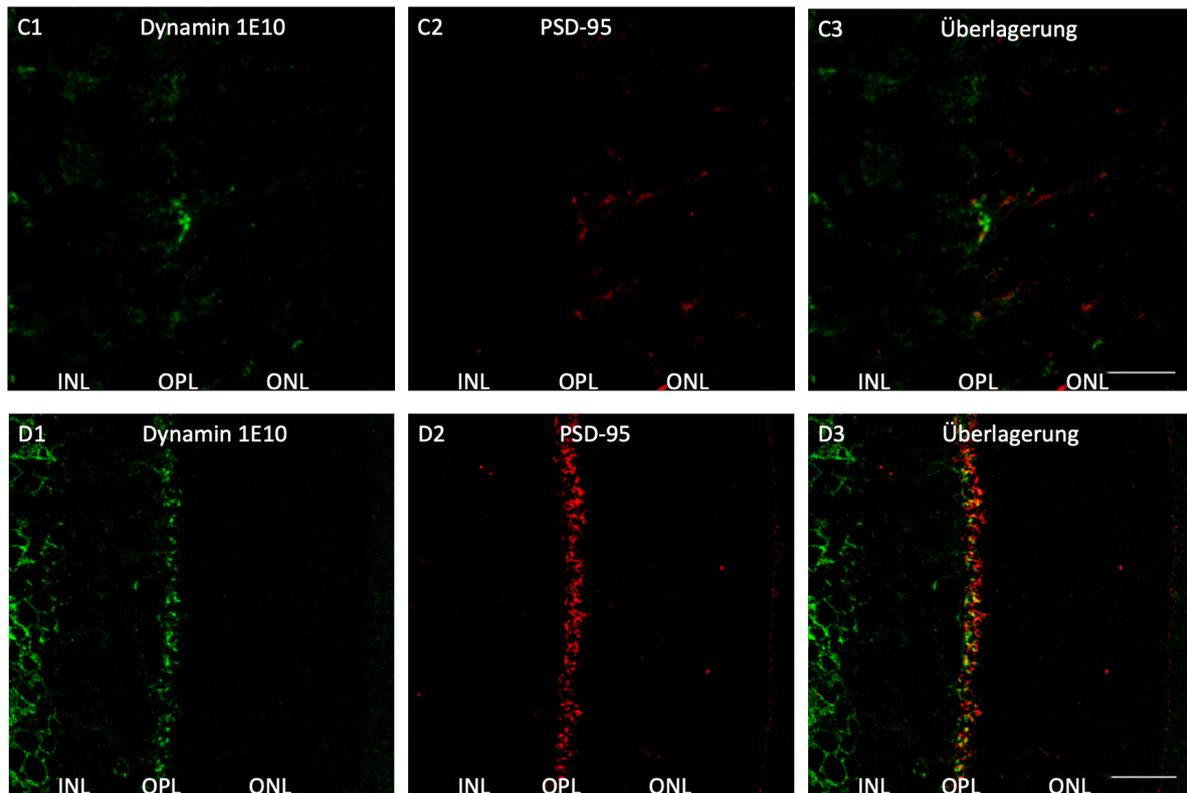


Abbildung 37 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 16 (P16)

C1/D1: Anti-Dynamin 1E10 im grünen Emissionskanal

C2/D2: Anti-PSD95 im roten Emissionskanal

C3/D3: Überlagerung von Anti-Dynamin 1E10 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Konfokalmikroskop. Maßstab entspricht 10 μ m.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 16/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

Die Veränderungen der endozytotischen Proteine waren am postnatalen Tag 16 besonders stark ausgeprägt. In der OPL des Knockoutversuchs waren die Signale der Immunmarkierung mit dem Anti-Dynamin Antikörper 1E10 nahezu vollständig verschwunden (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 36; A1, A3 und konfokalmikroskopisch: Abb. 37; C1, C3). Eine deutliche Beeinträchtigung des endozytotischen Proteins Dynamin ließ sich hier beobachten, sodass die retinale Schichtung nur noch schwer erkennbar ist.

4.3.3 Postnataltag 16, Clathrin

A1-A3: CSP α - Knockout
 B1-B3: Kontrolle

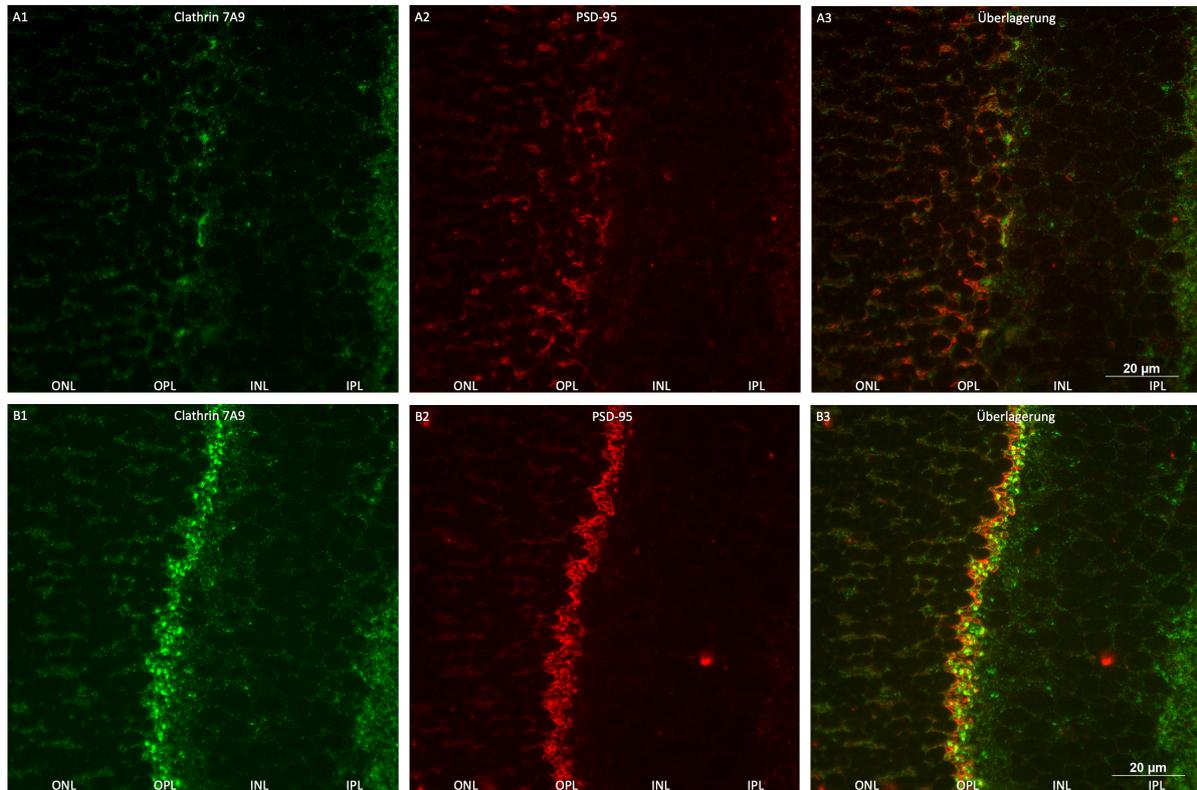


Abbildung 38 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 16 (P16)

A1/B1: Anti-Clathrin 7A9 im grünen Emissionskanal

A2/B2: Anti-PSD95 im grünen Emissionskanal

A3/B3: Überlagerung von Anti-Clathrin 7A9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Epifluoreszenzmikroskop.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 16/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

C1-C3: CSP α - Knockout
 D1-D3: Kontrolle

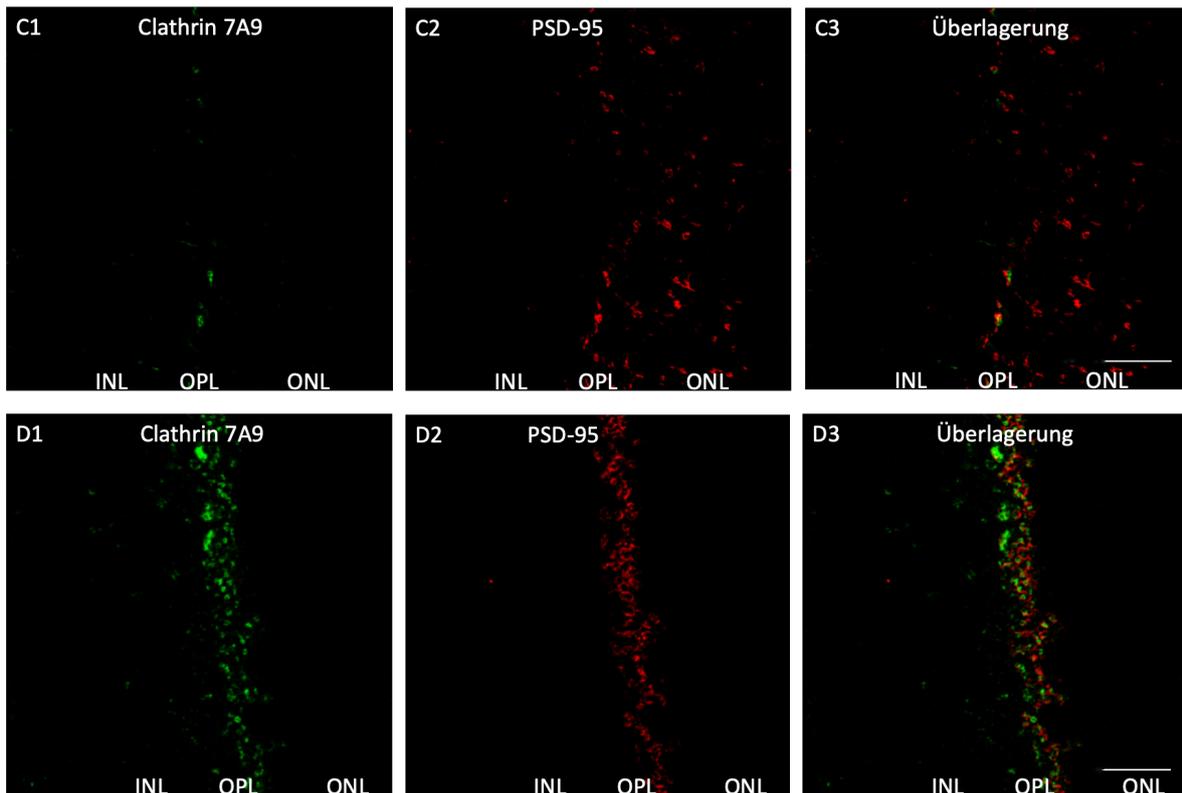


Abbildung 39 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 16 (P16)

C1/D1: Anti-Clathrin 7A9 im grünen Emissionskanal

C2/D2: Anti-PSD95 im grünen Emissionskanal

C3/D3: Überlagerung von Anti-Clathrin 7A9 und Anti-PSD95

Aufnahmen im Konfokalmikroskop. Maßstab entspricht 10 μ m.

Inkubation mit Semidünnschnitten aus der Einbettung 16/16. Abkürzungen: OPL= Äußere Plexiforme Schicht, INL=Innere Körnerschicht, ONL=Äußere Körnerschicht, IPL= Innere Plexiforme Schicht

Wie bei Dynamin zeigte sich auch in der Expression von Clathrin eine starke Abnahme der Signalstärke, sodass am postnatalen Tag 16 nur noch einzelne Signale vorhanden waren (epifluoreszenzmikroskopisch: Abb. 38; A1, A3 und konfokalmikroskopisch: Abb. 39, C1, C3). Auch hier ist die retinale Schichtung im Knockouttyp nur noch schwer abgrenzbar.

5. Diskussion

Durch frühere Untersuchungen war bereits bekannt, dass CSP α von großer Bedeutung für die Proteine der Exozytose ist [62][63][80]. Anhand der durchgeführten Experimente wurde in dieser Arbeit die Bedeutung des CSP α für endozytotische Schlüsselproteine untersucht. Die Resultate zeigen eine erhebliche Beeinträchtigung der Proteine Clathrin und Dynamin in den Photorezeptorsynapsen bei CSP α -Knockout-Mäusen. Dies geht über die vorhandenen Ergebnisse über die Rolle des CSP α bei der Exozytose hinaus [62][63][80].

In “*CSP α -deficiency causes massive and rapid photoreceptor degeneration*” von Schmitz F et al (2006) [59] wurden drastische neurodegenerative Veränderungen der Ribbonsynapsen von Photorezeptorsynapsen in CSP α -Knockout-Mäusen beschrieben, welche ab dem Moment der Augenöffnung fulminant fortschritten. In den frühen postnatalen Tagen vor der Augenöffnung bestanden jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen CSP α -Knockout- und Wildtyp [59]. Es ist also davon auszugehen, dass dieser Prozess kurz nach dem Öffnen der Augen beginnt [59]. Bei einer zunächst normalen Entwicklung der Photorezeptorsynapsen kam es im Verlauf zu einer völligen Degeneration an P28 und Erblindung [59].

Sobald die Photorezeptorsynapsen nach Augenöffnung vollständig in Funktion treten und die korrekte Konformation der beteiligten Proteine essentiell ist, um die Kontinuität der synaptischen Informationübertragung bei hoher Geschwindigkeit zu erhalten [80][62], wird die Faltungshelferfunktion des CSP α erforderlich [59]. Diese gewährleistet die Funktionserhaltung der entsprechenden Proteine und verlängert damit die Überlebenszeit der Synapsen [59]. Durch eine erhöhte Aktivität der Photorezeptorsynapsen nach Augenöffnung erhöhen sich die Anforderungen an die tonisch aktiven Ribbonsynapsen. Die Freisetzung von hunderten synaptischen Vesikeln pro Sekunde ist stimulusabhängig in den Ribbonsynapsen möglich, sodass die Funktion des CSP α als Faltungshelferprotein nun von essentieller Bedeutung ist, um diese enorme Leistungsfähigkeit zu sichern [59] [70].

Dieser Prozess wurde bisher primär für Proteine der Exozytose wie dem SNAP-25 untersucht, da CSP α bekannterweise ein Co-Chaperon/Faltungshelferprotein für Proteine für den SNARE-Komplex ist [63]. Ohne CSP α vermindert sich die Effizienz der Ausbildung des für die Exozytose essentiellen SNARE-Komplexes und damit die exozytotische Leistungsfähigkeit der Synapse [63]. Analog ist ebenso eine Rolle als Faltungshelferprotein für die Schlüsselproteine der Endozytose vorstellbar. Hierfür gibt es aus anderen Forschungsarbeiten Hinweise, beispielsweise in den Arbeiten von Zhang et al (2012) [80] und Rozas et al (2012) [53].

Mithilfe einer Doppelimmunfluoreszenzuntersuchung konnte ich nachweisen, dass endozytische Proteine in einem sehr frühen Stadium der postnatalen Entwicklung in den Photorezeptorsynapsen von CSP α -Knockout-Mäusen vermindert exprimiert werden. Dies könnte auf eine Fehlfaltung dieser Proteine im Knockouttyp hinweisen. Durch die Reizzunahme bei Augenöffnung könnte es durch den ausgefallenen Reparaturmechanismus von CSP α vermehrt zur Bildung funktionsunfähiger Fehlkonformationen der endozytischen Proteine kommen. Die fehlgefalteten Proteine werden dann wahrscheinlich verstärkt abgebaut. Dies könnte die verminderte Expression von Dynamin und Clathrin in CSP α -Knockout-Mäusen erklären.

Untersucht wurden Präparate aus dem Zeitraum der postnatalen Tage 14-16, also aus dem Zeitraum direkt nach der Augenöffnung, die bei Mäusen in der Regel zwischen dem 10.-12. postnatalen Tag stattfindet [31]. Die Degeneration der Photorezeptorsynapsen nahm nach der Augenöffnung deutlich zu, was durch stark abnehmende Signalintensitäten der immunmarkierten Proteine (Ribeye, Clathrin, Dynamin) insbesondere in der äußeren plexiformen Schicht, wo sich die hochaktiven Ribbonsynapsen der Photorezeptoren befinden, sichtbar gemacht werden konnte. Während der postnatalen Entwicklung schritten diese Veränderungen weiter voran.

In der Arbeit von *Schmitz F et al (2006)* [59] wurde anhand abnormaler ERG-Untersuchungsergebnisse in Zapfen und Stäbchen und struktureller Umbildungen ihrer Ribbonsynapsen bei CSP α -Knockout-Mäusen bereits kurz nach der Augenöffnung das Einsetzen der Photorezeptordegeneration beobachtet [59]. Die Verringerung der hier untersuchten endozytischen Proteine beginnt zum postnatalen Tag 14 und damit etwa zeitgleich wie die von *Schmitz F et al (2006)* [59] beschriebene Photorezeptordegeneration. Der frühe Zeitpunkt der degenerativen Veränderungen in den hier dargelegten Untersuchungen lässt somit vermuten, dass diese Proteine an den neurodegenerativen Veränderungen im CSP α -Knockout ursächlich beteiligt sind und nicht nur sekundäre Folgen der Veränderungen der exozytischen Proteine darstellen.

Die Polymerisation von Dynamin 1 ist von Bedeutung für die Umsetzung der Vesikelabschnürung in der Endozytose [64]. Das CSP α hat hier die Funktion, direkt an das Dynamin 1 zu binden und darüber dessen Selbstassemblierung und Polymerisation zu erlauben, ein für die Membranteilung wichtiger Schritt [16][64][80]. *Zhang Y et al (2012)* [80] konnten zeigen, dass Dynamin 1 ADP-abhängig ist und direkt an CSP α bindet [80].

Die These, dass das CSP α in seiner Funktion nicht nur für die Exozytose relevant ist, indem es die SNARE-Komplexbildung sichert, sondern auch für die Endozytose, in der es die Selbstassemblierung von Dynamin 1 ermöglicht [16][62], bestätigt sich in dieser Forschungsarbeit insofern, als dass eine erhebliche Beeinträchtigung des Dynamins gezeigt werden konnte. In den hier durchgeführten Untersuchungen ließ sich mithilfe der Immunfluoreszenz eine veränderte Verteilung des Dynamins in

der Retina von Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Versuchen nachweisen. Innerhalb der postnatalen Tage 14 bis 16 wurde die Anordnung der Signale von Tag zu Tag im Vergleich lückenhafter und die Intensität der Dynamin-Signale in der äußeren plexiformen Schicht nahm stark ab. Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass durch den CSP α -Knockout die Funktion des Dynamins und damit die Endozytose kompromittiert sind. In Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten erhärtet sich die Vermutung, dass Dynamin ein Zielsubstrat für das CSP α ist [80].

Welche Form der Endozytose durch CSP α reguliert wird, die Clathrin-abhängige oder Clathrin-unabhängige, ist jedoch bislang unklar [64]. Clathrin scheint aber, wie in den Ergebnissen der hier durchgeführten Versuche erkennbar ist, in seiner Funktion beeinträchtigt zu sein. *Braun J et al (1996)* [8] beschrieben näher, dass CSP α die ATPase Funktion von Hsc70 aktiviert und als dessen Regulierer fungiert, sodass das ATPase-abhängige Clathrin-Uncoating möglich ist [10][8]. Ob Clathrin zudem ein direktes Substrat des CSP α /Hsc70-Komplexes ist, konnte nicht gezeigt werden [8].

Bestätigt werden konnte in dieser Dissertation, dass durch den Knockout die Signaldichte und Intensität des Clathrins in der äußeren plexiformen Schicht geschwächt und seine physiologische Lokalisation verändert ist. Die Ergebnisse dieser Dissertation legen nahe, dass die Clathrin-abhängige Endozytose bei einem CSP α -Knockout eingeschränkt wird.

Schlussfolgernd lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Dissertation sagen, dass es durch den CSP α -Knockout zu Veränderungen von Clathrin und Dynamin in der äußeren plexiformen Schicht der Retina kommt, welche wahrscheinlich die Endozytose beeinträchtigen. Aufgrund des frühen Zeitpunktes dieser Veränderungen kann vermutet werden, dass die untersuchten Proteine darüber hinaus an den von *Schmitz F et al (2006)* [59] beschriebenen neurodegenerativen Prozessen in Photorezeptorsynapsen ursächlich mitbeteiligt sind. Ob und welche anderen Formen der Endozytose neben der Clathrin-abhängigen Endozytose beeinträchtigt sind, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die Frage bleibt außerdem offen, ob insbesondere das Clathrin ein direktes Zielsubstrat der CSP α -Chaperone ist. Es bietet sich an, Versuche mit präziseren Aufnahmen in höheren Auflösungen bzw. entsprechende biochemische und molekularbiologische Untersuchungen durchzuführen, um die Fragestellung mit noch genaueren Daten weiterführend beantworten zu können.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen vorhergehender Forschungsarbeiten zu dessen Funktionsmechanismen gilt CSP α als ein neuroprotektives Protein mit großer Wichtigkeit für den Erhalt der synaptischen Aktivität [80][9]. Neben den klaren Hinweisen hierfür in Tiermodellen konnten auch Verweise zu menschlichen Erkrankungen festgestellt werden [9]. *Zhang Y et al (2012)* konnten beispielsweise im frontalen Cortex eine Verminderung von CSP α und Hsp70 um 40% bei an Alzheimer erkrankten Gehirnen feststellen [80].

Die genaue Untersuchung weiterer CSP α -abhängiger Mechanismen und Interaktionen sowie die Suche nach neuen Zielsubstraten des CSP α ist somit auch von klinischer Bedeutung für das Verständnis neurodegenerativer Krankheitsbilder beim Menschen.

6. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis gemäß den Vorgaben der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes.

1. Agathocleous M, Harris WA (2009) From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:45–69
2. Antony B, Burd C, De Camilli P, Chen E, Daumke O, Faelber K, Ford M, Frolov VA, Frost A, Hinshaw JE, Kirchhausen T, Kozlov MM, Lenz M, Low HH, McMahon H, Merrifield C, Pollard TD, Robinson PJ, Roux A, Schmid S (2016) Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J* 35:2270–2284
3. Arpino G, Somasundaram A, Shin W, Ge L, Villareal S, Chan CY, Ashery U, Shupliakov O, Taraska JW, Wu L-G (2022) Clathrin-mediated endocytosis cooperates with bulk endocytosis to generate vesicles. *iScience* 25:103809
4. Baker RW, Hughson FM (2016) Chaperoning SNARE assembly and disassembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:465–479
5. Barnard RJ, Morgan A, Burgoyne RD (1996) Domains of alpha-SNAP required for the stimulation of exocytosis and for N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) binding and activation. *Mol Biol Cell* 7:693–701
6. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E (2016) Duale Reihe Physiologie, Kapitel 2.4 Synaptische Übertragung, S.48-59. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
7. Boucrot E, Ferreira APA, Almeida-Souza L, Debard S, Vallis Y, Howard G, Bertot L, Sauvonnet N, McMahon HT (2015) Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* 517:460–465
8. Braun JEA, Wilbanks SM, Scheller RH (1996) The Cysteine String Secretory Vesicle Protein Activates Hsc70 ATPase*. *J Biol Chem* 271:25989–25993
9. Burgoyne RD, Morgan A (2015) Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 40:153–159
10. Chamberlain LH, Burgoyne RD (1997) Activation of the ATPase activity of heat-shock proteins Hsc70/Hsp70 by cysteine-string protein. *Biochem J* 322:853–858
11. Chen X, Nelson CD, Li X, Winters CA, Azzam R, Sousa AA, Leapman RD, Gainer H, Sheng M, Reese TS (2011) PSD-95 is required to sustain the molecular organization of the postsynaptic density. *J Neurosci* 31:6329–6338
12. Choi UB, Zhao M, White KI, Pfuetzner RA, Esquivies L, Zhou Q, Brunger AT (2018) NSF-mediated disassembly of on- and off-pathway SNARE complexes and inhibition by complexin *Elife* 7:e36497

13. Clayton EL, Cousin MA (2009) The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J Neurochem* 111:901–914
14. DeLuca-Flaherty C, McKay DB, Parham P, Hill BL (1990) Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell* 62:875–887
15. Dembla M, Kesharwani A, Natarajan S, Fecher-Trost C, Fairless R, Williams SK, Flockerzi V, Diem R, Schwarz K, Schmitz F (2018) Early auto-immune targeting of photoreceptor ribbon synapses in mouse models of multiple sclerosis. *EMBO Mol Med* 10:e8926
16. Donnelier J, Braun JEA (2014) CSP α -chaperoning presynaptic proteins. *Front Cell Neurosci* 8:116
17. Drenckhahn D, Franz H (1986) Identification of Actin-, α -Actinin-, and Vinculin-containing Plaques at the Lateral Membrane of Epithelial Cells. *J Cell Biol* 102:1843–1852
18. Eich M-L, Dembla E, Wahl S, Dembla M, Schwarz K, Schmitz F (2017) The Calcineurin-Binding, Activity-Dependent Splice Variant Dynamin1xb Is Highly Enriched in Synapses in Various Regions of the Central Nervous System. *Front Mol Neurosci* 10:230
19. Faelber K, Posor Y, Gao S, Held M, Roske Y, Schulze D, Haucke V, Noé F, Daumke O (2011) Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* 477:556–560
20. Fernández-Chacón R, Wölfel M, Nishimune H, Tabares L, Schmitz F, Castellano-Muñoz M, Rosenmund C, Montesinos ML, Sanes JR, Schneggenburger R, Südhof TC (2004) The synaptic vesicle protein CSP α prevents presynaptic degeneration. *Neuron* 42:237–251
21. Fotin A, Cheng Y, Grigorieff N, Walz T, Harrison SC, Kirchhausen T (2004) Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature* 432:649–653
22. Grossman GH, Ebke LA, Beight CD, Jang G-F, Crabb JW, Hagstrom SA (2013) Protein partners of dynamin-1 in the retina. *Vis Neurosci* 30:129–139
23. Gundersen CB (2020) Cysteine string proteins. *Prog Neurobiol* 188:101758
24. Han J, Pluhackova K, Böckmann RA (2017) The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion. *Front Physiol* 8:5
25. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Kapitel 12 Zellorganellen und Vesikeltransport S.166-169. Springer, Berlin, Heidelberg, Berlin, Heidelberg
26. Heuser JE, Anderson RG (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 108:389–400
27. Huppelsberg J, Walter K (2013) Kurzlehrbuch Physiologie, Kapitel 17 Visuelles System S. 300-305. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
28. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH (2019) An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol* 1897:299–311

29. Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Südhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277:1511–1515
30. Iversen TG, Skotland T, Sandvig K (2011) Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 6:176–185
31. Jungbauer AM (2011) Untersuchung des postnatalen Expressionsmusters des synaptischen Proteins RIBEYE in der Mausretina. Univ des Saarlandes, Medizinische Fak Hombg
32. Kaksonen M, Roux A (2018) Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:313–326
33. Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC (2014) Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016725
34. Koulen P, Fletcher EL, Craven SE, Bredt DS, Wässle H (1998) Immunocytochemical Localization of the Postsynaptic Density Protein PSD-95 in the Mammalian Retina. *J Neurosci* 18:10136–10149
35. Latomanski EA, Newton HJ (2019) Taming the Triskelion: Bacterial Manipulation of Clathrin. *Microbiol Mol Biol Rev* 83:e00058-18
36. Llobet A, Gallop JL, Burden JJE, Camdere G, Chandra P, Vallis Y, Hopkins CR, Lagnado L, McMahon HT (2011) Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J Neurosci* 31:8512–8519
37. LoGiudice L, Matthews G (2007) Endocytosis at ribbon synapses. *Traffic* 8:1123–1128
38. Marquardt T, Gruss P (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* 25:32–38
39. Matthews G, Fuchs P (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11:812–822
40. Mayor HD, Hampton JC, Rosario B (1961) A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue. *J Biophys Biochem Cytol* 9:909–910
41. Mayor S, Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:603–612
42. McMahon HT, Boucrot E (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:517–533
43. Morgan A, Dimaline R, Burgoyne RD (1994) The ATPase activity of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is regulated by soluble NSF attachment proteins. *J Biol Chem* 269:29347–29350
44. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* 77:759–803
45. Nakane PK (1975) Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann N Y Acad Sci* 254:203–211
46. Nguyen-Ba-Charvet KT, Chédotal A (2014) Development of retinal layers. *C R Biol* 337:153–159

47. Olney JW (1968) An Electron Microscopic Study of Synapse Formation, Receptor Outer Segment Development, and other Aspects of Developing Mouse Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 7:250–268
48. Otto H, Hanson PI, Jahn R (1997) Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6197–6201
49. Pelkmans L, Helenius A (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3:311–320
50. Prinslow EA, Stepien KP, Pan Y-Z, Xu J, Rizo J (2019) Multiple factors maintain assembled trans-SNARE complexes in the presence of NSF and α SNAP. *Elife* 8:e38880
51. Regus-Leidig H, Tom Dieck S, Specht D, Meyer L, Brandstätter JH (2009) Early steps in the assembly of photoreceptor ribbon synapses in the mouse retina: the involvement of precursor spheres. *J Comp Neurol* 512:814–824
52. Reiner A, Levitz J (2018) Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* 98:1080–1098
53. Rozas JL, Gómez-Sánchez L, Mircheski J, Linares-Clemente P, Nieto-González JL, Vázquez ME, Luján R, Fernández-Chacón R (2012) Motoneurons require cysteine string protein- α to maintain the readily releasable vesicular pool and synaptic vesicle recycling. *Neuron* 74:151–165
54. Saheki Y, De Camilli P (2012) Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a005645
55. Sandvig K, Pust S, Skotland T, van Deurs B (2011) Clathrin-independent endocytosis: Mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol* 23:413–420
56. Sandvig K, Kavaliauskiene S, Skotland T (2018) Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 150:107–118
57. Schmid SL, Frolov VA (2011) Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:79–105
58. Schmitz F, Königstorfer A, Südhof TC (2000) RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28:857–872
59. Schmitz F, Tabares L, Khimich D, Strenzke N, De La Villa-Polo P, Castellano-Muñoz M, Bulankina A, Moser T, Fernández-Chacón R, Südhof TC (2006) CSP α -deficiency causes massive and rapid photoreceptor degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8:2926–2931
60. Schmitz F (2009) The making of synaptic ribbons: how they are built and what they do. *Neurosci* 15:611–624
61. Shankhwar S, Schwarz K, Katiyar R, Jung M, Maxeiner S, Südhof TC, Schmitz F (2022) RIBEYE B-Domain Is Essential for RIBEYE A-Domain Stability and Assembly of Synaptic Ribbons. *Front Mol Neurosci* 15:838311

62. Sharma M, Burré J, Südhof T (2011) CSP α promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat Cell Biol* 13:182
63. Sharma M, Burré J, Bronk P, Zhang Y, Xu W, Südhof TC (2012) CSP α knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function. *EMBO J* 31:829–841
64. Sheng J, Wu LG (2012) Cysteine String Protein α : A New Role in Vesicle Recycling. *Neuron* 74:6–8
65. Shin M, Wang Y, Borgus JR, Venton BJ (2019) Electrochemistry at the Synapse. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 12:297–321
66. Silbernagl S, Despopoulos A, Draguhn A (2018) Taschenatlas Physiologie, Kapitel 1 Grundlagen, Zellphysiologie / Aktiver Transport (S.40-42). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
67. Stein A, Weber G, Wahl MC, Jahn R (2009) Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane. *Nature* 460:525–528
68. Südhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions. *Nature* 375:645–653
69. Tamm ER, Ohlmann A (2012) Entwicklung des menschlichen Auges. *Der Ophthalmol* 109:911–928
70. tom Dieck S, Brandstätter JH (2006) Ribbon synapses of the retina. *Cell Tissue Res* 326:339–346
71. Ulfig N (2019) Kurzlehrbuch Histologie, Kapitel 13 Nervensystem und Sinnesorgane / Das Auge (S.230-235). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
72. van der Blik AM, Payne GS (2010) Dynamin subunit interactions revealed. *Dev Cell* 18:687–688
73. Vivona S, Cipriano DJ, O’Leary S, Li YH, Fenn TD, Brunger AT (2013) Disassembly of all SNARE complexes by N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) is initiated by a conserved 1:1 interaction between α -soluble NSF attachment protein (SNAP) and SNARE complex. *J Biol Chem* 288:24984–24991
74. von Kriegstein K, Schmitz F (2003) The expression pattern and assembly profile of synaptic membrane proteins in ribbon synapses of the developing mouse retina. *Cell Tissue Res* 311:159–173
75. Wahl S, Katiyar R, Schmitz F (2013) A local, periaxial zone endocytic machinery at photoreceptor synapses in close vicinity to synaptic ribbons. *J Neurosci* 33:10278–10300
76. Wahl S, Magupalli VG, Dembla M, Katiyar R, Schwarz K, Köblitz L, Alpadi K, Krause E, Rettig J, Sung C-H, Goldberg AFX, Schmitz F (2016) The Disease Protein Tulp1 Is Essential for Periaxial Zone Endocytosis in Photoreceptor Ribbon Synapses. *J Neurosci* 36:2473–2493
77. Wen X, Saltzgaber GW, Thoreson WB (2017) Kiss-and-Run Is a Significant Contributor to Synaptic Exocytosis and Endocytosis in Photoreceptors. *Front Cell Neurosci* 11:268

78. Xu J, Luo F, Zhang Z, Xue L, Wu X-S, Chiang H-C, Shin W, Wu L-G (2013) SNARE proteins synaptobrevin, SNAP-25, and syntaxin are involved in rapid and slow endocytosis at synapses. *Cell Rep* 3:1414–1421
79. Yoon T-Y, Munson M (2018) SNARE complex assembly and disassembly. *Curr Biol* 28:R397–R401
80. Zhang Y-Q, Henderson MX, Colangelo CM, Ginsberg SD, Bruce C, Wu T, Chandra SS (2012) Identification of CSP α clients reveals a role in dynamin 1 regulation. *Neuron* 74:136–150
81. Zhao C, Slevin JT, Whiteheart SW (2007) Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett* 581:2140–2149
82. Zhao M, Wu S, Zhou Q, Vivona S, Cipriano DJ, Cheng Y, Brunger AT (2015) Mechanistic insights into the recycling machine of the SNARE complex. *Nature* 518:61–67

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Retina	- 6 -
Abbildung 2 Schichten der menschlichen Retina	- 7 -
Abbildung 3 Signaltransduktion in der Photorezeptorzelle	- 8 -
Abbildung 4 Entwicklung des Neuralrohrs und Augenbläschens	- 10 -
Abbildung 5 Neurogenese der Retina	- 11 -
Abbildung 6 Aufbau einer Gab Junction	- 13 -
Abbildung 7 Die chemische Synapse	- 14 -
Abbildung 8 Neurotransmission an der chemischen Synapse	- 15 -
Abbildung 9 SNARE-Komplex: Ausbildung und Auflösung	- 19 -
Abbildung 10 SNARE-Komplex-Dissassemblierung durch NSF und SNAPs	- 21 -
Abbildung 11 Clathrin-abhängige Endozytose	- 23 -
Abbildung 12 Gegenüberstellung der CME und der ADBE	- 25 -
Abbildung 13 Formen der Endozytose	- 26 -
Abbildung 14 Die Clathrin-abhängige und die Endophilin-abhängige Endozytose	- 27 -
Abbildung 15 Struktur des Clathrins	- 29 -
Abbildung 16 Struktur des Dynamins	- 30 -
Abbildung 17 Funktion des CSP α /Hsc70/SGT-Chaperon-Komplexes	- 31 -
Abbildung 18 Struktur des CSP α	- 32 -
Abbildung 19 Funktion des CSP α	- 34 -
Abbildung 20 CSP α in Exozytose und Endozytose	- 35 -
Abbildung 21 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz	- 41 -
Abbildung 22 Referenzinkubation , postnataler Tag 14 (P14)	- 45 -
Abbildung 23 Negativkontrollen mit PBS, postnataler Tag 14 (P14)	- 46 -
Abbildung 24 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 14 (P14)	- 47 -
Abbildung 25 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 14 (P14)	- 48 -
Abbildung 26 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 14 (P14)	- 49 -
Abbildung 27 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 14 (P14)	- 50 -
Abbildung 28 Referenzinkubation, postnataler Tag 15 (P15)	- 51 -
Abbildung 29 Negativkontrollen mit PBS, postnataler Tag 15 (P15)	- 52 -
Abbildung 30 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 15 (P15)	- 53 -
Abbildung 31 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 15 (P15)	- 54 -
Abbildung 32 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 15 (P15)	- 55 -
Abbildung 33 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 15 (P15)	- 56 -
Abbildung 34 Referenzinkubation, postnataler Tag 16 (P16)	- 57 -
Abbildung 35 Negativkontrolle mit PBS, postnataler Tag 16 (P16)	- 58 -
Abbildung 36 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 16 (P16)	- 59 -
Abbildung 37 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Dynamin 1E10, postnataler Tag 16 (P16)	- 60 -
Abbildung 38 Epifluoreszenzmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 16 (P16)	- 61 -
Abbildung 39 Konfokalmikroskopisch, Immunfluoreszenz mit Anti-Clathrin 7A9, postnataler Tag 16 (P16)	- 62 -

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnungen	- 36 -
Tabelle 2 Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen.....	- 37 -
Tabelle 3 Auflistung weiterer Materialien	- 39 -

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADBE	Activity Dependent Bulk Endocytosis
ADP	Adenosindiphosphat
AP2, AP180	Adapterprotein
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Enzyme zur Spaltung von ATP
BAR-haltige Proteine	bin-amphiphysin-rvs -Domäne
Ca	Calcium
cGMP	cyclisches Guaninmonophosphat
CME	Clathrin-Mediated-Endocytosis
CSP	Cystein String Protein
CtBP	C-terminales Bindeprotein
C-Terminale	Carboxyterminal
Hsp40	heat shock protein 40kD
ERG	Elektroretinogramm
EPS15	Epidermal Growth Factor Receptor Substrate-15
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
et al	und andere
FEME	Fast endophilin-mediated endocytosis
g	gramm
GED	GTPase- Effektordomäne
GMP	Guanosinmonophosphat
GPI	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
G-Protein	GTPase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Enzym zur Spaltung von GTP
Hsc70	Heat shock cognate 70kD
Hsp	Heat shock proteine
INL	Inner Nuclear Layer
IPL	Inner Plexiform Layer
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
KCl	Kaliumchlorid
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
MD	mittlere Domäne

mGluR6	metabotroper Glutamatrezeptor
N.	Nervus
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
NPG	N-Propylgallat
NSF	<i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor
N-Terminale	Aminoterminal
ONL	Outer Nuclear Layer
OPL	Outer Plexiforme Layer
P14, P15, P16	Postnataler Tag 14, 15, 16
PBS	Phosphat Buffered Saline
PH	Pleckstrin Homologe
PRD	Prolinreiche Domäne
PSD	Postsynaptische Dichte
Q-SNARE	Vorhandensein von Glutamin im SNARE-Motiv
Rho	Ras Homologoue
R-SNARE	Vorhandensein von Arginin im SNARE-Motiv
SGT	small glutamine rich tetratricopeptide repeats
SNAP-25	Synaptosomal Assoziiertes Protein 25 kD
SNAP	Soluble NSF Attachment Proteine
SNARE-Komplex receptor	soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive-factor attachment
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
Syt1, Syt2, Syt9	Synaptotagmin-1, 2, 9
t-SNARE	SNARE-Protein der Zielmembran
v-SNARE	SNARE-Protein des Vesikel
z.B.	zum Beispiel

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Verwirklichung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zuallererst bedanke ich mich insbesondere bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Schmitz, der mich bei Fragen und Schwierigkeiten während der Versuche stets beraten und während der Ausarbeitung der Arbeit betreut hat.

Außerdem gilt mein aufrichtiger Dank Frau Dr. rer. nat. Katrin Schwarz, Frau Dr. rer. nat. Amrita Mukherjee, Frau Dr. rer. nat. Shweta Suiwal und Frau Soni Shankhwar, die mir bei der Arbeit im Labor zu jeder Zeit mit Tipps hilfreich zur Seite gestanden und mich im Team freundlich aufgenommen haben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Tamara Brück und Gabriele Kiefer für die Hilfe bei labortechnischen Belangen und Fragen bedanken. Besonderer Dank an Gabriele Kiefer für die Herstellung der Semidünnschnitte, die ich in der Arbeit verwendet habe.

Nicht zu vergessen sind meine lieben Mitdoktoranden und Mitdoktorandinnen, die zeitgleich mit mir im Labor der Arbeitsgruppe Schmitz promoviert haben. Die Zeit zur Erarbeitung der Dissertation kann ich mir kaum ohne den Austausch mit ihnen vorstellen!

Dank gilt außerdem meinen Eltern Angela Stilianakis und Prof. Dr. rer. nat. Nikoaloas Stilianakis sowie Pauline Löschner, Max Nelles, Dr. med. Theodor Pesch und Ellie Lagler für ihre Unterstützung.

11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

