

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

**Ein morphologischer Interaktionsassay
zur Charakterisierung der Bindung von CtIP an das
synaptische Ribbonprotein RIBEYE**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008*

vorgelegt von:

Karin Fröhlich
geb. am: 13.05.1974
in Naumburg

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatter:

Inhaltsverzeichnis

1.	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	1
2.	EINLEITUNG	4
2.1	DIE ELEKTRISCHE SYNAPSE	4
2.2	DIE CHEMISCHE SYNAPSE	5
2.3	DIE RIBBONSYNAPSE	7
2.3.1	Präsynaptische Proteine der Ribbonsynapse und der konventionellen chemischen Synapse.....	10
2.3.2	RIBEYE, Hauptbestandteil der synaptischen Ribbons	12
2.4	CTIP, PUTATIVER INTERAKTIONSPARTNER VON RIBEYE.....	15
2.5	ZIELSTELLUNG DIESER ARBEIT	16
3.	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	MATERIAL	17
3.1.1	Plasmide.....	17
3.1.2	COS-Zellen.....	19
3.2	VERWENDETE LÖSUNGEN.....	20
3.2.1	Lösungen zur Transfektion	20
3.2.2	Lösungen zur Immunfluoreszenz.....	21
3.3	VERWENDETE ANTIKÖRPER	22
3.4	GERÄTE	23
3.5	SOFTWARE.....	23
3.6	METHODEN	23
3.6.1	Transfektion.....	23
3.6.1.1	Allgemeine Bemerkungen zur gewählten Transfektionsmethode.....	23
3.6.1.2	Durchführung der Transfektion.....	24

3.6.2	Immunfluoreszenz	25
3.6.2.1	Allgemeine Bemerkungen zur Immunfluoreszenz	25
3.6.2.2	Durchführung und Auswertung der Immunfluoreszenz	26
3.6.3	Mikroskopische Analyse	27
4.	ERGEBNISSE.....	28
4.1	KONTROLLEN	28
4.1.1	Negativkontrollen.....	28
4.1.2	Immunfluoreszenzkontrolle des EGFP	28
4.1.3	Blockierungskontrollen.....	29
4.2	VERTEILUNG VON RIBEYE IN TRANSFIZIERTEN COS-ZELLEN	30
4.2.1	Verteilungsmuster der B-Domäne von RIBEYE.....	30
4.2.2	Verteilungsmuster der A-Domäne von RIBEYE.....	31
4.2.3	Verteilungsmuster der AB-Domäne von RIBEYE	33
4.3	VERTEILUNG VON CTIP IN TRANSFIZIERTEN COS-ZELLEN.....	35
4.4	UMVERTEILUNG VON CTIP IN RIBEYE-TRANSFIZIERTEN COS-ZELLEN	36
4.4.1	Retention von CtIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und pCtIP.....	36
4.4.1.1	Gesamtübersicht: Retentionsmuster von CtIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und pCtIP und Verteilungsmuster von einzeln transfiziertem pCtIP und pRE(B)EGFP	38
4.4.1.2	Graphische Quantifizierung des morphologischen Interaktionsassays der B-Domäne von RIBEYE und CtIP	39
4.4.2	Lokalisation von CtIP und RE(AB)EGFP bei Doppeltransfektion pRE(AB)EGFP und pCtIP	40
4.4.2.1	Gesamtübersicht: Lokalisation von CtIP und RE(AB)EGFP bei Doppeltransfektion pRE(AB)EGFP und pCtIP und Verteilungsmuster von einzeln transfiziertem pCtIP und pRE(AB)EGFP	42
4.5	INTERAKTION UND VERTEILUNGSMUSTER DER CTIP-KONSTRUKTE MIT RIBEYE IN TRANSFIZIERTEN COS-ZELLEN	44
4.5.1	Verteilungsmuster des einzeln transfizierten HIIIcTIP-Konstruktes und Retention von HIIIcTIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und pHIIIcTIP.....	44

4.5.2	Verteilungsmuster des einzeln transfizierten (+)PLDLSCtIP-Konstruktes und Retention von (+)PLDLSCtIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und p(+)-PLDLSCtIP	46
4.5.3	Graphische Quantifizierung des morphologischen Interaktionsassays der B-Domäne von RIBEYE und der CtIP-Konstrukte HIIIcTIP und (+)PLDLSCtIP	47
4.5.4	Verteilungsmuster des einzeln transfizierten (-)-PLDLSCtIP-Konstruktes und Lokalisation von (-)-PLDLSCtIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und p(-)-PLDLSCtIP	49
5.	DISKUSSION	51
5.1	UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN DEM SYNAPTISCHEN RIBBONPROTEIN RIBEYE UND DEM KERNPROTEIN CTIP	51
5.1.1	Verteilungsmuster von RIBEYE und CtIP in einzeln transfizierten COS-Zellen	51
5.1.2	Verteilungsmuster von RIBEYE und CtIP in doppelt transfizierten COS-Zellen.....	52
5.2	MÖGLICHE BEDEUTUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN DER B-DOMÄNE VON RIBEYE UND CTIP	53
5.3	UNTERSUCHUNG DER INTERAKTIONSBINDUNGSSTELLE ZWISCHEN DER B-DOMÄNE VON RIBEYE UND CTIP	54
6.	LITERATURVERZEICHNIS	56
7.	DANKSAGUNG	66
8.	LEBENS LAUF	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Elektrische Synapse	5
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Signalübertragung an chemischen Synapsen.....	7
Abbildung 3:	Schematische Darstellung und elektronenmikroskopisches Bild einer Ribbonsynapse in der Retina.....	9
Abbildung 4:	Domänenstruktur von RIBEYE	13
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des humanen Gens, das RIBEYE und CtBP2 kodiert.....	14
Abbildung 6:	Funktionsmodell synaptischer Ribbons in präsynaptischen Nervenendigungen	15
Abbildung 7:	Schematische Domänenstruktur von CtIP	19
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der direkten und indirekten Immunfluoreszenz	25
Abbildung 9:	Zellverteilung von EGFP in transfizierten COS-Zellen	28
Abbildung 10:	Zellverteilung von CtIP mit den jeweiligen Blockierungsreagenzien: BSA, Gelatine und NGS in transfizierten COS-Zellen	29
Abbildung 11:	COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP (ET)	30
Abbildung 12:	COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP (ET) und immunmarkiert mit anti-Histonantikörper	31
Abbildung 13:	COS-Zellen transfiziert mit pRE(A)EGFP (ET)	31
Abbildung 14:	COS-Zellen transfiziert mit pRE(A)EGFP (ET) und immunmarkiert mit anti-Histonantikörper	32
Abbildung 15:	COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP (ET).....	33
Abbildung 16:	COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP (ET) und immunmarkiert mit anti-Histonantikörper	33
Abbildung 17:	COS-Zellen transfiziert mit pCtIP (ET).....	35
Abbildung 18:	COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP und pCtIP (DT)	36
Abbildung 19:	Gesamtübersicht: COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP und pCtIP (ET/DT)	38

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20:	Graphische Quantifizierung des morphologischen Interaktionsassays	39
Abbildung 21:	COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP und pCtIP (DT)	40
Abbildung 22:	Gesamtübersicht: COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP und pCtIP (ET/DT)	42
Abbildung 23:	COS-Zellen transfiziert mit pHIIICtIP (ET)	44
Abbildung 24:	COS-Zellen transfiziert mit pHIIICtIP und pRE(B)EGFP (DT)	45
Abbildung 25:	COS-Zellen transfiziert mit p(+)-PLDLSCtIP (ET)	46
Abbildung 26:	COS-Zellen transfiziert mit p(+)-PLDLSCtIP und pRE(B)EGFP (DT)	46
Abbildung 27:	Graphische Analyse der Verteilung von CtIP in COS-Zellen, die mit pHIIICtIP und pRE(B)EGFP „co“-transfiziert wurden	48
Abbildung 28:	Graphische Analyse der Verteilung von CtIP in COS-Zellen, die mit p(+)-PLDLSCtIP und pRE(B)EGFP „co“-transfiziert wurden	48
Abbildung 29:	COS-Zellen transfiziert mit p(-)-PLDLSCtIP (ET)	49
Abbildung 30:	COS-Zellen transfiziert mit p(-)-PLDLSCtIP und pRE(B)EGFP (DT)	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Lösungen zur Transfektion	20
Tabelle 2:	Lösungen zur Immunfluoreszenz.....	21
Tabelle 3:	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....	22
Tabelle 4:	Verwendete Geräte	23
Tabelle 5:	Verwendete Software	23

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	destilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosin-3', 5'-cyclo-monophosphat
AS	Aminosäure
βAPP	Amyloid-Vorläufer-Protein
BRCA1	breast cancer-associated protein-1
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserum-Albumin)
BZ	Bipolarzellen
cAMP	cyclisches AMP
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CtBP1	C-terminales-Bindungs-Protein 1 für das Adenovirus E1A-Protein
CtBP2	C-terminales-Bindungs-Protein 2 für das Adenovirus E1A-Protein
CtIP	CtBP-interacting Protein
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DT	Doppeltransfektion
E1A	Adenovirus
ET	Einzeltransfektion
HZ	Horizontalzellen
IP3	Inositoltrisphosphat
kDa	Kilodalton
LMO4	LIM-only protein-4
LZ	Leuzin-Zipper
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NGS	Normal Goat Serum (normales Ziegenserum)

Abkürzungsverzeichnis

NPG	N-propyl-gallat
p. A.	pro analysi
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PhR	Photorezeptor
Rb	Retinoblastoma-Protein
RRP	Rapidly Releasable Pool
RP	Reserve Pool
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SV	synaptische Vesikel
TBS	Tris-buffered saline (Tris-NaCl-Puffer)
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

In der vorliegenden Dissertation wurden die englischen Wörter durch Anführungszeichen definiert.

1. Zusammenfassung / Summary

Ein morphologischer Interaktionsassay zur Charakterisierung der Bindung von CtIP an das synaptische Ribbonprotein RIBEYE

Nervenzellen übertragen Informationen zu nachgeschalteten Nervenzellen über spezielle Kontaktstellen: die Synapsen. Chemische Synapsen sind spezialisierte Interzellularkontakte, an denen ein präsynaptisches Neuron Informationen via Exozytose von Neurotransmitter-enthaltenden synaptischen Vesikeln an die postsynaptische Zielstelle weiterleitet. Ribbonsynapsen sind spezialisierte, tonisch aktive Synapsen, die eine schnelle Vesikelexozytose über lange Zeiträume aufrechterhalten können. Für diese Eigenschaft macht man die synaptischen Ribbons verantwortlich; der genaue Mechanismus, wie synaptische Ribbons arbeiten, ist allerdings noch unbekannt. RIBEYE ist das von der Arbeitsgruppe identifizierte Hauptprotein der synaptischen Ribbons und somit wahrscheinlich maßgeblich für die Eigenschaften der synaptischen Ribbons verantwortlich.

In Vorarbeiten wurde durch Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen das Protein CtIP als möglicher Interaktionspartner von RIBEYE identifiziert. In vorliegender Doktorarbeit sollte diese Interaktion durch ein weiteres unabhängiges Verfahren untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein morphologischer Interaktionsassay entwickelt und erfolgreich angewendet. Dieser Assay beruht darauf, dass das nukleäre Protein CtIP durch das im Zytosol befindliche RIBEYE im Fall einer Interaktion im Zytosol retiniert und daran gehindert wird, in den Zellkern zu translozieren. Mit diesem Interaktionsassay wurde die im Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren gefundene Interaktion bestätigt und zudem die Interaktionsstelle zwischen RIBEYE und CtIP kartiert.

Aufgrund unserer Ergebnisse gehen wir davon aus, dass die Interaktion des synaptischen Ribbonproteins RIBEYE mit dem nukleären Protein CtIP für die Kommunikation zwischen Synapse und Zellkern wichtig ist.

Dieser Signalweg könnte für die Regulierung der Expression von synaptischen Proteinen von Bedeutung sein. Denn nach intensiver Tätigkeit altern und denaturieren synaptische Proteine und müssen ersetzt werden. Deshalb muss ein Rückkopplungsmechanismus zwischen Synapse und Zellkern bestehen, der in den tonisch aktiven Ribbonsynapsen offensichtlich von besonderer Bedeutung ist. Das Protein CtIP ist ein idealer Kandidat, um Signale von der Synapse in den Zellkern zu übermitteln und dort die Genexpression zu regulieren.

A morphological interaction assay for the characterization of binding of CtIP to the synaptic ribbon protein RIBEYE

Nerve cells communicate via specialized intercellular contacts: the synapses. Chemical synapses are specialized intercellular junctions, at which a presynaptic neuron communicates with a postsynaptic neuron via exocytosis of neurotransmitter-containing synaptic vesicles. Ribbon synapses are specialized, tonically active synapses, that are able to maintain a high rate of vesicle exocytosis during long periods of time. It is assumed that synaptic ribbons, are responsible for the unique physiological properties of ribbon synapsis although the exact mechanisms are still unknown. RIBEYE, which has been identified by our group, is the main protein of the synaptic ribbons and therefore likely to be responsible for the properties of synaptic ribbons.

Previous yeast two-hybrid assays identified the protein CtIP as a potential binding partner of RIBEYE. The aim of the present thesis work was to analyze this interaction using a further, independent approach. For this purpose a morphological interaction assay was developed and successfully applied for the analysis of RIBEYE-CtIP interaction. The assay was based on the retention of the nuclear protein CtIP in the cytosol by the cytosolically localized protein RIBEYE. If CtIP interacts with RIBEYE it is inhibited to enter the nucleus. By using this interaction assay the result of the yeast two-hybrid assay was verified. Furthermore, it was possible to map the interaction site between RIBEYE and CtIP.

On the basis of our results we suppose, that the interaction between the synaptic ribbon protein RIBEYE and the nuclear protein CtIP is relevant for the communication between synapse and cell nucleus. This signalling pathway could be of importance for the regulation of the expression of synaptic proteins. Such a signaling between the synapses and the nucleus could provide a feedback mechanism to replace synaptic proteins that get aged and denatured during extended activity. Obviously, such a mechanism would be particularly important in the tonically active ribbon synapses. CtIP is an ideal candidate protein to transmit signals from the synapse to the nucleus where it could regulate gene expression of synaptic proteins.

2. Einleitung

Der menschliche Organismus ist einer Vielzahl von Reizen ausgesetzt, die er sowohl bewusst als auch unbewusst wahrnimmt. Um diese Reize verarbeiten zu können, werden diese von spezifischen Sinnesorganen aufgenommen, in Erregung umgewandelt und zur weiteren Verarbeitung an das Zentralnervensystem (ZNS) weitergeleitet. Diese Signalübertragung wird durch Neurone (Nervenzellen) gewährleistet. Dabei breitet sich das Signal innerhalb einer Nervenzelle von den Dendriten über den Zellkörper zur Axonendigung aus. Die Signalübertragung zwischen einzelnen Nervenzellen erfolgt über spezielle Kontaktstellen, die so genannten Synapsen, die die Erregung von Zelle zu Zelle weiterleiten. Die Synapse besteht grundsätzlich aus einer präsynaptischen Membran (die die Erregung überträgt) und einer postsynaptischen Membran (der nachgeschalteten, zu erregenden Zelle). Zwischen beiden liegt der synaptische Spalt. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen zwei Typen von Synapsen, die sich aufgrund ihres Aufbaus und der Art der Signalübertragung in elektrische und chemische Synapsen einteilen lassen (Kandel et al. 1996). Eine spezialisierte Form der chemischen Synapse ist die Ribbonsynapse, die den Gegenstand der vorliegenden Arbeit darstellt.

2.1 Die elektrische Synapse

Elektrische Synapsen (Gap Junctions, Abb.1) sind im zentralen Nervensystem zwischen Nervenzellen und den ihnen funktionell zugeordneten Gliazellen lokalisiert. Sie bilden jeweils zusammen ein funktionelles Netzwerk. Entdeckt wurde diese Form der Synapsen zunächst in den Nervenzellen von Fischen, wo sie für die Auslösung von Fluchtreflexen verantwortlich sind (Kandel et al. 1996). Gap Junctions sind im menschlichen Organismus vielerorts vorhanden, z. B. in der Retina, im Leberepithel, in der glatten Muskulatur sowie in den Glanzstreifen des Herzmuskels. Die Aufgabe der elektrischen Synapse besteht in der schnellen Übertragung einfacher Signale durch direkte Membrankontakte.

Dabei nähert sich im Bereich der Gap Junctions die Doppelmembran der Prä- und Postsynapse in einem Abstand von etwa 2 bis 4 nm. In beiden Membranen

befinden sich Tunnelproteine, die so genannten Connexone, die jeweils aus sechs Proteinen, den Connexinen, bestehen.

Entsteht in der Präsynapse eine Erregung, treffen die Connexone der prä- und postsynaptischen Membran aufeinander und bilden so einen Kanal mit einem Durchmesser von etwa 1,5 nm. Dieser Kanal verbindet beide aneinander grenzenden Zellen miteinander und ermöglicht so einen direkten Stromfluss zwischen zwei Nervenzellen. Diese Form der Signalübermittlung geschieht fast verzögerungsfrei und weist in den meisten Fällen eine kurze Latenzzeit von ca. 0,1 ms auf. Durch den relativ großen Durchmesser der Kanäle können nicht nur Ionen die Kanäle passieren, sondern auch kleinere intrazelluläre Botenstoffe. Dazu gehören unter anderem der Neurotransmitter Glyzin, cAMP, Aminosäuren oder der Botenstoff Inositoltrisphosphat (IP₃) (Kandel et al. 1996; Vaney et al. 1998). Anders als im Bereich der chemischen Synapse fehlt es an einem Verstärkungsmechanismus, so dass in der Präsynapse ein relativ starker Reiz vorliegen muss, damit eine Erregung der Postsynapse erfolgt.

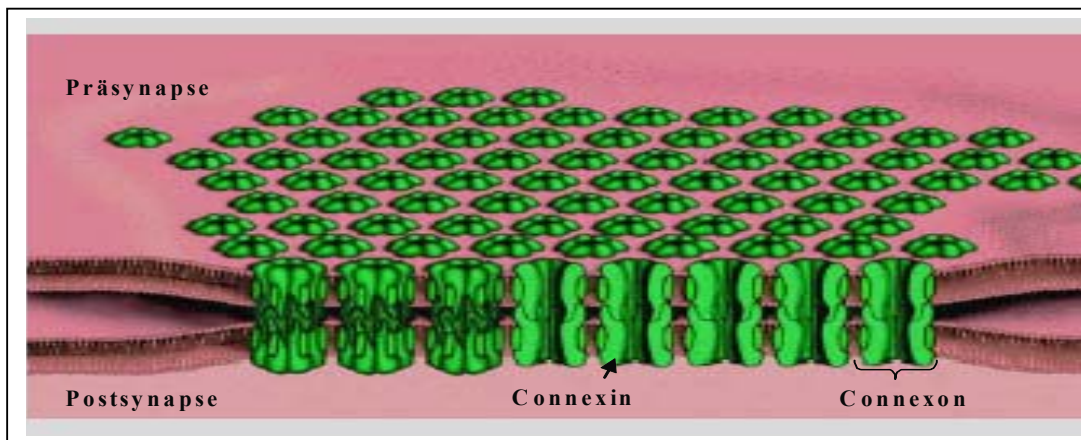


Abbildung 1: Elektrische Synapse

Dreidimensionales Modell einer elektrischen Synapse mit angeschnittenen Connexonen (Gap Junctions), die jeweils aus sechs identischen Untereinheiten, den Connexinen, bestehen. Es werden jeweils Connexone von der Prä- und Postsynapse gestellt. Die daraus resultierenden Kanäle ermöglichen den direkten Membrankontakt zwischen beiden Zellen. Die Connexone verringern gleichzeitig den Interzellularraum von 20 nm auf etwa 2 bis 4 nm. (Kandel et al. 1996; in veränderter Form).

2.2 Die chemische Synapse

Bei Säugetieren, einschließlich des menschlichen Organismus, erfolgt die synaptische Erregungsübertragung im ZNS hauptsächlich durch chemische Synapsen (Abb.2). Anders als bei der elektrischen Synapse sind chemische

Synapsen in der Regel asymmetrisch aufgebaut, d. h. die prä- und postsynaptische Membran weisen unterschiedliche Eigenschaften auf, wodurch die Reizübertragung nur in eine Richtung erfolgt.

Weiterhin bewirken sie keinen unmittelbaren Zellmembrankontakt zwischen Prä- und Postsynapse, sondern benutzen Botenstoffe, so genannte Neurotransmitter, um die Signalübermittlung von Nerven- oder Sinneszellen auf nachgeschaltete Zellen zu gewährleisten. Diese Botenstoffe sind in den synaptischen Vesikeln verpackt. Die Neurotransmitter-beladenen Vesikel befinden sich in den präsynaptischen Terminalen, den so genannten synaptischen Endkolben, und werden dort für die Vesikelexozytose bereitgestellt.

Die Erregungsleitung an chemischen Synapsen erfolgt, wenn ein Aktionspotential (Nervimpuls) den synaptischen Endkolben erreicht und Kalzium über spannungsabhängige Kanäle in die Präsynapse strömt (Smith und Augustine 1988). Kalzium induziert dabei die Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Plasmamembran, ein als Exozytose bezeichneter Prozess, und führt zur Ausschüttung des Vesikelinhaltes in den synaptischen Spalt. Der Ort der Verschmelzung an der präsynaptischen Membran wird als aktive Zone bezeichnet. Die Transmitter diffundieren im synaptischen Spalt zu den Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Je nach Rezeptortyp erfolgt eine Erregung (exzitatorisch) oder Hemmung (inhibitorisch) der nachgeschalteten Zelle (Kandel und Schwartz 1996). Die Rezeptoren der postsynaptischen Membran sind häufig Ionenkanäle, die durch Bindung des spezifischen Transmitters geöffnet und nach dessen Ablösung (Wegdiffusion) von der Rezeptorregion wieder geschlossen werden (ionotrope Rezeptoren). Ionotrope Rezeptoren lassen nur bestimmte Arten von Ionen vom synaptischen Spalt in das Innere der Zelle passieren (Kandel und Schwartz 1996). Die Aktivierung von metabotropen Rezeptoren führt dagegen zur Bildung von intrazellularen Botenstoffen. Die Ursache für die Rezeptoraktivierung ist eine räumliche Änderung der Proteinstruktur (Konformationsänderung), die durch die Bindung der Transmitter an den Rezeptor ausgelöst wird.

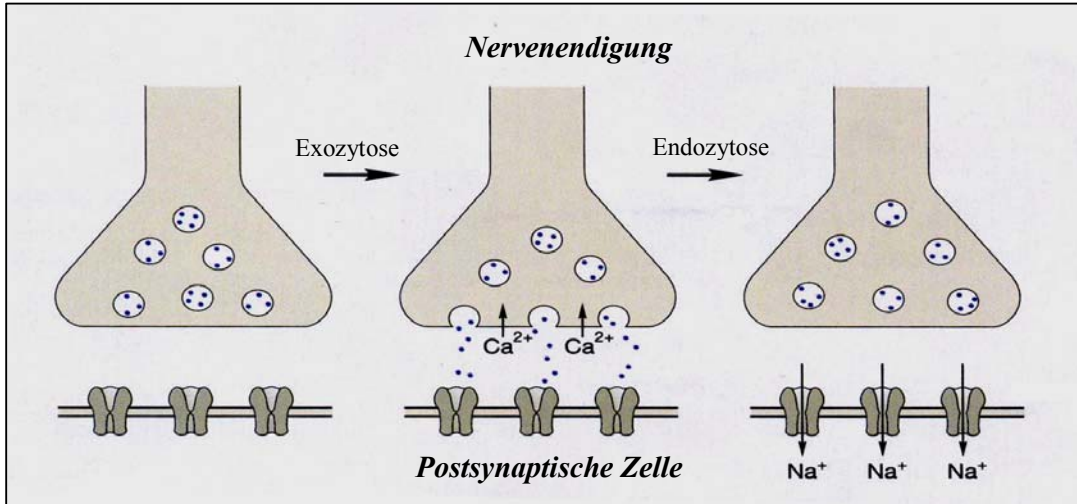


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signalübertragung an chemischen Synapsen

An der aktiven Zone der präsynaptischen Endigung befinden sich transmittergefüllte Vesikel. Nach Eintreffen eines Signals entsteht ein Aktionspotential in der Präsynapse und Kalzium strömt über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in die Präsynapse. Dies führt zur Verschmelzung synaptischer Vesikel an der präsynaptischen Membran (Vesikelfusion) sowie zur Neurotransmitterausschüttung in den synaptischen Spalt. Die Neurotransmitter diffundieren zur postsynaptischen Membran, binden an die speziellen Rezeptoren und öffnen Ionenkanäle. Über die geöffneten Ionenkanäle strömt Natrium (Na^+) in die Postsynapse, depolarisiert die Zelle und gewährleistet auf diesem Wege die Signalübertragung (Kandel et al. 1996; in veränderter Form).

Anders als bei der elektrischen Synapse bewirkt die chemische Synapse eine Signalverstärkung und eine Signalmodulation. Das heißt, dass sowohl die Menge der Neurotransmitter als auch die Affinität der Rezeptoren verändert werden kann. Aufgrund der langen Latenzzeit im Mittel von 0,4 ms (0,3 bis 0,5 ms) ist die chemische Synapse im Gegensatz zur elektrischen Synapse an Orten schneller Signalübertragung ungeeignet.

2.3 Die Ribbonsynapse

Ribbonsynapsen (Abb.3) stellen eine spezialisierte Form chemischer Synapsen dar. Sie kommen in speziellen Zellen des Nervensystems, wie den Photorezeptorzellen und bipolaren Zellen der Retina, in den Haarzellen des Innenohres sowie in den melatonin-sekretorischen Neuronen der Epiphyse vor (Smith und Sjöstrand 1961; Hopsu und Arstila 1964; Dowling 1987; Sterling 1998; Borjigin et al. 1999; Lenzi et al. 1999).

Immunzytochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bestandteile der Ribbonsynapsen denen der konventionellen chemischen Synapsen ähneln, jedoch einige Unterschiede in Bau und Funktion aufweisen (Ullrich und Südhof 1994; Brandstätter et al. 1996a, 1996b; Kriegstein et al. 1999; Kriegstein und

Schmitz 2003). Die Besonderheit der Ribbonsynapsen sind blattartige Organellen mit lamellarem Aufbau, die so genannten synaptischen Ribbons (Dowling 1987; Sterling 1998). Diese synaptischen Ribbons sind in den präsynaptischen Nervenendigungen senkrecht zur aktiven Zone der Plasmamembran, dem Ort der Exozytose synaptischer Vesikel, angeordnet (Gray und Pease 1971; Schaeffer et al. 1982) (Abb.3).

Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass Ribbonsynapsen, im Gegensatz zur phasischen Aktivität konventioneller chemischer Synapsen, zur permanenten, „tonischen“ Transmitterfreisetzung in der Lage sind (DeVries und Baylor 1993; Lenzi et al. 2001; von Gersdorff 2001). Diese Fähigkeit der Ribbonsynapsen beruht auf einer kontinuierlichen Exozytose synaptischer Vesikel, die durch die Existenz und den lamellaren Aufbau der synaptischen Ribbons gewährleistet wird (Dowling 1987; Sterling 1998; Juusola et al. 1996).

Während die aktive Zone von Ribbonsynapsen lediglich das Andocken von etwa 130 Vesikeln ermöglicht, wird durch die große Oberfläche der synaptischen Ribbons eine Bindung und Aktivierung von mehr als 600 Vesikeln erreicht. Demzufolge bilden die synaptischen Ribbons ein Reservoir von exozytosebereiten, aktivierten synaptischen Vesikeln, wodurch ein schneller und gezielter Transport, ähnlich dem eines Förderbandes, dieser Vesikel zur aktiven Zone gewährleistet wird.

Die Exozytose der Vesikel in den Ribbonsynapsen wird ähnlich wie bei den konventionellen chemischen Synapsen durch Ca^{2+} induziert (Rao et al. 1994; Rao-Mirotnik et al. 1995; von Gersdorff et al. 1998; De Ruyter van Steveninck und Laughlin 1996). Dabei exozytieren Ribbonsynapsen bei geringem Kalziumlevel pro synaptischen Ribbon etwa 50 Vesikel/Sekunde, während ein hoher Kalziumlevel eine Freisetzungsrate von etwa 500 Vesikel/Sekunde erreicht (Parsons et al. 1994; Rieke und Schwartz 1996; von Gersdorff et al. 1996).

Im Gegensatz dazu erreichen konventionelle chemische Synapsen bei maximalem Ca^{2+} -Einstrom lediglich eine Freisetzungsrate von etwa 20 Vesikel/Sekunde (Stevens und Tsujimoto 1995).

Infolgedessen sind Ribbonsynapsen eine spezialisierte Form chemischer Synapsen, die aufgrund eines optimierten synaptischen Exozytoseapparates zu einer tonischen Transmitterfreisetzung fähig sind und aus diesem Grund eine schnellere und effizientere Informationsübertragung gewährleisten.

Während die klassische Form der Ribbonsynapsen ausschließlich bei Vertebraten zu finden ist (Schmitz et al. 2000), konnte eine ähnliche Form bei Invertebraten, wie z.B. bei *Drosophila*, nachgewiesen werden. Diese als T-Form erkennbare Struktur weist möglicherweise ähnliche Funktion wie die Ribbonsynapse auf. Sie wurde in Nervenendigungen von Photorezeptoren, in neuromuskulären Verbindungen und in anderen Synapsen gefunden (Trujillo-Cenzo 1972; Wan et al. 2000), wobei die synaptischen Ribbons der Vertebraten sich in Form und histologischem Aufbau von denen der T-Form-Struktur unterscheiden. Während diese Form einen direkten Kontakt zur aktiven Zone bildet, berühren die synaptischen Ribbons der Vertebraten die aktive Zone nicht (Schmitz et al. 2000).

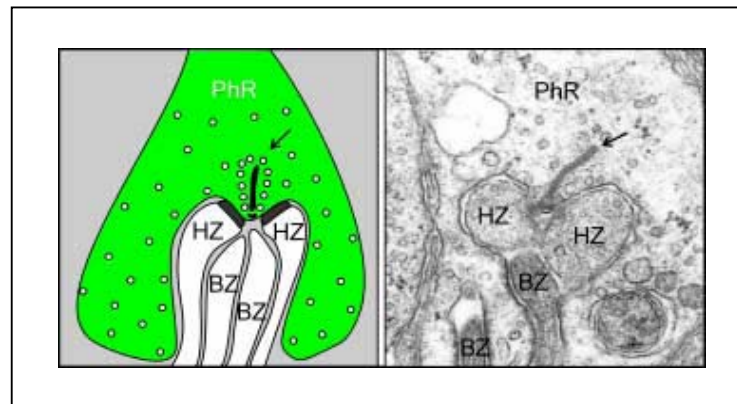


Abbildung 3: Schematische Darstellung und elektronenmikroskopisches Bild einer Ribbonsynapse in der Retina

In der Präsynapse des Photorezeptors (PhR), grün dargestellt, befindet sich ein synaptischer Ribbon (Pfeil), der von einer unbestimmten Zahl synaptischer Vesikel umgeben ist. Hier wird das Signal auf mehrere postsynaptische Neuronen, Horizontalzellen (HZ) und Stäbchen-Bipolarzellen (BZ) übertragen (Dick et al. 2001).

Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass drei verschiedene Vesikel-Populationen an den Ribbonsynapsen für die Exozytose der Vesikel zur Verfügung stehen (von Gersdorff et al. 1996, 2001). Die erste Population besteht aus den Vesikeln, die sich direkt an der aktiven Zone befinden. Diese Vesikel sind zur sofortigen Exozytose bereit und werden demzufolge als „Rapidly

Releasable Pool“ (RRP) bezeichnet. Die zweite Population bilden die Vesikel, die von der aktiven Zone weiter entfernt an den synaptischen Ribbons haften. Diese dienen als Vesikelnachschub für die erste Population und bilden somit den „Reserve Pool“ (RP). Die dritte Population besteht aus der Gesamtheit der Vesikel im Photorezeptor-Terminal und dient als Reservoir der zweiten Population (RP) (von Gersdorff et al. 1998). Während für die Exozytose des RRP nur ein geringer Ca^{2+} -Einstrom (kurze Depolarisation) erforderlich ist, benötigen die Vesikel aus dem RP einen höheren Ca^{2+} -Einstrom (eine länger andauernde Depolarisation) zur Freisetzung ihrer Neurotransmitter.

2.3.1 Präsynaptische Proteine der Ribbonsynapse und der konventionellen chemischen Synapse

Untersuchungen zum strukturellen Aufbau von Ribbonsynapsen zeigen, dass die Vesikel der Ribbonsynapsen und die der konventionellen chemischen Synapsen von gleichen Proteinen gebildet werden (Morgans et al. 1996; Nachman-Clewner et al. 1999). Selbst die Ca^{2+} -Auslösung und der Mechanismus der Vesikelverschmelzung an der postsynaptischen Membran weisen scheinbar keine Unterschiede auf (Schmitz et al. 2000). Dabei koordiniert eine Vielzahl von Proteinen die schnelle und effiziente Übertragung synaptischer Signale an der Präsynapse.

Zu diesen Proteinen, die an der präsynaptischen aktiven Zone lokalisiert sind, zählt man die beiden eng verwandten Zytomatrixproteine Bassoon und Piccolo (tom Dieck et al. 1998; tom Dieck und Gundelfinger 2000; Cases-Langhof et al. 1996; Wang et al. 1999; Fenster et al. 2000; Übersicht, siehe Garner et al. 2000) sowie die Munc 13 Proteine (Brose et al. 2000; Betz et al. 1997; Augustin et al. 1999, 2001) und das RIM-Protein (Wang et al. 1997).

Bassoon und Piccolo sind Multidomänen-Proteine, die durch spezielle Proteinabschnitte mit anderen Proteinen interagieren können (tom Dieck et al. 1998; Wang et al. 1999; Dresbach et al. 2001; Gerber et al. 2001).

Zudem konnte gezeigt werden, dass sie das Grundgerüst der Zytomatrix an der aktiven Zone der Neurotransmitterfreisetzung bilden und an der Koordination der Freisetzungsmechanismen beteiligt sind (Cases-Langhof et al. 1996; tom Dieck et al. 1998; tom Dieck und Gundelfinger 2000).

Beide Proteine sind in der Mehrzahl der konventionellen chemischen Synapsen und Ribbonsynapsen zu finden, wobei Bassoon in den Ribbonsynapsen der Photorezeptoren lokalisiert ist, jedoch nicht in den Ribbonsynapsen der Bipolarzellen (Brandstätter et al. 1999). An den synaptischen Ribbons der Photorezeptoren sind beide Proteine räumlich voneinander getrennt. Bassoon befindet sich dabei an der Basis der Ribbons, am Ort der Vesikelfusion, und Piccolo an der der aktiven Zone abgewandten Seite. Durch diese räumliche Trennung ist eine unterschiedliche Funktion beider Proteine bei der Freisetzung der Neurotransmitter an den Ribbonsynapsen der Photorezeptoren wahrscheinlich. Man vermutet, dass Bassoon die Funktion besitzt, Vesikel zur sofortigen Exozytose bereit zu stellen und Piccolo dagegen für den Vesikelnachschub aus dem Reservepool verantwortlich ist (Dick et al. 2001).

Untersuchungen haben gezeigt, dass gezielt hergestellte Mausmutanten, denen ein Teil des Bassoon-Genes fehlt, Defekte in den Ribbonsynapsen der Retina aufweisen sowie unter starken epileptischen Anfällen leiden (tom Dieck und Gundelfinger 2000; Altmann et al. 2003). Weiterhin haben Altmann et al. (2003) gezeigt, dass Bassoon nicht essentiell für den Aufbau der Synapsen verantwortlich ist, jedoch eine elementare Rolle in der Regulation der Neurotransmitterfreisetzung an den glutamergen Synapsen einnimmt.

Die Munc 13 Proteine werden dagegen als Priming-Faktoren an den Synapsen des Gehirnes beschrieben, deren Fehlen zu einem Verlust der Transmitterfreisetzung an der Präsynapse führt (Betz et al. 1997; Augustin et al. 1999, 2001; Brose et al. 2000). Generell sind diese Munc 13 Proteine keine Bestandteile der Ribbonsynapsen (Schmitz et al. 2001).

Neueste Studien haben jedoch gezeigt, dass das Munc 13-1 Protein, zur Familie der Munc 13 Proteine gehörend, präsynaptisch an den Ribbonsynapsen der Photorezeptoren lokalisiert ist (Altwein 2003).

Ein weiteres Protein, das RIM-Protein, wurde als ein präsynaptisches Protein der aktiven Zone an den konventionellen chemischen Synapsen und an den Ribbonsynapsen nachgewiesen (Wang et al. 1997). Dabei ist das RIM-Protein im gesamten Bereich der Ribbons zu finden (Wang et al. 1997).

Die beschriebenen Proteine sind wichtige Bestandteile sowohl für den Aufbau als auch für die Funktion einer Präsynapse. Sie sind jedoch nicht spezifisch für synaptische Ribbons und stellen auch keine Bestandteile synaptischer Ribbons dar (Schmitz et al. 1996, 2000).

2.3.2 RIBEYE, Hauptbestandteil der synaptischen Ribbons

Um den Aufbau synaptischer Ribbons und somit auch deren Funktion zu charakterisieren, wurden synaptische Ribbons aus der Rinderretina isoliert und gereinigt. Durch SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) konnten zwei Ribbon-spezifische Proteine in der Ribbonfraktion der Retina identifiziert werden (Schmitz et al. 1996).

Ein relativ großes Protein, mit einem Molekulargewicht von 120 kDa, welches den Namen **RIBEYE** erhielt (**RIB** für synaptische Ribbons, und **EYE** für Auge als Ursprungsgewebe) sowie ein weiteres Protein, mit einem Molekulargewicht von 63 kDa, das noch nicht näher identifiziert wurde. Es wird vermutet, dass RIBEYE und das noch unbekannt zweite Protein Hauptbestandteile der synaptischen Ribbons darstellen (Schmitz et al. 2000). Mit der Entdeckung von RIBEYE konnte ein Protein identifiziert werden, das ausschließlich bei Ribbonsynapsen vorkommt und möglicherweise für deren funktionelle Organisation verantwortlich ist (Schmitz et al. 2000).

Anhand weiterer Untersuchungen an Rinder-, Ratten- und humaner Retina konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem 120 kDa Protein um ein Multidomänen-Protein handelt, das aus einer einmalig vorkommenden aminoterminalen A-Domäne (565 AS) und einer carboxyterminalen B-Domäne (420 AS) besteht (Schmitz et al. 2000).

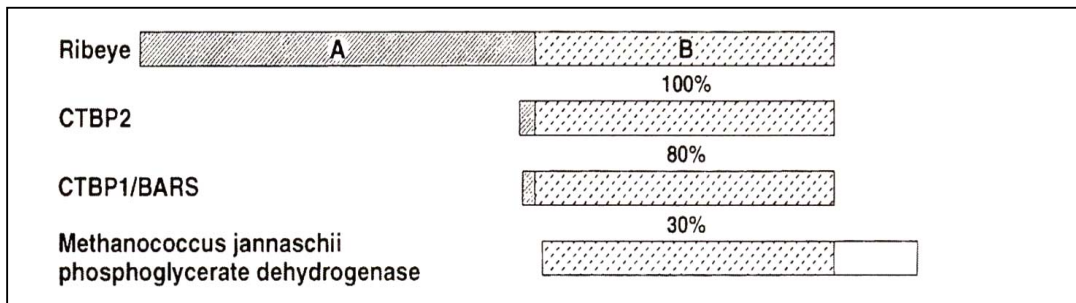


Abbildung 4: Domänenstruktur von RIBEYE

RIBEYE besteht aus einer einmalig vorkommenden A-Domäne und einer B-Domäne, die identisch zu CtBP2 und homolog zur Phosphoglycerat-Dehydrogenase ist (Abb. Schmitz et al. 2000).

Es ist wahrscheinlich, dass die A-Domäne für die Struktur und die Stabilität der synaptischen Ribbons sowie für die Bildung von Aggregaten verantwortlich ist, wohingegen die B-Domäne aufgrund ihrer Lokalisation an der Oberfläche der synaptischen Ribbons eine Rolle bei der Bindung von Vesikeln spielen könnte (Abb.6). Die A-Domäne scheint dabei spezifisch für die synaptischen Ribbons zu sein, da keine Homologien zu anderen Proteinen nachweisbar sind. Im Gegensatz dazu ist die B-Domäne identisch zu dem nukleären Protein CtBP2 (**C**-terminales-**B**indungs-**P**rotein für das Adenovirus E1A-Protein), das gemeinsam mit dem Protein CtBP1 zur Familie der Transkriptionsrepressoren gehört (Abb.4) (Schaeper et al. 1995; Katsanis und Fisher 1998; Poortinga et al. 1998; Turner und Crossley 1998; Zhang und Levine 1999).

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Entstehung des synaptischen Ribbonproteins RIBEYE durch die Verschmelzung einer neuen aminoterminalen Domäne (A-Domäne) und einer bekannten Sequenz, dem CtBP2 (B-Domäne), erfolgte.

Zum einen ist RIBEYE im Gegensatz zu CtBP in der genomischen Sequenz von *Drosophila* nicht nachweisbar (Schmitz et al. 2000). Weiterhin zeigen Experimente mit spezifischen Antikörpern in verschiedenen bovinen Geweben (Retina, Herz, Leber, Gehirn, Niere, Lunge und Milz), dass RIBEYE nur in speziellen Geweben präsent ist, z.B. in der Retina, während das Kernprotein CtBP2 in allen Geweben exprimiert wird. Dabei markierte der spezifisch gegen die A-Domäne gerichtete Antikörper das 120 kDa Protein RIBEYE ausschließlich in der Retina, währenddessen der spezifische Antikörper gegen die B-Domäne ein zusätzliches Protein von 50 kDa (entspricht dem CtBP2) in allen untersuchten Geweben erkannte (Schmitz et al. 2000).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass CtBP2 und RIBEYE von demselben Gen kodiert, aber von unterschiedlichen 5' Promotoren transkribiert werden. Das 5' Exon des CtBP2 verschlüsselt nur die 20 aminoterminalen Aminosäuren, wohingegen das 5' Exon von RIBEYE die vollständige Sequenz der A-Domäne enthält (Abb.5). Zusammen enthalten sie 8 gemeinsame 3' Exons, welche die identische Sequenz der B-Domäne darstellen (Schmitz et al. 2000).

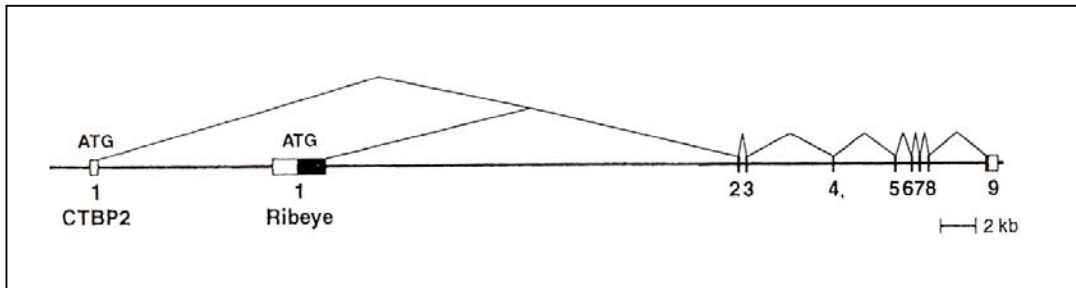


Abbildung 5: Schematische Darstellung des humanen Gens, das RIBEYE und CtBP2 kodiert

Beide Proteine werden von demselben Gen kodiert, aber von unterschiedlichen Promotoren aus transkribiert. RIBEYE und CtBP2 haben aufgrund einzelner 5' Exons einen unterschiedlichen N-Terminus und einen identischen C-Terminus, kodiert von denselben 3' Exons (Exon 2-9, Abb. Schmitz et al. 2000).

Demzufolge entstehen zwei unterschiedliche Transkriptionsprodukte, die für die Synthese von Proteinen mit unterschiedlicher Funktion verantwortlich sind. Vermutlich werden zwei Transkriptionsprodukte von einem Gen kodiert, das zum einen ein Protein für die Transkriptionskontrolle und zum anderen ein Protein für die Exozytose synthetisiert. Hieraus wird ersichtlich, dass RIBEYE durch Fusion einer neuen Sequenz und einer carboxyterminalen Sequenz des schon existierenden transkriptionellen Corepressors CtBP2 entstanden ist. Dabei wird die neue aminoternale Sequenz (A-Domäne von RIBEYE) durch ein neues Exon kodiert. Möglicherweise führt diese Fusion zur Bildung eines neuen Proteins mit neuer synaptischer Funktion (Schmitz et al. 2000).

Ein weiteres Beispiel dafür ist der DNA-Replikationsfaktor Iathea in *Drosophila*. Dieser DNA-Replikationsfaktor der normalerweise ein nukleäres Protein ist, spielt im Gegensatz dazu auch eine wesentliche Rolle in der Synapse (Rohrbough et al. 1999, Nibu et al. 1998, 2003).

Weiterhin weisen die B-Domäne, sowie CtBP1 und CtBP2 eine hohe Bindungsaffinität zu NAD⁺ (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) auf (Schmitz et al. 2000). Vermutlich können sie daher zur Familie der NAD⁺-abhängigen 2-

hydroxyacid-Dehydrogenasen gezählt werden und demzufolge enzymatische Funktionen besitzen. NAD^+ hat nicht nur Bedeutung im Energiestoffwechsel, sondern dient auch als Substrat für einige Enzyme, die die Spaltung zwischen der ADP-Ribose und dem Nikotinamid sowie den Transfer der ADP-Ribosegruppe auf eine Aminosäure katalysieren (Jacobson et al. 1989).

In welcher Weise die enzymatische Funktion der B-Domäne in den Mechanismus der Vesikelbindung und Vesikelfreisetzung involviert ist und welche Rolle die B-Domäne an der Oberfläche der synaptischen Ribbons spielt, ist bislang ungeklärt.

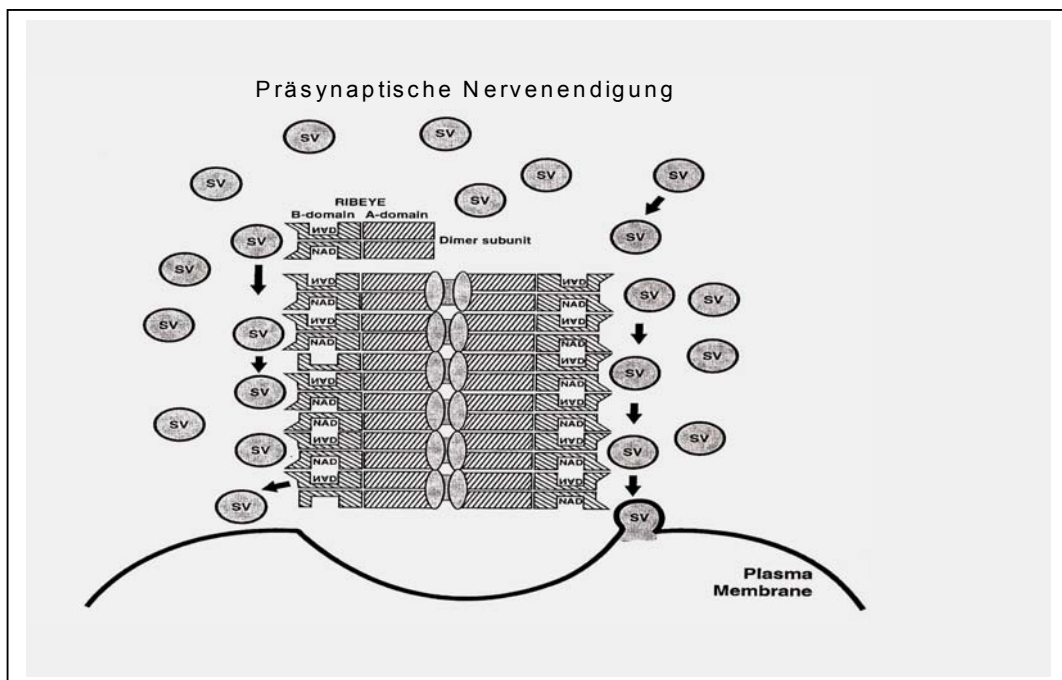


Abbildung 6: Funktionsmodell synaptischer Ribbons in präsynaptischen Nervenendigungen

Das synaptische Ribbonsprotein RIBEYE stellt hier die Hauptproteinkomponente der synaptischen Ribbons dar. Dabei bilden jeweils zwei RIBEYE-Proteine mit ihrer A- und B-Domäne eine Untereinheit, wobei die A-Domäne mit ihrer zentralen Lokalisation vermutlich für den Aufbau der synaptischen Ribbons verantwortlich ist, während die B-Domäne mit der enthaltenen NAD^+ -Bindungsstelle sich an der Oberfläche befindet. Aufgrund dieser Lokalisation lässt sich eine Funktion für die Vesikelanheftung vermuten. Die synaptischen Ribbons scheinen sich aus mehreren dieser Untereinheiten aufzubauen und können somit eine Vielzahl von synaptischen Vesikeln (SV) binden (Schmitz et al. 2000).

2.4 CtIP, putativer Interaktionspartner von RIBEYE

Das nukleäre Protein CtIP wurde erstmalig durch Schaeper et al. (1998) und Fusco et al. (1998) isoliert und charakterisiert. Durch Arbeiten von Fusco et al. (1998) fand man heraus, dass die cDNA von CtIP aus 897 Aminosäuren besteht und zwei Leuzin-Zipper enthält.

Das Wissen über Vorkommen und Aufbau der Leuzin-Zipper in der Aminosäuresequenz von CtIP wies erstmals auf eine DNA-bindende Funktion des nukleären Proteins hin (nach Lewing 1998). CtIP erhielt seinen Namen durch Schaeper et al. (1998), die auf der Suche nach Bindungspartnern für das nukleäre Protein CtBP1 waren.

Der transkriptionelle Corepressor CtBP1 (**C**arboxy-**t**erminales-**B**indungs-**P**rotein des Adenovirus E1A) bindet an die carboxyterminale Region des Adenovirus-Protein E1A. Das Adenovirus E1A stimuliert die Zellteilung und kann zur Ausbildung von Tumoren führen. Interagiert CtBP1 mit E1A wird dagegen die Tumorentstehung unterdrückt. Mittels Yeast-Two-Hybrid-Screens wurde ein CtBP1-Interaktions-Protein nachgewiesen, CtIP (für CtBP1-Interaktions-Protein) (Schaeper et al. 1998). Dabei wird die Interaktion zwischen CtBP1 und CtIP über ein Pentapeptidmotiv PLDLS vermittelt (Schaeper et al. 1998).

Aufgrund der bekannten Interaktion zwischen dem CtBP1 und CtIP bestand die Vermutung, dass auch das synaptische Protein RIBEYE interagieren könnte. Präliminäre Untersuchungen (Diplomarbeit Claudia Allritz), die mit dem Hefe-Zwei-Hybridsystem durchgeführt wurden, deuteten auch auf eine Interaktion zwischen der B-Domäne von RIBEYE und CtIP hin.

2.5 Zielstellung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Bindung von CtIP an das synaptische Ribbonprotein RIBEYE. Es sollte eine mögliche Interaktion von CtIP mit der B-Domäne von RIBEYE überprüft werden. In Vorarbeiten (Diplomarbeit Claudia Allritz) wurde durch Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen das Protein CtIP als möglicher Interaktionspartner von RIBEYE identifiziert.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte diese Interaktion durch ein weiteres unabhängiges Verfahren weiter charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein morphologischer Interaktionsassay etabliert und zur Untersuchung der dargestellten Fragestellung eingesetzt. Zudem sollte versucht werden, mit Hilfe dieses morphologischen Interaktionsassays die Interaktionsstelle zwischen RIBEYE und CtIP zu „kartieren“.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Plasmide

pEGFP NI (Clontech, Palo Alto)

Dieses Plasmid kodiert ein grün-fluoreszierendes Protein, das nach Anregung bei einer Wellenlänge von ca. 480 nm grünes Licht einer Wellenlänge von ca. 509 nm ausstrahlt.

pRE(A)EGFP (Schmitz et al. 2000)

Die cDNA-Sequenz der aminoterminalen A-Domäne von RIBEYE, die eine Aminosäuresequenz von 565 AS einschließt, kloniert in den Vektor pEGFP NI.

pRE(B)EGFP (Schmitz et al. 2000)

Die cDNA-Sequenz der carboxyterminalen B-Domäne von RIBEYE, die eine Aminosäuresequenz von 420 AS einschließt, kloniert in den Vektor pEGFP NI.

pRE(AB)EGFP („full length“) (Schmitz et al. 2000)

Die cDNA des vollständigen RIBEYE-Proteins „full length“, die eine Aminosäuresequenz von 985 AS einschließt, kloniert in den Vektor pEGFP NI.

pCMV-Tag 3c / pCMV-Tag 2c (Clontech)

pCMV-Tag 3c und pCMV-Tag 2c stellen einen eukaryontischen Expressionsvektor ohne ein Insert dar.

pCtIP CMV („full length“) (Yu und Baer 2000)

Die cDNA für das Adapterprotein CtIP „full length“ kloniert in den eukaryontischen Expressionsvektor pCMV. Das Insert kodiert eine Aminosäuresequenz von 897 AS, enthält das Pentapeptid-Motiv PLDLS (putative Bindungssequenz), zwei Leuzin-Zipper, das Flag Epitop sowie die BRCA1- und Rb-Interaktionsdomäne (BRCA1- und Rb-interacting Sequenz von CtIP). Das Plasmid pCtIP CMV ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

pCtIP Flag CMV (Yu und Baer 2000)

Dieses Plasmid entspricht dem pCtIP in den weiteren Kapiteln. Das Plasmid pCtIP FLAG CMV kodiert für ein nahezu vollständiges CtIP Protein; lediglich die ersten 16 Aminosäuren fehlen bei diesem Konstrukt. Das kodierte Protein enthält eine Aminosäuresequenz von 886 AS, sowie das Pentapeptid-Motiv PLDLS (putative Bindungssequenz), zwei Leuzin-Zipper, das Flag Epitop als auch die BRCA1- und Rb-Interaktionsdomäne (BRCA1- und Rb-interacting Sequenz von CtIP). Das Plasmid pCtIP FLAG CMV ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Für die gesamte Versuchsreihe (siehe Ergebnisse 4.1 - 4.4.2.1) wurde das Plasmid pCtIP FLAG CMV verwendet. Die im Vergleich zu CtIP „full length“ fehlenden 16 aminoterminalen AS führten zu keiner Beeinträchtigung bei der Untersuchung der Interaktion zwischen RIBEYE und CtIP im morphologischen Interaktionsassay.

pHIICtIP CMV (Arbeitsgruppe Schmitz)

Dieses Plasmid kodiert die carboxyterminalen 435 Aminosäuren von CtIP. Es enthält das Pentapeptid-Motiv PLDLS (putative Bindungssequenz) und den carboxyterminalen Leuzin-Zipper. Es fehlen die aminoterminalen 462 Aminosäuren, einschließlich der BRCA1- und Rb-Interaktionsdomäne und des aminoterminalen Leuzin-Zippers. Dieses Plasmid wurde mittels entsprechender Primer durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus pCtIP amplifiziert und in pCMV-Tag 3c über die Restriktionsstellen BamH I und Xho I im Leserahmen kloniert. Das Konstrukt ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

p(+)-PLDLSctIP CMV (Arbeitsgruppe Schmitz)

Dieses Plasmid kodiert die carboxyterminalen 408 Aminosäuren von CtIP. Es enthält das Pentapeptid-Motiv PLDLS (putative Bindungssequenz) und den carboxyterminalen Leuzin-Zipper. Es fehlen die aminoterminalen 489 Aminosäuren, einschließlich der BRCA1- und Rb-Interaktionsdomäne und des aminoterminalen Leuzin-Zippers. Dieses Plasmid wurde mittels entsprechender Primer durch PCR aus pCtIP amplifiziert und in pCMV-Tag 3c über die Restriktionsstellen BamH I und Xho I im Leserahmen kloniert. Das Konstrukt ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

p(--)-PLDLSCtIP CMV (Arbeitsgruppe Schmitz)

Dieses Plasmid kodiert die carboxyterminalen 401 Aminosäuren von CtIP. Es fehlt das Pentapeptid-Motiv PLDLS (putative Bindungssequenz) sowie zwei weitere sich unmittelbar anschließende Aminosäuren (**Aspartat, Arginin**). Weiterhin fehlen die aminoterminalen 496 Aminosäuren, einschließlich der BRCA1- und Rb-Interaktionsdomäne und des aminoterminalen Leuzin-Zippers. Dieses Plasmid wurde mittels entsprechender Primer durch PCR aus pCtIP amplifiziert und in pCMV-Tag 3c über die Restriktionsstellen BamH I und Xho I im Leserahmen kloniert. Das Konstrukt ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt.

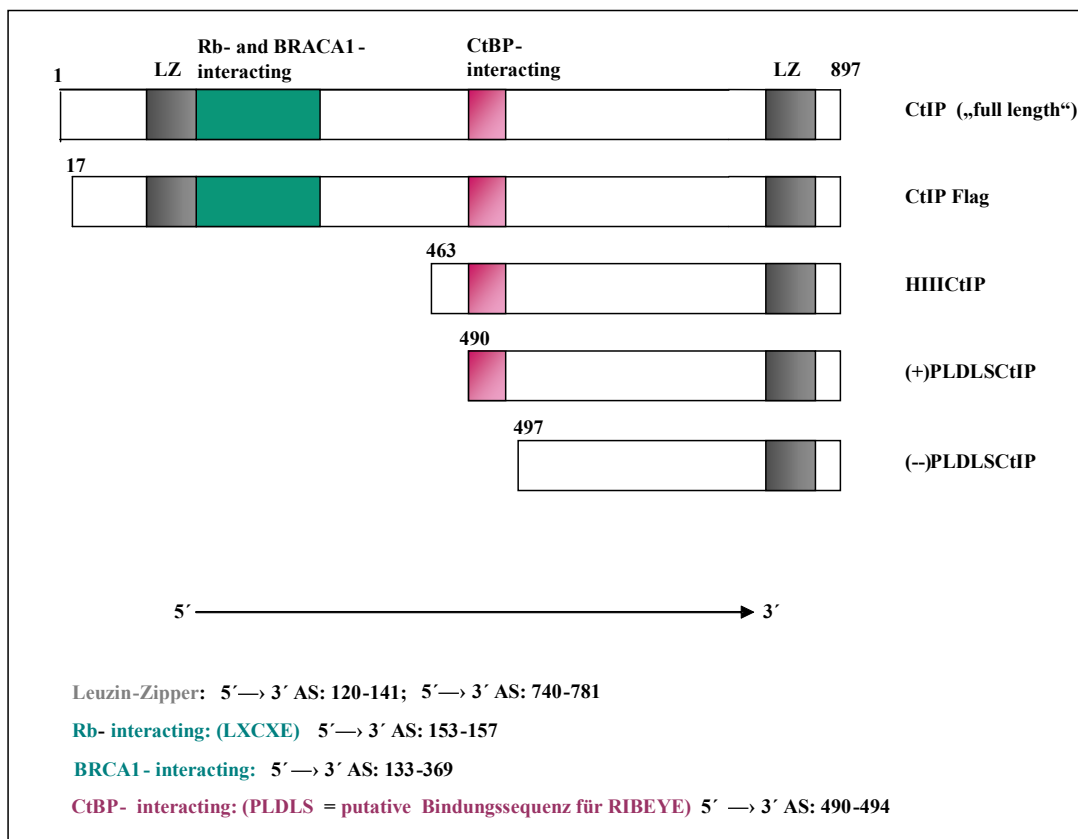


Abbildung 7: Schematische Domänenstruktur von CtIP

3.1.2 COS-Zellen

COS-Zellen sind Fibroblasten, die ein Standardmodell darstellen, um Proteinexpression in eukaryontischen Zellen zu untersuchen (Ichtchenko et al. 1995).

3.2 Verwendete Lösungen

Für die Durchführung der Versuche wurden Feinchemikalien in p.A.-Qualität von der Firma Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

3.2.1 Lösungen zur Transfektion

Tabelle 1: Lösungen zur Transfektion

2 x <u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (TBS)	43 µl H ₂ O 2000 µl 1 M TRIS 450 µl 200 mM Na ₂ HPO ₄ 2800 µl 5 M NaCl 300 µl 1 M KCl 50 µl 1 M MgCl ₂ 100 µl CaCl ₂ in 1300 µl H ₂ O gelöst (Sigma, Deisenhofen)
DEAE-Dextran	500 mg DEAE-Dextran in 100 ml H ₂ O, steril filtriert (Sigma, Deisenhofen)
20 % Glycerol	20 ml Glycerol mit 80 ml DMEM steril (Carl Roth, Karlsruhe)
1 M TRIS-HCl (M _R = 157,60 g/mol)	60,57 g in 500 ml H ₂ O = 1 M
200 mM Na ₂ HPO ₄ (M _R = 142,00 g/mol)	14,196 g in 100 ml H ₂ O = 1 M 2,84 g in 100 ml H ₂ O = 200 mM
5 M NaCl (M _R = 58,44 g/mol)	29,22 g in 500 ml H ₂ O = 1 M 146,10 g in 500 ml H ₂ O = 5 M
1 M KCl (M _R = 74,55 g/mol)	7,456 g in 100 ml H ₂ O = 1 M
1 M MgCl ₂ (M _R = 95,21 g/mol)	20,33 g in 100 ml H ₂ O = 1 M
1 M CaCl ₂ (M _R = 110,99 g/mol)	11,099 g in 100 ml H ₂ O = 1 M Alle Lösungen wurden steril filtriert.

Chloroquin-Lösung	5,2 mg Chloroquin in 1 ml H ₂ O steril filtriert (10 mM = 100 x Lösung)
Medium	DMEM + 10 % FCS (Invitrogen)
2 % Paraformaldehyd (PFA)	2 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS steril

3.2.2 Lösungen zur Immunfluoreszenz

Tabelle 2: Lösungen zur Immunfluoreszenz

<u>P</u>hosphate-<u>b</u>uffered <u>s</u>aline (PBS)	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, 40 g NaCl 7,2 g Na ₂ HPO ₄ 1 g KCl, 1,2 g KH ₂ PO ₄ auf 1 l A. dest. 1:5 Verdünnung entspricht der Arbeitslösung, isotonisch
Triton X-100 0,1 % Triton X-100/PBS	0,1 g Triton in 100 ml PBS
<u>N</u>-<u>p</u>ropyl-<u>g</u>allat (NPG) in 60 % Glycerol/PBS	Radikalfänger, bindet O ₂ -Radikale, (Sigma, Deisenhofen)
<u>N</u>ormal <u>G</u>oat <u>S</u>erum (NGS) 0,5 % BSA in 0,1 % Triton X-100/PBS	normales Ziegenserum (Sigma, Deisenhofen)
<u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumine (BSA) 10 % NGS in 0,1 % Triton X-100/PBS	Rinderserum-Albumin, (Frankfurt am Main), New England Bio Labs®Inc.,
Gelatine 0,2 % Gelatine in 0,1 % Triton X-100/PBS	(Sigma, Deisenhofen)

3.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Nachweis	Primärantikörper (Verdünnung und Herkunft)	Sekundärantikörper (Verdünnung und Herkunft)
Zellkern	α -Histon Maus, Verdünnung 1:250 (Quelle: Signal Trans- duction)	GAM-Cy3, Goat-Anti-Mouse gekoppelt mit Cy3, Verdünnung 1:800 (Rockland, USA)
CtIP in folgenden Plasmiden: * pCtIP pRE(B)EGFP + pCtIP pRE(AB)EGFP + pCtIP	Flag M2 monoklonal gegen das Flag- Epitop gerichtet, Verdünnung 1:250 (Sigma, Deisenhofen)	GAM-Cy3, Goat-Anti-Mouse gekoppelt mit Cy3, Verdünnung 1:800 (Rockland, USA)
CtIP in folgenden Plasmiden: ** pHIICtIP pHIICtIP + pRE(B)EGFP p(+)-PLDLSCtIP p(+)-PLDLSCtIP + pRE(B)EGFP p(-)-PLDLSCtIP p(-)-PLDLSCtIP + pRE(B)EGFP	myc mono, Verdünnung 1:100 (Sigma, Deisenhofen)	GAM-Cy3, Goat-Anti-Mouse gekoppelt mit Cy3, Verdünnung 1:800 (Rockland, USA)

* Plasmide, die für Flag-markierte Fusionsproteine kodieren
(pCMV-Tag 2c, siehe 3.1.1.)

** Plasmide, die für myc-markierte Fusionsproteine kodieren
(pCMV-Tag 3c, siehe 3.1.1.)

3.4 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Schüttler KM 2	Bühler, Tübingen
Durchlichtmikroskop Axioplan 2 mit Epifluoreszenz	Zeiss, Jena
Kamera Hamamatsu color chilled 3CCD (KAMERA C5810)	Hamamatsu, Herrsching am Ammersee

3.5 Software

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Hersteller
Image Access	Imagic, Glattbrugg
Adobe Photoshop 5.0	Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA

3.6 Methoden

3.6.1 Transfektion

3.6.1.1 Allgemeine Bemerkungen zur gewählten Transfektionsmethode

Die angewandte Transfektionsmethode ist die transiente Transfektion mit DEAE-Dextran (Ichtchenko et al. 1995). Das Polykation DEAE-Dextran bildet mit der polyanionischen DNA Komplexe aus, die mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen werden.

Aus den Endosomen werden die DNA-DEAE-Dextran-Komplexe durch im Einzelnen noch unbekannt Mechanismen in das Zytosol und nachfolgend in den Zellkern freigesetzt (Rüger 1997).

Die von Ichtchenko et al. (1995) beschriebene Transfektionsmethode ist eine effiziente, optimierte Transfektionsmethode. Durch Inhibierung des lysosomalen Abbaus der DNA kann die Effizienz der Transfektionsmethode gesteigert werden. Im Inneren der Lysosomen liegt der pH-Wert bei etwa 5, wobei das pH-Optimum der sauren Hydrolasen (hydrolytische Enzyme) zwischen 4 und 6 liegt (Sinowatz 2000). Durch den Einsatz von Chloroquin kommt es zur pH-Werterhöhung in den Lysosomen, die wahrscheinlich eine Freisetzung der DNA in das Zytosol erleichtert (Ichtchenko et al. 1995) und somit die Transfektionseffizienz erhöht (Luthman et al. 1983).

3.6.1.2 Durchführung der Transfektion

Die COS-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und in Petrischalen mit 3 ml Medium bei 37 °C inkubiert. Bei ausreichender Zelldichte erfolgten am zweiten Tag das Absaugen des Mediums und das Spülen der Deckgläschen mit 3 ml PBS. Anschließend wurden die Zellen mit der vorbereiteten DNA-Lösung versetzt.

Herstellung der DNA-Lösung:

1650 µl 2x TBS

1254 µl steriles Wasser

330 µl DEAE-Dextran

10 µl Plasmid

Nach einer Inkubation im Brutschrank für 30 Minuten bei 37 °C wurde die Lösung abgesaugt, mit 3 ml Medium und 30 µl Chloroquin-Lösung versetzt und für 3 Stunden im Brutschrank bei 37 °C belassen. Nach dem Absaugen des Mediums und dem Spülen mit 3 ml sterilem PBS, wurden 3 ml 20 % Glycerol in DMEM zugesetzt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein erneutes Absaugen, Spülen mit 3 ml sterilem PBS und Zusatz von 3 ml Medium. Diese Ansätze inkubierten für 42 Stunden im Brutschrank bei 37 °C.

Die transfizierten COS-Zellen wurden mit 2 %-igem Paraformaldehyd für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt.

3.6.2 Immunfluoreszenz

3.6.2.1 Allgemeine Bemerkungen zur Immunfluoreszenz

Der Nachweis von Antigenen kann auf direktem oder auf indirektem Wege erfolgen. Bei der direkten Immunfluoreszenz bindet ein antigen-spezifischer Antikörper (Primärantikörper) an das entsprechende Antigen. Dieser Antikörper ist mit einem Markermolekül (Enzyme oder fluoreszierende Farbstoffe) versehen, das diesen Antigen-Antikörper-Komplex markiert. Im Gegensatz dazu ist bei der indirekten Immunfluoreszenz das Markermolekül nicht an den Primärantikörper (1. AK), sondern an einen gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper gebunden. Dieser identifiziert den Antigen-Primärantikörper-Komplex.

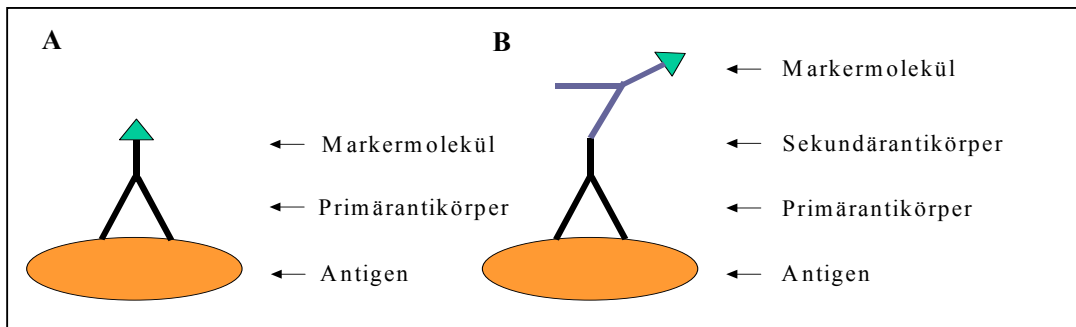


Abbildung 8: Schematische Darstellung der direkten und indirekten Immunfluoreszenz

Bild A: Direkte Immunfluoreszenz: Der Primärantikörper ist mit dem Markermolekül gekoppelt und bindet spezifisch an das Antigen. **Bild B: Indirekte Immunfluoreszenz:** Der Primärantikörper (antigen-spezifisch) bindet an das Antigen. Der Sekundärantikörper, der mit dem Markermolekül verbunden ist, bindet spezifisch an den Primärantikörper.

Aufgrund der mit der Kopplung des Markermoleküls an den Primärantikörper häufig einhergehenden Beeinträchtigung der Funktion des Antikörpers, wird die indirekte Immunfluoreszenz der direkten Immunfluoreszenz vorgezogen. Außerdem erfolgt eine Verstärkung der Fluoreszenz durch Bindung mehrerer Sekundärantikörper an den entsprechenden Primärantikörper.

3.6.2.2 Durchführung und Auswertung der Immunfluoreszenz

Nach der Transfektion und der Fixation der COS-Zellen erfolgte die indirekte Immunmarkierung. Nach dem Waschen der fixierten Zellen mit PBS wurden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100/PBS versetzt, um die Plasmamembran zu permeabilisieren, so dass die Antikörperdiffusion in die Zellen gewährleistet wird. Die Inkubation mit 0,1 % Triton X-100/PBS (Tab.2) erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Permeabilisierung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper.

Bei den Blockierungskontrollen wurde vor der Zugabe des Primärantikörpers eine 30 bis 45 minütige Vorinkubation mit den jeweiligen Blockierungsreagenzien (0,5 % BSA, 0,2 % Gelatine und 10 % NGS) durchgeführt. Der Primärantikörper wurde in der Regel in einer Verdünnung von 1:250 in 0,1 % Triton X-100/PBS eingesetzt (Tab.3), in einem Volumen von 30 µl pro Deckglas aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur, oder bei 4 °C über Nacht, in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Feuchtkammer wurde ausreichend mit destilliertem H₂O benetzt, um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern. Nach erfolgter Inkubation wurden die Deckgläser 3x mit 0,1 % Triton X-100/PBS und 1x mit PBS für je 5 Minuten gewaschen, um die ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:800 in PBS aufpipettiert (Tab.3) und für eine Stunde in der Feuchtkammer inkubiert. Um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen, wurden die Deckgläschen erneut gewaschen (4x mit PBS für je 5 Minuten) und anschließend mit 20 µl NPG auf die Objektträger fixiert.

Die so hergestellten Präparate wurden bis zur mikroskopischen Untersuchung und digitalen Dokumentation bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.6.3 Mikroskopische Analyse

Zur Analyse der Zellverteilung in den fluoreszierenden Präparaten wurde das Durchlichtmikroskop Axioplan 2 mit Epifluoreszenz (mit entsprechenden Filtersätzen, Zeiss, Jena) verwendet.

Die Aufnahme und Digitalisierung der Fluoreszenzbilder in den entsprechenden Grün-, Rot- und Mischkanälen erfolgte durch die Kamera Hamamatsu color chilled 3CCD (KAMERA C5810) und anhand des Image Access Programms. Nach erfolgter fluoreszenzmikroskopischer Auswertung der Bilddokumentationen wurden diese mit Photoshop 5.0 in Helligkeit und Kontrast optimiert sowie mit Power Point in eine entsprechende Präsentationsform gebracht.

4. Ergebnisse

4.1 Kontrollen

4.1.1 Negativkontrollen

Um unspezifische Reaktionen des Sekundärantikörpers mit bestimmten Strukturen des Präparates auszuschließen, wurden als Negativkontrollen Inkubationen ohne Primärantikörper bei ansonsten gleichem Verfahren (Inkubation mit dem Sekundärantikörper) durchgeführt. Diese Negativkontrollen ergaben keine Immunfluoreszenz, so dass unspezifische Markierungen ausgeschlossen werden konnten. Als weiteres wurden Scheintransfektionen mit COS-Zellen (ohne Plasmid) hergestellt und mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Auch diese Präparate zeigten kein Fluoreszenzsignal, so dass unspezifische Reaktionen mit Primär- und Sekundärantikörper ausgeschlossen werden konnten.

4.1.2 Immunfluoreszenzkontrolle des EGFP

Bei diesem Versuch wurde der Vektor pEGFP NI (Kontrollplasmid ohne Insert) in COS-Zellen transfiziert und direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die Dokumentation zeigt eine zytosolische Verteilung für das grün-fluoreszierende Protein EGFP in COS-Zellen, welche als Grundlage für die folgenden Versuchsreihen dient.

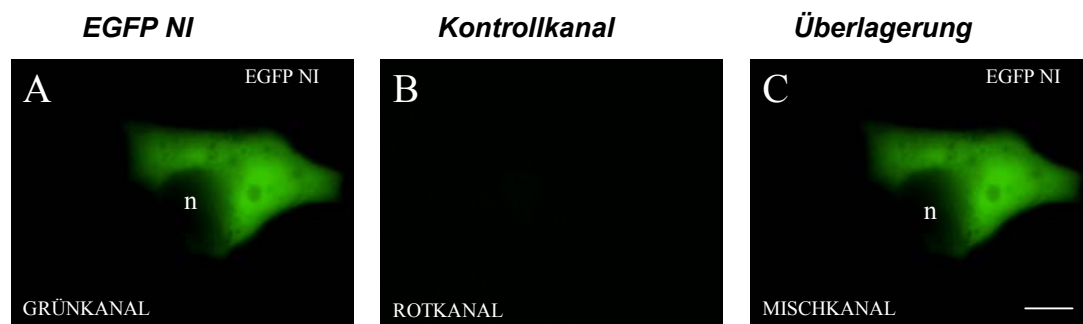


Abbildung 9: Zellverteilung von EGFP in transfizierten COS-Zellen

Bild A: Diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild B:** Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild C:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 μ m.

4.1.3 Blockierungskontrollen

Zur Minimierung unspezifischer Bindungen an den Zellstrukturen wurden die Zellen mit verschiedenen Blockierungsreagenzien behandelt. Zu diesem Zweck wurden die Blockierungsreagenzien BSA (Rinderserum-Albumin), Gelatine und NGS (normales Ziegen Serum) (Tab.2) verwendet.

Die Resultate zeigen, dass die mit den Blockierungsstoffen behandelten CtIP-Präparate im Vergleich zu den CtIP-Präparaten ohne Blockierungsstoffe keine Unterschiede im Signal aufweisen. Ein signifikantes Hintergrundsignal wurde bei diesen Präparaten nicht beobachtet. Demnach kann eine negative Beeinflussung durch die genannten Blockierungsstoffe für die gesamte Versuchsreihe ausgeschlossen werden.

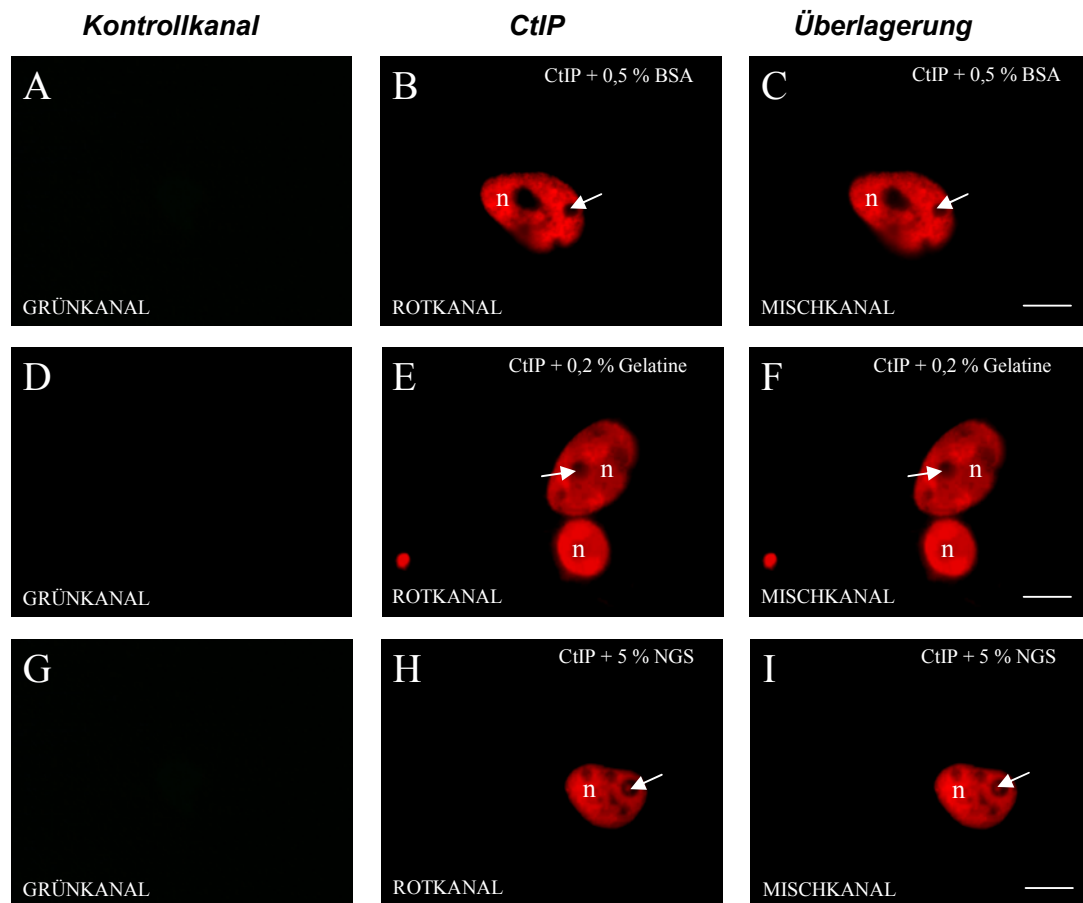


Abbildung 10: Zellverteilung von CtIP mit den jeweiligen Blockierungsreagenzien: BSA, Gelatine und NGS in transfizierten COS-Zellen

Bild A, D und G: Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild B, E und H:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die den Zellkern darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. **Bild C, F und I:** Stellt die Überlagerung von Bild A und B, D und E sowie der Bilder G und H dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 µm.

4.2 Verteilung von RIBEYE in transfizierten COS-Zellen

Die folgenden Abbildungen in den Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.3 zeigen die Lokalisation der RIBEYE-Konstrukte (RE(B), RE(A) und RE(AB)) in einzeln transfizierten COS-Zellen, die in den Vektor pEGFP kloniert wurden und dadurch im Fluoreszenzmikroskop als grün-fluoreszierende Strukturen sichtbar sind. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen mittels anti-Histonantikörper immunmarkiert und durch GAM-Cy3 visualisiert (Abb.12, 14 und 16). Die Zellkerne sind als rot-fluoreszierende Strukturen im Fluoreszenzmikroskop erkennbar.

4.2.1 Verteilungsmuster der B-Domäne von RIBEYE

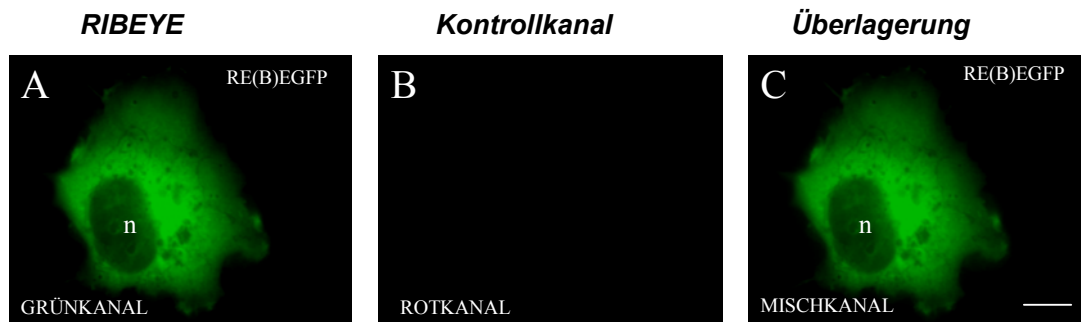


Abbildung 11: COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP (ET)

Bild A: Diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild B:** Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild C:** Stellt die Überlagerung von Bild A und B dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 μ m.

Abbildung 11 zeigt das Verteilungsmuster der B-Domäne von RIBEYE. Deutlich erkennbar ist eine diffus zytosolische Verteilung der B-Domäne aufgrund der grün-fluoreszierenden Strukturen im Grün- und Mischkanal (Bild A und C). Im Bereich der Zellkerne (Bild A und C) sowie im Rotkanal (Kontrollkanal, Bild B) sind fluoreszierende Strukturen nicht erkennbar.

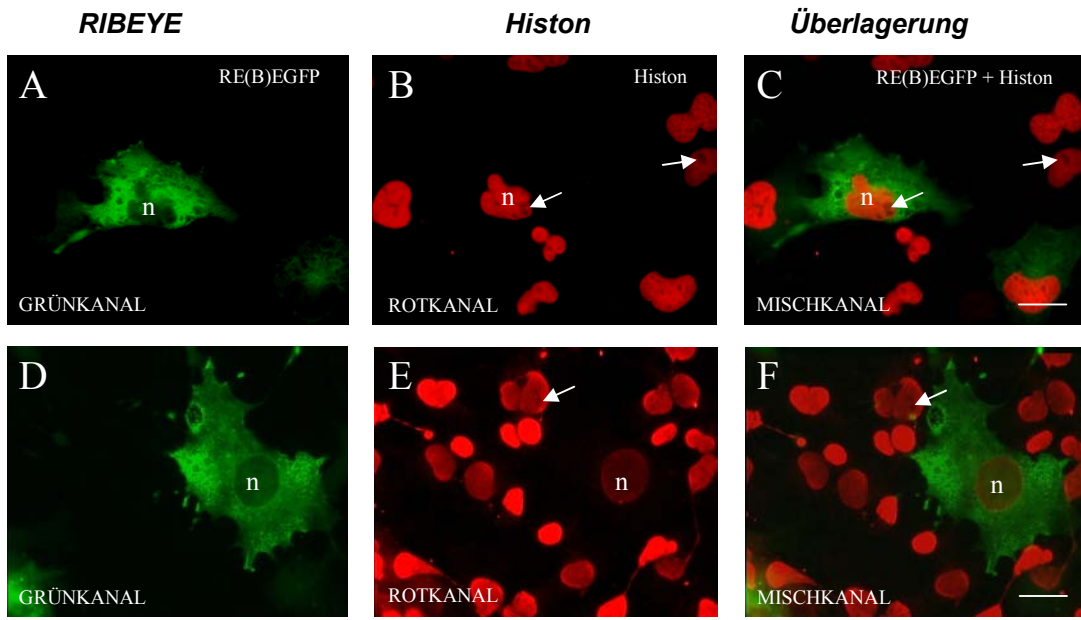


Abbildung 12: COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP (ET) und immunmarkiert mit anti-Histonantikörper

Bild A und D: Diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild B und E:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. **Bild C und F:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B sowie der Bilder D und E dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 4 µm.

In Abbildung 12 (Bild A, C, D und F) wird die diffus grün-fluoreszierende, zytosolische Verteilung der B-Domäne von RIBEYE deutlich. Durch die Immunmarkierung mit anti-Histonantikörper sind im Bereich der Zellkerne rot-fluoreszierende Strukturen im Rotkanal (Bild B und E) sowie im Mischkanal (Bild C und F) erkennbar. Eine nukleäre Verteilung der B-Domäne von RIBEYE kann aufgrund dieser Immunmarkierung ausgeschlossen werden.

4.2.2 Verteilungsmuster der A-Domäne von RIBEYE

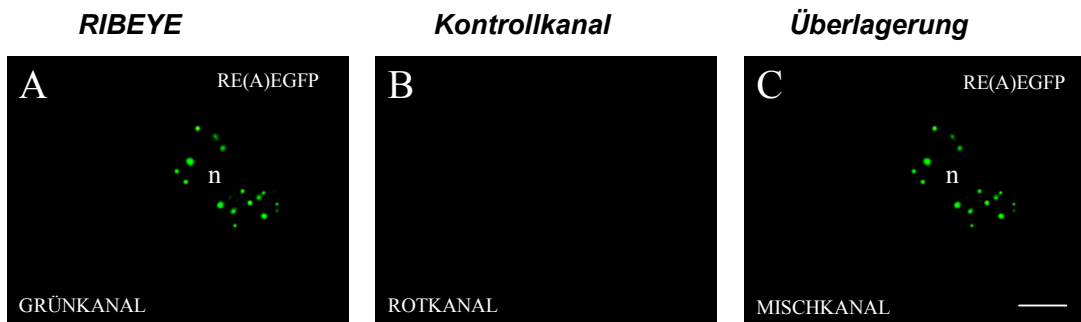


Abbildung 13: COS-Zellen transfiziert mit pRE(A)EGFP (ET)

Bild A: Es sind globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen erkennbar, die fluoreszenzfreie Areale einschließen. **Bild B:** Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild C:** Stellt die Überlagerung von Bild A und B dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 µm.

Die Abbildung 13 zeigt das Verteilungsmuster der A-Domäne von RIBEYE. Deutlich erkennbar ist auch hier eine zytosolische Verteilung, im Gegensatz zur B-Domäne zeigen sich im Grün- und Mischkanal (Bild A und C) distinkte, globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen. Im Bereich der Zellkerne (Bild A und C) sowie im Rotkanal (Kontrollkanal, Bild B) sind fluoreszierende Strukturen nicht erkennbar.

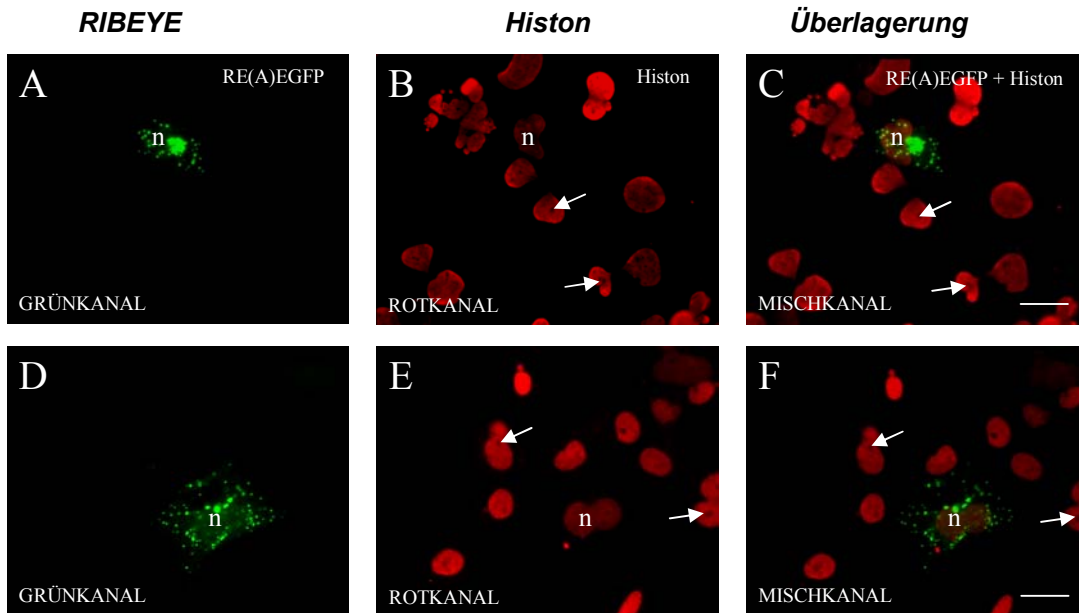


Abbildung 14: COS-Zellen transfiziert mit pRE(A)EGFP (ET) und immunmarkiert mit anti-Histonantikörper

Bild A und D: Globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen, die fluoreszenzfreie Areale einschließen. **Bild B und E:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. **Bild C und F:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B sowie der Bilder D und E dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 4 μ m.

Anhand der Abbildung 14 (Bild A, C, D und F) wird die globuläre, grün-fluoreszierende, zytosolische Verteilung der A-Domäne von RIBEYE deutlich. Durch die Immunmarkierung mit anti-Histonantikörper sind im Bereich der Zellkerne rot-fluoreszierende Strukturen im Rotkanal (Bild B und E) sowie im Mischkanal (Bild C und F) erkennbar. Eine nukleäre Verteilung der A-Domäne von RIBEYE kann aufgrund dieser Immunmarkierung ausgeschlossen werden.

4.2.3 Verteilungsmuster der AB-Domäne von RIBEYE

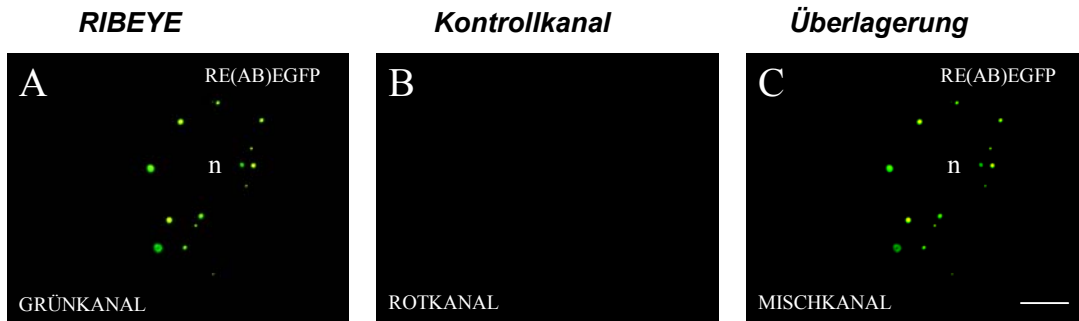


Abbildung 15: COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP (ET)

Bild A: Es sind globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen erkennbar, die fluoreszenzfreie Areale einschließen. **Bild B:** Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild C:** Stellt die Überlagerung von Bild A und B dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 μm .

Die Abbildung 15 zeigt das Verteilungsmuster der AB-Domäne „full length“ von RIBEYE. Deutlich erkennbar ist auch hier eine zytosolische Verteilung, im Gegensatz zur B-Domäne zeigen sich im Grün- und Mischkanal (Bild A und C) distinkte, globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen. Im Bereich der Zellkerne (Bild A und C) sowie im Rotkanal (Kontrollkanal, Bild B) sind fluoreszierende Strukturen nicht erkennbar.

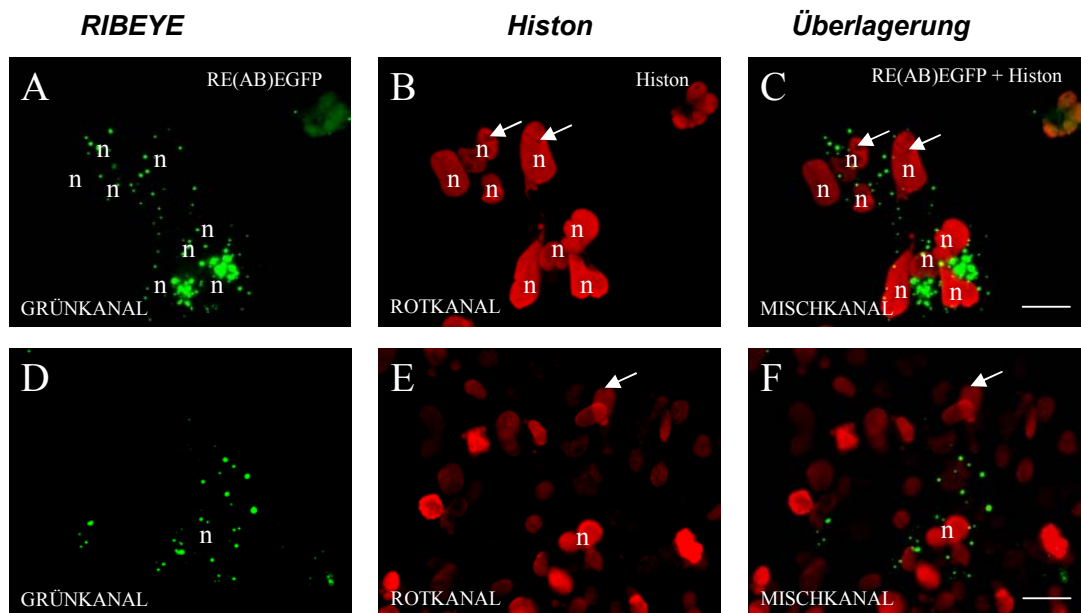


Abbildung 16: COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP (ET) und immunmarkiert mit anti-Histonantikörper

Bild A und D: Globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen, die fluoreszenzfreie Areale einschließen. **Bild B und E:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. Teilweise Überlagerung der Zellkerne aufgrund hoher Zelldichte des Präparates. **Bilder C und F:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B sowie der Bilder D und E dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 4 μm .

Anhand der Abbildung 16 (Bild A, C, D und F) wird die globuläre, grün-fluoreszierende, zytosolische Verteilung der AB-Domäne von RIBEYE deutlich. Durch die Immunmarkierung mit anti-Histonantikörper sind im Bereich der Zellkerne rot-fluoreszierende Strukturen im Rotkanal (Bild B und E) sowie im Mischkanal (Bild C und F) erkennbar. Eine nukleäre Verteilung der AB-Domäne von RIBEYE kann aufgrund dieser Immunmarkierung ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der Kapitel 4.2.1 bis 4.2.3 zeigen eine zytosolische Verteilung der einzelnen RIBEYE-Konstrukte in einzeln transfizierten COS-Zellen und bestätigen gleichzeitig die Ergebnisse von Schmitz et al. (2000), die RIBEYE als ein zytosolisches Protein darstellten.

Der Unterschied zwischen den RIBEYE-Konstrukten zeigt sich lediglich in der Art der Verteilung im Zytosol, bei der sich die B-Domäne diffus (Abb.11 und 12) und die A-Domäne (Abb.13 und 14) sowie die AB-Domäne („full length“, Abb. 15 und 16) distinkt, globulär verteilen.

4.3 Verteilung von CtIP in transfizierten COS-Zellen

Für die Darstellung der Lokalisation des Proteins CtIP in einzeln transfizierten COS-Zellen wurden die Zellen mit dem monoklonalen Flag M2 Antikörper immunmarkiert und mittels GAM-Cy3 visualisiert. Im Fluoreszenzmikroskop sind diese als rot-fluoreszierende Strukturen erkennbar.

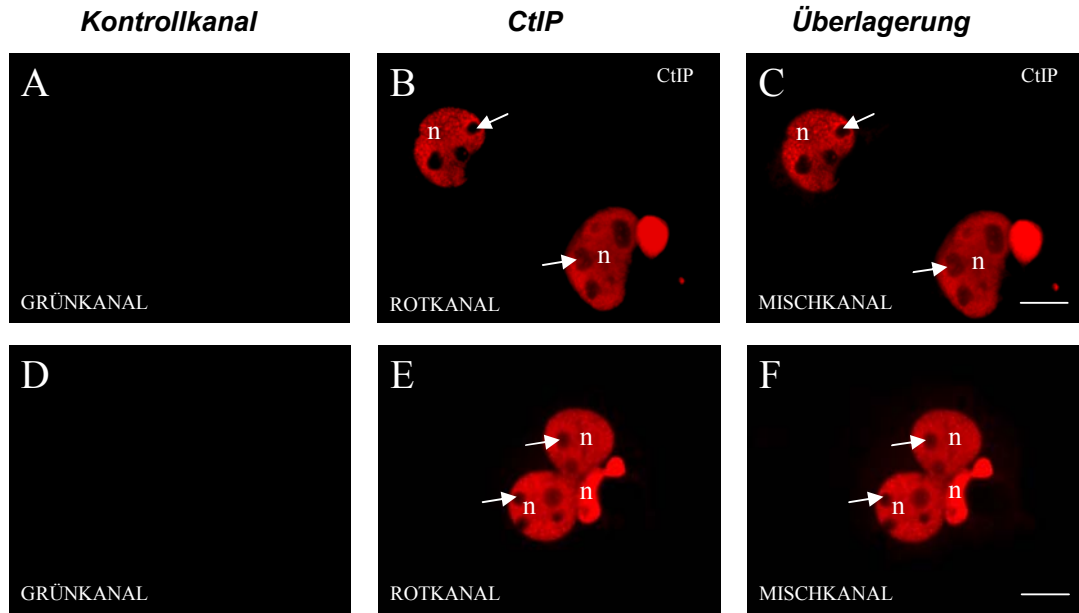


Abbildung 17: COS-Zellen transfiziert mit pCtIP (ET)

Bild A und D: Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild B und E:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. **Bilder C und F:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B sowie der Bilder D und E dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 μm .

Die Abbildung 17 zeigt für das Protein CtIP in einzeln transfizierten COS-Zellen ein nukleäres Verteilungsmuster, das aufgrund der rot-fluoreszierenden, gut abgrenzbaren Strukturen (Bild B, C, E und F) deutlich erkennbar ist. Im Grünkanal (Kontrollkanal, Bild A und D) sind fluoreszierende Strukturen nicht erkennbar. Mit diesem Versuch wurden die Ergebnisse von Yu und Baer (2000) bestätigt, die CtIP als ein Kernprotein identifizierten.

4.4 Umverteilung von CtIP in RIBEYE-transfizierten COS-Zellen

Für die morphologische Untersuchung der putativen Interaktion von CtIP mit der B-Domäne von RIBEYE wurden RE(B) und RE(AB) mit CtIP in COS-Zellen doppelt transfiziert. Die Zellen wurden mittels monoklonalem Flag M2 Antikörper immunmarkiert und mit GAM-Cy3 visualisiert. Im Fluoreszenzmikroskop erscheint das Protein CtIP durch die Immunmarkierung rot-fluoreszierend und die B-Domäne sowie die AB-Domäne „full length“ von RIBEYE erscheinen durch die Klonierung in den pEGFP Vektor grün-fluoreszierend.

4.4.1 Retention von CtIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und pCtIP

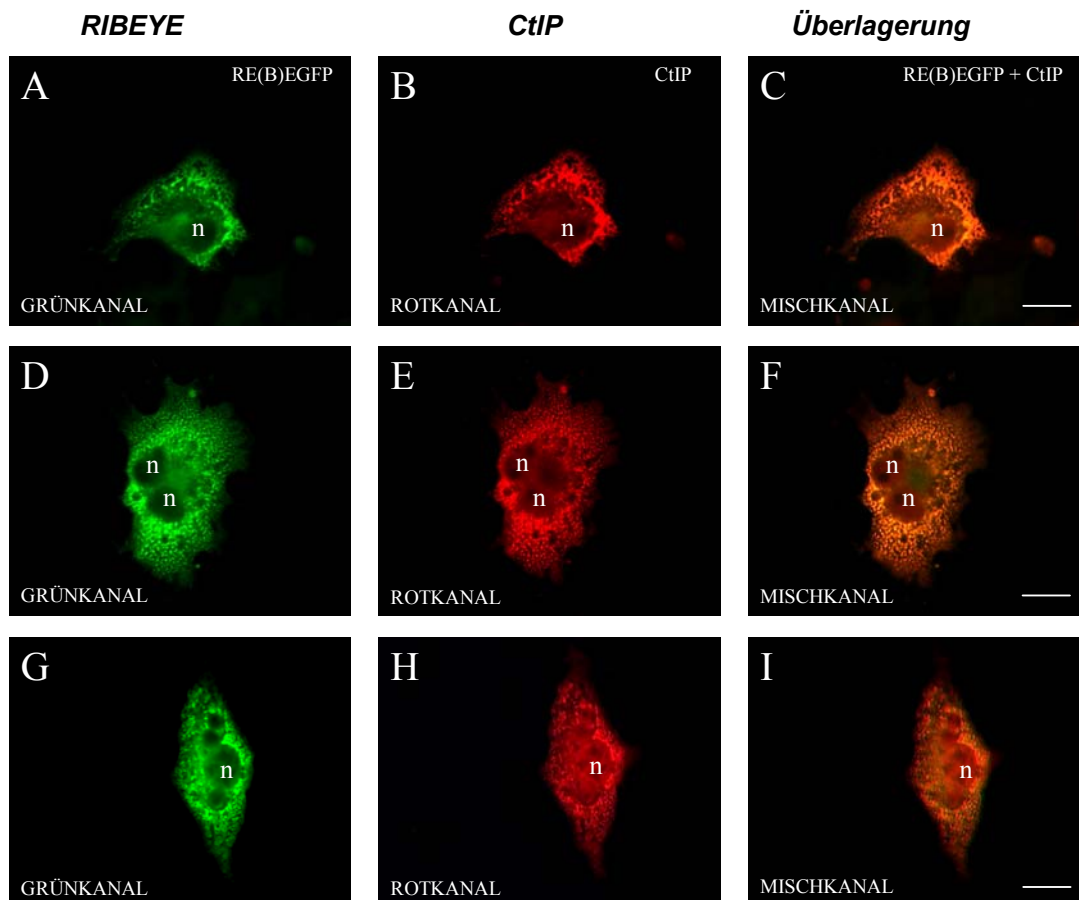


Abbildung 18: COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP und pCtIP (DT)

Bild A, D und G: Diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild B, E und H:** Zeigt die zelluläre Verteilung des CtIP, das hauptsächlich im Zytosol, sowie teilweise im Zellkern lokalisiert ist. Granuläre, rotmarkierte Fluoreszenz im Zytosol sowie diffus, rot markierte Immunreaktion im Zellkern. **Bild C, F und I:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B, D und E sowie der Bilder G und H dar. Deutlich sichtbar ist die Retention des CtIP im Zytosol durch „Co“-Lokalisation zwischen CtIP und der B-Domäne von RIBEYE, die sich als zytosolische, granuläre, gelb-fluoreszierende Bereiche darstellen. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet. Skalierungsbalken: 4 µm.

In Abbildung 18 wird aufgrund der rot-fluoreszierenden Strukturen im Rotkanal (Bild B, E und H) eine Umverteilung von CtIP in das Zytosol deutlich. Die Lokalisation der B-Domäne von RIBEYE bleibt dagegen unbeeinflusst. Dies wird durch die diffus grün-fluoreszierenden Strukturen im Grünkanal (Bild A, D und G), die auf das Zytosol begrenzt sind, ersichtlich. Im Mischkanal (Bild C, F und I) ist eine gelbe Fluoreszenz im Zytosol durch die „Co“-Lokalisation zwischen CtIP und der B-Domäne von RIBEYE deutlich erkennbar. Die sich aufgrund der Retention von CtIP im Zytosol durch RIBEYE ergibt.

Dieses Resultat zeigt, dass eine Interaktion zwischen CtIP und der B-Domäne von RIBEYE erfolgt.

4.4.1.1 Gesamtübersicht: Retentionsmuster von CtIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und pCtIP und Verteilungsmuster von einzeln transfiziertem pCtIP und pRE(B)EGFP

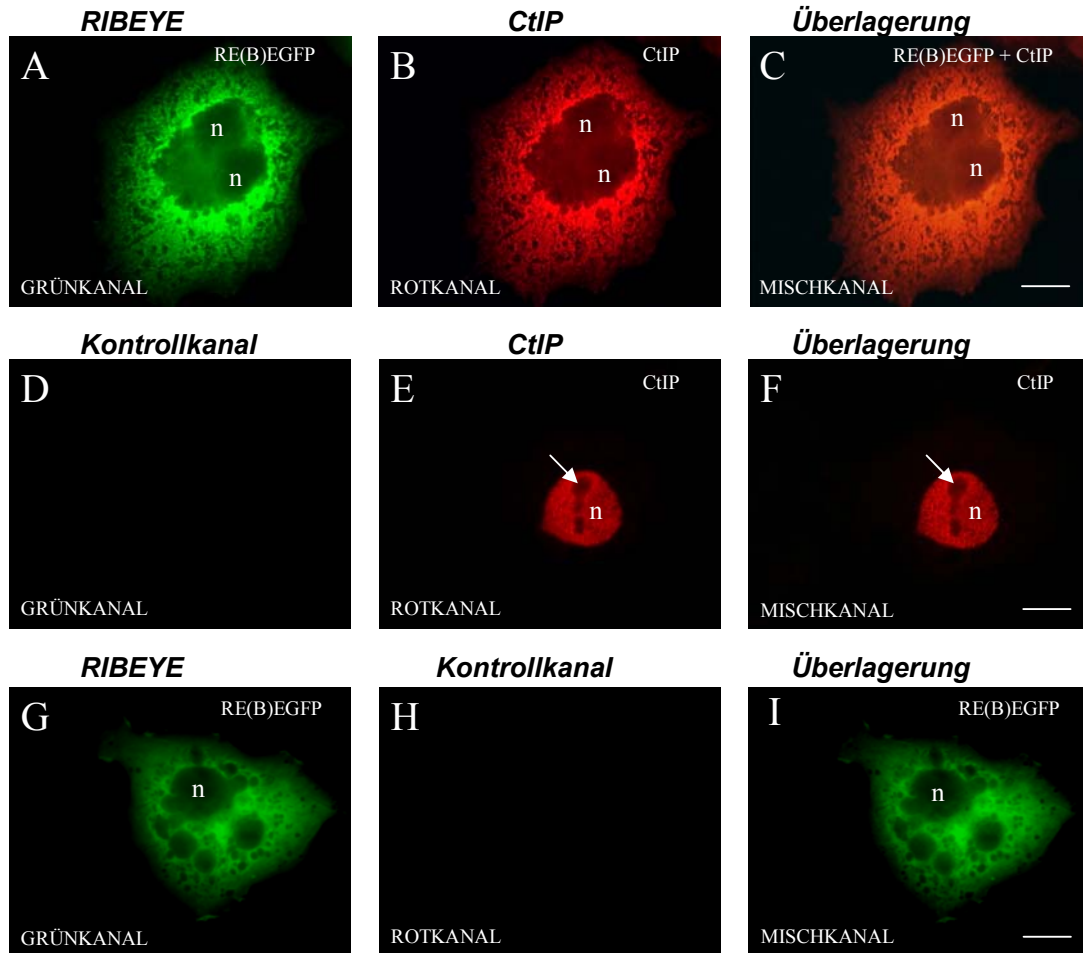


Abbildung 19: Gesamtübersicht: COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP und pCtIP (ET/DT)

Bild A, B und C: COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP und pCtIP (Doppeltransfektion), Bild A: Diffus teilweise granuläre, grün-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild B:** Zeigt die zelluläre Verteilung des CtIP, das hauptsächlich im Zytosol sowie teilweise im Zellkern lokalisiert ist. Granuläre, rot markierte Fluoreszenz im Zytosol, sowie diffus rot markierte Immunreaktion im Zellkern. **Bild C:** Stellt die Überlagerung von Bild A und B dar und demonstriert die Retention des CtIP im Zytosol durch „Co“-Lokalisation zwischen CtIP und der B-Domäne von RIBEYE, die sich als granuläre, gelb-fluoreszierende Bereiche darstellen. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 µm.

Bild D, E und F: COS-Zellen transfiziert mit pCtIP (Einzeltransfektion), Bild D: Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild E:** Es ist eine rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Struktur erkennbar, die einen Zellkern darstellt. Dieser enthält nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. **Bild F:** Stellt die Überlagerung der Bilder D und E dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 µm.

Bild G, H und I: COS-Zellen transfiziert mit pRE(B)EGFP (Einzeltransfektion), Bild G: Diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild H:** Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild I:** Stellt die Überlagerung der Bilder G und H dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 µm.

Die Gesamtübersicht in Abbildung 19 zeigt die Umverteilung des ursprünglich nukleären Proteins CtIP in das Zytosol bei Doppeltransfektion mit RE(B) sowie das Verteilungsmuster von CtIP und der B-Domäne von RIBEYE in einzeln transfizierter Form. Bild A, B und C stellt die Doppeltransfektion dar und verdeutlicht die Retention von CtIP im Zytosol, die sich infolge der „Co“-Lokalisation von RE(B) und CtIP durch gelb-fluoreszierende Strukturen im Mischkanal (Bild C) zeigt. Bild D, E und F stellt die Verteilung von CtIP in einzeln transfizierter Form dar und zeigt die nukleäre Verteilung von CtIP, die als rot-fluoreszierende Struktur im Rot- und Mischkanal (Bild E und F) erkennbar ist. Bild G, H und I stellt die Verteilung von RE(B) in einzeln transfizierter Form dar und zeigt die zytosolische Verteilung der B-Domäne von RIBEYE, die als grün-fluoreszierende Strukturen im Grün- und Mischkanal (Bild G und I) erkennbar sind.

4.4.1.2 Graphische Quantifizierung des morphologischen Interaktionsassays der B-Domäne von RIBEYE und CtIP

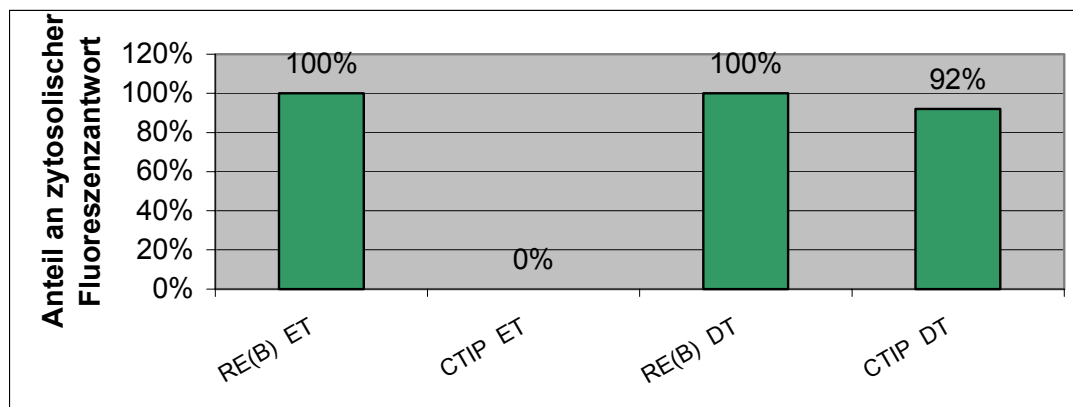


Abbildung 20: Graphische Quantifizierung des morphologischen Interaktionsassays

Quantitative Auswertung des morphologischen Interaktionsassays zwischen der B-Domäne von RIBEYE und dem nukleären Protein CtIP sowie Darstellung der Lokalisation beider Proteine bei Einzeltransfektion. Die B-Domäne von RIBEYE retiniert CtIP in einem hohen Maß im Zytosol. Einzeltransfektion (ET); Doppeltransfektion (DT).

Die graphische Darstellung in Abb.20 zeigt die quantitative Auswertung der gezeigten Fluoreszenzen bezüglich der Lokalisation von CtIP und der B-Domäne von RIBEYE. Es ist eine 100%-ige zytosolische Lokalisation der B-Domäne von RIBEYE sowohl bei der Einzeltransfektion als auch bei der Doppeltransfektion mit CtIP erkennbar. Die Einzeltransfektion von CtIP zeigt dagegen keine Lokalisation von CtIP im Zytosol.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der Doppeltransfektion von CtIP mit der B-Domäne von RIBEYE zu einer Retention (ca. 92 %) des ursprünglich nukleären Proteins CtIP im Zytosol. Aufgrund dieser Retention von CtIP ist auf eine Interaktion zwischen der B-Domäne des synaptischen Ribbonproteins RIBEYE und dem nukleären Protein CtIP zu schließen.

4.4.2 Lokalisation von CtIP und RE(AB)EGFP bei Doppeltransfektion pRE(AB)EGFP und pCtIP

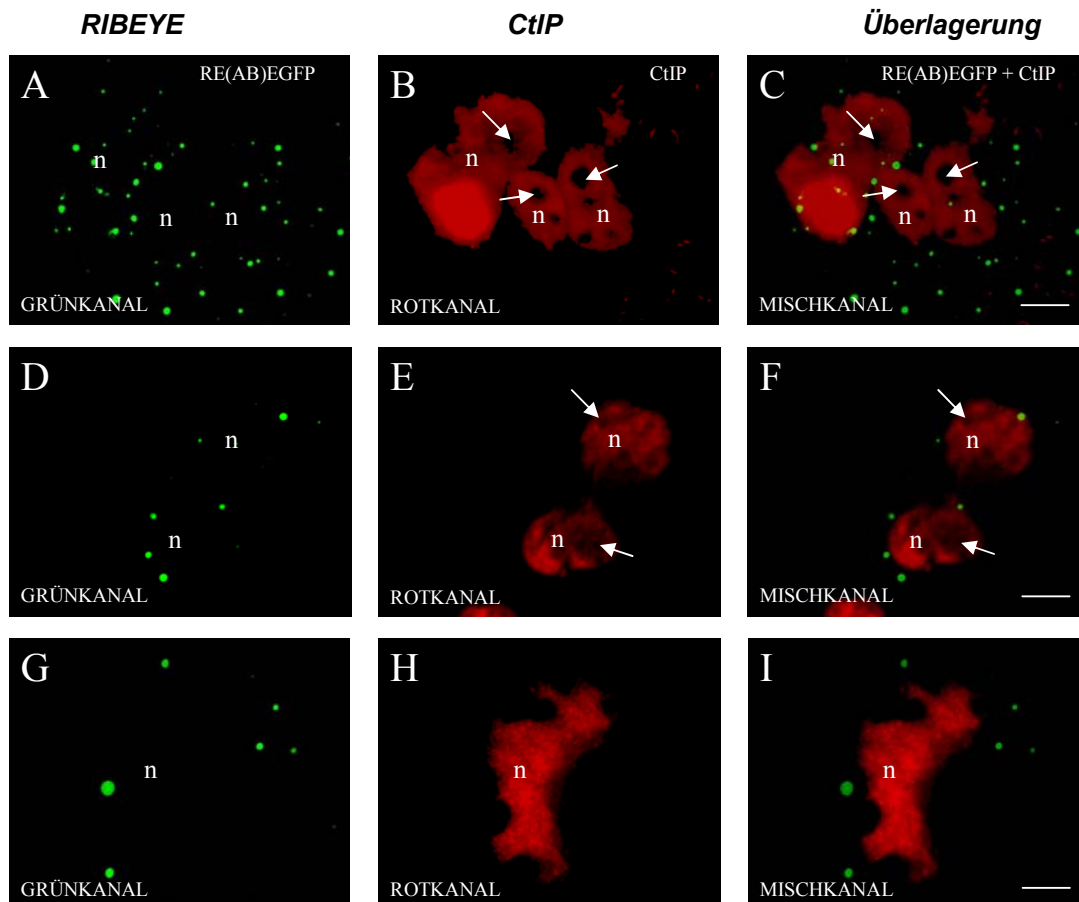


Abbildung 21: COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP und pCtIP (DT)

Bild A, D und G: Sichtbar sind globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen, die RIBEYE(AB) entsprechen. **Bild B, E und H:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. **Bild C, F und I:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B, D und E sowie der Bilder G und H dar. Es sind keine überlappenden, gelb-fluoreszierenden Bereiche erkennbar. Zellkerne wurden als gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 µm.

In der Abbildung 21 ist eine Umverteilung von CtIP vom Zellkern in das Zytosol nicht erkennbar, dies wird anhand der rot-fluoreszierenden, zellkernbegrenzten Strukturen im Rot- und Mischkanal (Bild B, C, E, F, H und I) ersichtlich. Die AB-Domäne „full length“ von RIBEYE zeigt sich wie in einzeln transfizierter Form als distinkte, globuläre, grün-fluoreszierende Struktur (Bild A, C, D, F, G und I), die auf das Zytosol begrenzt ist. Im Mischkanal wird die nukleäre Lokalisation von CtIP sowie die zytosolische Lokalisation von RIBEYE [RE(AB)] deutlich. Eine „Co“-Lokalisation (gelb-fluoreszierende Strukturen) beider Proteine ist nicht erkennbar.

Im Unterschied zu der B-Domäne von RIBEYE erfolgte bei Doppeltransfektion von RE(AB) „full length“ und CtIP keine Retention von CtIP im Zytosol (Abb.21), was auf eine fehlende Interaktion zwischen CtIP und „full length“ von RIBEYE im angewendeten System hinweist.

4.4.2.1 Gesamtübersicht: Lokalisation von CtIP und RE(AB)EGFP bei Doppeltransfektion pRE(AB)EGFP und pCtIP und Verteilungsmuster von einzeln transfiziertem pCtIP und pRE(AB)EGFP

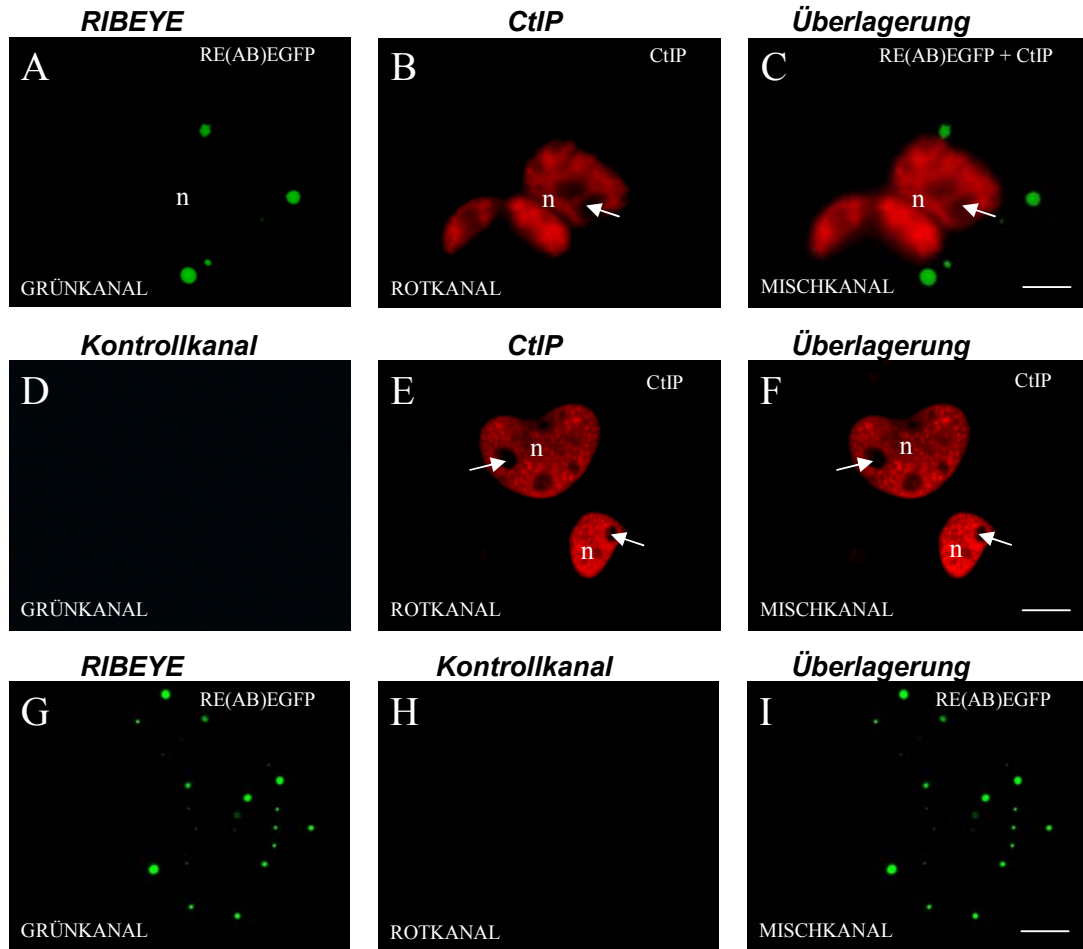


Abbildung 22: Gesamtübersicht: COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP und pCtIP (ET/DT)

Bild A, B und C: COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP und pCtIP (Doppeltransfektion), Bild A: Sichtbar sind globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen, die RIBEYE(AB) entsprechen. **Bild B:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nucleoli. **Bild C:** Stellt die Überlagerung von Bild A und B dar. Es sind keine überlappenden, gelb-fluoreszierenden Bereiche erkennbar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 µm.

Bild D, E und F: COS-Zellen transfiziert mit pCtIP (Einzeltransfektion), Bild D: Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild E:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nucleoli. **Bild F:** Stellt die Überlagerung der Bilder D und E dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 µm.

Bild G, H und I: COS-Zellen transfiziert mit pRE(AB)EGFP (Einzeltransfektion), Bild G: Es sind globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen erkennbar, die fluoreszenzfreie Areale einschließen. **Bild H:** Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild I:** Stellt die Überlagerung von Bild G und H dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 µm.

Die Gesamtübersicht in Abbildung 22 zeigt die Lokalisation von CtIP bei Doppeltransfektion mit RE(AB) sowie das Verteilungsmuster von CtIP und der AB-Domäne von RIBEYE in einzeln transfizierter Form.

Bild A, B und C stellt die Doppeltransfektion CtIP mit RE(AB) dar. Eine Umverteilung von CtIP vom Zellkern in das Zytosol ist nicht erkennbar. Dies wird im Bild B und C durch rot-fluoreszierende, zellkernbegrenzte Strukturen deutlich. Die AB-Domäne von RIBEYE zeigt sich als distinkte, globuläre, grün-fluoreszierende Strukturen (Bild A und C), die auf das Zytosol begrenzt sind. Bild D, E und F stellt die Verteilung von CtIP in einzeln transfizierter Form dar und zeigt die nukleäre Verteilung von CtIP, die als rot-fluoreszierende Strukturen im Rot- und Mischkanal (Bild E und F) erkennbar sind. Bild G, H und I stellt die Verteilung von RE(AB) in einzeln transfizierter Form dar und zeigt die zytosolische Verteilung der AB-Domäne von RIBEYE, die als grün-fluoreszierende Strukturen im Grün- und Mischkanal (Bild G und I) erkennbar sind.

Anhand dieser Ergebnisse aus Kapitel 4.4.1 bis 4.4.2. konnte gezeigt werden, dass bei Doppeltransfektion von RE(B) und CtIP, die B-Domäne von RIBEYE das ursprünglich nukleäre Protein CtIP im Zytosol retiniert, ohne dass die Lokalisation der B-Domäne von RIBEYE beeinflusst wird. Durch das Zurückhalten von CtIP im Zytosol (Retention) kommt es zu einer „Co“-Lokalisation zwischen dem zytosolischen RE(B) und dem nukleären Protein CtIP, welches sich als gelbe Fluoreszenz (Abb.18 und 19) darstellt. Dieses Resultat zeigt, dass eine Interaktion zwischen CtIP und der B-Domäne von RIBEYE erfolgt.

Im Unterschied dazu, erfolgte bei Doppeltransfektion von RE(AB) „full length“ und CtIP keine Retention von CtIP im Zytosol (Abb.21 und 22), was auf eine fehlende Interaktion zwischen CtIP und „full length“ von RIBEYE [RE(AB)] im angewendeten System hinweist.

4.5 Interaktion und Verteilungsmuster der CtIP-Konstrukte mit RIBEYE in transfizierten COS-Zellen

Zur Identifizierung der putativen Bindungssequenz von CtIP, die für die Bindung mit der B-Domäne von RIBEYE verantwortlich ist, wurden die CtIP-Konstrukte HIIICtIP, (+)PLDLSctIP und (--)PLDLSctIP im pCMV-Tag 3c Vektor von der Arbeitsgruppe Schmitz zur Verfügung gestellt. Dabei enthalten nur die CtIP-Konstrukte HIIICtIP und (+)PLDLSctIP die putative Bindungssequenz (Pentapeptid-Motiv PLDLS), dem CtIP-Konstrukt (--)PLDLS dagegen fehlt diese AS-Sequenz. Diese Konstrukte wurden jeweils zusammen mit pRE(B)EGFP in COS-Zellen „co“-transfiziert. Die CtIP-Konstrukte wurden mit dem monoklonalen anti-myc Mausantikörper immunmarkiert und mittels GAM-Cy3 visualisiert (rot-fluoreszierend). Die B-Domäne von RIBEYE [RE(B)] wird durch die Klonierung in den pEGFP Vektor als grün-fluoreszierend im Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

4.5.1 Verteilungsmuster des einzeln transfizierten HIIICtIP-Konstruktes und Retention von HIIICtIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und pHIIICtIP

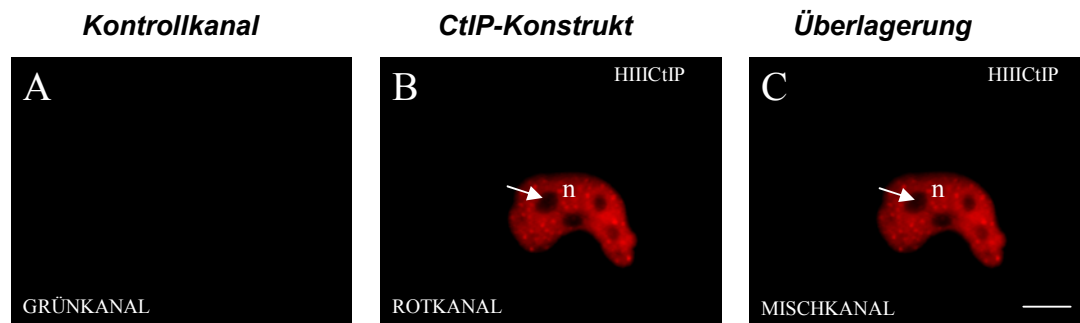


Abbildung 23: COS-Zellen transfiziert mit pHIIICtIP (ET)

Bild A: Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild B:** Es ist eine rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Struktur erkennbar, die einen Zellkern darstellt. Dieser enthält nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. **Bild C:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 µm.

Die Abbildung 23 zeigt das Verteilungsmuster des CtIP-Konstruktes HIIICtIP in einzeln transfizierter Form und bestätigt die nukleäre Verteilung von CtIP, die sich als rot-fluoreszierende Struktur im Rot- und Mischkanal (Bild B und C) darstellt. Im Grünkanal (Kontrollkanal, Bild A) sind keine fluoreszierenden Strukturen erkennbar.

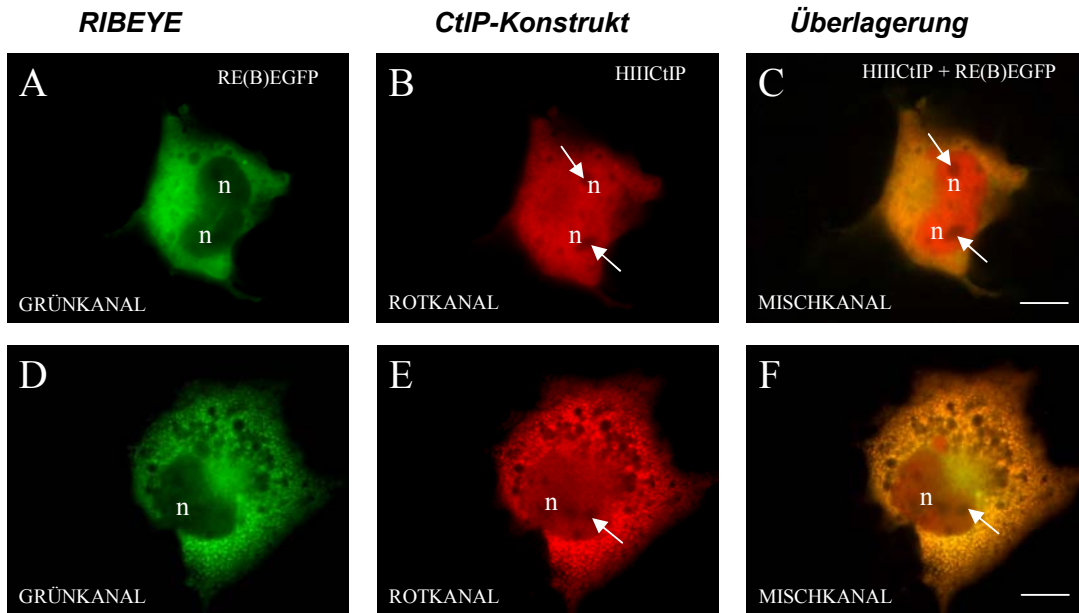


Abbildung 24: COS-Zellen transfiziert mit pHIIICtIP und pRE(B)EGFP (DT)

Bild A und D: Diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne sind ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild B und E:** Zeigt die zelluläre Verteilung des CtIP, das hauptsächlich im Zytosol (rot-fluoreszierend) sowie teilweise im Zellkern (diffus rot-fluoreszierend) lokalisiert ist. **Bild C und F:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B sowie der Bilder D und E dar und demonstriert die Retention des CtIP im Zytosol durch „Co“-Lokalisation zwischen CtIP und der B-Domäne von RIBEYE, die sich als granuläre, gelb-fluoreszierende Bereiche darstellen. Sichtbar sind auch diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die dem zytosolischen RIBEYE zugeordnet und auf das Zytosol begrenzt sind. Zusätzlich sind rot-fluoreszierende Strukturen sichtbar, die Zellkerne darstellen. Diese enthalten kleine nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 μ m.

Die Abbildung 24 zeigt die Doppeltransfektion des CtIP-Konstruktes HIIICtIP mit der B-Domäne von RIBEYE in transfizierten COS-Zellen. Aufgrund der rot-fluoreszierenden Strukturen im Rotkanal (Bild B und E) ist eine Umverteilung von CtIP (CtIP-Konstrukt HIIICtIP) in das Zytosol deutlich erkennbar. Die Lokalisation der B-Domäne von RIBEYE bleibt dagegen unbeeinflusst. Dies wird durch die diffus grün-fluoreszierenden Strukturen im Grünkanal (Bild A und D), die auf das Zytosol begrenzt sind, ersichtlich. Im Mischkanal (Bild C und F) ist eine gelbe Fluoreszenz im Zytosol deutlich erkennbar. Die sich durch die „Co“-Lokalisation zwischen dem CtIP-Konstrukt HIIICtIP und der B-Domäne von RIBEYE aufgrund der Retention von CtIP im Zytosol ergibt.

Dieses Resultat zeigt, dass das CtIP-Konstrukt HIIICtIP, welches das Pentapeptid-Motiv PLDLS enthält, eine Interaktion mit der B-Domäne von RIBEYE bewirkt.

4.5.2 Verteilungsmuster des einzeln transfizierten (+)PLDLScTIP-Konstruktes und Retention von (+)PLDLScTIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und p(+)-PLDLScTIP

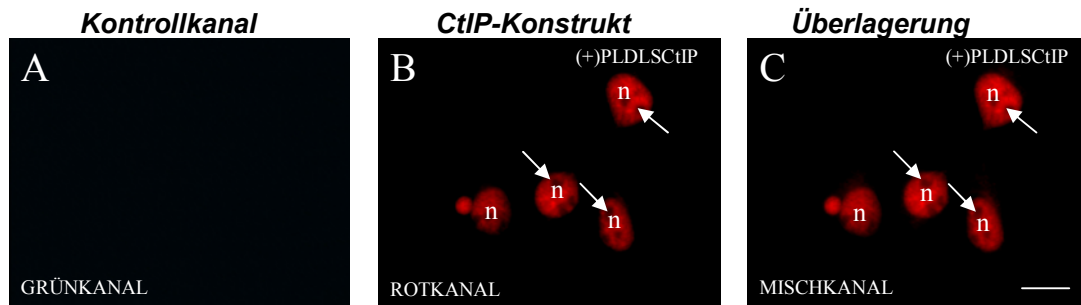


Abbildung 25: COS-Zellen transfiziert mit p(+)-PLDLScTIP (ET)

Bild A: Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild B:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nucleoli. **Bild C:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 4 µm.

Die Abbildung 25 zeigt das Verteilungsmuster des CtIP-Konstruktes (+)PLDLScTIP in einzeln transfizierter Form und bestätigt die nukleäre Verteilung von CtIP, die sich als rot-fluoreszierende Strukturen im Rot- und Mischkanal (Bild B und C) darstellen. Im Grünkanal (Kontrollkanal, Bild A) sind keine fluoreszierenden Strukturen erkennbar.

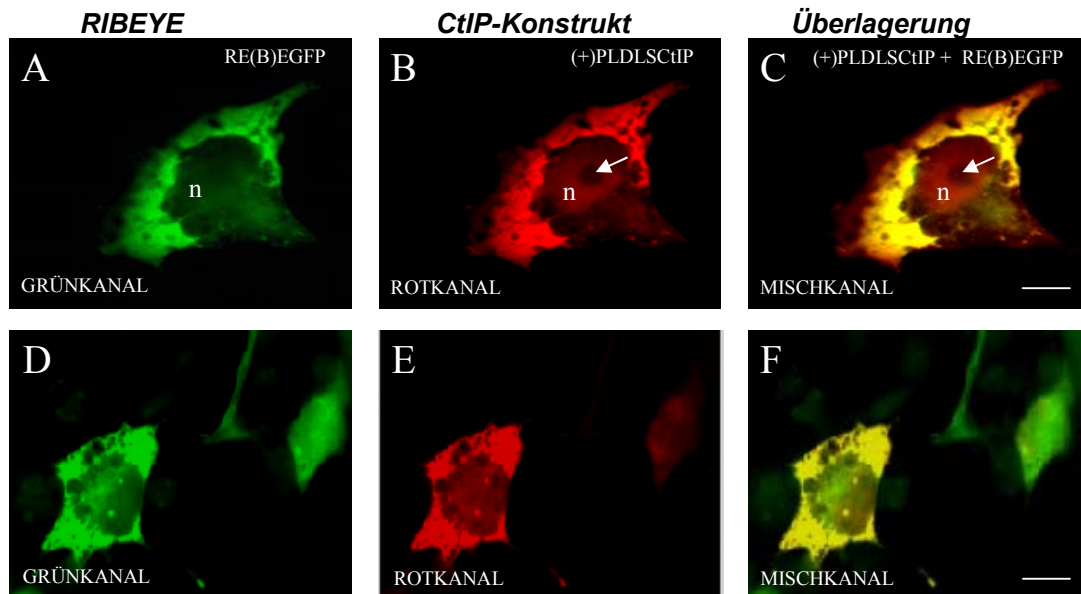


Abbildung 26: COS-Zellen transfiziert mit p(+)-PLDLScTIP und pRE(B)EGFP (DT)

Bild A und D: Diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne sind ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild B und E:** Zeigt die zelluläre Verteilung des CtIP, das hauptsächlich im Zytosol (rot-fluoreszierend) sowie teilweise im Zellkern (diffus rot-fluoreszierend) lokalisiert ist. **Bild C und F:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B sowie der Bilder D und E dar und demonstriert die Retention des CtIP im Zytosol durch „Co“-Lokalisation zwischen CtIP und der B-Domäne von RIBEYE, die sich als granuläre, gelb-fluoreszierende Bereiche darstellen. Sichtbar sind auch diffus grün-fluoreszierende Bereiche, die dem zytosolischen RIBEYE zugeordnet und auf das Zytosol begrenzt sind. Zusätzlich sind rot-fluoreszierende Strukturen sichtbar, die Zellkerne darstellen. Diese enthalten kleine nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nucleoli. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 1,6 µm (Bild A bis C) und 4 µm (Bild D bis F).

Die Abbildung 26 zeigt die Doppeltransfektion des CtIP-Konstruktes (+)PLDLSCtIP mit der B-Domäne von RIBEYE in transfizierten COS-Zellen. Aufgrund der rot-fluoreszierenden Strukturen im Rotkanal (Bild B und E) ist eine Umverteilung von CtIP (CtIP-Konstrukt (+)PLDLSCtIP) in das Zytosol deutlich erkennbar. Die Lokalisation der B-Domäne von RIBEYE bleibt dagegen unbeeinflusst. Dies wird durch die diffus grün-fluoreszierenden Strukturen im Grünkanal (Bild A und D), die auf das Zytosol begrenzt sind, ersichtlich. Im Mischkanal (Bild C und F) ist eine gelbe Fluoreszenz im Zytosol deutlich erkennbar. Die sich durch die „Co“-Lokalisation zwischen dem CtIP-Konstrukt (+)PLDLSCtIP und der B-Domäne von RIBEYE aufgrund der Retention von CtIP im Zytosol ergibt.

Dieses Resultat zeigt, dass das CtIP-Konstrukt (+)PLDLSCtIP, welches das Pentapeptid-Motiv PLDLS enthält, eine Interaktion mit der B-Domäne von RIBEYE bewirkt.

4.5.3 Graphische Quantifizierung des morphologischen Interaktionsassays der B-Domäne von RIBEYE und der CtIP-Konstrukte HIIICtIP und (+)PLDLSCtIP

Die quantitative, fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergibt bei einer Doppeltransfektion mit RE(B) sowohl für das CtIP-Konstrukt (+)PLDLSCtIP als auch für das CtIP-Konstrukt HIIICtIP eine Retention des Kernproteins CtIP im Zytosol. Jedoch besteht ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Konstrukten, welches sich in der Stöchiometrie zeigt. Die Retention des Kernproteins CtIP im Zytosol ergibt bei dem CtIP-Konstrukt HIIICtIP eine Umverteilung von etwa 90 %. Das CtIP-Konstrukt (+)PLDLSCtIP weist dagegen eine Umverteilung von etwa 41 % auf, so dass etwa bei 59 % eine Retention im Zytosol ausbleibt.

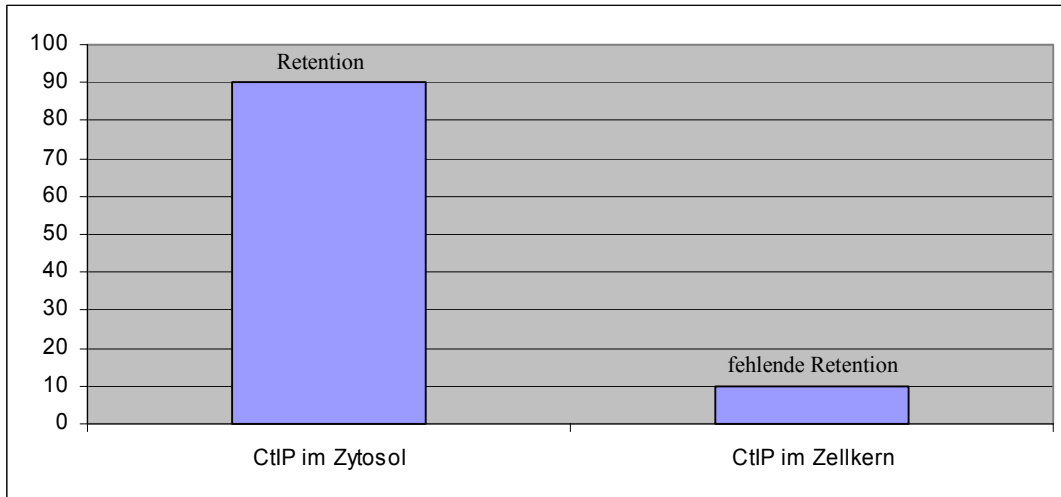


Abbildung 27: Graphische Analyse der Verteilung von CtIP in COS-Zellen, die mit pHIIICtIP und pRE(B)EGFP „co“-transfiziert wurden

Es ist eine Retention des CtIP im Zytosol von etwa 90 % erkennbar. In etwa 10 % der Fälle erfolgte keine zytosolische Retention (fehlende Retention) von CtIP. Bei diesen 10 % war CtIP im Zellkern lokalisiert.

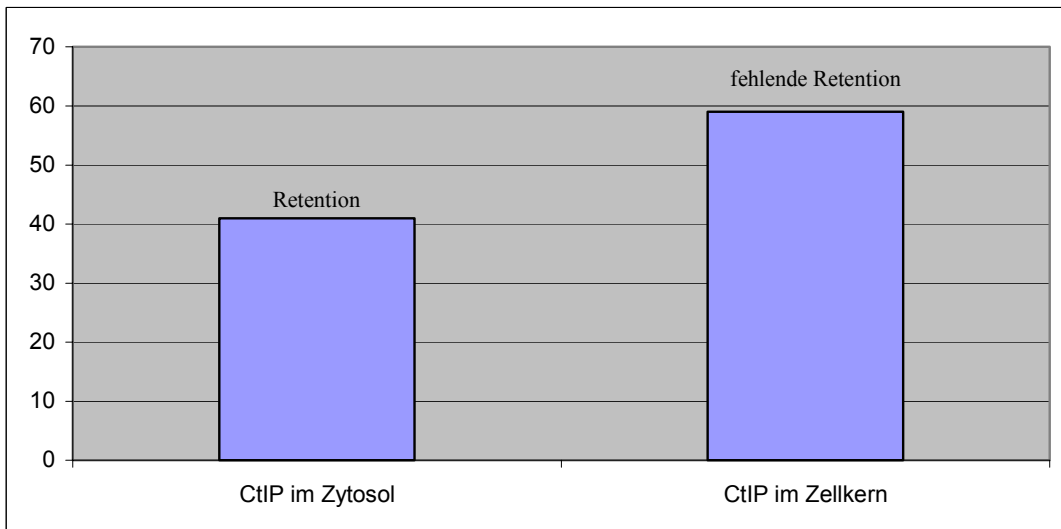


Abbildung 28: Graphische Analyse der Verteilung von CtIP in COS-Zellen, die mit p(+)-PLDLSCtIP und pRE(B)EGFP „co“-transfiziert wurden

Es ist eine Retention des CtIP im Zytosol von etwa 41 % erkennbar. Zu 59 % erfolgte keine zytosolische Retention (fehlende Retention) von CtIP.

4.5.4 Verteilungsmuster des einzeln transfizierten (--)PLDLSCtIP-Konstruktes und Lokalisation von (--)PLDLSCtIP bei Doppeltransfektion pRE(B)EGFP und p(--)-PLDLSCtIP

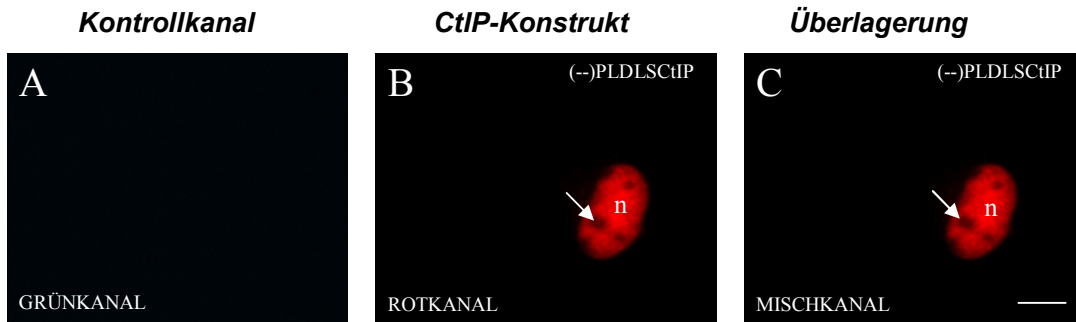


Abbildung 29: COS-Zellen transfiziert mit p(--)-PLDLSCtIP (ET)

Bild A: Keine sichtbare Fluoreszenz (entspricht dem Kontrollkanal). **Bild B:** Es ist eine rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Struktur erkennbar, die einen Zellkern darstellt. Dieser enthält nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. **Bild C:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B dar. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 μ m.

Abbildung 29 zeigt das Verteilungsmuster des CtIP-Konstruktes (--)PLDLSCtIP in einzeln transfizierter Form und bestätigt die nukleäre Verteilung von CtIP, die sich als rot-fluoreszierende Struktur im Rot- und Mischkanal (Bild B und C) darstellt. Im Gr \ddot{u} nkanal (Kontrollkanal, Bild A) sind keine fluoreszierenden Strukturen erkennbar.

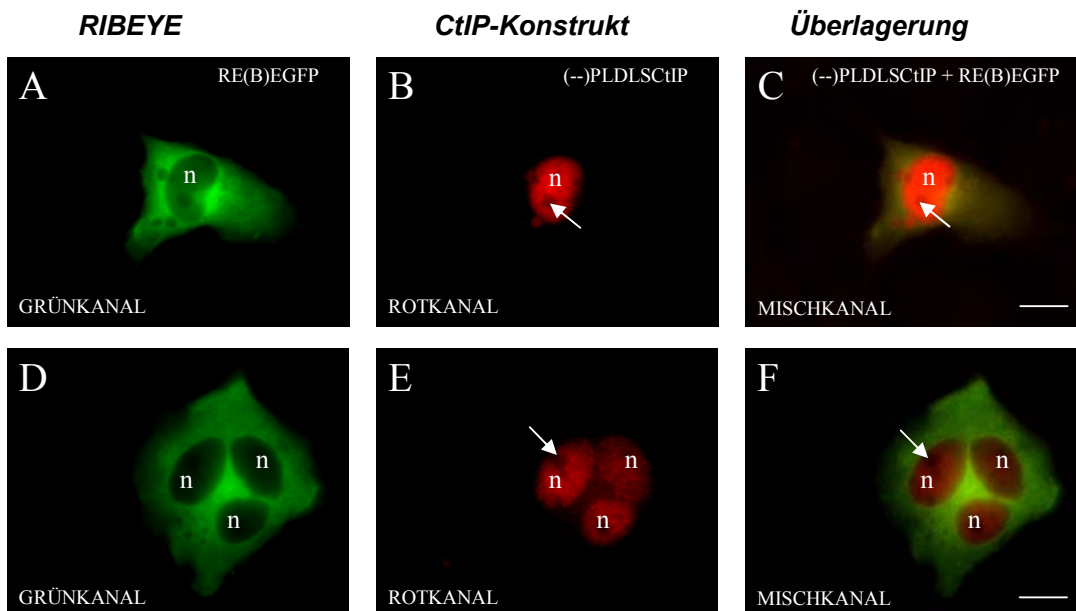


Abbildung 30: COS-Zellen transfiziert mit p(--)-PLDLSCtIP und pRE(B)EGFP (DT)

Bild A und D: Diffus gr \ddot{u} n-fluoreszierende Bereiche, die auf das Zytosol begrenzt sind. Zellkerne ohne sichtbare Fluoreszenz. **Bild B und E:** Es sind rot-fluoreszierende, gut abgrenzbare Strukturen erkennbar, die Zellkerne darstellen. Sie enthalten nicht-immunreaktive Bereiche (Pfeil), die Nukleoli. Eine Umverteilung des Kernproteins CtIP ist nicht zu erkennen. **Bild C und F:** Stellt die Überlagerung der Bilder A und B sowie der Bilder D und E dar. Es sind keine gelb-fluoreszierenden Bereiche erkennbar, so dass eine Retention mit erkennbarer „Co“-Lokalisation zwischen dem (--)PLDLSCtIP-Konstrukt und der B-Domäne von RIBEYE auszuschließen ist. Zellkerne wurden als n gekennzeichnet; Skalierungsbalken: 3 μ m.

Abbildung 30 zeigt die Doppeltransfektion des CtIP-Konstruktes (--)PLDLSCtIP mit der B-Domäne von RIBEYE in transfizierten COS-Zellen. Eine Umverteilung von CtIP (CtIP-Konstrukt (--)PLDLSCtIP) in das Zytosol ist nicht erkennbar. Dies wird anhand der rot-fluoreszierenden, zellkernbegrenzten Strukturen im Rot- und Mischkanal (Bild B, C, E und F) ersichtlich. Die B-Domäne von RIBEYE zeigt sich wie in einzeln transfizierter Form als diffus grün-fluoreszierende Strukturen (Bild A und D), die auf das Zytosol begrenzt sind. Im Mischkanal wird die nukleäre Lokalisation von CtIP (CtIP-Konstrukt (--)PLDLSCtIP) und die zytosolische Lokalisation der B-Domäne von RIBEYE deutlich. Eine „Co“-Lokalisation (gelb-fluoreszierende Strukturen) beider Proteine ist nicht erkennbar.

Im Unterschied zu den CtIP-Konstrukten HIIIcTIP und (+)PLDLSCtIP, die das Pentapeptid-Motiv PLDLS enthielten, konnte das CtIP-Konstrukt (--)PLDLSCtIP nicht mehr mit der B-Domäne von RIBEYE interagieren.

Die Ergebnisse der Kapitel 4.5.1 bis 4.5.4 zeigen, dass eine Umverteilung von CtIP in das Zytosol nur im Falle einer Doppeltransfektion mit der B-Domäne von RIBEYE und den CtIP-Konstrukten HIIIcTIP und (+)PLDLSCtIP erfolgte. Im Falle einer Doppeltransfektion mit der B-Domäne von RIBEYE und dem CtIP-Konstrukt (--)PLDLSCtIP kam es zu keiner Umverteilung (Retention) von CtIP in das Zytosol. Dies weist sowohl auf eine Interaktion der CtIP-Konstrukte HIIIcTIP und (+)PLDLSCtIP mit der B-Domäne von RIBEYE hin, als auch auf eine wesentliche Bedeutung des Pentapeptid-Motivs PLDLS.

Quantitativ ist ein Unterschied zwischen dem HIIIcTIP-Konstrukt und dem (+)PLDLSCtIP-Konstrukt erkennbar. Bei dem Konstrukt HIIIcTIP wird in ca. 90 % der Fälle CtIP im Zytosol retiniert, während bei Vorliegen des (+)PLDLSCtIP-Konstruktes bei ca. 59 % ein Fluoreszenzsignal auch im Zellkern zu beobachten ist. Dies deutet daraufhin, dass eine gewisse AS-Sequenz vor dem Pentapeptid-Motiv PLDLS notwendig ist, um eine höhere Retentionsrate im Zytosol zu bewirken.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Bindung von CtIP an das Ribbonprotein RIBEYE mittels eines eigens dafür entwickelten morphologischen Interaktionsassays. Bei dem Ribbonprotein RIBEYE handelt es sich um eine Hauptkomponente der synaptischen Ribbons in Ribbonsynapsen.

5.1 Untersuchung der Interaktion zwischen dem synaptischen Ribbonprotein RIBEYE und dem Kernprotein CtIP

Um die Interaktion zwischen dem synaptischen Ribbonprotein RIBEYE und dem nukleären Protein CtIP zu untersuchen, war es notwendig, ein Versuchssystem zu entwickeln, bei dem die zu untersuchenden Proteine auf morphologischer Ebene im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden konnten. Zu diesem Zweck wurde ein morphologischer Interaktionsassay etabliert.

5.1.1 Verteilungsmuster von RIBEYE und CtIP in einzeln transfizierten COS-Zellen

Die Untersuchungen ergaben für das synaptische Ribbonprotein RIBEYE eine zytosolische Lokalisation mit einer unterschiedlichen Art der Verteilung der einzelnen Domänen. Die A-Domäne und das „full length“-Konstrukt zeigten sich als distinkte, globuläre Strukturen im Zytosol, wohingegen die B-Domäne diffus zytosolisch verteilt war. Diese Ergebnisse wurden durch weitere Versuche verifiziert, bei denen durch Immunmarkierung der Zellkerne durch anti-Histonantikörper die Zellkerne sichtbar gemacht wurden. Anhand dieser Resultate wurden die Ergebnisse von Schmitz et al. (2000) bestätigt, die das synaptische Protein RIBEYE als ein zytosolisches Protein kennzeichneten.

Das Protein CtIP, das durch indirekte Immunfluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wurde, zeigt dagegen in einzeln transfizierten COS-Zellen ein nukleäres Verteilungsmuster. Dies bestätigt die Ergebnisse von Yu und Baer (2000), die CtIP als ein Kernprotein identifizierten.

Somit wurde gezeigt, dass im einzeln transfizierten Zustand RIBEYE „full length“, sowie dessen Einzeldomänen RE(A) sowie RE(B) zytosolisch und CtIP nukleär lokalisiert sind.

5.1.2 Verteilungsmuster von RIBEYE und CtIP in doppelt transfizierten COS-Zellen

Die Untersuchungen ergaben, dass das nukleäre Protein CtIP durch die im Zytosol befindliche B-Domäne von RIBEYE im Fall einer Interaktion im Zytosol retiniert wird und durch RIBEYE daran gehindert wird, in den Zellkern zu translozieren.

Es bestand die Vermutung, dass bei erfolgter Interaktion zwischen RIBEYE und dem nukleären Protein CtIP, RIBEYE durch CtIP in den Zellkern transportiert wird. Die Ergebnisse zeigen jedoch trotz Interaktion der B-Domäne von RIBEYE mit CtIP eine zytosolische Lokalisation. In keinem Fall kam es zu einer Umverteilung von RIBEYE in den Zellkern. Aufgrund der durch die B-Domäne von RIBEYE bewirkten Retention von CtIP im Zytosol konnte erstmalig eine spezifische Interaktion zwischen dem nukleären Protein CtIP und dem synaptischen Ribbonprotein RIBEYE im morphologischen Interaktionsassay nachgewiesen werden. Zudem konnte mit diesem morphologischen Interaktionsassay die im Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren gefundene Interaktion bestätigt werden.

Weiterhin wurde während dieser Versuchsreihe in vereinzelt doppelt transfizierten COS-Zellen eine zusätzliche nukleäre Lokalisation von CtIP beobachtet. Allerdings fiel diese beträchtlich geringer aus als die zytosolische Lokalisation. Der Grund hierfür könnte in der Ausbildung einer instabilen Bindung von CtIP an die B-Domäne von RIBEYE liegen, bei der sich eine unbestimmte Anzahl von CtIP vom CtIP/RE(B)-Proteinkomplex löst, woraufhin es zur Zurückdiffusion von CtIP in den Zellkern kommt.

Im Unterschied zu der zuvor nachgewiesenen Interaktion zwischen CtIP und der B-Domäne von RIBEYE, war eine Retention von CtIP mit RIBEYE „full length“ [RE(AB)] nicht zu beobachten. Für das Ausbleiben einer Interaktion zwischen RIBEYE „full length“ und CtIP kommen verschiedene Gründe in Betracht. Einerseits könnte aufgrund einer speziellen Faltung des Proteins die A-Domäne die NAD⁺-Bindungssequenz der B-Domäne blockieren und daraufhin ein negativ inhibitorischer Effekt ausgelöst worden sein. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer Interaktion zwischen CtIP und RIBEYE „full length“ im

morphologischen Interaktionsassay könnte an der Aggregationsbildung von „full length“ liegen. Hierdurch würde für CtIP ein Zugangsproblem für die Bindung an die NAD⁺-Bindungssequenz der B-Domäne entstehen.

Anhand dieser Resultate wurde nachgewiesen, dass die B-Domäne des synaptischen Ribbonproteins RIBEYE für die Bindung mit dem nukleären Protein CtIP verantwortlich ist.

5.2 Mögliche Bedeutung der Interaktion zwischen der B-Domäne von RIBEYE und CtIP

CtIP ist eine wichtige Proteinkomponente von Transkriptions-regulierenden Komplexen, die beispielsweise in unterschiedlichen Systemen das Retinoblastoma-Protein Rb (Fusco et al. 1998; nach Lewing 1998; Yu et al. 1998), den Tumorsuppressor BRCA1 (Li et al. 2000; Dubin et al. 2004; Yu et al. 1998, 2004; Varma et al. 2005) sowie den Tumorsuppressor Ikarus (Koipally und Georgopoulos 2002; Chinnadurai 2006) enthalten.

Anhand der nachgewiesenen spezifischen Interaktion zwischen der B-Domäne des synaptischen Ribbonproteins RIBEYE und dem Kernprotein CtIP lassen sich verschiedene Überlegungen über die Funktion dieser Komplexe ableiten.

Ribbonsynapsen unterliegen einem besonders großen Proteinturnover, da diese Synapsen permanent aktiv sind (Schmitz et al. 2006). Da Proteine eine begrenzte „Lebenszeit“ aufweisen und nach einer bestimmten „Lebenszeit“ altern und denaturieren, müssen sie entweder durch Proteinfaltungshelfer (so genannte Chaperones) renaturiert oder neu synthetisiert werden.

Demnach könnte CtIP ein Schlüsselprotein darstellen, das Signale von der Synapse in den Zellkern weiterleitet. In dem Fall das CtIP von RIBEYE abdissoziiert (z.B. bei Denaturierung von RIBEYE nach intensiver synaptischer Aktivität) kann CtIP in den Zellkern translozieren und dort die Genexpression, z.B. von RIBEYE oder anderen synaptischen Proteinen, regulieren.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Interaktion zwischen dem synaptischen Ribbonprotein RIBEYE und dem nukleären Protein CtIP für die Kommunikation zwischen Synapse und Zellkern wichtig ist und folglich eine Verbindung zwischen der Synapse und dem Zellkern besteht.

Dieser Signalweg ist offensichtlich von besonderer Bedeutung in der tonisch aktiven Ribbonsynapse, in der synaptische Proteine unter besonderer Belastung stehen und nach erfolgtem Funktionsverlust, z.B. durch Denaturierung, wieder ersetzt werden müssen.

Wie sich dieser Mechanismus im Einzelnen darstellt und wie er funktioniert, gilt es in weiteren Untersuchungen zu klären. Weiterhin stellt sich die Frage, welche Auswirkungen die Interaktion zwischen der B-Domäne von RIBEYE und CtIP auf den Aufbau und auf die Funktionsweise (die Bindung synaptischer Vesikel und Exozytose) der synaptischen Ribbons hat.

Für die hier formulierte Arbeitshypothese gibt es in der Literatur vergleichbare Zusammenhänge, etwa beim Notch 1 Rezeptor sowie bei dem Amyloid Precursor Protein (β APP). Der Notch 1 Rezeptor sowie β APP gehören zu den Typ 1 Transmembranproteinen, die Multidomänenproteine darstellen und durch Proteasen prozessiert werden (Kang et al. 1987; Mumm und Kopan 2000; Kopan und Goate 2000). Das β APP spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Genese der Alzheimer Erkrankung (Selkoe 1999; Haass und Steiner 2002), bei dem es zu einer zunehmenden Schädigung der Neurone und letztlich zu Funktionsverlust und Tod derselben führt, als Ursache der Alzheimer Demenz (Hardy und Selkoe 2002; Selkoe 2001).

Der Notch-Signaltransduktionsweg spielt dagegen eine entscheidende Rolle bei der Zelldifferenzierung (Mumm und Kopan 2000), bei dem die Bildung neuronaler und epidermaler Zellen aus undifferenzierten Embryonalzellen kontrolliert wird. Bei der Prozessierung dieser Proteine, die zunächst an der Plasmamembran lokalisiert sind, kommt es zur Bildung von Abspaltprodukten, die in den Zellkern translozieren und dort die Genexpression regulieren (Mumm und Kopan 2000; Kopan 2002; Cao und Südhof 2001; 2004).

5.3 Untersuchung der Interaktionsbindungsstelle zwischen der B-Domäne von RIBEYE und CtIP

Die Ergebnisse zeigen, dass bei dem CtIP-Konstrukt (--)PLDLSctIP eine Retention von CtIP in das Zytosol nicht stattgefunden hat. Daraus wird ersichtlich, dass aufgrund des fehlenden Pentapeptid-Motivs PLDLS in diesem CtIP-Konstrukt keine Interaktion mit der B-Domäne von RIBEYE zu verzeichnen war.

Im Gegensatz dazu führten die CtIP-Konstrukte HIIICtIP und (+)PLDLSctIP, die das Pentapeptid-Motiv PLDLS enthielten, zu einer Retention von CtIP im Zytosol und folglich zu einer Bindung zwischen RIBEYE und CtIP.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass das Pentapeptid-Motiv PLDLS das entscheidende Bindungsmotiv für die Interaktion zwischen der B-Domäne von RIBEYE und CtIP ist. Fehlt diese Bindungssequenz, wird die spezifische Interaktion mit der B-Domäne von RIBEYE verhindert.

Weiterhin besteht ein für die quantitative Auswertung signifikanter Unterschied zwischen den CtIP-Konstrukten HIIICtIP und (+)PLDLSctIP. Das CtIP-Konstrukt (+)PLDLSctIP war in seiner Fähigkeit CtIP im Zytosol zu retinieren schwächer als das CtIP-Konstrukt HIIICtIP. Dies deutet daraufhin, dass bestimmte Abschnitte im N-Terminal des PLDLS-Motivs auch eine gewisse Bedeutung für die Interaktion mit RIBEYE haben.

6. Literaturverzeichnis

1. Altrock WD, tom Dieck S, Sokolov M, Meyer AC, Sigler A, Brakebusch C, Fassler R, Richter K, Boeckers TM, Potschka H, Brandt C, Loscher W, Grimberg D, Dresbach T, Hempelmann A, Hassan H, Balschun D, Frey JU, Brandstätter JH, Garner CC, Rosenmund C, Gundelfinger ED (2003) Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein bassoon. *Neuron* 37: 787-800
2. Altwein M (2003) Lokalisierung und Funktion von Synaptischen Proteinen in der Netzhaut von Säugetieren. Naturwissenschaftliche Dissertation. Darmstadt
3. Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N (1999) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400: 457-461
4. Augustin I, Korte S, Rickmann M, Kretzschmar HA, Südhof TC, Herms JW, Brose N (2001) The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *Journal of Neuroscience* 21: 10-17
5. Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N (1997) Direct interaction of the rat Unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *Journal of Biological Chemistry* 272: 2520-2526
6. Borjigin J, Li X, Snyder SH (1999) The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39: 53-65
7. Brandstätter JH, Wässle H, Betz H, Morgans CW (1996a) The plasma membrane protein SNAP-25, but not syntaxin, is present at photoreceptor and bipolar cell synapses in the rat retina. *European Journal of Neuroscience* 8: 823-828
8. Brandstätter JH, Löhcke S, Morgans CW, Wässle H (1996b) Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in the mammalian retina. *Journal of Comparative Neurology* 370: 1-10

9. Brandstätter JH, Fletcher EL, Garner CC, Gundelfinger ED, Wässle H (1999) Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *European Journal of Neuroscience* 11: 3683-3693
10. Brose N, Rosenmund C, Rettig J (2000) Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 303-311
11. Cao X, Südhof TC (2001) A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293: 115-120
12. Cao X, Südhof TC (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *Journal of Biological Chemistry* 279: 24601-24611
13. Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Appeltauer U, Takei K, Kindler S, Veh RW, De Camilli P, Gundelfinger ED, Garner CC (1996) Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *European Journal of Cell Biology* 69: 214-223
14. Chinnadurai G (2006) CtIP, a candidate tumor susceptibility gene is a team player with luminaries. *Biochimica et Biophysica Acta* 1765: 67-73
15. De Ruyter van Steveninck RR, Laughlin SB (1996) Light adaptation and reliability in blowfly photoreceptors. *International journal of neural systems* 7: 437-444
16. DeVries SH, Baylor DA (1993) Synaptic circuitry of the retina and olfactory bulb. *Cell* 72: 139-149
17. Dick O, Hack I, Altroock WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2001) Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *Journal of Comparative Neurology* 439: 224-234
18. Dowling JE (1987) *The Retina: An Approachable Part of the brain*. MA: Harvard University Press, Cambridge

19. Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED (2001) The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cellular & Molecular Life Sciences* 58: 94-116
20. Dubin MJ, Stokes PH, Sum EYM, Williams RS, Valova VA, Robinson PJ, Lindeman GJ, Glover JNM, Visvader JE, Matthews JM (2004) Dimerization of CtIP, a BRCA1- and CtBP-interacting protein, is mediated by an N-terminal coiled-coil motif. *Journal of Biological Chemistry* 26: 26932-26938
21. Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC (2000) Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* 25: 203-214
22. Fusco C, Reymond A, Zervos AS (1998) Molecular cloning and characterization of a novel retinoblastoma-binding protein. *Genomics* 51: 351-358
23. Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED (2000) Molecular determinants of presynaptic active zones. *Current Opinion in Neurobiology* 10: 321-327
24. Geckeler KE, Eckstein H (1998) Immunfluoreszenz. In: Geckeler KE, Eckstein H (eds) *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*. Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, pp 429-438
25. Gerber SH, Garcia J, Rizo J, Südhof TC (2001) An unusual C(2)-domain in the active zone protein piccolo: implications for Ca(2+) regulation of neurotransmitter release. *EMBO Journal* 20: 1605-1619
26. Gray EG, Pease HL (1971) On understanding the organisation of the retinal receptor synapses. *Brain Research* 35: 1-15
27. Haass C, Steiner H (2002) Alzheimer's disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends in Cell Biology* 12: 556-562
28. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356

29. Hopsu VK, Arstila AU (1964) An apparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of the rat. *Experimental Cell Research* 37: 484-487
30. Ichtchenko K, Hata Y, Nguyen T, Ullrich B, Missler M, Moomaw C, Südhof TC (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81: 435-443
31. Jacobson EL, Mingkwan M, Abdoul-Ela N, Jacobson MK (1989) Endogenous ADP Ribosylation of Proteins at Cystein Residues. In: Jacobson MK, Jacobson EL (eds) *ADP-Ribose Transfer Reaktionen: Mechanisms and Biological Significance*. Springer-Verlag, New York, pp 13-17
32. Janeway CA (2002) Nachweis, Messung und Charakterisierung von Antikörper und ihre Verwendung in der Forschung und bei der Diagnostik. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (eds) *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp 671-675
33. Juusola M, French AS, Uusitalo RO, Weckström M (1996) Information processing by graded-potential transmission through tonically active synapses. *Trends Neuroscience* 19: 292-297
34. Kandel ER (1996) Einführung in die synaptische Übertragung. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds) *Neurowissenschaften*. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp 190-202
35. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736
36. Katsanis N, Fisher EM (1998) A novel C-terminal binding protein (CtBP2) is closely related to CtBP1, an adenovirus E1A-binding protein, and maps to human chromosome 21q21.3. *Genomics* 47: 294-299
37. Koipally J, Georgopoulos K (2002) Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression. *Journal of Biological Chemistry* 26: 23143-23149

38. Kopan R (2002) Notch: a membrane-bound transcription factor. *Journal of Cell Science* 115: 1095-1107
39. Kopan R, Goate A (2000) A common enzyme connects notch signaling and Alzheimer`s disease. *Genes & Development* 14: 2799-2806
40. Kriegstein K, Schmitz F, Link E, Südhof TC (1999) Distributions of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses. *European Journal of Neuroscience* 11: 1335-1348
41. 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 Research* 311: 159-173
42. Lenzi D, Runyeon JW, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM (1999) Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *Journal of Neuroscience* 19: 119-132
43. Lenzi D, von Gersdorff H (2001) Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines. *BioEssays* 23: 831-840
44. Lewing B (1998) Tumorsuppressoren. In: Lewing B (ed) *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp 934-940
45. Li S, Ting NS, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EY, Lee WH (2000) Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature* 406: 210-215
46. Lottspeich F, Zorbass H (1998) Einschleusen von Fremd-DNA in Säugerzellen. In: Lottspeich F, Zorbass H (eds) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp 897-900
47. Luthman H, Magnusson G (1983) High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Research* 11: 1295-1308
48. Morgans CW, Brandstätter JH, Kellerman J, Betz H, Wässle H (1996) A SNARE complex containing syntaxin 3 is present in ribbon synapses of the retina. *Journal of Neuroscience* 16: 6713-6721

49. Mülhardt C (2006) Molekularbiologie/Genomics. In: Mülhardt C (ed) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp 235-244
50. Mumm JS, Kopan R (2000) Notch signaling: from the outside in. *Development Biology* 228: 151-165
51. Nachman-Clewner M, St. Jules R, Townes-Anderson E (1999) L-type calcium channels in the photoreceptor ribbon synapse: localization and role in plasticity. *Journal of Comparative Neurology* 415: 1-16
52. Nibu Y, Zhang H, Bajor E, Barolo S, Small S, Levine M (1998) dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Krüppel and Snail in the *Drosophila* embryo. *EMBO Journal* 17: 7009-7020
53. Nibu Y, Senger K, Lewine M (2003) CtBP-independent repression in the *Drosophila* embryo. *Molecular und Cellular Biology* 23: 3990-3999
54. Parsons TD, Lenzi D, Almers W, Roberts WM (1994) Calcium-triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell: capacitance measurements in saccular hair cells. *Neuron* 13: 875-883
55. Poortinga G, Watanabe M, Parkhurst SM (1998) *Drosophila* CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO Journal* 17: 2067-2078
56. Rao R, Buchsbaum G, Sterling P (1994) Rate of quantal transmitter release at the mammalian rod synapse. *Biophysical Journal* 67: 57-63
57. Rao-Mirotnik R, Harkins AB, Buchsbaum G, Sterling P (1995) Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14: 561-569
58. Rehm H (2002) Antikörper. In: Rehm H (ed) Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp 153-162
59. Rieke F, Schwartz EA (1996) Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse. *Journal of Physiology* 493: 1-8

60. Rohrbough J, Pinto S, Mihalek RM, Tully T, Broadie K (1999) *latheo*, a *Drosophila* gene involved in learning, regulates functional synaptic plasticity. *Neuron* 23: 55-70
61. Rüger R (1997) Methoden der Genübertragung. In: Ganten D, Ruckpaul K (eds) *Molekular- und Zellbiologische Grundlagen*. Springer-Verlag Berlin, Berlin, Heidelberg, pp 197-241
62. Schaeffer SF, Raviola E, Heuser, J. (1982) Membrane specializations in the outer plexiform layer of the turtle retina. *Journal Comparative Neurology* 204: 253-267
63. Schaeper U, Boyd JM, Verma S, Uhlmann E, Subramanian T, Chinnadurai G (1995) Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92:10467-10471
64. Schaeper U, Subramanian T, Lim L, Boyd JM, Chinnadurai G (1998) Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif. *Journal of Biology Chemistry* 273: 8549-8552
65. Schmitz F, Augustin I, Brose N (2001) The synaptic vesicle priming protein Munc 13-1 is absent from tonically active ribbon synapses of the rat retina. *Brain Research* 895: 258-263
66. Schmitz F, Bechmann M, Drenckhahn D (1996) Purification of synaptic ribbons, structural components of the active zone complex in photoreceptor synapses. *Journal of Neuroscience* 16: 7109-7116
67. 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
68. Schmitz F, Tabares L, Khimich D, Strenzke N, de la Villa-Polo P, Castellano-Munoz M, Bulankina A, Moser T, Fernandez-Chacon R, Südhof TC (2006) CSP α -deficiency causes massive and rapid photoreceptor degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 103: 2926-2931

69. Selkoe DJ (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399: A23-31
70. Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81: 741-766
71. Seyffert W (2003) Neurogenetik. In: Seyffert W (ed) *Lehrbuch der Genetik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp 750-760
72. Sinowatz F (2000): Die Zelle. In: Hees H, Sinowatz F (eds) *Histologie*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, Heidelberg, Berlin, pp 78
73. Smith SJ, Augustine GJ (1988) Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends in Neuroscience* 11: 458-464
74. Smith CA, Sjöstrand FS (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *Journal Ultrastructural Research* 5: 184-192
75. Sterling P (1998) The retina. In: Shepherd GM (ed) *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press, New York, pp 205-253
76. Stevens CF, Tsujimoto T (1995) Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 846-849
77. Stryer L (2003) Erforschung der Proteine. In: Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (eds) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, pp 107-113
78. tom Dieck S, Sanmarti-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S, Soyke A, Wex H, Smalla KH, Kampf U, Franzer JT, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *Journal of Cell Biology* 142: 499-509
79. tom Dieck S, Gundelfinger ED (2000) Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. *Naturwissenschaften* 87: 513-523

80. Trujillo-Cenoz O (1972) The structural organization of the compound eye in insects. In: Fuortes MGF Handbook of Sensory Physiology, Volume VII/2, Physiology of Photoreceptor Organs. Springer-Verlag, Berlin, pp 5-62
81. Turner J, Crossley M (1998) Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Krüppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. EMBO Journal 17: 5129-5140
82. Ullrich B, Südhof TC (1994) Distribution of synaptic markers in the retina: implications for synaptic vesicle traffic in ribbon synapses. Journal of Physiology 88: 249-257
83. Vaney DI, Nelson JC, Pow DV (1998) Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. Journal Neuroscience 18: 10594-10602
84. Varma AK, Brown RS, Birrane G, Ladas JA (2005) Structural basis for cell cycle checkpoint control by the BRCA1-CtIP complex. Biochemistry 44: 10941-10946
85. von Gersdorff H (2001) Synaptic ribbons: Versatile signal transducers. Neuron 29: 7-10
86. von Gersdorff H, Sakaba T, Berglund K, Tachibana M (1998) Submillisecond kinetics of glutamate release from a sensory synapse. Neuron 21: 1177-1188
87. von Gersdorff H, Vardi E, Matthews G, Sterling P (1996) Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. Neuron 16: 1221-1227
88. Wan HI, DiAntonio A, Fetter RD, Bergstrom K, Strauss R, Goodman CS (2000) Highwire regulates synaptic growth in Drosophila. Neuron 26: 313-329
89. Wan L, Almers W, Chen W (2005) Two ribeye genes in teleosts: the role of Ribeye in ribbon formation and bipolar cell development. Journal of Neuroscience 25: 941-949

90. Wang X, Kibschull M, Laue MM, Lichte B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW (1999) Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology regions with Rim and Bassoon and binds profilin. *Journal of Cell Biology* 147: 151-162
91. Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC (1997) RIM is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388: 593-598
92. Yu X, Baer R (2000) Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18541-18549
93. Yu X, Chen J (2004) DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Molecular and Cellular Biology* 24: 9478-9486
94. Yu X, Wu LC, Bowcock AM, Aronheim A, Baer R (1998) The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. *Journal of Biological Chemistry* 273: 25388-25392
95. Zenisek D, Horst NK, Merriheld C, Matthews G (2004) Visualizing synaptic ribbons in the lining cell. *Journal of Neuroscience* 24: 9752-9759
96. Zhang H, Levine M (1999) Groucho and dCtBP mediate separate pathways of transcriptional repression in the *Drosophila* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 535-540

7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. Frank Schmitz am Institut für Anatomie der Universität Leipzig angefertigt.

Zu dieser Arbeit trug die Unterstützung einer Reihe von Menschen bei, denen ich hiermit herzlich danken möchte.

Zunächst gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Frank Schmitz für die freundliche Überlassung des Themas, für die hilfreichen Hinweise zur wissenschaftlichen Arbeit und zur Abfassung der Dissertation sowie für die ständige Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Besonderer Dank gebührt der medizinisch technischen Assistentin Judith Craatz für die Durchführung der Transfektion und für die intensive Betreuung bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Mein ganz spezieller Dank gilt Herrn Albert Rast für die wertvolle und unersetzliche Hilfestellung bei der Fluoreszenzmikroskopie und der Digitalisierung sowie für die geduldige Unterstützung in Computerfragen, die für das Gelingen der Arbeit essentiell waren.

Allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe sei herzlich gedankt für die überaus freundschaftliche Aufnahme, für die stets freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Versuche und die schöne Zeit im Labor.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern und Geschwistern bedanken, die mich während der Anfertigung der Arbeit ermutigt und bestärkt haben.

Meine besondere Dankbarkeit gilt meiner Schwester Claudia und meinem Mann Daniel für das konstruktive Korrekturlesen und für die vielen aufschlussreichen Diskussionen, die viel Verständnis für meine Arbeit aufgebracht und mich stets zum Durchhalten ermutigt haben.

8. Lebenslauf

Name: Karin Fröhlich, geb. Allritz
Anschrift: Schmuzerstr. 16, 81373 München
Geboren am: 13.05.1974 in Naumburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schul- und Berufsausbildung

1980 bis 1990 Polytechnische Oberschule
1990 bis 1994 Berufsausbildung mit Abitur
1993 Abitur
1994 Abschluss der Ausbildung zur Chemikantin

Studium

1994 bis 1999 Studium der Zahnmedizin, Universität Leipzig
1995 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
1997 Zahnärztliche Vorprüfung
1999 Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin

Famulatur

2001 Hilfsprojekt in Brasilien

Berufstätigkeit

01.01.2000 bis 31.03.2002 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Joanna Gräfin von Kageneck, Naumburg
01.04.2002 bis 28.02.2003 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Dipl.-Stom. Ulrike Polten, Leipzig
05.03.2003 bis 17.01.2007 Assistenz Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Dr. med. dent. Michael Hecht, Erding
seit 18.01.2007 angestellte Zahnärztin in der Zahnarztpraxis
Dr. med. dent. Michael Hecht, Erding