

Aus der Abteilung Neuroanatomie,
Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)
Prof. Dr. med. Frank Schmitz

Lokalisation von DMXL2 in der Retina

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

2023

vorgelegt von:

Alina Marie Dittrich

geb. am: 11.11.1996 in Rotenburg (Wümme)

Inhaltsverzeichnis

LOKALISATION VON DMXL2 IN DER RETINA	I
INHALTSVERZEICHNIS	I
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Deutsche Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	3
2 EINLEITUNG.....	5
2.1 Die Retina.....	5
2.1.1 Anatomie	5
2.1.2 Histologie	6
2.2 Synapsentypen.....	9
2.2.1 Elektrische Synapse.....	10
2.2.2 Chemische Synapse	10
2.3 Ribbonsynapsen	12
2.3.1 Zusammensetzung der Ribbons.....	15
2.3.2 Bereitstellung synaptischer Vesikel in Ribbonsynapsen	17
2.3.3 DMXL2	21
2.4 Ziel der Arbeit	23
3 MATERIAL UND METHODEN.....	24
3.1 Antikörper	24
3.1.1 Primärantikörper.....	24
3.1.2 Sekundärantikörper.....	25
3.2 Chemikalien und Lösungen.....	25

3.3	Gewebe.....	28
3.4	Immunfluoreszenzmikroskopie	28
3.4.1	Herstellung von Kryostatschnitten	28
3.4.2	Immunfluoreszenzmarkierung der Kryostatschnitte.....	29
3.4.3	Herstellung von Semidünnschnitten	29
3.4.4	Immunfluoreszenzmarkierung von Semidünnschnitten	29
3.4.5	Präabsorption	30
3.4.6	Kontrollinkubationen.....	30
3.4.7	Epifluoreszenzmikroskopie	30
3.4.8	Konfokalmikroskopie	31
3.5	Elektronenmikroskopie	31
3.5.1	Herstellung von Ultradünnschnitten	31
3.5.2	Post-embedding Immunogold-Markierung und elektronenmikroskopische Dokumentation	32
3.6	Herstellung und Reinigung von Fusionsprotein.....	33
3.6.1	Herstellung des Fusionsproteins DMXL2-GST	33
3.6.2	Reinigung des Fusionsproteins.....	35
3.6.3	Messung der Proteinkonzentration	36
3.7	Reinigung von Antikörpern mit Protein A-Sepharose-Beads	36
3.8	SDS-PAGE und Western Blot.....	37
3.8.1	SDS-PAGE	37
3.8.2	Western Blot.....	38
4	ERGEBNISSE.....	40
4.1	Western Blot mit dem DMXL2-Fusionsprotein.....	40
4.2	Immunfluoreszenzexperimente zur Lokalisation von DMXL2.....	41
4.2.1	Immunfluoreszenzfärbung von DMXL2	42

4.2.2	Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und RIBEYE	45
4.2.3	Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und Cav1.4	47
4.2.4	Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und PSD-95	50
4.2.5	Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und CSP	54
4.3	Präabsorption von Anti-DMXL2 (2G2)	55
4.4	Post-embedding Immunogold-Markierung	58
5	DISKUSSION	60
6	LITERATURVERZEICHNIS	64
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	75
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	78
9	TABELLENVERZEICHNIS	79
10	DANKSAGUNG	80
11	LEBENS LAUF	81
12	PUBLIKATION	83

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Ribbonsynapsen sind eine spezielle Form chemischer Synapsen, die in der Retina und den cochleären sowie vestibulären Haarzellen des Ohres eine präzise und gradierte Signalübertragung ermöglichen. Die Ausstattung mit synaptischen Ribbons, an die ein schnell verfügbarer Vesikelpool gebunden ist, erlaubt eine besonders rasche, flexible Signalweiterleitung. In dieser Arbeit erfolgte die Lokalisation des Proteins DMXL2 (auch Rabconnectin3 α) in der Retina. Rabconnectin3 α bildet in verschiedenen chemischen Synapsen zusammen mit Rabconnectin3 β den Vesikel-assoziierten Rabconnectin3-Komplex, der in die Calcium-abhängige Ausschüttung von Neurotransmittern involviert ist. In der Retina wurde dieses Protein bisher nicht erforscht. In Studien an konventionellen chemischen Synapsen des Gehirns wurde eine Bindung dieses Rabconnectin3-Komplexes an Effektoren von Rab3 nachgewiesen, dem in Ribbonsynapsen eine potenzielle Rolle bei der Bindung synaptischer Vesikel an die Ribbons zugeschrieben wird. Außerdem wurde Rabconnectin3 α in Ribbonsynapsen der Haarzellen des Innenohrs mit einer Vesikel-ähnlichen Verteilung gefunden. In neuroendokrinen Zellen steuert Rabconnectin3 α laut Crummy et al. (2019) zusammen mit Rabconnectin3 β und CAPS1 im Komplex mit der V-ATPase den pH-Wert synaptischer Vesikel und gewährleistet damit die vollständige Befüllung synaptischer Vesikel mit Neurotransmittern. Auch in Ribbonsynapsen von Haarzellen wurde von Einhorn et al. (2012) eine Stabilisierung der V-ATPase durch DMXL2 beobachtet. Es ist wahrscheinlich, dass DMXL2 ebenso in der Retina von Bedeutung für die Signalübertragung ist, weshalb seine Anreicherung in murinem Retinagewebe in dieser Arbeit untersucht wurde.

Die Lokalisation von DMXL2 erfolgte mit Hilfe von gegen dieses Protein gerichteten Antikörpern (Klon 2G2 und 12D8) in Immunfluoreszenzfärbungen von Mausretinagewebe. Es wurden sowohl Einzel- als auch Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Referenzantikörpern, die bereits gut charakterisierte Proteine markierten, durchgeführt. Die Immunfluoreszenzsignale wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop und einem konfokalen Mikroskop dokumentiert. Die DMXL2-Immunsignale ließen sich in der IPL und vor allem in der OPL nachweisen und lassen in den Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen die Annahme zu, dass DMXL2 sich in den Ribbonsynapsen der Retina präsynaptisch im Bereich der aktiven Zone befindet. Noch präzisere Aufnahmen gelangen nach der Inkubation von Retinagewebe mit dem gegen DMXL2 gerichteten Antikörperklon 2G2 auf ultrastruktureller Ebene mittels Post-embedding Immunogold-Elektronenmikroskopie. In diesen wurde die Nähe von DMXL2 zu

den synaptischen Ribbons deutlich. Ein Nachweis der Spezifität dieser Antikörper für DMXL2 gelang über einen Western Blot mit einem selbst hergestellten DMXL-Fusionsprotein und einer Präabsorption des Klons 2G2 mit anschließender Nutzung in der Immunfluoreszenzfärbung.

Vor dem Hintergrund, dass es sich bei DMXL2 laut bisherigen Untersuchungen an anderen chemischen Synapsen um ein Vesikel-assoziiertes Protein handelt, legt die Lokalisation der Anreicherung von DMXL2 in der Retina nahe, dass sich das Protein auf dem Ribbon-assoziierten Vesikelpool in den Photorezeptorzellsynapsen befindet. Über Interaktionen des Rabconnectin3-Komplexes mit Rab3-Effektoren könnte es somit an der Bindung von synaptischen Vesikeln an die Ribbons und damit der besonders schnellen Signalweiterleitung in Ribbonsynapsen beteiligt sein. Eine weitere mögliche Funktion von Rabconnectin3 α ist die oben beschriebene, in Synapsen anderer Organe beobachtete Mitwirkung an der Steuerung der Befüllung synaptischer Vesikel mit Neurotransmittern. Dies könnte in einer Synapse, die Informationen einzelner Photonen weiterleiten kann, von großer Bedeutung sein und lässt an die Möglichkeit einer Beeinflussung der visuellen Wahrnehmung bei Fehlen des Rabconnectin3-Komplexes denken.

1.2 Abstract

Ribbon synapses in the retina and in vestibular and auditory hair cells are a specialized form of chemical synapses that use graded potentials to modulate fast and tight coupled signal transmission through continuous neurotransmitter release. They are equipped with synaptic ribbons to which a rapidly available pool of synaptic vesicles is attached. In this work, the protein DMXL2 (also called Rabconnectin3 α) was localized in the retina. In various chemical synapses Rabconnectin3 α and Rabconnectin3 β form the vesicle-associated Rabconnectin3 complex which is involved in calcium-dependent neurotransmitter release. So far there have been no studies regarding DMXL2 in the retina. Studies on conventional chemical synapses in the brain have demonstrated binding of this Rabconnectin3 complex to effectors of Rab3, which is thought to have a potential role in binding synaptic vesicles to ribbons. In addition, Rabconnectin3 α was found in ribbon synapses of hair cells in the inner ear with a vesicle-like distribution. According to Crummy et al. (2019), Rabconnectin3 and CAPS1, connected to V-ATPase, regulate the pH of synaptic vesicles in neuroendocrine cells, ensuring complete filling of synaptic vesicles with neurotransmitters. Stabilization of V-ATPase by DMXL2 was also observed in ribbon synapses of hair cells by Einhorn et al. (2012). It is likely that DMXL2 is equally important for signal transduction in the retina, which is why its enrichment in murine retinal tissue was investigated in this work.

Localization of DMXL2 was realised using DXML2 antibodies (clone 2G2 and 12D8) for immunofluorescence staining of mouse retinal tissue. Both single and double immunofluorescence staining were performed using reference antibodies that labeled already well-characterized proteins. Immunofluorescence signals were documented with an epifluorescence microscope and a confocal microscope. Immuno puncta could be detected in the IPL and especially strong immunostaining in the OPL, the double immunofluorescence images allow the assumption that DMXL2 is located presynaptically at the active zone of retinal ribbon synapses. Even more precise images were obtained using an electron microscope after incubation of murine retinal tissue with the DXML2 antibody clone 2G2, revealing the proximity of DMXL2 to synaptic ribbons. The specificity of 2G2 and 12D8 for DMXL2 was demonstrated by Western blotting and detecting a DMXL fusion protein and by pre-absorption of clone 2G2 followed by its use in immunofluorescence staining experiments.

Given that, according to previous studies on other chemical synapses, DMXL2 is a vesicle-associated protein, the localization of DMXL2 enrichment in the retina suggests that the protein may be located on the ribbon-associated vesicle pool in photoreceptor cell synapses. Thus, via interactions of the Rabconnectin3 complex with Rab3 effectors, it could be involved in the binding of synaptic vesicles to ribbons and therefore in the particularly rapid signal transduction in ribbon synapses. Another possible function of Rabconnectin3 α is the involvement in controlling the filling of synaptic vesicles with neu-

rotransmitters, which has been observed in neuroendocrine cells and hair cells, as described above. It appears that this involvement could be of great importance in the retina, considering that retinal synapses transmit information from single photons. These findings may lead to the conclusion that the absence of the Rabconnectin3 complex would influence visual perception.

2 Einleitung

2.1 Die Retina

Einer der wichtigsten Sinne des Menschen, um sich in der Umwelt zurechtzufinden und mit dieser zu interagieren, ist das Sehen. Die Retina dient zur ersten Verarbeitung von visuellen Informationen und zur Weiterleitung von Lichtsignalen über den Nervus opticus zu höheren Hirnzentren. Somit ist sie die erste Station der Sehbahn (AUMÜLLER et al., 2020; TREPEL, 2021).

2.1.1 Anatomie

Der Bulbus oculi liegt in der Orbita und besitzt eine dreischichtige Wand, die von außen nach innen aus der Tunica fibrosa bulbi, der Tunica vasculosa bulbi (Gefäßhaut, Uvea) und der Tunica interna bulbi (Retina) besteht. Darauf folgt im Inneren des Auges der Glaskörper (Corpus vitreum). Die Tunica fibrosa bulbi setzt sich aus der lichtundurchlässigen Sclera (Lederhaut) und der durchsichtigen Cornea (Hornhaut) am vorderen Teil des Auges zusammen (siehe Abbildung 1). Corpus ciliare, Iris-Stroma und Choroidea (Aderhaut) bilden zusammen die Tunica vasculosa bulbi. Die Retina lässt sich in die Pars optica retinae (Netzhaut), die sich im hinteren Teil des Auges befindet und durch das Vorhandensein der entsprechenden Sinneszellen lichtempfindlich ist, und die Pars caeca retinae im vorderen Teil des Auges einteilen. Der Übergang zwischen diesen beiden Teilen der Retina befindet sich an der Ora serrata. Entwicklungsgeschichtlich ist die Retina ein Anteil des Zwischenhirns (Diencephalon), aus dem erst die Augenbläschen und später die Augenbecher entstehen, die zum Neuroektoderm gezählt werden. Aus den zwei Blättern des Augenbeckers bildet sich die Retina. In der Pars optica retinae werden aus diesen beiden Anteilen das außen gelegene Stratum pigmentosum (Pigmentepithel) und das Stratum nervosum mit Sinnes- und Nervenzellen. Nur an der Ora serrata und an der Austrittsstelle des Nervus opticus (Discus nervi optici) sind das Stratum pigmentosum und das Stratum nervosum zusammengewachsen. An allen anderen Stellen der Netzhaut besteht keine feste Verbindung zwischen den beiden Schichten, was die Gefahr einer Netzhautablösung birgt. Die Pars caeca retinae, die das Epithel des Corpus ciliare (Pars ciliaris retinae) und der Iris (Pars iridica retinae) bildet, besteht ebenfalls aus einem Stratum pigmentosum und einem inneren Stratum epitheliale, das nur im Bereich der Iris gehäuft Pigmente besitzt (zur Übersicht siehe Fachbücher der Anatomie AUMÜLLER et al., 2020; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019).

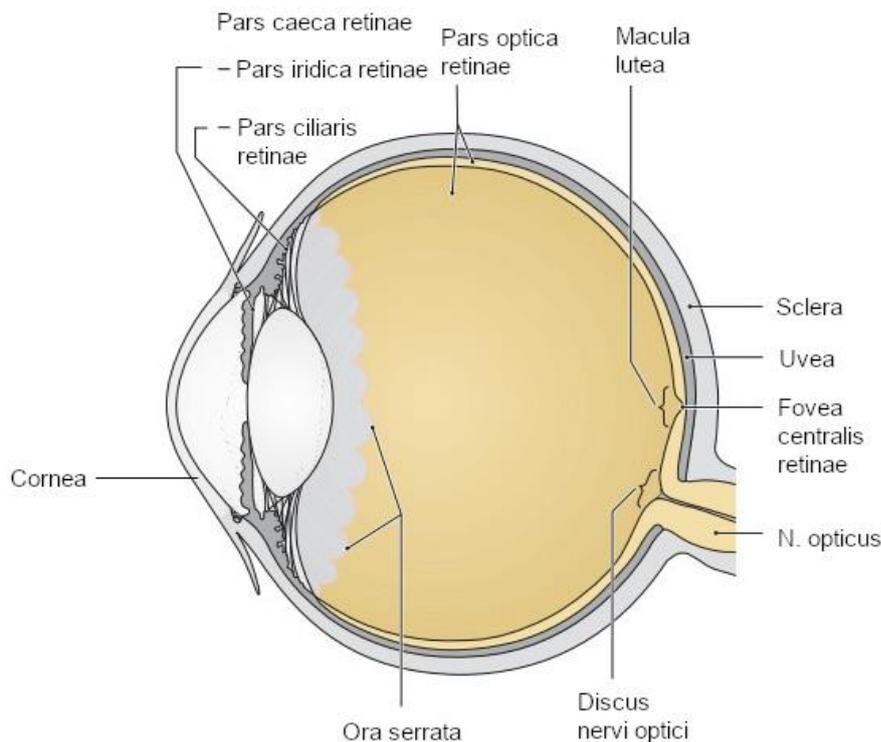


Abbildung 1: Die Schichten des Augapfels und die Anteile der Retina

Abbildung aus Prometheus LernAtlas. Thieme, 4. Aufl. (Beschriftung der ursprünglichen Abbildung leicht modifiziert) (SCHÜNKE et al., 2015).

2.1.2 Histologie

Der lichtempfindliche Teil der Retina, die Pars optica retinae, kann histologisch in 10 Schichten unterteilt werden, von denen 9 das Stratum nervosum bilden. Von außen nach innen unterscheidet man (siehe Abbildung 2a):

1. Pigmentepithel (Stratum pigmentosum)
2. Photorezeptorschicht (Stratum segmentorum externum et internum)
3. Äußere Grenzmembran (Stratum limitans externum)
4. Äußere Körnerschicht (Stratum nucleare externum)
5. Äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum)
6. Innere Körnerschicht (Stratum plexiforme internum)
7. Innere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme internum)
8. Ganglienzellschicht (Stratum ganglionicum)
9. Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum)
10. Innere Grenzmembran (Stratum limitans internum)

(zur Übersicht siehe Fachbücher AUMÜLLER et al., 2020; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019; TREPEL, 2021)

Beim Stratum pigmentosum handelt es sich um ein einschichtiges kubisches Epithel mit in den Zellen eingelagerten Melanosomen. Es befindet sich zwischen dem Stratum nervosum und der Choroidea, von der es durch die mit ihm fest verwachsene Bruch-Membran getrennt ist. Eine Funktion des Pigmentepithels bildet der Stoffaustausch zwischen der gefäßreichen Aderhaut und den Zellen des Stratum nervosum. Weiterhin ermöglicht es die Regeneration des 11-cis-Retinal der Photorezeptorzellen und schirmt die Photorezeptorzellen durch das in den Pigmentzellen enthaltene Melanin von Streulicht ab. Außerdem dient es dem Umsatz von Stoffwechselprodukten aus dem Stratum nervosum, indem abgewiesene Membranbestandteile der Photorezeptorfortsätze phagozytiert werden (AUMÜLLER et al., 2020; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019; TREPEL, 2021).

Die weiteren neun Schichten der Pars optica retinae werden insgesamt als Stratum nervosum bezeichnet. Ganz außen im Stratum segmentorum internum et externum befinden sich nur die Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren, während ihre übrigen Zellanteile in den folgenden Schichten liegen. Es handelt sich bei den Photorezeptoren um primäre Sinneszellen, die die Umwandlung von Lichtreizen in elektrochemische Signale ermöglichen. Man unterscheidet zwei Arten der Photorezeptorzellen: Die sehr helligkeitsempfindlichen Stäbchenzellen (ca. 120 Millionen), die vor allem beim skotopischen Sehen zum Einsatz kommen, und die höher auflösenden, aber weniger lichtsensiblen Zapfenzellen (ca. 6 Millionen), die für eine differenzierte Farbwahrnehmung bei höheren Lichtstärken verantwortlich sind. Beide Zelltypen sind aus einem sensorischen Fortsatz, einem Zellkörper, der sich im Stratum nucleare externum befindet, und einem axonalen Fortsatz im Stratum plexiforme externum aufgebaut. Die sensorischen Fortsätze bestehen aus einem Innensegment, in dem die Produktion der Membranbestandteile der Außensegmente und des Sehpigments stattfindet, und einem lichtsensiblen Außensegment. Dafür besitzen die Außensegmente Membranscheiben, zwischen denen der Sehfärbstoff eingelagert ist. Bei den Stäbchen handelt es sich dabei um Rhodopsin, das sich aus einem Transmembranprotein (Opsin) und einem Molekül 11-cis-Retinal (Derivat von Vitamin A) zusammensetzt. Durch Lichteinfall wird 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal umgewandelt, sodass sich die Konformation des Rhodopsins ändert. Dies führt über sich schließende Na^+/K^+ -Kanäle in der Membran der Außensegmente, was eine Beendigung des bei Dunkelheit vorliegenden Einstroms von Ionen bedeutet, zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran. Hierbei handelt es sich um eine Besonderheit der Photorezeptorzellen, da die Signalübertragung in konventionellen chemischen Synapsen in der Regel über eine auf einen Reiz folgende Depolarisation und vermehrte Glutamatausschüttung stattfindet (siehe Abschnitt 2.2.2). Über eine somit bei Lichteinwirkung verminderte Glutamatausschüttung aus synaptischen Vesikeln folgt die Weiterleitung des Signals über die Synapse an ein nachfolgendes Neuron. Dementsprechend sind die Photorezeptoren das erste Neuron der Sehbahn und der Ort der Umwandlung von Lichtreizen in neuronale Signale (AUMÜLLER et al., 2020; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019; TREPEL, 2021).

In den weiteren Schichten kommen vier verschiedene Arten von Neuronen vor: Bipolare Zellen, amakrine Zellen, Horizontalzellen und Ganglienzellen. Bei Letzteren handelt es sich um die einzigen Neurone der Retina, die nicht nur innerhalb der Retina Verschaltungen besitzen, sondern über den N. opticus eine Weiterleitung der optischen Reize in höher gelegene Hirnzentren ermöglichen. Betrachtet man den direkten Signalweg, lassen sich die Photorezeptorzellen (insgesamt etwa 126 Millionen) als 1. Neuron der Sehbahn bezeichnen, die Bipolarzellen als 2. Neuron und die Ganglienzellen (ca. 1 Millionen), die als erste Neuronart in dieser Reihe nicht nur ein Rezeptor- sondern auch ein Aktionspotential entwickeln können, als 3. Neuron (siehe Abbildung 2b). Die Horizontal- und amakrinen Zellen stellen innerhalb der Retina Verknüpfungen zwischen signalweiterleitenden Zellen her und ermöglichen somit vor allem eine bessere Wahrnehmung von Kontrasten und Bewegung (AUMÜLLER et al., 2020; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019; TREPEL, 2021).

An Stratum pigmentosum und Stratum segmentorum externum et internum schließt sich in Richtung des Glaskörpers die 3. Schicht der Retina an: Die äußere Grenzmembran setzt sich aus Fortsätzen von Gliazellen zusammen, bei denen es sich in der Retina typischerweise um Müllerzellen, eine Unterform der Astroglia, handelt. Diese Zellen durchziehen mit ihren Fortsätzen die gesamte Pars nervosa. Im Stratum nucleare externum, der 4. Retinaschicht, finden sich die Somata der Photorezeptorzellen. Darauf folgt als 5. Schicht das Stratum plexiforme externum, in dem die axonalen Fortsätze der Photorezeptorzellen (1. Neuron) auf die Dendriten der bipolaren Zellen (2. Neuron) treffen. Über Synapsen und Gap Junctions findet hier die Signalweiterleitung statt, die durch Horizontalzellen moduliert werden kann. In der 6. Schicht, dem Stratum nucleare internum, befinden sich die Perikaryen der Bipolar-, Horizontal- und amakrinen Zellen sowie der Müllerzellen. Bei den Bipolarzellen handelt es sich um Glutamat freisetzende Neurone. Die Horizontal- und amakrinen Zellen werden als hemmende Interneurone bezeichnet, welche die Transmitter GABA (Gamma-Aminobuttersäure) und Glycin ausschütten. Während die Horizontalzellen vor allem auf die Signalweiterleitung im Stratum plexiforme externum Einfluss nehmen, findet man die synaptischen Fortsätze der amakrinen Zellen überwiegend im Stratum plexiforme internum, der 7. Retinaschicht. Hier erfolgt die synaptische Signalübertragung von den axonalen Fortsätzen der Bipolarzellen zu den Dendriten der retinalen Ganglienzellen, die von den amakrinen Zellen moduliert wird. Die 8. Schicht, das Stratum ganglionicum, besteht aus den Zellkörpern der multipolaren Ganglienzellen und die 9. Retinaschicht, das Stratum neurofibrarum, aus deren Axonen. Diese Axone besitzen im Bereich der Retina noch keine Myelinschicht und erstrecken sich bis zur Papilla nervi optici, von wo aus sie myelinisiert im N. opticus zu höheren Hirnzentren ziehen. Außerdem befinden sich im Stratum neurofibrarum die Netzhautgefäße, die von nicht-retinaspezifischen Astrozyten umgeben sind und deren Kapillaren nur bis zum Stratum nucleare internum ziehen. Die darüber liegenden Schichten mit den Zellkörpern der neuronalen Zellen werden mittels Diffusion über das Stratum pigmentosum von der Aderhaut versorgt. Das Stratum limitans inter-

num bildet die 10. Schicht und somit die Abgrenzung zum Corpus vitreum. Es besteht aus den Fortsätzen der Müllerzellen und einer Basalmembran (AUMÜLLER et al., 2020; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019; TREPEL, 2021).

Aus diesem Aufbau geht hervor, dass der Signaltransfer in der Retina in entgegengesetzter Richtung zum Lichteinfall erfolgt. Das Licht durchquert zunächst alle Schichten der Retina, bevor es auf die Außensegmente der Photorezeptorzellen trifft, sodass Umwandlung und Weiterleitung der optischen Reize beginnen. Sowohl in der Fovea centralis als auch in der Papilla nervi optici unterscheidet sich der Aufbau der Retina von den bisher beschriebenen Schichten. Die Fovea centralis ist der Ort, der die größte Sehschärfe ermöglicht, und besitzt in der Retina die höchste Zapfendichte. Außerdem sind hier die vor den Photorezeptorzellen liegenden Anteile der Retina an den Rand verlagert und die Sinneszellen 1:1 von Photorezeptor- zu Bipolarzelle sowie zu einer Ganglienzelle verschaltet. An der Stelle der Papilla nervi optici finden sich keine Photorezeptorzellen, sondern die Axone der retinalen Ganglienzellen, die sich als N. opticus zusammenschließen und den Bulbus verlassen (AUMÜLLER et al., 2020; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019; TREPEL, 2021).

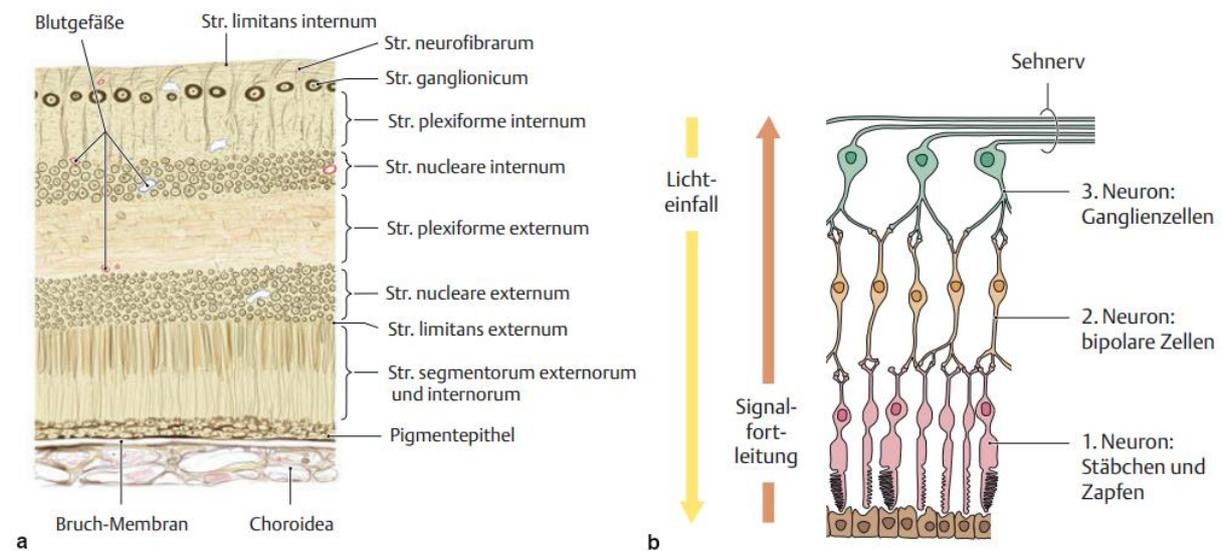


Abbildung 2: Aufbau der Retina

- a) Schichten der Pars optica retinae
- b) Schematische Darstellung der 3 Neuronen der direkten Signalübertragung der Sehbahn

Abbildungen aus Prometheus LernAtlas. Thieme, 4. Aufl. (Beschriftung der Abbildung 2a wurde leicht modifiziert) (SCHÜNKE et al., 2015).

2.2 Synapsentypen

Synapsen sind die Verbindung zur Signalweiterleitung von Neuronen zu nachfolgenden Zellen, bei denen es sich ebenfalls um Neurone oder Zellen der Erfolgsorgane handeln kann. Man unterscheidet

grundsätzlich zwei Arten von Synapsen: die elektrische Synapse und die im Nervensystem häufiger vorkommende chemische Synapse (LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019).

2.2.1 Elektrische Synapse

Bei elektrischen Synapsen besteht der Kontakt zwischen zwei Zellen in Form von Gap Junctions. Ohne zeitliche Unterbrechung erfolgt die Signalweiterleitung durch direkten Ionenstrom und ist nicht richtungsgebunden, was einen schnellen Signalaustausch ermöglicht. Diese Form der Synapse ist typisch für das Herz- und glatte Muskelgewebe, im Nervensystem als alleiniger Mechanismus der Erregungsübertragung eher selten. In der Retina treten Gap Junctions beispielsweise gelegentlich als elektrische Verknüpfungen zwischen Endköpfchen von Stäbchenzellen auf (AUMÜLLER et al., 2020; LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019; TREPEL, 2021).

2.2.2 Chemische Synapse

Je nach beteiligten Zellen unterscheiden sich chemische Synapsen in ihrem Aufbau. Chemische Synapsen, die an der Signalübertragung zwischen zwei Neuronen beteiligt sind, bestehen im Wesentlichen aus einer präsynaptischen Membran, synaptischen Vesikeln, einem synaptischen Spalt und einer postsynaptischen Membran (siehe Abbildung 3). Die präsynaptische Membran ist ein Teil des Neurons, von dem die Signalübertragung ausgeht. Dessen Zellkörper entspringt ein axonaler Fortsatz, an dessen Ende sich knöpfchenförmige Verdickungen befinden, die zum Aufbau der Synapse gehören. Im Zytoplasma der Endknöpfchen findet man die mit Transmittern gefüllten Vesikel, die einen Durchmesser von ca. 40 nm besitzen. Zwischen der präsynaptischen und der postsynaptischen Membran liegt der etwa 20-30 nm breite synaptische Spalt. Die postsynaptische Membran gehört zu dem Neuron, auf das ein Signal übertragen wird (LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019).

Wird über das Axon eines Neurons ein Aktionspotential weitergeleitet, führt dies zur Depolarisation der Membran des Endknöpfchens und hat zur Folge, dass synaptische Vesikel ihre enthaltenen Transmitter über Exozytose in den synaptischen Spalt freisetzen. Dort binden die Transmitter an Rezeptoren der postsynaptischen Membran, was eine elektrische Veränderung der Membran der nachfolgenden Zelle bewirkt. Bei der postsynaptischen Membran handelt es sich zum Beispiel um Dendriten einer nachfolgenden Zelle. Besitzt eine Nervenzelle viele Dendriten, kann sie über diese an mehreren synaptischen Verbindungen Signale empfangen, die am Soma der Zelle aufsummiert werden. Bei einem Neuron als Empfängerzelle kann dies zur Ausbildung eines weiteren Aktionspotentials führen. Die Signalweiterleitung an chemischen Synapsen ist diskontinuierlich und erfolgt nur in eine Richtung. Beendet wird die Transmitterwirkung durch enzymatische Spaltung der Neurotransmitter im synaptischen Spalt oder durch Endozytose zurück in die präsynaptische Zelle. Ultrastrukturell sind sowohl an der prä- als auch an der postsynaptischen Membran Verdichtungen zu erkennen, was eine Ansamm-

lung von Substanz mit hoher Elektronendichte bedeutet. Präsynaptisch sind die Verdichtungen mit assoziierten Vesikeln die aktiven Zonen. Hier findet die Exozytose statt. Postsynaptisch kennzeichnen die Verdichtungen Stellen, an denen sich Rezeptoren befinden (LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019).

Durch die von einem eintreffenden Aktionspotenzial ausgelöste Depolarisation öffnen sich spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran, was die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol des synaptischen Boutons ansteigen lässt. Indem Ca^{2+} an Synaptotagmin bindet, kommt es zum Zusammenspiel von SNAP-25 (Synaptosomal-assoziiertes Protein, 25 kDa) und Syntaxin (beide Bestandteile der präsynaptischen Membran) mit Synaptobrevin, das sich in der Membran der Vesikel befindet. Dies führt zur Verschmelzung der präsynaptischen und der Vesikelmembranen jener Vesikel, die sich bereits in der aktiven Zone befinden, und damit zur Exozytose von Transmittern aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt. Handelt es sich beim Rezeptor der postsynaptischen Membran um einen Liganden-gesteuerten Ionenkanal, führt ein erregender Transmitter wie Glutamat zu einem Kationeneinstrom aus Na^+ und teilweise Ca^{2+} in die postsynaptische Zelle. Zwar tritt auch ein vermehrter K^+ -Ausstrom aus der Zelle auf, doch aufgrund des hohen Na^+ -Gradienten überwiegt der Kationeneinstrom. Die Folge ist eine Depolarisation der postsynaptischen Membran, das exzitatorische postsynaptische Potenzial (EPSP). Werden an einer nachfolgenden Zelle viele Depolarisationen ausgelöst, kann dies durch räumliche und zeitliche Summation zur erneuten Generierung eines Aktionspotenzials und somit zur Fortleitung des Signals an eine weitere Zelle führen. Inhibitorische Transmitter wie GABA oder Glycin führen an der postsynaptischen Membran zu einer Hyperpolarisation, indem sie die Membran leitfähiger für K^+ oder Cl^- werden lassen. Durch die gesteigerte Leitfähigkeit für diese Ionen fallen Depolarisationen entstehender EPSPs geringer aus, womit die Signalweiterleitung am postsynaptischen Neuron gehemmt wird (SILBERNAGL et al., 2018).

Abhängig davon, wie häufig eine Synapse zur Signalweiterleitung von den Zellen genutzt wird, können sich Struktur und Funktion verändern. Die neuronale Plastizität kann sich in einer vermehrten Bereitstellung von synaptischen Vesikeln äußern sowie in Veränderungen der Eigenschaften und Anzahl postsynaptischer Rezeptoren und der Ausprägung synaptischer Kontakte (LÜLLMANN-RAUCH, ASAN, 2019).

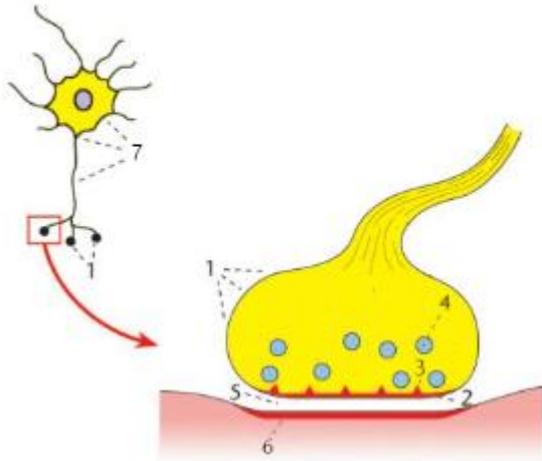


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus einer konventionellen chemischen Synapse

1) Präsynaptische Terminale, 2) präsynaptische Membran, 3) aktive Zonen, 4) synaptische Vesikel, 5) synaptischer Spalt, 6) postsynaptische Verdichtungszone, 7) Nervenzelle (Überblick).

Abbildung modifiziert aus Neuroanatomie (Struktur und Funktion), Elsevier, Urban & Fischer, 8. Aufl. (TREPEL, 2021).

2.3 Ribbonsynapsen

Neuronen der Retina erfassen eine große Bandweite an Reizen unterschiedlicher Intensität, weshalb sie ein genau abgestimmtes und anpassungsfähiges System der Signalweiterleitung benötigen (SCHMITZ, 2009). Diese Aufgabe erfüllen sie mit Hilfe von Ribbonsynapsen, einer speziellen Form von chemischen Synapsen für graduierte und besonders schnelle Signalübertragung ohne die für konventionelle chemische Synapsen typischen Aktionspotentiale (FUCHS et al., 2003; JUUSOLA et al., 1996; SCHMITZ et al., 2000). Ribbonsynapsen werden ausgebildet von den Photorezeptorzellen und Bipolarzellen der Retina, den cochleären und vestibulären Haarzellen im Ohr (FUCHS et al., 2003; STERLING, MATTHEWS, 2005) sowie in Sensoren zur Wahrnehmung von elektrischen Feldern (SEJNOWSKI, YODLOWSKI, 1982; zitiert nach SZABO, 1974).

Ribbonsynapsen enthalten größtenteils die gleichen Proteine wie konventionelle Synapsen (ULLRICH, SÜDHOF, 1994). Synapsin und Rabphilin fehlen in manchen Spezies in Ribbonsynapsen, während sie von anderen exprimiert werden, was gegen eine grundlegende Rolle dieser Proteine in der Funktion von Ribbonsynapsen spricht (MANDELL et al., 1990; VON KRIEGSTEIN et al., 1999). Ein Protein, das nicht in Ribbonsynapsen der Retina vorkommt, ist das Syntaxin 1, ein wichtiger Bestandteil des SNARE-Komplexes für die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran in konventionellen Synapsen (MORGANS et al., 1996; ULLRICH, SÜDHOF, 1994). Stattdessen konnte in den Photorezeptoren und Bipolarzellen der Retina Syntaxin 3 nachgewiesen werden (MORGANS et al., 1996). Ein weiteres Charakteristikum der Ribbonsynapsen ist, dass bei ansonsten scheinbar gleichen Mechanismen bezüglich des Calciumeinstroms, da die Transmitterfreisetzung wie in konventio-

nellen Synapsen durch erhöhte Calciumspiegel gesteuert wird, statt N-, P-, Q- oder R-Typ-Calciumkanälen, die sonst im zentralen Nervensystem in Synapsen vorkommen, spannungsgesteuerte L-Typ-Calciumkanäle an der Signalweiterleitung beteiligt sind (HEIDELBERGER, MATTHEWS, 1992; MATTHEWS, FUCHS, 2010; MORGANS et al., 1996; NACHMAN-CLEWNER et al., 1999; SCHMITZ et al., 2000; TAKAHASHI, MOMIYAMA, 1993).

Ein zentrales und namensgebendes Element der Ribbonsynapsen, das sie von konventionellen chemischen Synapsen unterscheidet, sind die Ribbons (SJÖSTRAND, 1953; STERLING, MATTHEWS, 2005). Tangential angeschnitten erscheinen Ribbons band- oder plattenförmig (SCHMITZ, 2009). In Photorezeptorzellen sitzen sie an einer bogenförmigen Verdichtung der präsynaptischen Membran über dem synaptischen Spalt. Entlang dieser Verdichtung über einer Membranwölbung besitzen die Ribbons die Form von Hufeisen. An der Stelle, an der ein Ribbon über die bogenförmige Verdichtung mit der präsynaptischen Membran verbunden ist, befindet sich die aktive Zone. Nach Glutaraldehyd/Osmium-Fixation lässt sich im Querschnitt der Ribbons im Elektronenmikroskop darstellen, dass diese aus 3 Lamellen aufgebaut sind, von denen die äußeren beiden elektronendicht sind und die mittlere elektronendurchlässig (WAGNER, 1997). Es wird außerdem sichtbar, dass an einen Ribbon zahlreiche Vesikel über dünne, elektronendichte Strukturen gebunden sind (SCHMITZ, 2009). Diese stielartigen Verbindungen sind jeweils 20-30 nm lang (RAO-MIROTZNIK et al., 1995).

Neben oberflächlichen synaptischen Kontakten (DOWLING, WERBLIN, 1969) bestehen an Ribbonsynapsen von Photorezeptorzellen in der äußeren plexiformen Schicht Kontakte mit nachfolgenden Zellen über Einstülpungen der präsynaptischen Membran (DE ROBERTIS, FRANCHI, 1956; DOWLING, BOYCOTT, 1966; SJÖSTRAND, 1958): Die Ribbons in Photorezeptorzellen bilden eine Triade oder Tetrade mit zwei an den Seiten lokalisierten Dendriten von Horizontalzellen und ein oder zwei zentralen Dendriten von Bipolarzellen (DOWLING, BOYCOTT, 1966; DOWLING, WERBLIN, 1969; HAVERKAMP et al., 2001; RAO-MIROTZNIK et al., 1995)(siehe Abbildung 4). 1 μm^2 Fläche der Retina scheint die durchschnittliche Größe der Triade aus präsynaptischem Ribbon, den zwei Fortsätzen von Horizontalzellen und ein oder zwei Dendriten von Bipolarzellen zu sein (HAVERKAMP et al., 2001). Zur Fovea hin nimmt die Anzahl der Ribbons in Fortsätzen der Zapfenphotorezeptorzellen ab, wobei es sich um das Resultat einer abnehmenden Größe dieser Fortsätze zur Fovea hin handelt. In Stäbchensynapsen von Säugetieren findet sich pro Synapse ein Ribbon an einer aktiven Zone (RAO-MIROTZNIK et al., 1995). Dort sind pro Ribbon etwa 130 Vesikel direkt an der aktiven Zone gebunden und ca. 640 weiter entfernt von der aktiven Zone als Reservevesikel. Eine Zapfensynapse hingegen enthält $11,6 \pm 0,9$ Ribbons (STERLING, 2003). Deren Länge liegt zwischen 0,2 und 3,5 μm , beträgt insgesamt pro Synapse im Schnitt aber $9,9 \pm 0,9 \mu\text{m}$, sodass die Gesamtribbonlänge konstant bleibt. Daraus ergeben sich etwa 600 Bindungsstellen für direkt verfügbare Vesikel und 3000 weitere für einen Pool von Ribbon-assoziierten Reservevesikeln. Dass in Zapfensynapsen

ungefähr fünfmal so viele Vesikel angedockt und als Reserve gebunden werden können wie in Stäbchensynapsen, legt nahe, dass eine höhere Ribbongröße und -anzahl auf eine hohe Informationsfrequenz zurückzuführen sind (DE RUYTER VAN STEVENINCK, LAUGHLIN, 1996; STERLING, MATTHEWS, 2005).

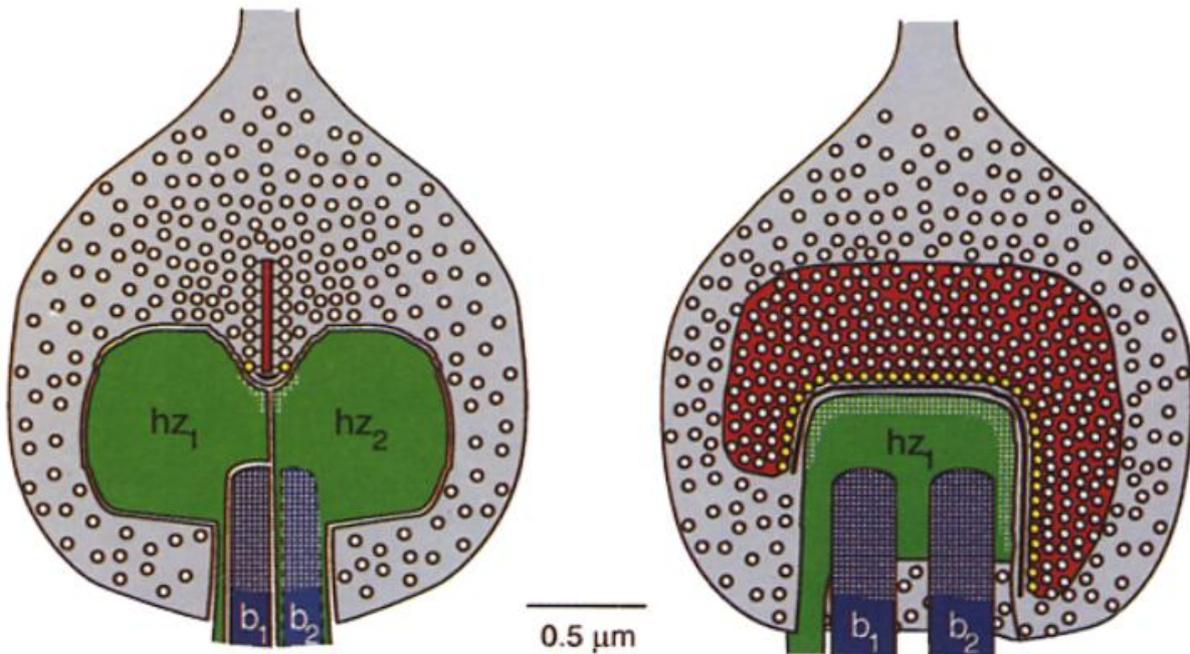


Abbildung 4: Übersicht über die Ribbonsynapse einer Stäbchenphotorezeptorzelle

Links ist der stabförmig erscheinende Querschnitt eines Ribbons dargestellt, rechts lässt sich die Plattenform des Ribbons entlang der aktiven Zone erkennen. In den synaptischen Endknöpfchen sind viele Vesikel sichtbar, die Reihe an synaptischen Vesikeln direkt an der aktiven Zone an der Basis der Ribbons ist gelb markiert. In der Einstülpung der präsynaptischen Membran ist die Tetrade aus zwei Fortsätzen von Horizontalzellen (hz_1 , hz_2) und zwei Dendriten von Bipolarzellen (b_1 , b_2) abgebildet (RAO-MIROTZNIK et al., 1995).

Abbildung aus Rao-Mirotnik et al. (RAO-MIROTZNIK et al., 1995).

Die große Menge an noch nicht angedockten, aber als Reserve an den Ribbons schnell verfügbaren Vesikeln zur Exozytose unterscheidet die aktive Zone einer Ribbonsynapse von der einer konventionellen (STERLING, MATTHEWS, 2005), in der sich lediglich etwa 10-100 synaptische Vesikel nahe der präsynaptischen Membran an der aktiven Zone befinden (HEIDELBERGER et al., 2005).

Im Dunkeln findet eine durchgehend hohe Transmitterausschüttung in Ribbonsynapsen von Photorezeptorzellen statt (HEIDELBERGER et al., 2005; SCHMITZ, 2009). Bei maximalen Ausschüttungsraten von 500 Vesikeln/s/Ribbon können kleine Intensitätsunterschiede des Lichts wahrnehmbare Signalunterschiede auslösen. Diese gesteigerten Ausschüttungsraten spiegeln sich auch in der Struktur der Ribbons wider, deren Erscheinungsbild sich verändern kann (BALKEMA et al., 2001; SPIWOKS-BECKER et al., 2004; VOLLRATH, SPIWOKS-BECKER, 1996). In der Retina von Mäusen wird bei Lichteinfall Substanz von den Ribbons in Stäbchenphotorezeptoren entfernt, während im Dunkeln

neue Bestandteile hinzugefügt werden (ADLY et al., 1999; SCHMITZ, 2009; SPIWOKS-BECKER et al., 2004; VOLLRATH, SPIWOKS-BECKER, 1996). Somit sind die Ribbons bei hoher Exozytoserate im Dunkeln länger als bei niedrigerer Rate unter Lichteinfluss (BALKEMA et al., 2001; SPIWOKS-BECKER et al., 2004). Diese Strukturveränderung wird möglich durch Abtrennung kleiner runder Ribbonanteile von der nicht an der bogenförmigen Verdichtung verankerten Ribbonseite, wodurch die Höhe der Ribbons abnimmt (SCHMITZ, DRENCKHAHN, 1993). Gleichzeitig verringert sich auch die Länge der Ribbons entlang der aktiven Zone (DEMBLA et al., 2020). Trotz Unterschieden bezüglich der Länge der aktiven Zone in Abhängigkeit von der Genetik oder des zirkadianen Rhythmus der Mäuse, wird dieser Prozess auch unabhängig vom zirkadianen Rhythmus durch Lichteinfluss gesteuert, sodass Änderungen der Ribbonlänge innerhalb von Minuten möglich sind (DEMBLA et al., 2020; SPIWOKS-BECKER et al., 2004).

2.3.1 Zusammensetzung der Ribbons

Das einzige bekannte Protein, das ausschließlich im Zusammenhang mit Ribbonsynapsen lokalisiert werden konnte, ist RIBEYE (SCHMITZ et al., 2000). RIBEYE besitzt eine Masse von 120 kDa (SCHMITZ et al., 2000) und scheint die Hauptkomponente der Ribbons zu sein, indem es deren größten Anteil ausmacht (ZENISEK, 2004). Das Protein besteht aus einer einzigartigen A-Domäne und einer B-Domäne, die abgesehen von den ersten 20 Aminosäuren der Proteinsequenz identisch mit dem in Zellkernen verbreiteten Korepressor C-terminal-Binding-Protein 2 (CtBP2) ist (SCHMITZ et al., 2000). RIBEYE und CtBP2 werden von unabhängigen Promotoren des gleichen Gens kodiert, wobei es sich bei RIBEYE um ein Fusionsprotein mit einer neuen Funktion aus dem in vielen Geweben vorliegenden CTBP2 und einer sonst nicht vorkommenden N-Domäne handelt. Während der A-Domäne eine strukturelle Rolle zugeschrieben wird, bindet die B-Domäne Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) und es wird angenommen, dass sie auf der zytoplasmatischen Seite der Ribbons liegt, was sie für Interaktionen mit anderen Proteinen zugänglich machen würde (ALPADI et al., 2008; MAGUPALLI et al., 2008; SCHMITZ et al., 2000; WAN, 2005; ZENISEK, 2004). Für die Struktur der Ribbons sind sowohl die RIBEYE-A-Domäne als auch die B-Domäne essenziell (SHANKHWAR et al., 2022). Über 3 Bindungsstellen kann die A-Domäne von RIBEYE mit anderen RIBEYE-A-Domänen interagieren (MAGUPALLI et al., 2008). Interaktionen der B-Domäne können über zwei verschiedene Bindungsstellen sowohl mit anderen RIBEYE-B-Domänen als auch mit A-Domänen stattfinden. Letztere werden durch NADH gehemmt, die Interaktionen zwischen RIBEYE-B-Domänen untereinander hingegen werden durch NADH begünstigt, was sich aus der Dimerisierung von CtBP2 bei erhöhten NADH-Konzentrationen schließen lässt (MAGUPALLI et al., 2008; THIO, 2004). Durch diese vielen Interaktionen bildet RIBEYE das Gerüst der Ribbons (siehe Abbildung 5),

wobei angenommen wird, dass weitere Proteine an der Stabform der Ribbons beteiligt sind (MAGUPALLI et al., 2008).

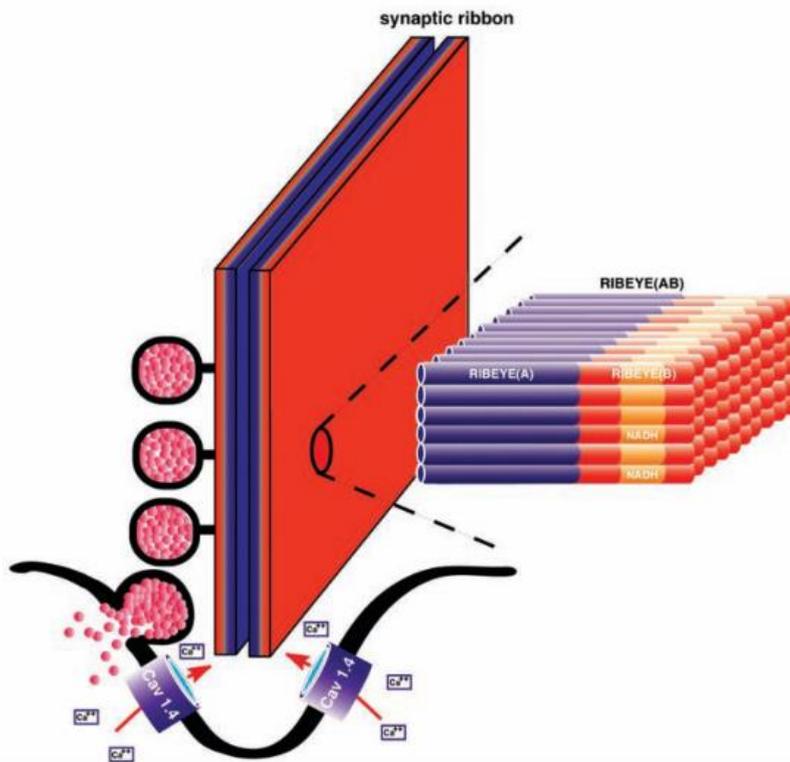


Abbildung 5: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines synaptischen Ribbons

RIBEYE besteht aus einer A- und einer B-Domäne, die miteinander und untereinander interagieren, sodass durch viele Interaktionen das Gerüst der Ribbons entsteht (SCHMITZ, 2009). Die RIBEYE-B-Domäne bindet außerdem NADH, das hemmend auf Interaktionen der unterschiedlichen RIBEYE-Domänen A und B miteinander wirkt. Entlang des Ribbons sind synaptische Vesikel dargestellt und an der Basis sind die spannungsgesteuerten L-Typ Calciumkanäle (Cav1.4) zu erkennen.

Abbildung aus Schmitz 2009, dort modifiziert aus Magupalli et al. 2008 (MAGUPALLI et al., 2008; SCHMITZ, 2009).

Die bisher bekannten Proteine, die neben RIBEYE ebenfalls am Aufbau der Ribbons beteiligt sind, kommen nicht ausschließlich in Ribbonsynapsen, sondern auch in anderen chemischen Synapsen vor (SCHMITZ, 2009; TOM DIECK, BRANDSTÄTTER, 2006). Eins dieser Proteine ist CtBP1, das der RIBEYE-B-Domäne sehr ähnlich ist und wie diese als Bestandteil der Ribbons an die Proteine Piccolo und Bassoon bindet (MOSER et al., 2020; SCHMITZ, 2009; SCHOCH, GUNDELFINGER, 2006; TOM DIECK et al., 2005). Anders als RIBEYE ist es für die Struktur und Funktion der Ribbons nicht notwendig (MOSER et al., 2020; VAITHIANATHAN et al., 2013).

Piccolo und Bassoon befinden sich sowohl in konventionellen als auch in Ribbonsynapsen an der aktiven Zone (ALTROCK et al., 2003; BUTOLA et al., 2017; DICK et al., 2001; DICK et al., 2003; SCHOCH, GUNDELFINGER, 2006). In konventionellen Synapsen sind sie an der Organisation der aktiven Zone und dem Nachschub an synaptischen Vesikeln beteiligt (DAVYDOVA et al., 2014; MENDOZA SCHULZ et al., 2014; MUKHERJEE et al., 2010). Ihre Abwesenheit führt zu keinen

erheblichen Veränderungen in der Struktur der aktiven Zonen konventioneller chemischer Synapsen (BUTOLA et al., 2017; MENDOZA SCHULZ et al., 2014). In Ribbonsynapsen von Photorezeptorzellen hingegen führt ein Fehlen von Bassoon zu deutlichen Umgestaltungen (DICK et al., 2003; MOSER et al., 2020). Es entsteht der Eindruck schwebender Ribbons, die nicht mehr an der aktiven Zone verankert sind, weshalb angenommen wird, dass Bassoon in Ribbonsynapsen von Photorezeptoren an der Verankerung der Ribbons in der aktiven Zone beteiligt ist (DICK et al., 2003; SCHOCH, GUNDELFINGER, 2006; TOM DIECK et al., 2005). Von dem Protein Piccolo existiert die für Ribbonsynapsen spezifische Splicevariante Piccolino, die zur Ribbonstruktur beiträgt (MÜLLER et al., 2019; REGUS-LEIDIG et al., 2014; REGUS-LEIDIG et al., 2013). In Knockdown-Experimenten wurde sichtbar, dass synaptische Ribbons in Stäbchenphotorezeptoren bei Abwesenheit von Piccolino nicht mehr ihre typische Struktur besitzen, sondern in kleineren Einheiten an der präsynaptischen Membran verankert sind, da Interaktionen zwischen RIBEYE und Piccolino zur länglichen Plattenform der Ribbons führen (MÜLLER et al., 2019; REGUS-LEIDIG et al., 2014). Sowohl Piccolo als auch Bassoon interagieren also direkt mit RIBEYE (GUNDELFINGER et al., 2015; IVANOVA et al., 2015; TOM DIECK et al., 2005).

2.3.2 Bereitstellung synaptischer Vesikel in Ribbonsynapsen

Knockout-Experimente an Mäusen haben gezeigt, dass RIBEYE nicht für den Vorgang der Vesikelschmelzung, sondern für die rasche sowie andauernde Calcium-abhängige Vesikelbereitstellung für die Exozytose notwendig ist (MAXEINER et al., 2016). In der präsynaptischen Membranwölbung in Stäbchensynapsen, wo an der bogenförmigen Verdichtung die Ribbons in der aktiven Zone verankert sind, befinden sich viele L-Typ spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (Cav1.4) (SCHMITZ, 2009) (siehe Abbildung 5). Die Vesikelfreisetzung ist in Stäbchenbipolarzellen eng mit der Öffnung von präsynaptischen Calciumkanälen verknüpft (JARSKY et al., 2010; MAXEINER et al., 2016) und die durch Lichteinflüsse variierte Anwesenheit spannungsgesteuerter L-Typ Cav-1.4-Kanäle direkt an der aktiven Zone in großer Zahl, die bei Vorhandensein von Ribbons bei Dunkeladaptation noch zunimmt, wird durch RIBEYE stabilisiert (DEMBLA et al., 2020). Es konnte nachgewiesen werden, dass Ribbonlänge und die Größe der aktiven Zone korrespondieren. Auf diese Weise tragen die Ribbons zur präzisen Kopplung der spannungsgesteuerten Calciumkanäle mit den zur Ausschüttung bereiten synaptischen Vesikeln an der aktiven Zone bei (BARTOLETTI et al., 2011; DEMBLA et al., 2020; MAXEINER et al., 2016).

Sowohl für die schnelle als auch die langanhaltende Vesikelausschüttung müssen die Vesikel sofort verfügbar direkt an der aktiven Zone vorliegen (MAXEINER et al., 2016; SCHMITZ, 2009). Ribbongebundene Vesikel sind im Vergleich zu den restlichen synaptischen Vesikeln im Endknöpfchen einer Ribbonsynapse relativ unbeweglich, es findet also kein deutlicher Austausch zwischen dem zytoplas-

matischen und dem Ribbon-assoziierten Vesikelpool statt, solange die Ribbonseiten Vesikel gebunden haben (HOLT et al., 2004; LOGIUDICE et al., 2008; REA et al., 2004; SCHMITZ, 2009). Im Gegensatz zu 50% der synaptischen Vesikel im Zytoplasma sind nur 20% der am Ribbon befindlichen Vesikel beweglich (LOGIUDICE et al., 2008). Während sich an der präsynaptischen Membran angedockte Vesikel in konventionellen Synapsen häufig ohne das Stattfinden einer Transmitterausschüttung wieder von der aktiven Zone entfernen, bleiben Ribbon-assoziierte Vesikel an die Ribbons gekoppelt und lösen sich größtenteils nur durch die Exozytose (LOGIUDICE et al., 2008; SCHMITZ, 2009; ZENISEK, 2008; ZENISEK et al., 2000). Nach der Exozytose werden aus dem sehr beweglichen Pool an synaptischen Vesikeln wieder einige Vesikel relativ fest an die Ribbons gebunden (HOLT et al., 2004; REA et al., 2004). Für Ribbonsynapsen wurden 3 verschiedene Vesikelpools beschrieben (SCHMITZ, 2009; THORESON, 2007; VON GERSDORFF, 2001). Es wird angenommen, dass die unterste Reihe Ribbon-assoziiierter Vesikel, die bereits an der aktiven Zone angedockt hat, den schnell verfügbaren Teil der Vesikel bildet und die anderen Ribbon-gebundenen Vesikel für die langsamere Signalweiterleitung zur Verfügung stehen. Der dritte Vesikelpool besteht aus den frei beweglichen synaptischen Vesikeln, die nicht an Ribbons gebunden sind und als Reserve gelten (BALKEMA et al., 2001; SCHMITZ, 2009; THORESON, 2007).

Die Vesikel können überall an den Seiten der Ribbons gebunden werden und sich an der Ribbonoberfläche frei bewegen, werden aber nur an der Basis der Ribbons, wo sich die aktive Zone befindet, freigesetzt (THORESON, 2021; VAITHIANATHAN, MATTHEWS, 2014; WEN et al., 2018). Da sich die Vesikel an den Ribbons bewegen können, muss es sich bei den fadenartigen Bindungen der Vesikel um relativ schwache Verbindungen handeln, die andererseits in ihrer Zahl stark genug sind, dass die Vesikel sich nicht mehr von den Ribbons entfernen, bevor es an der Basis der Ribbons zur Fusion kommt (THORESON, 2021). Die Vesikel bewegen sich an den Ribbons entlang in Richtung der Basis, indem dort nach Vesikelfreisetzung durch Fusion mit der präsynaptischen Membran Platz für nachrückende Vesikel entsteht (GRAYDON et al., 2014; THORESON, 2021). Da somit nur an der Basis der Ribbons ein Nachrücken möglich ist, erfolgt dieses passiv durch Diffusion der Vesikel ohne dafür benötigte Motorproteine, weshalb für die Freisetzung Ribbon-assoziiierter Vesikel kein ATP benötigt wird (GRAYDON et al., 2014; HEIDELBERGER et al., 2002).

Die B-Domäne von RIBEYE kann mit Lipidkomponenten der synaptischen Vesikel interagieren, was durch die Anwesenheit kleiner Mengen von Lysophospholipiden in den Liposomen und NADH (reduzierte Form) ermöglicht und durch NAD⁺ (oxidierte Form) gehemmt wird (SCHWARZ, SCHMITZ, 2017). NADH begünstigt nicht nur die Bindung von in Vesikelmembranen enthaltenen Liposomen an die RIBEYE-B-Domäne, sondern auch die Spaltung von Lysophospholipiden durch diese (SCHWARZ et al., 2011; SCHWARZ, SCHMITZ, 2017). Dies bedeutet die Entfernung des Phospholipids, das größtenteils verantwortlich für die Bindung der Liposomen an die B-Domäne ist, was

darauf hindeutet, dass die Verbindungen zwischen den Vesikeln und RIBEYE nur schwach und vorübergehend sind (SCHWARZ, SCHMITZ, 2017). Für stabilere Verbindungen bedarf es somit weiterer Interaktionen zwischen den Vesikeln und den synaptischen Ribbons (SCHWARZ, SCHMITZ, 2017).

Diese zusätzlichen Interaktionen könnten das mit den synaptischen Vesikeln assoziierte Protein Rab3 („Ras-related in brain“ (STENMARK, OLKKONEN, 2001; TOUCHOT et al., 1987)) beinhalten (SCHMITZ et al., 2000; SCHWARZ, SCHMITZ, 2017; TIAN et al., 2012; WANG et al., 1997). In Haarzellen der Cochlea wurde Rab3 in der Immunfluoreszenz an den Ribbons lokalisiert und in der Elektronenmikroskopie sowohl an den Ribbons als auch auf den synaptischen Vesikeln (UTHAIAH, HUDSPETH, 2010).

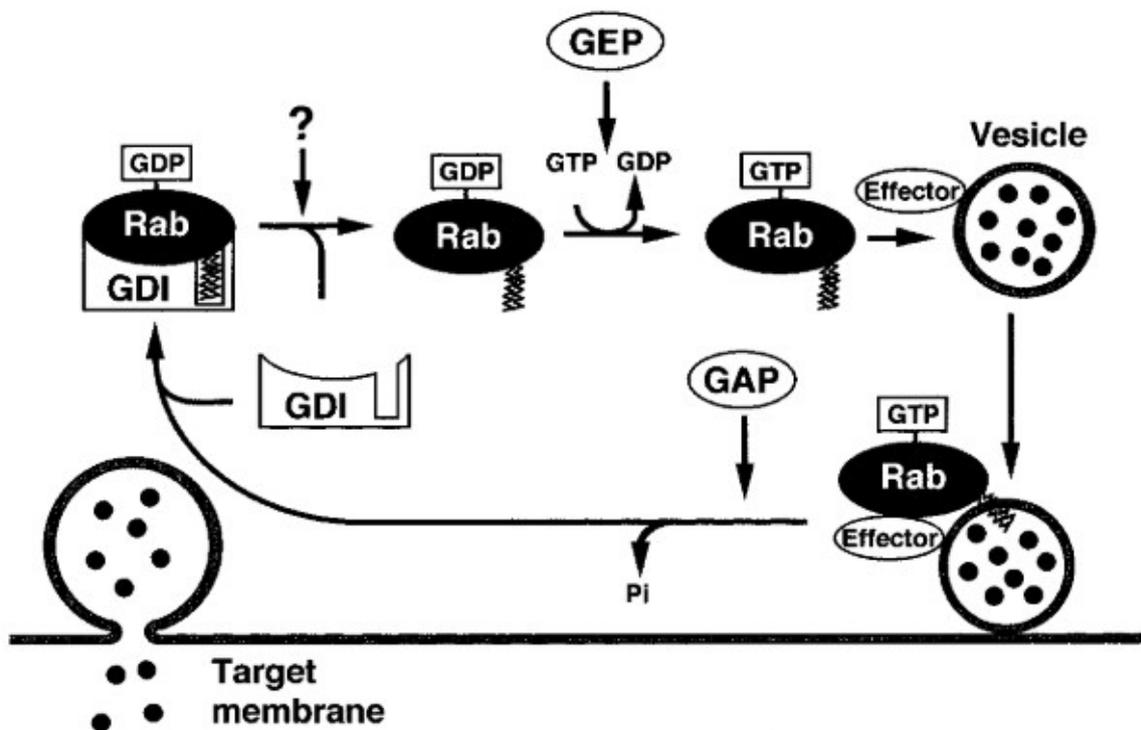


Abbildung 6: GDP/GTP-Zyklus der Rab-Proteine

Annäherung und Andocken synaptischer Vesikel an die präsynaptische Membran durch Aktivierung und Deaktivierung der Rab-Proteine durch ihre Regulatoren GDI („GDP dissociation inhibitor“), GEP („GDP/GTP exchange protein“) und GAP („GTPase activating protein“) in konventionellen chemischen Synapsen (GEPPERT et al., 1994; NAGANO et al., 2002; TAKAI et al., 2001; TAKAI et al., 1996).

Abbildung aus Takai et al. (TAKAI et al., 2001).

In konventionellen Synapsen ist Rab3A bei der Signalweiterleitung involviert in das Annähern und Andocken synaptischer Vesikel aus dem allgemeinen Vesikelpool an die präsynaptische Membran (GEPPERT et al., 1994). Außerdem wirkt es hemmend auf die Calcium-abhängige Verschmelzung der Vesikelmembran an der aktiven Zone (GEPPERT et al., 1997). Der GDP/GTP-Zyklus der Rab3-

Proteine wird von den Regulatoren Rab-GDI („GDP dissociation inhibitor“), Rab3-GEP („GDP/GTP exchange protein“) und Rab3-GAP („GTPase activating protein“) koordiniert (NAGANO et al., 2002; TAKAI et al., 2001; TAKAI et al., 1996) (siehe Abbildung 6). Rab3-GEP und GAP sind spezifisch für Rab3-Proteine, GDI ist an der Regulation aller Rab-Proteine beteiligt. Es wird angenommen, dass GDP-bindendes Rab3A im Zytosol der Synapsen einen Komplex mit GDI bildet. Dieser Komplex gelangt zu den synaptischen Vesikeln, wo GDP-gebundenes Rab3A durch Rab3-GEP und einen bisher nicht identifizierten Faktor zu GTP-bindendem Rab3A aktiviert wird (SOLDATI et al., 1994). Vor oder nach der Vesikelfusion an der präsynaptischen Membran wird das mit seinen Effektoren Rabphilin-3 und RIM („Rab3-interacting molecule“) in einem Komplex befindliche GTP-gebundene Rab3A durch Rab3-GAP zu GDP-gebundenem Rab3A inaktiviert und gelangt wieder ins Zytosol (DARCHEN, 2000; SHIRATAKI et al., 1993; TAKAI et al., 2001; TAKAI et al., 1996; WANG et al., 1997).

Rab3 könnte als GTPase sowohl die Bindung der Vesikel an die Ribbons verstärken, indem es Teil der stielartigen Verbindungen der synaptischen Vesikel mit den Ribbons ist (THORESON, 2021; TIAN et al., 2012; UTHAIAH, HUDSPETH, 2010), als auch als eine Filterfunktion besitzen, die bewirkt, dass je nach Lipidzusammensetzung der Vesikelmembran nicht alle Arten von Vesikeln an die synaptischen Ribbons binden können (CHAMBERS et al., 2005; SCHWARZ, SCHMITZ, 2017). Es wird angenommen, dass Rab3A in Ribbonsynapsen GTP-gebunden reversibel an Vesikel und über ein bisher nicht bekanntes Protein an synaptische Ribbons bindet (TIAN et al., 2012). Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass RIM1 an den Seiten der Ribbons entlang lokalisiert und dort durch Interaktionen mit Rab3 an der Vesikelbindung an die Ribbons beteiligt ist (THORESON, 2021; TOM DIECK et al., 2005; UTHAIAH, HUDSPETH, 2010; WANG et al., 1997). Obwohl RIM1 höchstwahrscheinlich in Photorezeptorsynapsen vorkommt, entstand diese Annahme zur Lokalisation von RIM1 an den Ribbons vermutlich aufgrund von Kreuzreaktionen mit Piccolino (LÖHNER et al., 2017; MOSER et al., 2020). RIM2 ist in Ribbonsynapsen unterhalb der Basis von Ribbons an der aktiven Zone nah an L-Typ Cav1.4-Kanälen an der präsynaptischen Membran lokalisiert und die bei Dunkelheit zunehmende Menge dieses Proteins variiert abhängig vom Vorhandensein von RIBEYE (DEMBLA et al., 2020). In konventionellen Synapsen bindet RIM2 an Rab3A, aber der Spleißvariante von RIM2 α , die größtenteils in den Photorezeptorsynapsen vorliegt, fehlt ein Teil der Bindungsstelle für Rab3A und die Bindung der RIM2-Variante in Photorezeptorsynapsen an Rab3A ist schwächer als die von RIM2 in voller Länge (LÖHNER et al., 2017). Eine Interaktion von Rab3A mit RIM-Proteinen in Ribbonsynapsen ist somit relativ unwahrscheinlich (LÖHNER et al., 2017). Rabphilin hingegen ist als Vesikel-assoziiertes Protein wie auch in konventionellen chemischen Synapsen ein möglicher Interaktionspartner von Rab3A bei der Vesikelbereitstellung (THORESON, 2021; UTHAIAH, HUDSPETH, 2010).

Bei Untersuchungen an konventionellen chemischen Synapsen wurde das Protein DMXL2 gefunden, das in der Immunpräzipitation an die zwei Rab3-Effektoren Rab3-GEP und GAP bindet (KAWABE et al., 2003; NAGANO et al., 2002). Damit könnte es ein entscheidender Faktor bei der Vesikelbereitstellung sein (NAGANO et al., 2002).

2.3.3 DMXL2

Das Gen DMXL2 auf dem Chromosom 15q21.2 codiert beim Menschen für das DmX-like Protein 2 (DMXL2), das auch Rabconnectin3 α genannt wird (CHEN et al., 2017; KAWABE et al., 2003; WONKAM-TINGANG et al., 2021). Es handelt sich um die α -Untereinheit des Rabconnectin3-Protein-Komplexes, der aus Rabconnectin3 α und Rabconnectin3 β besteht (KAWABE et al., 2003). Dieser ist auf synaptischen Vesikeln verdichtet und vermutlich in den Calcium-abhängigen Transport von Neurotransmittern über synaptische Membranen involviert (KAWABE et al., 2003; NAGANO et al., 2002; WONKAM-TINGANG et al., 2021). DMXL2 ist ein Vesikelprotein, das aus 3037 Aminosäuren besteht und eine Molekülmasse von 339.753 Da besitzt (ESPOSITO et al., 2019; NAGANO et al., 2002). Es verfügt über mindestens 12 WD40-Domänen und eine zentral gelegene Rav1p-Domäne, die dem V-ATPase-Regulator Rav1p in Hefe entspricht (ESPOSITO et al., 2019; NAGANO et al., 2002; TATA et al., 2014) (siehe Abbildung 7). WD40-Domänen formen Beta-Propellerstrukturen und ermöglichen damit Proteininteraktionen (JASKOLKA et al., 2021; XU, MIN, 2011).



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Proteindomänen von DMXL2

Das Protein DMXL2 enthält 3037 Aminosäuren und weist WD40-Domänen sowie eine zentrale Rav1p-Domäne auf (ESPOSITO et al., 2019; TATA et al., 2014).

Abbildung modifiziert aus Esposito et al. (ESPOSITO et al., 2019).

DMXL2 wurde in verschiedenen Geweben gefunden. Ein Nachweis dieses Proteins gelang in Haarzellen des Ohres und in synaptischen Endknöpfchen des Gehirns von Säugetieren (CHEN et al., 2017; ESPOSITO et al., 2019; KAWABE et al., 2003; NAGANO et al., 2002). Seine genaue Funktion im Gehirn wurde noch nicht abschließend erfasst, aber es wurde festgestellt, dass Rabconnectin3 β direkt an Rab3-GEP bindet und somit eine indirekte Bindung von Rabconnectin3 α an diesen Rab3-Effektor über den Rabconnectin3-Komplex vorliegt (ESPOSITO et al., 2019; KAWABE et al., 2003). Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass der Rabconnectin3-Komplex indirekt über ein noch nicht identifiziertes Molekül auch an Rab3-GAP bindet (KAWABE et al., 2003). Daher wird angenommen, dass der Rabconnectin3-Komplex an der Schaffung eines Gerüsts für das Protein Rab3A und dessen mitwirkende Proteine beteiligt ist, was mit der Ausprägung von WD40-Domänen im Einklang steht

(JASKOLKA et al., 2021; KAWABE et al., 2003; SAKISAKA, TAKAI, 2005). Zudem konnte in konventionellen Synapsen des Gehirns von Mäusen gezeigt werden, dass der Rabconnectin-3-Komplex dort direkt oder indirekt mit Cav2.2-Kanälen interagiert und den Calciumeinstrom durch diese reduziert (GANDINI et al., 2019).

Auch in Ribbonsynapsen wurde Rabconnectin3 α lokalisiert (EINHORN et al., 2012). Rabconnectin3 α befindet sich an der Basis der Haarzellen des Innenohrs von Zebrafischen mit einer ähnlichen Verteilung wie Proteine synaptischer Vesikel. Es scheint die Protonenpumpenfunktion von V-ATPasen zu stabilisieren, indem es die Ansammlung des V-ATPase-Holoenzym auf synaptischen Vesikeln ermöglicht (EINHORN et al., 2012). Die V-ATPase befördert Protonen über Membranen (COTTER et al., 2015). Dafür besitzt sie eine membrandurchspannende V0-Untereinheit, die über die zytosolische V1-Domäne mit der ATP-Hydrolyse verbunden ist (COTTER et al., 2015; CRUMMY et al., 2019). Bei mutiertem Rabconnectin3 α ist die Menge der zytosolischen Untereinheit der V-ATPase reduziert und der pH-Wert der synaptischen Vesikel in den Haarzellen erhöht (EINHORN et al., 2012). Ein angehobener pH-Wert hat zur Folge, dass synaptische Vesikel mit weniger Transmittern gefüllt werden, was die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung verringert, sodass die Signalweiterleitung mittels Neurotransmittern über Synapsen bei veränderter Rabconnectin3 α -Funktion herabgesetzt wird (EDWARDS, 2007; EINHORN et al., 2012; GOWRISANKARAN, MILOSEVIC, 2020; ROST et al., 2015; WONKAM-TINGANG et al., 2021). Auch bei einem genetisch bedingten Fehlen von CAPS1 („Ca²⁺-dependent activator protein for secretion“ (CRUMMY et al., 2019; LOYET et al., 1998)) wird der pH-Gradient an Vesikelmembranen nicht aufrechterhalten. CAPS1 ist ein Priming-Faktor, der an der Calcium-abhängigen Exozytose von Vesikeln in neuroendokrinen und Nervenzellen beteiligt ist (CRUMMY et al., 2019; WALENT et al., 1992). Unabhängig von seinem Einfluss auf den pH-Wert ist dieses Protein notwendig für die Vorgänge des Primings und Andockens der Vesikel, bevor die Vesikelfusion mit der präsynaptischen Membran stattfindet (CRUMMY et al., 2019; GRISHANIN et al., 2004; JAMES, MARTIN, 2013; STEVENS, RETTIG, 2009). Teilweise kommt CAPS1 im Zytoplasma vor, ein anderer Teil ist an synaptische Vesikel gebunden (GRISHANIN et al., 2002). Die optimale Bindung von CAPS1 an synaptische Vesikel für die Regulation des pH-Werts beruht wiederum auf Interaktionen dieses Proteins mit dem Rabconnectin3 α/β -Komplex über direkte Bindung an Rabconnectin3 β (CRUMMY et al., 2019). Diese Interaktionen und eine Beeinträchtigung der Senkung des pH-Werts synaptischer Vesikel sowohl beim Knockdown von CAPS1 als auch bei dem von Rabconnectin3 α oder Rabconnectin3 β in neuroendokrinen Zellen weisen darauf hin, dass Rabconnectin3 α/β und CAPS1 als Komplex mit der V-ATPase den pH-Wert synaptischer Vesikel steuern (CRUMMY et al., 2019). Somit sind sie wichtig für die Befüllung von Vesikeln und regulieren deren Funktion (CRUMMY et al., 2019). Bei Kohorten von Zebrafischen mit Mutationen in den Allelen von Rabconnectin3 α lagen Schwerhörigkeit und Gleichgewichtsstörungen vor, was ebenfalls darauf hin-

weist, dass Rabconnectin3 α am Hörvorgang in den Haarzellen des Innenohrs von Zebrafischen beteiligt ist (EINHORN et al., 2012).

In verschiedenen Studien wurde beobachtet, dass bestimmte DMXL2-Mutationen auch bei Menschen mit genetisch bedingter Schwerhörigkeit auftreten (CHEN et al., 2017; WONKAM-TINGANG et al., 2021). Außerdem wurden im Zusammenhang mit DMXL2-Mutationen das Polyendokrine Polyneuropathie-Syndrom und die Frühkindliche epileptische Enzephalopathie mit suppression-burst dokumentiert (ESPOSITO et al., 2019; TATA et al., 2014). Es wird angenommen, dass Rabconnectin3 α wichtig für die Hirnentwicklung ist (ESPOSITO et al., 2019; KANNAN et al., 2017).

2.4 Ziel der Arbeit

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass DMXL2 als Teil des Rabconnectin3-Komplexes an Rab3-Effektoren bindet und die Ergebnisse von Einhorn et al. weisen darauf hin, dass es in Ribbonsynapsen von Haarzellen des Innenohrs in die auditive Wahrnehmung involviert ist (EINHORN et al., 2012; KAWABE et al., 2003). In Versuchen mit Zebrafischen kam es bei Rabconnectin3 α -Mutationen auch zu Einschränkungen bezüglich der Anpassung an Lichtverhältnisse in Melanozyten und spontanen Augenbewegungen, was zusätzlich visuelle Defekte nahelegt (EINHORN et al., 2012). Aufgrund des Vorkommens von Ribbonsynapsen sowohl in Haarzellen als auch in den Photorezeptor- und Bipolarzellen der Retina haben schon Einhorn et al. auf die Notwendigkeit von Untersuchungen zu Rabconnectin3 α in der Retina hingewiesen (EINHORN et al., 2012). Da die genaue Funktion von DMXL2 noch nicht bekannt ist, könnte die Lokalisation dieses Proteins in der Retina weiteren Aufschluss geben und ist daher das Ziel dieser Arbeit. Hierzu sollen folgende Fragen beantwortet werden: In welcher Schicht der Retina ist DMXL2 zu finden? Ist DMXL2 in Ribbonsynapsen der Retina sichtbar und falls ja, ist es prä- oder postsynaptisch lokalisiert? Befindet sich DMXL2 auf allen synaptischen Vesikeln?

3 Material und Methoden

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

Tabelle 1: Primärantikörper

Primärantikörper	Quelle	Verdünnung
Anti-DMXL2, monoklonaler Mausantikörper (2G2), gerichtet gegen Aminosäuresequenz (von amino- nach carboxyterminal): KKDQLDSVSGRMENGPSESKP VSRSDGGSGADWSAVTSSQFD WSQPMVTVDEEPLRLDWGDD HDGALEEDDGGGLVMKTTDAK KAGQEQSASDPRALLTPQDEEC ADGDTE	im Labor hergestellt	1:10 (IF) 1:500 (WB) 1:10 (IG)
Anti-DMXL2, monoklonaler Mausantikörper (12D8), gerichtet gegen gleiche Aminosäuresequenz wie 2G2	im Labor hergestellt	1:10 (IF) unverdünnt, gereinigt (WB)
Anti-RIBEYE(B), monoklonaler Mausantikörper (2D9)	(DEMBLA et al., 2018)	1:400 (IG)
Anti-RIBEYE(B), polyklonaler Kaninchenantikörper (U2656)	(SCHMITZ et al., 2000)	1:10000 (IF)
Anti-PSD95, polyklonaler Kaninchenantikörper (L667)	(IRIE et al., 1997)	1:1000 (IF)
CSP, polyklonales Endserum eines Kaninchens	im Labor hergestellt	1:500 (IF)
Anti-Cav1.4 CTerm, polyklonaler Kaninchenantikörper	(DEMBLA et al., 2020)	1:500 (IF)

Anti-Cav1.4 NTerm, polyklonaler Kaninchenantikörper	(MUKHERJEE et al., 2020)	1:500 (IF)
Anti-GST, monoklonaler Mausantikörper	Sigma-Aldrich, Cat. No: G1160	1:10000 (WB)

3.1.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Quelle/Hersteller	Verdünnung
Donkey anti-mouse Alexa488	Invitrogen, Molecular Probes, A-21202	1:1000 (IF)
Donkey anti-mouse Dylight488	Jackson ImmunoResearch, 715485150	1:1000 (IF)
Donkey anti-rabbit Alexa568	Invitrogen, Molecular Probes, A-10042	1:1000 (IF)
Chicken anti-mouse Alexa488	Thermo Fisher, 10114192	1:1000 (IF)
Goat anti-mouse peroxidase-conjugated (GAM-POX)	Sigma-Aldrich, A-3673	1:5000 (WB)
Nanogold-IgG: goat anti mouse IgG (H+L)	Nanoprobes, Lot 35C048	1:100 (IG)

3.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen

Material	Hersteller/Zusammensetzung
Gel NEG-50	Richard-Allan-Scientific
PBS	Sigma-Aldrich, D8537
NPG (N-Propyl-Gallat)	Sigma-Aldrich, P-3130
Epon Harz (Epon 812)	Fluka/Sigma-Aldrich
Natriummethylat (30% in Methanol)	Merck
Xylol	Carl Roth GmbH

Material und Methoden

Methanol	Zentrales Chemikalienlager der Universität des Saarlandes
Aceton	Thermo Fisher
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, 158127-500G
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, G5882
Cacodylatpuffer (100mM)	21,4 g Cacodylsäure /l H ₂ O, pH 7,4
Benzil	Science Services
Uranylacetat	Merck
Ampicillin	Carl Roth GmbH
LB (lysogeny broth)	Gibco (20mg LB-Medium auf 1l destilliertes Wasser)
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	MP biomedical
Glutathion-Agarose-Beads	Fluka/Sigma-Aldrich
Bradford Solution (Roti-Quant 5x Konzentrat)	Carl Roth GmbH
Aqua B. Braun Spüllösung	B. Braun
Essigsäure (99-100%)	Carl Roth GmbH
4 x SDS-Ladepuffer	1,6 g SDS 4 ml β -Mercaptoethanol 2 ml Glycerol 2 ml 1 M Tris pH 7,0 4 ml Bromphenolblau 2 ml H ₂ O

Material und Methoden

Trenngel 10%	<p>1,5 ml H₂O</p> <p>1,9 ml 1 M Tris pH 8,8</p> <p>2,5 ml 30% Acrylamid</p> <p>75 µl 10% SDS</p> <p>1,5 ml 50% Glycerol</p> <p>5 µl TEMED</p> <p>38 µl 10% APS</p>
Sammelgel	<p>240 ml H₂O</p> <p>940 µl 0,5 M Tris pH 6,8</p> <p>500 µl 30% Acrylamid</p> <p>50 µl 10% SDS</p> <p>10 µl TEMED</p> <p>50 µl APS</p>
SDS-Elektrophoresepuffer	<p>3,03 g Tris</p> <p>14,4 g Glycin</p> <p>1,0 g SDS</p>
Western Blot-Transferpuffer	<p>15,125 g Tris</p> <p>72,05 g Glycin</p> <p>1 l Methanol</p> <p>bis zu einem Volumen von 5 l mit Aqua dest. auffüllen</p>
Ponceau S	<p>30 g Trichloressigsäure</p> <p>5 g Ponceau S</p> <p>bis zu einem Volumen von 1 l mit Aqua dest. auffüllen</p>

ECL1	<p>5 ml 1 M Tris pH 8,5</p> <p>500 µl Luminol</p> <p>220 µl Para-Hydroxycoumarinsäure (PCA)</p> <p>Röhrchen bis 50 ml mit Aqua dest. auffüllen</p>
ECL2	<p>5 ml 1 M Tris pH 8,5</p> <p>32 µl H₂O₂</p> <p>Röhrchen bis 50 ml mit Aqua dest. auffüllen</p>

3.3 Gewebe

Für die verschiedenen Experimente wurden Augen von C57BL/6J-Mäusen beider Geschlechter verwendet. Die Mäuse wurden den Tierschutzrichtlinien der Universität des Saarlandes entsprechend gehalten. Alle Tierversuche wurden begutachtet und bewilligt von der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Verbraucherschutz (Geschäftsbereich 3, 66115 Saarbrücken; Haltungsnummer: GB 3-2.4.1.1-K110/180-07).

3.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.4.1 Herstellung von Kryostatschnitten

Die Aufbereitung des Gewebes für die Kryostatschnitte wurde wie von Grabner et al. beschrieben durchgeführt (GRABNER et al., 2015). Im ersten Schritt wurden die Mäuseaugen in durch flüssigen Stickstoff (-196°C) gekühltem Isopentan schockgefroren, dann in durch Stickstoff gekühlter Alufolie aufbewahrt und in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend wurden die Kryostatschnitte mit dem Kryostat Leica CM1950 angefertigt. Dafür wurden die Mäuseaugen im Kryostat auf einer Halterung platziert und in dem Gel NEG-50 Richard-Allan-Scientific (enthält Polyvinyl-Alkohol und Polyethylen-Glycol) eingebettet. Das Gewebe hatte beim Schneiden eine Temperatur von etwa -21°C und der Raum im Kryostat eine von ca. 17°C. Es wurden 8 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger transferiert. Anschließend wurden die Objektträger mit den Schnitten bis zur Immunfluoreszenzmarkierung bei -20°C gelagert.

3.4.2 Immunfluoreszenzmarkierung der Kryostatschnitte

Zunächst wurden die Kryostatschnitte durch das Entweichen des Kondenswassers beim Auflegen der Objektträger auf eine erhitzte Platte für 30 min bei etwa 60°C fixiert. Es folgte die Inkubation mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4°C. Nach 3 x 5 min Waschen in PBS wurden die Schnitte mit den Sekundärantikörpern inkubiert (1 h, Raumtemperatur) und danach erneut wie zuvor beschrieben mit PBS gewaschen. Anschließend wurde zur Verhinderung des Ausbleichens das Einbettmedium Natrium-Propylgallat (NPG; mit Hilfe des Thermomixers compact von Eppendorf auf 37°C erwärmt) auf die Schnitte aufgetragen. Darauf wurden Deckgläschen gelegt und diese mit Nagellack an den Kanten fixiert, um ein Verschieben der Deckgläschen und das Austrocknen der Schnitte zu vermeiden (SCHMITZ et al., 2000). Anschließend wurden die markierten Schnitte bis zur Betrachtung im Mikroskop bei 4°C gelagert.

3.4.3 Herstellung von Semidünnschnitten

Die Einbettung des Gewebes für die Herstellung der Semidünnschnitte erfolgte nach der Methode von Drenckhahn und Franz (DRENCKHAHN, FRANZ, 1986) mit Modifizierungen nach Wahl et al. (WAHL et al., 2013). Mäuseaugen des Wildtyps (WT) 72/17 wurden entnommen und in durch Stickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren. Es folgte die Gefriergetrocknung in flüssigem Stickstoff für 24 h in einem Vakuum, das durch eine TCP270 Turbomolekularpumpe (Artur-Pfeiffer-Vakuumtechnik) erreicht und ein PKG020 Pirani-Gold-Kathodenmanometer kontrolliert wurde. Das Gewebe verblieb weitere 24 h bei Raumtemperatur an der Vakuumpumpe. Anschließend erfolgten die Infiltration mit Epon Harz bei Raumtemperatur und die Auspolymerisation des Harzes bei 60°C für 24 h. Mit Hilfe eines Reichert Uktramikrotoms wurden 0,5 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, die auf Deckgläschen gezogen und bei 80°C auf einer Heizplatte getrocknet wurden.

3.4.4 Immunfluoreszenzmarkierung von Semidünnschnitten

Für die Immunfluoreszenzmarkierung der Semidünnschnitte wurde zunächst in leicht veränderter Form nach der Methode von Mayor et al. in einigen Schritten das Epon Harz herausgelöst (MAYOR et al., 1961). Dafür wurden die Schnitte als erstes für 10 min in Natriummethylat inkubiert (30% in Methanol), anschließend ebenfalls 10 min in einem Gemisch, das zu gleichen Anteilen aus Xylol und Methanol bestand, und 2 x 10 min in Aceton. Dann wurden die Schnitte erst 10 min in Wasser und dann mit PBS gewaschen.

Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzmarkierung mit den jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern (wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben) mit darauffolgender Versiegelung und ebenfalls Lagerung bei 4°C.

3.4.5 Präabsorption

Die Präabsorption wurde mit Modifikationen durchgeführt wie von Schmitz et al. und Mukherjee et al. beschrieben (MUKHERJEE et al., 2020; SCHMITZ et al., 2000). Für die Präabsorption wurden die Proteine DMXL2-GST und GST, das als unspezifisches Protein zur Kontrolle diente, wie in Abschnitt 3.6 beschrieben hergestellt, gereinigt und deren Konzentration bestimmt. Für die Produktion von GST erfolgte die Elektroporation mit dem Plasmid pGEX-KG anstelle von DE4-pGEX. Die Proteine wurden zu den Primärantikörpern in deren Verdünnung für die Versuchsdurchführung gegeben. Das DMXL2-GST-Fusionsprotein lag in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml vor, GST in einer Endkonzentration von 0,25 mg/ml, da letzteres nur etwa halb so groß ist wie das Fusionsprotein. Die Röhrchen mit den Antikörperansätzen samt zugefügten Proteinen inkubierten über Nacht bei 4°C auf einem Rotator. Am Folgetag wurde mit diesen Ansätzen wie oben beschrieben eine Immunfluoreszenzmarkierung von Kryostatschnitten durchgeführt.

3.4.6 Kontrollinkubationen

In den Kontrollinkubationen wurde sowohl bei den Kryostat- als auch bei den Semidünnschnitten anstatt der Primärantikörper PBS aufgetragen und anschließend wie oben aufgeführt mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Die Bilder der Kontrollen wurden an den Mikroskopen unter den gleichen Bedingungen (Vergrößerung, Expositionszeit bzw. Laserstärke, Offset, Scan Size, Scan Speed) wie die der zugehörigen Immunfluoreszenzen aufgenommen. Bei Verstärkung des Kontrasts oder der Helligkeit der gesamten Aufnahmen durch die jeweilige Dokumentations-Software der Mikroskope oder die Bildverarbeitungssoftware ImageJ/Fiji zur verbesserten Sichtbarkeit der Immunfluoreszenzsignale wurde diese auch bei den Kontrollinkubationen durchgeführt.

3.4.7 Epifluoreszenzmikroskopie

Zur Detektierung der an spezifische Proteine gebundenen Primärantikörper wurden bei der Immunfluoreszenzmarkierung Sekundärantikörper mit gekoppelten fluoreszierenden Farbstoffen verwendet, was als indirekte Immunfluoreszenz bezeichnet wird. Bei einer direkten Immunfluoreszenz würden die Farbstoff-tragenden Antikörper direkt an das Protein im Gewebe binden. Zur Beurteilung der Immunfluoreszenzmarkierungen wurden sowohl die immungefärbten Kryostat- als auch die Semidünnschnitte mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) analysiert. Dafür wurden die Lichtquelle Oligochrom der Firma Till Photonics und die Mikroskopierkamera Zeiss Axiocam Mrm genutzt. Je nach an den Sekundärantikörper gekoppeltem Farbstoff wurde Licht der Anregungswellenlänge 488 nm im grünen Kanal oder 568 nm im roten Kanal verwendet. Es wurden Aufnahmen mit einem 40x Öl-Immersion-Objektiv (Plan-Neofluar, 40x/1,3 Oil, Zeiss), einem 63x

Öl-Immersion-Objektiv (Plan-Apochromat, 63x/1,4 Oil, Zeiss) und einem 100x Öl-Immersion-Objektiv (Plan-Fluar, 100x/1,45 Oil, Zeiss) gemacht. Mit Hilfe der Software AxioVision Rel. 4.8 (Zeiss) wurden Bilder der verschiedenen Immunfluoreszenzmarkierungen und Vergleichsaufnahmen der Negativkontrollen bei gleicher Expositionszeit gemacht.

3.4.8 Konfokalmikroskopie

Zur genauen Lokalisation der Fluoreszenzsignale wurden die Semidünnschnitte und Kryostatschnitte nach der Dokumentation mit dem Epifluoreszenzmikroskop auch mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beurteilt. Dafür wurde das Konfokalmikroskop A1R der Firma Nikon genutzt und die Signale wurden ebenfalls im roten und grünen Kanal mit der Software NIS-Elements dokumentiert. Ein Durchschlagen der Fluoreszenzsignale in benachbarte Kanäle konnte nicht beobachtet werden. Für alle Bilder wurde ein 60x Öl-Immersion-Objektiv (Plan Apo VC, 60x/1,4 Oil, Nikon) verwendet.

3.5 Elektronenmikroskopie

3.5.1 Herstellung von Ultradünnschnitten

Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte mit Abwandlungen nach der Methode von Schmitz et al. (SCHMITZ et al., 2000). Nach der Entnahme der Mausaugen wurde das Gewebe in verschlossenen 2 ml Eppendorfröhrchen in 2% Paraformaldehyd und 0,1% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (100 mM) bei 4°C für 4 Stunden fixiert. Die Entwässerung erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe (30% auf Eis; 50%, 70%, 80%, 90% und 99% Ethanol bei -20°C). Das Gewebe wurde für jeweils 30 min in der jeweiligen Ethanolstufe belassen. Nachdem die Proben vollständig entwässert waren, folgte die Infiltration mit London Resin (LR-Gold, Acrylharz der Firma Electron Microscopic Sciences). Dafür lagerte das Gewebe bei -20°C in 3 Schritten für jeweils 30 min in einem Gemisch aus 99% Ethanol und LR-Gold Harz, das wie folgt zusammengesetzt war: In den ersten 30 min bestand es aus 2 Teilen 99% Ethanol und einem Teil LR-Gold Harz, dann aus 99% Ethanol und LR-Gold Harz zu gleichen Teilen und abschließend aus einem Teil 99% Ethanol und 2 Teilen LR-Gold Harz. Über Nacht verblieb das Gewebe dann in reinem LR-Gold Harz bei -20°C. Danach folgte für 1 Stunde die Durchdringung des Gewebes mit LR-Gold + Benzil 0,1%. Nach diesem Schritt wurde die LR-Gold-Benzil-Lösung erneuert und der Inhalt der Eppendorfgefäße über einer UV-Lampe bei -20°C polymerisiert. Nach der Auspolymerisation des Harzes (ca. 2 Tage) wurden die Blöcke zunächst passend zugetrimmt. Im Semidünnschnitt wurden geeignete Retinastellen aufgesucht (0,5 µm, Methylenblaufärbung nach Richardson) und Ultradünnschnitte (80 nm) mit Hilfe eines Ultramikrotoms R (Reichert)

und eines Diatome Diamantmessers angefertigt und auf 300-mesh Gold-Grids (Plano) aufgezogen. Die Herstellung der Schnitte erfolgte durch Gabriele Kiefer.

3.5.2 Post-embedding Immunogold-Markierung und elektronenmikroskopische Dokumentation

Die Post-embedding Immunogold-Markierung und Auswertung wurden mit Modifikationen wie von Schmitz et al. und Wahl et al. beschrieben durchgeführt (SCHMITZ et al., 2000; WAHL et al., 2013). Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Ultradünnschnitte auf Gold-Grids zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocking-Serum (1% Bovine Serum Albumin der Firma Capricorn Scientific in steril filtriertem PBS) inkubiert. Wie auch bei den folgenden Inkubations- und Waschlösungen wurde dafür pro Schnitt ein Tropfen auf Parafilm in einer feuchten Petrischalenkammer aufgetragen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern bei 4°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde durchgehend bei Raumtemperatur gearbeitet. Die Schnitte wurden 3 x kurz in Blocking-Serum gewaschen und für 90 min in der feuchten Petrischalenkammer mit dem sekundären Antikörper mit gekoppelten 1,4 nm-Goldpartikeln inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut erst mit Blocking-Serum und dann mit PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung in 2,5% Glutaraldehyd-PBS-Lösung für 10 min und das Waschen in sterilem Wasser (H₂O). Als nächstes wurde das Silver Enhancement Kit der Firma Nanoprobes (Cat. No.: 2012-45ML) verwendet, das dem Sichtbarmachen der 1,4 nm-Goldpartikel in der anschließenden Betrachtung im Elektronenmikroskop dient. Dieses Kit bestand aus den 3 Lösungen A (Initiator), B (Moderator) und C (Activator), die bei -20°C gelagert wurden. Unmittelbar vor Gebrauch wurden sie bei Raumtemperatur aufbewahrt, bis sie diese erreicht hatten. Die anschließenden Schritte fanden im Dunkeln statt: Die Lösungen A, B und C wurden zu gleichen Teilen mit Hilfe eines Vortexmischers (Firma VWR International) miteinander vermischt. Erst wurden die Lösungen A und B gemeinsam gevortext, anschließend wurde Lösung C hinzugegeben und das Ganze wieder vermischt. Von dieser Mischung wurde pro Schnitt ein Tropfen auf den Parafilm gegeben. Die Schnitte wurden 4 min darin belassen. Danach wurden die Schnitte bei Licht wieder in H₂O gewaschen und zur Kontrastierung 10 min in 2% Uranylacetat inkubiert, erneut mit H₂O gewaschen und mit Hilfe von Filterpapier getrocknet. Bis zur Betrachtung und Dokumentation mit dem Elektronenmikroskop wurden die Schnitte in speziellen Grid-Boxen bei Raumtemperatur aufbewahrt. In den Kontrollinkubationen wurden anstatt des DMXL2-Primärantikörpers 2D9 als Positivkontrolle und Blocking-Serum als Negativkontrolle verwendet. Anschließend wurde mit dem Sekundärantikörper inkubiert und wie bei den anderen Ultradünnschnitten verfahren. Nach dem Trocknen erfolgte die Dokumentation mit einem FEI Tecnai 12 BioTwin Transmissionselektronenmikroskop und einer von der Olympus iTEM

Acquisition Software gesteuerten Kamera (MegaView III digital TEM camera, Olympus Soft Imaging Solutions).

3.6 Herstellung und Reinigung von Fusionsprotein

3.6.1 Herstellung des Fusionsproteins DMXL2-GST

Das DMXL2-Protein wurde als GST-Fusionsprotein in BL21(DE3)-Bakterien exprimiert und mit Standardverfahren (DEMBLA et al., 2014; SCHMITZ et al., 2000) gereinigt. Das DMXL2-Fusionsprotein besteht somit aus einem N-terminalen GST-Protein, das für die Affinitätsreinigung verwendet wurde, sowie dem carboxyterminalen DMXL2. Dazu wurde das Plasmid DE4-pGEX, das es Bakterien auch ermöglicht, auf Ampicillin zu wachsen, in das Genom der Bakterien integriert. Dies geschah mittels Elektroporation: Die zuvor bei -80°C gefrorenen Bakterien wurden aufgetaut und $1\ \mu\text{l}$ Plasmidlösung auf Eis hinzugefügt, sodass sich plasmidumstülpte Bakterien in der Lösung befanden. Diese wurden in eine Küvette zwischen zwei Kondensorplatten gegeben und zur Einbringung des Plasmids in die Bakterien wurde mit Hilfe des Elektroporators (Safety Stand 630B und Spannungsquelle ECM399 der Firma BTX) ein Puls von $1400\ \text{V}$ über $5\ \text{ms}$ generiert.

Es folgte das Spülen der nun trüben Bakterienlösung mit LB (lysogeny broth), einem Nährmedium für Bakterien. Nach einer Stunde Regeneration der Bakterien in mit LB gefüllten Glasröhrchen bei 37°C und $220\ \text{Umdrehungen/min}$ im Schüttler KS-15 der Firma Edmund Bühler erfolgte das Auftragen der Bakterien auf zwei Ampicillin-Platten, sodass sich nur die Bakterien vermehren konnten, die das Plasmid DE4-pGEX enthielten und somit Ampicillin-resistent waren. Jeweils $30\ \mu\text{l}$ Bakterienlösung wurde mit einer zuvor durch eine Flamme desinfizierte Öse auf den Platten verteilt, anschließend lagerten die Platten bis zum nächsten Tag mit dem Nährboden auf der Oberseite in einer Konstantklimakammer von Memmert bei 37°C .

Am nächsten Tag waren die Bakterienkolonien sichtbar gewachsen. Unter sterilen Bedingungen wurden Glasröhrchen mit jeweils einer Bakterienkolonie, $5\ \text{ml}$ LB und $20\ \mu\text{l}$ Ampicillin, um einen Verlust des Plasmids der Bakterien zu verhindern, gefüllt. Bis zum nächsten Tag verblieben die Röhrchen so bei $220\ \text{Umdrehungen/min}$ und 37°C im Schüttler KS-15 von Edmund Bühler, sodass sich die Bakterien weiter vermehrten.

Am folgenden Tag wurde der nun trübe Inhalt der Röhrchen zusammen mit jeweils $500\ \text{ml}$ LB und einer Ampicillinlösung ($c=50\ \text{mg/ml}$, Zugabe im Verhältnis $1:1000$ zur LB-Lösung) in Erlenmeyerkolben gefüllt. Die Kolben wurden samt Inhalt wieder bei $220\ \text{Umdrehungen/min}$ und 37°C in den Schüttler gestellt. Nach etwa $6\ \text{Stunden}$ war der zuvor klare Inhalt durch das Bakterienwachstum wieder trüb und im Photometer (Ultrospec 2100 pro UV/Visible

Spectrophotometer, Amersham Biosciences) ergab sich bei der Wellenlänge 600 nm eine Absorption von 0,8. Daraufhin wurde die Temperatur auf Raumtemperatur gesenkt, damit sich die Bakterien nicht weiter vermehrten.

Nach einem halbstündigen Verbleib der Bakterien bei Raumtemperatur und 400 Umdrehungen/min im oben genannten Schüttler erfolgte die Induktion der Produktion des Fusionsproteins durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), einem künstlichen Induktor des Lactose-Operons in *Eschericia coli*, im Verhältnis 1:1000 zum Inhalt der Erlenmeyerkolben. Nach Hinzufügen von IPTG lagerte der Kolben bei 220 Umdrehungen/min und Raumtemperatur für weitere 4 Stunden, in denen das Fusionsprotein von den Bakterien produziert wurde.

Im Anschluss wurde der Inhalt der Erlenmeyerkolben auf 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Um ein Abbauen des produzierten Proteins durch die Bakterien zu verhindern, wurden diese auf Eis gekühlt. Die Röhrchen wurden für 30 min bei 3500 Umdrehungen/min. (2301 g) und 4°C in der Zentrifuge Heraeus Multifuge X1R der Firma Thermo Scientific zentrifugiert. Nach der Entnahme wurde die LB-Lösung aus den Zentrifugenröhrchen, auf deren Boden nun jeweils ein Bakterienpellet haftete, abgegossen. Mit einer Pipette wurden die Bakterienpellets mit Hilfe einer zuvor auf Eis kaltgestellten, phosphatgepufferten Salzlösung (1 x PBS) wieder in Lösung gebracht und so gelöst und von LB-Lösung gereinigt erneut auf Zentrifugenröhrchen verteilt. Nach erneutem Zentrifugieren für 30 min (4°C und 2301 g) und wiederholter Bildung von Bakterienpellets auf dem Boden der beiden Röhrchen wurde die klare PBS-Flüssigkeit abgegossen und die Bakterienpellets wurden in den Röhrchen bei -80°C eingefroren. Die Lagerung bei -80°C entsprach dem ersten Schritt des Aufbrechens der Bakterien.

Das weitere Aufbrechen der Bakterien zur Gewinnung des von ihnen produzierten Proteins erfolgte mit Hilfe von Lysozym, das Bakterienwände osmotisch durchlässig macht, und Ultraschall. Dazu wurden die Bakterienpellets am folgenden Tag aus der Gefriertruhe genommen, auf Eis in jeweils 10 ml PBS aufgelöst und wieder in einem Röhrchen zusammengefügt. Zu den aufgelösten Bakterienpellets wurde im Verhältnis 1:1000 zum Inhalt des Röhrchens Lysozym gegeben, das zuvor bereits im Verhältnis 10 mg/ml in PBS gelöst war. Dann wurden die Röhrchen für eine Stunde auf dem Schüttler L-40 der Firma A. Hartenstein auf Eis durchmischt und anschließend im Ultraschallgerät Sonopuls von Bandelin 5 x 20 s bei einer Leistung von 40% geschallt, wodurch sich die Bakterienlösung, in der die Bakterien jetzt aufgebrochen und das Protein freigesetzt waren, ein wenig dunkler färbte. Die Ultraschallspitze wurde vor und nach dem Schallen mit 70% Ethanol und Wasser gereinigt. Danach wurden die Röhrchen für eine Stunde bei 4°C und 13000 Umdrehungen/min in die Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos von Thermo Scientific gestellt. Unten in den Röhrchen befand sich nach dem Zentrifugieren ein Bakterienpellet aus den gespaltenen Bakterien, im Überstand waren die Bakterienproteine einschließlich des Fusionsproteins gelöst. Nach Umfüllen des Überstands

in neue Zentrifugenröhrchen auf Eis wurde das Bakterienpellet verworfen. Um eventuell noch vorhandene Bakterienbruchstücke, die die Proteinlösung verunreinigen würden, zu entfernen, wurde der Überstand in den neuen Röhrchen erneut in der Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos bei 4°C und 13000 Umdrehungen/min für 30 min zentrifugiert und der Überstand wieder in 50 ml-Röhrchen überführt.

3.6.2 Reinigung des Fusionsproteins

Zum Herausstrennen des Fusionsproteins aus der Proteinlösung wurden Glutathion-Agarose-Beads genutzt. Diese waren in einer Ethanol- und Azidlösung (20% Ethanol und 0,5% Azide in PBS), die das Bakterienwachstum hemmt, suspendiert. Um das Ethanol und die Azide von den Glutathion-Agarose-Beads zu waschen, wurden von den Beads in ihrer Ethanol- und Azidlösung in 2 Zentrifugenröhrchen jeweils 1,5 ml zu 50 ml PBS gegeben und es erfolgte eine Zentrifugation in der Zentrifuge Heraeus Multifuge X1R der Firma Thermo Scientific für 1 min bei 4°C und 15000 Umdrehungen/min. Das Pellet aus Beads, das sich dabei am Boden des Röhrchens bildete, wurde nach Verwerfen des Überstands zum gründlichen Waschen 3 x mit PBS zentrifugiert und dann in Suspension zum bis dahin weiterhin bei 4°C gelagerten induzierten Bakterienüberstand gegeben. Der Bakterienüberstand wurde zusammen mit den Glutathion-Agarose-Beads über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert, sodass das Fusionsprotein spezifisch an die Beads gebunden wurde, da nur dieses die GST, welche kovalent an das Glutathion der Beads bindet, enthielt.

Am nächsten Tag wurde der Bakterienüberstand mit den Agarose-Beads in der oben genannten Zentrifuge Heraeus Multifuge X1R bei 4°C und 15000 Umdrehungen/min für 2 min zentrifugiert, wodurch sich am Boden der Röhrchen ein Pellet aus Agarose-Beads, die das Fusionsprotein gebunden hatten, bildete. Nach dem Abgießen des flüssigen Überstands wurden 50 ml kaltes PBS zum Pellet in die Röhrchen gegeben. Zum Waschen wurde das Ganze ein weiteres Mal in der Heraeus Multifuge X1R zentrifugiert, diesmal für 1 min bei 4°C und 15000 Umdrehungen/min. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand über dem Pellet abpipettiert und verworfen und das Röhrchen erneut mit 50 ml PBS aufgefüllt. Dieser Waschvorgang wurde 6 x wiederholt und die Flüssigkeit nach dem letzten Waschen bis auf einen geringen PBS-Überstand entfernt. Zum Umfüllen wurde das Bead-Pellet mit jeweils 1 ml PBS vermischt und in Eppendorf Röhrchen abpipettiert. Anschließend wurden diese Röhrchen für 1 min bei 4°C und 15000 Umdrehungen/min in der Zentrifuge Himac CT15RE des Herstellers Hitachi Koki zentrifugiert und in jedes Eppendorf-Röhrchen im Verhältnis 1:100 zum Inhalt Natriumazid 10% gegeben, um Bakterienwachstum zu verhindern.

3.6.3 Messung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Test genutzt (BRADFORD, 1976). Die Methode basiert auf dem proportionalen Binden der Farbe Coomassie an Proteine. Je mehr Protein vorhanden ist, desto mehr Coomassie wird gebunden, wodurch die Probe dunkler gefärbt ist. Um die Proteinkonzentration anhand der Absorption zu bestimmen, wurde die Absorption der zu bestimmenden Proteinprobe mit denen einer Reihe von anderen Proteinproben, die ein lineares Absorptionsprofil ergaben, verglichen. Für die Herstellung der Vergleichsreihe wurde BSA (Capricorn Scientific, pH 7,0) als Protein-Standard verwendet. Die Bradford Solution (Roti-Quant 5x Konzentrat, Dichte 1,37) enthielt die Farbe Coomassie, die bei 595 nm absorbiert. Die Standard-Proteinreihe und die zu bestimmenden Proteinproben wurden mit der Bradford Solution bei Raumtemperatur angesetzt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption der Proben bei 595 nm im Photometer Ultrospec 2100 pro UV/Visibile Spectrophotometer des Herstellers Amersham Biosciences gemessen und die Konzentration der zu bestimmenden Proben mit Hilfe einer aus den Werten der Vergleichsreihe erstellten Standard-Kalibrierungskurve in Microsoft Excel berechnet.

3.7 Reinigung von Antikörpern mit Protein A-Sepharose-Beads

Die Reinigung der Antikörper mit Hilfe von Protein A-Sepharose-Beads und Glycin wurde durchgeführt wie von Dembla et al. beschrieben (DEMBLA et al., 2020). Zunächst wurden 100 µl Protein A-Sepharose-Beads (P3391-1.5G, Protein A-Sepharose from Staphylococcus aureus, Sigma-Aldrich) in einem Eppendorfgefäß 3 x mit PBS gewaschen. Dafür wurden sie für 1 min bei 4°C und 13000 rpm (Umdrehungen pro Minute) in der Zentrifuge Biofuge fresco (Firma Heraeus) zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurden 100 µl PBS zum Bead-Pellet gegeben. Die Beads wurden suspendiert und 100 µl des jeweiligen Antikörpers dazugegeben. Dann wurde der Ansatz über Nacht bei 4°C im Rotator inkubiert. Am folgenden Tag stand das Eppendorfgefäß mit dem Antikörper-Bead-Gemisch für 20 min ruhig auf Eis, sodass die Beads mit gebundenen Antikörpern nach unten absanken. Das Ganze wurde wie oben beschrieben mit Hilfe der Zentrifuge mit kaltem PBS (4°C) 2 x gewaschen, dann wurde der Überstand entfernt. Zum Bead-Antikörper-Pellet wurden 100 µl 0,2 M Glycinlösung (pH 2,7; aus Aqua B. Braun Spüllösung und Glycin >99% der Firma Carl Roth) gegeben. Nach der Inkubation für 5 min auf Eis folgte die Zentrifugation bei 13000 rpm (4°C, 1 min). Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Neutralisation wurden 11 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,5) zum Überstand hinzugefügt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop One (Thermo Scientific). Gelagert wurden die Antikörper dann bei -20°C.

In einer anderen Variante der Methode wurden statt der Glycinlösung 100 µl Natriumcarbonatlösung (100 mM, pH 11,0; aus Na₂CO₃ [Natriumcarbonat] 99,5% der Firma Grüssing und destilliertem Was-

ser) zum Antikörper-Bead-Pellet hinzugefügt. Nach der Inkubation im Rotator für 10 min bei 4°C und der anschließenden Zentrifugation bei 13000 rpm (1 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß gefüllt und mit 17 µl 1 M Essigsäure (angesetzt aus 99-100% Essigsäure der Firma Carl Roth und destilliertem Wasser) neutralisiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben nach der Neutralisation verfahren.

Eine weitere Variation dieser Methode beinhaltet die Nutzung von erhitztem PBS zum Lösen der Antikörper von den Protein A-Sepharose-Beads (DRENCKHAHN, FRANZ, 1986). Statt Glycin oder Na₂CO₃-Lösung wurden nach den oben genannten Schritten 100 µl PBS (55°C) zum Antikörper-Bead-Pellet gegeben und der Ansatz für 10 min bei 55°C im Thermomixer compact von Eppendorf bei 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der Inhalt des Eppendorfröhrchens bei 13000 rpm und 4°C für 1 min zentrifugiert, dann wurde der Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen pipettiert und wie oben genannt mit der Messung der Proteinkonzentration fortgefahren.

3.8 SDS-PAGE und Western Blot

3.8.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erfolgte wie von Johnston et al. und Schmitz et al. beschrieben (JOHNSTON et al., 1989; SCHMITZ et al., 2000). Um das Fusionsprotein für die SDS-PAGE in denaturierter Form vorliegen zu haben, wurde zum Bead-Pellet mit entweder gebundenem DXML2-GST-Fusionsprotein oder GST-Protein (Herstellung siehe Abschnitt 3.6) zuvor auf 95°C erhitzter SDS-Ladepuffer gegeben und mit einer Pipette vermischt. Das Gemisch wurde über Nacht bei -20°C eingefroren.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurde ein zehnprozentiges Trenngel angefertigt. Nach dem Einspannen zweier Glasplatten in eine Elektrophoresekammer (miniVE vertical electrophoresis system, Hoefer, Inc.) wurde das Gel dazwischengegeben und der Rest des Zwischenraums bis zum Rand mit destilliertem Wasser aufgefüllt, um eine glatte Geloberfläche ohne Luftbläschen zu gewährleisten. Nach 45 min und somit der Auspolymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen. Anschließend wurde das Sammelgel gemischt und zwischen die beiden Glasplatten auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wurde zur Bildung von Taschen ein Kamm geschoben und nach Auspolymerisation des Sammelgels wieder herausgezogen. Der SDS-Elektrophoresepuffer wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und in die Elektrophoresekammer gefüllt. Die Proteinproben im Ladepuffer wurden erneut für 10 min auf 96°C erhitzt und in die Taschen des Sammelgels appliziert. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde der Marker RotiMark Standard der Firma Carl Roth aufgetragen. Auf die gefüllten Sammelgeltaschen wurde für

eine leitende Verbindung tropfenweise Elektrophoresepuffer gegeben. Beim darauffolgenden Trennvorgang lag die Spannung für 30 min bei 80 Volt, solange die Proteine im Sammelgel waren. Sobald die Proteine im Trenngel angekommen waren, wurde die Spannung für etwa 1,5 Stunden auf 195 Volt erhöht. Nach der Auftrennung der Proteine wurden die Glasplatten herausgenommen und das Trenngel für den anschließenden Western Blot vorsichtig abgezogen.

3.8.2 Western Blot

Die Methode des Western Blots wurde wie von Schmitz et al. beschrieben durchgeführt (SCHMITZ et al., 2000). Das Trenngel aus der SDS-PAGE mit den Proteinbanden wurde in einem Westernblot-Kammersystem (TE Series Transport Electrophoresis Unit, Hoefer Scientific Instruments) mit einer aufliegenden Nitrocellulosefolie zwischen Filterpapieren und Schwämmen auf beiden Seiten positioniert. Dabei war es wichtig, den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden. Das Kammersystem wurde mit Western Blot-Transferpuffer gefüllt und an eine Stromquelle von Carl Roth angeschlossen. Per Elektrotransfer wurden die Proteine vom Gel bei 4°C und einer Spannung von 50 V über 5 h auf die Nitrocellulosemembran übertragen.

Nach der reversiblen Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S und der Beschriftung der Proteinbanden folgten die Entfärbung in PBS und die Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen der Membran durch Schwenken in Magermilch (5% Magermilchpulver in PBS) für 45 min.

Anschließend wurde die Inkubation der Proteinbanden mit den primären Antikörpern, die spezifisch an DMXL2 binden, über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Antikörper wurden dafür mit Magermilch verdünnt. Zum Entfernen der nicht gebundenen Primärantikörper wurde danach 6 x 5 min mit PBS gewaschen. In einem weiteren Schritt wurde der Sekundärantikörper GAM-POX mit Magermilch verdünnt aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das Programm ChemiDoc XRS genutzt, um durch „enhanced chemoluminescence (ECL)“ über den Sekundärantikörper zu detektieren, wie viel der jeweiligen primären Antikörper an die Proteinbanden gebunden hat. Dafür wurden die beiden Substrate ECL1 und ECL2, die überall dort, wo sich die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase (POX) befindet, zu einer chemischen Reaktion führen, zu gleichen Anteilen gemischt. Dann wurden die Banden mit dem Gemisch aus den Substraten beträufelt und das entstehende Lichtsignal mit einem GelDoc Chemilumineszenz-Dokumentationssystem (Bio-Rad) aufgenommen. Darauffolgend wurde die Nitrocellulosefolie mit PBS gewaschen und wieder 45 min in Magermilch abgesättigt. Über Nacht wurde sie mit einem mit Magermilch verdünnten Primärantikörper, der spezifisch an GST bindet, erneut bei 4°C inkubiert und

im Anschluss wie oben beschrieben ein weiteres Mal mit dem Sekundärantikörper GAM-POX. Dann wurde das Signal wieder mit dem System von Bio-Rad dokumentiert.

4 Ergebnisse

4.1 Western Blot mit dem DMXL2-Fusionsprotein

Um die Spezifität der monoklonalen Anti-DMXL2-Antikörper für DMXL2 und ihre Bindung an dieses Protein nachzuweisen, wurde ein Western Blot mit dem DMXL2-Fusionsprotein und dem als Kontrolle genutzten Protein GST durchgeführt. Nach der Übertragung der Proteinbanden auf die Nitrocellulosefolien wurden diese zunächst mit den gegen das DMXL2-Fusionsprotein gerichteten Antikörpern 2G2 (Abbildung 8A1) und 12D8 (Abbildung 8B1) inkubiert. Nach anschließender Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurde die Antikörperbindung mit Hilfe von Chemilumineszenz sichtbar. Beide Klone des Anti-DMXL2-Antikörpers markierten das DMXL2-Fusionsprotein und zeigten Banden bei ca. 45 kDa. Ohne Antikörper-Stripping folgte die Inkubation mit dem monoklonalen Anti-GST-Antikörper mit anschließender Detektion. In den Aufnahmen ist die für GST typische Bande bei 26 kDa erkennbar (Abbildung 8A2, B2), die von den Anti-DMXL2-Antikörpern nicht markiert wurde. Die Banden unterhalb von 45 kDa in Abbildung 8A sind auf Bruchstücke des Fusionsproteins aufgrund von Proteolyse zurückzuführen. Die Ergebnisse des Western Blots zeigen, dass die Klone 2G2 und 12D8 des Anti-DMXL2-Fusionsprotein-Antikörpers nur das DMXL2-Fusionsprotein erkennen.

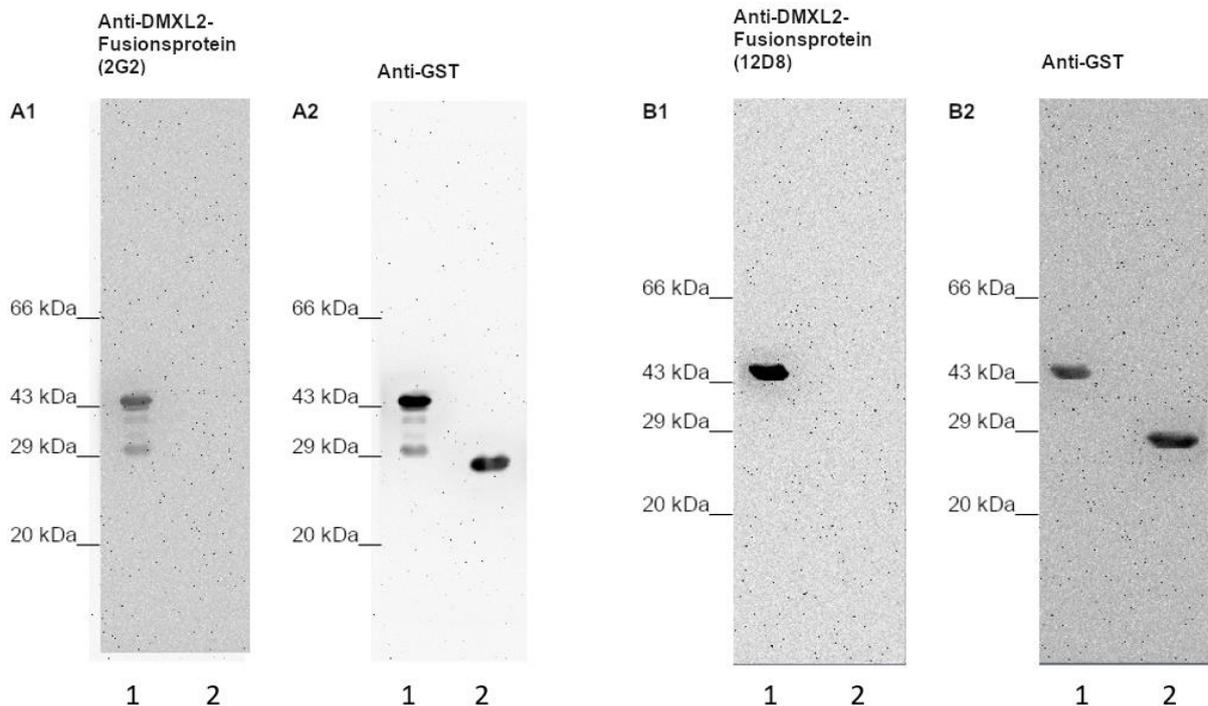


Abbildung 8: Markierung des DMXL2-Fusionsproteins im Western Blot

In Spur 1 wurde jeweils das DMXL2-Fusionsprotein aufgetragen, in Spur 2 das Kontrollprotein GST. Nach Inkubation mit den Anti-DMXL2-Fusionsprotein-Antikörpern 2G2 und 12D8 zeigt sich in der Spur des DMXL2-Fusionsproteins eine Bande bei ca. 45 kDa (**A1**, **B1**). Nachdem anschließend ohne ein Antikörper-Stripping mit dem Anti-GST-Antikörper inkubiert wurde, ist eine weitere Bande in Spur 2 bei 26 kDa zu erkennen, was der erwarteten Größe des Proteins GST entspricht (**A2**, **B2**). Links der Nitrocellulosestreifen dienen die kDa-Angaben des Proteinmarkers zur Orientierung.

Abbildung modifiziert aus Dittrich et al. (DITTRICH et al., 2023).

4.2 Immunfluoreszenzexperimente zur Lokalisation von DMXL2

Zur Bestimmung der Lokalisation von DMXL2 in der Retina wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit den Anti-DMXL2-Fusionsprotein-Klonen 2G2 und 12D8 an Kryostat- und Semidünnschnitten der Mausretina durchgeführt. Um die Signale genau zuzuordnen, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen die Proteine RIBEYE, Cav1.4, PSD-95 und CSP, deren Position in der Retina bereits bekannt ist, vorgenommen. So konnten beim Vergleich der Antikörpersignale in den Doppelimmunfluoreszenzfärbungen Rückschlüsse auf die Lage von DMXL2 gezogen werden. Wenn kaum oder keine Hintergrundsignale sichtbar waren, wurden die Schnitte der Negativkontrollen auch im Durchlicht-Kanal („transmitted light channel“, TD) aufgenommen, in dem sich die retinalen Zellen erkennen lassen. Aufgrund der geringen Schnittdicke wurden von den Negativkontrollen Übersichtsaufnahmen gemacht, sodass eine Orientierung anhand der Schichten möglich ist. Auch bei Detailaufnahmen der OPL in den Negativkontrollen waren keine Immunfluoreszenzsignale sichtbar, die über unspezifische Hintergrundsignale hinausgingen.

4.2.1 Immunfluoreszenzfärbung von DMXL2

In der Immunfluoreszenzfärbung von DMXL2 mit dem Anti-DMXL2-Fusionsprotein-Antikörper 2G2 auf Kryostatschnitten, die mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiovert200 analysiert wurde, lässt sich DMXL2 im Stratum plexiforme externum (Outer plexiform layer, OPL) (Abbildung 9) lokalisieren. In der Detailaufnahme der OPL erscheinen die Signale von DMXL2 punkt- bis halbkreisförmig (Abbildung 9C). Da in den Negativkontrollen (Abbildung 9B, D) lediglich unspezifische Hintergrundsignale vorliegen, handelt es sich bei den Antikörpersignalen in Abbildung 9A und C nicht um Autofluoreszenz.

Die konfokalen Aufnahmen nach der Markierung von Semidünnschnitten mit dem Anti-DMXL2-Fusionsprotein-Antikörper 12D8 zeigen ebenfalls eine starke Anreicherung von DMXL2 in der OPL und ein weniger starkes Signal im Stratum plexiforme internum (Inner plexiform layer, IPL) (Abbildung 10). In der Detailaufnahme der OPL sind die Immunfluoreszenzsignale rund bis sichelförmig (Abbildung 10C). Als Kontrolle der Detailaufnahme der OPL wird wegen der geringen Schnittdicke eine Übersichtsaufnahme der Negativkontrolle gezeigt, in der sich im Durchlichtkanal das retinale Pigmentepithel abgrenzen lässt und eine Orientierung möglich ist (Abbildung 10D2). Auch bei Betrachtung von Detailaufnahmen der OPL waren in der Negativkontrolle keine Immunfluoreszenzsignale sichtbar.

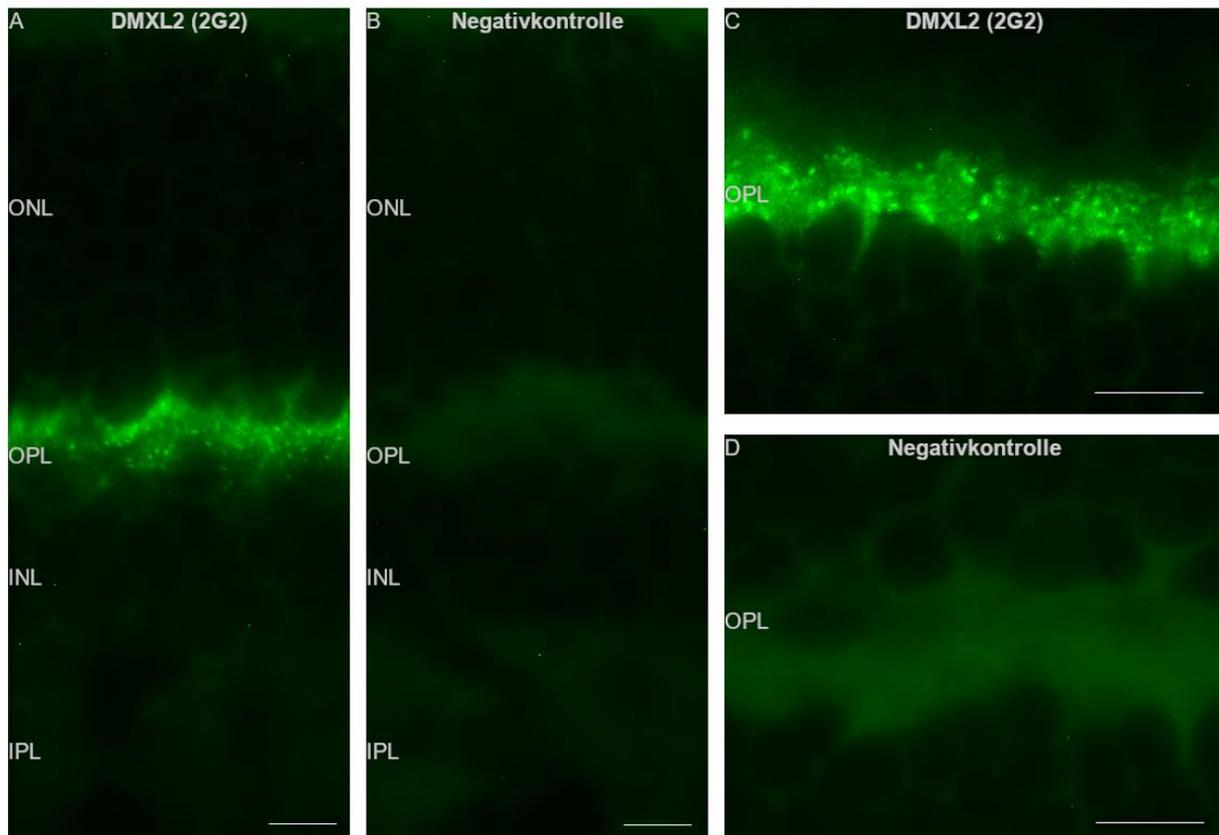


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von DMXL2 in der Retina (Klon 2G2)

Kryostatschnitte der Mausretina sind immunfluoreszenzgefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) (A, C). Bei den Negativkontrollen (B für A, D für C) wurde anstatt des Primärantikörpers PBS aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiovert200. Abkürzungen: ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Maßstab: 10 μ m.

Abbildung modifiziert aus Dittrich et al. (DITTRICH et al., 2023).

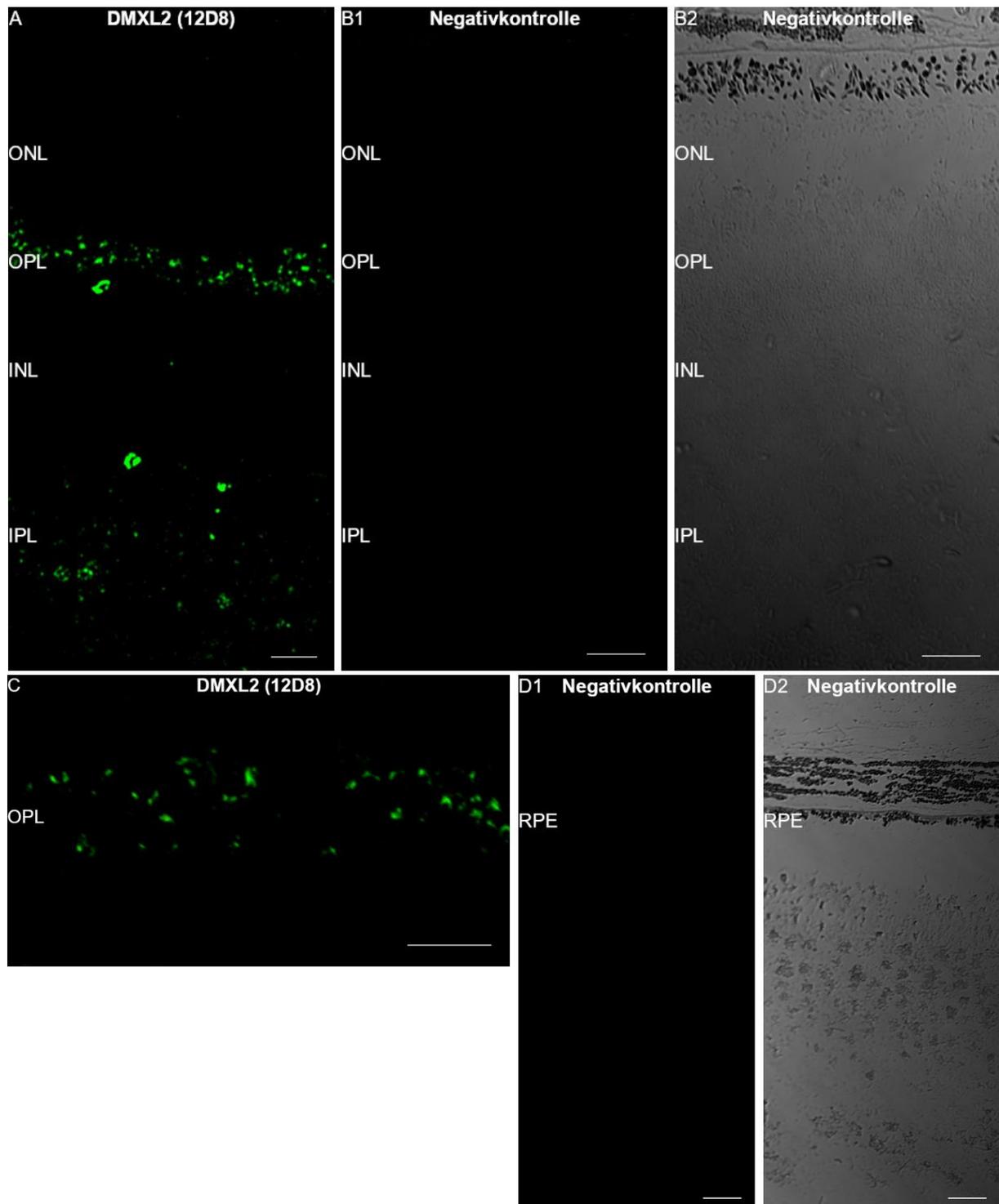
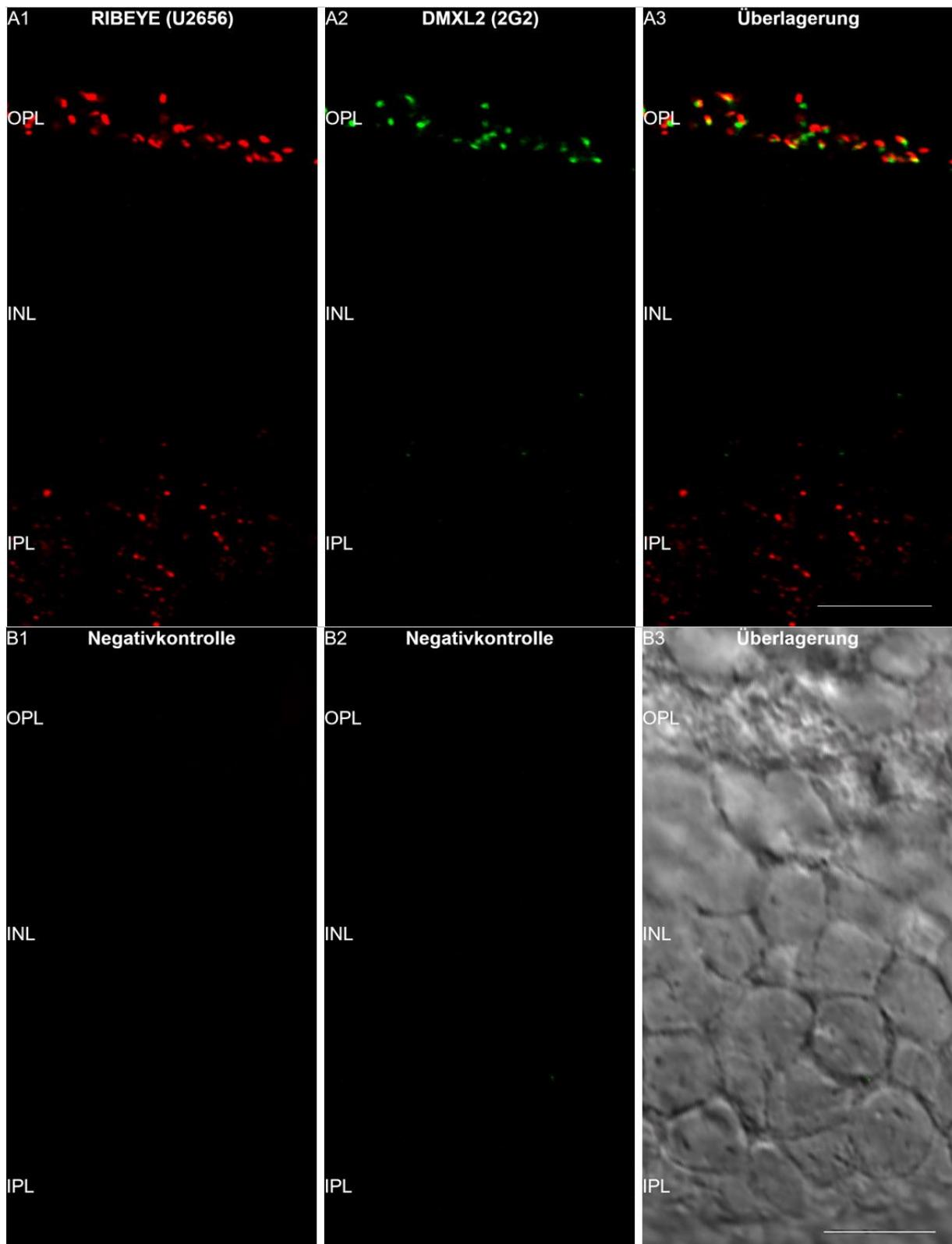


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von DMXL2 in der Retina (Klon 12D8)

Konfokale Aufnahmen von Semidünnschnitten der Mausretina. **A** und **C** sind immunfluoreszenzgefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 12D8). Bei den Negativkontrollen (**B** für **A**, **D** für **C**) wurde anstatt des Primärantikörpers PBS aufgetragen. Da in der Negativkontrolle kein Hintergrund zu sehen ist, wurden die Schichten der Retina zusätzlich im Durchlicht-Kanal („transmitted light channel“, TD) aufgenommen, in dem retinale Zellen erkennbar sind (**B2**, **D2**). Abkürzungen: ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; RPE, retinal pigment epithelium. Maßstab: 10 μ m.

4.2.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und RIBEYE

Da RIBEYE spezifisch für synaptische Ribbons ist, werden diese durch den Antikörper U2656 gegen die RIBEYE-B-Domäne markiert (SCHMITZ et al., 2000). In den konfokalen Aufnahmen der Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Kryostatschnitten mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) und dem polyklonalen Kaninchenantikörper U2656 zeigt sich das Signal von RIBEYE sowohl in der OPL als auch in der IPL, wo es weniger stark ausgeprägt ist (Abbildung 11A). DMXL2 kann ebenfalls in der OPL gefunden werden und besitzt dort eine ähnliche Verteilung wie RIBEYE (Abbildung 11). Dabei ist das Signal von DMXL2 punktförmiger als die Hufeisen-förmigen Signale von RIBEYE und überlappt zu großen Teilen mit diesen. In der Negativkontrolle lässt sich bei gleichen Kameraeinstellungen nur unspezifisches Hintergrundsignal feststellen (Abbildung 11B), also ist das beschriebene Immunfluoreszenzsignal nicht auf Autofluoreszenz zurückzuführen.



(Abbildungslegende auf der folgenden Seite)

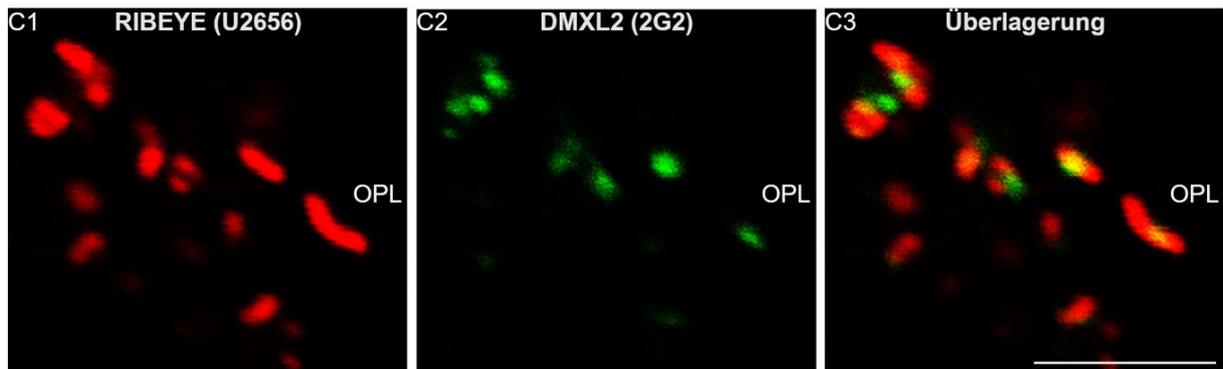


Abbildung 11: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und RIBEYE in der Retina

Konfokale Aufnahmen von Kryostatschnitten der Mausretina. **A** und **C** sind doppelimmunfluoreszenzgefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) und dem polyklonalen Kaninchenantikörper U2656, der das Protein RIBEYE markiert. Bei der Negativkontrolle (**B**) für **A** und **C** wurde anstatt der Primärantikörper PBS aufgetragen. In der Überlagerung der Negativkontrolle wurde über die 2 Kanäle der Durchlicht-Kanal gelegt (**B3**). Abkürzungen: OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Maßstab: 10 µm.

C1-C3 der Abbildung modifiziert aus Dittrich et al. (DITTRICH et al., 2023).

4.2.3 Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und Cav1.4

Cav1.4 befindet sich in Ribbonsynapsen entlang der aktiven Zone (DEMBLA et al., 2020). In Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurden somit auf Semidünnschnitten die aktiven Zonen mit polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen Cav1.4 N-term und C-term markiert. Sowohl Cav1.4 als auch DMXL2 zeigen ein schwaches Signal in der IPL und ein ausgeprägtes Immunfluoreszenzsignal in der OPL (Abbildung 12A). Bei näherer Betrachtung der OPL fällt eine Kolo-kalisation der punkt- bis halbmondförmigen Signale von Cav1.4 und DMXL2 auf (Abbildung 13, 14A). In den Negativkontrollen lassen sich abgesehen von unspezifischen Hintergrundsignalen wie eine Markierung von Gefäßen in der INL keine Immunfluoreszenzsignale feststellen, sodass die oben beschriebenen Immunfluoreszenzsignale in der OPL der anderen Retinaschnitte nicht auf Autofluoreszenz zurückzuführen sind (Abbildung 12B, 14B).

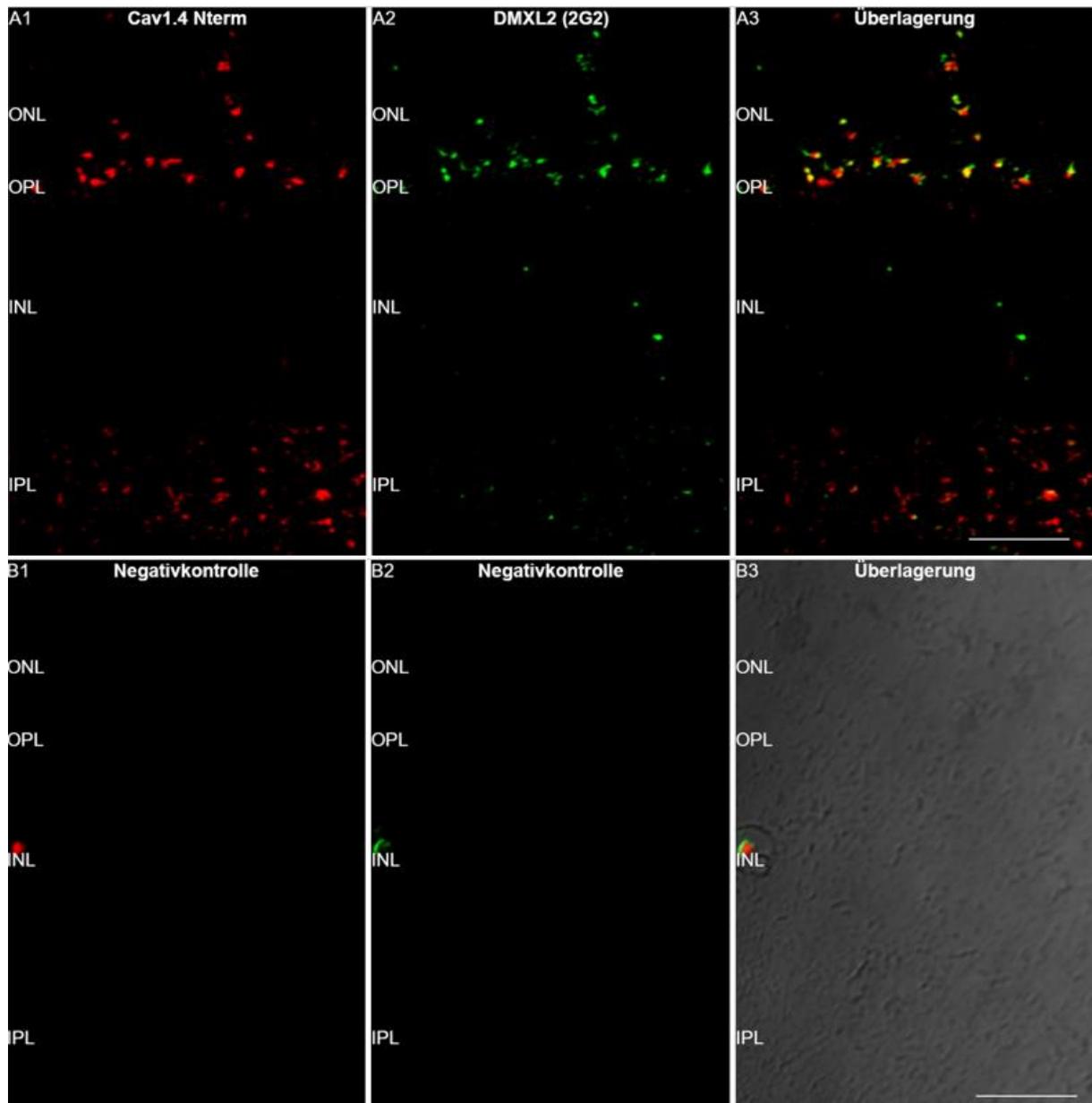


Abbildung 12: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und Cav1.4 in der Retina

Konfokale Aufnahmen von Semidünnschnitten der Mausretina. **A** ist doppelimmunfluoreszenzgefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) und einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Cav1.4 (N-term). Bei der Negativkontrolle (**B**) wurde anstatt mit den Primärantikörpern mit PBS inkubiert. In der Überlagerung der Negativkontrolle wurde über die 2 Kanäle der Durchlicht-Kanal gelegt (**B3**). Abkürzungen: ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Maßstab: 10 µm.

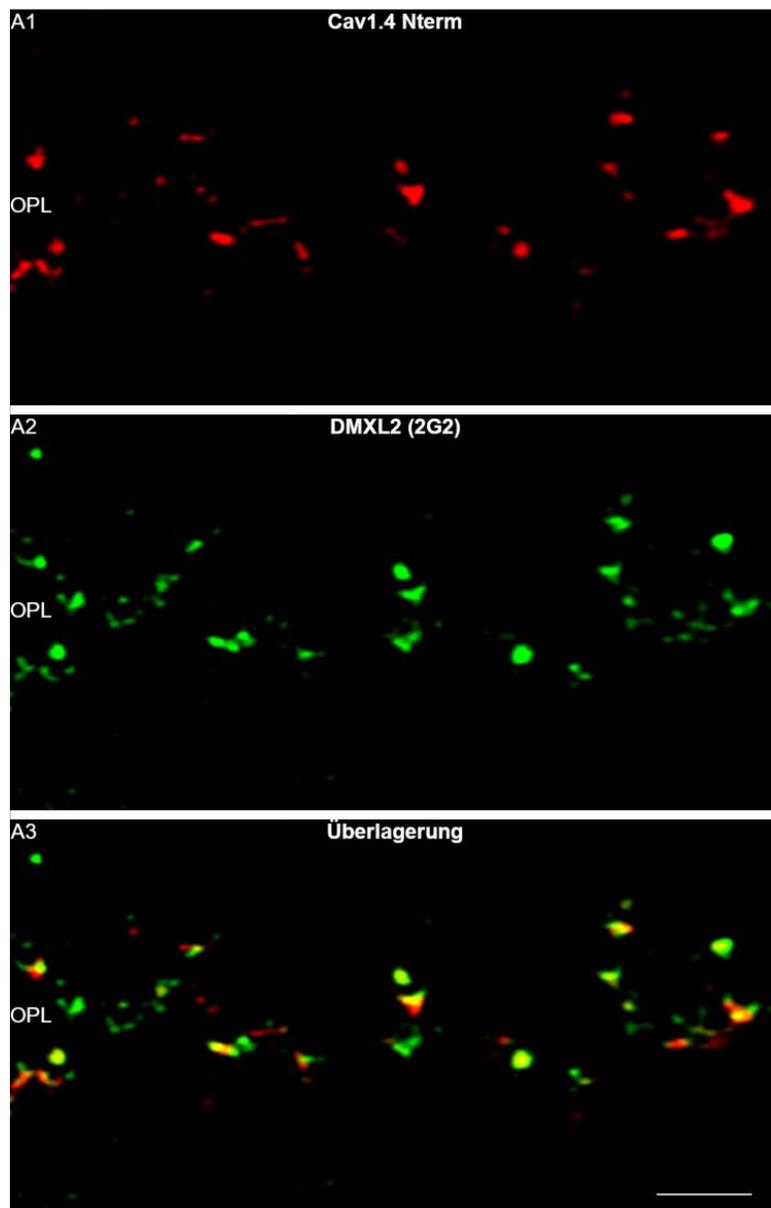


Abbildung 13: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und Cav1.4 in der OPL (Klon 2G2)

Konfokale Detailaufnahmen der OPL von einem Semidünnschnitt der Mausretina. Dieser ist doppelimmunfluoreszenzgefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) und einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen Cav1.4 (N-term). Für die Negativkontrolle siehe Abbildung 10. Abkürzung: OPL, outer plexiform layer. Maßstab: 5 μm .

Abbildung modifiziert aus Dittrich et al. (DITTRICH et al., 2023).

des runden PSD-95-Signals in Richtung INL und somit innerhalb der Präsynapse liegen (Abbildung 16A3, C3). In den Aufnahmen der Negativkontrollen sind neben unspezifischen Hintergrundsignalen oder markierten Gefäßen in der INL keine Immunfluoreszenzsignale zu sehen, weshalb es sich bei den oben beschriebenen Immunfluoreszenzsignalen der anderen Retinaschnitte nicht um Autofluoreszenz handeln kann (Abbildung 15B; 16B, D).

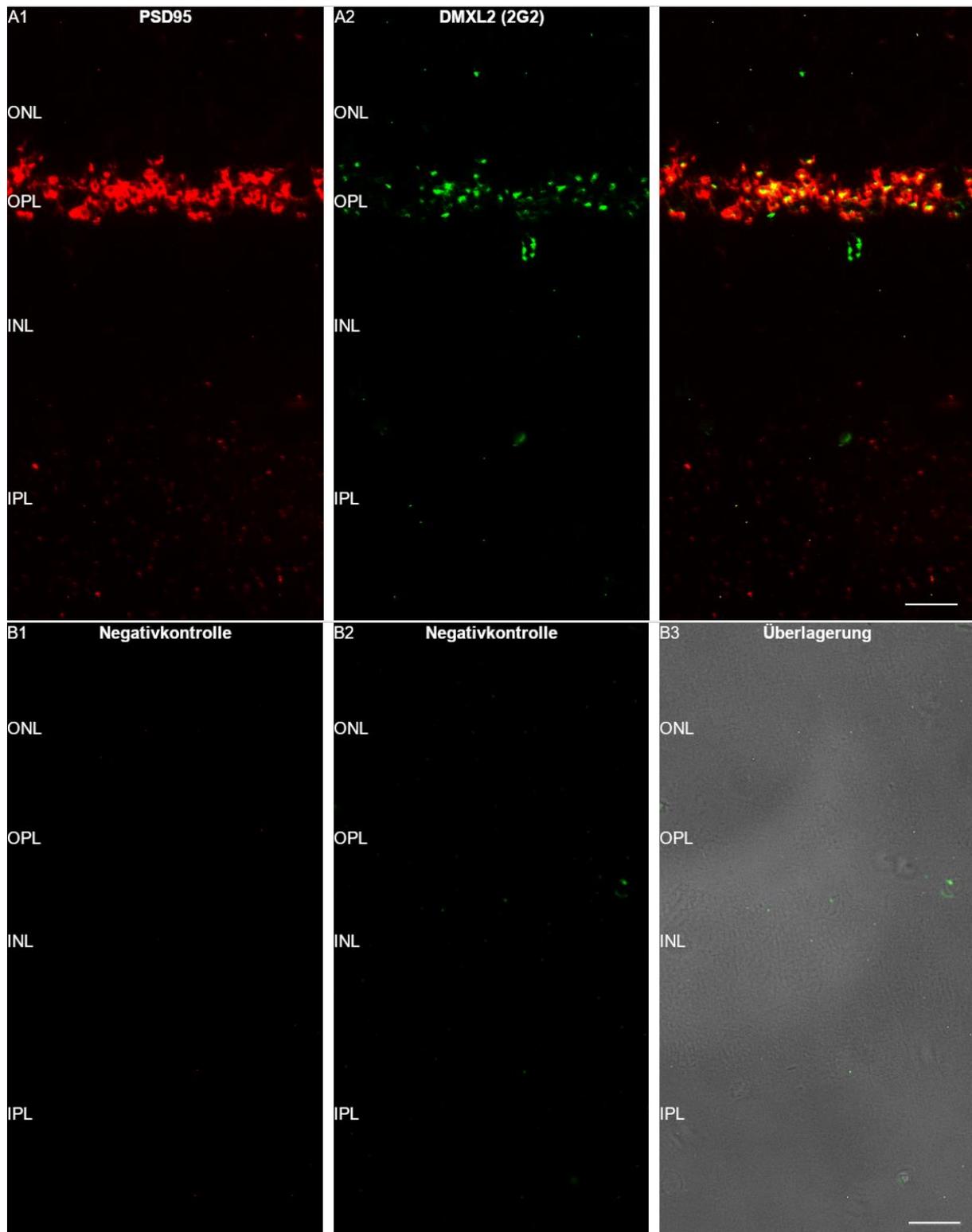
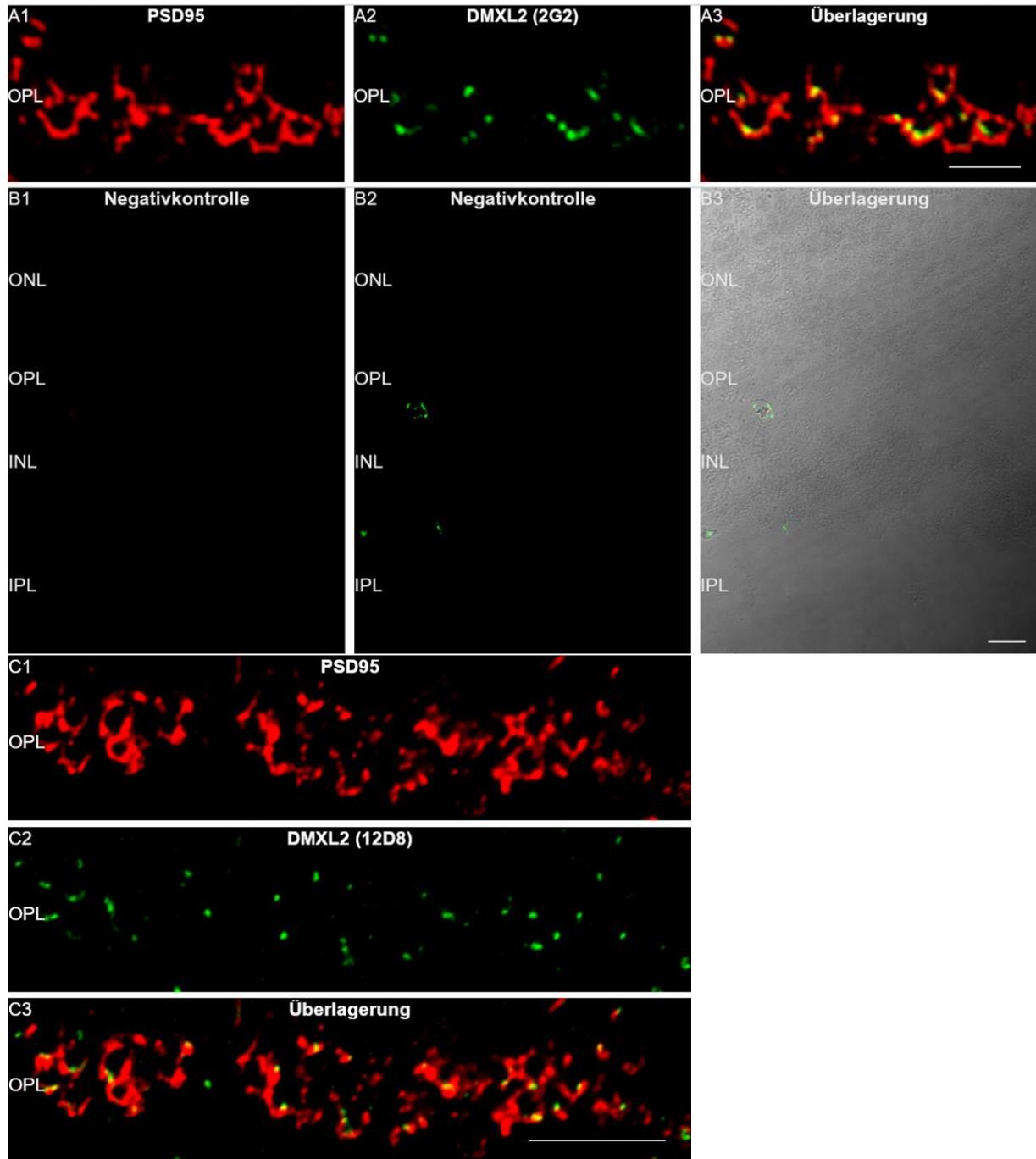


Abbildung 15: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und PSD-95 in der Retina

Semidünnschnitte der Mausretina, deren Dokumentation mit dem Epifluoreszenzmikroskop Axiovert200 erfolgte. **A** ist immunfluoreszenzgefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) und dem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen das Protein PSD-95. Für die Negativkontrolle (**B**) wurde der Schnitt anstatt mit den Primärantikörpern mit PBS inkubiert. In der Überlagerung wurde der Durchlicht-Kanal über die 2 anderen Kanäle gelegt (**B3**). Abkürzungen: ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Maßstab: 10 μ m.



(Abbildungslegende auf der folgenden Seite)

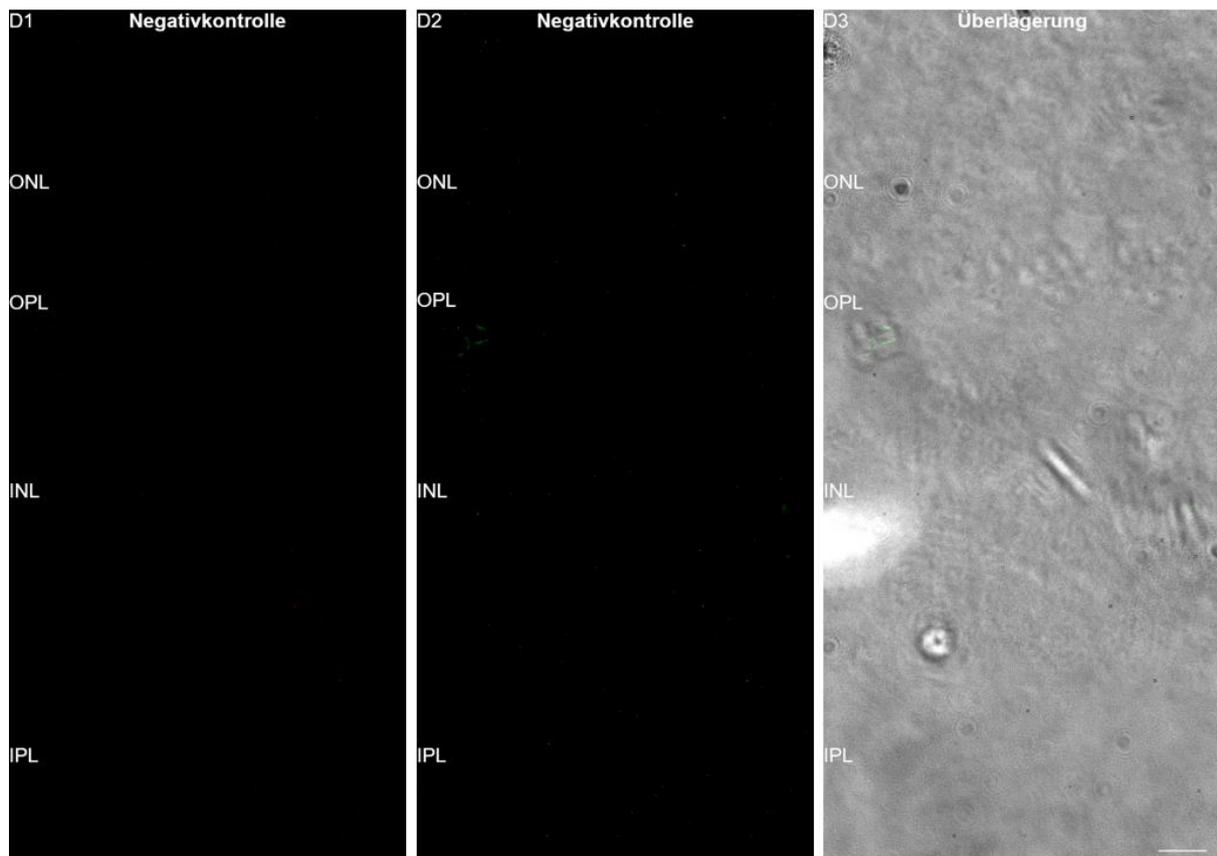


Abbildung 16: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und PSD-95 in der OPL

Konfokale (**A, B**) und mit dem Epifluoreszenzmikroskop dokumentierte (**C, D**) Aufnahmen der OPL von Semi-dünnschnitten der Mausretina. **A** und **C** sind doppelimmunfluoreszenzgefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2 in **A**, Klon 12D8 in **C**) und dem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen das Protein PSD-95. Die Schnitte der Negativkontrollen wurden anstatt mit den Primäranantikörpern mit PBS inkubiert (**B, D**) und der Durchlicht-Kanal wurde in der Überlagerung über die anderen beiden Kanäle gelegt (**B3, D3**). Abkürzungen: ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Maßstab in **A, D**: 5 μm ; Maßstab in **B, C**: 10 μm .

A1-A3 der Abbildung modifiziert aus Dittrich et al. (DITTRICH et al., 2023).

4.2.5 Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und CSP

Das Protein CSP („cysteine-string protein“ (ZINSMAIER et al., 1990)) ist in neuronalen Zellen auf den synaptischen Vesikeln lokalisiert (MASTROGIACOMO et al., 1994). In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Anti-CSP-Endserum und dem Anti-DMXL2-Antikörper auf Kryostatschnitten wird in den konfokalen Aufnahmen beim Vergleich der beiden Signale in der OPL sichtbar, dass das Signal von CSP die synaptischen Terminalen ausfüllt, während DMXL2 nicht im gesamten Endknöpfchen angereichert ist, sondern ein punkt- bis sichelförmiges Signal aufweist (Abbildung 17A). In der Überlagerung liegen alle Signale von DMXL2 innerhalb des Immunfluoreszenzsignals von CSP und somit im Bereich der synaptischen Terminalen beziehungsweise des synaptischen Vesikelpools. In der Negativkontrolle ohne die primären Antikörper sind die retinalen Schichten in der Überlagerung eindeutig zu erkennen, ansonsten zeigt sich nur unspezifisches Hintergrundsignal (Abbildung 17B).

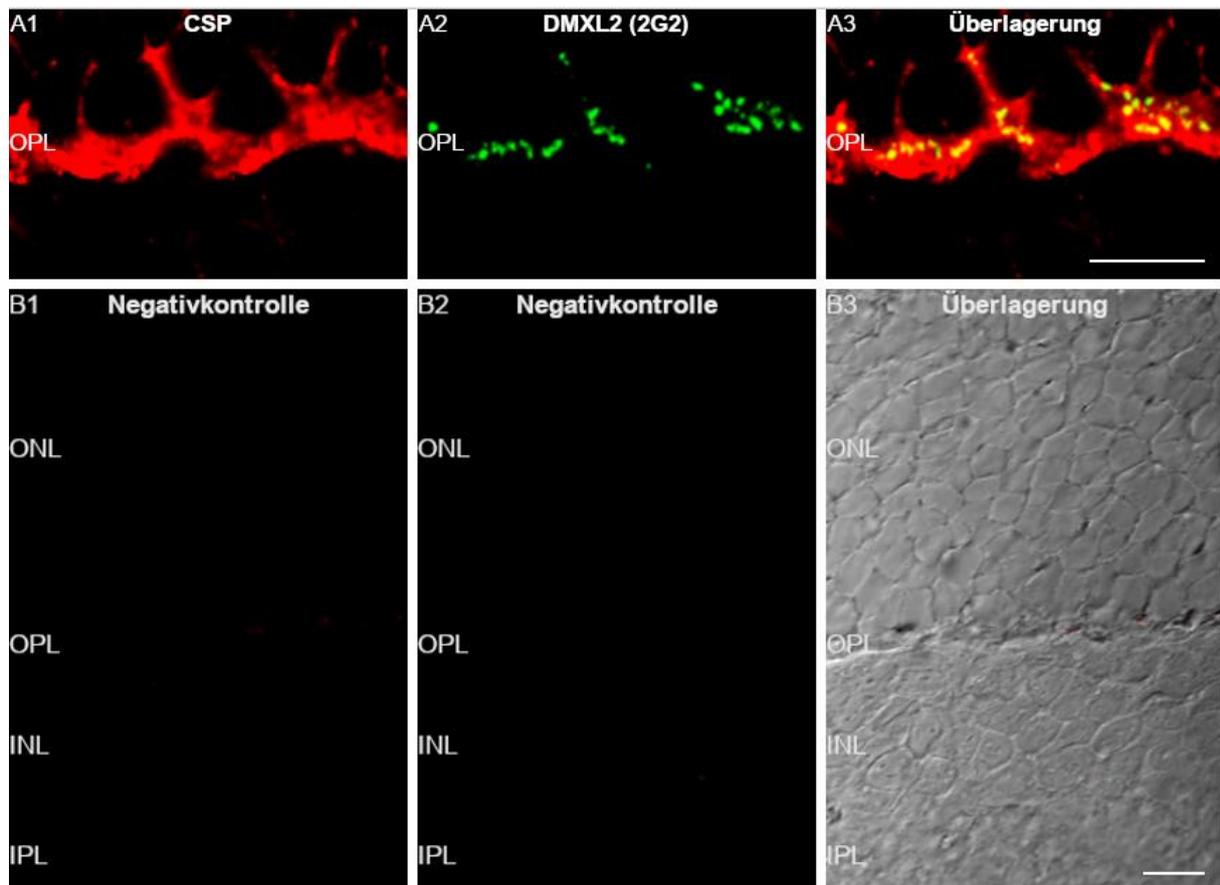


Abbildung 17: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und CSP in der OPL

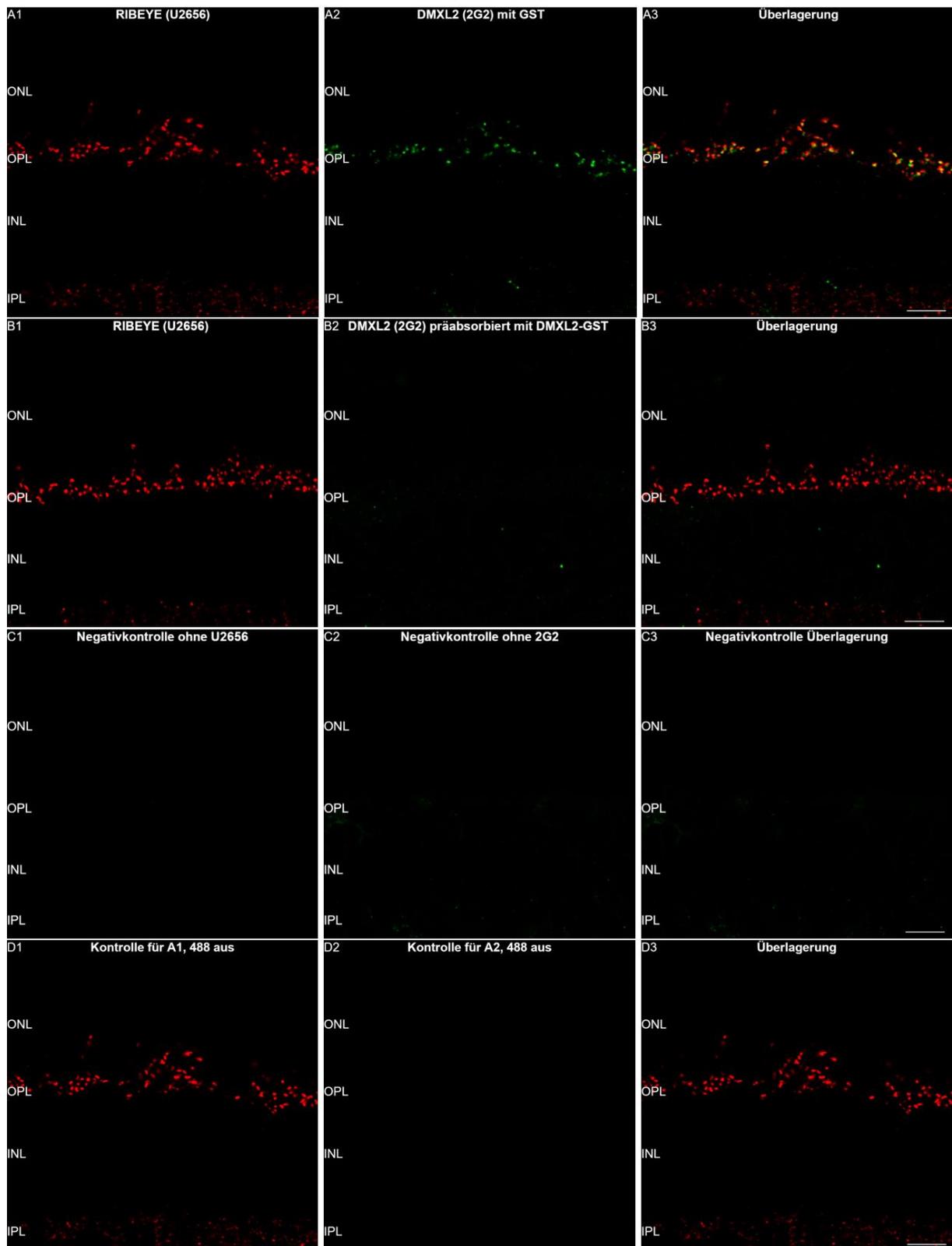
Konfokale Aufnahmen von Kryostatschnitten der Mausretina. **A** ist doppelimmunfluoreszenzgefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) und dem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen das Protein CSP. Für die Negativkontrolle (**B**) wurde der Schnitt anstatt mit den Primäranantikörpern mit PBS inkubiert und in der Überlagerung der Aufnahmen der Durchlicht-Kanal über die anderen beiden Kanäle gelegt (**B3**). Abkürzungen: ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Maßstab: 10 μ m.

A1-A3 der Abbildung modifiziert aus Dittrich et al. (DITTRICH et al., 2023).

4.3 Präabsorption von Anti-DMXL2 (2G2)

Um die Spezifität des monoklonalen Anti-DMXL2-Antikörpers für DMXL2 ergänzend zum Western Blot zu belegen, wurde eine Präabsorption des Antikörpers mit dem DMXL2-Fusionsprotein durchgeführt. Dafür wurde der gegen das DMXL2-Fusionsprotein gerichtete Antikörper (Klon 2G2) vor seinem Einsatz auf den Gewebeschnitten der Mausretina entweder mit dem DMXL2-Fusionsprotein oder dem als Kontrolle dienenden Protein GST inkubiert. Anschließend wurden Kryostatschnitte mit dem so vorbereiteten DMXL2-Antikörper und dem ebenfalls als Kontrolle eingesetzten polyklonalen Anti-RIBEYE Kaninchenantikörper U2656 doppelimmunfluoreszenzgefärbt. In den konfokalen Aufnahmen ist das Immunfluoreszenzsignal von DMXL2 bei vorheriger Inkubation mit dem irrelevanten Kontrollprotein GST unverändert kräftig in der OPL zu sehen (Abbildung 18A). Bei Absorption des DMXL2-Antikörpers von dem DMXL2-Fusionsprotein hingegen (Abbildung 18B) zeigt sich in die-

sem Kanal bei gleichen Kamera- und Lasereinstellungen nur ein mit der Negativkontrolle (Abbildung 18C) vergleichbares unspezifisches Hintergrundsignal. Im Vergleich dazu bleibt das Signal vom Anti-RIBEYE-Antikörper unbeeinflusst, sodass das typische, stark ausgeprägte Signal in der OPL und ein schwächeres Signal in der IPL erkennbar sind (Abbildung 18A, B). In weiteren Kontrollaufnahmen (Abbildung 18D-F) ist kein Durchschlagen des Immunfluoreszenzsignals in den roten oder grünen Kanal bei Ausschalten des jeweiligen Lasers zu beobachten. Die Aufnahmen der Präabsorptionsexperimente bestätigen, dass der Anti-DMXL2-Antikörper (Klon 2G2) im Gewebe spezifisch an das Protein DMXL2 bindet, weshalb nach vorheriger Bindung an dieses Protein keine für den Antikörper charakteristische Immunfluoreszenzmarkierung in der Retina zu erkennen ist. Ein für den Anti-DMXL2-Antikörper irrelevantes Protein wie GST nimmt keinen Einfluss auf dessen Bindung an sein Zielprotein im Gewebe.



(Abbildungslegende auf der folgenden Seite)

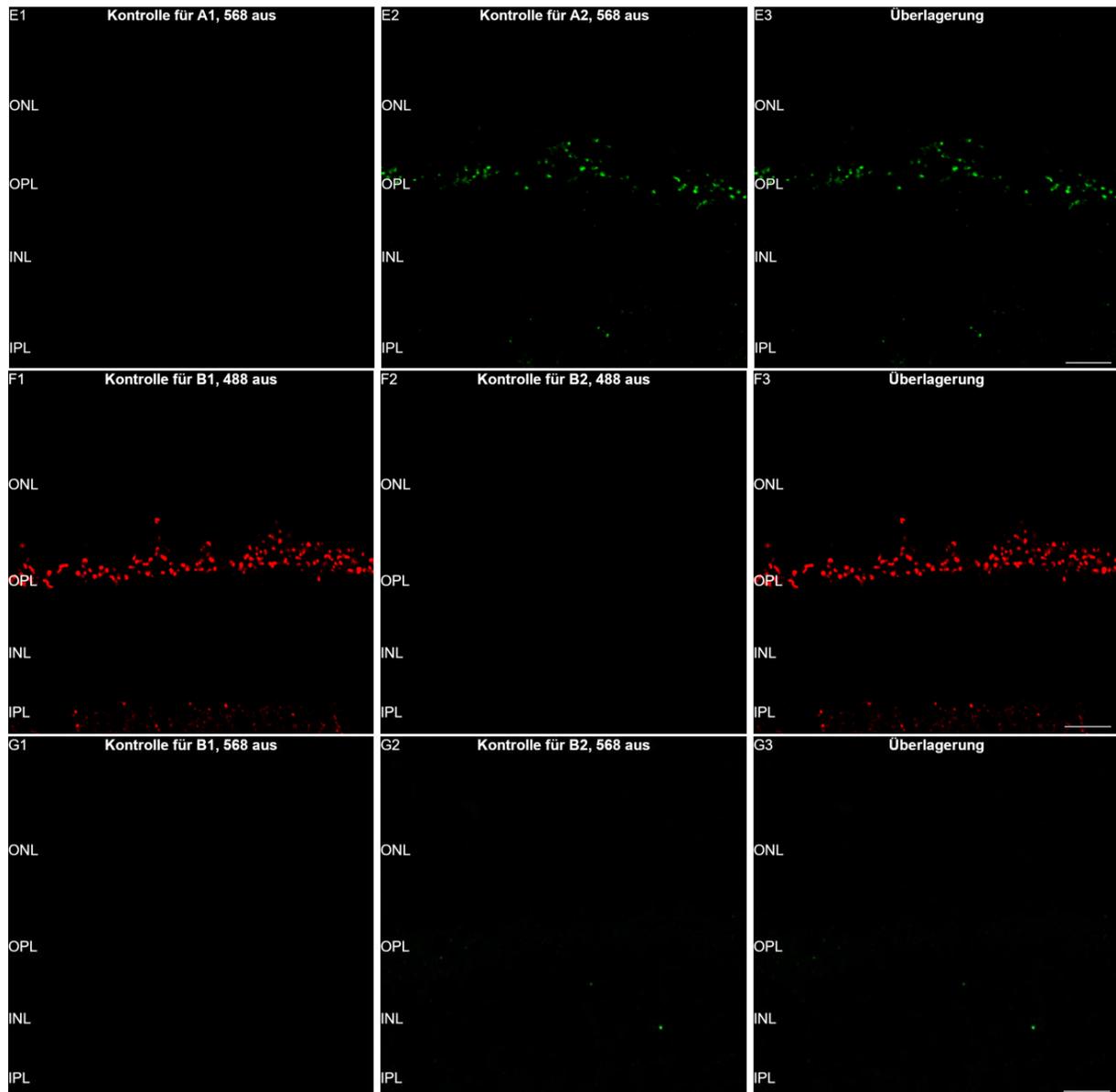


Abbildung 18: Präabsorption mit dem DMXL2-Fusionsprotein

Konfokale Aufnahmen von Kryostatschnitten der Mausretina, die doppelimmunfluoreszenzgefärbt sind mit dem polyklonalen anti-RIBEYE Kaninchenantikörper U2656 und dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) (**A, B, D-G**). Bei der Negativkontrolle **C** wurde anstatt der Primäantikörper PBS aufgetragen. Der DMXL2-Antikörper (2G2) wurde vor seinem Einsatz entweder mit dem Kontrollprotein GST (**A, D, E**) oder mit dem DMXL2-Fusionsprotein (**B, F, G**) inkubiert. Bei **D-G** handelt es sich um Kontrollaufnahmen der beiden Kryostatschnitte von **A** und **B**, in denen bei sonst gleichen Aufnahmebedingungen und identischem Bildausschnitt jeweils ein Laser ausgeschaltet wurde. Abkürzungen: ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer. Maßstab: 10 µm.

4.4 Post-embedding Immunogold-Markierung

Um die lichtmikroskopisch beobachteten Immunfluoreszenzsignale noch präziser zuzuordnen, wurde eine Post-embedding Immunogold-Markierung von Ultradünnschnitten der Mausretina mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) durchgeführt. Dieser wur-

de durch einen Sekundärantikörper mit daran gekoppelten 1,4 nm-Goldpartikeln und anschließender Silberverstärkung sichtbar. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Photorezeptorsynapsen ist eine Markierung entlang der gesamten synaptischen Ribbons erkennbar (Abbildung 19A-G). Abseits der Ribbons konnte keine Konzentration der Goldpartikel festgestellt werden. Die Negativkontrollen, in denen anstatt mit dem Primärantikörper mit Blocking-Serum inkubiert wurde, zeigten keine Signalanreicherung (Abbildung 19H, I).

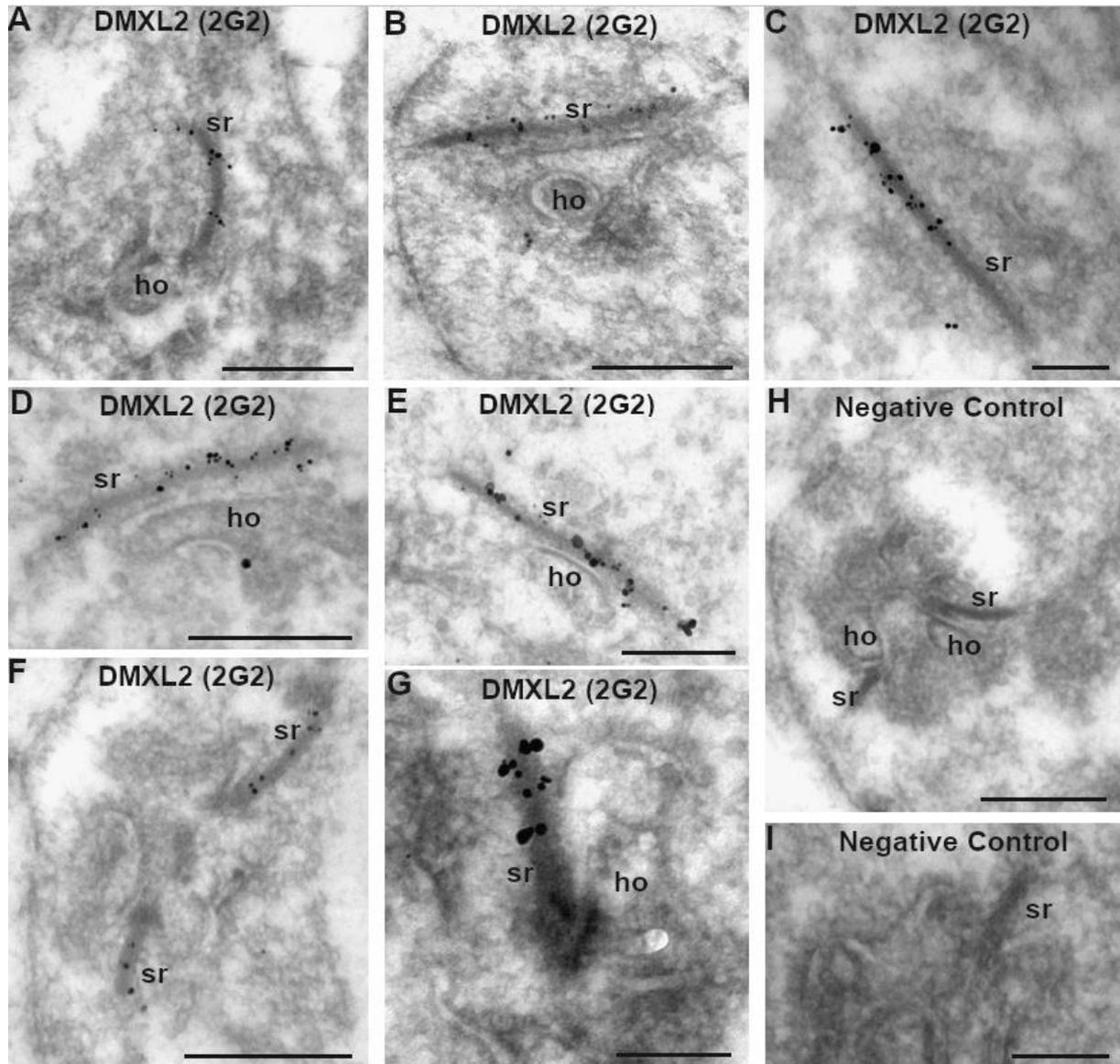


Abbildung 19: Post-embedding Immunogold-Markierung mit Anti-DMXL2 (2G2)

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Photorezeptorsynapsen nach der Post-embedding Immunogold-Markierung mit dem monoklonalen Mausantikörper gegen das DMXL2-Fusionsprotein (Klon 2G2) von Ultra-dünnschnitten der Mausretina (A-G). In den Negativkontrollen (H, I) wurde anstatt der Primärantikörper Blocking-Serum aufgetragen. sr = synaptische Ribbons; ho = Zellendriten von Horizontalzellen. Maßbalken: 0,5 μm (A, B, D, E, F, H); 0,2 μm (C, G, I).

A, E, G und I der Abbildung modifiziert aus Dittrich et al. (DITTRICH et al., 2023).

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Protein DMXL2 (auch Rabconnectin3 α) mit den monoklonalen Anti-DMXL2-Fusionsprotein-Antikörpern 2G2 und 12D8 in der Retina lokalisiert. Nach lichtmikroskopischer Beurteilung von immunfluoreszenzmarkierten Retinagewebeschnitten wurden die Befunde durch Immunogold-Markierungen mit anschließender Elektronenmikroskopie bestätigt und präzisiert.

Der Western Blot mit dem durch Bakterien hergestellten DMXL2-Fusionsprotein hat die Spezifität der Anti-DMXL2-Antikörper nachgewiesen. Die Antikörper banden spezifisch an das stark konzentrierte DMXL2-GST-Fusionsprotein. Im Western Blot mit den Retinae einiger Mäuse ließ sich das vollständige Protein DMXL2 nicht mit Hilfe der Antikörper nachweisen, was ein Indiz dafür ist, dass DMXL2 wenig abundant in der Retina ist. Die Konzentration von DMXL2 war im Retinalysat zu gering, um im Western Blot nachgewiesen zu werden. Hätte man die DMXL2 enthaltende Fraktion von Retinae vieler Mäuse konzentriert im Western Blot aufgetragen, wäre eine Markierung des Proteins möglich gewesen. Allerdings wurde die spezifische Bindung der DMXL2-Antikörper an DMXL2 bei fehlender Bindung an GST im Western Blot deutlich und auch in den Präabsorptionsexperimenten gelang der Beweis der Spezifität der Antikörper. Nach der Präabsorption des gegen DMXL2 gerichteten Antikörpers 2G2 durch das DMXL2-GST-Fusionsprotein waren in der Immunfluoreszenzfärbung mit diesem anstatt des vorher beobachteten Immunfluoreszenzsignals nur noch unspezifische Hintergrundsignale zu sehen. Die Inkubation des Antikörpers mit dem Protein GST bewirkte keinen solchen Effekt auf das Immunfluoreszenzsignal von 2G2 im Gewebe, was die Spezifität des Antikörpers belegt. Daher wurde auf den Nachweis des Proteins im Retinagewebe im Western Blot mit Hilfe dieser Antikörper aus ethischen Gründen verzichtet.

Die eingangs gestellten Fragen zur Lokalisation von DMXL2 konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten der Mausretina und anschließender lichtmikroskopischer Dokumentation beantwortet werden. Aus den Immunfluoreszenzfärbungen lässt sich schließen, dass DMXL2 in der IPL und vor allem in der OPL angereichert ist. Damit befindet es sich in den synapsenreichen Schichten der Netzhaut. Die Kolo-kalisation der Signale von DMXL2 und RIBEYE zeigt, dass DMXL2 in Ribbonsynapsen der Retina vorkommt. Die Ergebnisse legen nahe, dass DMXL2 sich in Ribbonsynapsen der Mausretina in der Präsynapse befindet. Darauf weisen sowohl die Kolo-kalisation von DMXL2 mit RIBEYE und somit mit den Ribbons (SCHMITZ et al., 2000) als auch die mit Cav1.4 und damit der aktiven Zone (DEMBLA et al., 2020) hin. Außerdem spricht die Lokalisation des DMXL2-Signals innerhalb des wabenartigen, präsynaptischen (KOULEN et al., 1998) PSD95-

Signals in der OPL für ein Vorkommen von DMXL2 vornehmlich in der Präsynapse. Bei der Markierung von DMXL2 im Corti-Organ der Maus durch Chen et al. schlossen diese aus ihren Ergebnissen darauf, dass DMXL2 sowohl prä- als auch postsynaptisch vorliegt (CHEN et al., 2017). Dass DMXL2 sich auch postsynaptisch befindet, konnte in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Retina in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Allerdings können verschiedene Arten von chemischen Synapsen entweder verschiedene Proteine oder die gleichen Proteine mit unterschiedlichen Funktionen in den für die Signalweiterleitung nötigen Abläufen besitzen (TIAN et al., 2012). Photorezeptorsynapsen der Retina und die inneren Haarzellen der Cochlea weisen einige Unterschiede in ihrer molekularen Zusammensetzung auf (MOSER et al., 2020). Somit besteht die Möglichkeit, dass auch hinsichtlich der Verteilung von DMXL2 Unterschiede zwischen Ribbonsynapsen verschiedener Organe vorliegen. Da es bei beobachteten Fällen von genetisch bedingter Schwerhörigkeit aufgrund von DMXL2-Mutationen bei Menschen keine Sehstörungen gab, sind auch hier möglicherweise unterschiedliche Gendefekte in den verschiedenen Synapsentypen relevant (WONKAM-TINGANG et al., 2021).

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen lassen die Annahme zu, dass DMXL2 in Ribbonsynapsen der Retina ein Vesikel-assoziiertes Protein ist. Diese Vermutung deckt sich mit der Zuordnung von DMXL2 zur allgemeinen Vesikelfraktion in konventionellen Synapsen durch Nagano et al. (NAGANO et al., 2002). Auch Einhorn et al. haben bei indirekter Markierung von Rabconnectin3 α in Ribbonsynapsen von Haarzellen des Innenohrs ein dem von Vesikel-Markern ähnliches, sichelförmiges Signal beobachtet (EINHORN et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen aber nahe, dass DMXL2 sich zumindest in Ribbonsynapsen der Retina nicht auf allen synaptischen Vesikeln, sondern nur auf den Ribbon-assoziierten Vesikeln befindet. Das DMXL2-Signal liegt nämlich im Bereich des Signals des Proteins CSP, aber anders als das Immunfluoreszenzsignal von CSP, das alle synaptischen Vesikel markiert (MASTROGIACOMO et al., 1994), füllt das DMXL2-Signal nicht das gesamte synaptische Endknöpfchen aus, sondern ist punkt- bis sichelförmig angereichert. Diese Beobachtung wurde durch die Elektronenmikroskopie bestätigt, bei der DMXL2 auf Ultradünnschnitten der Mausretina mit dem Anti-DMXL2-Antikörper 2G2 sehr nah an den Ribbons markiert wurde. Die Vermutung, dass DMXL2 nur mit einem bestimmten, Ribbon-nahen Pool von Vesikeln assoziiert ist, ist vereinbar mit der bestehenden Annahme, dass innerhalb von Synapsen verschiedene Vesikelpools mit variabler Proteinausstattung und Funktion existieren (CRAWFORD, KAVALALI, 2015; GOWRISANKARAN, MILOSEVIC, 2020). Wie auch Cav1.4 (DEMBLA et al., 2020) ist DMXL2 deutlich stärker in der OPL angereichert als in der IPL, in der sich nur in wenigen Inkubationen ein schwaches Signal gezeigt hat. Laut Gandini et al. interagiert DMXL2 im Gehirn in konventionellen Synapsen mit Cav2.2-Kanälen (GANDINI et al., 2019). Da die Signale von Cav1.4 und DMXL2 in der Immunfluoreszenz größtenteils überlappen, könnten weitere Untersuchungen Aufschluss darüber geben, ob DMXL2 auch mit Cav1.4-Kanälen in Ribbonsynapsen interagiert.

Die Ribbons sind bei ansonsten nahezu gleichem Aufbau der Ribbonsynapsen im Vergleich zu konventionellen chemischen Synapsen die Struktur, die besonders schnellen Vesikeltransport und damit Transmitterfreisetzung ermöglicht (SCHMITZ et al., 2000). Es ist noch nicht abschließend erforscht, wie die Vesikel an Ribbons binden. Uthaiia et al. haben die Hypothese aufgestellt, dass Rab3 an der Bindung von synaptischen Vesikeln an Ribbons beteiligt sein könnte und Kawabe et al. haben beobachtet, dass DMXL2 über den Rabconnectin3-Komplex an Rab3-Effektoren bindet (KAWABE et al., 2003; UTHAIAH, HUDSPETH, 2010). Verbunden damit lassen die Markierung von DMXL2 in der Elektronenmikroskopie entlang der Ribbons und die Annahme, dass es sich bei DMXL2 um ein Vesikel-assoziiertes Protein handelt, an die Möglichkeit einer Beteiligung von DMXL2 an der Vesikelbindung an Ribbons denken. Für diese Überlegung spricht, dass eine potenzielle Bindung einer Interaktionsstelle von DMXL2 an RIBEYE aus Datenbanken hervorgeht.

Aus bisherigen Untersuchungen geht hervor, dass Rabconnectin3 α zusammen mit Rabconnectin3 β und CAPS1 in neuroendokrinen Zellen einen Komplex mit der V-ATPase bildet und damit an der Steuerung des pH-Werts synaptischer Vesikel beteiligt ist (CRUMMY et al., 2019). CAPS1 bindet direkt an Rabconnectin3 β , das im Komplex mit Rabconnectin3 α vorliegt, und Rabconnectin3 α ermöglicht eine Anreicherung des V-ATPase-Holoenzym auf synaptischen Vesikeln in Ribbonsynapsen des Innenohrs (CRUMMY et al., 2019; EINHORN et al., 2012). Für die Exozytose selbst scheint der Rabconnectin3 α/β -Komplex im Gegensatz zu CAPS nicht notwendig zu sein, aber über die Vesikelazidifizierung für eine vollständige Befüllung synaptischer Vesikel mit Transmitter (CRUMMY et al., 2019). In den Synapsen der Retina wurde DMXL2 bisher nicht untersucht. Die in dieser Arbeit dokumentierten, oben beschriebenen Immunfluoreszenzsignale deuten darauf hin, dass Rabconnectin3 α den Prozess der Vesikelazidifizierung auch in Ribbonsynapsen der Retina unterstützt. Aufgrund der in der Elektronenmikroskopie deutlich sichtbaren Ribbon-Nähe des DMXL2-Signals, ist es möglich, dass Rabconnectin3 α diese Funktion für den Ribbon-assoziierten und somit besonders schnell freisetzbaren Vesikelpool erfüllt. Gerade bei einer Synapse, die Informationen einzelner Photonen übermitteln kann (DUNN, RIEKE, 2008; FIELD, RIEKE, 2002), könnte es von entscheidender Bedeutung sein, dass alle Vesikel zuverlässig mit Neurotransmittern befüllt sind. Auf die Absorption eines einzelnen Photons wird durch intakte Stäbchenphotorezeptorzellen ein stark amplifiziertes Signal an die Bipolarzellen weitergegeben (DUNN, RIEKE, 2008; FIELD, RIEKE, 2002). Bereits extrem geringe Veränderungen in der Transmitterausschüttungsrate, die den Dunkelstrom darstellt, beeinflussen in Photorezeptorsynapsen die Effizienz der Signalweiterleitung (SCHEIN, AHMAD, 2006). Es ist vorstellbar, dass geringe Schwankungen in der Transmitterausschüttung, die durch eine variable Vesikelfüllung ausgelöst werden, in diesem äußerst sensiblen System zur Weiterleitung veränderter Informationen führen.

Zusammenfassend ist die Lokalisation von DMXL2 in der Retina in den Aufnahmen der Immunfluoreszenz und der Elektronenmikroskopie gelungen und lässt mehrere Hypothesen zu. Es ist denkbar, dass DMXL2 ein Teil der Vesikelmembran jener Vesikel ist, die an die synaptischen Ribbons binden und über den Rabconnectin3 α / β -Komplex und Rab3-Effektoren (KAWABE et al., 2003) an der Bindung der Vesikel an Ribbons beteiligt ist, wofür die präsynaptische, Vesikel-typische und zugleich Ribbon-nahe Lokalisation spricht. Ob DMXL2 tatsächlich mit RIBEYE interagiert, sollte daher in Zukunft näher erforscht werden. Gleichzeitig könnte Rabconnectin3 α in der Retina als Komplex zusammen mit Rabconnectin3 β , CAPS1 und der V-ATPase wichtig für die Vesikelazidifizierung und somit die zuverlässige Befüllung synaptischer Vesikel mit genügend Transmittern (CRUMMY et al., 2019) für die präzise Weiterleitung von Signalen sein. Seine Lokalisation in den Photorezeptorsynapsen der Retina bietet die Möglichkeit, dass DMXL2 hier aufgrund der herausragenden Sensibilität von Photorezeptorsynapsen eine essenzielle Rolle spielt. Interessant wären zukünftige Untersuchungen dazu, welchen Einfluss das Fehlen des Rabconnectin3 α / β -Komplexes oder eine reduzierte Befüllung von synaptischen Vesikeln mit Neurotransmittern in Photorezeptorsynapsen auf die Weiterleitung der Information einzelner Photonen und die visuelle Wahrnehmung insgesamt besitzen. Für diese Studien eignen sich die in dieser Arbeit genutzten, gegen DMXL2 gerichteten Antikörper.

6 Literaturverzeichnis

1. Adly MA, Spiwoks-Becker I, Vollrath L (1999) Ultrastructural changes of photoreceptor synaptic ribbons in relation to time of day and illumination. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2165-2172
2. Alpadi K, Magupalli VG, Käppel S, Köblitz L, Schwarz K, Seigel GM, Sung C-H, Schmitz F (2008) RIBEYE Recruits Munc119, a Mammalian Ortholog of the *Caenorhabditis elegans* Protein unc119, to Synaptic Ribbons of Photoreceptor Synapses. *Journal of Biological Chemistry* 283:26461-26467
3. Altrock WD, Tom Dieck S, Sokolov M, Meyer AC, Sigler A, Brakebusch C, Fässler R, Richter K, Boeckers TM, Potschka H, Brandt C, Löscher 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
4. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G (2020) *Duale Reihe Anatomie, 5., korrigierte Auflage* edn, Georg Thieme Verlag).
5. Balkema GW, Cusick K, Nguyen TH (2001) Diurnal variation in synaptic ribbon length and visual threshold. *Vis Neurosci* 18:789-797
6. Bartoletti TM, Jackman SL, Babai N, Mercer AJ, Kramer RH, Thoreson WB (2011) Release from the cone ribbon synapse under bright light conditions can be controlled by the opening of only a few Ca(2+) channels. *J Neurophysiol* 106:2922-2935
7. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254
8. Butola T, Wichmann C, Moser T (2017) Piccolo Promotes Vesicle Replenishment at a Fast Central Auditory Synapse. *Front Synaptic Neurosci* 9:14
9. Chambers K, Judson B, Brown WJ (2005) A unique lysophospholipid acyltransferase (LPAT) antagonist, CI-976, affects secretory and endocytic membrane trafficking pathways. *Journal of Cell Science* 118:3061-3071

Literaturverzeichnis

10. Chen D-Y, Liu X-F, Lin X-J, Zhang D, Chai Y-C, Yu D-H, Sun C-L, Wang X-L, Zhu W-D, Chen Y, Sun L-H, Wang X-W, Shi F-X, Huang Z-W, Yang T, Wu H (2017) A dominant variant in DMXL2 is linked to nonsyndromic hearing loss. *Genetics in Medicine* 19:553-558
11. Cho KO, Hunt CA, Kennedy MB (1992) The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9:929-942
12. Cotter K, Stransky L, McGuire C, Forgac M (2015) Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. *Trends in Biochemical Sciences* 40:611-622
13. Crawford DC, Kavalali ET (2015) Molecular Underpinnings of Synaptic Vesicle Pool Heterogeneity. *Traffic* 16:338-364
14. Crummy E, Mani M, Thellman JC, Martin TFJ (2019) The priming factor CAPS1 regulates dense-core vesicle acidification by interacting with rabconnectin3 β /WDR7 in neuroendocrine cells. *Journal of Biological Chemistry* 294:9402-9415
15. Darchen F (2000) Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: Focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* 82:375-384
16. Davydova D, Marini C, King C, Klueva J, Bischof F, Romorini S, Montenegro-Venegas C, Heine M, Schneider R, Markus, Wilko, Henneberger C, Dmitri, Eckart, Fejtova A (2014) Bassoon Specifically Controls Presynaptic P/Q-type Ca²⁺ Channels via RIM-Binding Protein. *Neuron* 82:181-194
17. De Robertis E, Franchi CM (1956) ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATIONS ON SYNAPTIC VESICLES IN SYNAPSES OF THE RETINAL RODS AND CONES. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2:307-318
18. De Ruyter Van Steveninck RR, Laughlin SB (1996) The rate of information transfer at graded-potential synapses. *Nature* 379:642-645
19. Dembla E, Dembla M, Maxeiner S, Schmitz F (2020) Synaptic ribbons foster active zone stability and illumination-dependent active zone enrichment of RIM2 and Cav1.4 in photoreceptor synapses. *Sci Rep* 10:5957
20. Dembla M, Wahl S, Katiyar R, Schmitz F (2014) ArfGAP3 Is a Component of the Photoreceptor Synaptic Ribbon Complex and Forms an NAD(H)-Regulated, Redox-Sensitive Complex with RIBEYE That Is Important for Endocytosis. *Journal of Neuroscience* 34:5245-5260
21. Dembla M, Kesharwani A, Natarajan S, Fecher-Trost C, Fairless R, Williams SK, Flockerzi V, Diem R, Schwarz K, Schmitz F (2018) Early auto-immune targeting of photoreceptor ribbon synapses in mouse models of multiple sclerosis. *EMBO Molecular Medicine* 10:e8926

Literaturverzeichnis

22. Dick O, Hack I, Altroch 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. *J Comp Neurol* 439:224-234
23. Dick O, Tom Dieck S, Altroch WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2003) The Presynaptic Active Zone Protein Bassoon Is Essential for Photoreceptor Ribbon Synapse Formation in the Retina. *Neuron* 37:775-786
24. Dittrich A, Ramesh G, Jung M, Schmitz F (2023) Rabconnectin-3 α /DMXL2 Is Locally Enriched at the Synaptic Ribbon of Rod Photoreceptor Synapses. *Cells* 12:1665
25. Dowling JE, Boycott BB (1966) Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 166:80-111
26. Dowling JE, Werblin FS (1969) Organization of retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. I. Synaptic structure. *Journal of Neurophysiology* 32:315-338
27. Drenckhahn D, Franz H (1986) Identification of actin-, α -actinin-, and vinculin-containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells. *The Journal of Cell Biology* 102:1843-1852
28. Dunn FA, Rieke F (2008) Single-Photon Absorptions Evoke Synaptic Depression in the Retina to Extend the Operational Range of Rod Vision. *Neuron* 57:894-904
29. Edwards RH (2007) The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron* 55:835-858
30. Einhorn Z, Trapani JG, Liu Q, Nicolson T (2012) Rabconnectin3 Promotes Stable Activity of the H⁺ Pump on Synaptic Vesicles in Hair Cells. *Journal of Neuroscience* 32:11144-11156
31. Esposito A, Falace A, Wagner M, Gal M, Mei D, Conti V, Pisano T, Aprile D, Cerullo MS, De Fusco A, Giovedì S, Seibt A, Magen D, Polster T, Eran A, Stenton SL, Fiorillo C, Ravid S, Mayatepek E, Hafner H, Wortmann S, Levanon EY, Marini C, Mandel H, Benfenati F, Distelmaier F, Fassio A, Guerrini R (2019) Biallelic DMXL2 mutations impair autophagy and cause Ohtahara syndrome with progressive course. *Brain* 142:3876-3891
32. Field GD, Rieke F (2002) Nonlinear Signal Transfer from Mouse Rods to Bipolar Cells and Implications for Visual Sensitivity. *Neuron* 34:773-785
33. Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T (2003) The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13:452-458
34. Gandini MA, Souza IA, Fan J, Li K, Wang D, Zamponi GW (2019) Interactions of Rabconnectin-3 with Cav2 calcium channels. *Molecular Brain* 12
35. Geppert M, Bolshakov VY, Siegelbaum SA, Takei K, De Camilli P, Hammer RE, Südhof TC (1994) The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 369:493-497

Literaturverzeichnis

36. Geppert M, Goda Y, Stevens CF, Südhof TC (1997) The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 387:810-814
37. Gowrisankaran S, Milosevic I (2020) Regulation of synaptic vesicle acidification at the neuronal synapse. *IUBMB Life* 72:568-576
38. Grabner CP, Gandini MA, Rehak R, Le Y, Zamponi GW, Schmitz F (2015) RIM1/2-Mediated Facilitation of Cav1.4 Channel Opening Is Required for Ca²⁺-Stimulated Release in Mouse Rod Photoreceptors. *Journal of Neuroscience* 35:13133-13147
39. Graydon CW, Zhang J, Oesch NW, Sousa AA, Leapman RD, Diamond JS (2014) Passive Diffusion as a Mechanism Underlying Ribbon Synapse Vesicle Release and Resupply. *Journal of Neuroscience* 34:8948-8962
40. Grishanin RN, Klenchin VA, Loyet KM, Kowalchuk JA, Ann K, Martin TFJ (2002) Membrane Association Domains in Ca²⁺-dependent Activator Protein for Secretion Mediate Plasma Membrane and Dense-core Vesicle Binding Required for Ca²⁺-dependent Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 277:22025-22034
41. Grishanin RN, Kowalchuk JA, Klenchin VA, Ann K, Earles CA, Chapman ER, Gerona RRL, Martin TFJ (2004) CAPS Acts at a Prefusion Step in Dense-Core Vesicle Exocytosis as a PIP2 Binding Protein. *Neuron* 43:551-562
42. Gundelfinger ED, Reissner C, Garner CC (2015) Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front Synaptic Neurosci* 7:19
43. Haverkamp S, Grünert U, Wässle H (2001) The Synaptic Architecture of AMPA Receptors at the Cone Pedicle of the Primate Retina. *The Journal of Neuroscience* 21:2488-2500
44. Heidelberger R, Matthews G (1992) Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *The Journal of Physiology* 447:235-256
45. Heidelberger R, Sterling P, Matthews G (2002) Roles of ATP in Depletion and Replenishment of the Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *Journal of Neurophysiology* 88:98-106
46. Heidelberger R, Thoreson WB, Witkovsky P (2005) Synaptic transmission at retinal ribbon synapses. *Progress in Retinal and Eye Research* 24:682-720
47. Holt M, Cooke A, Neef A, Lagnado L (2004) High Mobility of Vesicles Supports Continuous Exocytosis at a Ribbon Synapse. *Current Biology* 14:173-183
48. Irie M, Hata Y, Takeuchi M, Ichtchenko K, Toyoda A, Hirao K, Takai Y, Rosahl TW, Südhof TC (1997) Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* 277:1511-1515

Literaturverzeichnis

49. Ivanova D, Dirks A, Montenegro-Venegas C, Schöne C, Altmann WD, Marini C, Frischknecht R, Schanze D, Zenker M, Gundelfinger ED, Fejtova A (2015) Synaptic activity controls localization and function of CtBP1 via binding to Bassoon and Piccolo. *The EMBO Journal* 34:1056-1077
50. James D, Martin T (2013) CAPS and Munc13: CATCHRs that SNARE Vesicles. *Frontiers in Endocrinology* 4
51. Jarsky T, Tian M, Singer JH (2010) Nanodomain Control of Exocytosis Is Responsible for the Signaling Capability of a Retinal Ribbon Synapse. *Journal of Neuroscience* 30:11885-11895
52. Jaskolka MC, Winkley SR, Kane PM (2021) RAVE and Rabconnectin-3 Complexes as Signal Dependent Regulators of Organelle Acidification. *Front Cell Dev Biol* 9:698190
53. Johnston PA, Jahn R, Südhof TC (1989) Transmembrane Topography and Evolutionary Conservation of Synaptophysin. *Journal of Biological Chemistry* 264:1268-1273
54. Juusola M, French AS, Uusitalo RO, Weckström M (1996) Information processing by graded-potential transmission through tonically active synapses. *Trends Neurosci* 19:292-297
55. Kannan M, Bayam E, Wagner C, Rinaldi B, Kretz PF, Tilly P, Roos M, McGillevie L, Bär S, Minocha S, Chevalier C, Po C, Chelly J, Mandel J-L, Borgatti R, Piton A, Kinnear C, Loos B, Adams DJ, Héroult Y, Collins SC, Friant S, Godin JD, Yalcin B (2017) WD40-repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114:E9308-E9317
56. Kawabe H, Sakisaka T, Yasumi M, Shingai T, Izumi G, Nagano F, Deguchi-Tawarada M, Takeuchi M, Nakanishi H, Takai Y (2003) A novel rabconnectin-3-binding protein that directly binds a GDP/GTP exchange protein for Rab3A small G protein implicated in Ca²⁺-dependent exocytosis of neurotransmitter. *Genes to Cells* 8:537-546
57. Koulen P, Fletcher EL, Craven SE, Brecht DS, Wässle H (1998) Immunocytochemical Localization of the Postsynaptic Density Protein PSD-95 in the Mammalian Retina. *The Journal of Neuroscience* 18:10136-10149
58. Logiudice L, Sterling P, Matthews G (2008) Mobility and Turnover of Vesicles at the Synaptic Ribbon. *Journal of Neuroscience* 28:3150-3158
59. Löhner M, Babai N, Müller T, Gierke K, Atorf J, Joachimsthaler A, Peukert A, Martens H, Feigenspan A, Kremers J, Schoch S, Brandstätter JH, Regus-Leidig H (2017) Analysis of RIM Expression and Function at Mouse Photoreceptor Ribbon Synapses. *The Journal of Neuroscience* 37:7848-7863

Literaturverzeichnis

60. Loyet KM, Kowalchyk JA, Chaudhary A, Chen J, Prestwich GD, Martin TFJ (1998) Specific Binding of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate to Calcium-dependent Activator Protein for Secretion (CAPS), a Potential Phosphoinositide Effector Protein for Regulated Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 273:8337-8343
61. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie / Renate Lüllmann-Rauch, Esther Asan, 6., vollständig überarbeitete Auflage edn, Georg Thieme Verlag).
62. Magupalli VG, Schwarz K, Alpadi K, Natarajan S, Seigel GM, Schmitz F (2008) Multiple RIBEYE-RIBEYE interactions create a dynamic scaffold for the formation of synaptic ribbons. *J Neurosci* 28:7954-7967
63. Mandell JW, Townes-Anderson E, Czernik AJ, Cameron R, Greengard P, De Camilli P (1990) Synapsins in the vertebrate retina: absence from ribbon synapses and heterogeneous distribution among conventional synapses. *Neuron* 5:19-33
64. Mastrogiacomo A, Parsons SM, Zampighi GA, Jenden DJ, Umbach JA, Gundersen CB (1994) Cysteine string proteins: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca²⁺ channels. *Science* 263:981-982
65. Matthews G, Fuchs P (2010) The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nature Reviews Neuroscience* 11:812-822
66. Maxeiner S, Luo F, Tan A, Schmitz F, Sudhof TC (2016) How to make a synaptic ribbon: RIBEYE deletion abolishes ribbons in retinal synapses and disrupts neurotransmitter release. *EMBO J* 35:1098-1114
67. Mayor HD, Hampton JC, Rosario B (1961) A SIMPLE METHOD FOR REMOVING THE RESIN FROM EPOXY-EMBEDDED TISSUE. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9:909-910
68. Mendoza Schulz A, Jing Z, María Sánchez Caro J, Wetzel F, Dresbach T, Strenzke N, Wichmann C, Moser T (2014) Bassoon-disruption slows vesicle replenishment and induces homeostatic plasticity at a CNS synapse. *The EMBO Journal*:n/a-n/a
69. 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. *The Journal of Neuroscience* 16:6713-6721
70. Moser T, Grabner CP, Schmitz F (2020) Sensory Processing at Ribbon Synapses in the Retina and the Cochlea. *Physiol Rev* 100:103-144

Literaturverzeichnis

71. Mukherjee A, Katiyar R, Dembla E, Dembla M, Kumar P, Belkacemi A, Jung M, Beck A, Flockerzi V, Schwarz K, Schmitz F (2020) Disturbed Presynaptic Ca²⁺ Signaling in Photoreceptors in the EAE Mouse Model of Multiple Sclerosis. *iScience* 23:101830
72. Mukherjee K, Yang X, Gerber SH, Kwon HB, Ho A, Castillo PE, Liu X, Sudhof TC (2010) Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:6504-6509
73. Müller TM, Gierke K, Joachimsthaler A, Sticht H, Izsvák Z, Hamra FK, Fejtová A, Ackermann F, Garner CC, Kremers J, Brandstätter JH, Regus-Leidig H (2019) A Multiple Piccolino-RIBEYE Interaction Supports Plate-Shaped Synaptic Ribbons in Retinal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 39:2606-2619
74. Nachman-Clewner M, St Jules R, Townes-Anderson E (1999) L-type calcium channels in the photoreceptor ribbon synapse: localization and role in plasticity. *J Comp Neurol* 415:1-16
75. Nagano F, Kawabe H, Nakanishi H, Shinohara M, Deguchi-Tawarada M, Takeuchi M, Sasaki T, Takai Y (2002) Rabconnectin-3, a Novel Protein That Binds Both GDP/GTP Exchange Protein and GTPase-activating Protein for Rab3 Small G Protein Family. *Journal of Biological Chemistry* 277:9629-9632
76. Rao-Mirotznik R, Harkins AB, Buchsbaum G, Sterling P (1995) Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14:561-569
77. Rea R, Li J, Dharia A, Levitan ES, Sterling P, Kramer RH (2004) Streamlined Synaptic Vesicle Cycle in Cone Photoreceptor Terminals. *Neuron* 41:755-766
78. Regus-Leidig H, Ott C, Löhner M, Atorf J, Fuchs M, Sedmak T, Kremers J, Fejtová A, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2013) Identification and Immunocytochemical Characterization of Piccolino, a Novel Piccolo Splice Variant Selectively Expressed at Sensory Ribbon Synapses of the Eye and Ear. *PLoS ONE* 8:e70373
79. Regus-Leidig H, Fuchs M, Löhner M, Leist SR, Leal-Ortiz S, Chiodo VA, Hauswirth WW, Garner CC, Brandstätter JH (2014) In vivo knockdown of Piccolino disrupts presynaptic ribbon morphology in mouse photoreceptor synapses. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8
80. Rost BR, Schneider F, Grauel MK, Wozny C, G Bentz C, Blessing A, Rosenmund T, Jentsch TJ, Schmitz D, Hegemann P, Rosenmund C (2015) Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes. *Nature Neuroscience* 18:1845-1852
81. Sakisaka T, Takai Y (2005) Purification and properties of rabconnectin-3. *Methods Enzymol* 403:401-407

Literaturverzeichnis

82. Schein S, Ahmad KM (2006) Efficiency of Synaptic Transmission of Single-Photon Events from Rod Photoreceptor to Rod Bipolar Dendrite. *Biophysical Journal* 91:3257-3267
83. Schmitz F, Drenckhahn D (1993) Intermediate stages in the disassembly of synaptic ribbons in cone photoreceptors of the crucian carp, *Carassius carassius*. *Cell & Tissue Research* 272:487-490
84. 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
85. Schmitz F (2009) The making of synaptic ribbons: how they are built and what they do. *Neuroscientist* 15:611-624
86. Schoch S, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell and Tissue Research* 326:379-391
87. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K (2015) Prometheus LernAtlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie, 4. Auflage edn, Georg Thieme Verlag).
88. Schwarz K, Natarajan S, Kassas N, Vitale N, Schmitz F (2011) The Synaptic Ribbon Is a Site of Phosphatidic Acid Generation in Ribbon Synapses. *Journal of Neuroscience* 31:15996-16011
89. Schwarz K, Schmitz F (2017) RIBEYE(B)-domain binds to lipid components of synaptic vesicles in an NAD(H)-dependent, redox-sensitive manner. *Biochem J* 474:1205-1220
90. Sejnowski TJ, Yodlowski ML (1982) A freeze-fracture study of the skate electro receptor. *Journal of Neurocytology* 11:897-912
91. Shankhwar S, Schwarz K, Katiyar R, Jung M, Maxeiner S, Südhof TC, Schmitz F (2022) RIBEYE B-Domain Is Essential for RIBEYE A-Domain Stability and Assembly of Synaptic Ribbons. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15
92. Shirataki H, Kaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi T, Wada K, Miyazaki M, Takai Y (1993) Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol Cell Biol* 13:2061-2068
93. Silbernagl S, Despopoulos jr A, Draguhn A (2018). Synaptische Übertragung. In Taschenatlas Physiologie, Silbernagl S, A Despopoulos jr, A Draguhn, eds. (Georg Thieme Verlag KG).
94. Sjöstrand FS (1953) The ultrastructure of the inner segments of the retinal rods of the guinea pig eye as revealed by electron microscopy. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 42:45-70

Literaturverzeichnis

95. Sjöstrand FS (1958) Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *Journal of Ultrastructure Research* 2:122-170
96. Soldati T, Shapiro AD, Dirac Svejstrup AB, Pfeiffer SR (1994) Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* 369:76-78
97. Spiwoкс-Becker I, Glas M, Lasarzik I, Vollrath L (2004) Mouse photoreceptor synaptic ribbons lose and regain material in response to illumination changes. *Eur J Neurosci* 19:1559-1571
98. Stenmark H, Olkkonen VM (2001) *Genome Biology* 2:reviews3007.3001
99. Sterling P (2003) How retinal circuits optimize the transfer of visual information. *The Visual Neurosciences* 1
100. Sterling P, Matthews G (2005) Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci* 28:20-29
101. Stevens DR, Rettig J (2009) The Ca²⁺-dependent Activator Protein for Secretion CAPS: Do I Dock or do I Prime? *Molecular Neurobiology* 39:62-72
102. Szabo T (1974). Anatomy of the Specialized Lateral Line Organs of Electroreception. In *Electroreceptors and Other Specialized Receptors in Lower Vertebrates*, Fessard A, ed. (Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg), pp. 13-58.
103. Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366:156-158
104. Takai Y, Sasaki T, Shirataki H, Nakanishi H (1996) Rab3A small GTP-binding protein in Ca²⁺-dependent exocytosis. *Genes to Cells* 1:615-632
105. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208
106. Tata B, Huijbregts L, Jacquier S, Csaba Z, Genin E, Meyer V, Leka S, Dupont J, Charles P, Chevenne D, Carel J-C, Léger J, De Roux N (2014) Haploinsufficiency of Dmxl2, Encoding a Synaptic Protein, Causes Infertility Associated with a Loss of GnRH Neurons in Mouse. *PLoS Biology* 12:e1001952
107. Thio SSC (2004) The CtBP2 co-repressor is regulated by NADH-dependent dimerization and possesses a novel N-terminal repression domain. *Nucleic Acids Research* 32:1836-1847
108. Thoreson WB (2007) Kinetics of Synaptic Transmission at Ribbon Synapses of Rods and Cones. *Molecular Neurobiology* 36:205-223
109. Thoreson WB (2021) Transmission at rod and cone ribbon synapses in the retina. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 473:1469-1491

Literaturverzeichnis

110. Tian M, Xu CS, Montpetit R, Kramer RH (2012) Rab3A Mediates Vesicle Delivery at Photoreceptor Ribbon Synapses. *Journal of Neuroscience* 32:6931-6936
111. Tom Dieck S, Altmann WD, Kessels MM, Qualmann B, Regus H, Brauner D, Fejtová A, Bracko O, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2005) Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse. *Journal of Cell Biology* 168:825-836
112. Tom Dieck S, Brandstätter JH (2006) Ribbon synapses of the retina. *Cell and Tissue Research* 326:339-346
113. Touchot N, Chardin P, Tavittian A (1987) Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:8210-8214
114. Trepel M (2021) *Neuroanatomie*, 8. Auflage edn, Elsevier, Urban & Fischer).
115. Ullrich B, Südhof TC (1994) Distribution of synaptic markers in the retina: implications for synaptic vesicle traffic in ribbon synapses. *J Physiol Paris* 88:249-257
116. Uthairah RC, Hudspeth AJ (2010) Molecular Anatomy of the Hair Cell's Ribbon Synapse. *Journal of Neuroscience* 30:12387-12399
117. Vaithianathan T, Akmentin W, Henry D, Matthews G (2013) The ribbon-associated protein C-terminal-binding protein 1 is not essential for the structure and function of retinal ribbon synapses. *Mol Vis* 19:917-926
118. Vaithianathan T, Matthews G (2014) Visualizing synaptic vesicle turnover and pool refilling driven by calcium nanodomains at presynaptic active zones of ribbon synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:8655-8660
119. Vollrath L, Spiwox-Becker I (1996) Plasticity of retinal ribbon synapses. *Microsc Res Tech* 35:472-487
120. Von Gersdorff H (2001) Synaptic Ribbons: Versatile Signal Transducers. *Neuron* 29:7-10
121. Von Kriegstein K, Schmitz F, Link E, Südhof TC (1999) Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses. *Eur J Neurosci* 11:1335-1348
122. Wagner HJ (1997) Presynaptic bodies ("ribbons"): from ultrastructural observations to molecular perspectives. *Cell and Tissue Research* 287:435-446
123. Wahl S, Katiyar R, Schmitz F (2013) A Local, Periaxial Zone Endocytic Machinery at Photoreceptor Synapses in Close Vicinity to Synaptic Ribbons. *Journal of Neuroscience* 33:10278-10300

Literaturverzeichnis

124. Walent JH, Porter BW, Martin TF (1992) A novel 145 kd brain cytosolic protein reconstitutes Ca(2+)-regulated secretion in permeable neuroendocrine cells. *Cell* 70:765-775
125. Wan L (2005) Two ribeye Genes in Teleosts: The Role of Ribeye in Ribbon Formation and Bipolar Cell Development. *Journal of Neuroscience* 25:941-949
126. Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Sudhof TC (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388:593-598
127. Wen X, Van Hook MJ, Grassmeyer JJ, Wiesman AI, Rich GM, Cork KM, Thoreson WB (2018) Endocytosis sustains release at photoreceptor ribbon synapses by restoring fusion competence. *Journal of General Physiology* 150:591-611
128. Wonkam-Tingang E, Schrauwen I, Esoh KK, Bharadwaj T, Nouel-Saied LM, Acharya A, Nasir A, Leal SM, Wonkam A (2021) A novel variant in DMXL2 gene is associated with autosomal dominant non-syndromic hearing impairment (DFNA71) in a Cameroonian family. *Experimental Biology and Medicine* 246:1524-1532
129. Xu C, Min J (2011) Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein & Cell* 2:202-214
130. Zenisek D, Steyer JA, Almers W (2000) Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406:849-854
131. Zenisek D (2004) Visualizing Synaptic Ribbons in the Living Cell. *Journal of Neuroscience* 24:9752-9759
132. Zenisek D (2008) Vesicle association and exocytosis at ribbon and extraribbon sites in retinal bipolar cell presynaptic terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4922-4927
133. Zinsmaier KE, Hofbauer A, Heimbeck G, Pflugfelder GO, Buchner S, Buchner E (1990) A cysteine-string protein is expressed in retina and brain of *Drosophila*. *J Neurogenet* 7:15-29

7 Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	ungefähr
Ca ²⁺	Calciumionen
CAPS	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion
Cav	voltage-gated calcium channel
°C	Grad Celsius
Cl ⁻	Chloridionen
CSP	cysteine-string protein
CtBP	C-terminal-Binding-Protein
DMXL2	DmX-like Protein 2
ECL	enhanced chemoluminescence
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
et al.	et alii („und andere“)
g	g-Wert/relative Zentrifugalbeschleunigung
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAP	GTPase activating protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEP	GDP/GTP exchange protein
GST	Glutathion-S-Transferase

Abkürzungsverzeichnis

GTP	Guanosintriphosphat
h	Hours
IF	Immunfluoreszenz
IG	Immuno-Gold
IgG	Immunglobulin G
INL	inner nuclear layer
IPL	inner plexiform layer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K ⁺	Kaliumionen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	lysogeny broth
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
min	Minute/n
N.	Nervus
Na ⁺	Natriumionen
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
NPG	N-Propyl-Gallat
ONL	outer nuclear layer
OPL	outer plexiform layer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
POX	peroxidase-conjugated
PSD-95	postsynaptic density protein 95
Rab	Ras-related in brain

Abkürzungsverzeichnis

RIM	Rab3-interacting molecule
RPE	retinal pigment epithelium
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNAP-25	Synaptosomal-assoziiertes Protein, 25 kDa
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
TD	transmitted light channel
WB	Western Blot
WD40	Abschnitt aus ca. 40 Aminosäuren; abschließend: Tryptophan (W), Asparaginsäure (D)
WT	Wildtyp
x	mal

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Schichten des Augapfels und die Anteile der Retina	6
Abbildung 2: Aufbau der Retina	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus einer konventionellen chemischen Synapse.....	12
Abbildung 4: Übersicht über die Ribbonsynapse einer Stäbchenphotorezeptorzelle.....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines synaptischen Ribbons	16
Abbildung 6: GDP/GTP-Zyklus der Rab-Proteine.....	19
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Proteindomänen von DMXL2	21
Abbildung 8: Markierung des DMXL2-Fusionsproteins im Western Blot.....	41
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von DMXL2 in der Retina (Klon 2G2).....	43
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von DMXL2 in der Retina (Klon 12D8).....	44
Abbildung 11: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und RIBEYE in der Retina	47
Abbildung 12: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und Cav1.4 in der Retina	48
Abbildung 13: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und Cav1.4 in der OPL (Klon 2G2)..	49
Abbildung 14: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und Cav1.4 in der OPL (Klon 12D8)	50
Abbildung 15: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und PSD-95 in der Retina	52
Abbildung 16: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und PSD-95 in der OPL.....	54
Abbildung 17: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von DMXL2 und CSP in der OPL	55
Abbildung 18: Präabsorption mit dem DMXL2-Fusionsprotein.....	58
Abbildung 19: Post-embedding Immunogold-Markierung mit Anti-DMXL2 (2G2)	59

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper.....	24
Tabelle 2: Sekundärantikörper	25
Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen.....	25

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Frank Schmitz, für die Überlassung des überaus interessanten Themas sowie die ausgezeichnete fachliche und stets motivierende Betreuung. Auch bei Fragen oder Problemen stand seine Tür immer für mich offen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Karin Schwarz, Dr. Shweta Suiwal und Dr. Soni Shankhwar bedanken, die mir den Einstieg in die Laborarbeit erleichtert und mich kontinuierlich unterstützt haben.

Auch Dr. Rashmi Katiyar, Dr. Ajay Kesharwani und Swarnali Kundu danke ich für ihre Unterstützung und hilfreichen Tipps bei der Laborarbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Gabriele Kiefer für das Anfertigen der Ultra- und Semi-dünnschnitte, die Einführung in die Methode der Elektronenmikroskopie sowie viele förderliche Ratschläge. Tamara Brück und Sabine Schmidt danke ich für die zuverlässige technische Unterstützung.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des anatomischen Instituts für ihre Unterstützung und die freundliche Atmosphäre. Bei meinen Mitdoktoranden, Freunden und Kommilitonen möchte ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft und viele wertvolle Anregungen bedanken.

Meiner Familie und dabei ganz besonders meinen Eltern, Bettina Dittrich und Dr. Olaf Dittrich, danke ich für ihre bedingungslose und vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

11 Lebenslauf

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

12 Publikation

Folgende Publikation wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit vom Journal „Cells“ akzeptiert und veröffentlicht:

Dittrich Alina, Ramesh Girish, Jung Martin, Schmitz Frank (2023). „Rabconnectin-3 α /DMXL2 Is Locally Enriched at the Synaptic Ribbon of Rod Photoreceptor Synapses“. Cells 12:1665.

Tag der Promotion:	15.12.2023
Dekan:	Prof. Dr. Michael D. Menger
Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Schmitz Prof. Dr. Sandra Iden