

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Etablierung eines Zellkultursystems zur Untersuchung  
von Exozytose in Ribbon-Synapsen**

***Dissertation zur Erlangung des Grades Dr. med.***

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von: Angelika Haffner

geb. am: 21.02.1978 in Mainz

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1 Signalübertragung durch konventionelle Synapsen	4
2.2 Ribbonsynapsen	5
2.3 RIBEYE, ein Hauptbestandteil synaptischer Ribbons	9
2.4 humane Retinoblastomazellen Y79	10
2.5 Ribbonsynapsen in Pinealozyten	12
2.6 Ziel der Arbeit	13
<b>3 Material und Methodik</b>	<b>14</b>
3.1 Material	14
3.1.1 Verwendete Zellkulturen	14
3.1.2 Nährmedium	14
3.1.3 Puffer, Chemikalien und Lösungen	15
3.1.3.1 Für die Zellkultivierung	15
3.1.3.2 Für Polyacrylamidgele und Western-Blots	16
3.1.3.3 Für Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie	17
3.1.3.4 Für Elektronenmikroskopie	17
3.1.4 Geräte	17
3.1.5 Verwendete Primärantikörper	18
3.1.6 Verwendete Sekundärantikörper	19
3.2 Methodik	20
3.2.1 Zellkulturen	20
3.2.1.1 Beschichten der Deckgläser mit Gelatine	21
3.2.1.2 Gewinnung der Zellen	21
3.2.1.3 Differenzierung der Y79 Zellen	22
3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
3.2.3 Western-Blot	24
3.2.4 "Strippen" von Nitrocellulose-Blots	25
3.2.5 Durchlichtmikroskopie	26
3.2.6 Elektronenmikroskopie	26
3.2.7 Fluoreszenzmikroskopie	28

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>30</b>
4.1 Untersuchung der humanen Retinoblastomazellen (Y79) auf spezifische Proteine im Western-Blot	30
4.2 Differenzierung der Y79 Zellen mit Retininsäure	33
4.2.1 Dokumentation der differenzierten Y79 Zellen mit dem Durchlichtmikroskop	33
4.2.2 Dokumentation der Retininsäure behandelten Y79 Zellen mit dem Elektronenmikroskop	35
4.3 Untersuchung der Rattenpinealozyten auf spezifische Synapsenproteine in der Fluoreszenzmikroskopie	36
4.4 Darstellung der Ribbons im Elektronenmikroskop	37
<b>5 Diskussion</b>	<b>38</b>
5.1 Untersuchung zweier Zellkulturen auf Ribbonsynapsen-Proteine	38
5.2 Untersuchung zur Analyse von synaptischen Proteinen in Retinoblastomazellen (Y79)	39
5.3 Untersuchung zu synaptischen Proteinen in isolierten und kultivierten Pinealozyten	42
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>7 Danksagung</b>	<b>54</b>
<b>8 Lebenslauf</b>	<b>55</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 2.1: Schematische Darstellung der synaptischen Übertragung elektrischer und chemischer Synapsen
- Abb. 2.2: Funktionsmodell synaptischer Ribbons mit RIBEYE als wesentliche Protein-Komponente in präsynaptischen Nervenendigungen
- Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von RIBEYE, CtBP2, CtBP1 und der Phosphoglycerat-Dehydrogenase
- Abb. 2.4: Schematische Darstellung des humanen Gens, das RIBEYE und CtBP2 kodiert
- Abb. 4.5: Western-Blot Versuche zum Nachweis spezifischer Proteine in Y79 Zellen
- Abb. 4.6: Durchlichtmikroskopie der Y79 Zellen
- Abb. 4.7: Durchlichtmikroskopie der Y79 Zellen
- Abb. 4.8: Elektronenmikroskopie von Y79 Zellen
- Abb. 4.9: Elektronenmikroskopie von Y79 Zellen
- Abb. 4.10: Elektronenmikroskopie von Y79 Zellen
- Abb. 4.11: Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie von Pinealozyten

## **Tabellenverzeichnis**

- Tab. 3.1: Zellkulturen
- Tab. 3.2: Nährmedium
- Tab. 3.3: Zellkultivierung
- Tab. 3.4: Polyacrylamidgele und Western-Blots
- Tab. 3.5: Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie
- Tab. 3.6: Elektronenmikroskopie
- Tab. 3.7: Geräte
- Tab. 3.8: Primärantikörper
- Tab. 3.9: Sekundärantikörper
- Tab. 4.10: synapsenspezifische Proteine
- Tab. 4.11: Positivkontrollen
- Tab. 4.12: Ergebnisse Abbildung 4.5

## **1 Zusammenfassung**

Ribbonsynapsen, eine spezialisierte Form chemischer Synapsen, sind tonisch aktive Synapsen, die schnelle Exozytose synaptischer Vesikel über lange Zeiträume aufrechterhalten können. Für diese besonderen physiologischen Eigenschaften macht man die synaptischen Ribbons verantwortlich (Dowling, 1987; Sterling, 1989). Ribbonsynapsen stellen Hochleistungssynapsen in den sensorischen Organen (Auge, Ohr) des menschlichen Organismus dar (Kriegstein und Schmitz, 2003). Sie wurden in Photorezeptoren und bipolaren Zellen der Retina (Dowling, 1987; Sterling, 1998), in Sinneszellen (Haarzellen) des Innenohres und in melatoninsezernierenden Neuronen der Epiphyse (Smith und Sjöstrand, 1961; Hospu und Arstila, 1964; Jastrow et al., 1997; Lenzi et al., 1999) nachgewiesen. Die äußere plexiforme Schicht der Retina (OPL) besteht größtenteils aus Ribbonsynapsen. In der OPL kontaktieren die Photorezeptoren die sekundären Neurone (Bipolarzellen und Horizontalzellen) (Dowling, 1987; Sterling, 1998). Auch in Retinoblastoma-Tumoren wurden partiell Ribbons und Ribbonsynapsenformen beschrieben (Radnót et al., 1977 und Dickson et al., 1976). Sie entsprechen in ihrer Anordnung den Ribbonsynapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen der humanen Retina (Dickson et al., 1976).

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bezüglich der molekularen Charakterisierung von Ribbonsynapsen gemacht. Es fehlte jedoch ein geeignetes Zellkultursystem, in dem die Funktion der neu gefundenen Proteine physiologisch untersucht und experimentell gezielt manipuliert werden könnte.

Für diese Fragestellungen sollten möglicherweise geeignete Zellkultursysteme in vorliegender Untersuchung näher charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurden daher humane Retinoblastomazellen (Y79) und Pinealozyten Einzel-Zellkulturen (isolierte Pinealozyten) der Sprague Dawley Ratte auf die Ausbildung von Ribbonsynapsen untersucht. Die humanen Retinoblastomazellen (Y79) wurden mit Hilfe des Western-Blot auf für Ribbonsynapsen spezifische Synapsenproteine untersucht. Keiner der für Exozytose wichtigen synaptischen Proteine wurde in den Y79-Zellen gefunden. Durch den Zusatz von Retininsäure im Nährmedium der Retinoblastomazellen (Y79) wurde der Versuch einer weiteren Differenzierung der Retinoblastomazellen durch Retininsäure durchgeführt. Auch durch Retininsäure konnte keine synaptische Differenzierung beobachtet werden. Somit erschienen Y79 Retinoblastomazellen als nicht geeignetes System, um physiologische Untersuchungen zu Ribbonsynapsen durchführen zu können.

Dagegen konnte in den Pinealozyten Einzel-Zellkulturen der Sprague Dawley Ratte mittels Fluoreszenzmikroskopie das ribbonsynapsenspezifische Protein RIBEYE nachgewiesen werden. Durch die zusätzliche ultrastrukturelle Darstellung von Ribbons in den isolierten Pinealozyten mit Hilfe des Elektronenmikroskopes wurde die Existenz von

Ribbonsynapsen in den Pinealozyten Einzel-Zellkulturen gesichert. Dadurch konnte im Rahmen dieser Arbeit mit den Pinealozyten Einzel-Zellkulturen ein Kulturmodell zur möglichen weiteren funktionellen Charakterisierung der Ribbonsynapsen erschlossen werden.

## **1 Abstract**

Ribbon synapses, a specialized form of chemical synapses, are able to maintain fast exocytosis of neurotransmitter-containing synaptic vesicles for prolonged periods of time. They are tonically active. The presence of synaptic ribbons is important for these unique physiological properties (Dowling, 1987; Sterling, 1989), which is ensured by the presence of synaptic ribbons. Ribbon synapses are high-speed synapses in the sensory organs (eye, ear) of the human organism (Kriegstein and Schmitz, 2003). They are present in photoreceptors and bipolar cells of the retina (Dowling, 1987; Sterling, 1998), in cochlear hair cells of the ear, and in melatonin-releasing neurons of the epiphysis (Smith and Sjöstrand, 1961; Hospu and Arstila, 1964; Jastrow et al., 1997; Lenzi et al., 1999). The outer plexiform layer (OPL) of the retina largely exists of ribbon synapses. In the OPL photoreceptors make synaptic contacts with the horizontal cells and the bipolar cells (Dowling, 1987; Sterling, 1998). Also in retinoblastoma tumors, ribbons and ribbon synapses have been observed (Radnót et al., 1977 and Dickson et al., 1976). Their arrangement corresponds to the ribbon synapses between photoreceptors and bipolar cells of the human retina (Dickson et al., 1976).

In the last years, many progresses were made concerning the molecular characterization of ribbon synapses. But still missing was a cell culture system that allowed the physiological analysis and experimental manipulation of these new proteins. The aim of the present study was to characterize possible experimental systems that could be used for that purpose.

For this reason human retinoblastoma cells (Y79) and isolated pinealocytes of the Sprague Dawley rat were investigated. Human retinoblastoma cells (Y79) were tested by western-blot for the presence of ribbon synapses-typical proteins, but none of them could be detected. By means of the addition of retinoic acid to the nutrient medium of the retinoblastoma cells (Y79), the test of a further differentiation of the retinoblastoma cells was carried out. Also, treatment of Y79 Cells with retinoic acid could induce synaptic differentiation of the Y79 retinoblastoma cells. Therefore, retinoblastoma cells are not suitable to analyze physiological properties of ribbon synapses.

In contrast, the synaptic ribbon-specific protein RIBEYE could be detected in single cultures of pinealocytes of the Sprague Dawley rat. Additionally, electronmicroscopy demonstrated the presence of synaptic ribbons in cultured pinealocytes. Therefore, isolated pinealocytes from the rat pineal gland could be a useful system to analyze physiological properties in ribbon synapses.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Signalübertragung durch konventionelle Synapsen**

Informationen aus der Umwelt in Form von Sinnesreizen nimmt der Organismus mit Hilfe von reizspezifischen Sinneszellen wahr und wandelt diese in elektronische Impulse um. In den Neuronen des zentralen Nervensystems, werden die Sinnesreize als elektronische Impulse weitergeleitet und verarbeitet. Dabei wird das Signal innerhalb des Neurons über die Dendriten an den Zellkörper und schließlich zum Axon weitergeleitet. An der spezialisierten Axonendigung, der präsynaptischen Nervenendigung, kommt es zur Übertragung der Erregung an eine Effektorzelle. Diese Signalübertragung vom Axonende zur Effektorzelle wird durch Synapsen gewährleistet. Hier kommt es zur keulen- oder bläschenartigen Aufweitung des Axonendes (Abb.2.1).

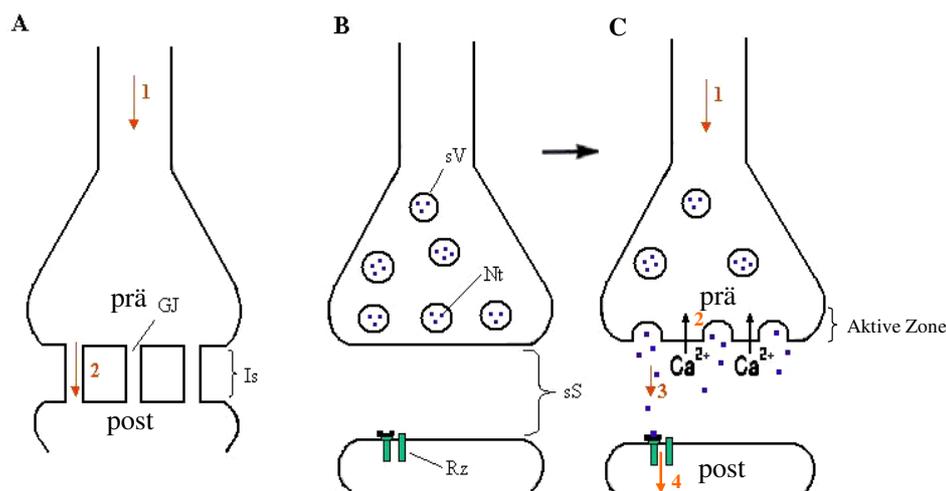


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der synaptischen Übertragung elektrischer (A, Pfeile 1 und 2) und chemischer Synapsen (B und C, Pfeil 1). prä= präsynaptische Membran, post= postsynaptische Membran, GJ= Gap Junctions, Is= Interzellulärspalt, sS= synaptischer Spalt, sV= synaptische Vesikel, Nt= Neurotransmitter, Rz= Rezeptor (Übersicht Kandel, Schwartz und Jessell, 1996; in veränderter Form)

Bei der chemischen Synapse (Abb. 2.1, B und C) befindet sich im Gegensatz zur elektrischen Synapse (Abb. 2.1, A) keine direkte zyttoplasmatische Verbindung. Die Erregungsweiterleitung erfolgt durch das Freisetzen von chemischen Botenstoffen, den Neurotransmittern in einem als Exozytose benannten Prozess (zur Übersicht, siehe Südhof, 2004). Die Neurotransmitter befinden sich im präsynaptischen Anteil, verpackt in synaptischen Vesikeln. Die im präsynaptischen Axon ankommenden Erregungsimpulse

führen zur Membrandepolarisation und Aktivierung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$  - Kanälen, wodurch es zu einem erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$  -Einstrom kommt. Die lokale Transmitterausschüttung erfolgt an der aktiven Zone der präsynaptischen Membran; dem Bereich, in dem Vesikel und präsynaptische Membran verschmelzen, um die Botenstoffe über Exozytose in den synaptischen Spalt zu geben. Die aktive Zone liegt dem postsynaptischen Rezeptorapparat gegenüber (Südhof, 2004; Jahn et al., 2003). Die Transmitter diffundieren anschließend durch den synaptischen Spalt und legen dabei eine Strecke von ca. 20-40 nm zurück, um an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran zu binden. Durch die Transmitterbindung an die Rezeptoren werden diese aktiviert und es kommt zu definierten Veränderungen an der Zielzelle. Diese Veränderung kann die Öffnung oder Schließung bestimmter Ionenkanäle in der Membran beinhalten (sogenannte „ionotrope“ Rezeptoren) oder in intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden eingreifen („metabotrope“ Rezeptoren). Dadurch kommt es zur Ladungsverschiebung, die erregend (depolarisierend) oder hemmend (hyperpolarisierend) sein kann. Die Wirkung ist von der Art der postsynaptischen Rezeptoren abhängig, an die die Transmitter binden. Durch Aneinanderreihen der einzelnen Schritte (Transmitterausschüttung und Rezeptorbindung) kommt es - im Gegensatz zu den elektrischen Synapsen - bei den chemischen Synapsen zu einer synaptischen Latenz; einer synaptischen Verzögerung von ca. 0,5 ms.

Vorteil der chemischen Synapsen ist die Verstärkung und Modifikation von Signalen. Bei der Exozytose von nur einem Vesikel werden mehrere tausend Transmitter freigesetzt, von denen manchmal schon die Bindung von zwei Molekülen an einen hochaffinen und aktiven Rezeptor ausreicht, um die Erregung weiterzuleiten.

## **2.2 Ribbonsynapsen**

Die Ribbonsynapsen sind tonisch aktive Hochleistungssynapsen, die in höchst entwickelten sensorischen Organen des menschlichen Organismus entdeckt wurden (Kriegstein und Schmitz, 2003). Sie zählen zu den chemischen Synapsen, unterscheiden sich jedoch in Struktur und Aktivität von den konventionellen chemischen Synapsen. Die Ribbonsynapsen wurden in Photorezeptoren und Bipolarzellen der Netzhaut (Retina) (Dowling, 1987; Sterling, 1998), in Haarzellen des Innenohres und in melatoninsezernierenden Neuronen der Epiphyse gefunden (Smith und Sjöstrand, 1961; Hopsu und Arstila, 1964; Jastrow et al., 1997; Lenzi et al., 1999). Charakteristisch für diese Synapsen sind die im präsynaptischen Teil befindlichen Bänder (Ribbons), bei denen es sich um blattartige Organellen mit lamellärer Organisation handelt (Dowling, 1987; Sterling, 1998). In den präsynaptischen Nervenenden der Photorezeptoren sind

diese Ribbons senkrecht zur aktiven Zone der Plasmamembran, am Ort der Exozytose synaptischer Vesikel, angeordnet (Gray und Pease, 1971; Schaeffer et al., 1982). Ihr lamellärer Aufbau ermöglicht den Ribbons, eine Vielzahl von Vesikeln zu beiden Seiten zu binden (s. Abb. 2.2). Während an die aktive Zone der Plasmamembran nur das Andocken von ca. 130 Vesikeln zulässt, ermöglicht die große Oberfläche der Ribbons das Andocken von mehr als 600 synaptischen Vesikeln (Parsons et al., 1994; Rieke und Schwartz, 1996; von Gersdorff et al., 1996). Es wird angenommen, dass durch diese hohe Verfügbarkeit der gebundenen Vesikel ihr schneller und gezielter Transport zur aktiven Zone und die nachfolgende tonische Exozytose gewährleistet werden. Der Ablauf des Vesikeltransportes könnte demnach ähnlich eines Förderbandes ablaufen, das die Vesikel vom Ribbon zur aktiven Zone der präsynaptischen Membran transportiert (Schmitz et al., 2000) (Abb. 2.2).

Es wurde beobachtet, dass in Ribbonsynapsen eine „tonische“ permanente Transmitterfreisetzung stattfindet (Dowling, 1987; Sterling, 1989), die im Gegensatz zur phasischen Transmitterfreisetzung konventioneller Synapsen steht. Im Vergleich zur maximalen Ausschüttung hippocampaler Synapsen von nur etwa 20 Vesikel pro Sekunde (Stevens und Tsujimoto, 1995) kann das Freisetzen der Transmitter in der Ribbonsynapse mit mehr als 500 Vesikel pro Sekunde (Parsons et al., 1994; Rieke und Schwartz, 1996; von Gersdorff et al., 1996) wesentlich schneller stattfinden. Diese physiologische Eigenschaft beruht auf einer kontinuierlichen Exozytose synaptischer Vesikel (Dowling, 1987; Sterling, 1989), die durch die Existenz synaptischer Ribbons ermöglicht wird.

Ausgelöst wird die Exozytose dieser Vesikel wie bei konventionellen Synapsen von einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der jedoch zu einer wesentlich höheren Exozytose-Rate führt. Bei mäßigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom exozytieren pro Ribbon bis zu 50 Vesikel pro Sekunde und bei hohem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom mehr als 500 Vesikel pro Sekunde (Parsons et al., 1994; Rieke und Schwartz, 1996; von Gersdorff et al., 1996). Im Vergleich dazu beträgt die maximale Ausschüttung hippocampaler (konventioneller) Synapsen nur etwa 20 Vesikel pro Sekunde (Stevens und Tsujimoto, 1995).

### Arbeitshypothese

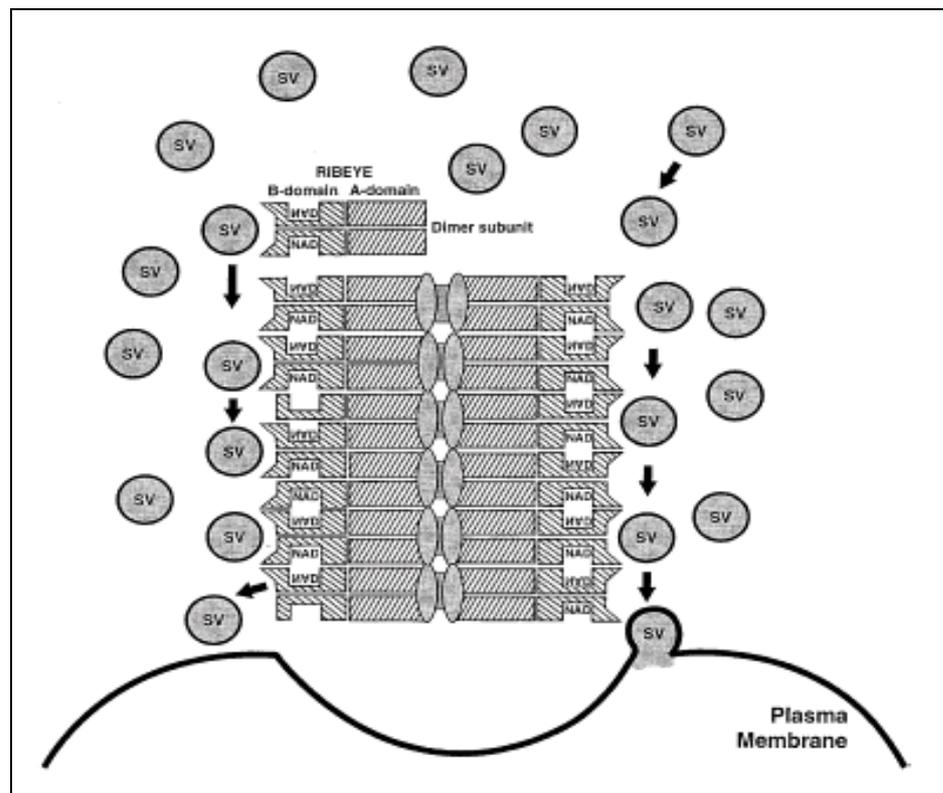


Abb. 2.2: Funktionsmodell synaptischer Ribbons mit RIBEYE als wesentliche Protein-Komponente in präsynaptischen Nervenendigungen (nach Schmitz et al., 2000); SV=synaptische Vesikel

Die hohe Ausschüttungsrate bei Ribbonsynapsen wird wahrscheinlich dadurch ermöglicht, dass die Ribbons als eine Art Reservoir dienen, welches ständig zur Exozytose bereitstehende Vesikel zur Verfügung stellt und in der Lage ist, unverzüglich mit der Membran zu fusionieren. Die schnelle Exozytosefähigkeit erklärt die Bildung und Nutzung von Ribbonsynapsen in den hoch entwickelten Sinnesorganen Auge und Ohr (Schmitz et al., 2000).

Untersuchungen des strukturellen Aufbaus von Ribbonsynapsen durch immunzytochemische Studien haben gezeigt, dass die Bestandteile von Ribbonsynapsen im Allgemeinen ähnlich denen der konventionellen Synapsen sind (Ullrich und Südhof, 1994; Brandstätter et al., 1996a, 1996b; von Kriegstein et al., 1999). Obwohl es Unterschiede in Bau und Funktion zwischen Ribbon- und konventionellen Synapsen gibt (Morgans et al., 1996; Nachman-Clewner et al., 1999), scheinen die Vesikel aus den gleichen Proteinen gebildet zu werden. Auch die  $Ca^{2+}$ - Auslösung als auch der Mechanismus für die Fusion der Vesikel mit der Membran scheinen der Gleiche zu sein, wie in konventionellen Synapsen (Schmitz et al., 2000). Für die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran zeigen sich relativ wenig Unterschiede zwischen Ribbonsynapsen und

konventionellen Synapsen; Gebrauch von Syntaxin 3 (Ribbonsynapsen) im Gegensatz zu Syntaxin 1 der konventionellen chemischen Synapse (Morgans et al., 1996) und L-Typ-Calciumkanäle anstatt N-, P/Q- und R-Typ-Calciumkanäle für den Calciuminflux (Heidelberger und Matthews, 1992; Nachman-Clewner et al., 1999).

Die Ribbons selbst scheinen sich wahrscheinlich nicht aus bekannten Bestandteilen konventioneller Synapsen entwickelt zu haben. Zwar ähnelt das Zytoskelett der Ribbons dem Zytoskelett konventioneller Synapsen, klassische Zytoskelettproteine und deren typische Filamente konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden. Daraus lässt sich schließen, dass für den Aufbau und die Funktion der synaptischen Ribbons Proteine verantwortlich sind, die zu einer neuen Klasse von Proteinen gehören (Schmitz et al., 2000).

Klassische Ribbonsynapsen sind eine spezialisierte Form von Synapsen, die ausschließlich in Vertebraten vorkommen (Dowling, 1987; Sterling, 1998). Bei Invertebraten, wie z.B. der *Drosophila* Fliege, wurden dem Ribbon ähnliche Strukturen in T-Form in präsynaptischen Zellen entdeckt, die möglicherweise analoge Funktionen besitzen. Diese T-Form-Strukturen wurden in Nervenendigungen von Photorezeptoren, in neuromuskulären Verbindungen und in anderen Synapsen gefunden (Trujillo-Cenoz, 1972; Wan et al., 2000). Diese Strukturen der Invertebraten sind aber wahrscheinlich von den Ribbons der Vertebraten zu unterscheiden. Der Unterschied liegt sowohl in der Form als auch im histologischen Aufbau. Während die T-Form-Strukturen direkten Kontakt zur aktiven Zone haben, berühren die Ribbons bei Vertebraten die aktive Zone nicht.

### **2.3 RIBEYE, Hauptbestandteil synaptischer Ribbons**

Im Ribbon befindliche Proteine zu charakterisieren war für die weitere Analyse des strukturellen Aufbaus und der Funktionsweise der synaptischen Ribbons von Bedeutung. Erste Erkenntnisse wurden durch Isolieren und Reinigen synaptischer Ribbons aus der Rinderretina erzielt (Schmitz et al., 1996). Aus dieser gereinigten Ribbonfraktion wurde die Bande, die sich am stärksten angereichert hatte, ansequenziert und unter Einsatz dieser Peptidfrequenz die cDNA dieses Proteins kloniert. Dieses neue Protein wurde im Bezug auf die synaptischen **Ribbons** und dem Gewebeursprung (**Eye**) **RIBEYE** genannt (Schmitz et al., 2000). Mit Hilfe weiterer Untersuchungen von Rinder-, Ratten- und menschlichen Retina konnte gezeigt werden, dass dieses ca. 120 kDa große Protein RIBEYE aus zwei Domänen besteht; einer einmalig vorkommenden aminoterminalen A-Domäne (565 Aminosäuren) und einer carboxyterminalen B-Domäne (420 Aminosäuren) (Schmitz et al., 2000).

Die B-Domäne ist mit dem nukleären Protein CtBP2 (**C**-**t**erminales-**B**indungs-**P**rotein für das Adenovirus E1A-Protein) identisch, welches zusammen mit CtBP1 zur Familie der

transkriptionellen Repressoren gehört (Schaeper et al., 1995; Katsanis und Fisher, 1998; Poortinga et al., 1998; Turner und Crossley, 1998; Zhang und Levin, 1999). Im Gegensatz dazu ist die A-Domäne spezifisch für Ribbons. Gegenwärtig wurden noch keine homologen Proteine in der Datenbank registriert (Schmitz et al., 2000).

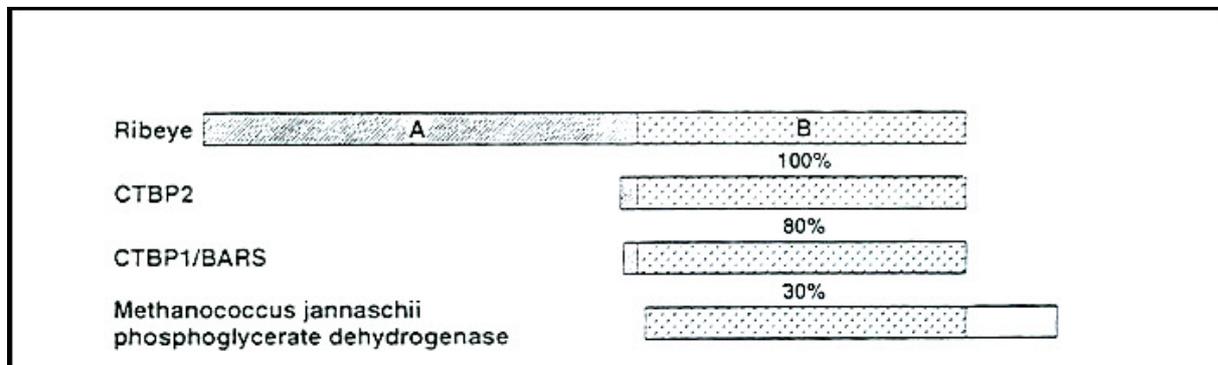


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von RIBEYE, CtBP2, CtBP1 und der Phosphoglycerat-Dehydrogenase. RIBEYE besteht aus zwei Domänen, aus einer einmalig vorkommenden A-Domäne und einer B-Domäne, identisch zu CtBP2 und homolog zur Phosphoglycerat-Dehydrogenase (Abb. aus Schmitz et al., 2000).

Die B-Domäne bindet homolog zu CtBP1 und CtBP2 das Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) mit großer Affinität (Aminosäuren für Bindung GXGXXG-18-D, Aminosäuren für Katalyse R-30-E-19-H; Schmitz et al., 2000).  $\text{NAD}^+$  dient neben seiner Funktion im Energiestoffwechsel auch als Substrat für Enzyme, die eine Spaltung zwischen der ADP-Ribose und dem Nikotinamid sowie den Transfer der ADP-Ribosegruppe auf eine Aminosäure katalysieren (Jacobson et al., 1989). Aus diesen Erkenntnissen läßt sich schließen, dass RIBEYE und CtBP's zur Familie der  $\text{NAD}^+$ -abhängigen 2-Hydroxyacid-Dehydrogenasen gehören und demnach enzymatische Funktionen besitzen. Durch unterschiedliche Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass RIBEYE kein Klon-Artefakt ist, sondern es sich hier um ein Hybridprotein handelt, das aus einer neuen N-terminalen Region und aus einem schon vorhandenen Protein (CtBP2) mit neuer Funktion besteht (Schmitz et al., 2000). Diese Aussage wurde durch eine Vielzahl von Experimenten mit spezifischen Antikörpern gegen die A- und B-Domäne des RIBEYE in verschiedenen Geweben des Rindes (wie Retina, Gehirn, Herz, Leber, Niere, Lunge und Milz) bestätigt. RIBEYE fehlt in der genomischen Sequenz der *Drosophila*, so dass RIBEYE evolutionär ein relativ junges Protein zu sein scheint (Schmitz et al., 2000). Bei den Versuchen mit den spezifischen Antikörpern gegen die A-Domäne wurde ausschließlich in der Retina das ca. 120 kDa-Protein RIBEYE lokalisiert. Der spezifische Antikörper gegen die B-Domäne erkennt zusätzlich in allen untersuchten Geweben ein ca. 50 kDa-Protein (entspricht CtBP2). Untersuchungen der genomischen Sequenz sowohl von RIBEYE als auch von CtBP2 zeigen, dass beide Proteine von dem selben Gen codiert, aber von zwei unterschiedlichen Promotoren aus transkribiert werden (Abb. 2.4). Dadurch entstehen zwei unterschiedliche Transkriptionsprodukte, die zur Synthese unterschiedlicher Proteine

führen, RIBEYE nur in speziellen Geweben, z.B. in der Retina, und CtBP2 in allen Geweben (Schmitz et al., 2000).

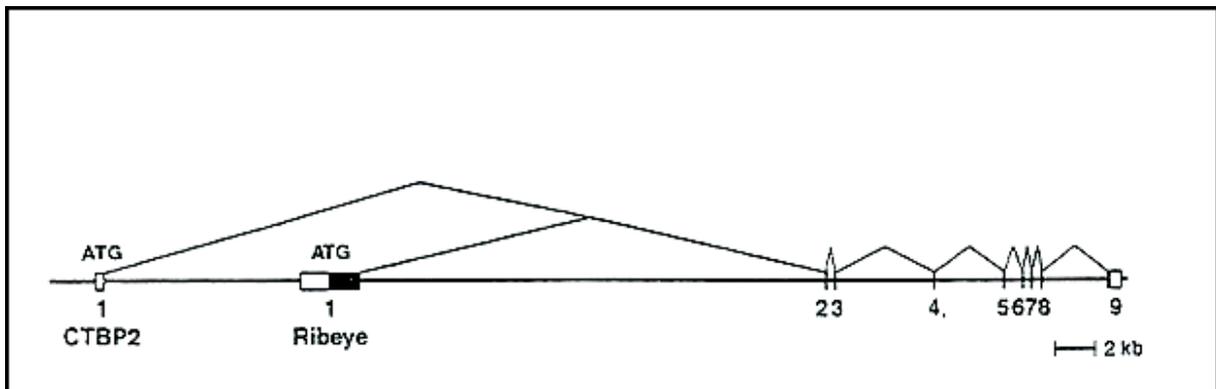


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des humanen Gens, das RIBEYE und CtBP2 codiert. RIBEYE und CtBP2 werden von demselben Gen codiert, aber von unterschiedlichen Promotoren aus transkribiert. (Abb. aus Schmitz et al., 2000)

Bisherige Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die synaptischen Ribbons aus einem stabilen Proteinaggregat bestehen und das Protein RIBEYE ein wesentlicher Bestandteil dessen ist. Für die Struktur, Stabilisierung und die Bildung von Aggregaten ist vermutlich die A-Domäne des RIBEYE verantwortlich. Die B-Domäne lässt durch ihre Lokalisation an der Oberfläche des Ribbon darauf schließen, eine Rolle bei der Vesikelbindung zu spielen (Schmitz et al., 2000) (siehe Abb. 2.1). Untersuchungen im Zebrafisch unterstützen die Vermutung, dass RIBEYE das Hauptprotein der Synaptic Ribbons darstellt (Wan et al., 2005). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass das mit RIBEYE verwandte Protein CtBP1 ebenfalls eine Komponente der Ribbons darstellt (tom Dieck et al., 2005).

## **2.4 Humane Retinoblastomazellen Y79**

Das aus embryonalen Netzhautzellen entstehende Retinoblastom ist der häufigste maligne intraokuläre Tumor des Kindesalters. Die Entstehung des Tumors basiert auf genetisch veränderten Netzhautzellen, den sogenannten Retinoblasten. Hier liegt häufig eine Veränderung eines retinalen Tumorsuppressorgens, des Retinoblastomagens auf Chromosom 13 des Menschen vor. Diese kann durch Spontanmutation oder durch autosomal-dominante Vererbung auftreten (Bühling et al., 2000).

In 3 von 29 Retinoblastomen (10,3%) konnten Photorezeptor-ähnliche Zelldifferenzierungen, so genannte Fleurettes, nachgewiesen werden (Radnót et al., 1975). Bei diesen Fleurettes handelt es sich um partiell differenzierte asymmetrische Tumor-Zell-Formationen mit Ausläufern ähnlich denen von Photorezeptoren (Dickson et al., 1976), deren zytoplasmatische Struktur in ihrem Aufbau humanen Photorezeptoren

nicht erkrankter Retina ähnlich ist (Dickson et al., 1976; del Cerro et al., 1992). Es finden sich hier synaptische Vesikel (Choux et al., 1972), Neurotubuli (Albert et al., 1970), viele Mitochondrien (Dickson et al., 1976) und lamelläre Strukturen (Radnót et al., 1975, Ohkuma et al., 1974). Diese zuletzt genannten lamellären Strukturen stellen synaptic Ribbons dar (Dickson et al., 1976). Somit erscheint hier eine synaptische Anordnung, die identisch zu den Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen der normalen humanen Retina ist. Dickson et al. (1976) nehmen an, dass die Fleurettes ein Zwischenstadium zur Differenzierung des Retinoblastoms in Richtung Photorezeptoren darstellen. Diese Differenzierung im Retinoblastom beginnt mit der Rosette (Flexner, 1891; Wintersteiner, 1897), einem knollenförmigen vesikelgefüllten Sack, der sich zu Fleurettes weiterentwickelt, um später eine funktionstüchtige Synapse zu bilden. Eine weitere Annahme ist, dass der Vorgang dieser Entwicklung bzw. die photorezeptorische Differenzierung des Retinoblastoms ähnlich der normalen humanen embryonalen photorezeptorischen Entwicklung ist (Dickson et al., 1976). Zudem wurde die Expression von Photorezeptor spezifischen Proteinen in kultivierten Retinoblastomazellen beobachtet (Lerner et al., 2001), sowie Stammzellcharakteristika in einer Subpopulation von Retinoblastomazelllinien beobachtet (Seigel et al., 2005).

Vorausgegangene Untersuchungen haben eine wichtige Rolle der Retininsäure (RA) bei Wachstum und Entwicklung von Zellen des zentralen Nervensystems festgestellt (Maden und Holder, 1992), wobei der Mechanismus der Retininsäure - Wirkung auf gesunde oder pathologisch veränderte Retina (Retinoblastom) noch weitgehend unbekannt ist. Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass Retininsäure über spezifische Rezeptoren an den Zellen des zentralen Nervensystems wirkt und über diese Rezeptoraktivierung Genexpressionen resultieren (Aoudjit et al., 1994; Segars et al., 1993). Für die verändernde Wirkung der Retininsäure auf Wachstum und Entwicklung der Retinoblastomazellen wurde das Kulturmedium der Retinoblastomazellen mit Retininsäure versetzt und die Zellen in diesem kultiviert. Die Konzentration der Retininsäure im Kulturmedium sollte dabei nicht 10  $\mu\text{M}$  überschreiten und die Kultivierung auf 10 Tage beschränkt sein. Bei Überschreitung der Konzentration oder Kultivierungszeit kommt es zu einer toxischen Wirkung auf die Retinoblastomazellen, die zu einer Apoptose (Zelltod) führt. Bei Kultivierung bis zu 10 Tagen mit einer Retininsäurekonzentration von maximal 10  $\mu\text{M}$  kommt es zu keiner signifikanten Apoptose (Conway et al., 1997).

Es wurde beschrieben, dass humane Retinoblastomazellen (Y79) in Flüssigkulturen ohne Retininsäure - Zusatz oder mit Retininsäurefreien DMSO (Dimethyl Sulfoxide) als Zusatz, runde, in Aggregaten zusammenliegende Kolonien ausbilden. Mit Retininsäure im Kulturmedium wurden die Retinoblastomazellen (Y79) kleiner und die Anzahl der Zellen in den einzelnen Kolonien nimmt ab. Die Kolonie-Päckchen werden weniger dicht mit

Zellen besetzt und es entwickeln sich feine Plasmamembranveränderungen. Es kommt zu Neuriten - ähnlichen Ausläufern an den Zellen, die sich zwischen den Kolonien ausbilden und diese zum Teil auch miteinander verbinden (Conway et al., 1997). Die Ausbildung dieser Veränderung kann zwischen dem 3. bis 10. Tag nach Retininsäure - Zusatz lichtmikroskopisch beobachtet werden. Zum Teil wurden solche Neuriten - ähnliche Veränderungen auch bei den Kulturen ohne Retininsäure beobachtet, jedoch waren sie hier wesentlich seltener und in ihrer Form kleiner und kürzer ausgebildet (Conway et al., 1997).

## **2.5 Ribbonsynapsen in Pinealozyten**

Im histologischen Aufbau besteht die Epiphyse aus Parenchym, Pigmentzellen, Gliafasern und Bindegewebe. Das Parenchym besteht aus Pinealzellen (*Pinealozyten*) und Interstitialzellen (Thomas und Schmid, 2001). Pinealozyten sind endokrine Zellen, die Melatonin synthetisieren und es in einer zirkadianen Rhythmik ausschütten (nachts vermehrte Exozytose von Melatonin, tagsüber verminderte Exozytose von Melatonin) (Axelrod, 1974; Klein, 1985; Reiter, 1991; Korf et al., 1996). Es ist bekannt, dass Pinealozyten neben Melatonin auch L-Glutamat mittels Exocytose ausschütten. Bei der Exocytose wird L-Glutamat, das in synaptischen Vesikeln gespeichert wird, mittels Exozytose freigesetzt (Moriyama und Yamamoto, 1995 a, 1995 b; Yamada et al., 1996 a, 1996 b; Yatsushiro et al., 1997).

Die Ribbons in den Pinealozyten werden als stabförmige Gebilde im Elektronenmikroskop sichtbar. Sie haben eine Länge von ca. 150-200 nm, eine Dicke von 30-40 nm und sind von synaptischen Vesikeln umgeben (Jastrow et al., 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Stabform aus Ultradünnschnitten einer ursprünglichen Tellerform resultiert (Sjöstrand, 1958; McCartney und Dickson, 1985; Rao Mikrotznik et al., 1995). Dreidimensionale Rekonstruktionen zeigten, dass manche dieser Tellerformen flach und manche gedreht oder auch schüsselförmig sind (Jastrow et al., 2004). Die Ribbons befinden sich meist senkrecht und in unmittelbarer Nähe zur präsynaptischen Membran der Zelle. Es wurden auch einige Ribbons beobachtet, die nicht in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran liegen, sondern weiter von dieser distanziert sind (Jastrow et al., 1997). Die Länge der Ribbons ist von der Tageszeit abhängig. Nachts nehmen sie an Länge zu, während sie zur Mittagszeit kürzer sind. Diese Längenvariationen haben wenig Einfluss auf die Grundform der Ribbons, diese bleibt- wie auch die Dicke- immer gleich (Jastrow et al., 1997).

Während sich die Ribbonsynapsen in den Photorezeptoren und bipolaren Zellen der Retina und in den cochlearen Haarzellen des Ohres zu essentiellen Komponenten der

zwei sensorischen Systeme der Vertebraten (Hören und Sehen) entwickelt haben, ist die Funktion der Ribbonsynapsen in den Pinealozyten noch ungeklärt (Schmitz et al., 2000).

## **2.6 Ziel der Arbeit**

Durch vorausgegangene Untersuchungen der Ribbonsynapsen konnten neue Proteine wie das RIBEYE (Schmitz et al., 2000) nachgewiesen werden. Hierbei wurde das RIBEYE als wesentlicher struktureller und funktioneller Bestandteil synaptischer Ribbons charakterisiert. Zur funktionellen Charakterisierung dieser Proteine stehen leider noch keine geeigneten Zellkultursysteme zur physiologischen Analyse und experimenteller Manipulation dieser Proteine zur Verfügung.

Ziel dieser Arbeit war es, Zellkulturmodelle zur funktionellen Untersuchung von RIBEYE zu gewinnen. Als ein mögliches Kultursystem stellten sich die humanen Retinoblastomazellen (Y79) dar, da gezeigt wurde, dass Retinoblastome zum Teil eine Differenzierung in Richtung Photorezeptoren, wie sie in der humanen Retina zu finden sind, aufweisen (Dickson et al., 1976). Zusätzlich wurde durch vorausgehende Untersuchungen gezeigt, dass der Zusatz von Retininsäure im Kulturmedium zu einer Differenzierung der Retinoblastomazellen mit Ausbildung Neuriten-ähnlicher Fortsätze führt (Conway et al., 1997). Es sollte untersucht werden, ob sich in Retinoblastomazellen bzw. in durch Retininsäure differenzierten Retinoblastomazellen eine Ausstattung mit synaptischen und ribbonsynaptischen Proteinen nachweisen lässt. Hierzu wurden die Immunfluoreszenz und das Western-Blot-Verfahren angewendet.

Als ein weiteres alternatives Modellsystem sollten dissoziierte Pinealozyten der Sprague Dawley Ratte analysiert werden. Es ist bekannt, dass Pinealozyten Ribbonsynapsen besitzen. Deshalb sollten aus diesem Organ Einzel-Zellkulturen angelegt werden, um mit den oben beschriebenen Methoden zu überprüfen, ob auch dissoziierte Pinealozyten Ribbonsynapsen ausbilden und somit ein geeignetes Exozytosemodell zur Untersuchung von Ribbonsynapsen darstellen.

## **3 Material und Methodik**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Verwendete Zellkulturen**

Material	Bezugsquelle/ Publikation
humane Y79 Retinoblastomazellen	Conway et al., 1997 Quelle : ATCC
Pinealozyten (Epiphysenzellen)	Gewinnung aus drei Wochen alten Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) gewonnen.
COS Zellen (Fibroblasten)	Gluzman, 1981

Tab. 3.1: Zellkulturen

#### **3.1.2 Nährmedium**

Material	Bezugsquelle
Dulbecco's MEM -Sodium Pyruvate -4500 MG/L Glucose -Pyridoxine mit 10 % Foetal Bovine Serum (Foetales Kälberserum) und 2mM Glutamax-1	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Aufbewahrung bei 4 °C
Foetal Bovine Serum (FBS)	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Aufbewahrung bei -80°C

Tab. 3.2 Nährmedium

### **3.1.3 Puffer, Chemikalien und Lösungen**

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

#### **3.1.3.1 Für Zellkultivierung**

Material	Bezugsquelle und Zusammensetzung
Collagenase 0,1 %	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Aufbewahrung bei -20 °C
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Gelatine	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Aufbewahrung bei -20 °C
5x PBS-Puffer (Phosphate-buffered saline)	40 g NaCl 1 g KCL 7,2 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit Aqua dest. (destilliertes Wasser) auf 1 Liter auffüllen. 1:5 Verdünnung entspricht der Arbeitslösung
Trypsin 0,25 %	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland Aufbewahrung bei -20 °C

Tab. 3.3: Zellkultivierung

## 3.1.3.2 Für Polyacrylamidgele und Western-Blots

Material	Bezugsquelle und Zusammensetzung
1x Elektrophoresepuffer	3,03 g Tris-hydroxymethyl- ammoniummethan (Tris) 14,4 g Glycin 1,0 g SDS mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen
Western-Blot-Transferpuffer	15,125 g Tris 72,05 g Glycin 1000 ml Methanol mit Aqua dest. auf 5 Liter auffüllen
4x Ladepuffer für Polyacrylamidgele	1,6 g SDS 4 ml $\beta$ -Mercaptoethanol 2 ml Glycerol 2 ml 1 M Tris, pH 7,0 4 mg Bromphenolblau 2 ml Aqua dest. Aufbewahrung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Proteinmolekulargewichtsstandard Roti <sup>®</sup> - Mark Standard	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Aufbewahrung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
Ponceau S-Farblösung	30 g Trichloressigsäure 5 g Ponceau S mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen
5 % Magermilch	5 g Magermilchpulver in 100 ml PBS Aufbewahrung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Enhanced Chemolumineszent (ECL) -Lösung	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

Tab. 3.4: Polyacrylamidgele und Western-Blots

3.1.3.3 Für Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie

Material	Bezugsquelle
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Biosciences GmbH, Bad Soden, Deutschland
n-Propyl gallate (NPG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X 100	Serva, Heidelberg, Deutschland

Tab. 3.5: Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie

3.1.3.4 Für Elektronenmikroskopie

Material	Bezugsquelle
O <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (Osmiumtetroxid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat	Serva, Heidelberg, Deutschland
1,2 Epoxypropan	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Epon (Epoxy- Einbettungsmittel)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Tab. 3.6: Elektronenmikroskopie

**3.1.4 Geräte**

Material	Bezugsquelle
Hera cell 240 (Zellinkubator)	Heraeus Instruments, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Deutschland
Blot-Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Material	Bezugsquelle
Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Elektronenmikroskop „EM 900“	Zeiss, Deutschland
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop Axioplan 2	Zeiss, Deutschland
Ultramicrotom „Ultra E“	Leica Camera GmbH, Solms, Deutschland

Tab. 3.7: Geräte

### **3.1.5 Verwendete Primärantikörper**

Antikörper	Eigenschaft	Bezugsquelle/Publication
anti-Rhodopsin	Monoklonaler (Maus-Antikörper)	Geschenk von R.S. Molday
anti-RIBEYE U2656	Polyklonaler (Kaninchen- Antikörper)	Schmitz et al., 2000
anti-SNAP-25 (Clone 71.2)	Monoklonaler (Maus-Antikörper)	Walch-Solimena et al., 1995
anti-SV2A (Kaninchenantiserum 915)	Polyklonaler (Kaninchen- Antikörper)	von Kriegstein et al., 1999
anti-Synaptobrevin 2 (Clone 69.1)	Monoklonaler (Maus-Antikörper)	Edelmann et al., 1995
anti-Synaptophysin 1 (Clone 7.2)	Monoklonaler (Maus-Antikörper)	Jahn et al., 1985
anti-Synaptotagmin 1 (Clone 41.1)	Monoklonaler (Maus-Antikörper)	Brose et al., 1992

Antikörper	Eigenschaft	Bezugsquelle/Publication
anti-Syntaxin 1/3 (clone 78.2)	Monoklonaler (Maus-Antikörper)	Von Kriegstein et al., 1999
anti-Tubulin	Monoklonaler (Maus-Antikörper)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
anti-C4 Aktin	Monoklonaler (Maus-Antikörper)	ICN
anti-Anti RE alpha	Polyklonaler-Antikörper bezogen gegen das aminoternale Drittel der B-Domäne von RIBEYE	Arbeitsgruppe Schmitz

Tab. 3.8: Primärantikörper

### **3.1.6 Verwendete Sekundärantikörper**

Antikörper	Eigenschaft	Bezugsquelle/Publication
Goat-Anti-Mouse Pox-IgG-AK (Pox, Peroxidase)	Ziege-Antikörper gegen Maus-Immunglobuline gerichtet, mit Peroxidase gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, USA
Goat-Anti-Rabbit Pox-IgG-AK (Pox, Peroxidase)	Ziege-Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet, mit Peroxidase gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore, USA
Goat anti-mouse Cy3/Cy2	Ziege-Antikörper gegen Maus-Immunglobuline gerichtet, mit Fluoreszenzfarbstoff Cy3 oder Cy2 gekoppelt	Biotrend, Köln, Deutschland
Goat anti-rabbit Cy2/Cy3	Ziege-Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet, mit Fluoreszenzfarbstoff Cy3 oder Cy2 gekoppelt	Biotrend, Köln, Deutschland

Tab. 3.9: Sekundärantikörper

## **3.2 Methodik**

### **3.2.1 Zellkulturen**

Die Zellkultivierung der Y79-Zellen erfolgte in sterilen verschließbaren bis zu 15ml fassenden Flaschen. Die Y79 Zellen und COS Zellen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> versetzter Luft in einem Inkubator gehalten und regelmäßig (alle 2-3 Tage) mit frischem Zellkulturmedium versorgt. Bei diesem Vorgang wurden 14,5 ml des „alten“ Mediums entfernt und durch „frisches“ Medium ersetzt.

Die eingesetzten Pinealozyten wurden durch das Verfahren von Yamada et al. (1996 a, b) in Form von Primärkulturen gewonnen. Dazu wurden die Epiphysen, wie nachfolgend beschrieben, isoliert. Die Ratten wurden nach tiefer Anästhesie mit Diethylether durch zervikale Dislokation und nach folgender Dekapitation getötet. Nachdem der Rattenkopf vom Körper abgetrennt wurde, wurde das Fell vollständig entfernt. Anschließend wurde die Kalotte eröffnet und vom Gehirn abpräpariert. Die Epiphyse befindet sich zwischen den beiden Großhirnhemisphären und konnte mit einer feinen Pinzette entnommen werden. Nach Überführen der Epiphyse in ein steriles Reagenzglas erfolgte eine 30 Minuten lange Inkubation bei 37 °C in 0,1 % Collagenase in PBS. Anschließend wurde bei 1200 rpm 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Waschen des Zellpellets mit PBS erfolgte nochmals eine Zentrifugation bei 3500 rpm 5 min bei Raumtemperatur, wobei der Überstand verworfen wurde. Nach dem Waschen wurde 20 min bei 37 °C in 0,25 % Trypsin in PBS inkubiert und wiederum einmal mit PBS und zweimal mit Nährmedium gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wurde jeweils bei 1200 rpm 2 min zentrifugiert und der Überstand jedes Mal verworfen.

Die so gewonnenen Pinealozyten nahm man mit ca. 0,5 ml Nährmedium auf und gab sie auf Deckgläser mit 1 cm Durchmesser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), die mit Gelatine beschichtet waren (siehe Punkt 3.2.1.1) und kultivierte sie anschließend für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Luftanteil, wobei alle zwei Tage das Nährmedium erneuert wurde. Auf diesen Deckgläsern ließen sich anschließend vereinzelt Pinealozyten unter dem Mikroskop nachweisen. Um die spezifischen Synapsenproteine in den Pinealozyten nachzuweisen, wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz verwendet (siehe Punkt 3.2.7).

### **3.2.1.1 Beschichten der Deckgläser mit Gelatine**

Für das Beschichten der Deckgläser mit Gelatine wurden diese eine Stunde bei Raumtemperatur in 0,5 % Gelatine in PBS geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Deckgläser in 2,5 % Glutaraldehyd bei Raumtemperatur 20 min geschüttelt und die Gelatine quervernetzt. Nach dem Quervernetzen wurden die Deckgläser wiederum zweimal je 10 min mit PBS gewaschen, und eine Stunde bei Raumtemperatur in 70 % Ethanol zur Sterilisierung stehen gelassen. Im Anschluss wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und eine Stunde in PBS bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend wurde das PBS nochmals erneuert und die nun mit Gelatine beschichteten Deckgläser bei 4 °C aufbewahrt.

### **3.2.1.2 Gewinnen der Zellen**

Um für die Versuche eine ausreichende Anzahl an Y79 Zellen zu erhalten, wurden 2 ml der bestehenden Zelllinie zu 15 ml frischem Medium gegeben und dieses 10 Tage bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> versetzter Luft kultiviert. Nach den 10 Tagen hatten die Y79 Zellen sich soweit vermehrt, dass sie makroskopisch in Form von aneinanderhaftenden Zellhaufen im Nährmedium schwimmend sichtbar wurden. Um die Y79 Zellen zu gewinnen wurden diese bei 3500 rpm 10 min vom Nährmedium abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet, bestehend aus den Y79 Zellen, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend jeweils bei 1300 rpm 5 min bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände wiederum verworfen. Die Zellpellets wurden in wenig PBS aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

Um die COS Zellen zu gewinnen wurde 1 ml der bestehenden Zelllinie in 5 ml frisches Nährmedium gegeben und in Petrischalen mit 7 cm Durchmesser 2 Tage bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> versetzter Luft im Inkubator (Brutschrank) kultiviert. Nach 2 Tagen hatten die COS Zellen sich soweit vermehrt, dass auf dem Boden der Petrischale ein „Rasen“ aus fest anhaftenden COS Zellen gewachsen war. Das Nährmedium wurde abgekippt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Gummischabers wurden die COS Zellen vom Petrischalenboden gelöst und mit etwas PBS in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und jeweils bei 1300 rpm 10 min bei 4 °C zentrifugiert, wobei der Überstand nach jeder Zentrifugation verworfen wurde. Die Zellpellets wurden mit wenig PBS aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Überprüfung der Y79 Zellen auf spezifische Synapsenproteine wurde eine Probe auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und für das Verfahren des Western-Blots aufgearbeitet (wie unter 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben). Die COS Zellen dienten jeweils als Negativkontrolle im Western-Blot bei der Detektion von synaptischen Proteinen. Hirn-

bzw. Retinaextrakte wurden als Positivkontrolle für die entsprechenden Versuche verwendet.

### **3.2.1.3 Differenzierung der Y79 Zellen**

Radnót (1977) beschreibt partielle Differenzierungen von Retinoblastomen in Richtung Photorezeptoren mit synaptischen Lamellen, Neurotubuli und Vesikeln. Vorausgegangene Untersuchungen zeigen, dass mit Retininsäure versetztes Nährmedium bei den Y79 Zellen zur Differenzierung in Form von Ausbildung neuritenähnlicher Fortsätze führt (Conway et al., 1997). Dabei besteht die Möglichkeit, dass diese Fortsatzausbildung auch zur Synthese von unter Radnót beschriebenen Strukturen in den Y79 Zellen führt. Zur morphologischen Differenzierung in Form dieser neuritenähnlichen Fortsätze, wurde das Nährmedium zu 11  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  Lösungen mit in DMSO gelöster Retininsäure (Carl Roth GmbH, Deutschland) versetzt. Die Y79 Zellen wurden in zwei Ansätzen zu einmal 7 und einmal 10 Tagen bei 37 °C mit 5 %  $\text{CO}_2$  versetzter Luft kultiviert. Parallel wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der der Retininsäureanteil im Nährmedium durch reines DMSO ersetzt wurde. Innerhalb der 7 bzw. 10 Tage Wachstums wurde das Nährmedium alle 2 Tage erneuert. Das alte Nährmedium wurde bei 3500 rpm 5 min abzentrifugiert und verworfen. Das Zellpellet wurde jeweils in wenig Nährmedium, das mit Retininsäure bzw. DMSO versetzt war suspendiert, und anschließend mit Selbigem aufgefüllt. Nach der Kultivierung wurde das Nährmedium bei 3500 rpm 5 min abzentrifugiert, das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen und jeweils bei 1300rpm 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dabei jeweils verworfen. Das nun gewaschene Zellpellet wurde mit 2 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS und 2,5 % Glutaraldehyd für die Durchlichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie fixiert und die morphologische Differenzierung der Zellen in diesen beurteilt (wie unter 3.2.5 und 3.2.6 beschrieben).

### **3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Um in den Y79 Zellen spezifische Synapsenproteine nachzuweisen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, mit nachfolgender Western-Blot Analyse, verwendet. Nachfolgend wird in Kürze das Western-Blot Verfahren beschrieben.

Die Abkürzung SDS steht für Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium dodecylsulfate). Natriumdodecylsulfat ist ein anionisches Tensid, das Proteine denaturiert und sich an die denaturierten Proteine anlagert. Durch Hitzezuführung wird die Proteindenaturierung vor Auftragen der Proteinprobe auf das Polyacrylamidgel durchgeführt. An die, durch die Denaturierung in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine, lagern sich SDS-Moleküle an. Die Anlagerung der SDS-Moleküle erfolgt an ca. jedem zweiten Aminosäurerest des

Proteins. Durch die negative Eigenladung der SDS-Moleküle erhält der so entstandene Protein-SDS-Komplex eine negativ geladene Oberfläche. Die negativ geladene Oberfläche der Protein-SDS-Komplexe ist proportional zur Masse der jeweiligen Proteine. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Protein-SDS-Komplexe im Polyacrylamid-Gel vom Minus- zum Pluspol. Daraus lässt sich schließen, dass die Laufgeschwindigkeit in etwa umgekehrt proportional zur Masse des im Polyacrylamid-Gel wandernden Proteins ist. Also große Moleküle, da stärker negativ geladen langsam und kleine Moleküle, da weniger negativ geladen schnell im Polyacrylamid-Gel wandern. Auf diese Weise trennt sich das Proteingemisch in die Proteingruppen mit gleicher Molekülmasse auf.

Für die SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese wurden zwei verschiedene Gele hergestellt. Ein Trenngel in dem sich die Proteine voneinander trennen und ein Sammelgel, in das die Proteine bei ihrem „Start“ gegeben werden.

Die Herstellung eines 10 % Sodiumdecylsulfat-Polyacrylamidgels wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Trenngel: 1 ml A. dest.

1,27 ml 1 M Tris, pH 8,8

1,67 ml 30 % Acrylamid

50 µl 10 % SDS (Sodiumdodecylsulfat)

3,3 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)

25 µl 10 % APS (Amoniumpersulfat)

Das 10 % Trenngel wurde zwischen zwei abgedichtete, durch „Spacer“ voneinander getrennte Glasplatten blasenfrei gegossen. Während der Auspolymerisation des Trenngels bei Raumtemperatur wurde dieses mit Wasser überschichtet, um ein Austrocknen des Gelrandes zu vermeiden.

Sammelgel: 3,15 ml A. dest.

1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8

0,5 ml 30 % Acrylamid

50 µl 10 % SDS

5 µl TEMED

37,5 µl 10 % APS

Das Wasser über dem Trenngel wurde entfernt und durch das zuvor hergestellte Sammelgel ersetzt und ein entsprechend der gewünschten Laufbahnanzahl ausgewählter Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Nach der Auspolymerisation des Sammelgels bei Raumtemperatur wurde der Kamm wieder entfernt und es hatten sich „Taschen“ im Sammelgel gebildet, worin die Protein-Proben auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden konnten. Das Gel wurde in

eine Elektrophoreseapparatur, die mit Laufpuffer gefüllt war, überführt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit Probenpuffer versetzt und für 2 min bei 95 °C, wie oben bereits erwähnt, denaturiert. Als Standard zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde der Proteinmolekulargewichtsstandard Roti®-Mark Standard verwendet. Der Standard ist eine Referenzprobe, an der man die Molekülmasse der Proteine aus den aufgetragenen Proben zuordnen kann. COS-Zellen dienten bei den Experimenten, da sie Fibroblasten darstellen und synaptische Proteine von Nervenzellen in diesen Zellen weitgehend fehlen, als Negativkontrolle. Auch eine Positivkontrolle wurde jeweils mitaufgetragen, die in Abhängigkeit vom gesuchten Synapsenprotein variierte (Hirn- oder Netzhautextrakt). Die Elektrophorese der Proben lief bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 V und anschließend bei 200 V. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel vorsichtig aus der Apparatur entnommen und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde zum Western-Blot überführt.

### **3.2.3. Western-Blot-Verfahren**

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegtes elektrisches Feld auf eine Membran aus Nitrocellulose (Hybond C) transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine erhalten. Die Bindung der Proteine an der Nitrocellulosemembran erfolgt dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen. Die Western-Blot Durchführung erfolgte nach dem Nass-Blot-Verfahren. Die hierzu verwendeten Filzschwämme und Filterpapiere wurden vor dem Blotaufbau in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau erfolgte nach folgendem Schema:

- Filzschwamm
  - 3-4 Lagen Filterpapier
  - verstärkte Nitrocellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
  - Polyacrylamidgel
  - 3-4 Lagen Filterpapier
  - Filzschwamm
- ↑ + Pol
- ↑ - Pol

Der Elektrotransfer erfolgte für zwei Stunden bei 50 mA in der mit Transferpuffer aufgefüllten Blot-Apparatur. In dem erzeugten elektrischen Feld wanderten die Proteine vom - Pol, dem Polyacrylamidgel zum + Pol der Nitrocellulosemembran. Nach Ablauf der zwei Stunden wurde die Nitrocellulosemembran vorsichtig aus dem Blotaufbau entnommen und mit Ponceau S-Farblösung angefärbt. Diese Farblösung färbte die

Proteinbanden auf der Membran rot und die in der Ponceau S-Farblösung enthaltene Trichloressigsäure fixierte zudem die Proteine auf der Nitrocellulosemembran. Im Anschluß wurde die überschüssige Farbe mehrmals mit Aqua dest. abgespült, und die Membran vorsichtig beschriftet. Unspezifische Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran, wurden durch Magermilch-Inkubation (5% Magermilch in PBS) blockiert. Diese Blockade verhinderte bei der späteren Antikörperinkubation unspezifische Bindungen der Antikörper an der Nitrocellulosemembran. Die Magermilchaufsättigung erfolgte mit 5 % Magermilch in PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Um die auf der Nitrocellulosemembran befindlichen Proteine spezifisch und sensitiv sichtbar zu machen, erfolgte die Inkubation mit einem gut charakterisierten Primärantikörper, der gegen das entsprechende Protein gerichtet war. Dafür wurde die Membran mit 1 µl Antikörper und 10 ml 5 % Magermilch in PBS (1:10000) über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Enthielten die auf der Nitrocellulosemembran transferierten Proteinbanden die vom Primärantikörper erkannten Proteine so wurde der Primärantikörper an diese gebunden. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde dreimal mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach dem dreimaligen Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:10000 Verdünnung in 5% Magermilchlösung), der spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet war. Diese Sekundärantikörper waren mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation eines Diacylhydrazids. Bei der Oxidation wurden Stickstoff und Licht freigesetzt, die zur Schwarzfärbung auf einem auf die Membran gelegten Röntgenfilms (ECL Film, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) führten, wodurch die mit dem Sekundärantikörper markierten Primärantikörper, die die gesuchten Proteine markierten, auf der Nitrocellulosemembran sichtbar und nachweisbar wurden. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte zwei Stunden bei Raumtemperatur ebenfalls auf einem Schüttler. Die Nitrocellulosemembran wurde dreimal mit PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran mit 1 ml ECL-Detektionslösung (1:1 = 500 µl ECL1+500 µl ECL2) 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 10 min und anschließend 20 min in einer Filmkassette auf Röntgenfilm (ECL Hyperfilm, Amersham Biosciences) exponiert. Nach Entwicklung (Entwicklermaschine Agfa Curix 60) wurden die Antikörperbindungsstellen als schwarze Banden auf dem Röntgenfilm sichtbar.

#### **3.2.4 „Strippen“ von Nitrocellulose-Blots**

Es besteht die Möglichkeit, die Nitrocellulosemembran erneut einer Immundetektion zu unterziehen (Amersham Broschüre zu ECL). Durch den Vorgang des „Strippens“ wurden sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper von der Membran gelöst. So konnte diese ein weiteres Mal mit anderen Antikörpern inkubiert werden. Für das Strippen wurden 20

ml 10 % SDS in der Mikrowelle erwärmt und mit 14 µl β-Mercaptoethanol vermischt. Die Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur in dieser Lösung geschüttelt und anschließend mehrfach jeweils 10 min in PBS gewaschen. Nach dem Strippen wurde die Membran erneut mit 5 % Magermilch abgesättigt und erneut mit Antikörpern inkubiert (3.2.3).

### **3.2.5 Durchlichtmikroskopie**

Um die morphologische Differenzierung der Y79 Retinoblastomazellen mit Retinsäure zu beurteilen, wurden die Durchlichtmikroskopie und die Elektronenmikroskopie eingesetzt. Für die Durchlichtmikroskopie wurden die Y79 Zellen in 2 % PFA in PBS bei 4 °C über Nacht fixiert. Nach dem Fixieren wurde das Fixans bei 3500 rpm 10 min abzentrifugiert und verworfen. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und bei 3500 rpm 10 min zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in wenig PBS suspendiert und jeweils 20 µl auf einen Objektträger (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen. Das Ganze wurde dann mit einem Deckplättchen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) abgedeckt und mit dem 63iger Objektiv (63fache Vergrößerung) des Mikroskops (Axioplan 2, Zeiss, Deutschland) untersucht und mit dem Programm „Image Access Version 3.20“ digital dokumentiert.

### **3.2.6 Elektronenmikroskopie**

Als weiteres Verfahren, um die Differenzierung der Y79 Zellen zu beurteilen und Ribbons in Pinealozyten nachzuweisen, wurde die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Die Funktion des Elektronenmikroskops wird nachfolgend erläutert.

Das Elektronenmikroskop ist mit einer Elektronenquelle ausgestattet, einer haarnadelförmigen Kathode, die durch Stromdurchfluss aufgeheizt wird. Durch eine an eine Anode angelegte Hochspannung werden die Elektronen abgesaugt, was den Elektronenstrahl erzeugt. Es resultiert eine Beschleunigungsspannung von 50-150 kV. Das Auflösungsvermögen nimmt mit Höhe der Beschleunigungsspannung zu. Das in dieser Arbeit verwendete Elektronenmikroskop (Elektronenmikroskop „EM 900“, Zeiss, Deutschland) erlaubte Beschleunigungsspannungen von 50 kV und 80 kV. Moderne Geräte haben aufgrund der hohen Beschleunigungsspannungen ein Auflösungsvermögen von bis zu 0,2-0,3 nm. Nach Durchtritt des Elektronenstrahls durch die Anode wird dieser in einem Kondensator gebündelt und so durch das Präparat geleitet. Hier werden die Strahlen abhängig von der Elektronendichte der Atome im Präparat partiell abgelenkt. Je höher die Atommasse, desto größer ist auch die Ablenkung. Biologische Präparate bestehen meist aus Atomen mit einer niedrigen Ordnungszahl (C, H, N, O) die nur einen geringen Kontrast mitbringen, daher werden diese Objekte vorher mit Kontrastmittel

(Schwermetalle) behandelt. Die Schnitte dürfen eine Dicke von 100 nm nicht überschreiten, da sie sonst eine zu hohe Strahlenabsorption erreichen, was zur Temperaturerhöhung und Präparaterstörung führt. Die unterschiedlich stark abgelenkten Strahlen erzeugen ein Zwischenbild, das mit einem Projektiv (Linsensystem) vergrößert und auf einen fluoreszierenden Schirm projiziert wird. Der Schwärzungsgrad der schwarz-weiß gewonnenen Bilder gibt die Elektronendichte (Atommasseendichte) in den Präparaten wieder.

Die differenzierten Y79 Zellen wurden wie in 3.2.1.2 beschrieben gewonnen und anschließend für die Elektronenmikroskopie eingebettet (der Vorgang des Einbettens wird im Anschluss erläutert). Die Pinealozyten wurden für die Elektronenmikroskopie auf Cell Inserts (NUNC Brand Products GmbH, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert. Diese Cell Inserts bestehen aus 0,4 µm Polycarbonat Membranen, auf denen die Pinealozyten fünf Tage kultiviert wurden. Nach den fünf Tagen wurden die Pinealozyten auf der Membran fixiert und diese in drei gleichgroße Teile zerschnitten. Die Zellen wurden dann mitsamt der Membran für die Elektronenmikroskopie eingebettet.

#### Einbetten für die Elektronenmikroskopie

- Zellen 1x in PBS waschen und mit 2,5 %iger Glutaraldehyd-Lösung in PBS über Nacht bei 4 °C fixieren
- 4x in PBS für jeweils 10 min waschen um Fixans vollständig zu entfernen
- Mit 1 %  $O_5O_4$  (Osmiumtetroxid) in 100 mM Cacodylatlösung Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur kontrastieren
- 5x in Aqua dest. jeweils 10 min waschen
- 2 % Uranylacetat in 70 % Ethanol für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
- 5x in Aqua dest. jeweils 10min waschen
- Alkoholreihe zur Entwässerung, in sieben Schritten mit aufsteigender Alkoholkonzentration von 30 % bis 96 %, pro Alkoholkonzentrationsschritt jeweils 15min bei Raumtemperatur stehen lassen
- 1,2 Epoxypropan für 30 min einwirken lassen
- Epoxy- Einbettungsmittel (EPON) bei 60°C über Nacht erhärten

Nach dem Einbetten konnten die Präparate mit Hilfe des Ultramicrotom zu Semidünn- und Ultradünnschnitten geschnitten werden. Die Semidünnschnitte sind 0,5 µm dick und dienen zum Beurteilen und Auswählen des Schneidebereichs am Präparat. Wurde der erwünschte Präparatebereich ausgewählt, konnten die Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 55 nm angefertigt werden. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfernetze aufgenommen und im Elektronenmikroskop (Zeiss EM 900) untersucht. Die Dokumentation der im Elektronenmikroskop betrachteten Präparate erfolgte mit der im

Elektronenmikroskop befindlichen Planfilmkamera auf Elektron Microscope Filmen (Kodak Stuttgart-Wangen, Deutschland).

### **3.2.7 Fluoreszenzmikroskopie**

Mit der Fluoreszenzmikroskopie können Antigene- in dieser Arbeit sind es die spezifischen Synapsenproteine- in den Pinealozyten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Verwendet wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz. Bei der Methode der indirekten Immunfluoreszenz werden nicht die Primärantikörper, sondern die Sekundärantikörper mit einem bestimmten Marker, in dieser Arbeit mit Fluophor markiert. Um die erwünschten Antigene nachzuweisen, werden die Präparate mit den jeweils spezifischen Primärantikörpern inkubiert, der das entsprechende Antigen spezifisch erkennt. Die Bindung des Primärantikörpers wird durch einen Zweitantikörper nachgewiesen, der spezifisch den Primärantikörper erkennt. Der Sekundärantikörper ist mit einem Marker (für Fluoreszenzmikroskopie an Fluorophor) konjugiert. Auf diese Weise erhält man an dem Primärantikörper einen fluoreszierenden Komplex, der im Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist. Die Wahl des Sekundärantikörpers war in dieser Arbeit abhängig vom Primärantikörper. Handelte es sich um einen monoklonalen (Maus) Antikörper verwendet man einen mit Rhodamin (Cy3) gekoppelten Sekundärantikörper, der dann im Rotkanal des Fluoreszenzmikroskopes nachweisbar wurde. Bei polyklonalen (Kaninchen) Antikörpern, wurde ein mit Fluoroisothiocyanat (Cy2) gekoppelter Sekundärantikörper verwendet, der sich im Grünkanal des Fluoreszenzmikroskopes nachweisen ließ. Durch diese spezifische Sekundärantikörperbindung an monoklonalen und polyklonalen Primärantikörpern, bestand mit der Immunfluoreszenz die Möglichkeit, in ein und demselben Analyseansatz gleichzeitig zwei verschiedene Antikörper, zweier verschiedener Spezies einen monoklonalen und einen polyklonalen, gegen unterschiedliche Antigene eines biologischen Substrats zu verwenden, und sichtbar zu machen.

Im Fluoreszenzmikroskop trifft von einer Quecksilberdampf-Höchstdrucklampe ausgehende kurzwellige Anregungsstrahlung (excitation) auf das Objekt, welches diese absorbiert. Vom Präparat nicht absorbierte Anregungsstrahlung geht nach unten verloren. Die von fluoreszierenden Präparatstellen ausgehende längerwellige Fluoreszenzstrahlung (emission) gelangt durch das Objekt in Richtung Okular und kann beobachtet bzw. aufgezeichnet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit auf den Deckgläsern kultivierten Pinealozyten wurden für diese Methode auf den Deckgläsern belassen und für die Fluoreszenzmikroskopie aufgearbeitet. Nach einmaligem Waschen mit PBS bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 2 % PFA eine Stunde bei 4 °C fixiert und anschließend nochmals mit PBS gewaschen. Um die Zellmembran für die Antikörper durchlässig zu machen, wurde mit 0,1 % Triton-X

100 in PBS 30 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nun wurden die Deckgläser in eine Feuchtkammer überführt, in der die Antikörperinkubation stattfand. Die monoclonalen Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000, die polyclonalen Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:250 in 0,1 % Triton-X 100 in PBS eingesetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit 0,1 % Triton-X 100 und einmal mit PBS jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte die Sekundärantikörperinkubation (Ziege gegen Kaninchen Cy2 oder Cy3 und Ziege gegen Maus Cy3 oder Cy2) in einer Verdünnung von 1:800 in PBS eine Stunde bei Raumtemperatur. Mit Abschluss der Sekundärantikörperinkubation wurden die Präparate (Deckgläser) dreimal mit PBS jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen.

Bei einigen Präparaten erfolgte noch eine weitere Inkubation mit dem Knollenblätterpilzgift Phalloidin in einer Verdünnung von 1:500 in PBS bei Raumtemperatur. Phalloidin bindet an Aktin-Filamente und bildet das vollständige Mikrofilamentsystem der Zelle ab. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Präparate, um die fluoreszierende Eigenschaft länger zu erhalten, mit je 3 µl NPG (n-Propyl gallate) auf Objektträger eingedeckelt. Parallel zu allen Inkubationen wurden zum Beurteilen des Hintergrundes Negativkontrollen ohne Primärantikörper jedoch mit Sekundärantikörper inkubiert. Alle Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Deutschland) mit dem 63iger Objektiv (63fache Vergrößerung) in Kombination mit Ölemission zum Erreichen einer höheren und kontrastreicherer Auflösung betrachtet und mit dem Programm „Image Access Version 3.20“ digital dokumentiert.

## **4 Ergebnisse**

### 4.1 Untersuchung der humanen Retinoblastomazellen (Y79) auf spezifische Proteine im Western-Blot

Der Nachweis der für die Ribbonsynapsen spezifischen Synapsenproteine wurde mit dem Verfahren des Western-Blot durchgeführt. Dafür wurden die verwendeten Y79 Zellproben aus der Zelllinie gewonnen, im Polyacrylamidgel für den Western-Blot aufgearbeitet und in diesen überführt (siehe 3.2.1.2 bis 3.2.3). Die Y79 Zellproben wurden mit Hilfe des Western-Blots auf mehrere synapsenspezifische Proteine untersucht (Abb. 4.5), die in nachfolgender Tabelle erläutert werden:

Syntaxin	„t-SNARE“, ist in die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran involviert (zur Übersicht siehe Südhof, 2004)
Synaptobrevin	„v-SNARE“, ist in die Vesikelexozytose der Synapsenvesikel involviert (Südhof, 2004)
SV2	befindet sich in der Membran der synaptischen Vesikel (Südhof, 2004)
Rhodopsin	ist ein spezifisches Protein der Stäbchenphotorezeptoren der Retina, der für die Lichttransduktion in den Außengliedern verantwortlich ist (Karlson, et al., 1994)
Ribeye	ist ein spezifisches Protein der Ribbons (Schmitz et al., 2000)
Tubulin	ist in allen eukaryonten Zellen enthalten und bildet die Mikrotubuli für das Zytoskelett von: Axonen und Dendriten, Teilungsspindel während der Mitose und den intrazellulären Organellentransport (Kontrollprotein)
SNAP-25	„t-SNARE“, ist für die Fusion der synaptischen Vesikel mit der Zellmembran wichtig (Südhof, 2004)
Synaptophysin	befindet sich in der Membran der synaptischen Vesikel (Südhof, 2004)
Synaptotagmin	Ca <sup>2+</sup> -Sensor der Exozytose (Südhof, 2004)

Tab. 4.10: synapsenspezifische Proteine

Zum Nachweis der oben aufgeführten Proteine wurde der Western-Blot mit in der Literatur sehr gut charakterisierten proteinspezifischen Antikörpern, wie unter dem Kapitel Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. In allen Western-Blot-Versuchen wurden zusätzlich zu den experimentellen Proben jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit eingebracht. Als Positivkontrolle wurden postnukleäre Extrakte aus dem Hirn bzw. eine gereinigte OPL-Fraktion aus der Rindernetzhaut (Schmitz et al., 1996) verwendet. Als Negativkontrollen wurden COS Zellextrakte eingesetzt. COS-Zellen

leiten sich von Fibroblasten ab und besitzen keine synaptischen Proteine. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, die einzelnen Versuche direkt nach Versuchsdurchführung auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Bei den Positivkontrollen war bekannt, dass sich das nachzuweisende Protein in der aufgetragenen Probe befand. Dadurch ergab sich, dass in der Positivkontrolle immer eine Bande an der dem Molekulargewicht entsprechenden Stelle des nachzuweisenden Proteins zu erwarten war (siehe Abb. 4.5).

Bei der Negativkontrolle (COS-Zellen, Fibroblasten) wiederum war bekannt, dass sich das jeweilige Protein nicht in der Probe befand. Das bedeutete, dass keine Bande an der dem Molekulargewicht entsprechenden Stelle nachweisbar sein sollte (Abb. 4.5). Während in allen Western-Blot-Versuchen COS-Zellen als Negativkontrolle dienten, wurden verschiedene Zellproben als Positivkontrolle verwendet, die in Tabelle 4.2 erläutert werden. COS-Zellen sind Fibroblasten, die bis auf wenige bekannte Ausnahmen praktisch keine synaptischen Proteine enthalten.

OPL (outer plexiform layer)	in der Retina befindliche Schicht, in der Photorezeptoren mit den Horizontal- und Bipolarzellen durch Ribbonsynapsen verbunden werden
PNS -Gehirn, oder -Retina	postnukleärer Überstand aus Gehirn oder Retina
Ribbonfraktion	aufgereinigt aus Retina (Schmitz, et al., 2000)

Tab. 4.11: Positivkontrollen

Als Positivkontrollen wurden Proteinextrakte aus dem Rattenhirn bzw. der Rinderretina verwendet, die große Mengen an synaptischen Proteinen enthalten. Alle Positivkontrollen wurden von der Arbeitsgruppe Schmitz zur Durchführung der Versuche zur Verfügung gestellt.

Abbildung 4.5 zeigt die im Western-Blot-Verfahren auf spezifische Proteine untersuchten Y79 Zellproben mit den jeweiligen Positiv- und Negativkontrollen. Nachfolgend soll in Tabelle 4.3 eine kurze Erläuterung der Ergebnisse in Abbildung 4.5 erfolgen:

<b>gesuchte Proteine mit spezifischem Molekulargewicht</b>	<b>Y79 Zellprobe</b>	<b>Positivkontrolle (OPL, PNS oder Ribbonfraktion)</b>	<b>Negativkontrolle (COS-Zellen)</b>
Syntaxin, 35 kDa	Spur 1, keine Bande nachweisbar	Spur 2 (OPL), Bande bei 35 kDa nachweisbar	Spur 3, keine Bande nachweisbar
Synaptobrevin, 17/16 kDa	Spur 4, keine Bande nachweisbar	Spur 5 (PNS-Gehirn), Bande bei 17/16 kDa	Spur 6, keine Bande nachweisbar
SV2, 110 kDa	Spur 7, keine Bande nachweisbar	Spur 8 (PNS-Gehirn), Bande bei 110 kDa	Spur 9, keine Bande nachweisbar
Rhodopsin, 53 kDa	Spur 10, keine Bande nachweisbar	Spur 11 (PNS-Retina), Bande bei 53 kDa	Spur 12, keine Bande nachweisbar
RIBEYE, 120 kDa	Spur 13, keine Bande nachweisbar	Spur 14 (Ribbonfraktion), Bande bei 120 kDa	Spur 15, keine Bande nachweisbar
Tubulin, 55 kDa	Spur 1, Bande bei 55 kDa	Spur 2 (PNS-Gehirn), Bande bei 55 kD	Spur 3, Bande bei 55 kDa
SNAP-25, 25 kDa	Spur 4, keine Bande nachweisbar	Spur 5 (PNS-Gehirn), Bande bei 25 kDa	Spur 6, keine Bande nachweisbar
Synaptophysin, 38 kDa	Spur 7, keine Bande nachweisbar	Spur 8 (PNS-Gehirn), Bande bei 38 kDa	Spur 9, keine Bande nachweisbar

Synaptotagmin, 65 kDa	Spur 10, keine Bande nachweisbar	Spur 11 (PNS- Gehirn), Bande bei 65 kDa	Spur 12, keine Bande nachweisbar
--------------------------	--	---	--

Tab. 4.3: Ergebnisse Abbildung 4.5

In den Positivkontrollen der hier aufgeführten Western-Blot-Versuche wurde das jeweils untersuchte Protein immer an der dem Molekulargewicht entsprechenden Stelle wie erwartet nachgewiesen. Die Negativkontrollen waren außer im Versuch **f** (Tubulin) alle negativ. Bis auf Tubulin konnte keines der untersuchten Proteine in den Y79 Zellen nachgewiesen werden. Tubulin ist ein ubiquitär vorkommendes Zytoskelettprotein, das mit Ausnahme von Erythrozyten in allen Zellen des menschlichen Körpers vorhanden ist. Das Protein Tubulin wurde in den Y79 Zellen, der Positiv- (postnukleärer Überstand aus dem Gehirn) und auch Negativkontrolle in Form von einer Bande im Western-Blot auf der dem Molekulargewicht von Tubulin (55 kDa) entsprechenden Höhe nachgewiesen. Synapsenspezifische Proteine konnten somit in Y79-Retinoblastomazellen nicht nachgewiesen werden.

## **4.2 Differenzieren der Y79 Zellen mit Retininsäure**

### **4.2.1 Dokumentation der differenzierten Y79 Zellen mit dem Durchlichtmikroskop**

Um die morphologische Differenzierung der Y79 Zellen in Form von Ausbildung neuritenähnlicher Fortsätze zu erreichen, wurde das Nährmedium, wie von Conway et al. (1997) beschrieben mit verschiedenen Konzentrationen von Retininsäure (11  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M in DMSO) bzw. alleine mit dem Vehikel DMSO versetzt (siehe 3.2.1.3). Die anschließende Kultivierung der Y79-Zellen mit jeweils unterschiedlich hoch konzentrierten Retininsäure-Lösungen in Nährmedien wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Diese beiden Ansätze unterschieden sich in der Kultivierungsdauer. Im ersten Ansatz wuchsen die Y79 Zellen über 7 Tage in dem mit Retininsäure versetzten Nährmedium, im zweiten Ansatz über 10 Tage. Dabei blieb die Retininsäurekonzentration in den jeweiligen Ansätzen über die gesamte Kultivierungsdauer konstant. Zu jedem Ansatz wurde parallel eine Negativkontrolle kultiviert, die ebenfalls über 7 bzw. 10 Tage nur mit DMSO inkubiert wurde. Bei der Negativkontrolle wurde das Nährmedium anstelle von

Retininsäure nur mit dem Vehikel (DMSO) versetzt. Die Ansätze und Negativkontrollen wurden in der Durchlichtmikroskopie mit dem 63iger Objektiv untersucht und dokumentiert (Abb. 4.6 und 4.7).

Die Abbildungen 4.6 und 4.7 zeigen die Y79 Zellen nach Kultivierung in dem mit Retininsäure versetzten Nährmedium. Abbildung 4.6 zeigt den Ansatz nach 7 Tagen Kultivierung in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 11  $\mu\text{M}$  und der Negativkontrolle. Wie in Abbildung 4.6 dargestellt kann man mit der Durchlichtmikroskopie keine neuritenähnlichen Fortsätze beobachten. Es gibt jedoch vereinzelt kleine Ausstülpungen der Zellmembran der Y79 Zellen, die mit schwarzen Pfeilen in den Bildern a, b, e und j markiert sind. Die Abbildung 4.7 zeigt den Ansatz nach 10 Tagen Kultivierung in den gleichen Konzentrationen wie in Abbildung 4.6 und ebenfalls mit einer Negativkontrolle. Auch hier kann man in der Durchlichtmikroskopie keine Fortsatzausbildung erkennen; jedoch sind kleine Ausstülpungen der Zellmembranen wie in Abbildung 4.6 sichtbar, die in Abbildung 4.7 in a, h, i und k ebenfalls mit kleinen schwarzen Pfeilen markiert sind.

Jeder der oben beschriebenen Ansätze, mit unterschiedlicher Kultivierungsdauer und Konzentration der Retininsäure-Lösung, wurde zweimal durchgeführt und jeweils mittels Durchlichtmikroskopie untersucht. Die in Abbildung 4.6 und 4.7 dargestellten Befunde wurden in allen Versuchen übereinstimmend gefunden. Ein drittes, dem oben genannten Vorgang exakt entsprechendes Experiment wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht um die Befunde weiter abzusichern und zu vertiefen (siehe Abbildung 4.8, 4.9 und 4.10).

#### **4.2.2 Dokumentation der Retininsäure behandelten Y79 Zellen mit dem Elektronenmikroskop**

Die mit Retininsäure behandelten Y79 Zellen wurden mit dem Elektronenmikroskop untersucht, da mit der Durchlichtmikroskopie nicht eindeutig ersichtlich war, ob es sich bei den Zellmembranausstülpungen der Y79 Zellen nach der Kultivierung mit Retininsäurelösung um Ansätze einer Ausbildung von neuritenähnlichen Fortsätzen handelte. Dafür wurden Zellen, entsprechend der Methode für die Durchlichtmikroskopie für 10 Tage in 0,1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Retininsäurelösung kultiviert, anschließend für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet (siehe 4.2.6) und im Elektronenmikroskop untersucht und dokumentiert (Abb. 4.8, 4.9 und 4.10).

In den Abbildungen 4.8, 4.9 und 4.10 sind die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Y79 Zellen dargestellt.

In Abbildung 4.8 sind die Zellen mit 0,1  $\mu\text{M}$  Retininsäurelösung über 10 Tage kultiviert worden. In Bild a ist eine Ausstülpung der Zellmembran sichtbar, die den Anfang eines neuritenähnlichen Fortsatzes darstellen könnte. In Bild b wird diese Ausstülpung weiter heraus vergrößert und es wird verdeutlicht, dass es keine Veränderungen im zytoplasmatischen Aufbau gibt, die auf eine Differenzierung von präsynaptischen Terminalen, zum Beispiel durch eine vermehrte Ansammlung von synaptischen Vesikeln bzw. von Plasmamembranverdickungen, hinweisen. Bild c zeigt zwei Y79 Zellen, die in Kontakt zueinander stehen. Die Kontaktzone wurde in Bild d ausgeschnitten und vergrößert. Auch hier sind keine differenzierten präsynaptischen Terminalen mit Anhäufungen von synaptischen Vesikeln und prä- sowie postsynaptischen Plasmamembranverdickungen zu beobachten. Abbildung 4.9 zeigt die Y79 Zellen, die mit 10  $\mu\text{M}$  Retininsäurelösung 10 Tage kultiviert wurden. Die Bilder a und b zeigen Zellen, deren Zellmembranen keine Ausstülpungen bzw. Fortsätze aufweisen. In Bild c ist eine Ausstülpung der Zellmembran lokalisiert, die in Bild d weiter vergrößert wurde. Eine synaptische Veränderung des Zytoplasmas lässt sich dennoch nicht erkennen.

Abbildung 4.10 stellt die Negativkontrolle zu den Versuchen der Abbildungen 4.8 und 4.9 dar. Hier wurden die Y79 Zellen anstelle von Retininsäurelösung in DMSO (Vehikel) nur mit DMSO kultiviert. Es ist kein signifikanter Unterschied zu den mit Retininsäure behandelten Zellen zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es weder im Western-Blot noch in der Durchlichtmikroskopie und auch nicht in der Elektronenmikroskopie zu einer synaptischen Differenzierung der mit Retininsäure behandelten Retinoblastomazellen (Y79) kam. Diese waren somit, zumindest unter den durchgeführten Bedingungen, als Exozytosemodell für Ribbonsynapsen unbrauchbar.

### **4.3 Untersuchung der Rattenpinealozyten auf spezifische Synapsenproteine in der Fluoreszenzmikroskopie**

Mit der Fluoreszenzmikroskopie wurden kultivierte Pinealozyten der Sprague Dawley Ratte auf das Vorhandensein von spezifischen Synapsenproteinen der Ribbonsynapsen untersucht. Die Pinealozyten wurden direkt aus den Epiphysen der Sprague Dawley Ratte gewonnen und kultiviert (siehe 3.2.1). Nach einer Kultivierungsdauer von 5 Tagen wurden die Pinealozyten für die Fluoreszenzmikroskopie aufgearbeitet und mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern inkubiert (siehe 3.2.7).

In Abbildung 4.11 a, d und g zeigte die Inkubation mit einem Antikörper gegen Synaptobrevin, einem ubiquitären Marker synaptischer Vesikel, die Anwesenheit dieses Proteins und damit von synaptischen Vesikeln in den kultivierten Pinealozyten. Die Verteilung dieses synaptischen Markerproteins in den Pinealozyten ist, wie erwartet, relativ diffus (Abb. 4.11).

Mit zwei verschiedenen Antikörpern gegen RIBEYE, U2656 und RE B alpha (Abb. 4.11 b, e, und k), der Hauptkomponente von Synaptic Ribbons, konnte gezeigt werden, dass auch dieses für Synaptic Ribbons-spezifische Protein in Pinealozyten exprimiert wird.

Die Anwesenheit von Ribbons in kultivierten Pinealozyten konnte weiterhin durch einen Aktinantikörper, C4-Aktin (Abb. 4.11 h und j) bestätigt werden, der mit einer Komponente der Ribbons kreuzreagiert (Schmitz et al.; in Vorbereitung). Daß das in den Pinealozyten beobachtete, mit C4-Aktin erzielte Ribbonsignal nicht auf einer Markierung mit filamentärem Aktin herrührt, wurde durch eine Doppelmarkierung mit Phalloidin-Rhodamin gezeigt. Phalloidin-Rhodamin bindet an filamentäres Aktin, aber nicht an Ribbons. Die Entsprechenden Kontrollen (nicht gezeigt) zeigten keinen signifikanten zellspezifischen Hintergrund.

#### **4.4 Darstellung der synaptischen Ribbons im Elektronenmikroskop**

Mit Hilfe des Elektronenmikroskopes wurden die kultivierten Pinealocyten aus der Sprague Dawley Ratte auf die Anwesenheit von Ribbons untersucht. Die dafür gewonnenen Pinealocyten wurden nach der Kultivierung direkt für die Elektronenmikroskopie fixiert und aufgearbeitet (siehe 3.2.6). In den Abbildungen 4.11 Zeile 5 stellen sich die Ribbons in Form von elektronendichten Strukturen in den Pinealocyten dar. Sie sind in den jeweiligen Abbildungen mit schwarzen Pfeilen markiert.

## **5 Diskussion**

In vorausgegangenen Untersuchungen wurden in 3 von 29 Retinoblastomen Ribbons und Ribbonsynapsenformen nachgewiesen (Radnót et al., 1977; Dickson et al., 1976). Diese entsprechen in ihrer Anordnung den Ribbonsynapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen der humanen Retina (Dickson et al., 1976). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich in Retinoblastomazellen (Y79) ebenfalls wie in den Retinoblastomen (Tumor als ganzes) Ribbons bzw. Ribbonsynapsen nachweisen lassen und Retinoblastomazellen (Y79) ein Zellkulturmodell zur Untersuchung von Ribbonsynapsen darstellen. Hierfür sollten undifferenzierte und differenzierte Retinoblastomazellen (Y79) untersucht werden. Da zum Einen gezeigt wurde, dass die Entwicklung der Synapsen in den Retinoblastomen in verschiedenen Stadien verläuft (Dickson et al., 1976) und zum anderen Retininsäure bei den Retinoblastomazellen zur Differenzierung führt (Conway et al., 1997), wurden Retinoblastomazellen einmal mit (differenziert) und einmal ohne (undifferenziert) Retininsäure kultiviert und mittels Western-Blot und Elektronenmikroskopie auf Synapsen- bzw. Ribbonsynapsenproteine und Ribbons untersucht.

Desweiteren wurden in dieser Arbeit die Pinealozyten der Sprague Dawley Ratte untersucht. Diese stellen ein Alternativmodell zu den Retinoblastomazellen dar. In situ wurden bereits Ribbonsynapsen in Pinealozyten nachgewiesen (z.B. Smith und Sjöstrand, 1961). Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie untersucht werden, ob sich ebenfalls in Einzel-Zellkulturen von Pinealozyten Ribbonsynapsen bzw. deren Synapsenproteine nachweisen lassen, und ob sich somit diese Einzel-Zellkulturen als Zellkulturmodell zur Untersuchung von Ribbonsynapsen eignen. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

### **5.1 Untersuchung zweier Zellkultursysteme auf Ribbonsynapsen-Proteine**

Vorausgegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass bis auf relativ geringfügige Unterschiede in Ribbonsynapsen generell die gleichen Synapsenproteine vorkommen wie in den konventionellen Synapsen (Ullrich und Südhof, 1994; Brandstätter et al., 1996 a, 1996 b; von Kriegstein et al., 1999). Neben den in beiden Synapsentypen vorkommenden Synapsenproteinen gelang es, ein ausschließlich für die Ribbonsynapsen spezifisches Protein, das RIBEYE, nachzuweisen (Schmitz et al., 2000).

## **5.2 Untersuchungen zur Analyse von synaptischen Proteinen in Retinoblastomazellen (Y79)**

Dickson et al. (1976) gelang es, Ribbons in Retinoblastomen nachzuweisen. Darauf aufbauend wurden in dieser Arbeit humane Retinoblastomazellen (Y79) als funktionelles Zellkultursystem auf Synapsenproteine untersucht, die für konventionelle Synapsen wie auch für Ribbonsynapsen spezifisch sind. Dazu gehören die in der Vesikelmembran selbst befindlichen Proteine wie *Synaptophysin* (als ein spezielles Glykoprotein), *Syntaxin* sowie *SNAP-25*, die bei der Vesikelfusion mit der Zellmembran im Rahmen der Exozytose eine wesentliche Rolle spielen, als auch *Synaptotagmin*, dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor der Exozytose und *Synaptobrevin*, das in die Vesikelexozytose involviert ist.

Von allen Synapsenproteinen (siehe Tab. 4.1), deren Antikörper für die Western-Blot-Versuche mit den Retinoblastomazellen verwendet wurden, konnte in den durchgeführten Versuchen für keines der Proteine ein positives Ergebnis nachgewiesen werden, obwohl die verwendeten Positivkontrollen eindeutig funktionierten (siehe Ergebnisse Abb. 4.5). Die humanen Retinoblastomazellen (Y79) wiesen keine spezifischen Synapsenproteine auf, weder für konventionelle Synapsen noch für Ribbonsynapsen. Dies kann darin begründet sein, dass synaptisch angeordnete Strukturen, welche Fortsätze von Photorezeptoren nachahmen, und Ribbons nur in geringer Zahl in Retinoblastomen vorkommen (etwa 10%). Die Anzahl könnte zum Nachweis mit der Methodik des Western-Blots zu gering sein. Daher konnten die humanen Retinoblastomazellen (Y79) in dieser unbehandelten Form nicht als neues Kultursystem zur Untersuchung der Ribbonsynapsenexozytose gewonnen werden.

Es ist bekannt, dass sich der oben beschriebene Aufbau der Retina mit ihren einzelnen Schichten (OPL und IPL) erst nach der Geburt vollständig ausbildet. So existiert am Tag der Geburt die broad neuroblast layer (NBL), in der sich am vierten bis fünften Tag nach der Geburt die OPL mit ihren Ribbonsynapsen ausbildet (Kriegstein und Schmitz, 2003). Da die Retinoblastomazellen spontan veränderte Tumorzellen sind und die Retina wie vorher beschrieben eine postnatale Differenzierung in Aufbau und Struktur durchläuft, führt dies zu unterschiedlichen Eigenschaften von Retina und Retinoblastom in Aufbau und Funktion. Ein weiterer Hinweis auf die genetische Veränderung der Retinoblastome im Vergleich zur Retina ist das ebenfalls negative Ergebnis bei dem Versuch, Rhodopsin in den humanen Retinoblastomazellen (Y79) nachzuweisen. Rhodopsin ist ein spezifisches Protein der Retina, das bei Lichtreiz zur Erregung der Retinazellen führt (Karlson, 1994). Durch mehrmaliges Wiederholen der Western-Blot-Versuche mit den jeweiligen Proteinen konnten die negativen Resultate abgesichert werden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Retinoblastomazellen im Gegensatz zu den Retinazellen nicht auf dem gleichen Differenzierungsstand sind und daher die untersuchten Proteine nicht oder nur in

geringer Zahl aufweisen. Somit wurde versucht, die humanen Retinoblastomazellen nach Conway et al. (1997) auf einen höheren Differenzierungsgrad zu heben.

Conway et al. (1997) beobachtete durch Zusatz von Retininsäure zum Nährmedium der Retinoblastomazellen eine Zelldifferenzierung in Form von Ausbildung neuritenähnlicher Zellausläufer. Neuriten sind die Fortläufer von Nervenzellen. Am Ende dieser Fortläufer, der Neuritenendigung, kann die Nervenzelle über Synapsen mit weiteren Nervenzellen oder direkt mit den Zielzellen in Kontakt treten und die reizspezifischen Informationen in Form von Erregungsimpulsen übertragen. So wären bei der Differenzierung der Retinoblastomazellen mit Retininsäure neben der Ausbildung von den neuritenähnlichen Ausläufern auch die Ausbildung von Synapsen zu erwarten.

Darauf basierend wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die humanen Retinoblastomazellen (Y79) mit Hilfe von Retininsäure zu neuritenähnlichen Ausläufern zu differenzieren. Diese differenzierten Zellen sollten anschließend mit der Methode des Western-Blot auf synapsenspezifische Proteine untersucht werden. Neben den beschriebenen neuritenähnlichen Ausläufern führt der Zusatz von Retininsäure zum Nährmedium auch zu makroskopisch beurteilbaren Veränderungen in den Zellkulturen. Retininsäure hemmt das Wachstum der humanen Retinoblastomazellen (Conway et al., 1997). Zellkulturen ohne Retininsäurezusatz bilden im Nährmedium Zellkolonien aus, die sich zu aus mehreren Zellen bestehenden runden Päckchen zusammenfügen. Auch nach Zusatz von Retininsäure zum Nährmedium werden diese aus mehreren Zellen bestehenden Zellkolonien gebildet. Die einzelnen Zellen sind jedoch kleiner und die Anzahl der Zellen pro Kolonie ist reduziert.

Eine Retininsäurekonzentration von über 10  $\mu\text{M}$  im Nährmedium wurde von Conway et al. (1997) als toxisch für die Zellkulturen bezeichnet. Bei Überschreiten der Retininsäurekonzentration von 10  $\mu\text{M}$  wird ein vermehrter Zelltod in Form von Apoptose beschrieben. In Anlehnung an Conway et al. (1997) wurden in dieser Arbeit die Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  verwendet. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit 11  $\mu\text{M}$  Retininsäurekonzentration kultiviert, um auszutesten, ob diese geringe Überschreitung der Konzentrationsangabe schon zu einem vermehrten Zelltod in der Kultur führt. Kultiviert wurden alle drei Konzentrationen über 7 bzw. 10 Tage mit einer jeweiligen Negativkontrolle. Bei allen Kulturen, die mit den jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von Retininsäure versetzt wurden, konnten die makroskopisch beurteilbaren Veränderungen in Form von Wachstumshemmung der Retinoblastomazellen beobachtet werden. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung (siehe Ergebnisse, Abbildung 4.6 und 4.7) konnten jedoch keine neuritenähnlichen Ausläufer nachgewiesen werden. Es fanden sich Ausstülpungen der Zellmembranen, die auf Ansätze zu solchen Ausläufern schließen lassen könnten. Um dem nachzugehen, wurden die mit Retininsäure bearbeiteten Zellen bei einer größeren Vergrößerung im

Elektronenmikroskop (siehe Ergebnisse, Abbildung 4.8, 4.9 und 4.10) betrachtet. Um nachzuweisen, dass es sich bei den Zellmembranausstülpungen um Neuritenausläufer handelt, wurde in diesen Bereichen nach Anhäufungen von synaptischen Vesikeln gesucht, welche die entsprechenden synaptischen Proteine besitzen (Navone et al., 1986; Schmitz et al., 2000). Jedoch war keine Vesikelanhäufung in der Nähe der Zellmembranen festzustellen.

Neben den Zellmembranausstülpungen wurden die Bereiche, an denen zwei Zellen in Kontakt treten, näher betrachtet, um eventuelle Synapsenausbildungen zwischen den Zellen nachzuweisen. Die dazu erforderliche Membranverdickung der prä- und postsynaptischen Zellmembranen war ebenfalls wie die Synapsenvesikel nicht nachzuweisen. Der licht- und elektronenmikroskopische Aufbau der Zellen in allen Ansätzen entsprach sich unabhängig von der Retininsäurekonzentration im Nährmedium und der Kultivierungsdauer sowie in der retininsäurefreien Negativkontrolle. Auch bei 11  $\mu\text{M}$  Retininsäurekonzentration konnte kein vermehrter Zelltod festgestellt werden. Daher wird davon ausgegangen, dass der Zusatz von Retininsäure zum Nährmedium zwar zu einer Änderung der Zellkolonien im Medium in Form einer Wachstumshemmung geführt hat, darüber hinaus aber keine weitere Zelldifferenzierung stattgefunden hat. Durch mehrmaliges Wiederholen der Versuche wurde das Ergebnis der ausbleibenden Differenzierung gesichert. Obwohl sich im Vorgehen der Versuche exakt an die Beschreibung von Conway et al. (1997) gehalten wurde, konnte kein entsprechendes Ergebnis erzielt werden. Es muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass sich die Versuche dieser Arbeit zu den Untersuchungen von Conway et al. (1997) in einem grundlegendem Schritt der Versuchsdurchführung unterscheiden, der hier nicht nachvollzogen werden konnte. Da eine Differenzierung der Retinoblastomazellen sowohl in der Licht- als auch in der Elektronenmikroskopie ausgeschlossen wurde, wurde ebenfalls auf eine anschließende Untersuchung der mit Retininsäure versetzten kultivierten humanen Retinoblastomazellen auf synapsenspezifische Proteine verzichtet. Die humanen Retinoblastomazellen (Y79) konnten nicht als weiteres Kultursystem zur Untersuchung der Ribbonsynapsen und deren Exozytose gewonnen werden. Es lassen sich keine synapsenspezifischen Proteine für Ribbonsynapsen in ihnen nachweisen. Die humanen Retinoblastomazellen eignen sich nicht zur Untersuchung von Exozytose in Ribbonsynapsen.

### **5.3 Untersuchung zu synaptischen Proteinen in isolierten und kultivierten Pinealozyten**

Neben den humanen Retinoblastomazellen (Y79) wurden Einzel-Zellkulturen von Pinealozyten (Epiphysenzellen), die von 3 Wochen alten Sprague Dawley Ratten gewonnen wurden, auf die Expression von Ribbonsynapsenproteine untersucht. Für den Nachweis von Synapsenproteinen in den Pinealozyten wurde die Methode der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Mit einem Antikörper gegen das ubiquitäre synaptische Vesikelprotein Synaptobrevin (AK 69.1) konnte gezeigt werden, dass dieses wichtige synaptische Vesikelprotein in kultivierten Pinealozyten vorhanden ist.

Mit zwei spezifischen Antikörpern gegen RIBEYE (siehe Abb. 4.11), der Hauptkomponente von Synaptic Ribbons (Schmitz et al., 2000), konnte gezeigt werden, dass auch das für Ribbonsynapsen spezifische Protein RIBEYE in kleineren Pinealozyten exprimiert wird. Die Anwesenheit von Ribbons in kultivierten Pinealozyten konnte weiterhin durch einen Aktinantikörper bestätigt werden (Abb. 4.11), der mit einer Komponente der Ribbons kreuzreagiert (Schmitz et al.; in Vorbereitung). Dass das in den Pinealozyten beobachtete, mit C4-Aktin erzielte Ribbonsignal nicht auf einer Markierung mit filamentärem Aktin herrührt, wurde durch eine Doppelmarkierung mit Phalloidin-Rhodamin gezeigt. Phalloidin-Rhodamin bindet an filamentäres Aktin, aber nicht an Ribbons.

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie weiter zu sichern, wurde nach der Methode von Jastrow et al. (1997) versucht, die im präsynaptischen Anteil der Ribbonsynapsen befindlichen Ribbons durch Elektronenmikroskopie direkt nachzuweisen. Durch die Ultradünnschnitte der Präparate für das Elektronenmikroskop sind die meist tellerförmigen Ribbons als stabförmige Gebilde zu erkennen (Sjöstrand, 1958; Mc Cartney und Dickson, 1985; Rao Mikrotznik et al., 1995), die von vielen runden Vesikeln umgeben sind. Die Ribbons befinden sich hier häufig in unmittelbarer Nähe der präsynaptischen Zellmembran und stehen meist senkrecht zu dieser. Manche Ribbons lassen sich auch weiter im Zellinneren nachweisen. Während man sie meistens einzeln stehend findet, können sie auch in Gruppen parallel zueinander stehend vorkommen (Jastrow et al., 1997). Wie in der Abbildung 4.11 Zeile 5 des Ergebnisteils zu sehen ist, konnten stabförmige Gebilde mit daran assoziierten Vesikeln nachgewiesen werden. Die Zahl der mit den Ribbons assoziierten synaptischen Vesikeln war dabei geringer als in-situ, was möglicherweise durch noch zu optimierende Zellkulturbedingungen sowie durch den Verlust des Zellverbandes bedingt ist. Die Ribbons waren immer einzeln stehend und in der Hälfte der Fälle befanden sie sich in der Nähe der Zellmembran. Jedoch wurden sie nicht senkrecht stehend zu dieser beobachtet, was durch einen nicht entsprechenden

Schnittwinkel der Zellen oder auch durch einen geringeren Differenzierungsgrad der dissoziierten Pinealocyten im Vergleich zum intakten Gewebe erklärt wird (Abdissoziierung der Ribbons von der Plasmamembran). Durch die vorangestellten übereinstimmenden Ergebnisse in der Fluoreszenzmikroskopie und die typische Morphologie der Strukturen in der Elektronenmikroskopie darf geschlussfolgert werden, dass es sich bei diesen Abbildungen um Ribbons handelt. Diese Annahme wird vor allem dadurch unterstützt, dass es sich um Gebilde handelt, die in ihrem spezifischen Aussehen in den verschiedenen Präparaten dieser Arbeit immer wiederkehren und den Beschreibungen von Jastrow et al. (1997) entsprechen.

Durch die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie und deren Bestätigung mit dem Elektronenmikroskop konnte in dieser Arbeit die Existenz von Ribbonsynapsen in den Pinealocyten Einzel-Zellkulturen der Sprague Dawley Ratte nachgewiesen werden.

Während in der Zelllinie der humanen Retinoblastomazellen (Y79) keine Ribbonsynapsen bzw. synapsenspezifischen Proteine nachweisbar sind, lassen sich in den kultivierten Pinealocyten Einzel-Zellkulturen der Sprague Dawley Ratte Ribbonsynapsen nachweisen. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit die aus Pinealocyten gewonnene Einzel-Zellkultur als ein geeignetes Kulturmodell zur weiteren funktionellen Charakterisierung der Ribbonsynapsen gewonnen. Somit erscheinen kultivierte Pinealocyten als ein potentiell viel versprechendes System, um Ribbonsynapsen in einem Zellsystem zu untersuchen. Dies gilt es durch weitere Untersuchungen abzusichern und weiter zu vertiefen.

## **6 Literaturverzeichnis**

1. Albert, D.M., Dalton, A.J., Rabson, A.S. (1970): Microtubules in retinoblastoma. *Amer J Ophthal.* 69, 296-300.
2. Aoudjit, F., Bosse, M., Stratowa, C., Voraberger, G., Audette, M. (1994): Regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by retinoic acid: analysis of the 5' regulatory region of the gene. *Int J Cancer.* 58, 543.
3. Arnold, G., Beier, H.M., Hermann, M., Kaufmann, P., Kretschmann, H.-J., Kühnel, W., Schiebler, T.H., Schmidt, W., Steiniger, B., Winckler, J., van der Zypen, E. und Zilles, K. (1997): Histologie, Gewebelehre. In: Schiebler T.H., Schmidt W., Zilles K. (Hrsg.); Kapitel: Anatomie, Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen. 7. Auflage. *Springer Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York 35-99.
4. Axelrod, J. (1974): The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184, 1341-1348.
5. Bains, H.S., Barker, N.A., Adler, R. (1994): Developmental expression of retinoic acid receptors in the mouse retina in vivo and in purified retinal cultures in vitro. *ARVO Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35, 2075.
6. Bergmann, M., Post, A., Rittel, A., Bechmann, I., Nitsch, R. (1997): Expression of synaptophysin in sprouting neurons after entorhinal lesion in the rat. *Exp Brain Res* 117:80-86.
7. Brandstätter, J.H., Wässle, H., Betz, H., Morgans, C.W. (1996a): The plasma membran protein SNAP-25, but not syntaxin, is present at photoreceptor and bipolar cell synapses in the rat retina. *Eur J Neurosci.* 8, 823-828.
8. Brandstätter, J.H., Löhrke, S., Morgans, C.W., Wässle, H. (1996b): Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in the mammalian retina. *J Comp Neurol.* 370, 1-10.
9. Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C., Jahn, R. (1992): Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science.* 256, 1021-1025.

10. Bühling, K.J., Lepenies, J., Seiffert, K., Witt, K. (2000): Tumoren. In: Bühling, K.J., Lepenies, J., Witt, K. (Hrsg.) Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 2. Auflage. *Urban und Fischer Verlag*, München, Jena.
11. Cameron, P., Mundigl, O., De Camilli, P. (1993): Traffic of synaptic vesicle proteins in polarized and nonpolarized cells. *J Cell Sci* 17:93-100.
12. Choux, R., Tripiet, M.F., Berard, M., Hassoun, J., Toga, M. (1972): Ultrastructure d'une tumeur de la retine. *Bulletin du Cancer* 59: 301-314.
13. Confaloni, A., Lyckman, A.W., Moya, K.L. (1997): Developmental shift of synaptic vesicle protein 2 from axons to terminals in the primary visual projection of the hamster. *Neuroscience* 77:1225-1236.
14. Conway, R.M., Madigan, M.C., King, N.J.C., Billson, F.A., Penfold, P.L. (1997): Human retinoblastoma: in vitro differentiation and immunoglobulin superfamily antigen modulation by retinoic acid. *Cancer Immunol Immunother.* 44, 189-196.
15. del Cerro, M., Notter, M.F., Seigel, G., Lazar, E., Chader, G., del Cerro, C. (1992): Intraretinal xenografts of differentiated human retinoblastoma cells integrate with the host retinae. *Brain Res.* 583, 12-22.
16. Dickson, D.H., Ramsey, M.S., Tonus, J.G. (1976): Synapse formation in retinoblastoma tumours. *Brit. J. Ophthalmol.* 60, 371.
17. Dowling, J.E. (1987): *The Retina: An Approachable Part of the brain.* (Cambridge, MA: *Harvard University Press*).
18. Drifhout, W.J., Grol, C.J., Westerink, B.H.C. (1996): Parasympathetic inhibition of pineal indole metabolism by prejunctional modulation of noradrenaline release. *Eur J Pharmacol.* 308, 117-124.
19. Edelmann, L., Hanson, P.I., Chapman, E.R., Jahn, R. (1995): Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machinery. *EMBO J.* 14, 224-231.

20. Fenster, S.D., Kessels, M.M., Qualmann, B., Chung, W.J., Nash, J., Gundelfinger, E.D., Garner, C.C. (2003): Interactions between Piccolo and the Actin/Dynamin-binding Protein Abp 1 Link Vesicle Endocytosis to Presynaptic Active Zones. *J Biol Chem* 278:20266-20277.
21. Flexner, S. (1891): A peculiar glioma (neuroepithelion) of the retina. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 2, 115-119.
22. Foulkes, N.S., Borjigin, J., Snyder, S.H., Sassone-Corsi, P. (1997): Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends Neurosci.* 20, 487-492.
23. Grabs, D., Bergmann, M., Schuster, T.H., Fox, P.A., Brich, M., Gratzl, M. (1994): Differential expression of synaptophysin and synaptoporin during pre- and postnatal development of the rat hippocampal network. *Eur J Neurosci* 6:1765-1771.
24. Gray, E.G., Pease, H.L. (1971): On understanding the organization of the retinal receptor synapses. *Brain Res.* 35, 1-15.
25. Guzman, Y. (1981): SV40 transformed simian cell support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 23, 175-182.
26. Heidelberger, R., Matthews, G. (1992): Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J Physiol. (Lond.)* 447, 235-256.
27. Hepp, R., Langley, K. (2001): SNAREs during development. *Cell Tissue Res* 305:247-253.
28. Hering, H., Kröger, S. (1996): Formation of synaptic specialization in the inner plexiform layer of the chick retina. *J Comp Neurol* 375:393-405.
29. Hospu, V.K., Arstila, A.U. (1964): An apparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of the rat. *Exp Cell Res.* 37, 484-487.
30. Jacobson, E.L., Mingkwan, M., Abdoul-Ela, N., Jacobson, M.K. (1989): Endogenous ADP-Ribosylation of Proteins at cystein Residues. In Jacobsons, M.K., E.L. (Hrsg.): ADP-ribose transfer reactions: mechanismus and biol. Significance. *Springerverlag*, New York. Berlin, Heidelberg.

31. Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C., Greengard, P. (1985): A 38000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicle. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82, 4137-4141.
32. Jahn, R., Lang, T., Südhof, T.C. (2003): Membrane fusion. *Cell*.112(4), 513-533.
33. Jastrow, H., von mach, M.A., Vollrath, L. (1997): The shape of synaptic ribbons in the pineal gland. *Cell Tissue Res.* 287, 55-261.
34. Jastrow, H., Schmanke, D., Weinert, J. 2004: Bizarre alterations of the morphology of pineal synaptic bodies under constant light and an evaluation of suitable 3D-reconstruction software. *science@direkt*. [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com), aufgerufen am 17.11.2004.
35. Johnston, P.A., Jahn, R., Südhof, T.C. (1989): Transmembrane topography and evolutionary conservation of synaptophysin. *J Biol Chem.* 264, 1268-1273.
36. Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., (1996): Neurowissenschaften. *Spektrum akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, Oxford.
37. Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1993): Spezielle biochemische Funktionen einiger Organe. In: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage. *Georg Thieme Verlag* Stuttgart, New York 489-554.
38. Katsanis, N., Fisher, E.M. (1998): A novel C-terminal binding protein (CtBP2) is closely related to CtBP1, and adenovirus E1A-binding, and maps to human chromosome 21q21.2. *Genomics.* 47. 294-299.
39. Kelly, R.B. (1993): Storage and release of neurotransmitters. *Cell.* 72, 43-53.
40. Klein, D.C. (1985): Photoneural regulation of the mammalian pineal gland (Ciba Foundation Symposium 117): Photoperiodism, melatonin and the pineaö gland ( Evered D., and Clark S. eds), pp 38-56. *London: Pitmann.*
41. Korf, H.W., Schomerus, C., Maronde, E., Stehle, J.H. (1996): Signal transduction molecules in the rat pineal organ: Ca<sup>2+</sup>, pCREB and ICER. *Naturwissenschaften.* 83, 535-543.

42. Kriegstein, K., Schmitz, F. (2003): The expression pattern and assembly profile of synaptic membrane proteins in ribbon synapses of the developing mouse retina. *Cell Tissue Res.* 311, 159-173.
43. Kus, L., Handa, R.J., McNulty, J.A. (1994): Glutamate inhibition of the adrenergically-stimulated production of melatonin in rat pineal gland in vitro. *J Neurochem.* 62, 2241-2245.
44. Lenzi, D., Runyeon, J.W., Crum, J., Ellisman, M.H., Roberts, W.M. (1999): Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J Neurosci.* 19, 119-132.
45. Lerner, L.E., Gribanova, Y.E., Ji, M., Knox, B.E., Farber, D.B. (2001): Nrl and Sp nuclear proteins mediate transcription of rod-specific cGMP-phosphodiesterase beta-subunit gene: involvement of multiple response elements. *J Biol. Chem.* 276(37), 34999-5007.
46. Littleton, J.T., Upton, L., Kania, A. (1995): Immunocytochemical analysis of axonal outgrowth in synaptotagmin mutations. *J Neurochem* 65:32-40.
47. Lunch, B.A., Lambeng, N., Nocka, K., Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A., Fuks, B. (2004): The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *PNAS* 26:9861-9866.
48. Maden, M., Holder, N. (1992): Retinoic acid and development of the central nervous system. *Bioessays.* 14, 431.
49. McNulty, J.A., Fox, L.M., Taylor, D., Miller, M., Takaoka, J. (1986): Synaptic ribbon populations in the pineal gland of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Cell Tissue Res.* 243, 353-357.
50. Merker, R. (1997): Allgemeine Neuro- und Sinnesphysiologie. In: Hick C. und A. (Hrsg.): Physiologie, Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1 mit Einarbeitung der wichtigen Prüfungsfakten, 2. Auflage. *Gustav Fischer Verlag*, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm 263-283.
51. Morgans, C.W., Brandstätter, J.H., Kellermann, J., Betz, H., Wässle, H. (1996): A SNARE complex containing syntaxin 3 is present in ribbon synapses of retina. *J Neurosci.* 16, 6713-6721.

52. Moriyama, Y., Yamamoto, A. (1995): Microvesicles isolated from bovine pineal gland specifically accumulate L-glutamate. *FEBS Lett.* 367, 233-236.
53. Moriyama, Y., Yamamoto, A. (1995b): Vesicular L-glutamate transporter in micrivesicles from bovine pineal glands. *J Biol Chem.* 270, 22314-22320.
54. Nachman-Clewner, M., St. Jules, R., Townes-Anderson, E. (1999): L-type calcium channels in the photoreceptor ribbon synapse: localization and role in plasticity. *J Comp Neurol.* 415, 1-16.
55. Ohkuma, M., Amemiya, Tsugio, Koyama Shin-ichi: Synapse-like Structures in Retinoblastoma. *Acta Soc. Ophthalm. Jap.:* 78, 1392-1400.
56. Osen-Sand, A., Staple, J.K., Naldi, E., Schiavo, G., Rossetto, O., Petitpierre, S., Malgaroli, A., Montecucco, C., Catsicas, S. (1996): Common and distinct fusion proteins in axonal growth and transmitter release. *J Comp Neurol* 367:222-234.
57. Parsons, T.D., Lenzi, D., Almers, W., Roberts, W.M. (1994): Calcium-triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell: capacitance measurements in saccular hair cells. *Neuron.* 13, 875-883.
58. Pojito, P.P., Govitrapong, P., Ebadi, M. (1991b): Inhibitory actions of muscarinic cholinergic receptor agonists on serotonin N-acetyltransferase in bovine pineal explants in cultures. *Neurochem Res.* 16, 885-889.
59. Poortinga, G., Watanbe, M., Parkhurst, S.M. (1998): *Drosophila* CtBP: a hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* 17, 2067-2078.
60. Radnót, M. (1975): Synaptic lamellae in retinoblastoma. *Amer. J. Ophthalm.* 79, 393-405.
61. Radnót, M. (1977): Elements of photoreceptors in retinoblastomas (authors transl.). *Albrecht von Graefe Arch. Klein. Exp. Ophthalm.* 202, 63-70.
62. Rao- Mikrotznik. R., Harkins, A.B., Buchsbaum, G., Sterling, P. (1995): Mammalian rod termina: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14, 561-569.

63. Reiter, J. (1991): Pineal gland: interaction between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol Metab.* 13-19.
64. Rieke, F., Schwartz, E.A. (1996): Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse. *J Physiol.* (Lond.) 493, 1-8.
65. Riemann, R. (1990): Morphologische und biochemische Aspekte der Zirbeldrüse vasopressindefizienter Brattleboro-Ratten. Inauguraidissertation, Fachbereich Medizin, *J Gutenberg Universität Mainz.*
66. Robertson, G.N., Dickson, H. (1987): Day-night differences in the number and structure of synaptic ribbons in chick pineal. *J Pineal Res.* 4, 135-145.
67. Sarthy, P.V., Bacon, W. (1985): Developmental expression of synaptic vesicle-specific protein in the retina. *Dev Biol* 112:284-291.
68. Schaeffer, S.F., Raviola, E., Heuser, J.E. (1982): Membrane specializations in the outer plexiform layer of the turtle retina. *J Comp Neurol.* 204, 253-267.
69. Schaeper, U., Boyd, J.M., Sulekha, V., Uhlmann, E., Subramanian, T., Chinnadurai, G. (1995): Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92, 10467-10471.
70. Schmitz, F., Bechmann, M., Drenckhahn, D. (1996): Purification of synaptic ribbons, structural components of the active zone complex in photoreceptor synapses. *J Neurosci.* 16, 7109-7116.
71. Schmitz, F., Königstorfer, A., Südhof, T.C. (2000): RIBEYE, a Component of Synaptic Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight Synaptic Ribbon Function. *Neuron.* 28, 857-872.
72. Segars, J.H., Nagata, T., Bours, V., Medin, JA., Franzoso, G., Blanco, JCG., Drew, PD., Becker, KG., An, J., Tang, T., Stephany, DA., Neel, B., Siebenlist, U., Ozato, K., (1993): Retinoic acid induction of major histocompatibility complex class I genes in Ntera-2 embryonal carcinoma cells involves induction of NF- $\kappa$ B (p50-p65) and retinoic acid receptor  $\beta$ -retinoid X receptor  $\beta$  heterodimers. *Mol Cell Biol.* 13, 6157.

73. Smith, S.J., Augustin, G.J. (1988): Calcium ions, active zones and synaptic transmitter release. *Trends Neurosci.* 11, 458-464.
74. Smith, C.A., Sjöstrand, F.S. (1961): A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J Ultrastruct Res.* 5, 523-556.
75. Spiwoks-Becker, I. (1995): Untersuchungen zur Plastizität retinaler und pinealer Synaptic Ribbons. Inauguraldissertation, Fachbereich Biologie, *J Gutenberg-Universität Mainz.*
76. Stankov, B., Cimino, M., Marini, P., Lucini, V., Fraschini, F., Clementi, F. (1993): Identification and functional significans of nicotinic cholinergic receptors in the rat pineal gland. *Neurosci Lett.* 156, 131-134.
77. Sterling, P. (1998): The Retina. In *The Synaptic Organization of the brain*, Fourth Edition, G Shepherd, ed. (New York: *Oxford University Press*), pp. 205-253.
78. Stevens, C.F., Tsujimoto, T. (1995): Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92, 846-849.
79. Südhof, T.C., Jahn, R. (1991): Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron.* 6, 665-77.
80. Südhof, T.C. (2004): The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* 27, 509-547.
81. Theron, J.J., Biagio, R., Meyer, A.C. (1981): Circadian changes in microtubules, synaptic ribbons and synaptic ribbon fields in the pinealocytes of the baboon (*Papio ursinus*). *Cell Tissue Res.* 217, 405-413.
83. Thomas, C. und Schmid, K.W. (2001): Endokrines System. In: Thomas C. (Hrsg.): *Histopathologie, Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie*, 13. Auflage. *Schattauer Verlag*, Stuttgart, New York 271.
84. tom Dieck, S., Altrock, W.D., Kessels, M.M., Qualmann, B., Regens, H., Brauner, D., Fegtova, A., Bracko, O., Gundelfinger, E.D. (2005): Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential fort he assembly of the ribbon complex. *J Cell Biol.* 168(5), 825-36.

85. Trujillo-Cenoz, O. (1972): The structural organizations of the compound eye in insects. In *Handbook of Sensory Physiology, Volume VII/2, Physiology of Photoreceptor Organs*, M.G.F. Fuortes, Ed. (New York: *Springer Verlag*), pp. 5-62.
86. T'so, M.O., Fine, B.S., Zimmermann, L.E. (1970): The nature of retinoblastoma. II. Photoreceptor differentiation: an electron microscopic study. *Armer J. Ophthalmol.* 69, 350-359.
87. Turner, J., Crossley, M. (1998); Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Krüppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *EMBO J.* 17, 5129-5140.
88. Ullrich, B., Südhof, T.C. (1994): Distribution of synaptic markers in the retina: implications for synaptic vesicle traffic in ribbon synapses. *J Physiol.* 88, 249-257.
89. van Wyk, E., Daya, S. (1994): Glutamate inhibits the isoprenaline-induced raise in melatonin synthesis by organ cultures of rat pineal glands. *Med Sci Res.* 22, 635-636.
90. Vollrath, L., Schultz, R.L., McMillan, P.J. (1983): "Synaptic" ribbons and spheres of the guinea-pig pineal gland: inverse day/night differences in number. *Am J Anat.* 168, 67-74.
91. von Gersdorff, H., Vardi, E., Matthews, G., Sterling, P. (1996): Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron.* 16, 1221-1227.
92. von Kriegstein, K., Schmitz, F., Link, E., Südhof, T.C. (1999): Distributions of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses. *Eur J Neurosci.* 11, 1335-1348.
93. Walch-Solimena, C., Jahn, R., Südhof, T.C. (1993): Synaptic vesicle proteins in exocytosis: what do we know? *Curr Opin Neurobiol.* 3, 329-336.
94. Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E.R., von Mollard G.F., Jahn, R. (1995): The t-SNARE syntaxin and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol.* 128, 637-645.
95. Wan, H.I., DiAntonio, A., Fetter, R.D., Bergstrom, K., Strauss, R., Goodman, C.S. (2000): Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron.* 26, 313-329.

96. Wan, L., Almers, W., Chen, W. (2005): Two ribeye genes in teleost: the role of Ribeye in Ribbon formation and bipolar cell development. *J. Neurosci.* 25, 941-949.
97. Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., Südhof, T.C. (1997): RIM is a putativ Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature.* 388, 593-598.
98. Wintersteiner, H. (1897): Das Neuroepithelioma *Retinae* 14. *Leipzig.*
99. Yamada, H., Yamamoto, A., Yodozawa, S., Kozaki, S., Takahashi, M., Michibata, H., Morita, M., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Moriyama, J. (1996a): Microvesicle-mediated exocytosis of glutamate is a novel paracrine-like chemical transduction mechanism and inhibits melatonin secretion in rat pinealocytes. *J Pineal Res.* 21, 175-191.
100. Yamada, H., Yamamoto, A., Takahashi, M., Michibata, H., Kumon, H., Moriyama, J. (1996b): The L-type  $Ca^{2+}$  channel is involved in microvesicle-mediated glutamate exocytosis from rat pinealocytes. *J Pineal Res.* 21, 165-174.
101. Yamada, H., Yatsushiro, S., Ishio, S., Hayashi, M., Nishi, T., Yamamoto, A., Futai, M., Yamaguchi, A., Moriyama, J. (1998): Metabotropic glutamate receptors negatively regulate melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci.* 18, 2056-2062.
102. Yatsushiro, S., Yamada, H., Kozaki, S., Kumon, H., Michibata, H., Yamamoto, A., Moriyama Y. (1997): L-Aspartat but not the D form is secreted through microvesicle-mediated exocytosis and is sequestered through  $Na^{+}$  -dependent transfer in rat pinealocytes. *J Neurochem.* 69, 340-347.
103. Zhang, H., Levine, M. (1999): Groucho and dCtBP mediate separate pathways of transcriptional repression in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci. USA* 96, 535-540

## **Danksagung**

An dieser Stelle danke ich ganz herzlich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Frank Schmitz sowohl für die Betreuung im Labor, als auch für die tatkräftige Unterstützung beim Schreiben. Er hatte immer eine „offene Tür“ für mich und nahm sich bei allen Fragen, Problemen und Verständnisschwierigkeiten die Zeit, mir zu helfen. Danke !

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des anatomischen Instituts der Universität Leipzig, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Ganz besonders danke ich Frau Judith Craatz und Frau Constanze Franke, die mir bei der Arbeit im Labor täglich zur Seite standen.

**Lebenslauf: Angelika Haffner, geb. Schneider**

<u>Geburtstag/-ort</u>	21.02.1978	Mainz
<u>Grundschule</u>	1984-1988	Maler-Becker-Grundschule, Mainz
<u>Gymnasium</u>	1988-1995	Gymnasium Mainz-Gonsenheim
	1995-1997	Integrierte Gesamtschule Mainz
	1997	Schulabschluss mit Abitur
<u>Studium</u>	1997	Humboldtuniversität Berlin Studium der Humanmedizin
	2000	Wechsel an die Universität Leipzig
	2005-05-09	Studiumsabschluss mit Ärztlicher Prüfung (3. Staatsexamen)
<u>Dissertation</u>	seit 2002	Etablierung eines Zellkultursystems zur Untersuchung von Exozytosen in Ribbon-Synapsen, Anatomisches Institut der Universität Leipzig, Betreuer: Prof. Dr. med. F. Schmitz
<u>Approbation</u>	2005-05-10	Erteilt vom Regierungspräsidium Leipzig
<u>Berufsstart</u>	2005-06-01	Assistenzärztin an der Universitätsaugenklinik Mainz

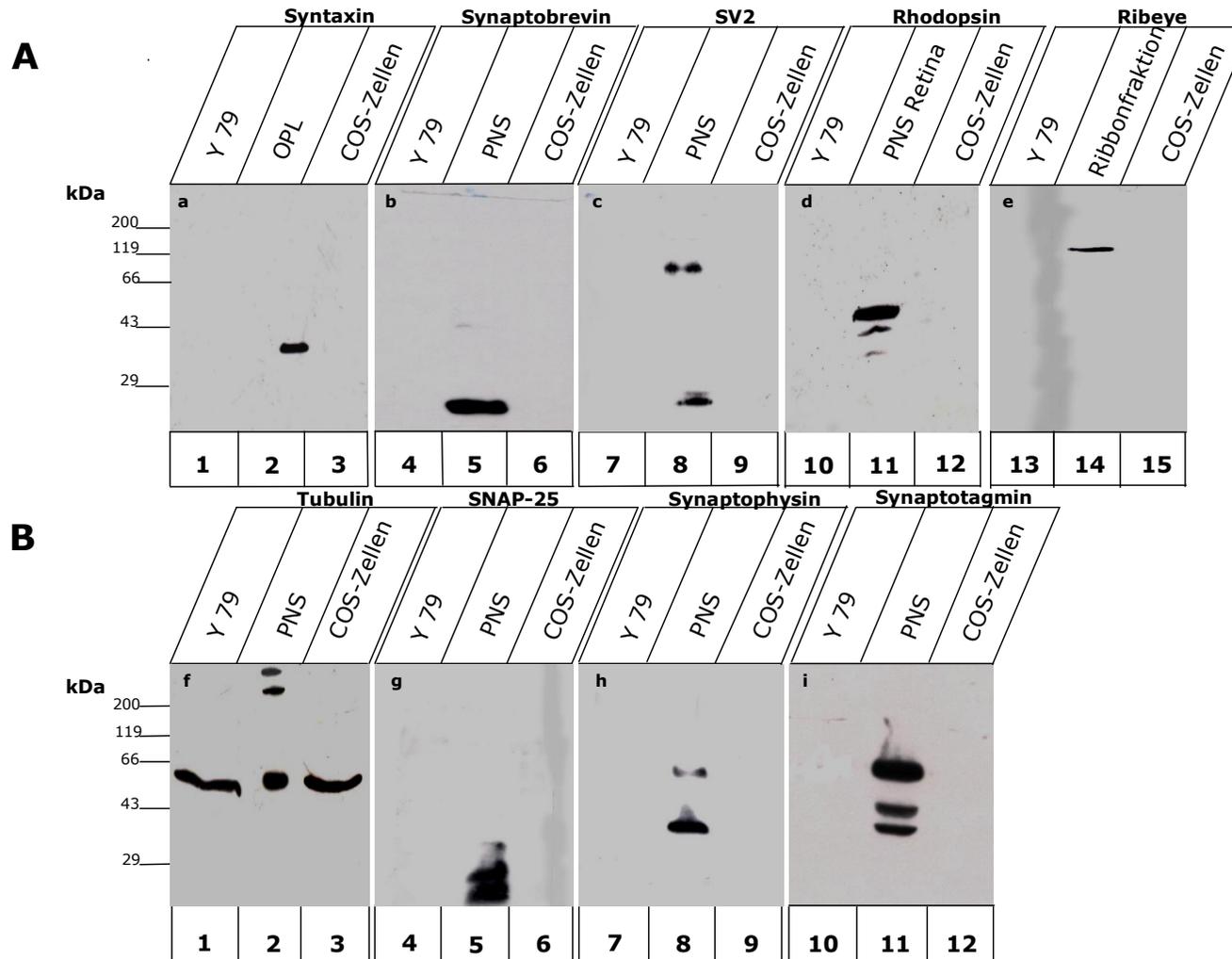


Abb. 4.5: Western-Blot Versuche zum Nachweis spezifischer Proteine in Y79 Zellen: A: Syntaxin in Spur 2 bei 35 kDa, Synaptobrevin in Spur 5 bei 17/16 kDa, Sv2 in Spur 8 bei 110 kDa, Rhodopsin in Spur 11 bei 53 kDa, RIBEYE in Spur 14 bei 120 kDa

B: Tubulin in Spur 1, 2 und 3 bei 55 kDa, SNAP-25 in Spur 5 bei 25 kDa, Synaptophysin in Spur 8 bei 38 kDa, Synaptotagmin in Spur 11 bei 65 kDa. Die experimentellen Proben sind in den Spuren #1, 4, 7, 10, 13 (A), sowie #1, 4, 7, 10 (B) aufgetragen. In den Spuren #2, 5, 8, 11, 14 (A), sowie #2, 3, 5, 8, 11 (B) befinden sich die entsprechenden Positivkontrollen und in den Spuren #3, 6, 9, 12, 15 (A), sowie #6, 9, 12 (B) die entsprechenden Negativkontrollen.

### Inkubationszeit von 7 Tagen (7d)

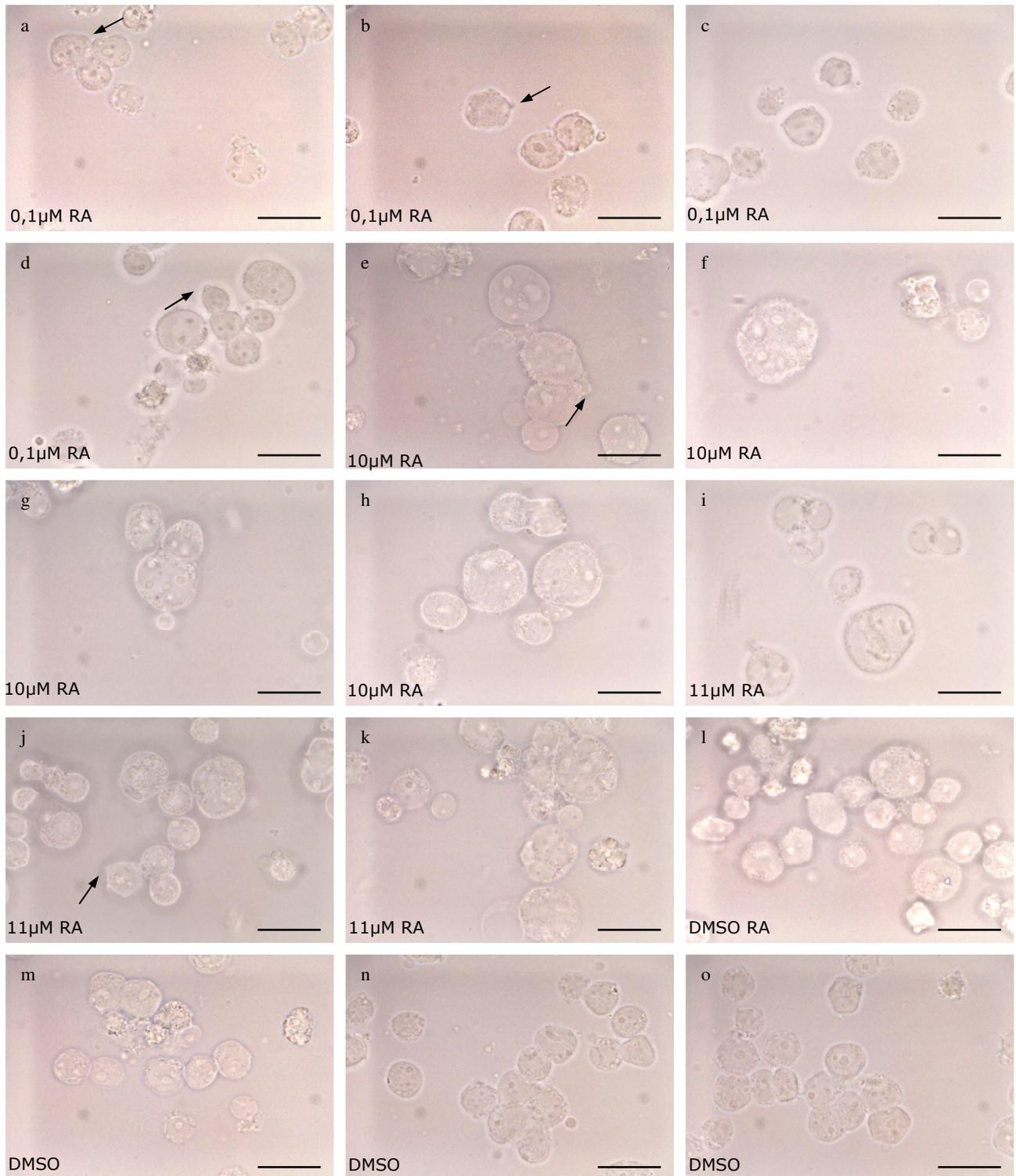


Abb. 4.6: Durchlichtmikroskopie der Y79 Zellen, die in mit Retininsäure (RA) versetztem Nährmedium für 7 Tage kultiviert wurden. a-d mit 0,1 μM Retininsäure-Lösung, e-h mit 10 μM Retininsäure-Lösung, i-k mit 11 μM Retininsäure-Lösung und l-o mit DMSO als Negativkontrolle. Pfeile in a, b, d, e und j: vereinzelte Ausstülpungen der Zellmembran. Skalierungsbalken, 30 μm.

### Inkubationszeit von 10 Tagen (10d)

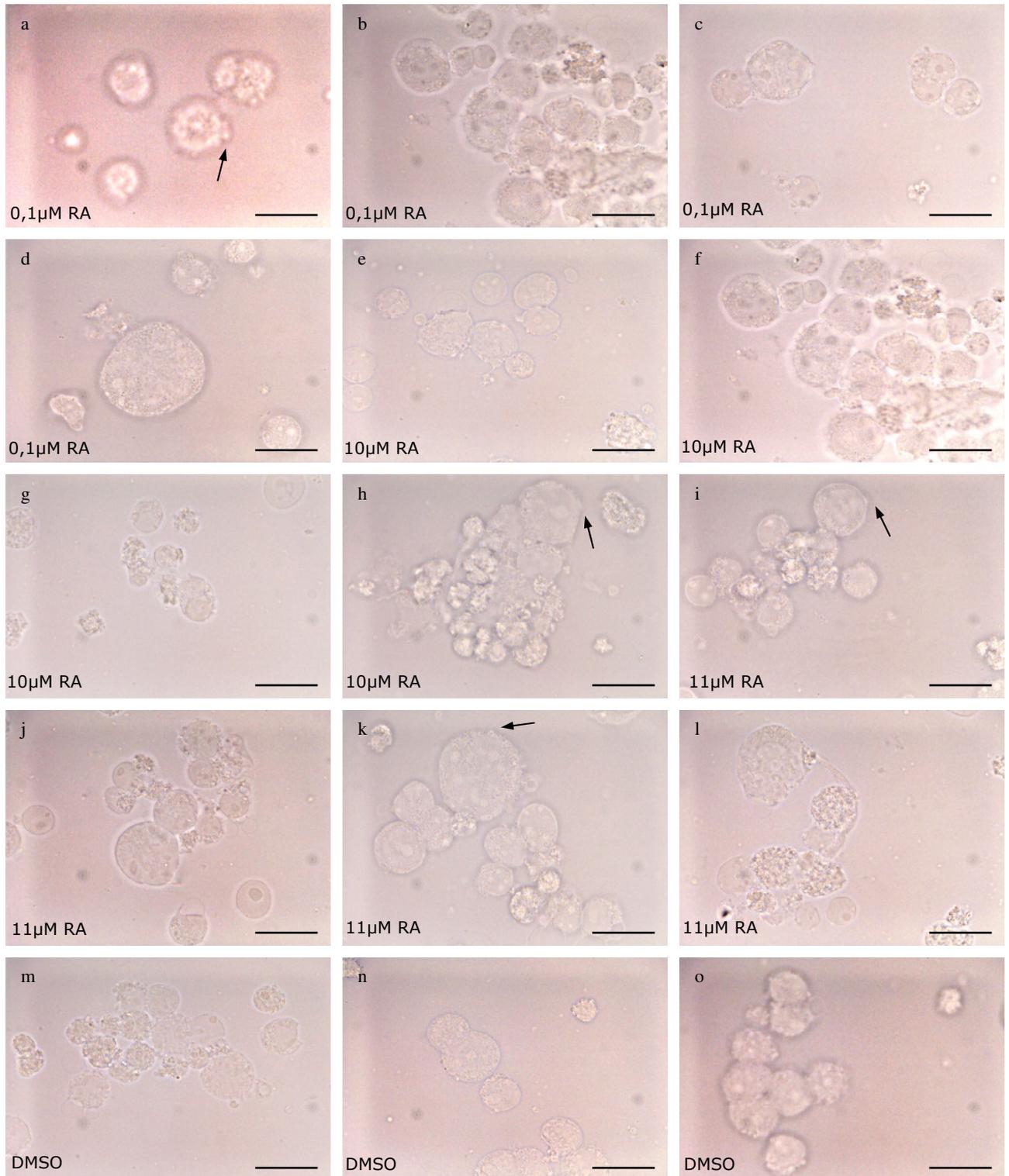


Abb. 4.7: Durchlichtmikroskopie der Y79 Zellen, die in mit Retininsäure (RA) versetztem Nährmedium für 10 Tage kultiviert wurden. a-d mit 0,1 µM Retininsäure-Lösung, e-h mit 10 µM Retininsäure-Lösung, i-l mit 11 µM Retininsäure-Lösung und m-o mit DMSO als Negativkontrolle. Pfeile in a, h, i und k: Ausstülpungen der Zellmembran. Skalierungsbalken, 30µm.

Y79 Zellen mit 0,1 $\mu$ M Retininsäure nach 10 Tagen Inkubation

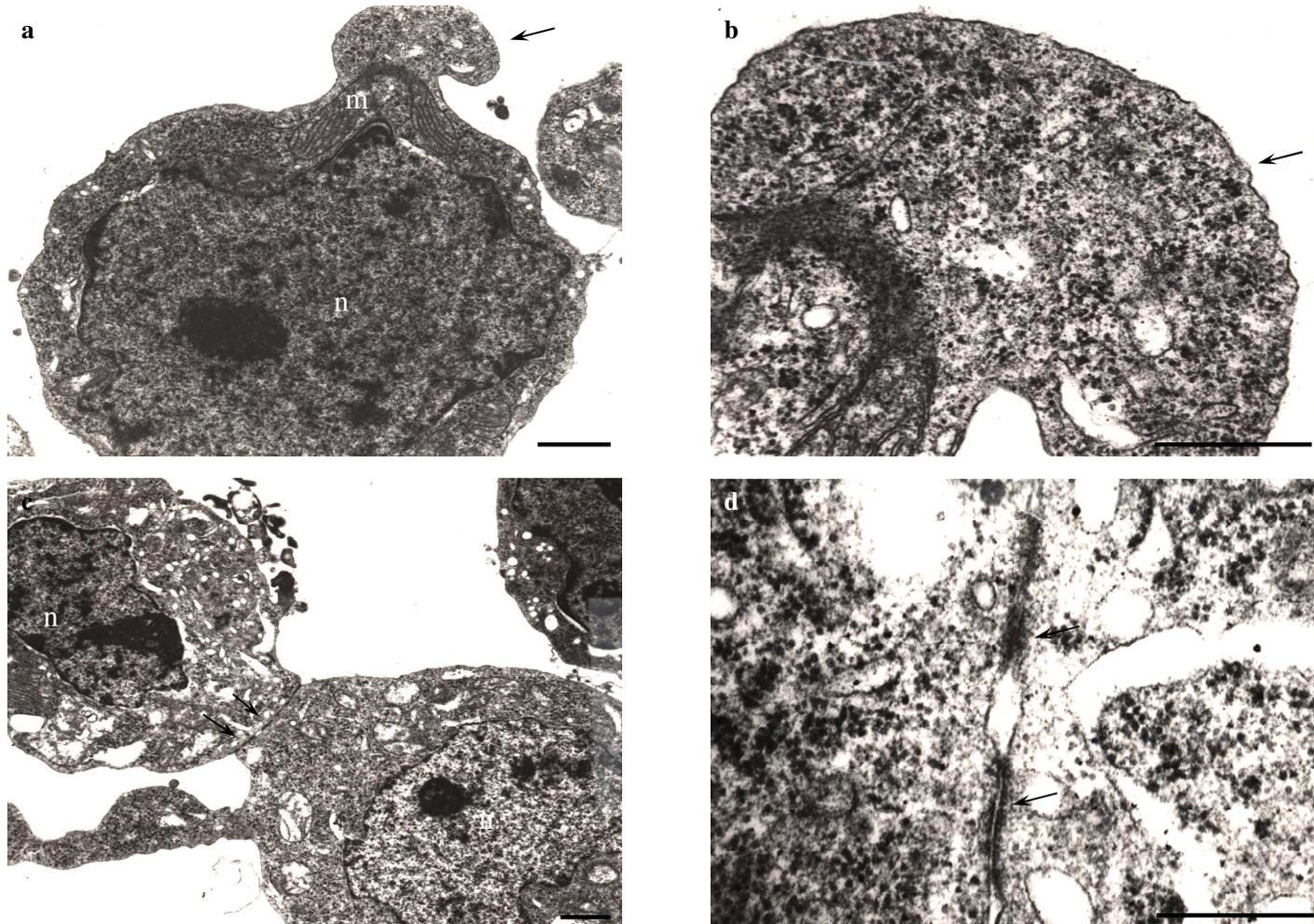


Abb. 4.8: Elektronenmikroskopie von Y79 Zellen nach 10 Tagen Kultivierung in 0,1 $\mu$ M Retininsäurelösung. a: schwarzer Pfeil Zellmembranausstülpung, in b als Ausschnitt weiter vergrößert. c: Kontaktzone zweier Zellen, in d als Ausschnitt weiter vergrößert. n: Nucleus (Zellkern), m: Mitochondrien. Skalierungsbalken: a und c: 2 $\mu$ m; b und d: 1 $\mu$ m.

Y79 Zellen mit 10 $\mu$ M Retininsäure nach 10 Tagen Inkubation

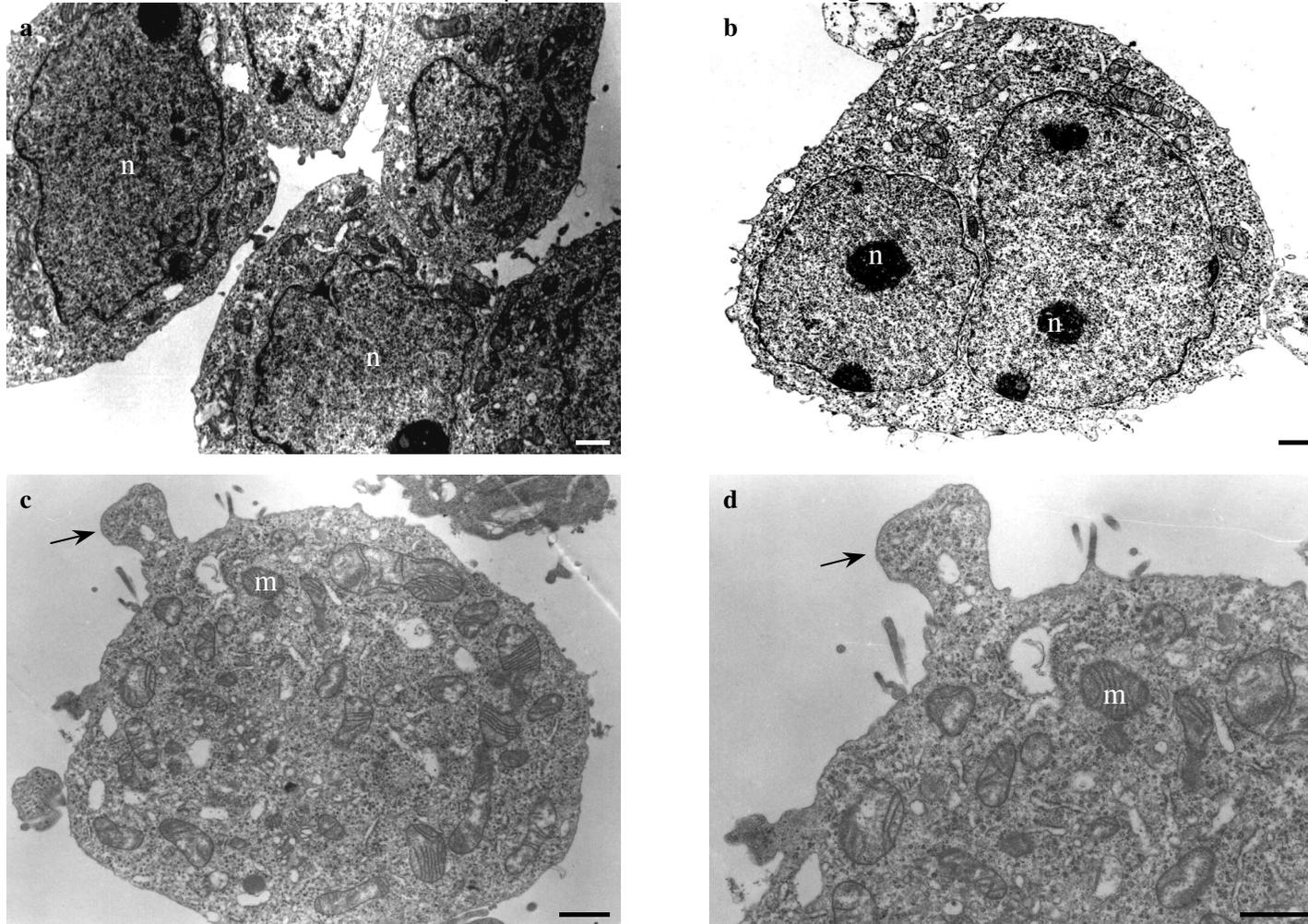


Abb. 4.9: Elektronenmikroskopie von Y79 Zellen nach 10 Tagen Kultivierung in 10 $\mu$ M Retininsäure. c: schwarzer Pfeil: Zellmembranausstülpung, in d als Ausschnitt weiter vergrößert. n: Nucleus, m: Mitochondrien. Skalierungsbalken: 2 $\mu$ m.

Y79 Zellen Negativkontrolle nach 10 Tagen Inkubation

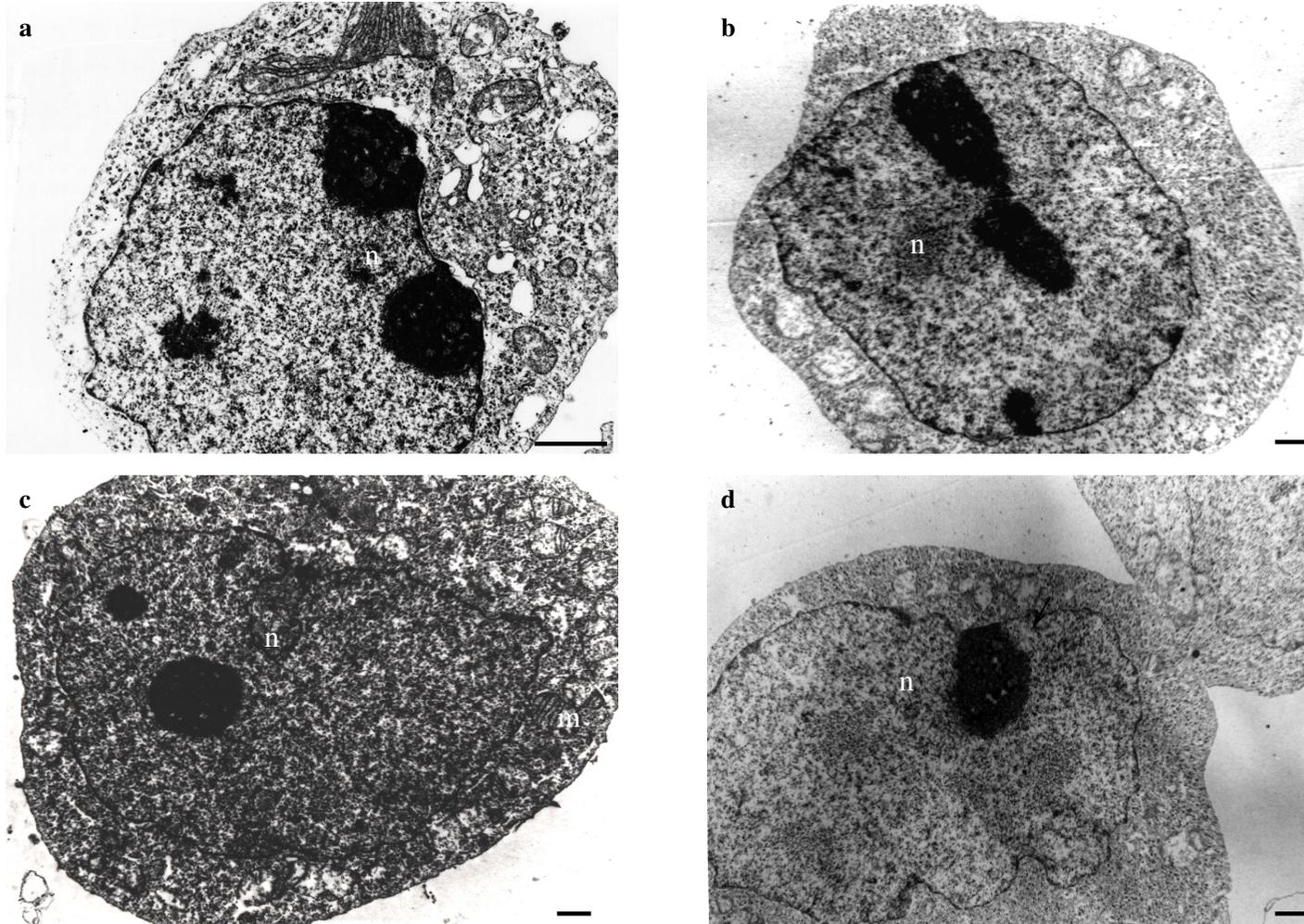


Abb. 4.10: Elektronenmikroskopie von Y79 Zellen nach 10 Tagen Kultivierung in DMEM-Zellkulturmedium, dem DMSO alleine zugesetzt wurde, als Negativkontrolle. n: Nucleus. Skalierungsbalken: 2 $\mu$ m.

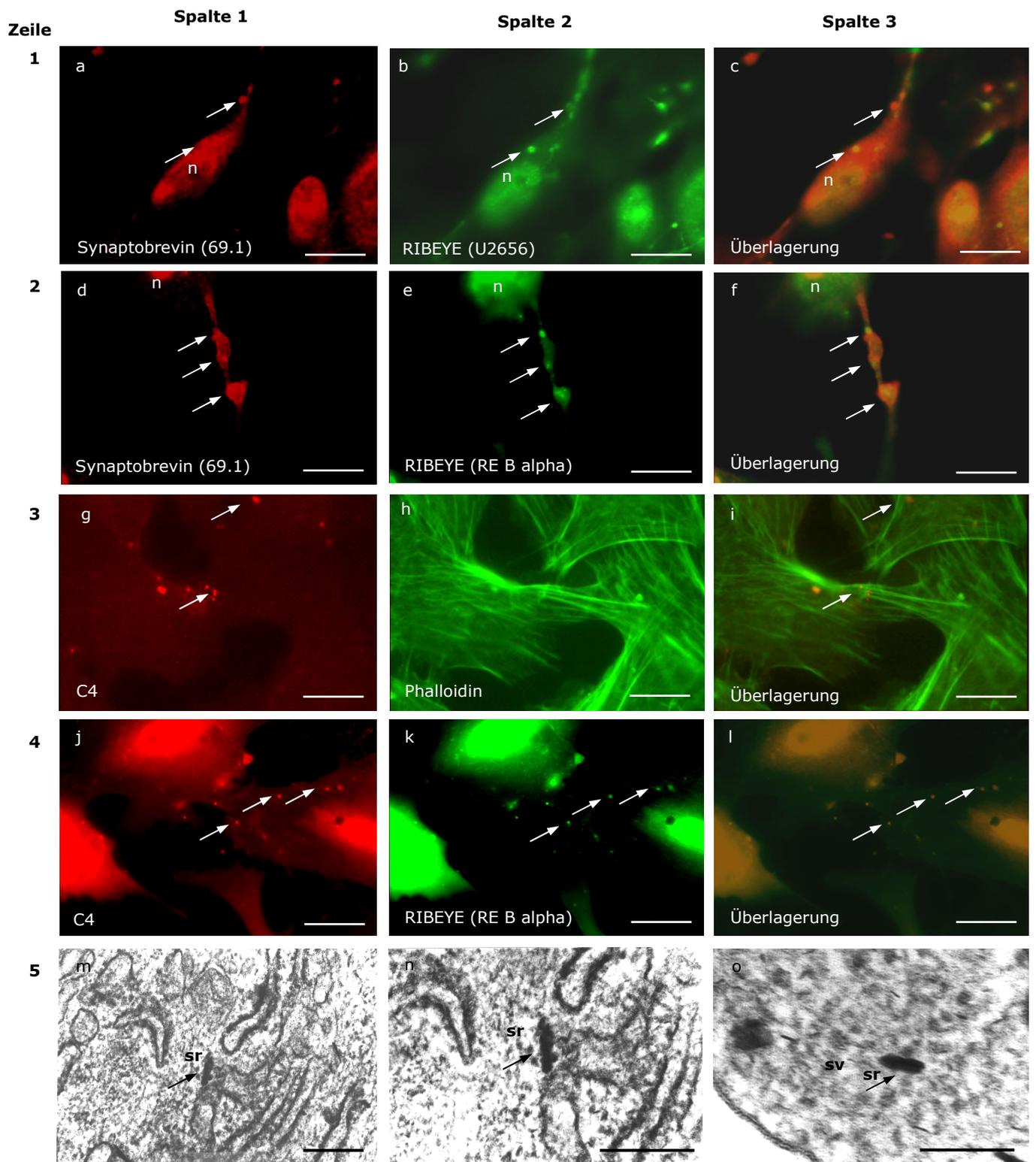


Abb. 4.11: Immunfluoreszenzaufnahmen von Pinealozyten. In den Zeilen 1-4 handelt es sich jeweils um den gleichen Abschnitt der Zelle, der in verschiedenen Farbkanälen aufgenommen wurde. Zeile 5 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Pinealozyte. N wurde aus m vergrößert. Abkürzungen: synaptic ribbons (sr), synaptic vesicle (sv). Skalierungsbalken a bis l: 12µm; m bis o: 0,2µm.