

Aus dem Bereich Anatomie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen  
Fakultät der Universität des Saarlandes

Hochauflösende immunzytochemische  
Lokalisation von Aczonin und anderen Proteinen  
der aktiven Zone von Synapsen

Dissertation zu Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes

vorgelegt von: Ruth Dahlen, geb. am 23.12.1975 in Ludwigsburg

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Zusammenfassung</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Einleitung</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.1 Die postsynaptische Dichte</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.2 Die Cytomatrix an der aktiven Zone (CAZ)</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2.3 Die einzelnen CAZ-Proteine</b>   | <b>6</b>  |
| 2.3.1 Aczonin   | 6         |
| 2.3.2 Bassoon   | 7         |
| 2.3.3 Rim   | 9         |
| 2.3.4 Cast (ERC2)   | 10        |
| 2.3.5 Munc13  | 11        |
| <b>2.4 Ziel der Arbeit</b>  | <b>16</b> |
| <b>3. Material und Methoden</b>   | <b>18</b> |
| <b>3.1 Herstellen der Präparate</b>   | <b>18</b> |
| 3.1.1 Perfusions-Fixierung nach der pH-Shift-Methode  | 18        |
| 3.1.2 Schnitte, Immunmarkierung und Einbettung  | 20        |
| 3.1.2.1 Preembedding-Immunmarkierung  | 20        |
| 3.1.2.2 Postembedding-Immunmarkierung   | 23        |
| <b>3.2 Antikörper</b>   | <b>27</b> |
| <b>3.3 Auswertung der Immunmarkierung</b>   | <b>29</b> |
| 3.3.1 Bestimmung des Abstandes zwischen Goldpartikeln und Zellstrukturen  | 29        |
| 3.3.2 Bestimmung des Abstandes von Goldpartikeln zur Plasmamembran  | 30        |
| 3.3.3 Bestimmung des Abstandes zwischen Goldpartikeln und dem Dichteschwerpunkt der nächstgelegenen präsynaptischen Verdichtung | 31        |
| 3.3.4 Berechnung von Höhe, Breite und Abstand der präsynaptischen Verdichtungen   | 32        |
| <b>3.4 Statistische Auswertung</b>  | <b>34</b> |
| <b>4. Ergebnisse</b>  | <b>35</b> |
| <b>4.1 Morphometrie der präsynaptischen Verdichtungen</b>   | <b>35</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.2 Immunmarkierung mit Antikörpern gegen präsynaptische Proteine</b>            | <b>38</b> |
| 4.2.1 Immunmarkierung mit Antikörpern gegen Aczonin                                 | 38        |
| 4.2.1.1 Aczonin N-Abschnitt   | 38        |
| 4.2.1.2 Aczonin M-Abschnitt   | 39        |
| 4.2.1.3 Aczonin CC2-Abschnitt   | 40        |
| 4.2.1.4 Aczonin C-Abschnitt   | 41        |
| 4.2.2 Immunmarkierung mit Antikörpern gegen Rim                                     | 45        |
| 4.2.3 Immunmarkierung mit Antikörpern gegen Munc13                                  | 47        |
| 4.2.4 Negativkontrollen – Immunmarkierung mit Antikörpern gegen Bodipy und Glutamat | 49        |
| <b>4.3 Statistischer Vergleich mit den Kontrollen</b>                               | <b>52</b> |
| <b>4.4 Antikörper, die nicht zur Auswertung geeignet waren</b>                      | <b>55</b> |
| <b>5. Diskussion</b>  | <b>58</b> |
| <b>5.1 Morphometrie der präsynaptischen Verdichtungen</b>                           | <b>58</b> |
| <b>5.2 Lokalisation von Aczonin an der aktiven Zone</b>                             | <b>59</b> |
| 5.2.1 Lokalisation des N-Abschnittes von Aczonin an der aktiven Zone                | 59        |
| 5.2.2 Lokalisation des M-Abschnittes von Aczonin an der aktiven Zone                | 61        |
| 5.2.3 Lokalisation des CC2-Abschnittes von Aczonin an der aktiven Zone              | 62        |
| 5.2.4 Lokalisation des C-Abschnittes von Aczonin an der aktiven Zone                | 63        |
| <b>5.3 Lokalisation von Rim an der aktiven Zone</b>                                 | <b>65</b> |
| <b>5.4 Lokalisation von Munc13 an der aktiven Zone</b>                              | <b>66</b> |
| <b>5.5 Zusammenfassende Betrachtungen</b>   | <b>66</b> |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b>  | <b>71</b> |
| <b>7. Anhang</b>  | <b>84</b> |
| <b>7.1 Tabellenverzeichnis</b>  | <b>84</b> |
| <b>7.2 Abbildungsverzeichnis</b>  | <b>85</b> |

## **Abkürzungsverzeichnis**

AZ: aktive Zone

BSA: bovine serum albumin

CAZ: Cytomatrix an der aktiven Zone

IQR: Interquartilbereich

PBS: phosphate buffered saline

PLT: progressive lowering of temperature

PSD: postsynaptische Dichte

PV: präsynaptische Verdichtung

RT: Raumtemperatur

SV: synaptischer Vesikel

## 1. Zusammenfassung

Synapsen sind Kontaktstellen zwischen Neuronen und ihren Zielorganen, meist anderen Neuronen. In der präsynaptischen Nervenzelle werden Transmitter in synaptischen Vesikeln gespeichert. Diese nehmen, nach einem einlaufenden Aktionspotential und dem folgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle, Kontakt zur Plasmamembran auf. Durch die Bildung einer Fusionspore kann der Transmitter in den synaptischen Spalt entleert werden und an Rezeptoren der postsynaptischen Membran binden.

Die Region einer Synapse, in der Exozytose der synaptischen Vesikel und auch die Endozytose in die Zelle stattfinden, wird als aktive Zone bezeichnet. Bis jetzt wurden fünf spezifische Aktive-Zone-Proteine beschrieben: Aczonin, Bassoon, Rim, Munc13 und Cast. Ihnen wird eine wesentliche Rolle bei den Vorgängen an der aktiven Zone zugeschrieben. Ihre genaue Lokalisation und Funktionsweise liegen jedoch noch im Dunkeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe immunzytochemischer Methoden die genauere Lokalisation von Aczonin, Rim und Munc13 in Bezug zur Plasmamembran und den präsynaptischen Verdichtungen untersucht. Überraschenderweise fanden sich diese Proteine weiter von der Plasmamembran entfernt, als bisher vermutet. Außerdem scheint insbesondere Aczonin nicht, wie früher postuliert, gestreckt bis weit ins Axoplasma hinein zu reichen, sondern vielmehr auf einer relativ schmalen Zone in einem bestimmten Abstand parallel zur Plasmamembran zu liegen.

## Summary

Synapses are sites of contact between neurons. In the presynaptic part of a chemical synapse, neurotransmitters are packed into synaptic vesicles. An incoming action potential and the following  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cell lead to the docking of synaptic vesicles at the plasma membrane. By forming a so called fusion pore, neurotransmitters can be released into the synaptic cleft and dock at the receptors in the postsynaptic membrane.

The site in a neuron where the exocytosis and also the recycling of the synaptic vesicles occur, is referred to as the active zone. By now five specific active zone-proteins have been found: Aczonin, Bassoon, Rim, Munc13 and Cast. They are considered to play an essential role in the presynaptic exo- and endocytotic mechanisms. These mechanisms however, as well as the function and localization of the presynaptic proteins still remain unclear.

This work is intended to shed light on the precise localization of some of the presynaptic proteins, i. e. Aczonin, Munc13 and Rim. For this purpose, immunohistochemical methods have been used. The distance between immunogold particles and the plasmamembrane, as well as the distance between immunogold particles and dense projections were measured. Surprisingly, the proteins do not seem to be in a very close contact with the plasmamembrane, as supposed earlier. Aczonin, which was besides considered to extend far into the axoplasm, seems to be localized to a rather restricted site in a certain distance parallel to the plasma membrane.

## **2. Einleitung**

Alle Nervenzellen sind untereinander und mit den jeweiligen Erfolgsorganen durch Schaltstellen, sogenannte Synapsen, verknüpft. Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten von Synapsen: einfachere, elektrische und komplexer gebaute, chemische Synapsen.

Bei der elektrischen Synapse sind zwei Nervenzellen durch Ionenkanäle unmittelbar miteinander verbunden, so daß ein Aktionspotential durch Ionenströme innerhalb sehr kurzer Zeit direkt weitergeleitet werden kann.

An chemischen Synapsen (s. Abb. 2.1, S. 17) werden Informationen durch Botenstoffe, sogenannte Transmitter weitergegeben. Die Transmitter sind in der Präsynapse in Transportvesikel verpackt, welche, ausgelöst durch ein Aktionspotential und den daraus folgenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle, mit der Plasmamembran verschmelzen. Dies geschieht durch Bildung des sogenannten SNARE-Kernkomplexes, der aus Synaptobrevin, Syntaxin1 und SNAP-25 besteht (Söllner et al. 1993). So kann der darin enthaltene Transmitter in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden und an spezifische Rezeptoren in der postsynaptischen Membran binden.

Auf beiden Seiten der neuronalen Synapse lassen sich elektronendichte Zonen in der Nähe der zwei synaptischen Membranen nachweisen, die in den beiden nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben werden.

## **2.1 Die postsynaptische Dichte**

Die elektronendichte, bandförmige Struktur an der postsynaptischen Membran wird als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet.

Die PSD liegt der sogenannten aktiven Zone der präsynaptischen Seite genau gegenüber (s. Abb.2.1, S. 17) Transmembranäre Filamente zwischen aktiver Zone und PSD überbrücken den synaptischen Spalt: in erster Linie wohl Cadherine, verbunden mit alpha-Catenin und Actin, die quasi als Anker dienen (Ziff 1997).

Die PSD hat die Aufgabe, ein von der präsynaptischen Seite her kommendes einlaufendes Signal (in Form eines an einen Rezeptor andockenden Neurotransmitters) adäquat weiterzuleiten. Bisher wurden zahlreiche Bestandteile der PSD identifiziert, unter anderem Zytoskelett- und Zellverbindungsproteine, MAGUK-Proteine, Enzyme und Rezeptoren (Ziff 1997).

## **2.2 Die Cytomatrix der aktiven Zone in der Präsynapse**

Elektronenoptisch findet sich an der Stelle, wo die Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran erfolgt, eine Verdickung der Plasmamembran, die einen Durchmesser von etwa 200 bis 450 nm aufweist (Rosenmund et al. 2003, Siksou et al. 2007). Dies ist die sogenannte aktive Zone. Sie besteht aus elektronendichten pyramidenförmigen Strukturen, welche triagonal angeordnet sind. Um diese herum sind jeweils ca. sechs Vesikel gelagert (Gray 1963, Pfenninger et al. 1969, Akert et al. 1969, Bloom und Aghajanian 1968, Pfenninger et al. 1972, Phillips et al. 2001).

Die einzelnen pyramidenförmigen Strukturen werden in der Literatur meist

## Einleitung

Dense Projections genannt und hier im folgenden als präsynaptische Verdichtungen (PVs) bezeichnet. Sie stellen vermutlich Bereiche dar, in denen Proteine sehr dicht zusammengelagert sind.

Die Höhe der PVs wurde bisher zwischen 30 und 100 nm angegeben. Die Angaben zu den Abständen zwischen ihnen variieren von 20 -100 nm (Gray et al. 1963, Bloom und Aghajanian 1972, Landis et al. 1988, Philipps et al. 2001). Die einzelnen Verdichtungen sind untereinander durch fibrilläre Strukturen verbunden (Phillips et al. 2001). Das Netzwerk von Proteinen an der aktiven Zone wird häufig auch Cytomatrix an der aktiven Zone (kurz CAZ) oder auch präsynaptisches Gitter genannt. In den Vertiefungen dieses Gitters liegen die Vesikel (Gray et al. 1963, Pfenninger et al. 1969, Akert et al. 1969, Bloom und Aghajanian 1968, Pfenninger et al.1972, Phillips et al. 2001).

Die aktive Zone (s. Abb.2.1, S. 17) ist der Bereich in der präsynaptischen Nervenzelle, an dem die transmittergefüllten Vesikel an die Plasmamembran binden und mit ihr verschmelzen, um die Transmitter in den synaptischen Spalt abzugeben. Hier werden die Vesikel auch wieder in die Zelle aufgenommen und wiederverwertet. Die Vesikel in der Präsynapse befinden sich in unterschiedlichen "Reifezuständen". Direkt an der aktiven Zone findet man die Vesikel, die nach dem sogenannten Priming, einem Reifungsprozeß, unmittelbar zur Fusion mit der Plasmamembran bereit sind. Diese Vesikel gehören zum zirkulierenden Vesikelpool (Dresbach et al. 2000).

Andere Vesikel hingegen werden in einiger Entfernung von der aktiven Zone gespeichert und nur bei erhöhtem Bedarf in den Vesikelzyklus miteinbezogen. Diese gehören zum Reservepool. Ein dritter Vesikelpool, der sogenannte proximale Pool, welcher zwischen den beiden anderen Pools lokalisiert ist, enthält die meisten Vesikel, deren Funktion jedoch noch ungeklärt ist.

Unter den bisher an der CAZ lokalisierten Proteinen finden sich Proteine, die

für die aktive Zone spezifisch sind. Bisher konnten fünf CAZ-Proteine identifiziert werden: Munc13, Rim, Basson, Aczonin (Piccolo) und Cast (ERC2). Ihnen wird eine wesentliche Rolle beim Priming, der Exo- und Endozytose der Vesikel und beim Aufbau der aktiven Zone zugeschrieben. Für einige der Proteine konnten bereits Bindungspartner identifiziert werden, die genaue Struktur und auch die Funktionsweise dieses "Proteinorchesters" liegen jedoch noch weitgehend im Dunkeln.

### **2.3 Die einzelnen CAZ-Proteine**

Im folgenden werden die CAZ-Proteine einzeln vorgestellt. Die Abbildung 2.2 auf S. 17 soll die Verwandtschaft der CAZ-Proteine anhand ihrer charakteristischen Proteindomänen veranschaulichen.

#### **2.3.1 Aczonin**

Aczonin, das häufig auch als Piccolo bezeichnet wird, ist mit einem Molekulargewicht von 530 kD und bestehend aus ca. 5000 Aminosäuren unter den bisher identifizierten das größte präsynaptische Protein (Cases-Langhoff et al. 1996, Wang et al 1999, Fenster et al. 2000). Aczonin kommt in allen Synapsen des ZNS an der aktiven Zone (Cases-Langhoff et al. 1996, Wang et al 1999, Fenster et al. 2000), außerdem an den Bandsynapsen der Retina (Dick et al. 2001) und offenbar auch in endokrinen Zellen wie  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Fujimoto et al. 2002) vor. An der neuromuskulären Synapse wurde es ebenfalls gefunden (Juranek et al. 2006).

Die Domänenstruktur von Aczonin (s. Abb. 2.2, S. 17) zeichnet sich durch eine Q-Zone, zwei Zinkfinger-, eine PDZ- und zwei C2-Domänen aus. Außerdem enthält es mehrere Coiled-coil-Domänen sowie lange prolinreiche

Sequenzen (Cases-Langhoff et al. 1996, Wang et al. 1999).

Aczonin könnte aufgrund seiner Größe theoretisch weit ins Axoplasma reichen. Möglicherweise ist eine Funktion von Aczonin, Vesikel aus dem Reservepool in Richtung der aktiven Zone zu lenken. Dieser Mechanismus könnte über die Bindung von Aczonin an Pra1 laufen, das dadurch das vesikelassoziierte Rab3 freigibt (Fenster et al. 2000). Über die direkte Verbindung von Rab3 zu Rim könnte dann die Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran ermöglicht werden (Wang et al.1999, Fenster et al. 2000, Gundelfinger et al. 2003). Einer anderen Theorie zufolge könnte Aczonin über die indirekte Bindung an Actin über Abp1 auch eine Rolle bei der Clathrin-vermittelten Wiederaufnahme der Vesikel spielen (Fenster et al. 2003).

### **2.3.2 Bassoon**

Bassoon besteht aus ca. 3940 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 420 kD (tom Dieck et al. 1998). Es kommt an konventionellen inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen des ZNS und an den Bandsynapsen der Retina vor (Richter et al. 1999, Brandstätter et al. 1999). Ebenso an neuromuskulären Synapsen wurde es, wie Aczonin, gefunden (Juraneck et al. 2006).

Bassoon enthält am N-terminalen Ende zwei Zinkfingerdomänen (s. Abb. 2.2, S.17). Proximal des COOH-Terminus von Bassoon liegt eine längere glutaminreiche Region; außerdem enthält es, wie Aczonin, drei Coiled-coil-Regionen (tom Dieck et al. 1998).

Die zentrale Region von Bassoon ist offenbar für die Verankerung von Bassoon in der CAZ verantwortlich (Altrock et al. 2003, Dresbach et al. 2003). Die N-terminale Region von Bassoon könnte, möglicherweise über die Zinkfingerregion, an Zellorganellen wie synaptische Vesikel oder Endosomen

binden (Dresbach et al. 2003).

Mit seinem COOH-Ende liegt Bassoon offenbar in der Nähe oder direkt an der Plasmamembran. Es scheint jedoch nicht direkt in die Plasmamembran integriert zu sein, sondern über das membranassoziierte Zytoskelett mit ihr in Verbindung zu stehen (tom Dieck et al. 1998, Sanmartí-Vila et al. 2000).

Markierungen mit Immunogold wiesen Bassoon jedoch etwa ein bis drei Vesikellängen von der Plasmamembran entfernt nach (also 40-120 nm), und zwar in unmittelbarer Nachbarschaft zu den synaptischen Vesikeln (tom Dieck et al. 1998, Sanmartí-Vila et al. 2000).

Bassoon-Knockout-Mäuse zeigen eine verminderte synaptische Transmission: Vesikel können zwar andocken, verschmelzen aber nicht mit der Plasmamembran. Darüber hinaus kam es bei den Bassoon-Knockout-Mäusen gehäuft zu epileptischen Anfällen (Altrock 2003), außerdem wurde bei ihnen eine vergrößertes Hirnvolumen (vor allem durch eine verbreiterte Hirnrinde sowie vergrößerte Hippocampi) und ebenso ein verändertes Aktivitätsmuster gefunden (Angenstein et al. 2006).

Aczonin und Bassoon sind entwicklungsgeschichtlich vermutlich neuere Proteine - beide kommen nicht in *C. elegans* und *Drosophila* vor. Möglicherweise deutet dies darauf hin, daß sie nicht essentiell wichtig für die Bildung und/oder Aufrechterhaltung der CAZ-Struktur sind (Garner et al. 2000). Aczonin und Bassoon sind jedoch unter den ersten Proteinen, die an aktiven Zonen neugebildeter Synapsen von Säugetieren gefunden werden (Vardinon-Friedman et al. 2000, Zhai et al. 2001).

### 2.3.3 Rim

Rim (Rab3-interacting molecule) ist ein aus 1553 Aminosäuren bestehendes 180 kDa-Protein der aktiven Zone. Bei Säugetieren finden sich zwei verschiedene Formen: Rim1 $\alpha$  und Rim2 $\alpha$ . Durch mehrere Spleißvarianten, die in verschiedenen Formen vorliegen können, scheint es jedoch viele weitere Rim-Proteine zu geben (Wang et al. 1997, Wang et al. 2000, Wang und Südhof 2003).

Rim (s. Abb. 2.2, S. 17) enthält eine Zinkfingerdomäne am NH<sub>2</sub>-Ende, eine prolinreiche Region, eine PDZ-Domäne und zwei C2-Domänen am COOH-Ende (Wang et al. 1997).

Rim bildet unter anderem einen Komplex mit Munc13, der für die Transmission essentiell zu sein scheint. Die Verhinderung der Bildung dieses Komplexes führt zu einem Phänotyp, der, ähnlich wie bei Munc13-1-Knockout-Mäusen, mit einem Verlust an fusionsfähigen Vesikeln einhergeht. Vermutlich kann also entweder die Priming-Reaktion nicht stattfinden, oder der Komplex dient der funktionellen Verbindung zwischen den Vesikeln im Vesikelpool und dem Priminig (Betz et al. 2001, Koushika et al. 2001).

Bei Rim1 $\alpha$ -Knockout-Mäusen war das Priming deutlich vermindert und Munc13 um 60% reduziert, möglicherweise, weil es durch Rim stabilisiert wird (Schoch et al. 2002, Calakos et al. 2004). Außerdem wurde bei Rim-Knockout-Mäusen eine deutliche Verminderung von Vesikeln direkt an der Plasmamembran neuromuskulärer Synapsen gefunden (Weimer et al. 2006). Zusätzlich wiesen in einem anderen Versuch die Tiere erhebliche Defizite beim Lernen und Einschränkungen der Gedächtnisfunktion auf (Powell et al. 2004).

Nach Deletion beider Rim $\alpha$ -Isoformen kam es zu einer massiven Einschränkung der Transmission. Die Mäuse starben gleich nach der Geburt

(Schoch et al. 2006).

Rim1 $\alpha$  scheint in einigen Synapsen für die präsynaptische Langzeitpotenzierung (LTP, Verstärkung der Freisetzung von Glutamat), in anderen Synapsen hingegen für die Kurzzeitplastizität eine Rolle zu spielen (Castillo et al. 2002, Schoch et al. 2002, Lonart et al. 2002, Garcia-Junco-Clemente et al. 2005). Diese Funktion ist offensichtlich jeweils spezifisch für bestimmte Synapsen. Rim hat anscheinend aber keinen Einfluß auf die Struktur der CAZ (Castillo et al. 2002, Schoch 2002).

#### **2.3.4 Cast (ERC2)**

Cast (CAZ-associated structural protein) ist ein 120 kD Protein der aktiven Zone. Es ist ein Mitglied der ERC-Familie und entspricht ERC2. ERC1a kommt ubiquitär, ERC1b nur im Gehirn, aber nicht spezifisch an der aktiven Zone vor (Ohtsuka et al. 2000, Wang et al. 2002). Vor kurzem wurde ein Homolog von Cast/ERC2 entdeckt und als Cast2 bezeichnet, von dem es wiederum eine Splicing-Form gibt (Deguchi-Tawarada et al. 2004).

Cast (s. Abb. 2.2, S. 17) zeichnet sich durch vier Coiled-coil-Regionen aus (Ohtsuka et al. 2000).

Cast scheint durch direkte oder indirekte Bindung an alle anderen CAZ-Proteine eine Schlüsselrolle in Bezug auf die Struktur der aktiven Zone und der Transmissionsvorgänge zu spielen (Ohtsuka et al. 2002, Takao-Rikitsu et al. 2004). In Cast-Knockouts bei *C. elegans* war die synaptische Transmission erstaunlicherweise jedoch nicht beeinträchtigt, auch andere Auffälligkeiten zeigten die Tiere nicht (Deken et al. 2005).

Durch die Bindung an  $\alpha$ Liprin und Rab6 sind ERCs möglicherweise in intrazelluläre Membrantransportvorgänge eingebunden. In Nervenzellen könnten sie z. B. für die Zusammensetzung der aktiven Zone aus

Vorläufervesikeln des Golgi-Apparates wichtig sein, wobei die Bindung an Rab6 bisher nur für Cast2 nachgewiesen wurde (Monier et al. 2002, Ko et al. 2003).

### **2.3.5 Munc13**

Munc13-1 ist ein CAZ-Protein mit einem Molekulargewicht von 200 kD, das zu einer Familie von vier Proteinen gehört (Brose et al. 1995, Betz et al. 1998, Augustin et al. 1999, Koch et al. 2000). Interessanterweise kommt es an Bandsynapsen der Retina nicht vor (Schmitz et al. 2001).

Munc13-1 (s. Abb. 2.2, S. 17) enthält vier C-Domänen, eine C1- und drei C2-Domänen (Brose et al. 1995).

Munc13-1 und -2 scheint eine wesentliche Aufgabe bei der Regulation der Kurzzeitplastizität (Rosenmund et al. 2002) und beim Priming der an die Plasmamembran gebundenen Vesikel zuzukommen (Augustin et al. 1999, Aravamudan et al. 1999, Ashery et al. 2000, Brose 2000, Varoqueaux et al. 2002, Rosenmund et al. 2002, Stevens et al. 2005). Das Priming ermöglicht die Verschmelzung mit der Plasmamembran und die Bildung einer Fusionspore, durch die die Transmitter freigesetzt werden. Völliges Fehlen von Munc13 führt zum Versiegen der Transmitterfreisetzung (Augustin et al. 1999, Richmond et al. 1999, Aravamudan et al. 1999).

Eventuell modifiziert Munc13 die Konformation von Syntaxin und/oder Munc18, oder Munc13 verdrängt Munc18 von der Bindungsstelle an Syntaxin (Sassa et al. 1999, Brose et al. 2000) und reguliert auf einem der beiden Wege die Verfügbarkeit von Syntaxin zur Bildung des SNARE-Kernkomplexes.

Durch Punktmutationen, die die Interaktion von Munc13 mit Syntaxin1 verhinderten, ließ sich herausfinden, daß diese für den Primingprozeß

unabdingbar zu sein scheint (Stevens et al. 2005, Madison et al. 2005). Allerdings konnte mit Hilfe von NMR-Untersuchungen keine direkte Bindung von Syntaxin an Munc13 nachgewiesen werden (Basu et al. 2005). Für den Primingprozeß scheint jedoch auch Rim benötigt zu werden (Betz et al. 2001), denn das Verhindern der RIM/Munc13-Interaktion bewirkt eine ebenso drastische Verminderung aktivierter Vesikel im Vesikelpool wie völliges Fehlen von Munc13.

Neuere Untersuchungen legen den Wechsel von einem Munc13-1-Homodimer zu einem Munc13-1/ $\alpha$ RIM-Heterodimer als Grundlage für die Regulation der Neurotransmitterfreisetzung und einiger Formen der Kurzzeitplastizität nahe (Lu et al. 2006).

In Rim1-Knockout-Mäusen waren darüber hinaus die Munc13-Level drastisch reduziert (Schoch et al. 2002, Andrews-Zwilling et al. 2006). Dies läßt darauf schließen, daß die Rim/Munc13-Interaktion für die Lokalisation von Munc13 an der aktiven Zone wichtig ist.

Die Synapsen von Munc13-1-Knockout-Mäusen enthalten in der Regel keine fusionsfähigen Vesikel (Augustin et al. 1999). Elektronenoptisch stellt sich an der neuromuskulären Synapse eine deutliche Reduktion von Vesikeln im Bereich zwischen 60 und 120 nm von der Plasmamembran entfernt dar (Weimer et al. 2006).

**Tab. 2.1**

| <b>Proteine an der aktiven Zone und ihre Bindungspartner</b> |  |  |   |   |
|--|--|--|---|---|
| <b>Protein</b>   | <b>bindende Domäne</b>                   | <b>Bindungspartner</b>                                       | <b>Quelle</b>   | <b>Funktion</b>   |
| <b>Aczonin</b>   | Q-Domäne                                 | Abp1 (Actin/Dynamin-bindendes Protein) auch SH3P7 oder HIP55 | Fenster et al. 2003   | bindet an F-Actin und Dynamin (GTPase), evtl. hierüber Verbindung zu Clathrin-vermittelter Endozytose   |
|  | Zinkfingerdomäne                         | PRA1   | Fenster et al. 2000, Martincic et al. 1997, Bucci et al. 1999 | vesikelassoziierter Rezeptor für VAMP2/SynaptobrevinII, bindet Rabs   |
|  | Prolinreiche Sequenz<br>ca. AS 2011-2468 | GIT (Arf GTPase-aktivierendes Protein)                       | Kim et al. 2003   | aktiviert GTPasen, Komplex aus Aczonin, GIT1 und GIT-bindenden Proteinen (Beta-PIX, focal adhesion kinase, Liprin alpha und Paxillin), Regulation von Membrantransportvorgängen und dem Actin-Zytoskelett |
|  | Prolinreiche Sequenz                     | Profilin (Actinmonomer-bindendes Protein)                    | Wang et al. 1999  | bindet an Actin-Monomere und Phosphoinositid  |
|  | 3. CC-Domäne                             | Cast   | Takao-Rikitsu et al. 2004                                     | interagiert mit Acz, Bsn, Rim und Liprin  |
|  | PDZ-Domäne (Pankreas)                    | cAMP-GEFII (guanine nucleotide-exchange factor (Pankreas))   | Fujimoto et al. 2002  | cAMP-Sensor   |
|  | C2-Domänen                               | Ca <sup>2+</sup> -Kanal                                      | Shibasaki et al. 2004   |   |
|  | C2A-Domäne                               | Ca <sup>2+</sup>   | Gerber et al. 2001, Shibasaki et al. 2004                     |   |
|  | C2A-Domäne                               | Rim2 (Pankreas)  | Fujimoto et al. 2002  |   |

## Material und Methoden

| <b>Protein</b> | <b>bindende Domäne</b>                            | <b>Bindungspartner</b>                           | <b>Quelle</b>  | <b>Funktion</b>   |
|----------------|---|--|--|---|
| <b>Bassoon</b> |   |  |  |   |
|                | C2H2-Zinkfinger                                   | PRA1   | Zhen et al. 2004, Fenster et al. 2000                                      | vesikelassoziiert, Rezeptor für VAMP2/SynaptobrevinII, bindet Rab3 und Rab5 |
|                | Region zw. 1. und 2. CC-Domäne                    | RIBEYE/ CtBP2 (Retina)                           | tom Dieck et al. 2005  |   |
|                |   | CtBP1/BARS-50 (konventionelle Synapsen)          | tom Dieck et al. 2005  |   |
|                | 3. CC-Domäne                                      | Cast   | Ohtsuka 2002, Takao-Rikitsu 2004   | interagiert mit Acz, Bsn, Rim und Liprin                                    |
| <b>Rims</b>    |   |  |  |   |
|                | Zinkfinger  | Munc13-1   | Betz et al. 2001, Schoch et al. 2002, Wang et al. 2001                     | Vesikelpriming  |
|                | alpha-Helix im Anschluß an Zinkfinger<br>AS 19-55 | Rab3 (GTP-gebunden)                              | Wang et al. 1997, Betz et al. 2001, Wang et al. 2001, Dulubova et al. 2005 | bindet an Rabphilin, Doc2, SVs und Pra1, Regulation des Vesikelzyklus?      |
|                | zw. Zn-Finger & 1. C-Domäne                       | cAMP-GEFII                                       | Ozaki et al. 2000  | cAMP-Sensor, reguliert Exozytose, Insulinsekretion                          |
|                | PDZ-Domäne  | Cast   | Wang et al. 2002, Ohtsuka 2002   | interagiert mit Acz, Bsn, Rim und Liprin                                    |
|                | C2A-Domäne  | Aczonin (Pankreas)                               | Fujimoto et al. 2002   |   |
|                | C2-Domänen  | SNAP-25?, widerlegt für Rim2 von Dai et al. 2005 | Coppola et al. 2001  | Bestandteil des SNARE-Kernkomplexes   |
|                | C2-Domänen  | alpha1B-Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Untereinheit     | Coppola et al. 2001  |   |

## Material und Methoden

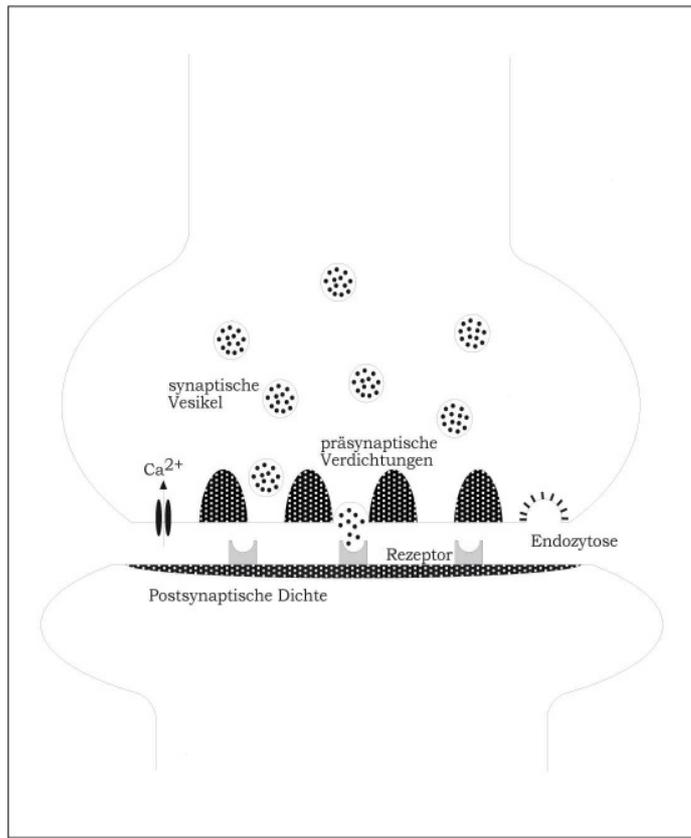
| <b>Protein</b>  | <b>bindende Domäne</b>                          | <b>Bindungspartner</b>                                      | <b>Quelle</b>   | <b>Funktion</b>  |
|-----------------|---|---|---|--|
| <b>Rims</b>     | C2-Domänen                                      | Synaptotagmin,<br>widerlegt für Rim2 von<br>Dai et al. 2005 | Coppola et al. 2001   | vesikelassoziiert, Ca <sup>2+</sup> -Sensor,<br>interagiert mit Syntaxin     |
|                 | prolinreiche<br>Sequenz zwischen<br>2 C-Domänen | Rim-BPs   | Wang et al. 2000  |  |
|                 | C2B-Domäne                                      | alpha-Liprin  | Schoch et al. 2002  | Gerüstprotein, bindet an Rim<br>und LAR, Entwicklung von<br>aktiver Zone?    |
|                 | N-Terminus                                      | 14-3-3-Proteine   | Sun et al. 2003, Broadie<br>et al. 1997   | binden an Rabphilin, wichtige<br>Rolle bei Transmission                      |
| <b>Cast/ERC</b> | C-Terminus<br>AS 833-957                        | Syntenin1 (PDZ)   | Ko et al. 2006  |  |
|                 | 2. CC-Domäne                                    | alpha-Liprin  | Ko et al. 2003  | Gerüstprotein, bindet an Rim<br>und LAR, Entwicklung v. AZ?<br>Transmission? |
|                 | 2. CC-Domäne?                                   | Aczonin und Bassoon   | Takao-Rikitsu et al. 2004   | kompetitive Bindung  |
| Cast2           | AS 860-1015                                     | Rab6  | Monier et al. 2002, Wang<br>et al. 2002   | Membrantransport am Golgi-<br>Apparat  |
|                 | C-Terminus                                      | Rim   | Wang 2002, Ohtsuka<br>2002  |  |
| <b>Munc13-1</b> | C-Terminus                                      | Doc2alpha   | Orita et al. 1997, Mochida<br>et al. 1998, Duncan et al.<br>1999, Brose et al. 2000 | Aufgaben bei Transmission?   |
|                 | C-Terminus                                      | Spectrin βspIIIΣ  | Sakaguchi et al. 1998,<br>Brose et al. 2000   | Aufgaben bei Transmission?   |

## Material und Methoden

| <b>Protein</b>  | <b>bindende Domäne</b>   | <b>Bindungspartner</b>     | <b>Quelle</b>  | <b>Funktion</b>  |
|-----------------|--------------------------|----------------------------|--|--|
| <b>Munc13-1</b> | C-Terminus               | msec7-1                    | Neeb et al. 1999, Brose et al. 2000  | Arf-spezifischer (G-Protein) GDP/GTP-Austauscher, verstärkt phorbolsterabhängig Transmission                         |
|                 | C2A-Domäne, AS 1-181     | Rim                        | Betz et al. 2001, Wang et al. 2002, Schoch et al. 2002, Dulubova et al. 2005                   | Rolle bei Priming?   |
|                 | C-Terminus, AS 1181-1736 | Syntaxin                   | Betz et al. 1997, Augustin et al. 1999, Sassa et al. 1999, Brose et al. 2000, Basu et al. 2005 | Bestandteil des SNARE-Kernkomplexes, Aufgabe bei Priming (scheint dafür Rim zu benötigen), bildet Komplex mit Munc18 |
|                 | C1-Domäne                | Phorbolster/Diacylglycerol | Betz et al. 1998   | Second messenger   |
|                 | C1-Domäne                | Calmodulin (Retina)        | Xu 1998, Brose et al. 2000, Junge et al. 2004  |  |

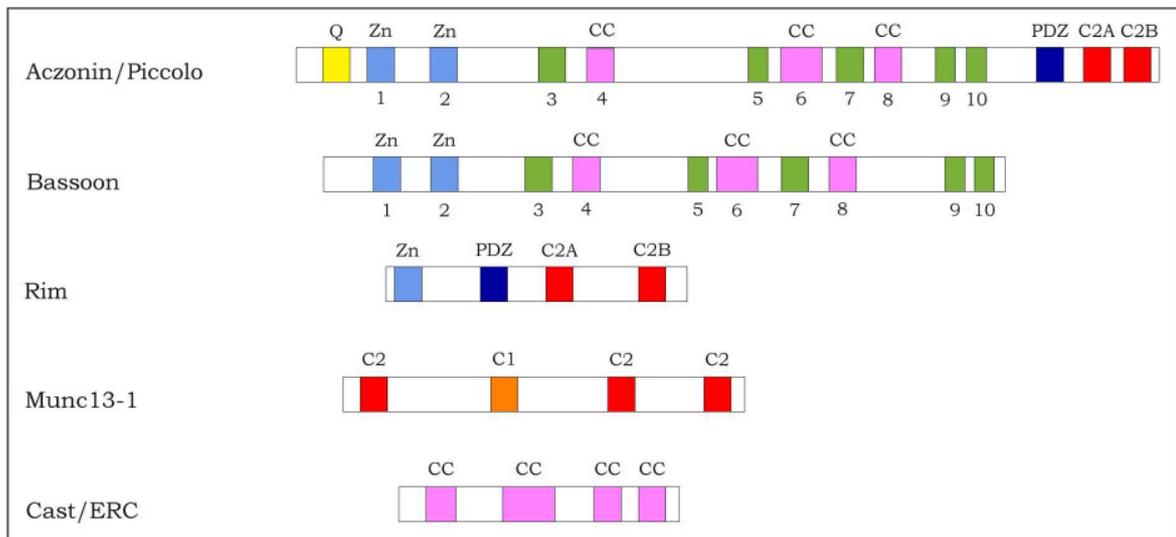
### 2.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden bestimmte Proteinabschnitte einiger CAZ-Proteine zu lokalisieren, und zwar sowohl in Bezug auf ihren Abstand von der Plasmamembran als auch auf ihren seitlichen Abstand zur nächstgelegenen präsynaptischen Verdichtung. Die genaue Lokalisation der Proteine dürfte Rückschlüsse auf die Architektur der CAZ und ihre Funktion zulassen.



**Abb. 2.1 Schematische Darstellung einer chemischen Synapse**

Ein Aktionspotential führt zum Einstrom von Calcium in die Nervenzelle, wodurch transmittergefüllte synaptische Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen. Es bildet sich eine Fusionspore, und der Transmitter wird in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, wo er an spezifische Rezeptoren in der postsynaptischen Membran bindet. Rechts im Bild ist die clathrinvermittelte Endozytose der Vesikel dargestellt.



**Abb. 2.2 Regionen präsynaptischer Proteine** Die teilweise große Ähnlichkeit der Regionen lässt auf eine enge Verwandtschaft der präsynaptischen Proteine schließen. Vor allem Aczonin und Bassoon teilen viele Regionen oberhalb der PDZ-Domäne von Aczonin. Die PDZ- sowie die C2-Regionen von Aczonin sind hingegen eng mit den homologen Regionen von Rim verwandt. Große Ähnlichkeit mit Rim weist Oboe auf, das zur Familie der Rim-Proteine gehört. Noch ist unklar, ob es ein CAZ-Protein ist. Bassoon weist außer zu Aczonin verschiedene Sequenzhomologien zu Rim, Rabphilin-3A und Noc2, einem Rabphilin-assoziierten Protein, auf.

### **3. Material und Methoden**

Mit Hilfe von immunzytochemischen Verfahren wurden präsynaptische Proteine bzw. Proteinregionen elektronenmikroskopisch lokalisiert. Hierfür wurden sowohl Pre- als auch Postembedding-Methoden eingesetzt. Die Lokalisation der Proteine wurde in Bezug zur präsynaptischen Membran und den präsynaptischen Verdichtungen bestimmt.

#### **3.1 Herstellen der Präparate**

Für die Versuche wurden Kleinhirne von weiblichen und männlichen CD-Ratten verwendet. Die Tiere wurden von Herrn Dr. Michael Laue (Zentrum für Elektronenmikroskopie, Homburg/Saar) perfundiert.

##### **3.1.1 Perfusions-Fixierung nach der pH-shift-Methode**

Die Perfusion wurde mit Formaldehyd in Anlehnung an Berod et al. (1981) durchgeführt.

Lösungen:

Vorspüllösung: 4 % Dextran [65000 Mwt]; 1 g/600 ml Nitroprussid (Natriumnitroprussiat = Natriumpentacyanonitrosylferrat,  $\text{Na}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ); 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2

Fixierungslösung A: 4 % Paraformaldehyd; 0,1 M Acetatpuffer, pH 5,6

## Material und Methoden

Fixierungslösung B: 4 % Paraformaldehyd; 0,1 M Carbonatpuffer, pH 10

### Durchführung:

- (1) Anästhesie mit 4 % Chloralhydrat für ca. 2-5 min (in die Bauchhöhle appliziert)
- (2) Öffnen des Brustkorbes; Freilegen des Herzens
- (3) Injektion von 80 Einheiten Heparin in PBS (Phosphate buffered saline), Gesamtvolumen ca. 0,2 ml
- (4) Perfusion über die linke Herzkammer mit Olivenkanüle und Peristaltikpumpe
- (5) Vorspüllösung für ca. 20 sec; kurz nach Beginn Öffnung des rechten Vorhofes
- (6) Fixierungslösung A für ca. 5 min, ca. 150 ml
- (7) Fixierungslösung B für ca. 10-12 min, ca. 250 ml
- (8) Kurzes Nachspülung mit Vorspüllösung (optional)
- (9) Abtrennen des Kopfes; Öffnen des Schädels, Entnahme des Gehirns
- (10) Lagerung des Gehirns in Fixierungslösung B im Kühlschrank bei 3°C

### **3.1.2 Schnitte, Immunmarkierung und Einbettung**

Vom Kleinhirn (Cerebellum) wurden 50-100 µm dicke Vibratomschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden entweder vor der Einbettung (Preembedding-Verfahren; siehe 3.1.2.1) oder nach der Einbettung (Postembedding-Verfahren; siehe 3.1.2.2) immunmarkiert.

#### 3.1.2.1 Preembedding-Immunmarkierung

Bei dieser Methode wurden die Vibratomschnitte nach Permeabilisierung zunächst mit Primär- und Sekundärantikörpern markiert, die Markierung mit Silber verstärkt und die Schnitte in Epoxy-Kunststoff (Epon) eingebettet. Von diesen Präparaten wurden Ultradünnschnitte (ca. 70 nm Dicke) angefertigt, auf Objektträger (Grids) aufgebracht und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Durchführung:

- (1) Zerteilen der Vibratomschnitte in kleine Stücke; Transfer in ein gemeinsames Gefäß (Rollrandgläschen) gefüllt mit PBS
- (2) Reduktion mit 1 % Natriumborhydrid in PBS für 30 min, Raumtemperatur (RT), Schüttler
- (3) 4 x PBS für ca. 30 min, RT, Schüttler
- (4) 2 x NS-T (10 % Normalserum; 0,05 % Triton X-100; PBS; inkl. Azid) für 60 min, RT, Schüttler
- (5) Inkubation mit Primärantikörper für 30 min, RT, Schüttler, 36-64 h bei 4-10°C, Schüttler

## Material und Methoden

- (6) 1 h bei RT, Schüttler; dann 2x NS-T für ca. 60 min, Schüttler, RT
- (7) 3 x PBS für 60-90 min, Schüttler, RT
- (8) Vorinkubation mit 1x PBGN (1% Normalserum Ziege; 0,4 % Fischgelatine; 0,5 % BSA; PBS; inkl. Azid) für 60-120 min, Schüttler, RT
- (9) Sekundärantikörper (Fab' Nanogold von Nanoprobes) in PBGN (1:800), 60 min, Schüttler, RT; ca. 20 h bei 4-10°C, Schüttler; 1 h, RT, Schüttler
- (10) 2 x PBGN, ca. 60 min, RT, Schüttler
- (11) 3 x PBS, ca. 1 h, RT, Schüttler
- (12) Postfixierung in 0,05 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer für ca. 60 min, RT, Schüttler
- (13) 2 x PBS; 3x Konditionierlösung (ECS, Aurion), RT, Schüttler
- (14) Silberverstärkung (Aurion R-GENT EM Silberverstärkungskit)
- (15) 3 x ECS
- (16) 2 x 0,1 M Phosphatpuffer
- (17) Postfixierung in 1 % Osmiumtetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer für 15 min, Schüttler, RT
- (18) 3 x 0,1 M Phosphatpuffer
- (19) Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Infiltration mit Epon (Embed Science Services, München) im Lynx-Einbettungsautomat (siehe Tab. 3.1, S. 22)
- (20) Einbettung in mit Epon gefüllte Förmchen
- (21) Polymerisation 2 Tage im Wärmeschrank bei 60°C

**Tab. 3.1** Entwässerung und Infiltration mit Epon

| <b>Nr.</b> | <b>Lösung</b>        | <b>Inkubationszeit (min)</b> | <b>Temperatur (°C)</b> | <b>Inkubationsdauer fortlaufend (min)</b> |
|------------|----------------------|------------------------------|------------------------|---|
| 1          | 0,1 M Phosphatpuffer | 20                           | 20                     | 20  |
| 2          | 50 % Ethanol         | 20                           | 20                     | 40  |
| 3          | 70 % Ethanol         | 20                           | 20                     | 60  |
| 4          | 80 % Ethanol         | 20                           | 20                     | 80  |
| 5          | 90 % Ethanol         | 20                           | 20                     | 100                                       |
| 6          | 95 % Ethanol         | 20                           | 20                     | 120                                       |
| 7          | 100 % Ethanol        | 20                           | 20                     | 140                                       |
| 8          | 100 % Ethanol        | 20                           | 20                     | 160                                       |
| 9          | 100 % Aceton         | 20                           | 20                     | 180                                       |
| 10         | 100 % Aceton         | 20                           | 20                     | 200                                       |
| 11         | Aceton + Epon 4:1    | 120                          | 20                     | 320                                       |
| 12         | Aceton + Epon 3:1    | 120                          | 20                     | 440                                       |
| 13         | Aceton + Epon 1:1    | 120                          | 20                     | 560                                       |
| 14         | Aceton + Epon 1:3    | 120                          | 20                     | 680                                       |
| 15         | Aceton + Epon 1:4    | 120                          | 20                     | 800                                       |
| 16         | Epon                 | 120                          | 20                     | 920                                       |

### 3.1.2.2 Postembedding-Immunmarkierung

Bei dieser Methode wurden die Vibratomschnitte zunächst entwässert und bei tiefen Temperaturen in Lowicryl K4M eingebettet. Hierfür wurde die sogenannte PLT-Methode verwendet, bei der das Präparat rasch und stufenweise in steigender Alkoholkonzentration von Raumtemperatur auf  $-35^{\circ}\text{C}$  abgekühlt wird. Die Einbettung in den Kunststoff und seine Polymerisierung fanden ebenfalls bei  $-35^{\circ}\text{C}$  statt, um Extraktion von Bestandteilen des Präparates zu vermeiden. Dann wurden von den Präparaten Ultradünnschnitte von ca. 70 nm Dicke angefertigt, auf Objektträger (Grids) aufgebracht und hinterher mit einem Primär- und einem Sekundärantikörper markiert. Die Kontrastierung der markierten Schnitte erfolgte mit Uranylacetat/Methylcellulose (1,8 %/0,2 %) nach Roth et al. (1990).

#### Material:

- (1) Vibratomschnitte von Rattenkleinhirn in Puffer
- (2) Ethanol 30, 50, 70, 90, 100 %
- (3) Lowicryl K4M
- (4) Kryo-Röhrchen (2 ml)
- (5) Alu-Block, auf  $-35^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt

## Material und Methoden

### Vorbereitung:

- (1) Ethanol 30 % auf Eis (0°C)
- (2) Ethanol 50 % bei -20°C vorkühlen (Gefrierschrank Labor)
- (3) Ethanol 70, 90, 100 % bei -35°C vorkühlen (Alublock, Gefrierschrank)
- (4) Lowicryl-Mischungen + reines Lowicryl in Kryo-Röhrchen (2 ml) auf -35°C vorkühlen

### Durchführung:

- (1) Überführen des Materials in auf Eis gekühltes Ethanol in Kryo-Röhrchen
- (2) Entwässerung und Infiltration mit dem Kunststoff gemäß Tab. 3.2, S. 25
- (3) Einbettung in frisches Lowicryl in Eppendorf-Reaktionsgefäße (safe-lock, 0,5 ml) unter Stickstoffatmosphäre
- (4) Polymerisation mit UV-Lampe bei -35°C in der Gefriersubstitutionsmaschine (FSU010, Balzers) für 24 h; Deckel mit Alufolie umwickeln (indirekte Polymerisation); Kammer mit Alkohol auffüllen; Nachpolymerisieren bei 0°C, 24 h (Alufolie noch in Position lassen) und ggf. bei RT (in UV-Polymerisationskasten, ohne Alufolie)
- (5) Anfertigen von Ultradünnschnitten von ca. 70 nm Dicke und Aufbringen auf Objektträger (Grids)

**Tab. 3.2** Entwässerung und Einbettung nach der PLT-Methode

| Stufe | Medium (in %)    | Temperatur (°C) | Dauer (h)  |
|-------|------------------|-----------------|------------|
| 1     | Ethanol 30       | 0               | 1          |
| 2     | 50               | -20             | 1          |
| 3     | 70               | -35             | 1          |
| 4     | 90               | -35             | 1          |
| 5     | 100              | -35             | 1          |
| 6     | 100              | -35             | 1          |
| 7     | Ethanol/Lowicryl | -35             | 1          |
| 8     | Ethanol/Lowicryl | -35             | 1          |
| 9     | Lowicryl         | -35             | über Nacht |
| 10    | Lowicryl         | -35             | 2          |

Variante der Infiltration: Schritt 9 = Lowicryl, 1 h; Schritt 10 = Lowicryl, über Nacht

Immunmarkierung:

Die Objektträger werden hierbei über eine Reihe von Tropfen (30 ml) verschiedener Lösungen geführt.

- (1) 2 x PBS-Glycin für je 10 min (Tropfengröße 30 µl)
- (2) 1 x FGBT (0,5 % BSA [0,25 g/50 ml PBS] + 0,5 % Fisch-Gelatine [250µl/50ml PBS] + 0,01 % Tween 20 [50 µl 10 %ige Lsg./50 ml PBS]; mit PBS auf 50ml auffüllen) für 5 min
- (3) 1 x FGBT für 60 min
- (4) Primärer Antikörper -> Verdünnung mit FGBT; Inkubation in feuchter Kammer; 60 min bei Raumtemperatur; über Nacht bei 4°C; 60 min bei Raumtemperatur

## Material und Methoden

- (5) 10 x FGBT für je 5 min
- (6) sekundärer Antikörper (10 nm Goldkolloid, British Bio Cell) 1:10 verdünnt mit FGBT; 60-120 min; RT
- (7) 4 x FGBT für je 5 min
- (8) 4 x PBS-Glycin für je 5 min
- (9) 6 x PBS für je 5 min
- (10) Fixierung mit 0,25 % Glutaraldehyd in PBS für 30 min
- (11) 10 x Aqua dest.
- (12) Kontrastierung mit Uranylacetat/Methylcellulose (nach Roth et al. 1990)

### 3.2 Antikörper

**Tab. 3.3** Übersicht über die verwendeten Antikörper

| <b>Antikörper</b> | <b>Sequenz</b>        | <b>Antikörpertyp</b> | <b>Wirt</b> | <b>Verfahren</b> |
|-------------------|-----------------------|----------------------|-------------|------------------|
| aAczNr2-1         | Aczonin, AS 1226-1515 | Rohserum             | Kaninchen   | Post             |
| a5.8-5            | Aczonin, AS 1808-2150 | Rohserum             | Kaninchen   | Post/Pre         |
| a5.8-2af          | Aczonin, AS 1808-2150 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Post             |
| aAczNr3-1         | Aczonin, AS 2521-2812 | Rohserum             | Kaninchen   | Post             |
| aAczNr3-2af       | Aczonin, AS 2521-2812 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Post             |
| aAczNr4-1         | Aczonin, AS 2784-3073 | Rohserum             | Kaninchen   | Post             |
| aAczC2A10-1       | Aczonin, AS 4566-4744 | Rohserum             | Kaninchen   | Post             |
| aAczC2A10-2af     | Aczonin, AS 4566-4744 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Post             |
| aAczC2A10-3       | Aczonin, AS 4566-4744 | Rohserum             | Kaninchen   | Post             |
| aAcz7-6-RB1-1     | Aczonin, AS 3593-3784 | Rohserum             | Kaninchen   | Pre              |
| aAcz7-6-RB1-2af   | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Pre              |
| aAcz7-6-RB1-3af   | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Pre              |
| aAcz7-6-RB1-3af   | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Pre              |
| aAcz7-6RB2-2af    | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Pre              |
| aAcz7-6RB2-3af    | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Pre              |
| aAcz8-nat-RB2-2af | Aczonin, AS 3539-3865 | Affinitätsger. Ser.  | Kaninchen   | Pre              |
| aAczNr8-5         | Aczonin, AS 3539-3865 | IgG                  | Kaninchen   | Pre              |
| aRim43-RB2-2af    | Rim, AS 9-387Δ83-105  | IgG Biotin           | Kaninchen   | Pre              |
| aRim43-RB3-1      | Rim, AS 9-387Δ83-105  | Rohserum             | Kaninchen   | Post             |

## Material und Methoden

|   |                              |   |           |          |
|---|------------------------------|---|-----------|----------|
| aRim43-RB3-2af                                    | Rim, AS 9-387Δ83-105         | Affinitätsger. Ser.<br>subtrahiert mit<br>Rabphilin | Kaninchen | Post     |
| aCast3-RB1-2af                                    | Cast, AS 325-677             | Affinitätsger. Ser.                                 | Kaninchen | Pre      |
| aCast3-RB2-2af                                    | Cast, AS 325-677             | Affinitätsger. Ser.                                 | Kaninchen | Pre      |
| aCast4a-RB1-2af                                   | Cast, AS 660-960             | Affinitätsger. Ser.                                 | Kaninchen | Pre      |
| aCast4a-RB2-2af                                   | Cast, AS 660-960             | Affinitätsger. Ser.                                 | Kaninchen | Pre      |
| aMunc13-MS1<br>(Synaptic Sys-<br>tems, Göttingen) | Munc13, AS 1399-1736         | Monoklonale AK                                      | Maus      | Pre      |
| aMuc1-RB1-2                                       | Munc13, AS 2-320             | IgG   | Kaninchen | Pre      |
| aBasso-1<br>(StressGen)                           | Bassoon, AS 738-1035         | Monoklonal,<br>IgG2a                                | Maus      | Post     |
| aGST-RB2-1  | Glutathion-S-<br>Transferase | Rohserum  | Kaninchen | Post/Pre |
| aAct20/33-1                                       | Actin                        | IgG-Fraktion  | Kaninchen | Post     |
| aGAD67<br>(Chemicon)                              | Glu-Decarboxylase            | Rohserum  | Kaninchen | Post     |
| aGlutamat-1<br>(Sigma-Aldrich)                    | Glutamat                     | Rohserum  | Kaninchen | Post     |
| aCaV2.1<br>(Chemicon)                             | Ca-Kanal, AS 865-881         | Affinitätsger. Ser.                                 | Kaninchen | Post     |
| aBodipy<br>(Molecular Probes<br>Europe B.V.)      | Bodipy                       | Rohserum, IgG-<br>Fraktion                          | Kaninchen | Post     |

Alle Antikörper, deren Quelle nicht in der Tabelle angegeben ist, wurden von Herrn Prof. Dr. Manfred W. Kilimann (Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der

Antikörper wurden rekombinante Proteinabschnitte (His-tag- oder GST-Fusionsproteine) der entsprechenden Proteine verwendet. Einige Seren wurden über einer Sepharosesäule mit den Proteinen, die für die Immunisierung verwendet worden waren, affinitätsgereinigt. Details der Antikörperherstellung finden sich bei Wang et al. (1999, 2008).

### **3.3 Auswertung der Immunmarkierung**

Die Auswertung der Immunmarkierungsexperimente erfolgte im Transmissions-Elektronenmikroskop (Tecnai 12, FEI Co.). In den Ultradünnschnitten wurde zunächst die Molekularschicht des Cerebellums aufgesucht. Alle Synapsen, die den unten angegebenen Auswahlkriterien entsprachen, wurden bei einer Vergrößerung von 68.000-fach mit einer CCD-Kamera (Megaview III, SIS) und einer Auflösung von 1376 mal 1024 Pixel photographiert. Für alle beschriebenen Messungen wurde das Programm Image J (entwickelt von den U.S. Institutes of Health) verwendet. Die gemessenen Werte wurden in Microsoft-Excel weiterverarbeitet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte im Programm Origin (Version 6.0).

#### **3.3.1 Bestimmung des Abstandes zwischen Goldpartikeln und Zellstrukturen**

Es wurde der vertikale Abstand der Goldpartikel zur präsynaptischen Membran sowie der laterale Abstand der Goldpartikel zum Dichteschwerpunkt der nächstgelegenen präsynaptischen Verdichtung gemessen. Für die Bestimmung wurden Synapsen der Molekularschicht nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Photographiert und ausgewertet

wurden aber nur Synapsen, die folgenden Kriterien genügten:

- paralleler Verlauf der prä- und postsynaptischen Plasmamembran im gesamten Bereich der aktiven Zone ohne Unterbrechung (d.h. Schnittführung senkrecht zur Plasmamembran der aktiven Zone)
- mindestens 1 Goldpartikel pro aktiver Zone
- deutlich erkennbare präsynaptische Verdichtungen im gesamten Bereich der aktiven Zone (nur für die Bestimmung der lateralen Abstände bzw. Vermessung der PVs)

### **3.3.2 Bestimmung des Abstandes der Goldpartikel zur Plasmamembran**

Zur Bestimmung des Abstandes zwischen Goldpartikel und Plasmamembran (= vertikaler Abstand) wurden Pre- und Postembedding-Präparate verwendet.

Da in den Preembedding-Präparaten die Partikel methodisch bedingt relativ groß und unregelmäßig geformt waren, wurde zunächst der kleinste, dann parallel dazu der größte Abstand der Partikel zur präsynaptischen Plasmamembran gemessen. Der mittlere Abstand wurde durch die Formel  $\frac{1}{2} * (b - a) + a$  errechnet (siehe Abb. 3.1, S. 33).

Bei den Postembedding-Präparaten wurde, aufgrund der geringen Größe der Partikel, der geringste Abstand des Goldpartikelzentrums von der präsynaptischen Plasmamembran gemessen. Dazu wurde eine Auswahllinie in das Bild eingezeichnet und vermessen. Die Linie diente später der Bestimmung des sog. lateralen Abstandes der Goldpartikel (s. Abb. 3.2, S. 33).

### **3.3.3 Bestimmung des Abstandes von Goldpartikel zum Dichteschwerpunkt der nächstgelegenen präsynaptischen Verdichtung**

Der Abstand von Goldpartikel zum Dichteschwerpunkt der nächstgelegenen PV (= lateraler Abstand) wurde ausschließlich an Postembedding-Präparaten gemessen, da nur hier die präsynaptischen Verdichtungen (durch die Kontrastierung nach Roth et al. 1990) als Bezugsstrukturen erkennbar waren. Zur Bestimmung des lateralen Abstandes (s. Abb. 3.2, S. 33) wurden folgende Operationen durchgeführt:

1. Markierung der Plasmamembran der aktiven Zone mit einer Markierungslinie, ausgehend vom linken Rand der PV, die am weitesten links im Bild lokalisiert ist (Nullpunkt der Linie)
2. Markierung der Dichteschwerpunkte der PVs mit einer senkrechten Linie, die lotrecht auf der Plasmamembran bzw. der Markierungslinie steht
3. Messung des kürzesten Abstandes zwischen Goldpartikel und der Markierungslinie des Dichteschwerpunktes einer PV
4. Bestimmung der Position auf der Markierungslinie der Plasmamembran, an der die Markierungslinie des Dichteschwerpunktes der PVs schneidet; Messung der Strecke, ausgehend vom Nullpunkt, entlang der Plasmamembran
5. Bestimmung der Position auf der Markierungslinie der Plasmamembran, an der die Markierungslinie der Goldpartikel schneidet; Messung der Strecke analog zu 4.
6. Berechnung des lateralen Abstandes aus den Positionsdaten des Dichteschwerpunktes der PVs und der Goldpartikel

### **3.3.4 Berechnung von Höhe, Breite und Abstand der präsynaptischen Verdichtungen**

Die Messungen erfolgten an Postembedding- sowie zur Kontrolle an unmarkierten Präparaten gleicher Gewebepräparation (Fixierung, Entwässerung, Einbettung). Es wurden markierte und unmarkierte Längsschnitte und unmarkierte Flachschnitte von Synapsen verwendet. Für die Auswertung mußten sie (analog 3.3.3, S. 31) dabei unten genannten Kriterien entsprechen:

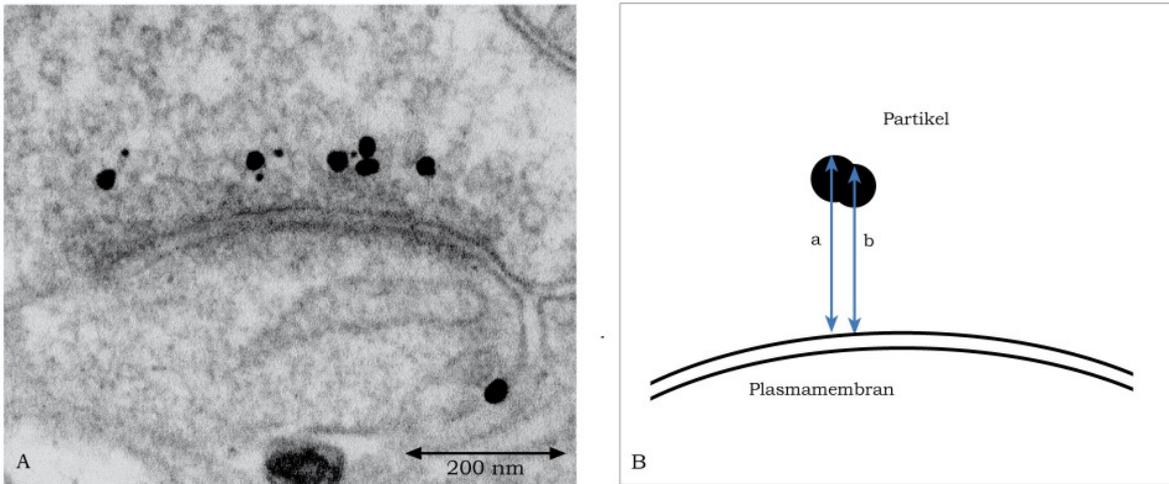
- paralleler Verlauf der prä- und postsynaptischen Plasmamembran im gesamten Bereich der aktiven Zone ohne Unterbrechung für die Längsschnitte
- deutlich erkennbare PVs im gesamten Bereich der aktiven Zone

Zur Bestimmung der Höhe der PVs wurde zunächst in den Längsschnitten (wie 3.3.3) der Verlauf der Plasmamembran im Bild markiert. Danach wurde der Kontrast derart angepaßt, daß die Dichteschwerpunkte der einzelnen PVs klar zu erkennen waren. Die kürzeste Strecke zwischen der oberen PV-Kante und der Plasmamembran wurde über dem Dichteschwerpunkt der PVs gemessen und ebenfalls als Strecke im Bild markiert (s. Abb. 3.2, S. 33).

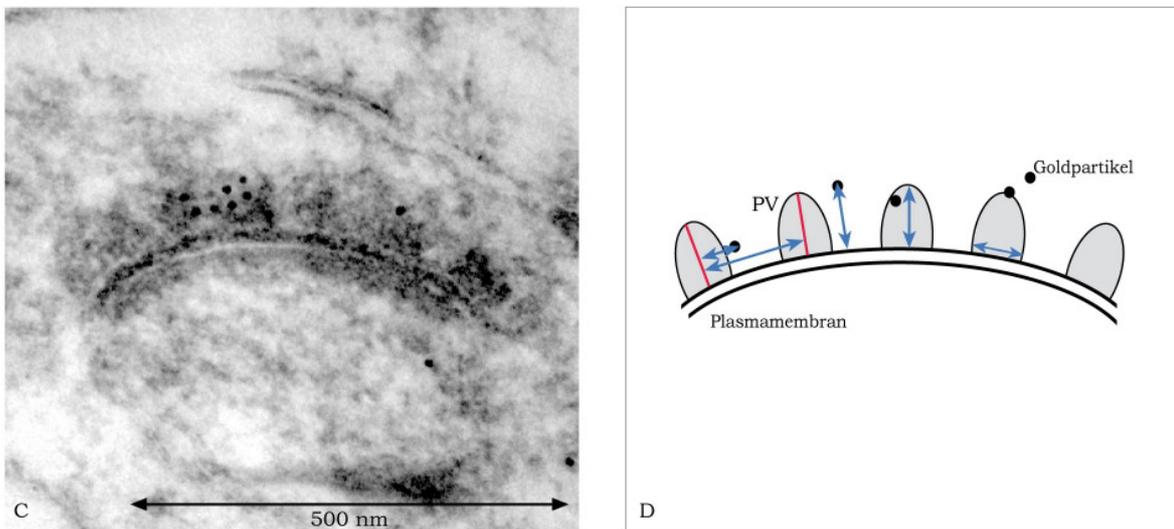
Nun konnte die Strecke zwischen dem definierten Nullpunkt und dem Dichteschwerpunkt der jeweiligen Verdichtung auf der Plasmamembran gemessen werden. Aus diesen Werten wurden die Abstände zwischen den PVs errechnet.

In den Flachschnitten wurden Umfang und Durchmesser der einzelnen PVs gemessen, sowie der Abstand von Dichteschwerpunkt zu Dichteschwerpunkt der PVs.

## Material und Methoden



**Abb. 3.1 Meßmethode Preembedding** (A) Elektronenmikroskopisches Bild. (Das Photo wurde freundlicherweise von Herrn Michael Laue zur Verfügung gestellt.) Schematische Zeichnung (B). Der kleinste und, parallel dazu, der größte Abstand des Partikels zur Plasmamembran wurde gemessen. Der mittlere Abstand wurde mit Hilfe der Formel  $\frac{1}{2} * (b - a) + a$  errechnet.



**Abb. 3.2 Meßmethode Postembedding** (A) Elektronenmikroskopisches Bild. Die präsynaptischen Verdichtungen an der Plasmamembran sind gut zu erkennen. (B) Der Abstand zwischen Goldpartikel und Plasmamembran sowie der Abstand zwischen Goldpartikel und Dichteschwerpunkt der nächstgelegenen präsynaptischen Verdichtung wurde gemessen. Außerdem wurde der Abstand zwischen den einzelnen präsynaptischen Verdichtungen, deren Höhe und die Breite an der Basis ermittelt.

### 3.4. Statistische Auswertung

Verschiedene statistische Kenngrößen wurden jeweils für die deskriptive Charakterisierung der Stichprobenverteilungen ermittelt: Median, Interquartilbereich, Wölbung (nur für die Verteilung lateraler Abstände). Das Maß für die Wölbung (bzw. die Steilheit) hat für die Normalverteilung den Wert 0,263 und wird aus Quartilen und Dezilen nach folgender Formel berechnet (Sachs 1992):

$$\text{Wölbung} = (Q3-Q1)/2(DZ9-DZ1)$$

Weiterhin wurden folgende verteilungsfreie statistische Tests durchgeführt:

- Kolmogoroff & Smirnow auf Verteilungsgleichheit für die vertikalen und lateralen Abstände (Sachs 1992)
- Siegel & Tukey für die lateralen Abstände (Sachs 1992)

Beide Tests prüfen, ob die Stichproben aus einer gemeinsamen Grundgesamtheit stammen, oder nicht. Der Kolmogoroff-Smirnow-Test vergleicht vor allem die Gestalt der Stichprobenverteilungen miteinander. Der Test nach Siegel & Tukey ist besonders empfindlich für Unterschiede von Verteilungen, die ähnliche Mittelwerte oder Mediane aufweisen, wie bei den hier gemessenen lateralen Markierungs-Abständen. Bei diesem Test wird im wesentlichen die Streuung und Variabilität der Verteilungen betrachtet.

## **4. Ergebnisse**

In diesem Kapitel sollen die Meßergebnisse für die Morphometrie der präsynaptischen Verdichtungen und die Lokalisation bestimmter Proteinabschnitte der präsynaptischen Proteine Aczonin, Rim und Munc13 sowie der Kontrollen vorgestellt werden. Vermessen wurden die Ausdehnung der präsynaptischen Verdichtungen in Höhe, Breite und Abstand zueinander, der vertikale Abstand der Immunmarkierungs-Partikel (Goldpartikel) zur präsynaptischen Membran sowie der laterale Abstand der Goldpartikel zum Dichteschwerpunkt der nächstgelegenen präsynaptischen Verdichtung.

Für alle Messungen wurden der Median, das 1. und 3. Quartil und daraus der Interquartilbereich (IQR) ausgerechnet. Die im Fließtext angeführten Werte entsprechen jeweils dem Median, falls nicht anders angegeben.

### **4.1 Morphometrie der präsynaptischen Verdichtungen**

Nach Kontrastierung mit Uranylacetat/Methylcellulose waren die präsynaptischen Verdichtungen als periodisch angeordnete Strukturen an der präsynaptischen Membran gut zu erkennen (s. Abb. 3.2, S. 33, Abb. 4.1 und Abb. 4.2, S. 37). In den Flachschnitten fanden sich pro aktiver Zone etwa 10-15 präsynaptische Verdichtungen. Die einzelnen Verdichtungen schienen im Längsschnitt am distalen Ende schmaler zu sein als an der Basis. Der Zentrum-zu-Zentrum-Abstand der PVs betrug in den Längsschnitten der Synapsen im Median der jeweiligen Mediane 74 nm, die Breite an der Basis 56 nm und die Höhe im Median der Mediane 50 nm. Es wurden PVs von unmarkierten und markierten Präparaten verglichen; die Daten unterschieden sich nicht wesentlich voneinander. Offenbar hat die

## Ergebnisse

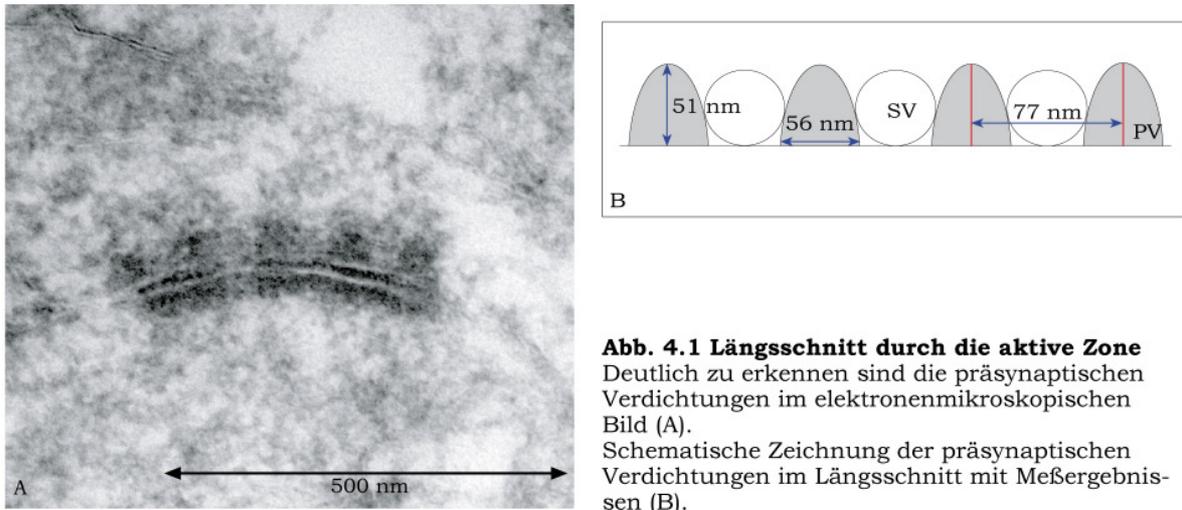
Markierung keinen nennenswerten Einfluß auf die Morphologie der PVs.

Im Flachschnitt erschienen die Verdichtungen als triangulär angeordnete, runde Strukturen (s. Abb. 4.1, S. 37). Der Zentrum-zu-Zentrum-Abstand betrug hier 79 nm, der Umfang 116 nm und der Durchmesser 39 nm. Die unterschiedlichen Werte für den Durchmesser der PVs in den Flachschnitten verglichen mit der Breite in den Längsschnitten erklären sich aus der kegelartigen Form der Verdichtungen, die in den Flachschnitten in unterschiedlicher Höhe getroffen wurden. In den Längsschnitten hingegen wurde die Breite direkt an der präsynaptischen Membran gemessen.

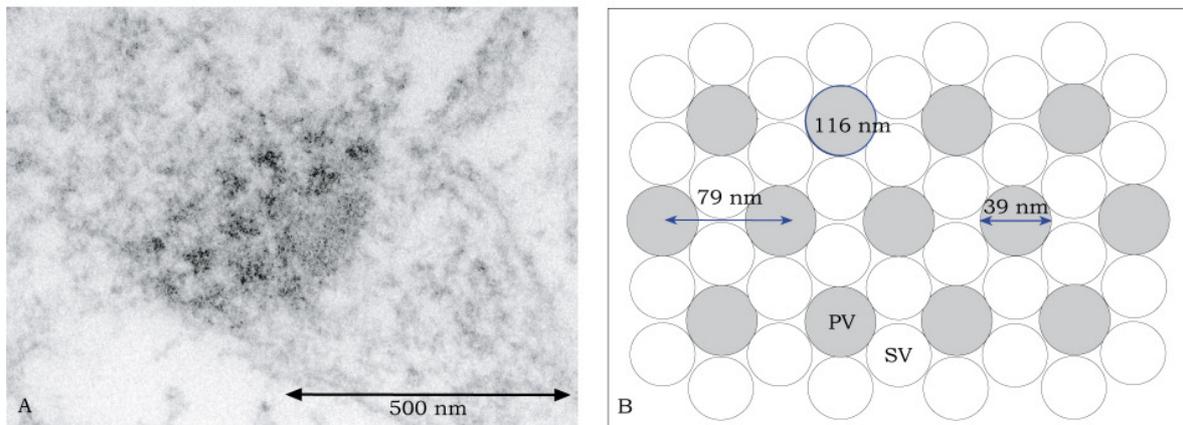
**Tab. 4.1** Morphometrie der präsynaptischen Verdichtungen

| <b>Markierung</b> | <b>Abstand<br/>[nm]</b> | <b>IQR</b> | <b>Höhe<br/>[nm]</b> | <b>IQR</b> | <b>Breite<br/>[nm]</b> | <b>IQR</b> | <b>n</b> |
|-------------------|-------------------------|------------|----------------------|------------|------------------------|------------|----------|
| Keine             | 72                      | 21         | 45                   | 15         | 56                     | 22         | 110      |
| a5.8-5            | 81                      | 26         | 59                   | 15         | -                      | -          | 147      |
| aAczNr2-1         | 70                      | 25         | 49                   | 13         | -                      | -          | 174      |
| aAczNr3-1         | 74                      | 34         | 48                   | 15         | -                      | -          | 144      |
| aAczNr4-1         | 90                      | 51         | 50                   | 13         | -                      | -          | 144      |
| aGAD              | 72                      | 28         | 53                   | 20         | -                      | -          | 188      |
| aGlutamat         | 79                      | 30         | 54                   | 16         | -                      | -          | 195      |
| <b>Median</b>     | <b>74</b>               |            | <b>50</b>            |            |                        |            |          |

## Ergebnisse



**Abb. 4.1 Längsschnitt durch die aktive Zone**  
Deutlich zu erkennen sind die präsynaptischen Verdichtungen im elektronenmikroskopischen Bild (A). Schematische Zeichnung der präsynaptischen Verdichtungen im Längsschnitt mit Meßergebnissen (B).



**Abb. 4.2 Querschnitt durch die aktive Zone** (A) Elektronenmikroskopisches Bild. (B) Schematische Zeichnung mit Darstellung der triangulären Anordnung der präsynaptischen Verdichtungen (nach Peters et al.). Dargestellt sind ebenfalls die vermutlich hexagonal um die präsynaptischen Verdichtungen gelagerten Vesikel sowie die Meßergebnisse.

## **4.2 Immunmarkierung mit Antikörpern gegen präsynaptische Proteine**

Mit Hilfe von goldgekoppelten Antikörpern wurden in Pre- und Postembedding-Versuchen bestimmte Proteinabschnitte verschiedener präsynaptischer Proteine immunmarkiert. Der (vertikale) Abstand der Goldpartikel zur Plasmamembran wurde gemessen. Für die verschiedenen Abschnitte des Proteins Aczonin wurde in den meisten Versuchen auch der (laterale) Abstand der Goldpartikel zum Dichteschwerpunkt der nächstgelegenen präsynaptischen Verdichtung ermittelt.

### **4.2.1 Immunmarkierung mit Antikörpern gegen Aczonin**

Für alle Abschnitte wurde der vertikale und (mit Ausnahme von aAczC2A10-1) der laterale Abstand bestimmt. In die Berechnung des lateralen Abstandes wurden nur diejenigen Partikel in die Auswertung miteinbezogen, die einen vertikalen Abstand innerhalb des Interquartilbereiches aufwiesen. Damit reduzierte sich der Stichprobenumfang um etwa 50 % auf die Verteilungswerte, die um den Median herum verteilt sind. Mit diesem Verfahren sollte die unspezifische Markierung ausgeschlossen werden, die vermutlich durch Abstandswerte am Rand der Verteilung repräsentiert ist.

#### **4.2.1.1 Aczonin N-Abschnitt**

Die Markierung des Aczonin-Abschnittes von AS 1226-1515 mit aAczNr2-1 ergab im Histogramm (s. Abb. 4.3 A, S. 43) für den Abstand der Partikel zur Plasmamembran eine scharfe Verteilung mit einer leichten Rechts-

verschiebung. Zwischen 40 und 60 nm findet sich eine deutliche Spitze, die ihre Entsprechung im Median von 54 nm findet. Statistisch (Test auf Verteilungsgleichheit von Kolmogoroff & Smirnof, Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %) zeigt sich beim Vergleich mit den Kontrollmarkierungen aBodipy und aGlutamat ein signifikanter Unterschied (s. Tab. 4.6, S. 52).

Das Histogramm für die lateralen Abstände zeigt eine leicht nach rechts verschobene Verteilung mit einer deutlichen Häufung um den Nullpunkt (s. Abb. 4.3 B, S. 43). Die Wölbung der Verteilung ist jedoch im Vergleich mit der einer Gaußschen Normalverteilung etwas flacher (s. Tab. 4.7, S. 54).

#### 4.2.1.2 Aczonin M-Abschnitt

Der M-Abschnitt (AS 1808-2150) von Aczonin wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern in Postembedding-Versuchen markiert. Bei beiden Markierungen findet sich im Histogramm (s. Abb. 4.3 C und E, S. 43) für die vertikalen Abstände eine scharfe Verteilung mit einem Maximum zwischen 60 und 80 nm. Der Median betrug für a5.8-5 67 nm, für a5.8-2affi 70 nm mit einem relativ engen Interquartilbereich. Beide Markierungen zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zu den Kontrollmarkierungen (s. Tab. 4.6, S. 52).

Die laterale Verteilung für a5.8-5 zeigt in der graphischen Darstellung eine eingipflige Verteilung mit einem Maximum um den Nullpunkt (s. Abb. 4.3 C, S. 43). Die Wölbung ist hier steiler als die einer Normalverteilung (s. Tab. 4.7, S. 54). Die Verteilung von a5.8-2affi im Histogramm ist etwas schmaler als die von a5.8-5. Das Verteilungsmaximum liegt hier ebenfalls bei 0 nm. Allerdings entspricht die Wölbung der Normalverteilung (s. Tab. 4.7, S. 54).

#### 4.2.1.3 Aczonin CC2-Abschnitt

## Ergebnisse

Die zweite Coiled-coil-Region von Aczonin (hier als CC2-Abschnitt bezeichnet) wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern markiert.

Die Auswertung der Markierung mit aAcz-Nr3-1 (AS-Sequenz 2521-2812) ergab eine relativ breite Verteilung, sowohl für die vertikalen als auch für die lateralen Abstände. Die graphische Darstellung (s. Abb. 4.3 G, S. 44) der vertikalen Abstandswerte zeigt eine flache, eingipflige Kurve mit einem Verteilungsmaximum zwischen 40 und 60 nm und einer deutlichen Rechtsverschiebung. Der Median für die vertikalen Abstände betrug 72 nm, mit einem Interquartilbereich von allerdings 60 nm. Diese Daten spiegeln sich in der Statistik wider. Nur gegen die Kontrolle mit Glutamat läßt sich die Markierung mit aAcz-Nr3-1 abgrenzen, gegen die Kontrolle mit Bodipy hingegen nicht (s. Tab. 4.6, S. 52).

Die Messung der lateralen Abstände ergab einen Median von 5 nm, und im Histogramm findet sich eine eingipflige, sehr breite, nach rechts verschobene Verteilung mit einer Spitze bei 0 nm (s. Abb. 4.3 H, S. 44). Die Wölbung ist etwas flacher als die einer Normalverteilung (s. Tab. 4.7, S. 54).

Die Auswertung der Markierung mit aAcz-Nr4-1 (AS 2784-3073) ergab eine flache, nach links verschobene Kurve mit einem Verteilungsmaximum zwischen 60 und 80 nm, das dem Median von 68 nm entspricht (s. Abb. 4.3 I, S. 44). Trotz des relativ breiten Interquartilbereiches von 52 nm kann ein statistisch signifikanter Unterschied zu den Kontrollen gezeigt werden (s. Tab. 4.6, S. 52). Die Auftragung der lateralen Werte zeigt eine leicht nach links verschobene und eingipflige Kurve mit einem Verteilungsmaximum um den Nullpunkt (s. Abb. 4.3 J, S. 44). Die Wölbung ist flacher als die einer Normalverteilung (s. Tab. 4.7, S. 54).

#### 4.2.1.4 Aczonin C-Abschnitt

Bei der Auswertung eines Postembedding-Versuchs mit aAczC2A10-1 wurde für die vertikalen Abstände ein Markierungsmaximum zwischen 20 und 40 nm gefunden (s. Abb. 4.3 K, S. 44). Der Median betrug aufgrund der breiten Verteilung 63 nm; der Antikörper war nicht affinitätsgereinigt. Der Spitze bei 40 nm entspricht jedoch die Auswertung eines früheren Preembedding-Versuchs mit aAczC2A10-2affi (s. Abb. 4.3 L, S. 44) in einer Konzentration von 1:40 die einen Median von 39 nm ergab (Michael Laue, unveröffentlichte Daten, Wang et al. 2008). Statistisch läßt sich die Markierung mit aAczC2A10-1 von den Kontrollmarkierungen abgrenzen (s. Tab. 4.6, S. 52). Wegen der breiten Streuung der vertikalen Abstände wurden die lateralen Abstände zu den präsynaptischen Verdichtungen hier jedoch nicht bestimmt.

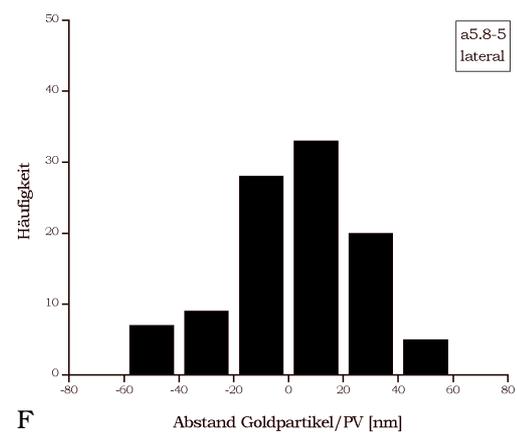
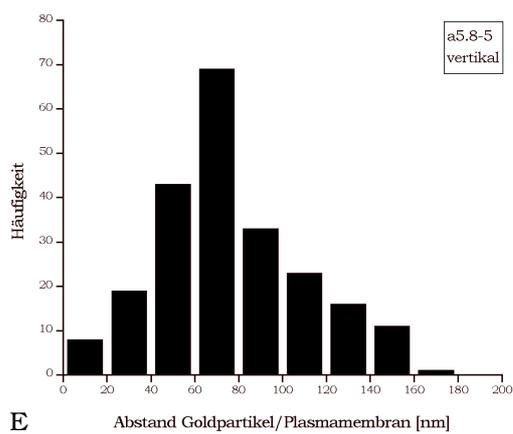
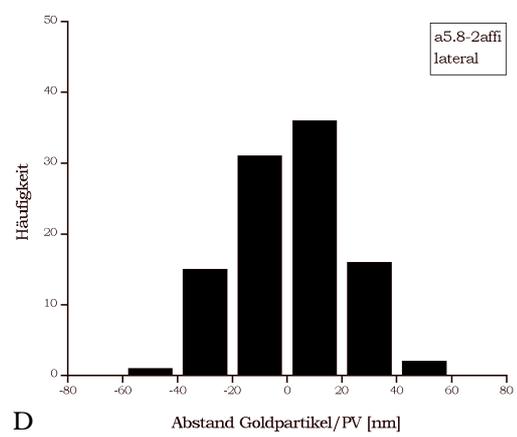
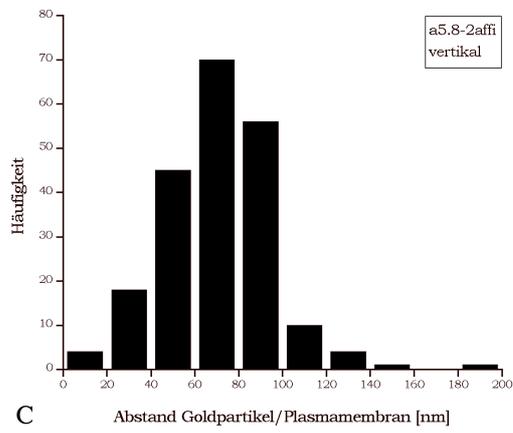
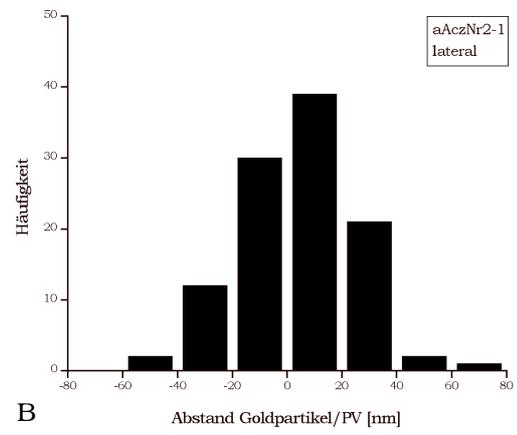
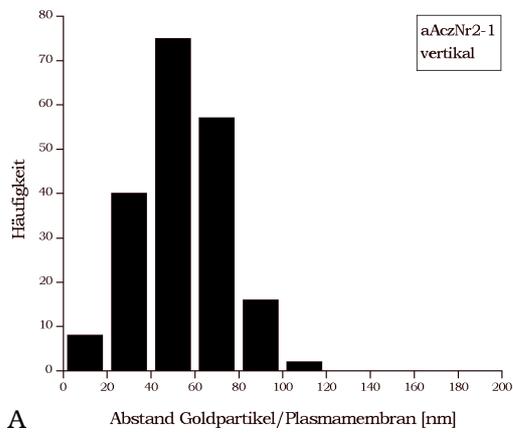
Ergebnisse

**Tab. 4.2** Ergebnisse der Markierung mit Antikörpern gegen Aczonin

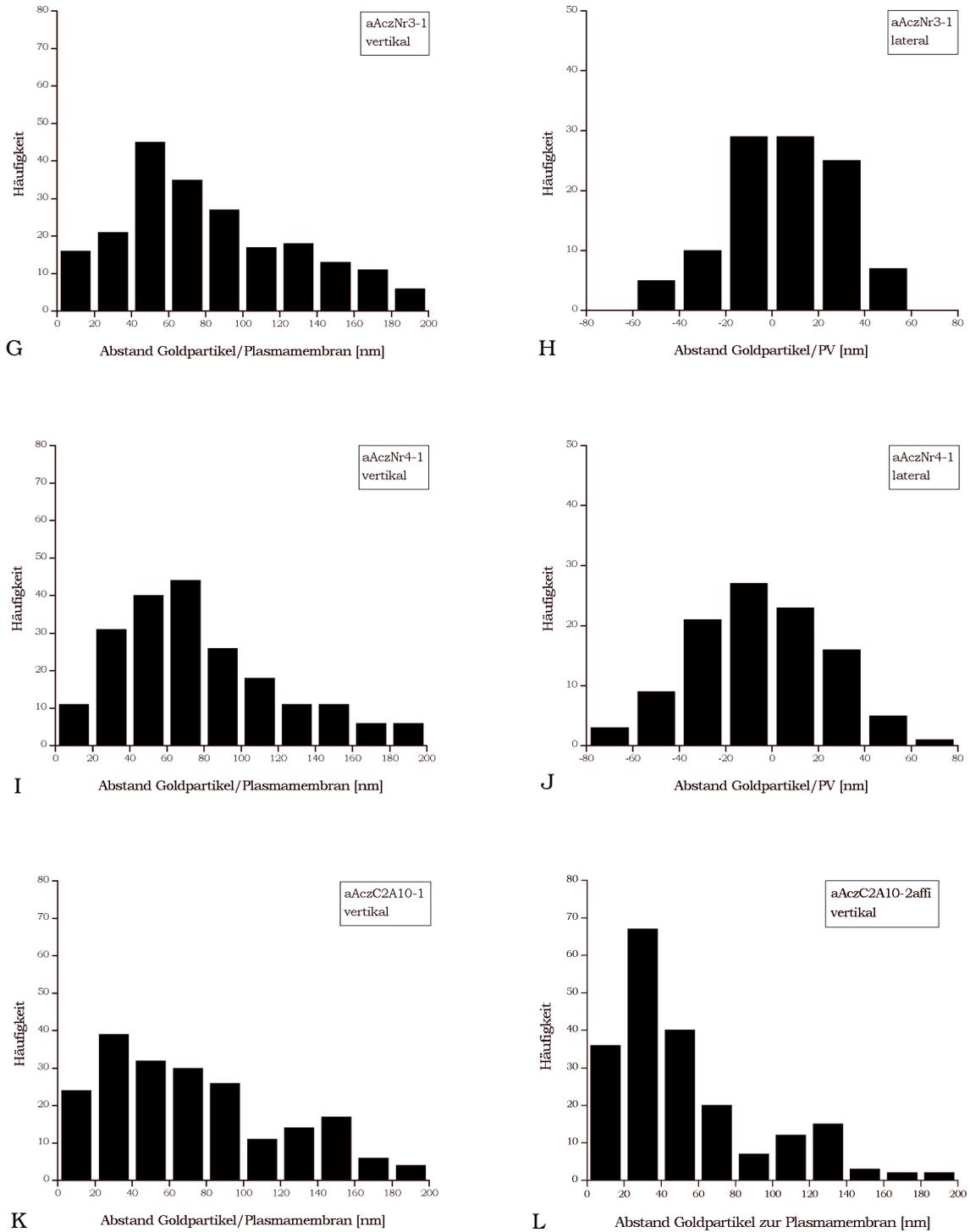
|                  |                                  | Abstände vertikal      |          |            | Abstände lateral       |          |            |
|------------------|----------------------------------|------------------------|----------|------------|------------------------|----------|------------|
| <b>Abschnitt</b> | <b>Sequenz/<br/>Markierung</b>   | <b>Median<br/>[nm]</b> | <b>n</b> | <b>IQR</b> | <b>Median<br/>[nm]</b> | <b>n</b> | <b>IQR</b> |
| N                | AS 1226-1515<br>aAczNr2-1        | 54                     | 198      | 26         | 3                      | 108      | 28         |
| M                | AS 1808-2150<br>a5.8-5           | 67                     | 195      | 31         | 4                      | 102      | 28         |
| M                | AS 1808-2150<br>a5.8-2affi       | 70                     | 209      | 29         | 0                      | 106      | 31         |
| CC2              | AS 2521-2812<br>aAcz-Nr3-1       | 72                     | 231      | 60         | 5                      | 105      | 32         |
| CC2              | AS 2784-3073<br>Acz-Nr4-1        | 68                     | 204      | 52         | -7                     | 105      | 40         |
| C                | AS 4566-4744<br>aAczC2A10-1      | 63                     | 204      | 66         | -                      | -        | -          |
| C                | AS 4566-4744<br>aAczC2A10-2affi* | 39                     | 204      | 43         | -                      | -        | -          |

\*Auswertung eines Preembedding-Versuchs (unveröffentlichte Daten von M. Laue, persönliche Mitteilung). Die übrigen Meßergebnisse stammen aus Postembedding-Versuchen.

## Ergebnisse



## Ergebnisse



**Abb. 4.3** A-L Histogramme der Goldpartikelverteilung von Antikörpern gegen Aczonin

### 4.2.2 Immunmarkierung mit Antikörpern gegen Rim

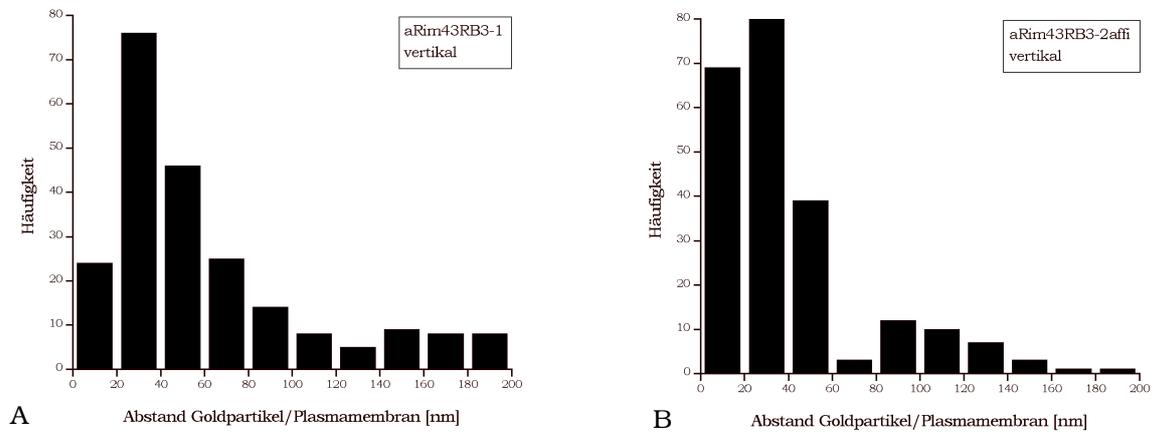
Rim wurde in einem Post- und einem Preembedding-Versuch mit aRim43RB3-1 1:50 und aRim43RB3-2affi 1:50 markiert. Hier wurden nur die vertikalen Abstände bestimmt. Statistisch ließen sich die Markierungen deutlich von den Kontrollmarkierungen abgrenzen (s. Tab. 4.6, S. 52).

**Tab. 4.3** Ergebnisse der Markierung mit Antikörpern gegen Rim

| Sequenz/Markierung                                   | Median [nm] | n   | IQR |
|--|-------------|-----|-----|
| AS 9-387Δ83-105<br>aRim43RB3-1<br>(Postembedding)    | 50          | 103 | 49  |
| AS 9-387Δ83-105<br>aRim43RB3-2affi<br>(Preembedding) | 29          | 228 | 30  |

Bei der Auswertung des Postembedding-Versuchs mit aRim43RB3-1 ergab sich für den vertikalen Abstand eine Verteilung mit einer deutlichen Spitze zwischen 20 und 40 nm (s. Abb. 4.4 A, S. 46) mit einem Median von 50 nm, der durch die zu größeren Abständen breit auslaufende Verteilung bedingt ist. Für den Preembedding-Versuch mit dem affinitätsgereinigten aRim43RB3-2affi fand sich ebenfalls im Histogramm ein deutliches Verteilungsmaximum in diesem Bereich, das sich, aufgrund der engeren Verteilung, im Median von 29 nm widerspiegelt (s. Abb. 4.4 B, S. 46).

## Ergebnisse



**Abb. 4.4** A-B Histogramme der Goldpartikelverteilung von Antikörpern gegen Rim

### 4.2.3 Immunmarkierung mit Antikörpern gegen Munc13

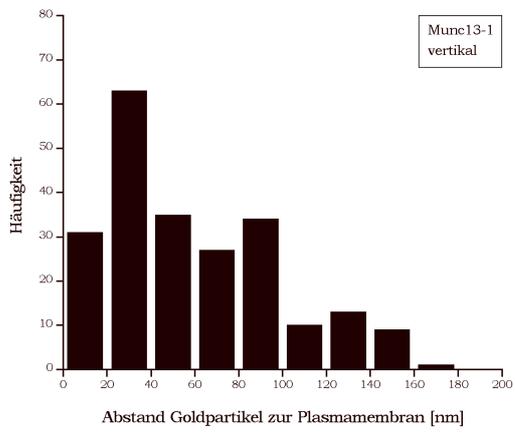
Die Proteinabschnitte von Munc13 wurden in einem Preembedding-Versuch mit aMunc13-MS1 in einer Konzentration von 1:10 markiert. Da bei den Preembedding-Präparaten methodisch bedingt die PVs nicht zu sehen waren, konnten die lateralen Abstände hier ebenfalls nicht bestimmt werden.

Im Histogramm stellt sich eine recht breite Kurve mit einer Spitze zwischen 20 und 40 nm dar (s. Abb. 4.5, S. 48). Trotz der breiten Verteilung unterscheiden sich die Werte statistisch deutlich von der Kontrollgruppe (s. Tab. 4.6, S. 52).

**Tab. 4.4** Ergebnisse der Markierung mit Antikörpern gegen Munc13

| <b>Sequenz/<br/>Markierung</b>               | <b>Median [nm]</b> | <b>n</b> | <b>IQR</b> |
|--|--------------------|----------|------------|
| AS1399-1736<br>aMunc13-MS1<br>(Preembedding) | 48                 | 223      | 60         |

## Ergebnisse



**Abb. 4.5** Histogramm der Goldpartikelverteilung von Antikörpern gegen Munc13

#### 4.2.4 Negativkontrollen - Immunmarkierung mit Antikörpern gegen Bodipy & Glutamat

Um sicherzugehen, daß die gemessenen Werte spezifisch für den Antikörper gegen den jeweiligen Proteinabschnitt des Proteins und nicht methodisch bedingt sind, wurden zwei Negativkontrollen durchgeführt. Die Kontrollen erfolgten mit den Antikörpern aBodipy (1:5) und aGlutamat (1: 1000).

**Tab. 4.5** Ergebnisse der Markierung mit Antikörpern gegen Bodipy und Glutamat

| Sequenz/<br>Markierung       | vertikale Abstände |     |     | laterale Abstände |     |     |
|------------------------------|--------------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|
|                              | Median<br>[nm]     | n   | IQR | Median<br>[nm]    | n   | IQR |
| aBodipy<br>(Postembedding)   | 85                 | 204 | 85  | 2                 | 101 | 30  |
| AGlutamat<br>(Postembedding) | 94                 | 202 | 82  | 0                 | 102 | 39  |

Die Verteilung der Abstände beider Markierungen war vor allem für die vertikalen aber auch für die lateralen Abstände erwartungsgemäß deutlich breiter als dies bei den Markierungen für Aczonin, Rim und Munc 13 der Fall war (s. Abb 4.6 A-D, S. 51). Der wesentlich größere Interquartilbereich bei beiden Messungen deutet schon auf eine unschärfere Verteilung hin. Dennoch gab es auch hier eine Häufung um die PVs.

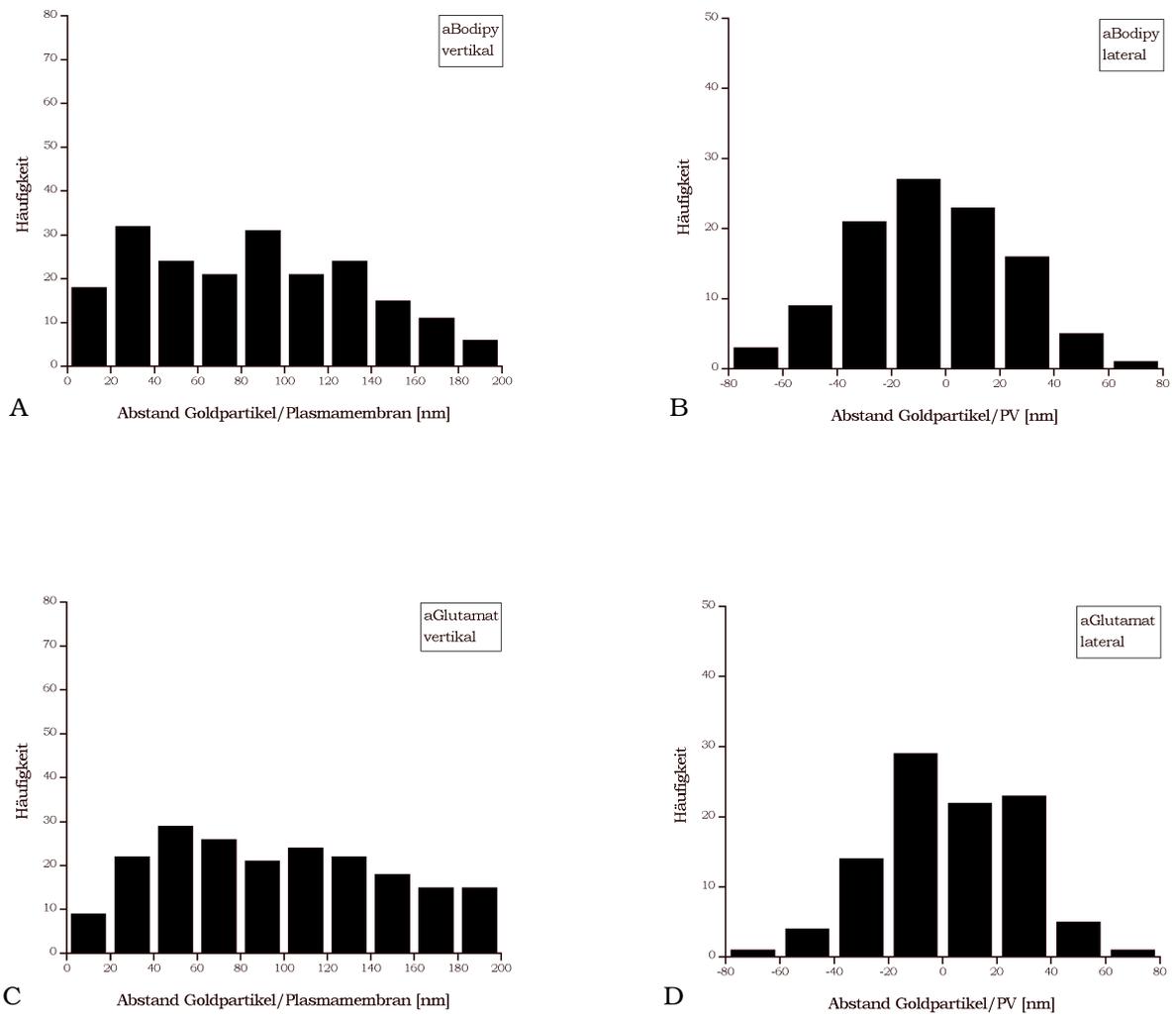
Der Vergleich der beiden Kontrollgruppen miteinander zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Für aBodipy lag der Median für die

## Ergebnisse

vertikalen Abstände bei 85 nm (IQR 85) und für die lateralen Abstände bei 2 nm (IQR 30). Die Wölbung war flacher als die einer Normalverteilung.

Bei der Auswertung der Markierung mit  $\alpha$ Glutamat belief sich der Median für die vertikalen Abstände auf 94 nm (IQR 82) und für die lateralen Abstände auf 0 (IQR 30) nm.

## Ergebnisse



**Abb. 4.6 A-D** Histogramme der Goldpartikelverteilung von Antikörpern gegen Bodipy und Glutamat

### 4.3 Statistischer Vergleich mit den Kontrollen

Die statistische Untersuchung nach Kolmogoroff und Smirnow (s. Tab. 4.6, S. 52) zeigt für die vertikalen Abstände der Markierungen aller Antikörper mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % mit einer Ausnahme, nämlich dem Vergleich von aAczNr3-1 mit Glutamat, einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollmarkierungen mit aGlutamat und aBodipy. Bei dieser Methode werden zwei unabhängige Stichproben daraufhin untersucht, ob sie aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, unabhängig von der Art der Werteverteilung. Erreicht oder übersteigt eine aus den zwei Verteilungen (F1, F2) ermittelte Prüfgröße den kritischen Wert, so liegt hinsichtlich der Verteilungs- oder Summenfunktion ein statistisch signifikanter Unterschied vor.

**Tab. 4.6** Vergleich der vertikalen Markierungsabstände von Aczonin-, Rim- und Munc-Markierung mit denen der Kontrollen (Test auf Verteilungsgleichheit nach Kolmogoroff und Smirnow)

|                                | Kritischer Wert<br>D( $\alpha$ ) aGlutamat | Prüfgröße D | Entscheidung | Kritischer Wert<br>D( $\alpha$ ) aBodipy | Prüfgröße D | Entscheidung |
|--------------------------------|--|-------------|--------------|--|-------------|--------------|
| <b>Aczonin</b>                 |  |             |              |  |             |              |
| aAczNr2-1<br>(N-Abschnitt)     | 0.136                                      | 0,494       | F1 $\neq$ F2 | 0.136                                    | 0,451       | F1 $\neq$ F2 |
| Acza5.8-5<br>(M-Abschnitt)     | 0.137                                      | 0,353       | F1 $\neq$ F2 | 0.136                                    | 2,526       | F1 $\neq$ F2 |
| Acza5.8-2affi<br>(M-Abschnitt) | 0.134                                      | 0,393       | F1 $\neq$ F2 | 0.134                                    | 0,312       | F1 $\neq$ F2 |
| aAczNr3-1<br>(CC2-Abschnitt)   | 0.134                                      | 0,154       | F1 $\neq$ F2 | 0.134                                    | 0,092       | F1 = F2      |

## Ergebnisse

|                              | Kritischer Wert<br>D(a) Glutamat | Prüfgröße D | Entscheidung | Kritischer Wert<br>D(a) Bodipy | Prüfgröße D | Entscheidung |
|------------------------------|----------------------------------|-------------|--------------|--------------------------------|-------------|--------------|
| <b>Aczonin</b>               |                                  |             |              |                                |             |              |
| aAczNr3-1<br>(CC2-Abschnitt) | 0.134                            | 0,154       | F1 ≠ F2      | 0.134                          | 0,092       | F1=F2        |
| aAczNr4-1<br>(CC2-Abschnitt) | 0.135                            | 0,210       | F1 ≠ F2      | 0.135                          | 0,155       | F1 ≠ F2      |
| aAczC2A10-1<br>(C-Abschnitt) | 0.135                            | 0,2104      | F1 ≠ F2      | 0.135                          | 0,155       | F1 ≠ F2      |
| <b>Rim</b>                   |                                  |             |              |                                |             |              |
| aRim43RB3-2af                | 0.131                            | 0,463       | F1 ≠ F2      | 0.131                          | 0,463       | F1 ≠ F2      |
| aRim43RB3-1                  | 0.165                            | 0,356       | F1 ≠ F2      | 0.165                          | 0,314       | F1 ≠ F2      |
| <b>Munc13</b>                |                                  |             |              |                                |             |              |
| aMunc13-MS1                  | 0.132                            | 0,317       | F1 ≠ F2      | 0.132                          | 0,236       | F1 ≠ F2      |

Für die lateralen Abstände von AczM zeigte der Test auf Verteilungsgleichheit mit dem Kolmogoroff-Smirnoff Test bezüglich der Kontrollen, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, keinen Unterschied zwischen den Stichprobenverteilungen. Weil die Verteilungen der anderen Markierungen schon optisch denen der Kontrollmarkierungen ähnlicher sind, wurde hier nur AczM berücksichtigt.

Da die Mediane der Verteilungen nahezu identisch sind, wurde zusätzlich der Rangdispersionstest nach Siegel und Tukey durchgeführt (1 % Irrtumswahrscheinlichkeit). Verteilungen mit identischen Lokalisationsparametern (Mittelwert oder Median) werden bei diesem Test hinsichtlich ihrer Variabilität oder Streuung miteinander verglichen. Zwischen den Verteilungen der Kontrollmarkierungen besteht kein signifikanter Unterschied. Ein Unterschied konnte zwischen aAczM und aGlutamat, aber nicht zwischen aAczM und der zweiten Kontrolle (aBodipy) festgestellt

## Ergebnisse

werden.

Die Betrachtung der Wölbung der Verteilung liefert folgende Werte:

**Tab. 4.7** Deskriptive Statistik des lateralen Abstandes

| <b>Antikörper</b>                   | <b>M</b> | <b>I</b> | <b>n</b> | <b>Wölbung</b> |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------------|
| aAczNr2-1 (1:100),<br>N-Abschnitt   | 4        | 31       | 112      | 0,30           |
| a5.8-5 (1:100),<br>M-Abschnitt      | 4        | 28       | 103      | 0,23           |
| a5.8-2affi (1:1,5),<br>M-Abschnitt  | 1        | 28       | 106      | 0,26           |
| aAczNr3-1 (1:100),<br>CC2-Abschnitt | 5        | 32       | 105      | 0,27           |
| aAczNr4-1 (1:20),<br>CC2-Abschnitt  | -7       | 40       | 105      | 0,29           |
| Kontrolle mit aBodipy<br>(1:5)      | 2        | 30       | 101      | 0,28           |
| Kontrolle mit aGlutamat<br>(1:1000) | 0        | 39       | 102      | 0,29           |

Generell liefern alle Markierungen eine symmetrisch gehäufte Verteilung um den Mittelpunkt der PVs, selbst die Kontrollen. Die Kurvenform ist nicht unähnlich der einer Normalverteilung. Die verwendeten Tests liefern keinen eindeutigen Hinweis auf Unterschiede (s.o.). Tendenziell zeigt noch AczM den größten Unterschied zu den Kontrollen. Dies läßt sich anhand der Wölbungswerte und der Interquartilbereiche der Verteilungen erkennen. Nur

aAczM zeigt Wölbungswerte, die der Normalverteilung entsprechen (0,263) oder sogar etwas steiler (d.h.  $< 0,263$ ) sind (Häufung über dem Median der Verteilung). Die Kontrollen und auch die anderen Markierungen verlaufen etwas weniger steil als die Normalverteilung oder aAczM. Das Ergebnis weist auf eine unspezifische Bindung von Antikörpern über den PVs hin, die eine eindeutige Bewertung der spezifischen Bindung unmöglich macht. Einzig die etwas schärfere Verteilung des AczM-Abschnittes läßt vermuten, daß die Antikörper gegen diesen Proteinabschnitt bevorzugt auf den PVs lokalisiert sind.

Die Lokalisation der Markierung wurde so genau wie möglich auf den Mittelpunkt (Schwerpunkt) des Partikels bezogen. Er ist maximal 25 nm (in alle Raumrichtungen) vom Epitop entfernt und ergibt sich aus den Dimensionen der Moleküle und des Goldkolloids (Ribrioux et al. 1996).

Für die Lokalisation von AczM wurden im Vorfeld Experimente mit verschiedenen Markierungssystem (Preembedding Nanogold, Postembedding 10 nm Gold, Pre-Postembedding mit einem 3-Schrittssystem) durchgeführt. Alle Methoden zeigen die Lokalisation (PGPic-Fixierung; Abstände 54, 55, 57 nm) in der gleichen Entfernung von der Plasmamembran (Michael Laue, persönliche Mitteilung). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, daß die Detektionssysteme allenfalls die statistische Breite der Markierungsverteilung bedingen, nicht aber ihren Median.

#### **4.4 Antikörper, die nicht zur Auswertung geeignet waren**

Einige Antikörper konnten für die Auswertung nicht verwendet werden, da die Markierung unzureichend war, d. h. für eine Auswertung waren nicht genügend Goldpartikel zu finden.

Die nicht zur Auswertung geeigneten Antikörper sind im folgenden

Ergebnisse

aufgelistet.

**Tab. 4.8** Ungeeignete Antikörper

| <b>Antikörper</b> | <b>Sequenz</b>        | <b>Antikörpertyp</b> | <b>Konzentration</b>     | <b>Verfahren</b> |
|-------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|------------------|
| aAczNr3-2af       | Aczonin, AS 2521-2812 | Affinitätsger. Serum | 1:20                     | Post             |
| PISAczNr4-1       | Aczonin, AS 2784-3073 | Präimmunserum        | 1:50, 1:20, 1:10         | Post             |
| aAczC2A10-3       | Aczonin, AS 4566-4744 | Rohserum             | 1:500, 1:100, 1:20, 1:10 | Post             |
| aAcz7-6-RB1-1     | Aczonin, AS 3593-3784 | Rohserum             | 1:3                      | Pre              |
| aAcz7-6-RB1-2af   | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Serum | 1:3                      | Pre              |
| aAcz7-6-RB1-3af   | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Serum | 1:3                      | Pre              |
| aAcz7-6-RB1-3af   | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Serum |                          | Pre              |
| aAcz7-6RB2-2af    | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Serum | 1:10                     | Pre              |
| aAcz7-6RB2-3af    | Aczonin, AS 3593-3784 | Affinitätsger. Serum | 1:10                     | Pre              |
| aAcz8-nat-RB2-2af | Aczonin, AS 3539-3865 | Affinitätsger. Serum | 1:3                      | Pre              |
| aAczNr8-5         | Aczonin, AS 3539-3865 | IgG                  | 1:10                     | Pre              |
| aRim43-RB2-2af    | Rim, AS 9-387Δ83-105  | IgG Biotin           | 1:3                      | Pre              |

## Ergebnisse

|                 |                          |                      |                   |          |
|-----------------|--------------------------|----------------------|-------------------|----------|
| PISRim43-RB3-1  | Rim, AS 9-387Δ83-105     | Präimmunserum        | 1:20              | Pre      |
| aCast3-RB1-2af  | Cast, AS 325-677         | Affinitätsger. Serum | 1:10              | Pre      |
| aCast3-RB2-2af  | Cast, AS 325-677         | Affinitätsger. Serum | 1:3               | Pre      |
| aCast4a-RB1-2af | Cast, AS 660-960         | Affinitätsger. Ser.  | 1:10, 1:3         | Pre      |
| aCast4a-RB2-2af | Cast, AS 660-960         | Affinitätsger. Serum | 1:10              | Pre      |
| aMu1-RB1-2      | Munc13, AS 2-320         | IgG                  | 1:3               | Pre      |
| aBasso-1        | Bassoon, AS 738-1035     | Monoklonal, IgG2a    | 1:50, 1:10        | Post     |
| aGST-RB2-1      | Glutathion-S-Transferase | Rohserum             | 1:10, 1:50, 1:100 | Post/Pre |
| aAct20/33-1     | Actin                    | IgG-Fraktion         | 1:20              | Post     |
| aCaV2.1         | Ca-Kanal, AS 865-881     | Affinitätsger. Serum | 1:50, 1:10        | Post     |

## **5. Diskussion**

Die Ausschleusung von in Vesikel verpackten Neurotransmittern erfolgt an einer definierten Stelle in der Präsynapse, der aktiven Zone. Bisher wurde eine Reihe Proteine entdeckt, denen man eine essentielle Rolle beim Aufbau der aktiven Zone sowie bei Transmissions- und Endozytosevorgängen zuschreibt. Bis heute konnten fünf CAZ-spezifische Proteine identifiziert werden: Aczonin (Piccolo), Bassoon, Cast (ERC), Munc13-1 und Rim1, die mit einer Vielzahl anderer Proteine interagieren. Das genaue Zusammenspiel dieses „Proteinorchesters“, die Funktionsweise und auch die Lokalisation einzelner Proteine in der CAZ liegen jedoch noch weitgehend im Dunkeln. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe immunhistochemischer Methoden die genauere Lokalisation einiger CAZ-Proteine zu ermitteln. Im Rahmen dieser Auswertungen wurde auch die Morphometrie der präsynaptischen Verdichtungen genauer vermessen.

### **5.1. Morphometrie der präsynaptischen Verdichtungen**

Meine eigenen Untersuchungen der präsynaptischen Verdichtungen an der aktiven Zone zeigen Ergebnisse, die den in der Literatur bereits beschriebenen weitgehend entsprechen (Gray et al. 1963, Bloom und Aghajanian 1968, Akert et al. 1969, Pfenninger et al. 1969). Dieser Befund ist bedeutend, da in den bisher publizierten Studien Phosphorwolframsäure zur Darstellung der präsynaptischen Verdichtungen verwendet worden ist und nicht Uranylacetat, wie in der vorliegenden Arbeit. Der Zentrum-zu-Zentrum-Abstand von knapp 80 nm sowohl in den Längs- als auch in den Querschnitten steht mit Beobachtungen in Einklang, nach denen die synaptischen Vesikel, deren Durchmesser in der Literatur mit 38 (Akert et al.

1969) bzw. 50 nm (Landis et al. 1988, Dresbach et al. 2001, Junqueira et al. 2002) angegeben wird, zwischen den präsynaptischen Verdichtungen eingebettet liegen.

Die unterschiedlichen Werte für den Durchmesser der PVs in den Flachschnitten, verglichen mit der Breite in den Längsschnitten, erklären sich aus der konischen Form der PVs, die in den Flachschnitten in unterschiedlicher Höhe getroffen wurden. In den Längsschnitten hingegen wurde die Breite an direkt an der präsynaptischen Membran gemessen.

Da sowohl Phosphorwolframsäure als auch Uranylacetat an Proteine binden, ist davon auszugehen, daß die hiermit gut zu kontrastierenden PVs proteinreiche Strukturen darstellen, in denen wahrscheinlich viele CAZ-Proteine lokalisiert sind.

## **5.2. Lokalisation von Aczonin an der aktiven Zone**

### **5.2.1 Lokalisation des N-Abschnittes von Aczonin an der aktiven Zone**

Der N-Abschnitt von Aczonin (AS 1226-1515) liegt meinen Untersuchungen zufolge etwa 54 nm von der präsynaptischen Membran entfernt (s. Abb. 5.1, S. 64). Dieser Wert scheint wegen des schmalen Interquartilbereichs (26 nm) und der statistischen Daten (die Verteilung unterschied sich deutlich von den Kontrollgruppen) der tatsächlichen Lokalisation des Epitops zu entsprechen. Im Histogramm zeigt sich in Übereinstimmung mit dem Median ein Verteilungsmaximum zwischen 50 und 70 nm.

In einem früheren Preembedding-Versuch mit einem affinitätsgereinigten Serum gegen den gleichen Proteinabschnitt wurde eine breitere Verteilung mit einem Median von 73 nm erhalten (Michael Laue, persönliche Mitteilung). Im Histogramm zeigt sich hier ein Verteilungsmaximum bei 60 -

## Diskussion

80 nm. Die Kurve ist allerdings deutlich nach links verschoben, so daß anzunehmen ist, daß der tatsächliche Wert unter 70 nm liegt. Der Unterschied in der Verteilung der Werte kann hier auch auf die unterschiedliche Qualität der Seren (Affinitätsreinigung) zurückgeführt werden.

Theoretisch können 5000 AS eine alpha-Helix von 750 nm bilden, was dem Durchmesser von 15 Vesikeln entspricht (Wang et al. 1999). Wenn man also davon ausgeht, daß die tatsächliche Lokalisation des markierten Epitops zwischen 50 und 70 nm liegt, widerspricht dieser Befund nicht unbedingt Theorien, denen zufolge sich Aczonin bis weit ins Axoplasma hinein erstreckt (Wang et al. 1999). Von der ermittelten Lokalisation des N-Abschnittes bis zum N-terminalen Ende wären es unter den oben genannten Voraussetzungen etwa 150-225 nm, das entspricht 3-4 Vesikeldurchmessern, wenn man voraussetzt, daß dieser Abschnitt gerade liegt. Dies ist, wenn man die Lokalisation der anderen Abschnitte betrachtet, jedoch eher unwahrscheinlich. Aczonin könnte aber durchaus über die indirekte Bindung an Rab3 über PRA1 eine Funktion bei der Steuerung von Vesikeln zur Plasmamembran haben und das Andocken der Vesikel an die Plasmamembran über die Vermittlung durch Rim ermöglichen, wie früher schon vermutet (Cases-Langhoff 1996, Wang et al. 1999, Fenster et al. 2000).

Aczonin hat offenbar auch durch die Bindung von Abp1 und/oder Profilin eine indirekte Beziehung zum Actin-Zytoskelett (Fenster et al. 2003); hierüber wäre eine Verbindung zwischen Aczonin und dem Vesikelpool denkbar. Welche Rolle Actin bei den Transmissions- und Endozytosevorgängen spielt, ist jedoch noch ungeklärt. Die Interaktion von Aczonin mit Actin könnte sowohl für Exozytosevorgänge wichtig sein, als auch eine Verbindung zur clathrinvermittelten Endozytose synaptischer Vesikel darstellen (Morales et al. 2000, Dousseau und Augustine 2000, Shupliakov et al. 2002, Sankaranarayanan et al. 2003, Bloom et al. 2003, Halpain 2003, Fenster et al. 2003).

Für den lateralen Abstand fand sich eine recht breite Verteilung mit einem Median von 3 nm. Die Spitze der Verteilung im Histogramm bei 10 nm spricht zwar für eine Lokalisation des markierten Epitops in diesem Bereich, die Wölbung war jedoch flacher als die einer Normalverteilung. Insofern muß offenbleiben, ob der Wert der tatsächlichen Lokalisation dieses Proteinabschnittes entspricht.

### **5.2.2 Lokalisation des M-Abschnittes von Aczonin an der aktiven Zone**

Der M-Abschnitt (AS 1808-2150) von Aczonin wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern in Postembedding-Versuchen markiert. Für a5.8-5 lag der Median der vertikalen Abstände bei 67 nm, für a5.8-2affi fand sich ein Median von 70 nm (s. Abb. 5.1, S. 64). Diese Ergebnisse entsprechen recht genau der Auswertung eines früheren Preembedding-Versuchs. Hierbei lag der vertikale Abstand bei 66 nm (Michael Laue, persönliche Mitteilung). Aufgrund der statistischen Werte für beide Versuche, gestützt von der schmalen Verteilung im Histogramm, kann man von einer realen Häufung dieses Epitops an der aktiven Zone ausgehen.

Für die lateralen Abstände ergab sich für die Markierung mit a5.8-5 ein Median von 4 nm, für a5.8-2affi ein Median von 1 nm. In den Histogrammen stellt sich für a5.8-2affi eine schmalere Verteilung dar. Für beide Antikörper ist die Verteilung jedoch vergleichsweise scharf, was sich auch in den statistischen Daten widerspiegelt. Nur AczM zeigt eine Wölbung, die der Normalverteilung entspricht oder sogar etwas steiler ist. Die Kontrollen und auch die anderen Markierungen ergeben eine etwas weniger steile Wölbung als die der Normalverteilung. Der Unterschied zwischen aAczM und den Kontrollen weist auf eine gehäufte Lokalisation dieses Abschnittes direkt über dem Dichteschwerpunkt der präsynaptischen Verdichtungen hin.

### **5.2.3 Lokalisation des CC2-Abschnittes von Aczonin an der aktiven Zone**

Die Auswertung der Markierung mit aAczNr3-1 (AS 2521-2812) ergab eine relativ breite Verteilung, sowohl für die vertikalen, als auch für die lateralen Abstände. Der Median für die vertikalen Abstände betrug hier 72 nm mit einem Interquartilbereich von allerdings 60 (s. Abb. 5.1, S. 64). Statistisch ließ sich die Verteilung von der Kontrolle mit aGlutamat abgrenzen, gegen aBodipy hingegen nicht. In einem früheren Preembedding-Versuch (Michael Laue, persönliche Mitteilung) lag der Median bei 61 nm mit einem engen IQR von nur 24. Im Histogramm zeigte sich damals eine sehr scharfe Verteilung mit einem Verteilungsmaximum im Bereich zwischen 60 und 80 nm. Daher ist davon auszugehen, daß der Wert von etwa 70 nm trotz der unscharfen statistischen Daten dem tatsächlichen Abstand des markierten Bereichs von der Plasmamembran entspricht.

Die Messung der lateralen Abstände ergab einen Median von 5 nm. Für diesem Wert muß aufgrund der statistischen Daten (Wölbung) offenbleiben, ob die Verteilung eher zufällig ist oder den tatsächlichen Verhältnissen entspricht.

Die Auswertung der Markierung mit aAczNr4-1 (AS 2784-3073) in einer Konzentration von 1:20 ergab einen Median von 68 nm für den vertikalen Abstand. Diese Daten ließen sich statistisch gut von den Kontrollgruppen abgrenzen. Die Ergebnisse eines früheren Preembedding-Versuchs für denselben Abschnitt zeigen einen Median von 79 nm (Michael Laue, persönliche Mitteilung). Im Histogramm findet sich hier, genau wie in meinen eigenen Ergebnissen, ein Maximum zwischen 70 und 90 nm. Für den lateralen Wert (Median -7 nm) muß aufgrund der statistischen Daten ebenso wie für aAczNr3-1 jedoch ebenfalls offen bleiben, ob er der tatsächlichen

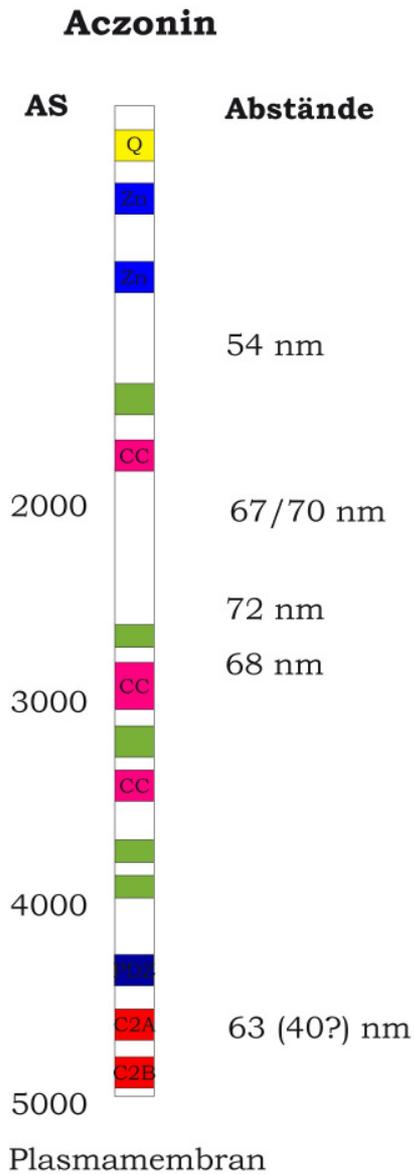
Lokalisation des markierten Epitops an der aktiven Zone entspricht.

#### **5.2.4 Lokalisation des C-Abschnitts von Aczonin an der aktiven Zone**

Bei der Auswertung einer Postembedding-Markierung mit dem nicht affinitätsgereinigten Antikörper aAczC2A10-1 (AS 4566 - 4744) wurde für die vertikalen Abstände ein Markierungsmaximum bei 40 nm auf einer sehr breiten Verteilung der Werte gemessen. Der Median betrug aufgrund der breiten Verteilung 63 nm (s. Abb. 5.1, S. 64).

Die Spitze bei 40 nm entspricht jedoch der Auswertung eines Preembedding-Versuchs mit aAczC2A10-2affi (Michael Laue, persönliche Mitteilung, Wang et al. 2008), die einen Median von 39 nm ergab.

Gängigen Theorien zufolge ist Aczonin mit seinem C-Ende direkt an der Plasmamembran verankert (Wang et al. 1999). Dies scheint in Anbetracht der gemessenen Abstände eher unwahrscheinlich; Aczonin könnte so weder den synaptischen Spalt überbrücken, wie früher postuliert (Phillips et al. 2001), noch direkt in die Plasmamembran integriert sein. Neueren immunhistochemischen Untersuchungen zufolge scheint Aczonin fest an der aktiven Zone verankert zu sein. Es wurde in erster Linie innerhalb eines Bereichs, der etwa einen Vesikeldurchmesser von der Plasmamembran entfernt ist, gefunden. Markierungen fanden sich außerdem gehäuft, aber nicht im selben Ausmaß, im Bereich des Reservepools ca. 200 nm von der Plasmamembran entfernt. Die Verteilung der Markierung schien vom Aktivitätszustand der Zelle unabhängig zu sein (Tao-Cheng 2006).



### **5.3. Lokalisation von Rim an der aktiven Zone**

Bei der Auswertung des Postembedding-Versuchs mit aRim43RB3-1 (AS 9-387Δ83-105) ergab sich für den vertikalen Abstand ein Median von 42 nm mit einer relativ scharfen Verteilung und einem Verteilungmaximum im Histogramm zwischen 20 und 40 nm.

Für den Versuch mit aRim43RB3-2affi fand sich ein vertikaler Abstand von 29 nm. Die Daten ließen sich statistisch gut von den Kontrollgruppen abgrenzen, die Verteilung im Histogramm ist sehr scharf. Das Ergebnis dieses Versuchs stimmt mit dem Ergebnis eines früheren Preembedding-Versuchs überein (Michael Laue, persönliche Mitteilung, der ebenfalls einen Abstand von 29 nm ergab).

Der Antikörper aRim43RB3-1 zeigt in Immunoblots eine Kreuzreaktivität mit Rabphilin (Manfred W. Kilimann, persönliche Mitteilung). Bei diesem Versuch fielen sehr dichte ketten- oder clusterförmig angeordnete Goldpartikel auf, die eng mit den präsynaptischen Verdichtungen in Verbindung standen. Die Partikel sind im Mittel 30-50 nm von der Plasmamembran entfernt.

Es ist gut möglich, daß es sich hier um die Markierung von Rabphilin handelt. Zusammen mit der in zwei Experimenten gefundenen Rim-Markierung (Rabphilin-subtrahierte Antikörper) im Abstand von 29 nm erklärt sich der größere Median sowie die etwas breitere Verteilung im Markierungshistogramm. Diese Ergebnisse lassen sich mit der Aufgabe von Rim beim Priming (s. Betz et al. 2001, Koushika et al. 2001) gut in Einklang bringen; diese würde eine Lokalisation relativ dicht an der Plasmamembran wahrscheinlich machen. Diese Lokalisation wurde für die neuromuskuläre Synapse ebenso gefunden (Weimer et al. 2006).

Allerdings läßt eine aktuelle immunhistochemische Untersuchung darauf schließen, daß Rim je nach Aktivitätszustand des Neurons seine Lokalisation wechselt. In unstimuliertem Zustand wurde es in unmittelbarer Nähe der

Plasmamembran gefunden, nach Stimulation der Zelle in größerer Entfernung (Tao-Cheng 2006).

#### **5.4 Lokalisation von Munc13 an der aktiven Zone**

Die Markierung mit einem Antikörper gegen eine Region am C-terminalen Ende von Munc13 (AS 1399-1736) ergab einen Median von 48 nm, der IQR war mit 60 relativ breit. Dennoch unterschieden sich die Werte signifikant von den Kontrollmarkierungen. Im Histogramm zeigte sich eine breite Verteilung mit einer deutlichen Spitze zwischen 20 und 40 nm, die sich signifikant von der der Kontrollmarkierungen unterscheidet. Diese Spitze deutet auf eine reelle Lokalisation hin, die deutlich unter dem Median von 48 nm liegt.

Diese Beobachtung steht mit der Tatsache in Einklang, daß Munc13 direkt an Syntaxin bindet (Betz et al. 1997, Augustin et al. 1999, Sassa et al. 1999, Brose et al. 2000, Basu et al. 2005), und somit eine direkte Verbindung zum SNARE-Kernkomplex, welcher dicht an der Plasmamembran lokalisiert ist, aufweisen könnte.

Da in NMR-Untersuchungen diese direkte Bindung jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, ist auch eine indirekte Bindung an Syntaxin über Munc18 denkbar, indem Munc13 zum Beispiel mit Munc18 um die Bindungsstelle an Syntaxin konkurriert und so dessen Konformation ändert. Die Bindung von Munc13 an Syntaxin scheint jedenfalls für das Priming unabdingbar zu sein (Stevens et al. 2005, Madison et al. 2005).

Die Lokalisation von Munc13 nahe der Plasmamembran erscheint auch wegen der Bindung an Rim wahrscheinlich (Betz et al. 2001, Wang et al. 2002, Schoch et al. 2002, Dulubova et al. 2005). Rim würde meinen Untersuchungen zufolge in etwa gleicher Höhe (Median 50 bzw. 29 nm)

liegen. Die Bindung von Munc13 an Rim scheint ebenfalls für den Primingprozeß essentiell zu sein.

## **5.5 Zusammenfassende Betrachtungen**

Alle Daten für die vertikalen Abstände waren statistisch signifikant. Im Vergleich mit den Daten der früheren Preembedding-Versuche für Aczonin und Rim (Wang et al. 2008) ergeben sich keine großen Diskrepanzen, so daß die Werte für die vertikalen Abstände den reellen Abständen der jeweiligen Proteinabschnitte von der Plasmamembran entsprechen dürften. Die Daten der vertikalen Markierungsabstände zur Plasmamembran sind statistisch von denen der Kontrollmarkierungen unterscheidbar und die Markierungen daher für die Antikörper spezifisch. Die Immunmarkierung repräsentiert damit wahrscheinlich die Lokalisation der entsprechenden Proteinabschnitte, für die die Antikörper spezifisch sind.

Alle Markierungen für die verschiedenen Epitope von Aczonin lagen auf ähnlicher Höhe, nämlich zwischen 40 und 70 nm. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß das Protein tatsächlich, zumindest im mittleren Abschnitt, nicht gestreckt in der aktiven Zone liegt. Dieser Bereich scheint eine Art Ankerpunkt für Aczonin an der aktiven Zone darzustellen.

Auch die Markierungen für Rim und Munc13 lagen in einem ähnlichen Bereich wie die für Aczonin, nämlich für Rim zwischen 29 und 50 nm und für Munc13 bei 48 nm. Eine direkte Verbindung von Aczonin zu Rim wurde bisher nur für Rim2 im Pankreas nachgewiesen (Fujimoto et al. 2002). Dennoch könnte, wie oben beschrieben, Aczonin über Pra1 und Rab3 eine indirekte Verbindung zu Rim1 haben. Bisher wird vermutet, daß diese Verbindung die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran ermöglicht (Wang et al. 1999, Fenster et al. 2000, Gundelfinger et al. 2003).

## Diskussion

Im Zusammenhang mit der oben beschriebenen Bindung von Munc13 an Rim erscheint also eine Lokalisation von Aczonin, Munc13 und Rim in einem ähnlichen Abstand von der Plasmamembran (und relativ dicht an dieser) plausibel. Die möglichen Interaktionen der präsynaptischen Proteine sind in Abb. 5.2 auf S. 70 dargestellt.

Die Auswertung der lateralen Markierungsabstände ergab durchweg ein Verteilungsmaximum über den präsynaptischen Verdichtungen, relativ eng am jeweiligen Dichtschwerpunkt, und sind von den Kontrollmarkierungen statistisch nicht zu unterscheiden. Da die Schwermetallhäufung bei Kontrastierung mit Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure für eine Proteinansammlung in den PVs sprechen, könnte ein Erklärungsansatz hierfür (und auch für die wesentlich breitere Verteilung der Werte) sein, daß die Antikörper eine größere Affinität zu den proteinhaltigen Strukturen hatten, was eine Verteilung direkt über den präsynaptischen Verdichtungen wahrscheinlicher machen würde. Die reale Lokalisation der Molekülabschnitte könnte daher durch diese unspezifische Markierung maskiert worden sein.

Die Verteilung der Partikel direkt über den PVs war auch aufgrund der Meßmethode rein statistisch wahrscheinlicher - die untersuchten Abschnitte der aktiven Zone waren jeweils durch den Rand einer Verdichtung begrenzt, so daß die PV-Fläche gegenüber der Zwischenraumfläche insgesamt größer war. Denkbar wäre auch, daß es keine festgelegte laterale Position für die Proteinabschnitte gibt, weil sich die Proteine oder einzelne ihrer Abschnitte in der aktiven Zone (z.B. durch Interaktionen mit anderen Proteinen oder Vesikeln) in gewissen Grenzen in verschiedenen Positionen anordnen können.

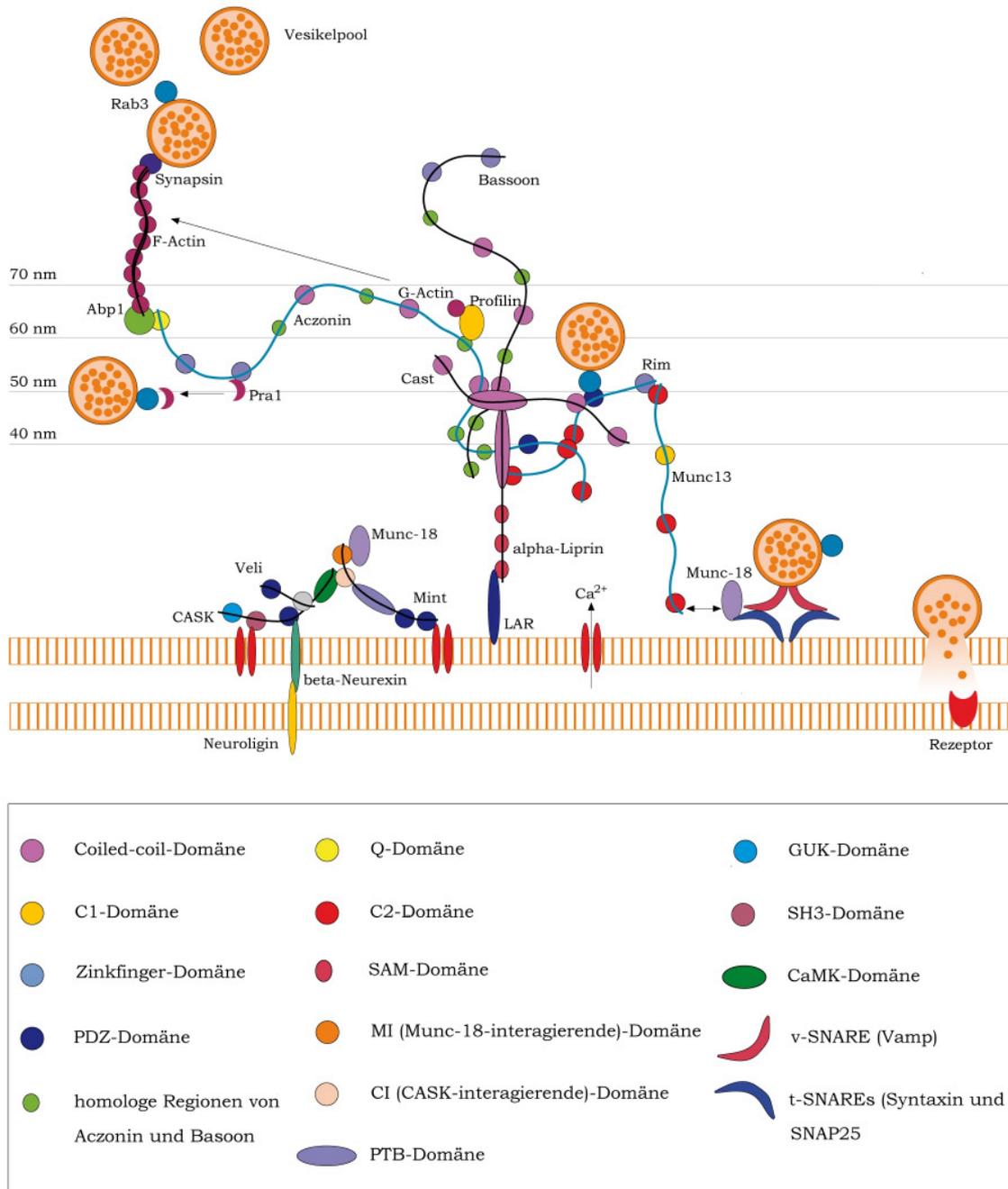
Obwohl die Werte für die lateralen Abstände statistisch teilweise nicht signifikant waren, kann man den Histogrammen jedoch deutliche Verteilungsschwerpunkte entnehmen. Für den mittleren Abschnitt von Aczonin ist die Häufung über den PVs tendenziell am größten (schärfste

## Diskussion

Verteilung). Eine breitere laterale Streuung der Lokalisation der verschiedenen Proteinabschnitte kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. In weiteren Versuchen, bei denen aufgrund der größeren Signalstärke Preembedding-Markierungen mit der Darstellung der PVs kombiniert werden sollte, kann eventuell weiter Aufschluß über die lateralen Abstände erhalten werden.

Überraschenderweise zeigten die affinitätsgereinigten Aczonin-Antikörper meist eine breitere Verteilung. Dieser Umstand könnte damit zusammenhängen, daß diese Antikörper wesentlich höher konzentriert werden mußten, damit entsprechende Signalstärken erhalten werden konnten. Dadurch kam es vermutlich auch zu einer intensiveren Hintergrundmarkierung.

## Diskussion



### Abb 5.2 Molekulare Organisation der aktiven Zone

Dargestellt ist die Lokalisation der einzelnen CAZ-Proteine sowie deren mutmaßliche Interaktionen. Die Bindung von Rim an Aczonin wurde bisher nur für Rim 2 im Pankreas nachgewiesen (Fujimoto et al. 2002). Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine sind blau markiert.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Akert K, Moor H, Pfenninger K, Sandri C**, *Contributions of new impregnation methods and freeze etching to the problems of synaptic fine structure*, 1969, Progress in Brain Research
2. **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**, *Functional inactivation of a fraction of excitatory synapses in mice deficient for the active zone protein Bassoon*, 2003, Neuron 37:787-800
3. **Aravamudan B, Fergestad T, Davis WS, Rodesch CK, Broadie K**, *Drosophila Unc-13 is essential for synaptic transmission*, 1999, Nature neuroscience 2:965-971
4. **Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N, Rettig J**, *Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells*, 2000, The EMBO Journal 19:3586-3596
5. **Augustin I, Betz A, Herrmann C, Jo T, Brose N**, *Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain*, 1999, Biochemical Journal 337:363-371
6. **Augustin I, Rosenmund C, Südhof TC, Brose N**, *Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles*, 1999, Nature 400:457-461
7. **Berod A, Hartman BK, Pujol JF**, *Importance of fixation in immunohistochemistry: use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase*, 1981, Journal of Histochemistry and Cytochemistry 29:844-850

- 8. Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin I, Neher E, Südhof TC, Rettig J, Brose N.** *Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release*, 1998, *Neuron* 21:123-136
- 9. Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N,** *Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N-terminus of Syntaxin*, 1997, *The Journal of Biological Chemistry* 272:2520-2526
- 10. Betz A, Thakur P, Junge HJ, Ashery U, Rhee J-S, Scheuss V, Rosenmund C, Rettig J, Brose N,** *Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming*, 2001, *Neuron* 30:183-196
- 11. Bloom FE, Aghajanian GK,** *Fine structural and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid*, 1968, *Journal of Ultrastructure Research* 22:361-375
- 12. Bloom O, Evergren E, Tomilin N, Kjaerulff O, Löw P, Brodin L, Pieribone VA, Greengard P, Shupliakov O,** *Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling*, 2003, *The Journal of Cell Biology* 161:737-747
- 13. Brandstätter JH, Fletcher EL, Garner CC, Gundelfinger ED, Wässle H,** *Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein Bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina*, 1999, *European Journal of Neuroscience* 11:3683-3693
- 14. Brose N, Hofmann K, Hata Y, Südhof TC,** *Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C<sub>2</sub>-domain proteins*, 1995, *The Journal of Biological Chemistry* 270:25273-25280
- 15. Brose N, Rosenmund C, Rettig J,** *Regulation of transmitter release by *Unc-13* and its homologues*, 2000, *Current Opinion in Neurobiology* 10:303-311

- 16. Bucci C, Chiariello M, Lattero D, Maiorano M, Bruni CB**, *Interaction cloning and characterization of the cDNA encoding the human prenylated Rab acceptor (Pra1)*, 1999, *Biochemical and biophysical research communications* 258:657-662
- 17. Calakos N, Schoch S, Südhof TC, Malenka RC**, *Multiple roles for the active zone protein RIM1 $\alpha$  in late stages of neurotransmitter release*, 2004, *Neuron* 42:889-896
- 18. Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Appeltauer U, Takei K, Kindler S, Veh RW, De Camilli P, Gundelfinger ED, Garner CC**, *Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix*, 1996, *European Journal of Cell Biology* 69:214-223
- 19. Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Südhof TC, Malenka RE**, *RIM1 $\alpha$  is required für synaptic long-term potentiation*, 2002, *Nature* 415:327-330
- 20. Coppola T, Magnin-Lüthi S, Perret-Menoud V, Gattesco S, Schiavo G, Regazzi R**, *Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca<sup>2+</sup> channels, SNAP-25, and Synaptotagmin*, 2001, *The Journal of Biological Chemistry* 276:32756-32762
- 21. Deguchi-Tawarada M, Inoue E, Takao-Rikitsu E, Inoue M, Ohtsuka T, Takai Y**, *CAST 2: identification and characterization of a protein structurally related to the presynaptic cytomatrix protein CAST*, 2004, *Genes to Cells* 9:15-23
- 22. Deken SL, Vincent R, Hadwiger G, Liu Q, Wang Z-W, Nonet ML**, *Redundant localization mechanisms of RIM and ELKS in *Caenorhabditis elegans**, 2005, *The Journal of Neuroscience* 25:5975-5983
- 23. Dick O, Hack I, Altroock WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH**, *Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon*, 2001,

The Journal of Comparative Neurology 439:224-234

**24. Dousseau F und Augustine GJ**, *The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: an overview*, 2000, Biochimie 82:353-363

**25. Dresbach T, Hempelmann A, Spilker C, tom Dieck S, Altroock WD, Zuschratter W, Garner CC, Gundelfinger ED**, *Functional regions of the presynaptic cytomatrix protein Bassoon: significance for synaptic targeting and cytomatrix anchoring*, 2003, Molecular and Cellular Neuroscience 23:279-291

**26. Dresbach T, Qualmann B, Garner CC, Gundelfinger ED**, *The presynaptic cytomatrix of brain synapses*, 2000, CMLS, 58:94-116

**27. Dulubova I, Lou X, Lu J, Huryeva I, Alam A, Schneggenburger R, Südhof TC, Rizo J**, *A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity?*, 2005, The EMBO Journal 24:2839-2850

**28. Duncan RR, Betz A, Shipston MJ, Brose N, Chows RH**, *Transient, phorbol ester-induced DOC2-Munc13 interactions in vivo*, 1999, The Journal of Biological Chemistry 274:27347-27350

**29. Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempfer U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC**, *Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to Bassoon*, 2000, Neuron 25:203-214

**30. Fenster S, Kessels MM, Qualmann B, Chung WJ, Nash J, Gundelfinger ED, Garner CC**, *Interactions between Piccolo and the actin/dynamin binding protein Abp1 link vesicle endocytosis to the presynaptic active zones*, 2003, The Journal of Biological Chemistry 278:20268-20277

**31. Fujimoto K, Shibasaki T, Yokoi N, Kashima Y, Matsumoto M, Sasaki T, Tajima N, Iwanaga T, Seino S**, *Piccolo, a Ca<sup>2+</sup> sensor in pancreatic beta-cells*, 2002, The Journal of Biological Chemistry 277:50497-50502

**32. Garcia-Junco-Clemente P, Linares-Clemente P, Fernández-Chacón R**,

*Active zones for presynaptic plasticity in the brain*, 2005, *Molecular Psychiatry* 10:185-200

**33. Garner CC, Kindler S, Gundelfinger ED**, *Molecular determinants of presynaptic active zones*, 2000, *Current opinion in neurobiology* 10:321-327

**34. Gerber SH, Garcia J, Rizo J, Südhof TC**, *An unusual C<sub>2</sub>-domain in the active-zone protein Piccolo: implications for Ca<sup>2+</sup> regulation of neurotransmitter release*, 2001, *The EMBO Journal* 20:1605-1619

**35. Gray EG**, *Electron microscopy of presynaptic organelles of the spinal cord*, 1963, *Journal of Anatomy* 97:101-106

**36. Gundelfinger ED, Kessels MM, Qualmann**, *Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis*, 2003, *Nature Reviews (Molecular cell biology)* 4:127-138

**37. Halpain S**, *Actin in a supporting role*, 2003, *Nature Neuroscience* 6:101-102

**38. Junge HJ, Rhee JS, Jahn O, Varoqueaux F, Spieß J, Waxham MN, Rosemund C, Brose N**, *Calmodulin and Munc13 form a Ca<sup>2+</sup> sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity*, 2004, *Cell* 118:389-401

**39. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO**, *Histologie*, 5. Aufl., 2002, Springer Verlag Berlin, S. 116-117

**40. Juranek J, Mukherjee K, Rickmann M, Martens H, Calka J, Südhof TC, Jahn R**, *Differential expression of active zone proteins in neuromuscular junctions suggests functional diversification*, 2006, *European Journal of Neuroscience*, 24:3043-3052

**41. Kim S, Ko J, Shin H, Lee J-R, Lim C, Han J-H, Altroock WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Premont RT, Kaang B-K, Kim E**, *The GIT family of proteins forms multimers and associates with the presynaptic cytomatrix*

*protein Piccolo*, 2003, *The Journal Biological Chemistry* 278:6291-6300

**42. Ko J, Na M, Kim S, Lee J-R, Kim E**, *Interaction of the ERC family of RIM-binding proteins with the Liprin-alpha family of multidomain proteins*, 2003, *The Journal of Biological Chemistry* 298:42377-42385

**43. Ko J, Yoon C, Piccoli G, Chung HS, Kim K, Lee HW, Kim H, Sala C, Kim E**, *Organization of the presynaptic active zone by ERC2/CAST1-dependent clustering of the tandem PDZ protein syntenin-1*, 2006, *Journal of Neuroscience* 26:963-970

**44. Koch H, Hofmann K, Brose N**, *Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform*, 2000, *Biochemical Journal* 349:247-253

**45. Koushika SP, Richmond JE, Hadwiger G, Weimer RM, Jorgensen EM, Nonet ML**, *A post-docking role for active zone protein Rim*, 2001, *Nature Neuroscience* 4:997-1005

**46. Landis DMD, Hall AK, Weinstein LA, Reese TS**, *The organisation of cytoplasm at the presynaptic AZ of a CNS system synapse*, 1988, *Neuron*, 1:201-209

**47. Lonart G**, *RIM1: an edge for presynaptic plasticity*, 2002, *TRENDS in Neuroscience* 25(7):329-331

**48. Lu J, Machius M, Dulubova I, Dai H, Südhof TC, Tomchick DR, Rizo J**, *Structural basis for a Munc13-1 homodimer to Munc13-1/RIM heterodimer switch*, 2006, *PLOS Biology* 4(7):1159-1172

**49. Martincic I, Peralta ME, Ngsee JK**, *Isolation and characterization of a dual prenylated Rab and Vamp2 receptor*, 1997, *The Journal Biological Chemistry* 272:26991-26998

**50. Mochida S, Orita S, Sakaguchi G, Sasaki T, Takai Y**, *Role of the Doc2-Munc13-1 interaction in the neurotransmitter release process*, 1998, *PNAS*

95:11418-11422

- 51. Monier S, Jollivet F, Janoueix, Lerosey I, Johannes L, Goud B,** *Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome to TGN transport*, 2002, *Traffic* 3:289-297
- 52. Morales M, Colicos MA, Goda Y,** *Actin-dependent regulation of neurotransmitter release at central synapses*, 2000, *Neuron* 27:539-550
- 53. Neeb A, Koch H, Schürmann A, Brose N,** *Direct interaction between the ARF-specific guanine nucleotide exchange factor msec7-1 and presynaptic Munc13-1*, 1999, *European Journal of Cell Biology* 78:533-538
- 54. Ohtsuka T, Takao-Rikitsu E, Inoue E, Inoue M, Takeuchi M, Matsu-  
bara K, Deguchi-Tawarada M, Satoh K, Morimoto K, Nakanishi H, Takai  
Y,** *CAST: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses  
that forms a ternary complex with RIM1 and Munc 13-1*, 2002, *The Journal of  
Cell Biology* 158:577-590
- 55. Orita S, Naito A, Sakaguchi G, Maeda M, Igarashi H, Sasaki T, Takai  
Y,** *Physical and functional interactions of Doc2 and Munc13 in Ca<sup>2+</sup>-dependent  
exocytotic machinery*, 1997, *The Journal of Biological Chemistry* 272:16081-  
16084
- 56. Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H,  
Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S,** *cAMP-GEFII  
is a direct target of cAMP in regulated exocytosis*, 2000, *Nature Cell Biology*  
2:805-811
- 57. Pfenninger K, Akert K, Moor H, Sandri C,** *The fine structure of freeze-  
fractured presynaptic membranes*, 1972, *Journal of Neurocytology* 1:129-149
- 58. Pfenninger K, Sandri C, Akert K, Eugster CH,** *Contribution to the  
problem of structural organization of the presynaptic area*, 1969, *Brain  
Research* 12:10-18
- 59. Phillips GR, Huang JK., Wang Y, Tanaka H, Shapiro L, Zhang W,**

- Shan W-S, Arndt K, Frank M, Gordon RE, Gawinowicz MA, Zhao Y, Colman DR**, *The presynaptic particle web: Ultrastructure, Composition, Dissolution and Reconstitution*, 2001, Neuron 32:63-77
- 60. Powell CM, Schoch S, Monteggia L, Barrot M, Matos MF, Feldmann N, Südhof TC, Nestler EJ**, *The presynaptic cytomatrix protein Rim 1 alpha is critical for normal learning and memory*, 2004, Neuron 42:143-153
- 61. Ribrioux S, Kleymann G, Haase W, Heitmann K, Ostermeier C, Michel H**, *Use of nanogold- and fluorescent-labeled antibody Fv fragments in immunocytochemistry*, 1996, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 44 (3):207-213
- 62. Richmond JE, Davis WS, Jorgensen EM**, UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*, 1999, Nature neuroscience 2:959-964
- 63. Richter K, Langnaese K, Kreutz MR, Olias G, Zhai R, Scheich H, Garner CC, Gundelfinger ED**, *The presynaptic cytomatrix protein Bassoon occurs at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain*, 1999, The Journal of comparative Neurology 408:437-448
- 64. Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, Reim K, Brose N, Rhee J-S**, *Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms*, 2002, Neuron 33:411-424
- 65. Rosenmund C, Rettig J, Brose N**, *Molecular mechanisms of active zone function*, 2003, Current opinion in neurobiology 13:1-11
- 66. Roth J, Taatjes DJ, Tokuyasu KT**, *Contrasting of Lowicryl K4M thin sections*, 1990, Histochemistry 95:123-136
- 67. Sachs L**, *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden*, 1992, Berlin u. a.: Springer
- 68. Sakaguchi G, Orita S, Naito A, Maeda M, Igarashi H, Sasaki T, Takai Y**, *A novel brain-specific isoform of beta spectrin: isolation and its interaction with Munc13*, 1998, Biochemical and Biophysical Research Communications

248:846-851

**69. Sankaranarayanan S, Atluri PP, Ryan TA,** *Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function*, 2003, *Nature Neuroscience* 6:127-135

**70. Sanmartí-Vila L, tom Dieck S, Richter K, Altroock W, Zhang L, Volkhardt W, Zimmermann H, Garner CC, Gundelfinger ED, Dresbach T,** *Membrane association of the presynaptic cytomatrix protein Bassoon*, 2000, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275:43-46

**71. Sassa T, Harada S, Ogawa H, Rand JB, Maruyama IN, Hosono R,** *Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC-13*, 1999, *The Journal of Neuroscience* 19:4772-4777

**72. Schmitz F, Augustin I, Brose N,** *The synaptic vesicle priming protein Munc13-1 is absent from tonically active ribbon synapses of the rat retina*, 2001, *Brain Research* 895:258-263

**73. Schoch S, Castillo PE, Jo T, Mukherjee K, Geppert M, Wang Y, Schmitz F, Malenka RC, Südhof TC,** *Rim 1 alpha forms a protein scaffold for regulating transmitter release at the active zone*, 2002, *Nature* 415:321-326

**74. Schoch S, Gundelfinger ED,** *Molecular organization of the presynaptic active zone*, 2006, *Cell Tissue Research* 326:379-391

**75. Shibasaki T, Sunaga Y, Seino S,** *Integration of ATP, cAMP, and Ca<sup>2+</sup> signals in insuline granule exocytosis*, 2004, *Diabetes* 53:S59-S62

**76. Shibasaki T, Sunaga Y, Fujimoto K, Kashima Y, Seino S,** *Interaction of ATP sensor, cAMP sensor, Ca<sup>2+</sup> sensor, and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in insuline granule exocytosis*, 2004, *Journal of Biological Chemistry* 279:7956-7961

**77. Shupliakov O, Löw P, Grabs H, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L,** *Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of*

*dynamamin-SH3 domain interactions*, 1997, *Science* 276:259-263

**78. Siksou L, Rostaing P, Lechaire J-P, Boudier T, Ohtsuka T, Fejtová A, Kao H-T, Greengard P, Gundelfinger ED, Triller A, Marty S**, *Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix*, 2007, *The Journal of Neuroscience* 27(26):6868-6877

**79. Simsek-Duran F, Linden DJ, Lonart G**, *Adaptor protein 14-3-3 is required for a presynaptic form of LTP in the cerebellum*, 2004, *Nature Neuroscience* 7:1296-1298

**80. Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothmann JE**, *A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion*, 1993, *Cell* 75:409-418

**81. Südhof T**, *The synaptic vesicle cycle*, 2004, *Annu. Rev. Neurosci.* 27:509-47

**82. Stevens DR, Wu Z-X, Matto U, Junge HJ, Schirra C, Becherer U, Wojcik SM, Brose N, Rettig J**, *Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1*, 2005, *Current Biology* 15:2243-2248

**83. Sun L, Bittner MA, Holz RW**, *Rim, a component of the presynaptic active zone and modulator of exocytosis, binds 14-3-3 through its N-terminus*, 2003, *The Journal of Biological Chemistry* 278:38301-38309

**84. Takao-Rikitsu E, Mochida S, Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Inoue M, Ohtsuka T, Takai Y**, *Physical and functional interaction of the active zone proteins, CAST, RIM1, and Bassoon in neurotransmitter release*, 2004, *The Journal of Cell Biology* 164:301-311

**85. Tao-Cheng JH**, *Activity-related redistribution of presynaptic proteins in the active zone*, 2006, *Neuroscience* 141:1217-1224

**86. tom Dieck S, Sanmartí-Vila L, Langnaese K, Richter K, Kindler S**,

**Soyke A, Wex H, Smalla K-H, Kämpf U, Fränzer J-T, Stumm M, Garner CC, Gundelfinger ED**, *Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of the presynaptic nerve terminals*, 1998, *The Journal of Cell Biology* 142:499-509

**87. tom Dieck S, Altmann WD, Kessels MM, Qualmann B, Regus H, Brauner D, Fejtová A, Bracko O, Gundelfinger ED, Brandstätter JH**, *Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex*, 2005, *The Journal of Cell Biology* 168(5):825-835

**88. Vardinon-Friedman H, Bresler T, Garner CC, Ziv N**, *Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment*, 2000, *Neuron* 27:57-69

**89. Varoqueaux F, Sigler A, Rhee J-S, Brose N, Enk C, Reim K, Rosenmund C**, *Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming*, 2002, *PNAS* 99:9037-9042

**90. Wang X, Hu B, Zimmermann B, Kilimann MW**, *Rim1 and Rabphilin-3 bind Rab3-GTP by composite determinants partially related through N-terminal alpha-helix motifs*, 2001, *The Journal of Biological Chemistry* 276:32480-32488

**91. Wang X, Kibschull M, Laue MM, Lichte B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW**, *Aczonin, a 550-kD putative scaffolding protein of presynaptic active zones, shares homology with Rim and Bassoon and binds Profilin*, 1999, *Journal of Cell Biology* 147: 151-162

**92. Wang X, Kilimann MW, Laue MM**, *Aczonin, an organizer protein of neurotransmitter release sites, localizes to a narrow plasma membrane-parallel layer and engages in a node of interactions with Bassoon, CAST, Munc13 and Rim*, 2008 (eingereicht)

- 93. Wang Y, Liu X, Biederer T, Südhof TC**, *A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: implications for the genesis of synaptic active zones*, 2002, PNAS 99:14464-14469
- 94. Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC**, *Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion*, 1997, Nature 388:593-598
- 95. Wang Y, Sugita S, Südhof TC**, *The RIM/NIM family of neuronal C<sub>2</sub> domain proteins*, 2000, The Journal of Biological Chemistry 275:20033-20044
- 96. Wang Y und Südhof TC**, *Genomic definition of RIM proteins: evolutionary amplification of a family of synaptic regulatory proteins*, 2003, Genomics 81: 126-137
- 97. Weimer RM, Gracheva EO, Merygnac O, Miller KG, Richmond JE, Bessereau J-L**, *UNC-13 and UNC-10/Rim localize synaptic vesicles to specify membrane domains*, 2006, The Journal of Neuroscience 26(31):8040-8047
- 98. Xu X-ZS, Wes PD, Chen H, Li H-S, Yu M, Morgan S, Liu Y, Montell C**, *Retinal targets of calmodulin include proteins implicated in synaptic transmission*, 1998, The Journal of Biological Chemistry 273:31297-31307
- 99. Zhai RG und Bellen, HJ**, *The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal*, 2004, Physiology, 19:262-270
- 100. Zhai RG, Vardinon-Friedman H, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED, Ziv NE, Garner CC**, *Assembling at the active zone: a characterization of an active zone precursor vesicle*, 2001, Neuron 29:131-143
- 101. Zhen M, Jin Y**, *Presynaptic terminal differentiation: transport and assembly*, 2004, Current Opinion in Neurobiology 14:280-287
- 102. Ziff EB**, *Enlightning the postsynaptic density*, 1997, Neuron 19:1163-1174

## **7. Anhang**

### **7.1 Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1 Proteine an der aktiven Zone und ihre Bindungspartner, S.13 ff.

Tab. 3.1 Entwässerung und Infiltration mit Epon, S. 22

Tab. 3.2 Entwässerung und Einbettung nach der PLT-Methode, S. 25

Tab. 3.3 Übersicht über die verwendeten Antikörper, S. 27 f.

Tab. 4.1 Morphometrie der präsynaptischen Verdichtungen, S. 36

Tab. 4.2 Ergebnisse der Markierung mit Antikörpern gegen Aczonin, S. 42

Tab. 4.3 Ergebnisse der Markierung mit Antikörpern gegen Rim, S. 45

Tab. 4.4 Ergebnisse der Markierung mit Antikörpern gegen Munc 13, S. 47

Tab. 4.5 Ergebnisse der Markierung mit Antikörpern gegen Bodipy und Glutamat, S. 49

Tab. 4.6 Vergleich der vertikalen Markierungsabstände von Aczonin, Rim und Munc 13-Markierung mit denen der Kontrollen (Test auf Verteilungsgleichheit nach Kolmogoroff und Smirnow), S. 52 f.

Tab. 4.7 Deskriptive Statistik der lateralen Abstände, S. 54

Tab. 4.8 Ungeeignete Antikörper, S. 56 f.

## **7. 2 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 2.1 Schematische Darstellung einer chemischen Synapse, S. 17

Abb. 2.2 Regionen präsynaptischer Proteine S. 17

Abb. 3.1 Meßmethode Preembedding, S. 33

Abb. 3.2 Meßmethode Postembedding, S. 33

Abb. 4.1 Längsschnitt durch die aktive Zone, S. 37

Abb. 4.2 Querschnitt durch die aktive Zone, S. 37

Abb. 4.3 Histogramme der Goldpartikelverteilung von Antikörpern gegen Aczonin, S. 43 f.

Abb. 4.4 Histogramme der Goldpartikelverteilung von Antikörpern gegen Rim, S. 46

Abb. 4.5 Histogramm der Goldpartikelverteilung von Antikörpern gegen Munc13, S. 48

Abb. 4.6 Histogramme der Goldpartikelverteilung von Antikörpern gegen Bodipy und Glutamat, S. 51

Abb. 5.1 Lokalisierung verschiedener Abschnitte von Aczonin in Bezug zur Plasmamembran, S. 64

Abb. 5.2 Molekulare Organisation der aktiven Zone, S. 70

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Dahlen, Ruth Agnes  
Adresse: Unterer Hagen 41  
66117 Saarbrücken  
Telephon: 06 81/9 07 21 22  
E-Mail: ruthdahlen@web.de  
Geboren: am 23.12.1975 in Ludwigsburg

### Schulbildung:

8/1986 - 6/1995: Hildegardisschule Bingen (Gymnasium)  
6/1995: Abitur

### Während der Wartezeit auf einen Studienplatz:

8/1995 - 1/1996: Hl.-Geist-Hospital Bingen: Krankenpflegepraktikum  
3/1996 - 10/1996: Alten- und Pflegeheim der AWO Mainz-Mombach: Altenpflegehelferin  
11/1996 - 6/1997: "L'Arche d'Aigrefoin" in St.-Rémy-lès-Chevreuse, Frankreich: Betreuung geistig behinderter Erwachsener  
6/1998 - 10/1998: Hildegardforum der Kreuzschwestern, Bingen: Arbeit als Aushilfe in der Gastronomie

### Studium:

10/1997 - 12/1997: Centre universitaire de Luxembourg, Luxemburg: Studium der Humanmedizin  
10/1998 - 10/2005: Universität des Saarlandes, Homburg/Saar: Studium der Humanmedizin  
3/2001: Ärztliche Vorprüfung  
9/2001 - 6/2002: Universität Kuopio, Finnland: Studium der Humanmedizin über das Austauschprogramm Erasmus  
3/2003: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
9/2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Abschlußnote: gut

**Praktisches Jahr:**

10/2004 - 2/2005: SHG-Klinikum Merzig, Chirurgie  
2/2005 - 6/2005: Lappländisches Zentralkrankenhaus Rovaniemi, Lehr-  
krankenhaus der Universität Oulu, Finnland: Innere  
Medizin  
6/2005 - 9/2005: Uniklinik Homburg/Saar: Dermatologie

**Berufserfahrung:**

6/2006 - 9/2007: Krankenhaus Sulzbach: Assistenzärztin für Innere  
Medizin  
Seit 10/2007: Klinik Berus: Assistenzärztin für Psychosomatik

**Sprachen:**

Deutsch: Muttersprache  
Englisch: fließend  
Französisch: fließend  
Finnisch: gut

Saarbrücken, 01.05.2008