

**Nachweis und Charakterisierung
Retinsäure-bindender Proteine
in der Fischretina**

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
angenommene Dissertation

Frank Schütte
geb. am 03. Juli 1972
in Varel

Oldenburg 2004

Gutachterin: Apl. Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Christiane Richter-Landsberg

Tag der Disputation: 14.02.2005

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Retinsäure und die Retinsäurerezeptoren | 1 |
| 1.1.1 | Der RA-Metabolismus | 1 |
| 1.1.2 | Retinoidrezeptoren und die Kernrezeptor-Großfamilie | 4 |
| 1.2 | Funktionen | 7 |
| 1.2.1 | Genomische Funktionen der physiologischen Kernrezeptorliganden | 8 |
| 1.2.2 | Nichtgenomische Effekte der Kernrezeptorliganden | 9 |
| 1.3 | RA und die Vertebratenretina | 12 |
| 1.3.1 | <i>Gap junctions</i> in der Retina | 14 |
| 1.3.2 | RA in der Retina | 16 |
| 1.3.3 | RA als Neuromodulator in der Retina | 18 |
| 1.4 | Fragestellung | 20 |
| | | |
| 2 | Material & Methoden | 21 |
| 2.1 | Versuchstiere | 21 |
| 2.2 | Immunbiochemie | 21 |
| 2.2.1 | Allgemeine Präparation | 21 |
| 2.2.2 | Subzelluläre Fraktionierung und Proteinbestimmung | 21 |
| 2.2.3 | Immunbiochemische Analyse verschiedener retinaler Fraktionen | 22 |
| 2.2.3.1 | Probenaufbereitung | 22 |
| 2.2.3.2 | Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) | 22 |
| 2.2.3.3 | Immunoblotanalyse | 23 |
| 2.2.4 | <i>In vitro</i> -Inkubation der Retinen | 23 |
| 2.2.5 | <i>In vitro</i> -Dephosphorylierung | 24 |
| 2.2.6 | Präparative Gelelektrophorese (PGE) | 24 |
| 2.2.6.1 | Präparation und Elektrophoreselauf | 24 |
| 2.2.6.2 | Ankonzentration der Fraktionen und Immunoblot-Analyse | 25 |
| 2.2.7 | Zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese nach O'Farrell (1975) | 25 |
| 2.2.7.1 | Probenaufbereitung und Gelelektrophorese | 25 |
| 2.2.7.2 | Silberfärbung nach Shevchenko <i>et al.</i> (1996) | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3 | Immunhistologie | 28 |
| 2.4 | Immuncytochemie | 28 |
| 2.5 | Elektronenmikroskopie | 29 |
| 2.6 | Bindungstest | 30 |
| 2.7 | Markierung [^3H]RA-bindender Proteine nach Bernstein <i>et al.</i> (1995) | 31 |
| 2.8 | Molekularbiologische Methoden | 32 |
| 2.8.1 | Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese | 33 |
| 2.8.2 | 3'-RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)-PCR | 33 |
| 2.8.3 | 5'-RACE-PCR | 35 |
| 3 | Ergebnisse | 36 |
| 3.1 | Lokalisation RAR α -immunoreaktiver Proteine in der Karpfenretina | 36 |
| 3.1.1 | RAR α -immunoreaktive Proteine in verschiedenen retinalen Fraktionen | 36 |
| 3.1.2 | Lokalisation der RAR α -immunoreaktiven Proteine in der Karpfenretina | 38 |
| 3.1.3 | Lichtabhängige Modulation der anti-RAR α -Immunoreaktivität | 45 |
| 3.2 | [^3H]RA-Bindungstest | 46 |
| 3.2.1 | Dissoziationskonstanten (K_D) der [^3H]RA-Bindung | 48 |
| 3.2.2 | Pharmakologie der [^3H]RA-Bindung | 49 |
| 3.3 | [^3H]RA-bindende Proteine in der Karpfenretina | 53 |
| 3.3.1 | [^3H]RA-bindende Proteine in Cytosol und Membranfraktion | 53 |
| 3.3.2 | Pharmakologische Charakterisierung der [^3H]RA-bindenden Proteine | 55 |
| 3.3.3 | [^3H]RA-Bindung durch ein RAR α -ähnliches Protein | 58 |
| 3.4 | Isolierung und Identifikation des anti-RAR α -immunoreaktiven RA-bindenden 43 kDa-Proteins | 60 |
| 3.4.1 | Isolierung des 43 kDa-Proteins | 60 |
| 3.4.2 | Identifikation des 43 kDa-Proteins | 62 |
| 3.4.3 | Isolierung und Sequenzierung der cDNA des 43 kDa-Proteins | 63 |
| 4 | Diskussion | 66 |
| 4.1 | Charakterisierung der RA-Bindung in der Retina | 66 |
| 4.1.1 | Der Bindungstest | 66 |
| 4.1.2 | [^3H]RA-Bindung in der Retina | 68 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2 | RA-bindende Proteine in der Retina | 72 |
| 4.3 | Anti-RAR α -immunoreaktive Proteine in der Retina | 75 |
| 4.3.1 | Lokalisation der anti-RAR α -ir Proteine in der Retina | 75 |
| 4.3.2 | Charakterisierung der anti-RAR α -immunoreaktiven Proteine | 78 |
| 4.4 | Identifikation des 43 kDa-Proteins | 80 |
| 4.4.1 | Das 43 kDa-Protein besitzt keine Homologie mit RA-Rezeptoren | 80 |
| 4.4.2 | Die Enolase als multifunktionelles Protein | 83 |
| 5 | Zusammenfassung | 86 |
| 6 | Summary | 88 |
| 7 | Literatur | 90 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| ABB 1-1: MODULARE STRUKTUR DER KERNREZEPTOREN. | 5 |
| ABB. 3-1: ANTI-RAR α -IR IN VERSCHIEDENEN FRAKTIONEN DES RATTENHIRNS UND DER KARPFFENRETINA. | 37 |
| ABB. 3-2: ANTI-RAR α -IR IN RETINALEN FRAKTIONEN VERSCHIEDENER SPEZIES. | 37 |
| ABB. 3-3: ANTI-RAR α -IR IM QUERSCHNITT DER KARPFFENRETINA. | 38 |
| ABB. 3-4: TX-100-ABHÄNGIGKEIT DES ANTI-RAR α -IMMUNOREAKTIVITÄTSMUSTERS IM QUERSCHNITT DER KARPFFENRETINA. | 39 |
| ABB. 3-5: ANTI-FRET 43- UND ANTI-RAR α -DOPPELMARKIERUNG IM QUERSCHNITT DER KARPFFENRETINA. | 40 |
| ABB. 3-6: ANTI-FRET 43- UND ANTI-RAR α -DOPPELMARKIERUNG IM TANGENTIALSCHNITT DER KARPFFENRETINA. | 40 |
| ABB. 3-7: ANTI-RAR α -IR IN DISSOZIIERTEN ZELLEN DER KARPFFENRETINA. | 41 |
| ABB. 3-8: ANTI-RAR α - UND ANTI-CALDENDRIN-DOPPELMARKIERUNG IM QUERSCHNITT DER KARPFFENRETINA. | 42 |
| ABB. 3-9: ANTI-RAR α - UND ANTI-GRIP-DOPPELMARKIERUNG IM QUERSCHNITT DER KARPFFENRETINA. | 42 |
| ABB. 3-10: ULTRASTRUKTURELLE LOKALISATION DER ANTI-RAR α -IR IN DEN <i>PEDICLES</i> . | 43 |
| ABB. 3-11: ULTRASTRUKTURELLE LOKALISATION DER ANTI-RAR α -IR IN DER OPL. | 44 |
| ABB. 3-12: EINFLUß UNTERSCHIEDLICHER LICHTADAPTATIONSBEDINGUNGEN UND VON ALKALINER PHOSPHATASE AUF DIE ANTI-RAR α -IR IN RETINALEN FRAKTIONEN. | 45 |
| ABB. 3-13: AUSWIRKUNGEN DES LICHTADAPTATIONSZUSTANDS AUF DIE ANTI-RAR α - IR IM QUERSCHNITT DER KARPFFENRETINA. | 46 |
| ABB. 3-14: ABHÄNGIGKEIT DER [3 H]RA-BINDUNG VON DER REZEPTORKONZENTRATION. | 47 |
| ABB. 3-15: ZEITABHÄNGIGKEIT DER [3 H]RA-BINDUNG AN CYTOSOLISCHE UND MEMBRANPROTEINE. | 48 |
| ABB. 3-16: BESTIMMUNG DER DISSOZIATIONSKONSTANTEN FÜR DIE [3 H]RA-BINDUNG AN CYTOSOLISCHE BINDUNGSSTELLEN. | 49 |
| ABB. 3-17: BESTIMMUNG DER DISSOZIATIONSKONSTANTEN FÜR DIE [3 H]RA-BINDUNG AN MEMBRANBINDUNGSSTELLEN. | 50 |
| ABB. 3-18: PHARMAKOLOGIE DER [3 H]RA-BINDUNG AN CYTOSOLISCHE BINDUNGSSTELLEN. | 51 |

| | |
|--|----|
| ABB. 3-19: PHARMAKOLOGIE DER [³ H]RA-BINDUNG AN MEMBRANBINDUNGSSTELLEN. | 52 |
| ABB. 3-20: [³ H]RA-BINDENDE PROTEINE IN CYTOSOL UND MEMBRANFRAKTION. | 54 |
| ABB. 3-21: EINFLUß VON RA AUF DIE [³ H]RA-BINDUNG [³ H]RA-BINDENDER PROTEINE. | 56 |
| ABB. 3-22: EINFLUß VON 13- <i>CIS</i> -RA AUF DIE [³ H]RA-BINDUNG [³ H]RA-BINDENDER PROTEINE. | 56 |
| ABB. 3-23: EINFLUß VON RAL AUF DIE [³ H]RA-BINDUNG [³ H]RA-BINDENDER PROTEINE. | 57 |
| ABB. 3-24: KORRELATION ZWISCHEN DER ANTI-RAR α -IR UND DER RA-BINDUNG. | 59 |
| ABB. 3-25: ANTI-RAR α -IR IN DEN PGE-FRAKTIONEN. | 59 |
| ABB. 3-26: EINFLUß VON RA UND DES RAR α -ANTIKÖRPERS AUF DIE [³ H]RA-BINDUNG DES ISOLIERTEN 43 kDa-MEMBRANPROTEINS. | 60 |
| ABB. 3-27: ISOLIERUNG DES 43 kDa-PROTEINS AUS EINER MEMBRANFRAKTION DER KARPFFENRETINA. | 61 |
| ABB. 3-28: ISOLIERUNG DES 43 kDa-PROTEINS AUS EINER PGE-FRAKTION. | 62 |
| ABB. 3-29: cDNA-SEQUENZ DER PUTATIVEN KARPFFEN-ENOLASE UND DIE DARAUS ABGELEITETE PROTEINSEQUENZ. | 65 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| TAB. 2-1: ANTIKÖRPER. | 28 |
| TAB. 3-1: ZUSAMMENFASSUNG DER INHIBITORISCHEN EFFEKTE EINIGER UNTERSUCHTER VERBINDUNGEN AUF DIE [³ H]RA-BINDUNG IN DER CYTOSOLISCHEN UND DER MEMBRANFRAKTION. | 52 |
| TAB. 3-2: MOLEKULARGEWICHTE DER MIT DER PHOTOAFFINITÄTSMETHODE MARKIERTEN PROTEINE UND DIE INTENSITÄT IHRER MARKIERUNG. | 54 |
| TAB. 3-3: PEPTIDSEQUENZEN DES 43 kDa-PROTEINS NACH DER MudPIT-ANALYSE. | 63 |

Abkürzungen

Abkürzungen stehen in der Regel für die englischen Bezeichnungen, die hier allerdings soweit möglich direkt ins Deutsche übersetzt sind.

| | |
|----------------|---|
| AF-2 | Transaktivierungsfunktion 2 |
| ALDH | Aldehyddehydrogenase |
| ANT | Adeninnukleotidtranslokase |
| AP | Alkaline Phosphatase |
| BP | Bindungspuffer |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| C | cytosolische Fraktion |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cDNA | kodierende DNA |
| CRABP-I | zelluläres Retinsäure-bindendes Protein, Typ I |
| CRABP-II | zelluläres Retinsäure-bindendes Protein, Typ II |
| CRBP-I | zelluläres Retinoid-bindendes Protein, Typ I |
| CRBP-II | zelluläres Retinoid-bindendes Protein, Typ II |
| Cx | Connexin |
| Cy3 | Indocarbocyanin (rot fluoreszierend) |
| CYP | Cytochrom P450 |
| DA | Dopamin |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DBD | DNA-Bindungsdomäne |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTE | Dithioerythritol |
| E ₂ | 17- β -Östradiol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykoltetraessigsäure |
| ER | Östrogenrezeptor |
| ERABP | epididymales Retinsäure-bindendes Protein |
| EtOH | Ethanol |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat (grün fluoreszierend) |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GCL | Ganglienzellschicht der Retina |
| GJ | <i>Gap junction</i> |
| GJIC | <i>Gap junction</i> -vermittelte interzelluläre Kommunikation |

| | |
|---------------------|---|
| GRIP | Glutamatrezeptor-interagierendes Protein |
| [³ H]RA | Tritium-markierte <i>all trans</i> -Retinsäure |
| H1 - H3 | Zapfen-Horizontalzelltypen |
| H4 | Stäbchen-Horizontalzelle |
| HC | Horizontalzelle |
| HP | Homogenisierungspuffer |
| HRP-konj. | Meerrettichperoxidase-konjugiert |
| IC ₅₀ | Inhibitorische Konstante (halbmaximale Inhibition) |
| IEF | isoelektrische Fokussierung |
| Ig | Immunoglobulin |
| INL | innere nukleäre Schicht der Retina |
| IPL | innere plexiforme Schicht der Retina |
| iR | intrazellulärer Rezeptor (allg.) |
| IR | Immunoreaktivität |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| LB (-Medium) | Luria-Bertani |
| LBD | Ligandenbindungsdomäne |
| M | Membranfraktion |
| mR | membranassoziiertes Rezeptor (allg.) |
| M _r | Molekulargewicht |
| MeOH | Methanol |
| MudPIT | multidimensionale Proteinidentifikationstechnologie |
| N | Kernfraktion |
| NGS | normales Ziegenserum |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| ONL | äußere nukleäre Schicht der Retina |
| OPL | äußere plexiforme Schicht der Retina |
| PB | Phosphatpuffer |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PDBu | Phorbol-12,13-dibutyrate |
| PGE | präparative Gelelektrophorese |
| pI | isoelektrischer Punkt |
| PIC | Proteaseinhibitor-Cocktail |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |

| | |
|------------|---|
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PR | Progesteronrezeptor |
| PtdSer | Phosphatidylserin |
| RA | <i>all trans</i> -Retinsäure; RA-Isomere und -Derivate tragen entsprechende Präfixe |
| RACE | schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden |
| RAL | <i>all trans</i> -Retinaldehyd; RAL-Isomere und -Derivate sind entsprechend benannt |
| RALDH | Retinaldehyddehydrogenase |
| RAR | Retinsäurerezeptor |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROL | <i>all trans</i> -Retinol |
| RPE | retinales Pigmentepithel |
| RT | Raumtemperatur |
| RXR | Retinoid X-Rezeptor |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| TBE-Puffer | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung |
| TH | Totalhomogenat |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan |
| TX-100 | Triton X-100 |
| UCP | Entkopplungsprotein |
| UGT | UDP-Glucuronosyltransferase |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | ultraviolettes Licht |

1 Einleitung

Der kontinuierlich schneller und umfangreicher erfolgende Zugewinn wissenschaftlicher Erkenntnisse auf zellulärer und molekularer Ebene führt oftmals auch zu einem Verwischen oder gar zu einer Aufhebung ‚klassischer‘ Betrachtungsweisen. Das Molekül Retinsäure (RA), ein Vitamin A-Metabolit, liefert dafür ein Beispiel. Lange galt RA ausschließlich als ein Morphogen, da sie vor allem während der Entwicklung eines Organismus über spezifische Kernrezeptoren Einfluß auf die Regulation der Expression bestimmter Gene nimmt. Jüngere Erkenntnisse zeigen, daß RA auch das Potential besitzt, einen unmittelbaren modulatorischen Einfluß auf die Physiologie von Neuronen in der Vertebratenretina auszuüben. Da RA die neuromodulatorischen Effekte nicht über den klassischen Signalweg vermittelt, stellt sich die Frage nach den molekularen Mechanismen und nach den entsprechenden zellulären Komponenten, die diesen lange unbekannten RA-Effekten zugrunde liegen. Mit eben dieser Frage beschäftigt sich die vorliegende Arbeit, deren vorrangiges Ziel es ist, ein Protein (oder mehrere) zu identifizieren und zu charakterisieren, welches als Vermittler der neu entdeckten RA-Effekte fungiert.

1.1 Retinsäure und die Retinsäurerezeptoren

Retinsäure (Vitamin A-Säure) zählt zu der Gruppe der Retinoide, zu der nach der Definition von Sporn und Roberts (1985) jede Substanz zählt, die durch Bindung und Aktivierung spezifischer Rezeptoren, deren klassische Liganden Retinol (Vitamin A-Alkohol) bzw. Retinsäure darstellen, eine biologische Antwort hervorrufen können. Die Retinoidrezeptoren sind Mitglieder einer Großfamilie von Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen (mit-)regulieren. RA stellt in dieser Hinsicht das biologisch wirksamste Retinoid dar. Aufgrund der Vielzahl von Rezeptor-Subtypen und -Isoformen und deren unterschiedlichen Eigenschaften einerseits und von biologisch wirksamen RA-Isomeren und RA-Metaboliten andererseits, ergibt sich für das Retinoid-Signal eine große Bandbreite an regulatorischen Möglichkeiten hinsichtlich der Kontrolle der Genexpression.

1.1.1 Der RA-Metabolismus

RA besitzt ein großes Wirkungsspektrum im Vertebratenorganismus (s. Kap. 1.2.1). RA wird aber nicht direkt über die Nahrung aufgenommen sondern erst im entsprechenden Organismus und dort häufig erst im Zielgewebe bzw. in den Zielzellen synthetisiert. Weder Retinol (ROL)

noch dessen Säurederivat RA kommen in größerem Umfang in der Nahrung vor. ROL wird entweder als Retinylester oder als Provitamin β -Carotin über die Nahrung aufgenommen (Übersichtsartikel: Napoli, 1999).

ROL ist das zentrale Metabolit im Retinoid-Stoffwechsel, da es zum einen die häufigste Transportform der Retinoide im Blut verkörpert, und zum anderen sowohl Ausgangsverbindung für die Umwandlung in Retinylester, der Hauptspeicherform der Retinoide, als auch für die Umwandlung in Retinaldehyd (RAL) und RA, den biologisch wirksamsten Retinoiden, darstellt. Die Bildung von Retinylestern, die vor allem in Mikrosomen der Leber aber auch in extrahepatischem Gewebe erfolgt, wird hauptsächlich durch die membrangebundene Lecithin-ROL-Acetyltransferase (LRAT) katalysiert. Auch die Hydrolysierung der Retinylester durch verschiedene Esterasen erfolgt hauptsächlich in der Leber (Prystowsky *et al.*, 1981; Napoli, 1999). Der erste Schritt bei der Synthese von RA aus ROL ist die Oxidation von ROL zu RAL, die von verschiedenen Alkohol-Dehydrogenasen katalysiert werden kann. Die cytosolischen Alkohol-Dehydrogenase (ADH)-Isozyme der Klassen I, III und IV können lediglich ungebundenes ROL oxidieren, welches allerdings aufgrund einer hohen Konzentration von zellulären Retinoid-bindenden Proteinen nur in sehr geringen Konzentrationen in einer Zelle vorkommt. Die mikrosomalen und cytosolischen Retinol-Dehydrogenasen, die zur SDR (kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase)-Großfamilie zählen, erkennen auch an zelluläre Retinoid-bindende Proteine gebundenes ROL als Substrat (Ottonello *et al.*, 1993; Boerman & Napoli, 1996; Napoli, 1999). Der zweite Schritt der Bildung von RA ist die Oxidation von RAL zu RA, die durch RAL-Dehydrogenasen katalysiert wird; RAL-Dehydrogenasen können sowohl freies als auch an zelluläre Retinoid-bindende Proteine gebundenes RAL als Substrat verwenden (Posch *et al.*, 1992; Duester *et al.*, 2003).

Aufgrund ihrer vielseitigen Aktivitäten bzw. Effekte wird RA, nachdem sie gebildet wurde, relativ schnell wieder abgebaut, ihre Halbwertszeit beträgt etwa 6-7 Stunden (Randolph & Simon, 1997). Der Abbau von RA wird von verschiedenen Mitgliedern der Cytochrom *P*-450-Familie katalysiert. Dabei spielen vor allem Hydroxylierungen bzw. Oxidationen am C-4-Atom und am C-18-Atom eine Rolle (White *et al.*, 1997; Napoli, 1999; Marill *et al.*, 2000). Die dabei entstehenden Produkte, wie z.B. 4-OH-RA, können ebenso wie 4-OH-Retinylnacetat oder 5,6-Epoxy-RA durch β -Glukuronidierung in eine polarere Form überführt und schließlich im Urin ausgeschieden werden (Übersicht in: Blaner & Olson, 1994; Samokyszyn *et al.*, 2000). Es gibt auch Hinweise, daß die Stoffwechselprodukte von RA ihrerseits in der Lage

sind Retinsäurerezeptoren zu aktivieren (Idres *et al.*, 2002). Neben dem enzymatisch katalysierten Metabolismus von RA spielen auch Isomerisierungsreaktionen, die zumindest teilweise nicht-enzymatisch katalysiert werden, eine wichtige Rolle für den RA-Metabolismus. Das häufigste und thermodynamisch stabilste RA-Isomer ist die *all trans*-Form, die auch die biologisch aktivste Form darstellt (Shih *et al.*, 1997). 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA bilden zwei weitere im Vertebratenorganismus nachweisbare Isomere, wobei vor allem 9-*cis*-RA als natürlicher Ligand der Retinoid X-Rezeptoren eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Isomerisierung kann zwar enzymatisch katalysiert ablaufen, wird in der Regel aber wohl von niedermolekularen Verbindungen mit freien Sulfhydrylgruppen, z.B. Glutathion, katalysiert, da sie auch in zellfreiem Zellkulturmedium erfolgt (Vane *et al.*, 1982; Urbach & Rando, 1994; Shih *et al.*, 1997). Außerdem verursacht Licht die Isomerisierung von *all trans*-RA (RA) zu 13-*cis*-RA (Lehman & Malany, 1989); bei entsprechender Intensität und Dauer führt Licht schließlich auch zu einer Photodegradation von Retinoiden (Takashima *et al.*, 1979).

Vier wichtige Retinoid-bindende Proteine sind beim Retinoid-Metabolismus und daher auch an der Retinoid-Hormonsignal-Physiologie im Embryo ebenso wie im adulten Gewebe beteiligt (Napoli, 1999). Die zellulären Retinoid-bindenden Proteine I und II (CRBP-I bzw. CRBP-II) binden ROL und RAL aber nicht RA, während die zellulären RA-bindenden Proteine I und II (CRABP-I bzw. CRABP-II) RA nicht aber ROL und RAL binden. CRBP-I und CRABP-I sind ubiquitär lokalisiert und besitzen daher eher allgemeine Funktionen, während CRBP-II und CRABP-II im adulten Organismus nur in ganz bestimmten Zelltypen zu finden sind und daher wohl eher spezialisiertere Funktionen wahrnehmen (Napoli, 1999). Eine Vielzahl von Publikationen beschäftigt sich mit den Funktionen von CRBP und CRABP, dennoch herrscht vor allem hinsichtlich CRABP-I und -II eine große Unsicherheit bezüglich ihrer *in vivo*-Funktionen, zumal Mäuse, in denen sowohl *crabp-I* als auch *crabp-II* ausgeschaltet sind, mit Ausnahme kleinerer Mißbildungen an den Gliedmaßen und einer leicht erhöhten Sterblichkeitsrate im Alter von sechs Wochen keinen auffälligen Phänotyp zeigen (Lampron *et al.*, 1995). Mögliche Funktionen der Bindungsproteine könnten zum einen darin liegen, ihre Liganden vor dem zellulären Milieu sowie die Zelle vor einer zu hohen Ligandenkonzentration zu schützen, und zum anderen, dafür zu sorgen, daß ihr Ligand jeweils mit dem richtigen Protein interagiert und nicht in den falschen Signalweg gelangt (Übersichtsartikel: Ross, 1993; Napoli, 1996). Auch eine Transportfunktion scheint möglich, obgleich die Löslichkeit von Retinoiden in wäßriger Lösung im Bereich von 100 nM liegt und eine Diffusion unkomplexierter Retinoide durch eine wässrige Lösung zwischen Liposomen möglich ist (Ho *et al.*,

1989; Szuts & Harosi, 1991). Trotz des Fehlens eines signifikanten Phänotyps bei CRABP-I- und -II-defizienten Mäusen deutet einiges darauf hin, daß beide Proteine wichtige Funktionen im Vertebratenorganismus erfüllen. Sie werden in allen Vertebraten exprimiert und sind hochkonserviert zwischen den Spezies; außerdem zeigen sie eine selektive und hochaffine Ligandenbindung (Napoli, 1999). Während also die Funktion der Bindungsproteine noch nicht eindeutig geklärt ist, ist die wichtigste Funktion der Retinoidrezeptoren seit geraumer Zeit bekannt: sie wirken als Transkriptionsfaktoren und beeinflussen die Expression einer Vielzahl von Genen sowohl im Embryo als auch im adulten Organismus.

1.1.2 Retinoidrezeptoren und die Kernrezeptor-Großfamilie

Es gibt zwei Gruppen von Retinoidrezeptoren, die RA-Rezeptoren (RARs) und die Retinoid X-Rezeptoren (RXRs), die sich wahrscheinlich unabhängig voneinander entwickelt haben und die auch unterschiedliche Präferenzen für die RA-Isomere besitzen: Retinoid X-Rezeptoren binden ausschließlich 9-*cis*-RA, während die RA-Rezeptoren sowohl RA als auch 9-*cis*-RA binden (Levin *et al.*, 1992; Tate & Grippo, 1995; Übersicht in: Chambon, 1996). Beide Gruppen zählen zu der Großfamilie der Kernrezeptoren, der größten Gruppe eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Die Mitglieder dieser Familie regulieren im embryonalen und adulten Organismus Entwicklungs- und Stoffwechselprozesse sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten. Sie lassen sich basierend auf strukturellen Homologien und der chemischen Ähnlichkeit ihrer Liganden in zwei Gruppen unterteilen: die Steroidhormonrezeptoren, zu denen u.a. der Östrogenrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor (PR) und der Glucocorticoidrezeptor zählen, und die RXR-Heterodimer-bildenden Rezeptoren. Zu letzteren zählen u.a. die RA-Rezeptoren, die Thyroidhormonrezeptoren, der Vitamin D₃-Rezeptor und natürlich die Retinoid X-Rezeptoren. Daneben existiert noch eine dritte Gruppe von Rezeptoren, für die allerdings bisher noch keine physiologischen Liganden nachgewiesen wurden (Laudet *et al.*, 1992; Übersichtsartikel: Weatherman *et al.*, 1999).

Von den verschiedenen Kernrezeptoren existieren jeweils verschiedene Subtypen, z.B. RAR α , β und γ , die i.d.R. jeweils durch ein eigenes Gen codiert werden. Durch Verwendung verschiedener Promoter oder durch alternatives Spleißen entstehen zusätzlich noch eine Vielzahl verschiedener Isoformen, z.B. RAR α 1 und RAR α 2 (Übersichtsartikel: Chambon, 1996; Katzenellenbogen & Katzenellenbogen, 1996). Da z.B. die verschiedenen RAR-Subtypen und -Isoformen unterschiedliche Bindungspräferenzen für die verschiedenen RA-Isomere aufweisen, und sie sich außerdem im Hinblick auf ihre Distribution im Organismus unterscheiden,

bieten sie eine Vielzahl an regulatorischen Möglichkeiten bei der Kontrolle der Genexpression (Allenby *et al.*, 1993, 1994; Scafonas *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Idres *et al.*, 2001, 2002).

Alle Kernrezeptoren besitzen eine relativ konservierte modulare Struktur (vgl. Abb. 1-1). Entsprechend der Homologie unterhalb der Mitglieder kann die Aminosäuresequenz in sechs Regionen (A-F) unterteilt werden. Diese Unterteilung korrespondiert allerdings sehr häufig nicht mit den jeweiligen strukturellen Domänen, daher werden bei den Kernrezeptoren drei strukturelle Domänen unterschieden: eine aminoterminal (A/B) Domäne, die innerhalb der Großfamilie am schwächsten konserviert ist, eine damit benachbarte DNA-Bindungsdomäne (DBD), die zu großen Teilen aus der C-Region gebildet wird und die innerhalb der Familie am stärksten konserviert ist, und eine carboxyterminale Liganden-Bindungsdomäne (LBD), die im wesentlichen aus der E-Region gebildet wird (Chambon, 1996; Weatherman *et al.*, 1999). Die LBD umfasst außerdem noch eine Transaktivierungsfunktion AF-2 sowie eine Dimerisierungsdomäne (Renaud *et al.* 1995; Chambon, 1996; Perlmann *et al.*, 1996; Williams & Sigler, 1998; Tanenbaum *et al.*, 1998; Weatherman *et al.*, 1999).

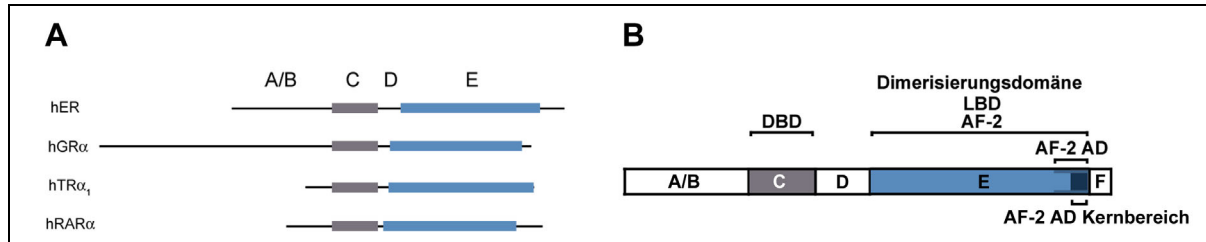


Abb 1-1: Modulare Struktur der Kernrezeptoren. (A) Gemeinsame Domänenstruktur von vier exemplarisch ausgewählten Kernrezeptoren des Menschen. (B) Allgemeine modulare und funktionelle Struktur der Kernrezeptoren mit besonderer Betonung der Transaktivierungsfunktion 2 (AF-2). Erläuterungen: s. Text. AF-2 AD: Aktivierungsdomäne von AF-2 (A: nach Katzenellenbogen & Katzenellenbogen, 1996; B: nach Chambon, 1996).

Die prinzipiellen Merkmale der Genregulation durch Kernrezeptoren stimmen bei den beiden Hauptgruppen der Großfamilie überein: der mit dem Liganden komplexierte Rezeptor bindet als Dimer an ein entsprechendes regulatorisches Element in der Promoter-Region des regulierten Gens und beeinflusst dadurch die Transkriptionsrate des Gens. Dennoch gibt es zwischen den Rezeptoren der beiden Gruppen wesentliche Unterschiede. So sind die RXR-Heterodimer-bildenden Rezeptoren auch ohne gebundenen Liganden an die regulatorischen DNA-Abschnitte gebunden, während die Steroidhormonrezeptoren ohne gebundenen Ligan-

den mit Repressorproteinen komplexiert sind und dadurch an der DNA-Bindung gehindert werden. Außerdem bilden die Steroidhormonrezeptoren Homodimere aus, Heterodimere werden lediglich zwischen verschiedenen Rezeptor-Subtypen gebildet (Katzenellenbogen & Katzenellenbogen, 1996). Die RXR-Heterodimere binden an regulatorische DNA-Sequenzen, die bestimmte Tandem-Bindungselemente enthalten. Die größte Präferenz zeigen RXR-Heterodimere für die Consensus-Sequenz 5'-AGGTCA-3', die in der Tandemanordnung (*direct repeat*) durch charakteristische Abstände von einem bis fünf Basenpaaren voneinander getrennt vorliegen und die entsprechend als DR1 bis DR5 bezeichnet werden. Die Vielzahl an verschiedenen Subtypen von Retinoid X-Rezeptoren einerseits und der mit jenen Heterodimere bildenden Rezeptoren andererseits sowie die unterschiedlichen Präferenzen dieser Heterodimere für die unterschiedlichen Tandemanordnungen erhöhen zusätzlich die Anzahl an regulatorischen Möglichkeiten bei der Kontrolle der Genexpression (Mangelsdorf & Evans, 1995; Rastinejad *et al.*, 2000).

Die Hauptaufgabe der Kernrezeptoren liegt also darin, die Transkriptionsrate bestimmter Gene zu beeinflussen. Die Mitglieder der Kernrezeptorfamilie interagieren dabei sowohl mit basalen Transkriptionsfaktoren als auch mit Enzymen, die die Chromatinstruktur modulieren. Diese Interaktion erfolgt über Koregulatorproteine (Katzenellenbogen & Katzenellenbogen, 1996). Von besonderer Bedeutung für diese Interaktionen ist die ligandenabhängige AF-2-Domäne, die zwischen den Mitgliedern der Großfamilie relativ konserviert ist (Weatherman *et al.*, 1999). Kernrezeptoren, die keinen Liganden gebunden haben, sind an Korepressor-Komplexe gebunden. Wichtige Korepressoren der RXR-Heterodimere sind N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) und SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*), welche einerseits die Bindung von Koaktivatoren verhindern und andererseits über die Bindung von Histon-Deacetylasen lokale Chromatin-Kondensationen induzieren (Chambon, 1996; Heinzel *et al.*, 1997; Wen *et al.*, 2000). Die Bindung eines Liganden induziert eine Konformationsänderung in der LBD des Rezeptors, die einerseits zum Ablösen der Korepressoren und andererseits zur Ausbildung einer neuen Interaktionsdomäne (AF-2 AD) führt, über die die Rekrutierung der Koaktivatoren ermöglicht wird (Renaud *et al.*, 1995; Bourguet *et al.*, 1995; Tanenbaum *et al.*, 1998; Weatherman *et al.*, 1999). Über diese Koaktivatoren werden Histon-Acetyltransferase-Komplexe rekrutiert, was zu einer Chromatin-Dekondensation in den entsprechenden Genbereichen führt. Über die Rekrutierung zusätzlicher Komplexe, z.B. von TRAP (*thyroid receptor-associated proteins*), erfolgt die Bildung der RNA-Polymerase-Initiationskomplexe (Übersichtsartikel: McKenna & O'Malley, 2002). Kernrezeptoren kön-

nen auch in Abwesenheit eines Liganden Einfluß auf die Genexpression nehmen. Da Kernrezeptoren Phosphoproteine sind, können sie durch verschiedene Signaltransduktionskaskaden moduliert werden, so daß sie auch ohne bzw. nach Entfernen eines Liganden in einer aktiven Form vorliegen können (El-Tanani & Green, 1997).

Der wichtigste Schritt bei der Regulation der Genexpression durch Kernrezeptoren scheint in der Liganden-induzierten Konformationsänderung ihrer LBD zu liegen, die eine veränderte Interaktion mit den Koregulatorproteinen zur Folge hat. Vom RAR α des Menschen wurde eine Spleißvariante beschrieben, der u.a. die DBD fehlt. Diese RAR-Isoform ist zwar dennoch im Kern lokalisiert, sie bindet aber nicht an die regulatorischen Elemente der vom RAR α regulierten Gene. Dennoch vermag sie als Heterodimer mit RXR α infolge der Bindung von RA die Aktivierung bestimmter regulatorischer Elemente hervorzurufen (Parrado *et al.*, 2001). Es erscheint denkbar, daß andere Spleißvarianten der RA-Rezeptoren oder anderer Kernrezeptoren, denen zusätzlich zur DBD die Kernlokalisationssequenz fehlt, auch in anderen Zellkompartimenten, z.B. in der Zellmembran, auf der Basis von Liganden-induzierten Konformationsänderungen Funktionen ausüben. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Vielzahl sogenannter nichtgenomischer Effekte, die durch die natürlichen Liganden der Kernrezeptor-Großfamilie hervorgerufen werden.

1.2 Allgemeine Funktionen der physiologischen Kernrezeptorliganden

Über die Regulation der Expression bestimmter Gene nehmen die hormonellen Liganden der Kernrezeptoren Einfluß auf eine Vielzahl biologischer Systeme innerhalb eines Vertebratenorganismus, von der befruchteten Zygote bis zu seinem Tod. Jüngere Erkenntnisse zeigen, daß diese hormonellen Liganden auch andere Funktionen wahrnehmen bzw. wahrnehmen können. In verschiedenen Geweben vermitteln diese Hormone schnelle, sogenannte nichtgenomische Effekte über die Plasmamembran der jeweiligen Zellen. Zwar ist in den meisten Fällen unklar, auf welche Weise diese Effekte vermittelt werden, aber jüngst wurde eine bisher unbekannte Familie membrangebundener Progesteron-Rezeptoren kloniert, wodurch die klassische Sicht auf die physiologischen Liganden der Kernrezeptor-Großfamilie um eine neue Perspektive erweitert wurde. Auch der Einfluß von RA im speziellen scheint nicht auf die Regulation der Genexpression beschränkt zu sein. Wie in den vergangenen Jahren gezeigt wurde, besitzt RA zumindest das Potential ganz unterschiedliche Proteine in verschiedenen zellulären Kompartimenten zu beeinflussen, wodurch das bisher bekannte ohnehin schon große Wirkungsspektrum von RA um zusätzliche Funktionen erweitert werden könnte.

1.2.1 Genomische Funktionen

Über die Regulation der Genexpression, vermittelt durch die entsprechenden im Cytosol bzw. im Kern lokalisierten Rezeptoren, spielen Steroidhormone, Thyroidhormone, Vitamin D₃, und die Retinoide, vor allem RA, Schlüsselrollen in fast allen Bereichen biologischer Funktionen. Die Steroidhormone steuern über die Untergruppe der Sexualhormone die Entwicklung des Reproduktionssystems und der reproduktiven Funktionen einschließlich bestimmter damit einhergehender Verhaltensweisen. Zwei weitere Untergruppen der Steroidhormone, die Glucocorticoide und die Mineralocorticoide, regulieren u.a. den Glukosemetabolismus und den Mineralhaushalt. Die Mineralocorticoide z.B. regulieren den Mineralhaushalt unter anderem über die Regulation der Expression von Na⁺/K⁺- und K⁺-Kanälen in der Niere. Die Thyroidhormone steigern z.B. die Stoffwechselrate und sind wichtig für die Regulation von Entwicklungsvorgängen von Organen. Vitamin D₃ (Cholecalciferol) reguliert als aktive Form Calciferol den Ca²⁺- und Phosphatmetabolismus (Übersicht in: Cooke *et al.*, 1988). Am vielseitigsten scheinen aber die Funktionen der Retinoide und hier im Besonderen von RA zu sein.

Über die Vielfalt auf verschiedenen regulatorischen Ebenen (s. Kap. 1.1.1 und 1.1.2) ergibt sich für RA eine große Bandbreite regulatorischer Einflussmöglichkeiten, die sich in einer großen Vielzahl von RA- bzw. Retinoideffekten widerspiegelt. Dazu zählen die Regulation von Entwicklungsprozessen, vor allem der Entwicklung der Gliedmaßen und der Finger bzw. Zehen, die Musterbildung entlang der anteroposterioren Körperachse im Vertebratenembryo sowie regenerative Prozesse (Übersicht in: Morriss-Kay & Sokolova, 1996; Mendelsohn *et al.*, 1994; Lohnes *et al.*, 1994; Maden, 1997; Wendling *et al.*, 2001). Im adulten Organismus ist RA an der Regulation der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, Hormone, Enzyme, Rezeptoren, Matrixproteine und weiterer zellulärer Komponenten beteiligt, außerdem nimmt RA Einfluß auf das Immunsystem (Übersichtsartikel: Gudas *et al.*, 1994; Ross & Hämmerling, 1994) und spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und der Differenzierung von Zellen, z.B. von Epithelzellen, was auch aus der Bedeutung von mutierten RA-Rezeptoren bei der Carcinogenese hervorgeht (z.B. Idres *et al.*, 2001; Vuilleminot *et al.*, 2004). Der vielfältige Einfluß von RA hat auch zu deren Einsatz in therapeutischen Ansätzen geführt, z.B. in der Chemoprävention. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums von RA sind therapeutische Ansätze i.d.R. mit Nebenwirkungen verbunden, da RA in pharmakologischen Konzentrationen teratogene Effekte hervorruft (Übersicht in: McCaffery *et al.*, 2003). Die unterschiedlichen bzw. gegensätzlichen Effekte, die RA in verschiedenen Zellen bzw. bei verschiedenen Konzentrationen hervorruft, wird am Beispiel des RA-Einflusses auf die *Gap*

junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation (GJIC) und die Cx43-Expression verschiedener Zellen deutlich. In einer embryonalen Fibroblasten-Zelllinie (C3H 10T1/2) verstärkt RA die GJIC und die Cx43-Expression (Rogers *et al.*, 1990); in Keratinozyten übt RA keinen Einfluß auf die GJIC aus, erhöht aber die Cx43-Expression bei niedrigen Konzentrationen und verringert die Expression bei hohen Konzentrationen (Guo *et al.*, 1992). In einer menschlichen Neuroblastoma-Zelllinie verstärkt RA zwar die GJIC, zeigt aber kaum Auswirkungen auf die Cx43-Expression bzw. auf die Cx43-Phosphorylierung (Carystinos *et al.*, 2001). Bei den Effekten, die RA auf die GJIC ausübt, sind vermutlich nicht nur genomische sondern auch nichtgenomische Mechanismen involviert.

1.2.2 Nichtgenomische Effekte

Nichtgenomische Effekte sind Effekte, die nicht unmittelbar die Transkriptionsrate bestimmter Gene betreffen. Sie sind zum einen dadurch charakterisiert, daß sie relativ schnell - innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten nach Applikation - erfolgen, und zum anderen dadurch, daß sie durch Inhibitoren der Transkription und der Translation nicht inhibiert werden (Übersichtsartikel: Schmidt *et al.*, 2000). Bei den meisten nichtgenomischen Effekten, die überwiegend in *in vitro*-Studien analysiert wurden, werden die Leitfähigkeiten von Ionenkanälen und die Aktivitäten von Ionenaustauschern und -pumpen moduliert (Valera *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1995; Waldegger *et al.*, 1995; Sakaguchi *et al.*, 1996; Ehring *et al.*, 1998). Daneben werden auch intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert (Lieberherr *et al.*, 1989; Barsony & Marx, 1991; Aronica *et al.*, 1994; Simoncini *et al.*, 2002, 2003). Da einige dieser Signalkaskaden regulatorischen Einfluß auf die Expression bestimmter Gene ausüben, beeinflussen die Kernrezeptorliganden die Transkriptionsrate bestimmter Gene also auch indirekt über nichtgenomische Effekte.

Viele dieser nichtgenomischen Effekte werden über die Plasmamembran vermittelt, aber auch intrazellulär vermittelte Effekte wurden schon beschrieben, z.B. die intrazellulär erfolgende Aktivierung des MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalwegs durch 17 β -Östradiol (E₂) in menschlichen Brustkrebszellen oder die Beeinflussung der β -Adrenozeptor-cAMP-Kaskade durch Glucocorticoide in der basolateralen Amygdala von Ratten (Migliaccio *et al.*, 1996; Roozendaal *et al.*, 2002). Die Effekte über die Plasmamembran werden auf verschiedene Weise vermittelt. In einigen Fällen scheint es eine direkte Interaktion der Hormone mit bestimmten Ionenkanälen bzw. Ionenkanalkomplexen zu geben, so binden bestimmte Progesteronderivate an den GABA (γ -Aminobuttersäure)_A-Rezeptorkomplex und beeinflussen

dessen Cl⁻-Leitfähigkeit (Lan *et al.*, 1991), während E₂ an einen spannungsabhängigen Ionenkanal (Maxi K-Kanal) in vaskulären glatten Muskelzellen bindet und dessen Leitfähigkeit beeinflusst (Valverde *et al.*, 1999). In vielen Fällen scheinen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in die nichtgenomischen Effekte involviert zu sein (Orchinik *et al.*, 1992; Gu & Moss, 1998; Qiu *et al.*, 2003; Carrer *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2002).

Obwohl die ersten Studien, in denen membrangebundene Steroidrezeptoren beschrieben wurden, schon vor über 30 Jahren durchgeführt wurden (Blyth *et al.*, 1971) und seitdem auch in neuronalem Gewebe ständig weitere membrangebundene Bindungsstellen für Kernrezeptorliganden beschrieben wurden (z.B. Orchinik *et al.*, 1991; Blaustein *et al.*, 1992; Tischkau & Ramirez, 1993; Mermelstein *et al.*, 1996; Ramirez *et al.*, 1996), ist die Identifikation dieser Bindungsstellen bisher nur für eine neue Familie von membrangebundenen Progesteron-Rezeptoren gelungen (Zhu *et al.*, 2003a, b). Die Hauptprobleme bei den bisher charakterisierten Bindungsstellen bestehen in ihrer Identifikation als spezifische Rezeptoren mit einer definierten Funktion bei der Agonist- bzw. Antagonisterkennung und einer anschließenden Signaltransduktion (Schmidt *et al.*, 2000). Die dafür notwendigen Kriterien, vor allem hohe Affinität, Selektivität, das Vorhandensein von spezifischen Agonisten und Antagonisten und die Inhibierbarkeit durch proteolytische Agentien sowie Membran-Interaktionsdomänen wurden in den meisten Fällen nicht zusammenhängend aufgezeigt. Außerdem war es bis vor kurzem nicht möglich, die beschriebenen membrangebundenen Bindungsstellen aufzureinigen und zu sequenzieren, so daß über die jeweilige Identität der Bindungsstellen keine Aussagen gemacht werden konnten.

Nichtgenomische Effekte über die Plasmamembran können von Kernrezeptorliganden auf verschiedene Weise vermittelt werden: neben unspezifischen Interaktionen der lipophilen Hormone mit den Membranen können die Hormone entweder mit spezifischen Bindungsproteinen bzw. Rezeptoren in den Membranen interagieren oder mit Kernrezeptoren, die aufgrund verschiedener denkbarer Modifikationen, z.B. alternatives Spleißen, oder durch Interaktion mit membrangebundenen Proteinen in bzw. an die Membran translozieren. Um zwischen spezifischen membrangebundenen Rezeptoren und membrangebundenen Kernrezeptoren zu differenzieren, werden zum einen Kernrezeptor-spezifische Agonisten bzw. Antagonisten verwendet und deren Einfluß auf die Ligandenbindung an die Membran-Bindungsstellen analysiert. Daneben werden vor allem Antikörper verwendet, die spezifisch gegen einzelne Domänen der Kernrezeptoren gerichtet sind. Einige Befunde solcher Studien deuten auf eine

Verwandtschaft der membrangebundenen Bindungsstellen und der entsprechenden Kernrezeptoren hin (Monje & Boland, 1999; Razandi *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu zeigen die jüngst klonierten membrangebundenen Progesteronrezeptoren keine Ähnlichkeit mit den im Cytosol bzw. im Kern lokalisierten und bilden eine völlig neue Familie membrangebundener Steroidhormonrezeptoren (Thomas *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003a, b).

Die vielen verschiedenen über die Plasmamembran vermittelten nichtgenomischen Effekte der Kernrezeptorliganden werden demnach über verschiedene Mechanismen vermittelt: **i)** über eine direkte Interaktion mit Ionenkanälen bzw. Ionenkanalkomplexen, **ii)** über eine inhibitorische Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren anderer Signalkaskaden, **iii)** über eine Interaktion mit Membranbindungsstellen, die zumindest einige Epitope mit den entsprechenden Kernrezeptoren gemeinsam haben, **iv)** über eine Interaktion mit einer eigenen Familie spezifischer Membranrezeptoren.

Auch für RA sind verschiedene Effekte beschrieben worden, die unabhängig von einer RAR-vermittelten Beeinflussung der Expression bestimmter Gene erfolgen. RA interagiert dabei direkt mit Proteinen in verschiedenen zellulären Kompartimenten und beeinflusst dadurch deren Aktivität. Verschiedene Studien deuten auf eine Interaktion von RA mit der Proteinkinase C (PKC) hin. So konnte gezeigt werden, daß RA PKC-Isoformen aus der cytosolischen Fraktion sowohl der Kaninchenretina als auch des Rattenhirns zu aktivieren vermag. Allerdings gibt es Unterschiede bezüglich der Ca^{2+} -Abhängigkeit dieses Effekts und der Konkurrenz mit Phosphatidylserin (PtdSer) um die Bindungsstellen (Ohkubo *et al.*, 1984; Bouzinba-Segard *et al.*, 1994; Radomska-Pandya *et al.*, 2000). Radomska-Pandya *et al.* zeigten, daß verschiedene rekombinante PKC-Isoformen des Menschen RA binden können, allerdings erst bei pharmakologischen Konzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$). Der mögliche RA-Einfluß auf den PKC-Signalweg scheint demnach vom Zelltyp und der beteiligten PKC-Isoform abhängig zu sein.

Ebenfalls einen direkten Einfluß kann RA auf mitochondriale Membranproteine wie die Adennukleotid-Translokase (ANT) oder die Entkopplungsproteine UCP1 und UCP2 nehmen, die ihrerseits den elektrochemischen Gradienten über die Mitochondrienmembran mitregulieren. RA inhibiert die ANT, was den Verlust des elektrochemischen Potentialgradienten zur Folge hat, ein Ereignis, das im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen auftritt (Rigobello *et al.*, 1999; Notario *et al.*, 2003). Die Bindung und Aktivierung von UCP1 und UCP2 durch RA hat ebenfalls eine Verringerung des Potentialgradienten zur Folge und spielt u.a.

eine Rolle bei der Thermogenese (Rial *et al.*, 1999; Tomás *et al.*, 2002). Über den Einfluß auf die Aktivität bzw. die intrazelluläre Verteilung des Mannose-6-Phosphat/Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-II-Rezeptors in Herzfibroblasten und Herzmuskelzellen von Ratten spielt RA auch eine Rolle beim intrazellulären Transport von lysosomalen Enzymen (Kang *et al.*, 1998). Auch für RA wurde eine direkte Interaktion mit einem Ionenkanal beschrieben. In Photorezeptor-Außensegmenten der Salamanderretina reduziert RA die Leitfähigkeit eines L-Typ Ca^{2+} -Kanals, welcher die synaptische Transmission zwischen Photorezeptoren und Folgeuronen kontrolliert (Vellani *et al.*, 2000). Wie schon angedeutet (s. Kap. 1.2.1) hat RA auch einen nichtgenomischen Einfluß auf die GJIC. In Zellen von Hamsterembryonen (SHE-Zellen) inhibiert RA die GJIC innerhalb von wenigen Minuten über die Disaggregation von Connexon-Strukturen (Rivedahl *et al.*, 1994) und in *Xenopus*-Oozyten reduziert RA *Gap junction*-Hemikanalströme von Cx38-Hemikanälen innerhalb weniger Sekunden (Ripps *et al.*, 2002). In beiden Fällen ist aber unklar, auf welche Weise der RA-Effekt vermittelt wird, eine direkte Bindung von RA an die *Gap junction*-Proteine, die Connexine, wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Verschiedene Studien der jüngeren Vergangenheit weisen RA eine weitere Funktion zu, die sie über die Vermittlung nichtgenomischer Effekte u.a. auf die GJIC zwischen neuronalen Zellen der Vertebratenretina ausübt.

1.3 RA in der Vertebratenretina

Die Retina, die aufgrund ihrer Ontogenese einen in der Peripherie gelegenen Teil des zentralen Nervensystems bildet, ist bei allen Vertebraten im Hinblick auf den Grundbauplan gleich organisiert. Der als *Stratum cerebrale* bezeichnete Bereich enthält mit Photorezeptoren, Bipolarzellen, Ganglienzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und Interplexiformen Zellen sechs Typen von Neuronen sowie mit den Müllerzellen einen Gliazelltyp. Von den Photorezeptoren gibt es zwei Typen von Zellen, die Stäbchen dienen der Photoperzeption bei skotopischen Lichtverhältnissen während die Zapfen bei photopischen Lichtverhältnissen aktiv sind. Die Zellen sind in der Retina in mehreren Schichten angeordnet. Ausgehend von ihrer Reihenfolge im Verarbeitungsprozeß liegt im distalen Bereich die äußere Kernschicht (ONL), die die Somata der Photorezeptoren enthält. Auf die ONL folgt die innere Kernschicht (INL), die die Somata von Bipolaren, Horizontalzellen, einigen Amakrinzellen, Müllerzellen und Interplexiformen enthält. Die Ganglienzellschicht (GCL) bildet den basalen Bereich der Retina und enthält die Somata einiger Amakrinzellen und der Ganglienzellen, deren Axone in die übergeordneten thalamischen Kerne projizieren. Die Informationsverarbeitung findet hauptsächlich in den synaptischen Schichten der Retina statt. In der äußeren Synapsenschicht (OPL),

zwischen der ONL und der INL, erfolgen die synaptischen Übertragungen zwischen Photorezeptoren, Bipolaren, Horizontalzellen und Interplexiformen, während in der zwischen INL und GCL gelegenen inneren Synapsenschicht (IPL) die synaptischen Verschaltungen zwischen Bipolaren, Amakrinen, Ganglienzellen und Interplexiformen liegen. Die Müllerzellen durchziehen die gesamte Retina.

Die Aufgabe der Retina besteht darin, aus den optischen Eigenschaften der Umwelt, über die sie in Form verschiedener Lichtreize Informationen erhält, ein verwertbares in neuronale Aktionspotentiale codiertes Abbild zu generieren. Über zwei prinzipielle Verarbeitungswege, einen vertikalen, der von den Photorezeptoren über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen führt, und einen lateralen, der die Prozessierung des vertikalen Verarbeitungsweges über Interaktionen der Photorezeptoren und Bipolaren mit den Horizontalzellen in der OPL und der Bipolaren und Ganglienzellen mit den Amakrinzellen in der IPL beinhaltet, werden von der Retina bestimmte Eigenschaften, wie Bewegung oder Kontrast, aus den eintreffenden optischen Reizen der Umwelt abstrahiert. Der Arbeitsbereich, innerhalb dessen die Retina verwertbare Informationen über die Umwelt liefern kann, umfasst einen Lichtintensitätsbereich von mehr als zehn logarithmischen Einheiten. Um innerhalb dieses großen Arbeitsbereiches optimale Arbeitsbedingungen zu schaffen und entsprechende Ergebnisse zu liefern, sind in der Retina verschiedene Adaptationsmechanismen verwirklicht, die eine Anpassung der retinalen Lichtsensitivität an das jeweilige durchschnittliche Umgebungslicht ermöglichen.

Eine der Ebenen, auf der die Lichtadaptation erfolgt, ist die der GJIC zwischen den retinalen Zellen. Nahezu alle retinalen Zelltypen kommunizieren nicht nur über chemische Synapsen, sondern sind auch über elektrische Synapsen, sogenannte *Gap junctions*, zu größeren Modulen zusammengefaßt. Diese elektrische Kopplung spielt eine wichtige Rolle bei der lateralen Informationsverarbeitung und der damit verbundenen Generierung bestimmter Eigenschaften wie z.B. Kontrast- oder Bewegungseindrücken. Horizontalzellen zeigen z.B. eine intensive elektrische Kopplung, wodurch einzelne Horizontalzellen über sehr große rezeptive Felder verfügen, also sehr große räumliche Bereiche, innerhalb derer ein Lichtreiz zu einer Stimulation der Zelle führt. Das Ausmaß der elektrischen Kopplung zwischen den retinalen Zellen ist lichtabhängig. Die Intensität des Umgebungslichts wird dabei über die lichtabhängige Ausschüttung bzw. Synthese von neuromodulatorischen Substanzen, z.B. von Dopamin (DA), kodiert. Diese Neuromodulatoren beeinflussen die GJIC häufig über bestimmte Signaltransduktionskaskaden. Neuere Befunde zeigen, daß auch RA in der Lage ist, neuromodulatori-

schen Einfluß u.a. auf die GJIC von Horizontalzellen auszuüben, und somit in die Lichtadaptation der Vertebratenretina involviert ist.

1.3.1 *Gap junctions in der Retina*

Gap junctions stellen Zellverbindungen dar, über die eine direkte metabolische bzw. elektrische Kopplung zweier benachbarter Zellen erfolgen kann. Homologe *Gap junctions* verbinden zwei gleiche Zelltypen während heterologe *Gap junctions* zwei unterschiedliche Zelltypen verbinden. Eine *Gap junction* (GJ) enthält häufig viele Kanäle, über die die Kopplung erfolgt. Ein funktionsfähiger GJ-Kanal wird gebildet, wenn zwei Hemikanäle (Connexone) von zwei benachbarten Zellen aneinander koppeln. Ein Hemikanal stellt ein Oligomer aus sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen, dar. Es gibt eine ganze Reihe verschiedener Connexine, so wurden alleine in der Nager-Unterfamilie der *Murinae* bisher 19 verschiedene Connexin (Cx)-Gene identifiziert (Eiberger *et al.*, 2001). Homomere *Gap junctions* enthalten nur einen Cx-Typ während heteromere aus mindestens zwei verschiedenen zusammengesetzt sind. Die Connexine bilden einen hydrophilen Kanal, durch den cytoplasmatische Komponenten bis zu einem M_r von etwa 1 kDa diffundieren können. Die Permeabilität eines Kanals ist dabei abhängig von den Connexinen, aus denen er zusammengesetzt ist (Elfgang *et al.*, 1995; Übersicht in: Pitts & Finbow, 1988). Die GJIC umfasst neben einer metabolischen Kopplung, die vor allem in nichterregbarem Gewebe eine Rolle spielt, auch eine elektrische Kopplung. *Gap junctions* koppeln als elektrische Synapsen nicht nur Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen (Spray & Burt, 1990) sondern auch Neuronen, damit bilden sie eine Grundlage für die Ausbildung neuronaler Netzwerke (Spray & Dermietzel, 1996).

Auch in der Vertebratenretina spielen *Gap junctions* eine wichtige Rolle, was auch darin zum Ausdruck kommt, daß alle Hauptzelltypen der Retina funktionsfähige *Gap junctions* ausbilden (Übersichtsartikel: Vaney, 1994; Cook & Becker, 1995). Relativ gut untersucht sind u.a. die *Gap junctions* zwischen Horizontalzellen. Die *Teleostier*-Retina enthält z.B. vier verschiedene Horizontalzellen, die alle untereinander eigenständige Netzwerke bilden (Kaneko, 1971). Die HC-Somata und -Dendriten bilden dabei von axonalen Netzwerken getrennte Netze, die auch unterschiedlich reguliert werden. Die Netzwerke der HC-Somata und -Dendriten unterliegen einem lichtabhängigen dynamischen Wandel mit mehr als zwei ineinander übergehenden Adaptationsphasen. So sind Horizontalzellen sowohl in dunkel- als auch in helladaptierten Retinen schwach gekoppelt, während sie bei schwachem Lichthintergrund eine stärkere Kopplung aufweisen (Shigematsu & Yamada, 1988; Tornquist *et al.*, 1988; Umino *et*

al., 1991; Baldrige & Ball, 1991; Xin & Bloomfield, 1999). Da die physiologischen Eigenschaften eines GJ-Kanals ebenfalls Cx-abhängig sind, besteht seit einiger Zeit großes Interesse an der Identifikation der Connexine in den verschiedenen retinalen *Gap junctions*. Doch während z.B. für die HC-Kopplung der Maus, die nur über einen HC-Typ verfügt (He *et al.*, 2000), mit Cx57 ein potentieller Kandidat gefunden wurde (Hombach *et al.*, 2004), ist die Identität der Connexine der HC-*Gap junctions* vom Fisch noch immer ungeklärt. Zwar wurde mit Cx52.6 in Horizontalzellen des Zebrafisches ein Connexin nachgewiesen, dessen Beteiligung an funktionellen HC-*Gap junctions* wurde aber noch nicht gezeigt (Zoidl *et al.*, 2004). Auch Cx43 wird im Zusammenhang mit HC-*Gap junctions* diskutiert (Janssen-Bienhold *et al.*, 2001).

Die Modulation der GJIC erfolgt über nichtkovalente Modifikationen, z.B. durch Spannungsänderungen entlang des GJ-Kanals, und kovalente Modifikationen der Kanalproteine, z.B. durch Phosphorylierungen. Durch diese Modifikationen werden die Regulation des Öffnens und Schließens, das sogenannte *Gating*, eines GJ-Kanals beeinflusst (Takens-Kwak & Jongsma, 1992; Übersichtsartikel: Bruzzone *et al.*, 1996). Vor allem im Hinblick auf die Spannungsabhängigkeit und auf die Eigenschaft, Substrat von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen zu sein, unterscheiden sich die verschiedenen Connexine stark, z.B. besitzen das Karpfen- und Zebrafisch-Cx43 eine putative Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase A (PKA), die das Ratten-Cx43 nicht enthält (Dermietzel *et al.*, 2000). Neben diesen Modifikationen besitzt auch die Connexondichte in einer *Gap junction* Auswirkungen auf das Ausmaß der Kopplung (Rivedahl *et al.*, 1994; Bukauskas *et al.*, 2000).

Die Modulation der GJIC über Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen wird i.d.R. über die Aktivierung bestimmter Signalkaskaden durch externe Botenstoffe vermittelt. In der Retina spielt z.B. Dopamin (DA) eine wichtige neuromodulatorische Rolle. DA induziert eine Reihe von Effekten, die im Zusammenhang mit der Helladaptation stehen. Durch DA werden u.a. retinomotorische Bewegungen, Lichtantworten von Horizontalzellen und die Connexondichte in HC-*Gap junctions* beeinflusst (Dearry & Burnside, 1986; Liman *et al.*, 1989; Übersichtsartikel: Wolburg & Kurz-Isler, 1996). Auch die GJIC von Horizontalzellen wird durch DA moduliert, da es ebenso wie Licht die GJIC reduziert (Teranishi *et al.*, 1983; Mangel & Dowling, 1985). Allerdings scheint nicht jedes Lichtsignal auf die GJIC von Horizontalzellen über DA vermittelt zu werden. DA wird sowohl bei Lichtreizen als auch bei längerer Dunkelheit verstärkt freigesetzt (Weiler *et al.*, 1997), aber der Einfluß von kontinuierlicher Beleuch-

tung auf die GJIC ist im Gegensatz zu dem Einfluß von Flickerlicht durch DA-Antagonisten nicht inhibierbar (Baldrige & Ball, 1991; Umino *et al.*, 1991), was auf das Vorhandensein zumindest eines weiteren Neuromodulators hindeutet. Eine Substanz, deren Synthese in der Retina im Zusammenhang mit den Lichtbedingungen steht, ist RA, die in der Retina vor allem während der Entwicklung aber auch im adulten Organismus wichtige Funktionen erfüllt.

1.3.2 Genomische Funktionen von RA in der Retina

Retinoide, vor allem RA, erfüllen auch in der Vertebratenretina wichtige Funktionen. Im frühen Embryo zählt die Augenanlage zu den Geweben mit den höchsten RA-Konzentrationen (McCaffery *et al.*, 1992). Neben der Funktion von 11-*cis*-RAL als Chromophor im Phototransduktionsprozeß in der adulten Retina, erfüllt RA wichtige Funktionen vor allem während der embryonalen und der frühen postnatalen Augenentwicklung aber auch in der adulten Retina. In einer frühen embryonalen Entwicklungsphase des Auges sowohl von Säugern als auch vom Zebrafisch trägt RA vermutlich dazu bei, die asymmetrische dorsoventrale Musterbildung zu etablieren. Während dieses Stadiums sind die RA-Konzentrationen in der ventralen Retina deutlich höher als in der dorsalen (McCaffery *et al.*, 1992; Mey *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2000; Übersichtsartikel: Dräger & McCaffery, 1997). RA etabliert in dieser Phase vornehmlich ventrale Charakteristika (Hyatt *et al.*, 1996a), was eindrucksvoll in Studien am Zebrafisch gezeigt werden konnte. Ein Übermaß an RA in dieser Entwicklungsphase führt zu einer Duplikation der ventralen Retina (Hyatt *et al.*, 1992), während die Inhibition der endogenen RA-Synthese in dieser Phase die Entwicklung von Augen zur Folge hat, denen der ventrale Bereich der Retina fehlt (Marsh-Armstrong *et al.*, 1994). Bei Mäusen mit mutierten RA-Rezeptoren zeigen sich ebenfalls okuläre Defekte, die u.a. die ventrale Retina betreffen (Ghyselinck *et al.*, 1997). Möglicherweise spielt RA auch eine Rolle bei der Regulation des Augenwachstums als Intermediär der Signalkaskade von der Retina zur Sklera (Fischer *et al.*, 1999). Sowohl in der Ratte als auch im Zebrafisch spielt RA in einer späteren Entwicklungsphase des Auges auch eine wichtige Rolle bei der Photorezeptor-Differenzierung (Kelley *et al.*, 1994; Hyatt *et al.*, 1996b; Dräger & McCaffery, 1997). Dies steht bei Säugern schon im Zusammenhang mit einer Verschiebung des RA-Gradienten in Richtung des dorsalen Bereichs der Retina.

Die unterschiedliche Verteilung der RA-Konzentrationen im Embryo und in der postnatalen Retina wird durch ein bestimmtes zeitliches und räumliches Expressionsmuster verschiedener Aldehyd-Dehydrogenasen erreicht. Im Zebrafisch werden in der dorsalen Region der embryo-

nen Augenanlage eine Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) vom Klasse I-Typ und in der ventralen Region eine Retinaldehyd-Dehydrogenase (RALDH) exprimiert. Die RALDH zeigt dabei nicht nur erhöhte Aktivität, sie wird auch vor der anderen ALDH exprimiert, woraus eine erhöhte RA-Konzentration im ventralen Bereich resultiert (Marsh-Armstrong *et al.*, 1994). Da die adulte Fischretina in den peripheren Bereichen während der gesamten Lebensspanne des Tieres weiter wächst, bleibt auch der ventrodorsale RA-Gradient erhalten, wobei allerdings die RA-Synthese im adulten Tier in geringerem Umfang erfolgt (Übersicht in: Hyatt & Dowling, 1997; Dräger & McCaffery, 1997). Auch in der embryonalen Hühnerretina tragen eine dorsale RALDH-1 und eine ventrale RALDH-3 zur Ausbildung eines sich während der Entwicklung verschiebenden RA-Gradienten entlang der dorsoventralen Achse bei (Mey *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2000). In der embryonalen Mausretina katalysieren drei Enzyme die Oxidation von RAL zu RA. Zusammen mit dem RA metabolisierenden Enzym CYP26, welches ebenfalls ein dynamisches Expressionsmuster aufweist, tragen die dorsal exprimierte AHD2, das ventral exprimierte Enzym V1 und das ebenfalls zunächst ventral exprimierte Enzym V2, welches später im retinalen Pigmentepithel (RPE) exprimiert wird, zu schnell wechselnden RA-Mustern in der embryonalen Augenentwicklung der Maus bei (McCaffery *et al.*, 1999).

Sowohl in der Fischretina als auch in der Säugerretina nimmt die RA-Produktion im adulten Auge ab. Dennoch findet auch im adulten Auge ein Retinoid-Metabolismus statt, der über die Synthese des Chromophors 11-*cis*-RAL bzw. dessen *Recycling* hinausgeht. Dieser Retinoid-Metabolismus erfordert das Vorhandensein der entsprechenden Enzyme und Bindungsproteine in den entsprechenden Zellen. Der einzige Zelltyp, in dem alle dafür notwendigen Proteine nachgewiesen wurden, ist die Pigmentepithelzelle (Bunt-Milam & Saari, 1983; Simon *et al.*, 1995; Saari *et al.*, 1995a; Hyatt & Dowling, 1997; Dräger & McCaffery, 1997; Fischer *et al.*, 1999). Einzelne Enzyme und Bindungsproteine konnten auch in Müllerzellen und sogar in Amakrinzellen nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung beider am RA- bzw. Retinoid-Metabolismus schließen lässt (Bunt-Milam & Saari, 1983; Gaur *et al.*, 1990; Saari *et al.*, 1995b; Fischer *et al.*, 1999). Da auch einzelne Retinoidrezeptoren in der adulten Retina exprimiert werden, scheint es auch eine Bedeutung von RA bei der Regulation der Genexpression in der adulten Retina zu geben (Wagner *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001).

Ein wichtiger RA-Syntheseweg in der adulten Retina besteht in einer Nebenreaktion des Phototransduktionszyklus in den RPE-Zellen (Übersicht in: Saari, 1994). Im Verlauf dieses Zyklus wird das während der Phototransduktion zu *all trans*-RAL isomerisierte Chromophor 11-*cis*-RAL regeneriert. In einer Nebenreaktion wird *all trans*-RAL zu RA oxidiert. Die RA-Synthese erfolgt verstärkt in einer helladaptierten Retina (McCaffery *et al.*, 1996). Dies bedeutet, daß die RA-Synthese im adulten Auge lichtkorreliert erfolgt, was die Möglichkeit eröffnet, daß RA als Vermittler eines kontinuierlichen Lichtsignals neuromodulatorische Effekte vermitteln könnte.

1.3.3 RA als Neuromodulator in der Retina

Die bisher durchgeführten Studien, die den neuromodulatorischen Einfluß von RA in der Vertebratenretina zum Inhalt hatten, ergaben mit einer Ausnahme (Vellani *et al.*, 2000; s. Kap. 1.2.2), daß RA auf die Morphologie und Physiologie von Horizontalzellen einen modulatorischen Einfluß ausübt, der dem von Dauerlicht vermittelten sehr ähnlich ist. Horizontalzellen haben in der Retina integrative Funktionen, da sie die verschiedenen Informationen, die sie von den Photorezeptoren erhalten, verrechnen und über Rückkopplungsmechanismen dazu verwenden, die Effektivität der synaptischen Übertragung von Photorezeptoren auf Bipolarzellen an die jeweils aktuelle Umgebungshelligkeit anzupassen. Sowohl die Interaktionen der Horizontalzellen mit den Photorezeptoren als auch die der Horizontalzellen untereinander unterliegen dabei lichtabhängigen adaptativen Änderungen. Eine Besonderheit der Fischretina stellt dabei die morphologische Plastizität der lateralen Dendriten der Zapfen-Horizontalzellen (H1 - H3) dar. Die lateralen Dendriten dieser Horizontalzelltypen, die ausschließlich Synapsen mit Zapfen ausbilden, bilden dabei während die Retina helladaptiert kleine Ausstülpungen, sogenannte *Spinules*, aus, deren Auftreten mit der Änderung bestimmter Lichtantworteigenschaften der Horizontalzellen korreliert, wobei ihre genaue Funktion noch ungeklärt ist (Weiler & Wagner, 1984; Wagner & Djamgoz, 1993; Kamermans & Spekreijse, 1995). *Spinules* werden von diesen Horizontalzellen auch in einer mit RA inkubierten dunkeladaptierten Retina ausgebildet. Dabei handelt es sich vermutlich um einen nichtgenomischen Effekt, da er schon relativ schnell nach Inkubationsbeginn zu beobachten ist und durch Actinomycin nicht inhibiert werden kann (Weiler *et al.*, 1998).

Daneben beeinflußt RA auch die Lichtantworteigenschaften von Horizontalzellen in der Fischretina. Die vier HC-Typen der Karpfenretina besitzen unterschiedliche Farbsensitivitäten. Auf einen Lichtreiz, der über Änderungen der Photorezeptor-Transmitterfreisetzung an

die Horizontalzellen weitergegeben wird, antworten der H1-Typ und der H4-Typ, letzterer bildet Synapsen mit den Stäbchen, unabhängig von der Wellenlänge des Lichtreizes mit einer Hyperpolarisation. Der H2-Typ antwortet auf langwelliges Licht mit einer Depolarisation und auf mittel- und kurzwelliges Licht mit einer Hyperpolarisation, während der H3-Typ auf mittelwellige Lichtreize mit einer Depolarisation antwortet und demnach ein triphasisches Antwortspektrum besitzt (Übersichtsartikel: Kato *et al.*, 1991). Im dunkeladaptierten Zustand geht dieser Antagonismus im Farbantwortspektrum der H2- und H3-Zellen verloren (Yang *et al.*, 1994). In einer mit RA inkubierten dunkeladaptierten Retina tritt dieser Antagonismus wieder auf (Potték & Weiler, 2000).

Auch die GJIC von Horizontalzellen wird durch RA beeinflusst, wobei der RA-Effekt allerdings auf die Horizontalzell-Typen beschränkt ist, die Zapfensignale verarbeiten. Sowohl in der Säugerretina als auch in der Fischretina reduziert RA die GJIC zwischen Horizontalzell-Somata, was mit einer Verringerung der rezeptiven Feldgröße verbunden ist und Änderungen der Lichtantworteigenschaften auf ringförmige bzw. punktförmige Lichtreize zur Folge hat (Weiler *et al.*, 1998, 1999; Potték & Weiler, 2000). RA senkt die Leitfähigkeit von GJ-Kanälen von Horizontalzellen in der Fischretina innerhalb von fünf Minuten in reversibler Form, wie eine Studie von Zhang & McMahon (2000) gezeigt hat. In dieser Studie haben die beiden Autoren auch gezeigt, daß RA den GJ-Hemikanalstrom über eine Reduktion der Kanal-Öffnungswahrscheinlichkeit und nicht über Änderungen der Einzelkanalleitfähigkeiten stark reduziert. Die Inhibition der Hemikanalströme erfolgt mit einer Latenz von weniger als 200 ms (Zhang & McMahon, 2001). Da RA bei allen diesen Effekten den Einfluß von Licht während der Helladaptation nachahmt, und da Licht stimulierend auf die RA-Synthese in der Retina wirkt (McCaffery *et al.*, 1996; Dirks *et al.*, 2004), scheint es möglich, daß RA als Vermittler des Lichtsignals bei den hier beschriebenen Effekten fungiert und somit neuromodulatorische Funktionen in der Retina erfüllt. Da diese Effekte relativ schnell nach Inkubationsbeginn erfolgen und durch Transkriptionsinhibitoren nicht beeinflusst werden, handelt es sich bei ihnen um weitere nichtgenomische RA-Effekte. Völlig unklar ist bisher allerdings, über welche Mechanismen diese nichtgenomischen neuromodulatorischen Effekte in der Vertebratenretina vermittelt werden.

1.4 Fragestellung

Der Unterschied zwischen dem etwa zehn logarithmischen Einheiten umfassenden Lichtintensitätsbereich, innerhalb dessen die Retina Informationen zu verarbeiten vermag, und dem nur knapp drei logarithmischen Einheiten umfassenden dynamischen Arbeitsbereich der Retina erfordert die Adaptation der retinalen Lichtsensitivität an die jeweils herrschende Umgebungshelligkeit. Eine Ebene, auf der solche adaptativen Prozesse ablaufen, ist die der synaptischen Interaktion zwischen Horizontalzellen und Photorezeptoren sowie die GJIC zwischen Horizontalzellen in der äußeren Retina, welche in Teleostiern einer lichtabhängigen morphologischen bzw. physiologischen Plastizität unterliegen. Der Einfluß der umgebenden Lichtverhältnisse wird dabei über neuromodulatorische Substanzen vermittelt. Neben dem seit längerem bekannten DA hat sich in den zurückliegenden Jahren RA als ein weiterer putativer Neuromodulator in der äußeren Retina herauskristallisiert. So ahmt RA den Einfluß von kontinuierlicher Belichtung sowohl auf die *Spinule*-Bildung als auch auf bestimmte Lichtantwort-eigenschaften und auf die GJIC von Horizontalzellen im Fisch nach. Völlig unklar sind bisher allerdings die Mechanismen, über die RA ihre Wirkung entfalten könnte. Der Einfluß von RA auf die *Spinule*-Bildung könnte z.B. über eine Interaktion mit der Proteinkinase C erfolgen, von der ihrerseits beschrieben wurde, daß sie die *Spinule*-Bildung induziert (Weiler *et al.*, 1991; Ohkubo *et al.*, 1984). Der Einfluß von RA auf die GJIC bzw. die Leitfähigkeit von GJ-Kanälen von Horizontalzellen in der Fischretina scheint unabhängig von intrazellulären Signalkaskaden über eine externe Membran-Bindungsstelle zu erfolgen, wobei die RA-Bindung an diese Bindungsstelle eine RAR-ähnliche Pharmakologie aufweist (Zhang & McMahon, 2000). Diese Arbeit hat die Charakterisierung und Identifikation RA-bindender Proteine in der Karpfenretina zum Ziel, um so Hinweise über mögliche molekulare Mechanismen der RA-Wirkung in der Karpfenretina zu erhalten. Im Einzelnen sollen dabei folgende Fragen beantwortet werden:

- Werden in der Karpfenretina RAR-ähnliche Proteine exprimiert?
- Wo sind solche Proteine lokalisiert?
- Lassen sich in der Karpfenretina membrangebundene RA-Bindungsstellen bzw. RA-bindende Proteine nachweisen und ihre RA-Bindung charakterisieren?
- Gibt es eventuell Korrelationen zwischen membrangebundenen RAR-ähnlichen und RA-bindenden Proteinen?

2 Material & Methoden

2.1 Versuchstiere

Die in den Versuchen eingesetzten Karpfen (*Cyprinus carpio*) wurden von einer Fischfarm aus Visbek bezogen. Ihre Größen variierten altersbedingt zwischen 8 und 10 cm bzw. 18 und 25 cm. Sie wurden in einem abgedunkelten Becken bei 20 °C in einem Hell-Dunkel-Zyklus mit jeweils 12-stündigen Phasen gehalten.

2.2 Immunbiochemie

2.2.1 Allgemeine Präparation

Den Karpfen wurden nach 30 - 60-minütiger Dunkeladaptation und anschließender Tötung die Augenbecher entnommen. Durch einen kreisförmigen Schnitt unterhalb der Iris wurden daraufhin der gesamte vordere Augenbereich, einschließlich der Linse, und mittels eines Wattestäbchens auch große Teile des Glaskörpers entfernt. Die Retina wurde dann aus dem Augenbecher herauspräpariert, in einem Waschpuffer (50 mM NaCl und 50 mM Tris/HCl, pH 7,4) zweimal gewaschen und dann entweder in einem entsprechenden Homogenisierungspuffer mit einem Glashomogenisator homogenisiert oder zunächst in Fischringer inkubiert.

2.2.2 Subzelluläre Fraktionierung und Proteinbestimmung

Das Retina-Totalhomogenat (TH) wurde zunächst mittels einer Vorzentrifugation vom groben Zelldebris getrennt. Diese erfolgte mit einer Tischzentrifuge mit Festwinkelrotor 5' bei 4 °C und 1700 Upm. Der Überstand wurde aufbewahrt und das Sediment wurde mit dem jeweiligen Homogenisierungspuffer (HP) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das schließlich entstandene Sediment wurde, da es auch die Zellkerne enthielt, als Kernfraktion (N) bezeichnet. Die Überstände aus den beiden Zentrifugationsschritten wurden anschließend vereinigt und ein drittes Mal zentrifugiert. Der schließlich entstandene Überstand (\ddot{U}_1) wurde mittels einer Hauptzentrifugation in cytosolische (C) und Membran (M)-Bestandteile getrennt. Die Hauptzentrifugation erfolgte entweder mit der Tischzentrifuge 60' bei 4 °C und 14000 Upm (~ 20000 g) oder mit einer mit Druckluft betriebenen Ultrazentrifuge (*Airfuge*, Beckmann) 15' bei 22 psi (~ 100000 g). Der Überstand (\ddot{U}_2) enthielt die cytosolischen Proteine und das Sediment (P_2) wurde im jeweiligen HP resuspendiert und bildete die Membranfraktion. Schließlich erfolgte eine Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen nach Bradford (1976) an einem Zweistrahlphotometer (Hitachi 100-80) mit Rinderserumalbumin (BSA)-Standardlösungen als Referenz. In einigen Versuchen wurden Membranextrakte eingesetzt.

Dafür wurde die P₂-Fraktion in dem jeweiligen HP, der zusätzlich 0,1 % Triton X-100 (TX-100) enthielt, resuspendiert und über Nacht bei 4 °C und ständiger Rotation extrahiert. Die nichtextrahierten Bestandteile wurden anschließend 5' bei 4 °C und 3100 Upm (~ 1000 g) abzentrifugiert. Schließlich wurde die TX-100-Konzentration des Extrakts anhand von Ultrafiltrationseinheiten (Amicon, Ausschlußgröße 10kDa) mittels Zentrifugation und anschließender Zugabe von HP verringert (die Verdünnung war abhängig von der anschließenden Verwendung) und der Extrakt ankonzentriert. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C entweder an der Tischzentrifuge bei 14000 Upm oder mit einer Hereaus-Minifuge 2 bei 4500 Upm.

Bradford-Reagenz: 0,01 % Coomassie-Brillantblau G-250; 5 % EtOH, 8,5 % H₃PO₄

2.2.3 Immunbiochemische Analyse verschiedener retinaler Fraktionen

2.2.3.1 Probenaufbereitung

Die Retinen von Maus und Karpfen wurden in den entsprechenden HPs homogenisiert und subzellulär fraktioniert. Ein TH einer Rattenretina, sowie eine M- und eine N-Fraktion eines Rattenhirns wurden von apl. Prof. Dr. U. Janssen-Bienhold zur Verfügung gestellt. Die Präparation der Mausretinen wurde von Dipl.-Biol. T. Schubert vorgenommen. Die jeweiligen Proben wurden mit SDS-Laufpuffer (3x) 2:3 verdünnt und 5' gekocht. Die aufgetrennten Proteinmengen betrugen 50 µg (bei allen Karpfenproben), 60 µg (TH_{Retina} und M_{Hirn} der Ratte und beide Mausproben) und 80 µg (N_{Hirn} der Ratte). Es wurde auch eine Fraktion, die mit Horizontalzellen angereichert war, analysiert. Die HC-Isolierung wurde in Anlehnung an van Buskirk & Dowling (1981) durchgeführt (vgl. auch Janssen-Bienhold *et al.*, 1993).

| | |
|---|--|
| BP (= HP _{Karpfen}) | 0,1 M NaCl; 1 mM DTE; 1 mM PMSF; 1 mM EDTA; 0,1 mM Na ₃ VO ₄ ; 2 µl/ml PIC (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma); 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 |
| HP _M (= HP _{Maus}) | 2 mM EDTA; 2 mM EGTA; 2 µg/ml Leupeptin; 4 µg/ml Aprotinin; 2 mM PMSF; 1 mM DTE; 0,1 mM Na ₃ VO ₄ ; 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 |
| 3 x SDS-Probenpuffer | 30 % Glycerol; 3 % β-Mercaptoethanol; 9 % SDS; 185 mM Tris, pH 6,8 |

2.2.3.2 Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Die Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Protokoll von Laemmli (1970) aufgetrennt. Vor der Auftrennung wurden die Proben mit einer Heraeus-Tischzentrifuge 3' bei 6000 Upm zentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte entweder in einem großen vertikalen Gelelektrophoresesystem (Modell V-16, BRL) mit einem 8-10-prozentigem Gradienten-Trenngel, oder in einem mittelgroßen vertikalen Elektrophoresesystem (Universitäts-eigene Konstruktion) mit einem 9-prozentigen Trenngel. Für eine Mole-

kulargewichtsbestimmung wurden Marker (LMW und HMW) mit aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 180 V (große Gele) bzw. 160 V (kleinere Gele).

| | |
|-----------------|--|
| SDS-Laufpuffer | 25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS |
| LMW | <i>light molecular weight marker</i> , Sigma |
| HMW | <i>high molecular weight marker</i> , Sigma |
| Lauffrontmarker | 0,1 % Bromphenolblau |

2.2.3.3 Immunoblotanalyse

Die in den Gelen aufgetrennten Proben wurden mittels der Westernblot-Methode nach Towbin *et al.* (1979) auf eine Nitrocellulosemembran (Optitran BA-S 85, Porendurchmesser 0,45 µm, Schleicher & Schuell) geblottet. Dieser Transfer erfolgte in den jeweiligen Gelgrößen entsprechenden Blotkammern (klein: *Mini-PROTEAN II Dual Slab Cell*, Bio-Rad; groß: Trans-Blot™ Cell) bei 4 °C und einer Spannung von 40 V (1 Stunde) und anschließenden 70 V (2 Stunden). Die Bloteffizienz wurde dann durch 15-minütige Inkubation mit Ponceau S überprüft. Daraufhin wurden die Blots entfärbt und unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde bei 37 °C mit einer Milchpulver-Lösung (5 % in PBS) blockiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10' in PBS wurden die Blots mit dem primären Antikörper anti-RARα (s. Tab. 2-1, S. 28; 1:1000 in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (goat anti-rabbit IgG HRP-conj., Bio-Rad; 1:3000 in PBS plus 2 % Milchpulver) für zwei Stunden bei RT. Es folgten erneut Waschschritte (6 x 5' in PBS) und die Antigendetektion mittels des ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Systems (Amersham Life Science). Die Inkubationszeit mit den Reaktionslösungen betrug 60 Sekunden. Mittels Röntgenfilmen (Kodak X-O-MAT Film) wurden die Ergebnisse visualisiert, wobei die Expositionszeiten variierten. Nach der Exposition wurden die Filme ca. 3' entwickelt (Kodak D19-Entwickler, Sigma), kurz in H₂O gewaschen, etwa 8 - 10' fixiert (Kodak Fixierer, Sigma) und mindestens 10' in H₂O gewaschen.

| | |
|----------------|---|
| Blotpuffer | 25 mM Tris; 190 mM Glycin; 10 % MeOH; 0,01% SDS |
| Ponceau S | 0,2 % Ponceau S in 3 % Essigsäure |
| PBS (physiol.) | 135 mM NaCl, 2,6 mM KCl; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4 |

2.2.4 *In vitro*-Inkubation der Retinen

Die freipräparierten Retinen wurden zunächst zweimal in Fischringer gewaschen, dann 20' in frisch O₂-begastem Fischringer äquilibriert und schließlich 40' in neuem O₂-begastem Fisch-

ringer entweder im Dunkeln oder unter einer Kaltlichtlampe dunkel- bzw. helladaptiert. Es folgten die Homogenisierung in BP und schließlich die Analyse mittels Immunoblotting (s. Kap. 2.2.3).

| | |
|-------------------|--|
| HEPES-Fischringer | 120 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; 2,5 mM CaCl ₂ ; 16 mM Glukose; 2 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, pH 7,4; vor Einsatz O ₂ -begast |
|-------------------|--|

2.2.5 *In vitro*-Dephosphorylierung

Die Retinen wurden in HP_{AP} homogenisiert. Die Inkubation erfolgte 18 Stunden bei 37 °C mit 50 µg Protein und 6 U AP in einem Reaktionsvolumen von 30 µl in Gegenwart von SDS (1 %). Vor der Zugabe des Enzyms wurde der Reaktionsansatz in einer Mikrowelle erhitzt (1'). Es folgte die Analyse mittels Immunoblotting (s. Kap. 2.2.3).

| | |
|--|--|
| HP _{AP} (= HP _{Alkaline Phosphatase}) | 2 mM EDTA; 5 mM EGTA; 10 mM DTE; 10 µM ZnCl ₂ ; 2 µg/ml Leupeptin; 5 µg/ml Aprotinin; 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 |
| Alkaline Phosphatase | 1 U/µl; Boehringer Mannheim |

2.2.6 Präparative Gelelektrophorese (PGE)

Auch mit der PGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht (M_r) aufgetrennt, allerdings durchlaufen sie das Gel dabei komplett, so daß sie am Ende des Gellaufes nach M_r getrennt in verschiedenen Fraktionen vorliegen. Die Fraktionen können dann gewaschen (= Verringerung der SDS-Konzentration), ankonzentriert und mittels Immunoblot-Analyse auf Immunoreaktivität (IR) hinsichtlich eines bestimmten Antigens überprüft werden.

2.2.6.1 Präparation und Elektrophoreselauf

In einem PGE-Lauf wurden 5 mg Membranprotein mit SDS-Probenpuffer (3x) 2:3 verdünnt und mit 30 µl Bromphenolblau (0,1 %) versetzt, 5' gekocht und vor dem Auftragen 3' bei 6000 Upm abzentrifugiert, analog der Aufbereitung für die Gelelektrophorese nach Laemmli (vgl. Kap 2.2.2 und 2.2.3). Die Auftrennung erfolgte auch bei der PGE mittels SDS-PAGE, hier allerdings in einem vertikalen Rundgel-Elektrophoresesystem (Prep Cell Model 491, Bio-Rad) mit einem 14-prozentigen Trenngel. Die Trenngellösung wurde dabei vor Zugabe der Katalysatoren entgast. Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug auch bei der PGE 4,5 %. Vor dem Lauf wurden die zur Apparatur gehörenden Fritten und Membranen entgast und die Elutionskammer luftblasenfrei zusammengesetzt. Nach dem Zusammenbau wurden alle Schläuche, Verbindungen und Kammern von Luftblasen befreit. Der Elektrophoreselauf

erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA, die Fraktionierungspumpe wurde auf ein Elutionsvolumen von 60 ml/h und die zugehörige Kühlpumpe auf den Wert 55 eingestellt. Es wurden 180 5 ml-Fraktionen gesammelt, beginnend 9 Stunden nach Laufstart, so daß die Gesamtlaufzeit 24 Stunden betrug. Um die Auftrennung zu überprüfen wurden 30 µl jeder zweiten Fraktion für die SDS-PAGE nach Laemmli aufbereitet und in großen 7,5 - 15-prozentigen Trenngelen aufgetrennt. Die Gele wurden dann Coomassie-Brillantblau gefärbt (30' fixiert, 30' gefärbt und über Nacht entfärbt, wobei nach 20' der Entfärber gewechselt wurde) und getrocknet.

| | |
|----------------------------------|--|
| Elutionspuffer | 25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS; vor Verwendung entgast |
| Coomassie-Brillantblau-Fixierer | 50 % MeOH; 10 % Essigsäure |
| Coomassie-Brillantblau-Färber | 0,2 % R-250; 50 % MeOH; 10 % Essigsäure |
| Coomassie-Brillantblau-Entfärber | 10 % MeOH; 10 % Essigsäure |

2.2.6.2 Ankonzentration der Fraktionen und Immunoblot-Analyse

Von den Fraktionen, die Proteine im interessanten M_r -Bereich enthielten, wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende vereinigt. Diese wurden dann mittels Ultrafiltrationseinheiten (Amicon, Ausschlußgröße 10 kDa) und einer Heraeus-Minifuge 2 bei 4 °C und 4500 Upm gewaschen und ankonzentriert. Dabei wurde das Volumen zunächst zweimal auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens reduziert und mit Waschpuffer wieder auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt, schließlich folgte eine Ankonzentration auf ein Restvolumen von 150 bis 500 µl. Ein dem Restvolumen entsprechendes Aliquot wurde dann für die Gelelektrophorese nach Laemmli aufbereitet und mittels Immunoblot-Analyse auf anti-RAR α -IR hin untersucht (s. Kap. 2.2.3). Von Fraktionen früherer PGE-Läufe wurden jeweils 20 bzw. 30 µl auf anti-RAR α -IR hin analysiert.

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| Waschpuffer | 20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM PMSF |
|-------------|-----------------------------------|

2.2.7 Zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese nach O'Farrell (1975)

2.2.7.1 Probenaufbereitung und Gelelektrophorese

Bei der 2D-Gelelektrophorese nach O'Farrell werden die Proteine zunächst in einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und anschließend in der 2. Dimension nach ihrem M_r aufgetrennt. Die Retinen wurden in HP_{2D} homogenisiert und subzellulär fraktioniert, einige Membranproteine wurden auch extrahiert (s. Kap. 2.2.2). Die Proben wurden dann mit LP (2x) auf ein Zielvolumen von 100 µl 1:2 verdünnt, wobei noch eine ‚Spatelspitze‘ Harnstoff addiert wurde. Nach kurzer Inkubationszeit wurden die Proben aufge-

tragen oder eingefroren (- 20 °C). Die Rundgele wurden nach O'Farrell präpariert und polymerisierten über Nacht aus. Die Gele wurden dann für zwei Stunden mit LP überschichtet. Nach Auswechseln des LPs erfolgte der Vorlauf in der entsprechenden Elektrophoresekammer (*tube gel module*): 15' 200 V; 30' 300 V; 30' 400 V. Mit Ausnahme zweier Gele, die nach dem Hauptlauf als pH-Kontrollen dienten, wurden der LP von den Gelen entfernt, die Proben aufgetragen und der Hauptlauf durchgeführt: 20 h bei 450 V (= 9000 Vh). Die pH-Kontroll-Gele wurden in etwa 10 gleich große Stücke geschnitten, mit 1 ml H₂O inkubiert und nach etwa zwei Stunden gemessen. Die übrigen Gele wurden 15' in ÄP äquilibriert und anschließend eingefroren. Die Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte nach Laemmli (s. Kap. 2.2.3.2), wobei allerdings Gele mit einer Dicke von 1,5 mm verwendet wurden. Für eine anschließende Immunoblot-Analyse (s. Kap. 2.2.3.3) wurden zum Vergleich Membranfraktionen mitaufgetrennt. Die anderen 2D-Gele wurden nach verschiedenen unspezifischen Färbemethoden gefärbt, entweder Coomassie-Brillantblau (s. Kap. 2.2.6.1), oder Coomassie-Colloidalblau oder Silber nach der Methode von Shevchenko *et al.* (1996; s. Kap. 2.2.7.2). Bei der Colloidalblau-Färbung wurden die Gele 20' fixiert und anschließend 2 Tage gefärbt und schließlich mit H₂O entfärbt.

| | |
|----------------------------|--|
| HP _{2D} | 2 mM EGTA; 2 mM EDTA, 1 mM DTE, 0,1 mM Na ₃ VO ₄ ; 1 mM PMSF 2 µl/ml PIC; 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 |
| LP (= Lysispuffer) | 9,5 M Harnstoff; 2 % NP-40; 1,6 % Ampholine 5-7; 0,4 % Ampholine 3-10; 5 % β-Mercaptoethanol |
| 2x LP | 9,5 M Harnstoff; 4 % NP-40; 3,2 % Ampholine 5-7; 0,8 % Ampholine 3-10; 10 % β-Mercaptoethanol |
| Äquilibrierungspuffer (ÄP) | 30 % Glycerin; 3 % SDS; 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 |
| Anodenpuffer | 0,01 M H ₃ PO ₄ ; vor Gebrauch entgasen |
| Kathodenpuffer | 0,02 M NaOH; vor Gebrauch entgasen |
| Gellösung | 9,5 M Harnstoff; 4 % Acrylamidlösung (für IEF); 2 % NP-40; 4 % Ampholine 5-7 (Serva, Heidelberg); 1% Ampholine 3-10 (Serva); 0,1 % APS, 0,07 % TEMED; vor Katalysatorzugabe entgasen |
| Colloidalblau-Fixierer | 45 % MeOH; 1 % Essigsäure |
| Colloidalblau-Färber | 17 % Ammoniumsulfat; 34 % MeOH; 0,5 % Essigsäure; 0,1 % Coomassie Blau G-250 (Sigma) |

2.2.7.2 Silberfärbung nach Shevchenko *et al.* (1996)

Die Gele wurden 20' fixiert und anschließend 10' in 50 % MeOH gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift (10' in H₂O) wurden die Gele eine Minute sensibilisiert, zweimal eine Minute in H₂O gewaschen und 20' bei 4°C mit der Silbernitratlösung inkubiert. Nach erneu-

tem zweimaligem Waschen in H₂O (je 1') wurden die Gele entwickelt, bis die Färbung ausreichend schien, die Reaktion in 5 % Essigsäure abgestoppt und die Gele schließlich in einprozentiger Essigsäure im Dunkeln aufbewahrt.

| | |
|-------------------------|---|
| Fixierer | 50 % MeOH; 5 % Essigsäure |
| Sensibilisierungslösung | 0,02 % Natriumthiosulfat |
| Färber | 0,1 % Silbernitrat |
| Entwickler | 2 % Natriumcarbonat; 0,04 % Formaldehyd |

2.3 Immunhistologie

Für die Immunhistologie wurden Quer- und Tangentialschnitte von Augenbecherpräparationen bzw. von isolierten Retinen angefertigt. Für einen Vergleich zwischen hell- und dunkeladaptierten Retinen wurden die Karpfen vor der Präparation jeweils eine Stunde hell- bzw. dunkeladaptiert. Die Retina wurde nach dem Entfernen des Glaskörpers im Augenbecher belassen und 2 x 10' bzw. 2 x 15' in Immunofix (2 % Paraformaldehyd in 0,1 M PB) fixiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10' in 0,1 M PB wurden die Augenbecher in 30 % Sucrose in 0,1 M PB überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann erfolgten die Einbettung in Kryomatrix (Tissue-Tek, Sakura) und die Schnitte am Gefriermikrotom, die anschließend bei -20 °C eingefroren wurden. Die Schnitte wurden vor Gebrauch auf einer Heizplatte aufgetaut (15', 37 °C). Nach dreimaligem Waschen (10') in PBS wurden die Schnitte blockiert (1 h in PBS / 0,3 % TX-100 und i.d.R. 5 % (max. 10 %) NGS (*normal goat serum*)) und anschließend mit dem primären Antikörper inkubiert (über Nacht; 4 °C). Der primäre Antikörper wurde in PBS, 0,3 % TX-100 und 3 % NGS verdünnt. Lediglich bei der Doppelmarkierung mit Caldendrin und bei einer Verwendung des sekundären FITC-konj. anti-Kaninchen-Antikörpers wurden Blockierung und Erstantikörperverdünnung mit Mausserum durchgeführt. Die Spezifität des RAR α -Antikörpers wurde durch eine Präinkubation des Antikörpers mit dem zur Immunisierung eingesetzten Peptid getestet. Dazu wurde der Antikörper mit einem 10-fachen Überschuß des Peptids inkubiert (2 h bei RT und Rotation), die Inkubationslösung abzentrifugiert (5', 3000 Upm) und die Schnitte mit dem Überstand inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 10') in PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (2 h bei RT). Bei den Doppelmarkierungen wurden Zweitantikörperlösungen ohne Serum verwendet, bei den anderen wurden bis zu 2 % NGS addiert. Die Inkubationen der Schnitte erfolgten im Dunkeln. Es folgten erneut drei Waschschritte (10' in PBS) und das Eindeckeln mit 90 % Glycerol, 10 % 0,1 M PB und (außer bei der Caldendrin-Doppelmarkierung) 2,5% KI. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica TCS SL).

PB

Natriumphosphatpuffer (NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4), pH 7,4**Tab. 2-1:** Antikörper. H = Histologie, B = Biochemie

| Antikörper | Spezies | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------------|---|
| primäre Ak | | | |
| Anti-RXR α | Kaninchen | 1:100 | zur Verfügung gestellt von Dr. J.J.M. Janssen, Nijmegen, NL |
| Anti-RXR β | Kaninchen | 1:100 | zur Verfügung gestellt von Dr. J.J.M. Janssen, Nijmegen, NL |
| Anti-RXR γ | Kaninchen | 1:100 | zur Verfügung gestellt von Dr. J.J.M. Janssen, Nijmegen, NL |
| Anti-RAR α (alt) | Kaninchen | 1:100 | zur Verfügung gestellt von Dr. J.J.M. Janssen, Nijmegen, NL |
| Anti-RAR β | Kaninchen | 1:100 | zur Verfügung gestellt von Dr. J.J.M. Janssen, Nijmegen, NL |
| Anti-RAR γ | Kaninchen | 1:100 | zur Verfügung gestellt von Dr. J.J.M. Janssen, Nijmegen, NL |
| Anti-RAR α (neu) | Kaninchen | 1:100 (H) 1:1000 (B) | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Anti-FRet 43 | Maus | 1:1000 | zur Verfügung gestellt von Dr. R. Bremiller, USA |
| Anti-Caldendrin | Meerschweinchen | 1:2000 | zur Verfügung gestellt von der AG von Prof. Dr. Gundelfinger, Magdeburg |
| Anti-GRIP | Maus | 1:600 | Transduction Laboratories, BD, Lexington, USA |
| sekundäre Ak | | | |
| FITC anti-Kaninchen IgG | Esel | 1:300 | Sigma, Steinheim |
| Oregon Green anti-Kaninchen IgG | Ziege | 1:300 | Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL |
| Alexa 568 anti-Kaninchen IgG | Ziege | 1:300 | Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL |
| Alexa 488 anti-Maus IgG | Ziege | 1:300 | Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL |
| Cy3 anti-Meerschweinchen IgG | Ziege | 1:1000 | Jackson ImmunoResearch, Soham, UK |
| HRP anti-Kaninchen IgG | Ziege | 1:3000 | Bio-Rad, München |
| AP anti-Kaninchen IgG | Ziege | 1:1000 | Vector Laboratories, Alexis, Grünberg |
| biotinylierter anti-Kaninchen IgG | Ziege | 1:500 | Vector Laboratories, Alexis, Grünberg |

2.4 Immuncytochemie

Suspensionen retinaler Zellen wurden aus der isolierten Retina wurden in Anlehnung an Jansen-Bienhold *et al.* (1993) gewonnen. Es wurden jeweils 200 μl der Zell-Suspension ausplatziert. Nach 1 h wurden die nicht-adhäsierten Zellen mit dem Medium abgezogen und Immunofix auf die Objektträger gegeben. Das Immunofix wurde nach 10' gewechselt. Die anschließende Blockierung und der Antikörper-Nachweis erfolgten wie bei den Schnitten (s. Kap. 2.3).

L-15-Medium

L-15 Leibovitz-Medium, Sigma 2,968 g in 200 ml, pH 7,4, O₂-begast

2.5 Elektronenmikroskopie

Die ultrastrukturelle Analyse der Lokalisation der anti-RAR α -IR erfolgte mittels verschiedener Methoden. Bei beiden Ansätzen wurden die Augenbecher eines helladaptierten (1 h) Fisches verwendet und mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PB fixiert (2 x 20' bei RT). Im Folgenden unterschieden sich beide Methoden allerdings. In einer Methode wurden die Augenbecher nach Fixierung gewaschen (3 x 15' in 0,1 M PB) und die Retinen in 0,1 M PB freipräpariert und anschließend über Nacht bei 4 °C in Gefrierschutz inkubiert (30 % Sucrose in 0,1 M PB). Bei der alternativen Methode wurden die Augenbecher nach erster Fixierung zusätzlich in Bicarbonat-Fixierer inkubiert (über Nacht bei 4 °C), anschließend in 0,1 M PB gewaschen (1 h bei 4 °C) und die Retinen im gleichen Puffer freipräpariert. Die Retinen wurden dann 30' auf Eis in Natriumborohydrid (1 % in 0,1 M PB) inkubiert, mit 0,1 M PB gewaschen und in Gefrierschutz inkubiert (30' in 10 % Sucrose + 5 % Glycerol; 1 h in 15 % Sucrose + 10 % Glycerol und über Nacht in 20 % Sucrose + 10 % Glycerol; alle Schritte bei 4 °C). In beiden Fällen folgten wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen in einem Trockeneis-MeOH-Gemisch (3 bzw. 2 x 10'). Die Retinen wurden daraufhin gesechstelt bzw. geviertelt und in Agar eingebettet. Dann wurden tangentiale (60 μ m) bzw. Querschnitte (200 μ m) am Vibratom angefertigt. Die Schnitte wurden dann (nach einmaligem Waschen (10' in 0,1 M PB) bei der alternativen Methode) blockiert (1 h bzw. 2 h in 0,1 M PB plus 10 % NGS) mit anti-RAR α inkubiert (1:100 in 0,1 M PB; bei 4 °C übers Wochenende), gewaschen (3 x 10' mit 0,1 M PB) und mit dem biotinylierten anti-Kaninchen IgG-Antikörper inkubiert (1:500 in 0,1 M PB; bei 4 °C über Nacht). Nach erneutem Waschen (3 x 15' mit 0,1 M PB) folgten die Inkubation mit dem *ABC-Kit* (Lösung A (1:70; über Tag) und Lösung B (1:70; über Nacht)) und erneutes Waschen (3 x 10'). Anschließend wurde die DAB-Reaktion durchgeführt (20' Inkubation mit der DAB-Lösung und 7' bzw. 10' Inkubation mit der DAB-H₂O₂-Lösung). Die Schnitte wurden erneut gewaschen (3 x 10') und mit EM-Fixierer fixiert (1 h bzw. 1,5 h). Nach erneutem Waschen (3 x 10') folgte bei einigen Schnitten eine Intensivierung (7' bzw. 10' bei 60 °C mit Lösung I; nach Waschen in H₂O, 2' bei RT mit Lösung II und nach abermaligem Waschen in H₂O erneut 2' bei RT mit Lösung III). Schließlich wurden die Schnitte mit Osmiumtetroxid (1 %) inkubiert (1 h bzw. 1,5 h bei 4 °C), gewaschen (3 x 10', 1x über Nacht bei 4 °C), mit einer Acetonreihe entwässert (50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 2 x 100 %, je 10'), in einem Aceton/Epoxidharz-Gemisch (1:1) inkubiert (3 h bzw. 2 h bei RT) und über Nacht bei RT in Epoxidharz eingebettet. Nach dem Trimmen der Harzblöcke wurden Semidünnschnitte (0,95 μ m) bzw. Ultradünnschnitte (~ 95 nm) am Mikrotom (Ultracut E, Reichert-Jung) hergestellt und am EM ausgewertet.

| | |
|---|---|
| <i>VectaStain Elite ABC-Kit</i> | Vector Laboratories |
| DAB-Lösung | 0,1 % DAB (3,3-Diaminobenzidin) in 0,1 M PB |
| DAB-H ₂ O ₂ -Lösung | 0,1 % DAB (3,3-Diaminobenzidin) in 0,1 M PB + 10 µl / ml H ₂ O ₂ |
| EM-Fixierer | 4 % Paraformaldehyd und 1,6 % Glutaraldehyd in 0,1 M PB |
| Bicarbonat-Fixierer | 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Bicarbonat-Puffer, pH 10,4 |
| Intensivierungslösungen | (I) 2,6 % Hexamethylentetramin; 0,2 % Silbernitrat; 0,2 % Borax; (II) 0,05 % Goldchlorid in H ₂ O und (III) 2,5 % Natriumthiosulfat |

2.6 Bindungstest

Für den Bindungstest wurden die Retinen in BP homogenisiert und anschließend subzellulär fraktioniert (s. Kap. 2.2.1 und 2.2.2). Der Bindungstest wurde mit cytosolischen und Membranfraktionen durchgeführt, wobei die Membranfraktion nach Resuspension in BP nochmals abzentrifugiert wurde (5', 1000 Upm, 4 °C). Die markierte RA wurde in EtOH gelöst vom Hersteller geliefert, weitere Verdünnungen wurden ebenfalls in EtOH vorgenommen. Die nichtmarkierten RA-Isomere, sowie ROL und RAL wurden in DMSO gelöst (100 mM) und unmittelbar vor jedem Experiment mit EtOH verdünnt. Phosphatidylserin lag in Chloroform gelöst vor, welches unter Vakuum verdampft und dann durch DMSO ersetzt wurde. PDBu lag in DMSO gelöst vor (10 mM) und wurde ebenfalls mit EtOH verdünnt. Dopamin wurde zusammen mit Pargylin (20 mM) in BP gelöst (100 mM) und auch mit BP verdünnt. Die EtOH-Konzentration im Bindungsansatz betrug immer 5 %, lediglich in den Versuchen, bei denen verschiedene Inhibitoren gleichzeitig getestet wurden, betrug die EtOH-Konzentration 7,5 %. Die Verdünnungsschritte der verschiedenen Substanzen, einschließlich der [³H]RA, wurden jeweils durch 3-minütige ‚Beschallung‘ im Ultraschallbad komplettiert, aufgrund der geringen Löslichkeit der Retinoide in wässriger Lösung. Die Ansätze, in denen die [³H]RA-Bindung inhibiert werden sollte, wurden mit den Inhibitoren 10' präinkubiert und anschließend mit [³H]RA inkubiert. Die Inkubation mit [³H]RA und den Inhibitoren erfolgte bei RT in einem Inkubationsvolumen von 100 µl. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl eisgekühlter *Charcoal*-Suspension, welche zuvor ein bis zwei Minuten auf dem Magnetrührer gut durchmischt wurde. Die Inkubation erfolgte 10' auf Eis, wobei der Ansatz nach etwa 5' erneut kurz gevortext wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (cytosolische Proben: 5' bei 5000 Upm; Membranproben: 10' bei 1100 Upm). Jeweils 100 µl des Überstandes wurden daraufhin erneut mit 50 µl der *Charcoal*-Suspension inkubiert (5' auf Eis) und anschließend abzentrifugiert. Erneut wurden jeweils 100 µl des Überstandes entnommen und mit 10 ml *Lumasafe*TM *Plus* (Lumac-LSC) gemischt. Nach mindestens einer Stunde erfolgte dann die Auswertung am Szintillator. Zur Bestimmung des Proteinverlusts während des Bindungstests wurden 0,45 µg

/ μl Protein mit verschiedenen RA-Konzentrationen bzw. verschiedene Proteinkonzentrationen mit 40 nM RA inkubiert. Nach zweimaliger Inkubation mit der *Charcoal*-Suspension und anschließender Zentrifugation wurden je nach eingesetzter Proteinmenge entsprechende Aliquots entnommen, deren Proteinkonzentration mit der Bestimmungsmethode nach Bradford (s. Kap. 2.2.2) ermittelt wurde.

| | |
|---------------------------------------|--|
| BP | s. Kap. 2.2.3.1 |
| <i>Charcoal</i> -Suspension | 1,5 % Norit [®] A (Serva); 0,15 % Dextran FP70 (Serva); 10 mM KCl 1 mM DTE; 7,75 ml H ₂ O; 50 mM Tris/HCl, pH 7,4 |
| [11,12- ³ H(N)]-Retinsäure | 40,5-56 Ci / mmol; Moravsek Biochemicals, Brea, USA (bezogen über Hartmann Analytic, Braunschweig) |

2.7 Markierung [³H]RA-bindender Proteine nach Bernstein *et al.* (1995)

Für diese Experimente wurden cytosolische und extrahierte Membranproteine (s. Kap. 2.2.1 und 2.2.2) sowie PGE-Fraktionen (s. Kap. 2.2.6) verwendet, die Homogenisierung erfolgte in BP. Die Verdünnungen der RA-Isomere und der Tritium-markierten RA erfolgten wie beim Bindungstest. Die Inkubation mit [³H]RA erfolgte entweder, nachdem die [³H]RA zunächst in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, das EtOH unter Vakuum verdampft und schließlich der Inkubationsansatz mit dem Protein zugegeben wurde, oder durch Zugabe der in EtOH gelösten [³H]RA in den Inkubationsansatz, der in jedem Fall 100 μl betrug, während die [³H]RA-Zielkonzentration 40 nM betrug. Sollte die RA-Bindung durch unmarkierte RA-Isomere inhibiert werden, wurden zunächst 110 μl Inkubationsansatz mit der entsprechenden Inhibitorkonzentration präinkubiert, woraufhin dann 100 μl bzw. 98 μl in die Inkubation mit [³H]RA überführt wurden. Die finale Proteinkonzentration betrug, außer im Fall der PGE-Fraktionen, 1 μg / μl in 100 μl Ansatz. Eine Präinkubation mit dem RAR α -Antikörper (1:150 in BP) erfolgte ebenfalls in einem größeren Volumen (150 μl). Die Präinkubation mit unmarkierten Inhibitoren erfolgte 15 - 20' bei RT, die Präinkubation mit dem Antikörper erfolgte zwei Stunden bei RT auf einem Rotor. Die Inkubation mit [³H]RA erfolgte 15' bei RT bzw. 10' bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden die Proben auf einer mit Eis gefüllten Glaspetrischale 5' mit UV bestrahlt (360 nm; 1250 J / cm²). Anschließend erfolgten eine Inkubation mit eisgekühltem Aceton (10' auf Eis) und eine Zentrifugation (5', 6000 Upm). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet unter Vakuum getrocknet und schließlich in SDS-Probenpuffer (1x) resuspendiert (mehrfaches Aufziehen mit der Pipette und 1' Ultraschallbad) und anschließend 5' gekocht. Die Proben wurden dann mittels SDS-PAGE nach Laemmli in 7,5 - 15-prozentigen Gradientengelen aufgetrennt und Coomassie-Brillantblau gefärbt (s. Kap

2.2.3.2 und 2.2.6.1). Die Gele wurden anschließend 30' in *Amplify* inkubiert, kurz mit H₂O gespült und getrocknet. Für den autoradiographischen Nachweis der [³H]RA-bindenden Proteine wurden Röntgenfilme mehrere Wochen auf den Gelen exponiert und anschließend entwickelt. Einige der Filme wurden mittels eines Laser-Densitometer (Molecular Dynamics) densitometrisch ausgewertet. Erfolgte der autoradiographische Nachweis von Proteinen auf Blots, so wurde eine dünne Plastikfolie zwischen Blot und Röntgenfilm platziert, was entsprechend längere Expositionszeiten zur Folge hatte. Die Blots wurden zuvor mittels Alkaliner Phosphatase-Reaktion gefärbt. Bei der Alkalinen Phosphatase-Reaktion erfolgten Waschschritte und Antikörper-Inkubationen im Rahmen der Immunoblot-Analyse mit TBS statt PBS (vgl. Kap. 2.2.3.3). Der Sekundärantikörper (1:1000) war AP-konjugiert. Die Entwicklung der Blots (30' - 45') wurde mit TBS abgestoppt, woraufhin die Blots luftgetrocknet wurden.

| | |
|---------------|--|
| Amplify | Amersham Pharmacia |
| TBS | 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl |
| Puffer A | 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 100 mM Tris/HCl, pH 9,5 |
| NBT | (<i>nitro blue tetrazolium</i>) 0,6 mg / ml Puffer A |
| BCIP | (<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>) 0,3 mg / ml Puffer A |
| PMS | (<i>phenazine methosulfate</i>) 2 mg / ml in H ₂ O |
| AP-Entwickler | 2 ml NBT, 2 ml BCIP, 30 µl PMS |

2.8 Molekularbiologische Methoden

Kits und Enzyme

| | |
|--|-------------------------------------|
| BD <i>Smart</i> TM <i>RACE cDNA Amplification Kit</i> | BD Biosciences Clontech, Heidelberg |
| dNTPs | Eppendorf, Hamburg |
| <i>Eco</i> RI Restriktionsendonuklease | Invitrogen, Karlsruhe |
| PCR <i>Clean-Up System</i> | Promega, Madison, WI, USA |
| pGEM [®] -T <i>Easy Vector</i> | Promega, Madison, WI, USA |
| QIAEX [®] II <i>Gel Extraction Kit</i> | Qiagen, Hilden |
| <i>Taq</i> DNA-Polymerase | Eppendorf, Hamburg |

Puffer und Medien

| | |
|--------------------|---|
| TBE-Puffer | 89 mM Borsäure; 20 mM EDTA; 89 mM Tris/HCl, pH 8,2 |
| LB-Medium | Roth, Karlsruhe |
| LB-Agar | Gibco BRL, Invitrogen |
| Ladepuffer | |
| P1-Puffer (Qiagen) | 10 mM EDTA ; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 ; + 100 µg / ml RNase A |
| P2-Puffer (Qiagen) | 200 mM NaOH ; 1 % SDS |
| P3-Puffer (Qiagen) | 2,5 M Kaliumacetat, pH 4,8 |

TCM-Puffer (10x) 0,1 M MgCl₂, 0,1 M CaCl₂; 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5

Primer

Alle *Primer* wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert und geliefert

| | |
|---------------------|--|
| ENO _f | <i>Forward-Primer:</i> 5'- ATG G(AGT)G CCT CCA CTG G(CT)A TC -3' |
| ENO _r | <i>Reverse Primer:</i> 5'- AGC TCC A(AG)A GCT TC(AGT) (CT)TG -3' |
| ENORAR _f | <i>Forward-Primer:</i> 5'- AG(CT) TG(CT) AGC CCC (AT)(GC)C CTC -3' |
| ENORAR _r | <i>Reverse Primer:</i> 5'- AGA GG(GC) (AT)GG GGC T(AG)C A(AG)C T -3' |
| Enolase_RACE3.1 | 5'- GCC AGA ACG TGT CAG TCT TGG A(AG)C AGG AG -3' |
| Enolase_RACE3.2.A | 5'- AGG AGA AGT ACG GCA AAG ATG CCA CCA ATG -3' |
| Enolase_3End | 5'- TTC TAC AAG GGT GGC AAG TA -3' |
| Enolase_RACE5.1 | 5'- GCG CTT GGG GTT GGT CAC (AT)GT GAG GTC -3' |
| Enolase_RACE5.2.A | 5'- AGT CAG GGC TGA T(AG)T AAC GGC TGG GGT CA -3' |

2.8.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

Die jeweils gewählten PCR-Bedingungen richteten sich in der Regel nach den gerade verwendeten *Kits* und den damit verbundenen Empfehlungen. Für die erste Amplifikation eines Karpfen-cDNA-Abschnitts, der für eine Enolase-Teilsequenz kodieren sollte, wurde zunächst mittels eines Temperaturgradienten die optimale Hybridisierungstemperatur ermittelt, die schließlich bei 61 °C lag. Entsprechend wurden die PCR-Bedingungen für den ersten Amplifikationsschritt gewählt (vorab: 3' 94 °C; dann 40 Zyklen: 30'' 94 °C; 30'' 61 °C und 1' 72 °C; schließlich: 2' 72 °C). Die Karpfen-cDNA wurde dabei von Dr. P. Dirks zur Verfügung gestellt. Als Primerpaar wurden ENO_f und ENO_r verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden fast ausnahmslos in einem Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in TBE-Puffer (1x) mit ein- bzw. zweiprozentigen Agarosegelen in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Agagel Midi (Wide), Biometra) bei ~ 100 V. Die Proben wurden dazu mit einem Ladepuffer verdünnt (1:6). Als Marker diente eine Basenpaarleiter, die Visualisierung der Banden erfolgte mit Ethidiumbromid (1 µg / ml in TBE-Puffer (1x); 30' bei RT). Das Ausschneiden von Banden erfolgte unter UV-Licht. Die Elution des ersten Amplikons erfolgte nach dem QIAEX II-Extraktionsprotokoll. Die anschließende Sequenzierung wurde, wie alle folgenden, bei SEQLAB (Göttingen) durchgeführt.

2.8.2 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)-PCR

Die 3'-RACE-PCR wurde auf der Grundlage der Sequenz des ersten Amplikons nach dem BD *Smart RACE* cDNA-Amplifikationsprotokoll mit dem entsprechenden *Kit* durchgeführt. Dabei wurde eine verschachtelte PCR mit den *Primern* Enolase_RACE3.1 (erste PCR) und

Enolase_RACE3.2.A (verschachtelte PCR) durchgeführt. Das erhaltene Amplikon wurde nach dem PCR *Clean-Up System*-Protokoll (Promega) mit dem entsprechenden *Kit* aufgereinigt. Nach einer Bestimmung der optischen Dichte (O.D.) wurde 1 µl des aufgereinigten Amplikons verwendet, um das Amplikon nach dem zugehörigen Protokoll in den pGEM[®]-T *Easy Vector* (Promega) mittels des entsprechenden *Kits* zu klonieren (über Nacht bei 4 °C). Anschließend erfolgte die Transformation in elektrokompente Zellen (*E. coli* JM 109; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Dirks). 50 µl eisgekühlte JM 109-Zellen wurden mit 1 ml Ligationsmix 5' auf Eis in einem Elektroporationsgefäß (Elektrodenabstand 0,2 cm) inkubiert und dann elektroporiert (2,5 kV; 200 Ohm, 25 µF), woraufhin umgehend vorgewärmtes LB-Medium (37 °C) zugegeben wurde. Nach einer Inkubation auf einem Rüttler (1 h, 37 °C) folgte eine Zentrifugation (3000 Upm, 5'), woraufhin der Überstand bis auf etwa 100 µl entnommen und das Sediment im restlichen Überstand resuspendiert wurde. Die Suspension wurde in unterschiedlichen Mengen auf Selektionsplatten (LB-Agar mit 100 mg / ml Ampicillin, 100 mg / ml IPTG und 40 mg / ml X-Gal) ausgestrichen, die vor dem Gebrauch nochmals mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropylthiogalactosid) bestrichen wurden, und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den zahlreichen gewachsenen Kolonien wurden 20 ausgewählt und in flüssiges LB-A-Medium (5 ml) überimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Rüttler inkubiert. Nach Entfernen eines Aliquots (100 µl) wurden aus jeder Probe die Plasmide mittels einer Plasmid-Minipräparation isoliert. Dazu wurden die Proben zentrifugiert (5', 11000 Upm) und das jeweilige Sediment in 300 µl P1-Puffer gelöst. Dann wurden 200 µl P2-Puffer addiert und nach 5-minütiger Inkubation 300 µl P3-Puffer zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation (30', 4 °C) wurden die Ansätze zentrifugiert (15', 4 °C, 14000 Upm), die Überstände mit Isopropanol versetzt und eine Stunde bei -70 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15', 4 °C, 14000 Upm) wurden die Sedimente jeweils in 1 ml EtOH (70 %) suspendiert und wieder zentrifugiert (10', 4 °C, 14000 Upm). Die Sedimente wurden bei 37 °C getrocknet und schließlich in 40 µl H₂O aufgenommen. Nach einer Restriktionskontrolle mit *EcoRI* wurden zwei Klone für eine Sequenzierung ausgewählt. Dazu wurden von den Aliquots, die vor der Plasmid-Isolierung entnommen wurden, mehrere Proben der beiden Klone auf LB-A-Medium überimpft. Die anschließende Plasmid-Isolierung und Restriktionsanalyse zeigte, daß nicht alle Proben das Plasmid enthielten. Daher wurde mit den beiden Plasmiden, die aus den ausgewählten Klonen isoliert wurden, eine chemische Transformation durchgeführt. Dabei wurden je 1 µl Plasmid mit 20 µl TCM-Puffer (10x) und 54 µl H₂O 5' auf Eis inkubiert und anschließend 125 µl eisgekühlte kompetente Zellen (*E. coli* JM 109) addiert. Nach 40-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock (2' bei

42 °C), woraufhin die Ansätze jeweils in 1 ml LB-A-Medium überführt wurden. Nach der Inkubation im LB-A-Medium (40' bei 37 °C auf einem Rüttler) wurden die beiden Ansätze auf je einer Platte ausplattiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach der, die im Anschluß an die elektrische Transformation erfolgte.

2.8.3 5'-RACE-PCR

Die 5'-RACE-PCR wurde auf der Grundlage der Sequenz, die mit der 3'-RACE-PCR erhalten wurde, ebenfalls nach dem BD *Smart RACE* cDNA-Amplifikationsprotokoll mit dem entsprechenden *Kit* durchgeführt. Das auf die verschachtelte PCR folgende Vorgehen entsprach dem vorherigen (s. Kap. 2.8.2), allerdings war hier keine chemische Transformation notwendig.

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation RAR α -immunoreaktiver Proteine in der Karpfenretina

Die Untersuchung des Vorkommens und der Verteilung RAR-ähnlicher Proteine in der Fischretina erfolgte sowohl auf immunbiochemischer Ebene mittels Immunoblotting als auch auf immunhistochemischer und immunocytochemischer Ebene bis hin zur ultrastrukturellen Lokalisation. Da die physiologischen Befunde, die den Ausgangspunkt für diese Arbeit bildeten, speziell auf einen Einfluß von RA auf die Horizontalzell-Physiologie hinwiesen, bildete die Analyse von RAR-ähnlichen Proteinen auf Horizontalzellebene, also in der OPL und in der INL, den Schwerpunkt dieser Untersuchungen.

3.1.1 RAR α -immunoreaktive Proteine in verschiedenen retinalen Fraktionen

Der Nachweis RA-Rezeptor-ähnlicher Proteine in der Karpfenretina mittels Immunoblotting wurde mit einem Antikörper durchgeführt, der spezifisch gegen die carboxyterminale Domäne vom RAR α 1 des Menschen gerichtet war. Nach Präinkubation mit dem zur Immunisierung eingesetzten Peptid wurden von dem Antikörper keine immunoreaktiven Komponenten auf dem Blot erkannt, so daß die Spezifität des Antikörpers gewährleistet war. Abbildung 3-1 zeigt die Verteilung der anti-RAR α 1-immunoreaktiven Proteine in verschiedenen Fraktionen der Karpfenretina. In einer Kernfraktion des Rattenhirns, in welchem die mRNA des Kernrezeptors RAR α exprimiert wird (Zetterström *et al.*, 1999), erkannte der RAR α -Antikörper vor allem ein Protein mit einem M_r von etwa 58 kDa, daneben wurde auch in geringerem Umfang eine etwa 61 kDa-Komponente vom Antikörper erkannt. Beide stellen vermutlich verschiedene Subtypen des Kernrezeptors RAR α der Ratte dar. In diesem M_r -Bereich erkennt der Antikörper auch einen in HeLa-Zellen exprimierten RAR α (Herstellerangaben). Eine 58 kDa- und eine 61 kDa-Komponente wurden von dem Antikörper auch in der Kern- und der Membranfraktion der Karpfenretina detektiert, allerdings waren beide Signale hier nur sehr schwach. Dagegen erkannte der Antikörper in der Karpfenretina drei immunoreaktive Proteine im M_r -Bereich von etwa 40, 43 und 46 kDa, die weder in der Kernfraktion des Rattenhirns noch in den Retinen von Ratte bzw. Maus (Abb. 3-2) nachgewiesen werden konnten. Alle drei Proteine waren in der Membranfraktion angereichert und im Cytosol gar nicht (46 kDa) bzw. nur in schwachem Ausmaß enthalten. Auch die immunoreaktiven Signale in der Kernfraktion waren sehr viel schwächer als in der Membranfraktion. Sowohl die 43 kDa- als auch die 46 kDa-Komponente waren in Fraktionen angereichert, die ihrerseits mit Horizontalzellen angerei-

chert waren, und ließen sich mit 0,1 % Triton X-100 (TX-100) aus den Membranen extrahieren. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei den anti-RAR α -immunoreaktiven 43 kDa- und 46 kDa-Proteinen um Membranproteine handelt, die z.T. oder sogar ausschließlich in Horizontalzellen der Karpfenretina exprimiert werden.

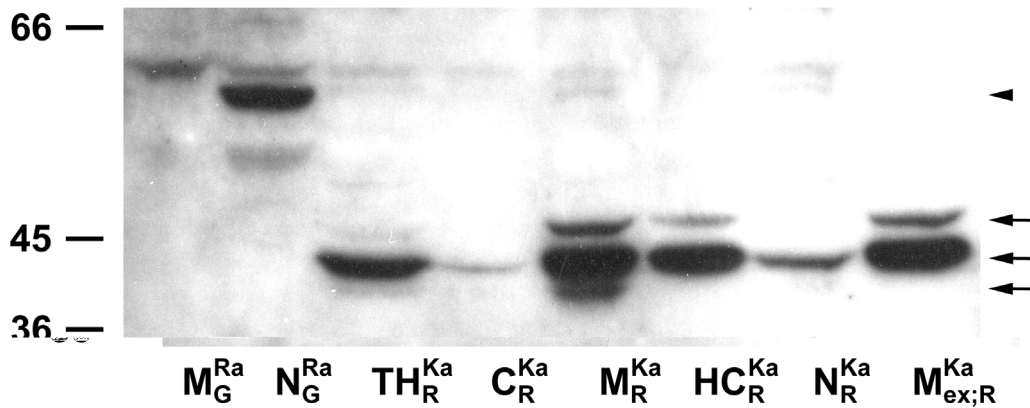


Abb. 3-1: Anti-RAR α -IR in verschiedenen Fraktionen des Rattenhirns und der Karpfenretina. Die Expression RAR α -ähnlicher Proteine in verschiedenen retinalen Fraktionen (R) des Karpfens (Ka) sowie Gehirnfractionen (G) der Ratte (Ra) wurden mittels Immunoblotting untersucht. In der Kernfraktion (N) des Rattenhirns zeigt eine 58 kDa-Komponente die stärkste anti-RAR α -IR (Pfeilspitze). Im Totalhomogenat (TH) der Karpfenretina erkennt der RAR α -Antikörper drei zusätzliche Proteine im M_r -Bereich von 40, 43 und 46 kDa (Pfeile). Das 43 kDa- und das 46 kDa-Protein sind sowohl in der Membranfraktion als auch in einer Horizontalzellfraktion (HC) sowie in einer mit TX-100 extrahierten (ex) Membranfraktion angereichert, während alle drei Proteine im Cytosol (C) und in der Kernfraktion nur in geringem Umfang enthalten sind. Die drei Balken links repräsentieren die Positionen von M_r -Markerproteinen (36, 45 und 66 kDa).

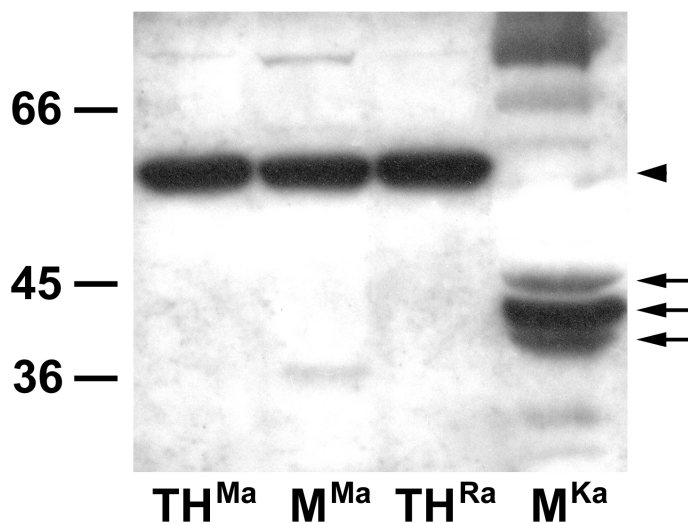


Abb. 3-2: Anti-RAR α -IR in retinalen Fraktionen verschiedener Spezies. Die Expression RAR α -ir Proteine wurde in den Retinen von Maus (Ma), Ratte (Ra) und Karpfen (Ka) mittels Immunoblotting analysiert. Sowohl in den Totalhomogenaten (TH) der Ratten- und der Mausretina als auch in der Membranfraktion (M) der Mausretina bildet das 58 kDa-Protein (Pfeilspitze) die hauptsächlich immunoreaktive Komponente, während in der

Membranfraktion der Karpfenretina die drei Proteine im M_r -Bereich von 40 - 46 kDa die Hauptkomponenten bilden (Pfeile). Die drei Balken repräsentieren die Positionen der jeweiligen Markerproteine.

3.1.2 Lokalisation der RAR α -immunreaktiven Proteine in der Karpfenretina

Die Lokalisation von Retinoidrezeptor-ähnlichen Proteinen in Querschnitten der Karpfenretina mittels Immunhistochemie wurde mit Antikörpern durchgeführt, die jeweils spezifisch gegen eine der RAR- bzw. RXR-Isoformen α , β und γ gerichtet waren. Während mit dem RAR β - und dem RAR γ -Antikörper keine immunreaktiven Komponenten detektiert werden konnten, wurden mit dem RXR α -Antikörper vereinzelt Zellen in der INL markiert, bei denen es sich möglicherweise um Amakrinzellen handelte. Eine schwache Markierung einzelner Zellen in der proximalen INL und der GCL wurde auch mit dem RXR γ -Antikörper beobachtet, während durch den RXR β -Antikörper vereinzelt Photorezeptor-Außensegmente markiert wurden (nicht gezeigt). Auch mit dem RAR α -Antikörper wurden vereinzelt Photorezeptor-Außensegmente markiert (vgl. Abb. 3-3 C). Desweiteren markierte der RAR α -Antikörper vor allem Horizontalzellen im Bereich der distalen INL und punktuelle Strukturen in der OPL (Abb. 3-3 B und C).

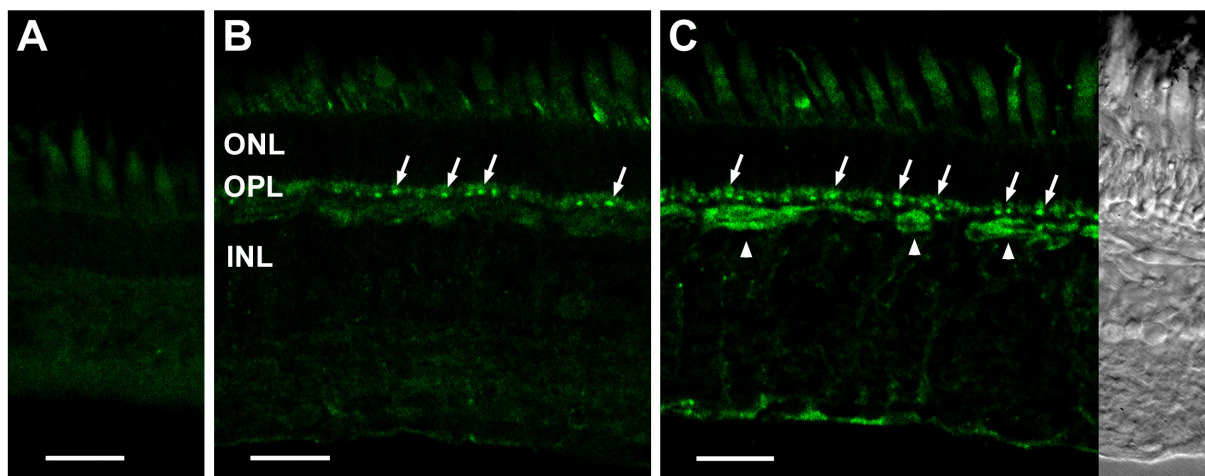


Abb. 3-3: Anti-RAR α -IR im Querschnitt der Karpfenretina. Retinaquerschnitte wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen des RAR α -Antikörpers inkubiert. (A) In der Kontrolle wurde der primäre Antikörper mit dem zur Immunisierung eingesetzten Peptid präinkubiert. (B) Schon in einer Verdünnung von 1:200 kann ein deutliches punktiertes IR-Muster in der OPL beobachtet werden (Pfeile). (C) Bei einer Verdünnung von 1:100 werden auch deutlich Horizontalzellen in der distalen INL markiert (Pfeilspitzen). Balken \cong 25 μ m.

Das anti-RAR α -Immunreaktivitätsmuster in der OPL und der distalen INL war abhängig vom Vorhandensein von TX-100 im Inkubationsansatz (Abb. 3-4). In Gegenwart von 0,3 % TX-100 trat das punktuelle Immunreaktivitätsmuster in der OPL deutlicher hervor, während die Horizontalzellen kaum noch bzw. gar nicht mehr markiert wurden (Abb. 3-4 B2). In Ab-

wesenheit von TX-100 war die Markierung der Horizontalzellen intensiver, während nur noch vereinzelt kleine Punkte in der OPL markiert wurden (Abb. 3-4 A2).

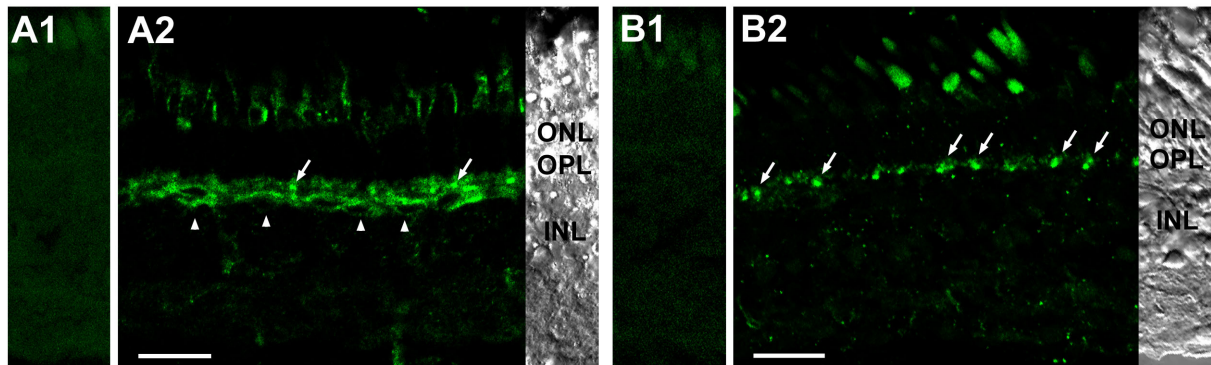


Abb. 3-4: TX-100-Abhängigkeit des anti-RAR α -Immunoreaktivitätsmusters im Querschnitt der Karpfenretina. Retinaquerschnitte wurden in Abwesenheit (A1, A2) bzw. in Gegenwart (B1, B2) von TX-100 mit dem RAR α -Antikörper inkubiert (A2, B2). In den Kontrollen (A1, B1) wurde der primäre Antikörper weggelassen. In Gegenwart von TX-100 ist die Markierung in der OPL (B2, Pfeile) intensiver, während die Horizontalzellen nur noch schwach bis gar nicht markiert sind. In Abwesenheit von TX-100 sind vor allem die Horizontalzellen markiert (A2, Pfeilspitzen). Balken \cong 25 μ m.

Die Synapsen, die die Dendriten der Horizontalzellen mit den Photorezeptoren ausbilden, sind innerhalb der Photorezeptorterminalien, den sog. *Pedicles* und *Spherules*, lokalisiert. Um eine genauere Lokalisation des immunoreaktiven Signals in der OPL vornehmen zu können, wurden Doppelmarkierungen mit Anti-RAR α und Anti-FRet 43 durchgeführt. Anti-FRet 43 markiert rot- und grünsensitive Einzel- und Doppelzapfen (Larison & Bremiller, 1990). Sowohl im Querschnitt als auch im Tangentialschnitt umhüllten die anti-FRet 43-Markierungen die anti-RAR α -Markierungen, die innerhalb der Zapfenterminalien, den *Pedicles*, lagen (Abb. 3-5 und 3-6). Dies deutet darauf hin, daß das anti-RAR α -immunoreaktive Signal in der OPL in den Dendriten von Horizontalzellen lokalisiert ist, die in die *Pedicles* invaginieren.

Um das anti-RAR α -Signal einzelnen Zelltypen zuordnen zu können, wurden retinale Zellen durch chemische und mechanische Dissoziation gewonnen und anschließend mit dem RAR α -Antikörper inkubiert. Dissoziierte Horizontalzellen zeigten vor allem an den dendritischen Endigungen und um den Kern herum ein starkes immunoreaktives Signal, aber auch der Rest der Horizontalzelloberfläche war mit kleinen immunoreaktiven Punkten übersät (Abb. 3-7). Dieser Befund bestätigte den immunbiochemischen Befund, der ein starkes anti-RAR α -immunoreaktives Signal in angereicherten HC-Fractionen zeigte (vgl. Abb. 3-1).

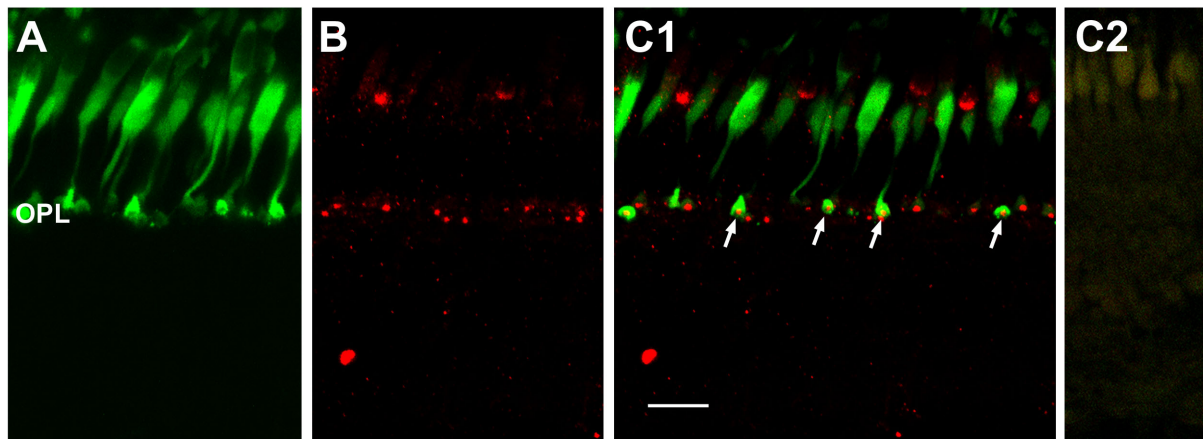


Abb. 3-5: Anti-FRet 43- und anti-RAR α -Doppelmarkierung im Querschnitt der Karpfenretina. Ein Retinaquerschnitt wurde mit Antikörpern gegen FRet 43 und RAR α inkubiert. (C2) Die Überlagerung der anti-FRet 43-IR (A) und der anti-RAR α -IR (B) deutet eine Lokalisation der anti-RAR α -IR in der OPL innerhalb der *Pedicles* an (Pfeile). (C1) In der Kontrolle wurden die primären Antikörper weggelassen. Balken $\cong 15 \mu\text{m}$.

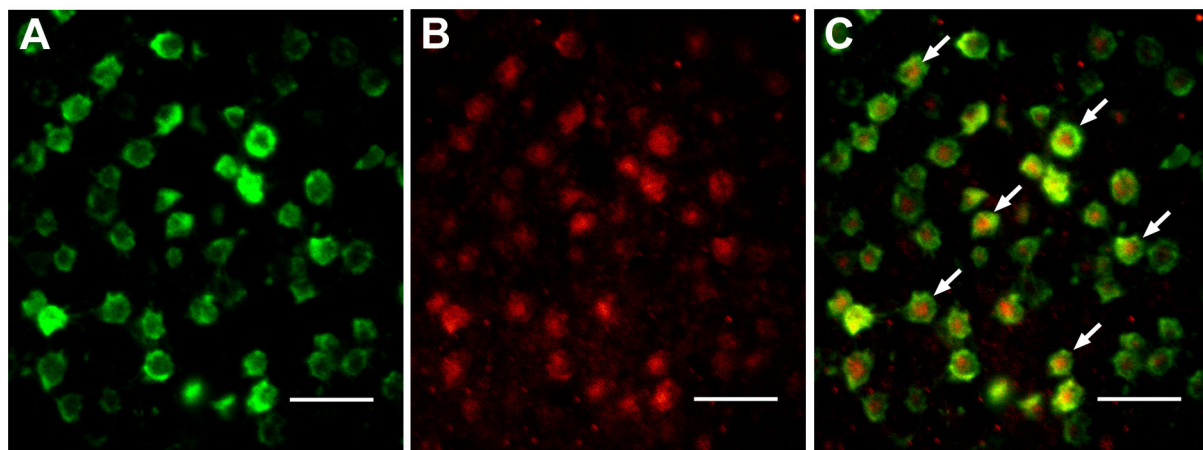


Abb. 3-6: Anti-FRet 43- und anti-RAR α -Doppelmarkierung im Tangentialschnitt der Karpfenretina. Ein Tangentialschnitt im Bereich der OPL wurde wie in Abb. 3-5 mit Anti-FRet 43 und Anti-RAR α inkubiert. (C) Die Überlagerung der anti-FRet 43-IR (A) und der anti-RAR α -IR (B) zeigt auch hier, daß die anti-RAR α -IR in der OPL innerhalb der *Pedicles* (Pfeile) lokalisiert ist. (D) Auch hier wurden in der Kontrolle die primären Antikörper weggelassen. Balken $\cong 10 \mu\text{m}$.

Einzelne grün- bzw. rotsensitive Zapfen und Doppelzapfen zeigten vor allem im Bereich der Außensegmente, seltener im Bereich der Innensegmente, und im äußersten Bereich der Terminalien ein anti-RAR α -immunoreaktives Signal (Abb. 3-7). Die anti-RAR α -IR im Bereich der *Pedicles* stammt möglicherweise von Horizontalzellendriten, die während des Dissoziationsprozesses von ihren Zellen abreißen. Dissoziierte Bipolarzellen zeigten kein anti-RAR α -

immunoreaktives Signal (nicht gezeigt). Auch eine Doppelmarkierung mit Anti-RAR α und Anti-Caldendrin deutete auf die Lokalisation des anti-RAR α -immunoreaktiven Signals in den *Pedicles* hin (Abb. 3-8). Caldendrin ist ein Ca²⁺-bindendes Protein, welches in der Karpfenretina u.a. in den terminalen Dendriten der Horizontalzellen lokalisiert ist (Schultz *et al.*, 2004). Die Doppelmarkierung zeigte, daß das anti-RAR α -immunoreaktive Signal in der OPL auch von dem anti-Caldendrin-immunoreaktiven Signal umhüllt wurde (vgl. Abb. 3-8 B).

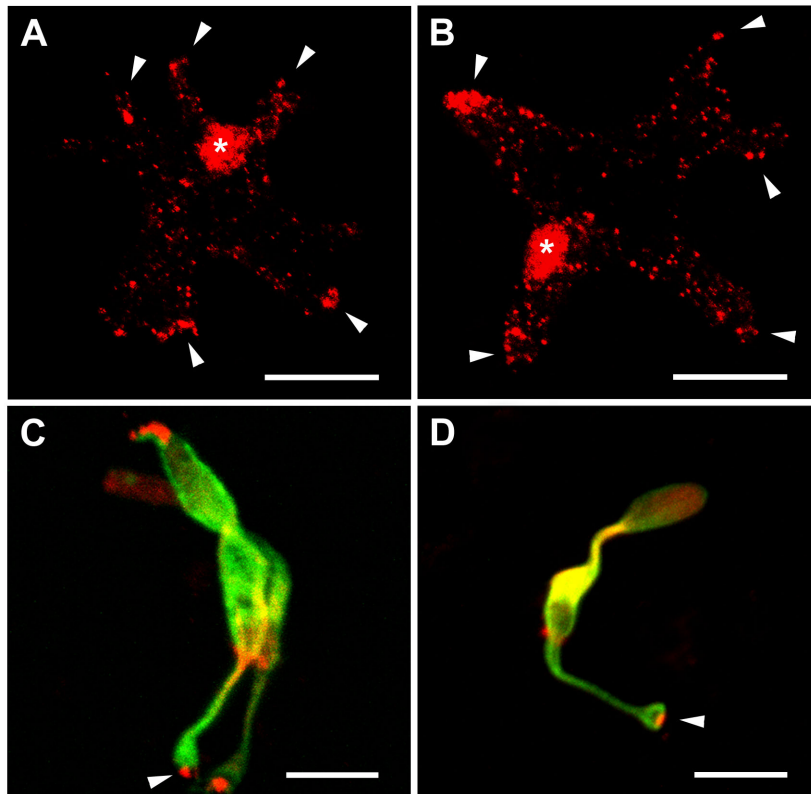


Abb. 3-7: Anti-RAR α -IR in dissoziierten Zellen der Karpfenretina. Dissoziierte Zellen der Karpfenretina wurden nur mit anti-RAR α - bzw. mit anti-FRet 43- und anti-RAR α -Antikörpern inkubiert. Dissoziierte Horizontalzellen (A, B) sind besonders intensiv an den Spitzen der Dendriten (Pfeilköpfe) und um den Kern herum (Stern) markiert. Dissoziierte Zapfen bzw. Doppelzapfen (C, D) werden am deutlichsten an den Außensegmenten und im äußersten Bereich der *Pedicles* (Pfeilspitze) markiert. Balken \cong 15 μ m.

Eine genaue Zuordnung der anti-RAR α -IR zu bestimmten Horizontalzelltypen ist mittels dissoziierter Zellen nicht exakt möglich. Um diesbezüglich weitere Hinweise zu erhalten, wurde eine Doppelmarkierung von Retinaquerschnitten mit RAR α - und GRIP-Antikörpern durchgeführt. GRIP ist ein Protein, das in der Karpfenretina nur in Stäbchen-Horizontalzellen (H4) exprimiert wird (Garms, 2003). Die Doppelmarkierung mit beiden Antikörpern ergab keine Kolo-kalisation von RAR α -ähnlichen Proteinen und GRIP (Abb. 3-9). Die beiden immunoreaktiven Signale in der OPL zeigten im Gegenteil eine deutliche räumliche Trennung, was darauf schließen läßt, daß das bzw. die RAR α -ähnliche(n) Protein(e) nicht in H4-Zellen exprimiert wird bzw. werden.

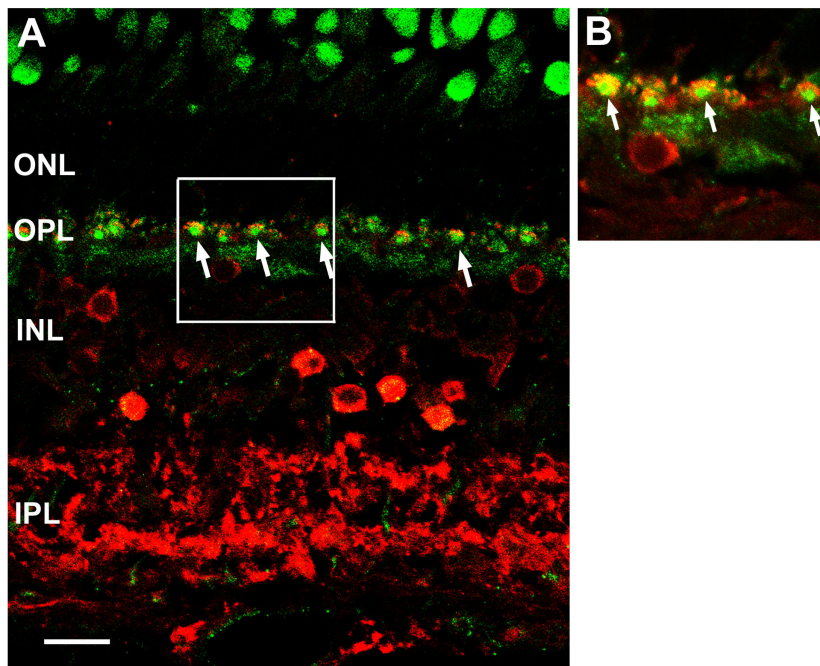


Abb. 3-8: Anti-RAR α - und anti-Caldendrin-Doppelmarkierung im Querschnitt der Karpfenretina. (A) Eine Überlagerung der immunoreaktiven Signale ergibt, daß das RAR α -Signal (grün) in der OPL von der Caldendrin-Markierung (rot) umhüllt wird (Pfeile). (B) Vergrößerter Ausschnitt von (A). Balken $\cong 15 \mu\text{m}$.

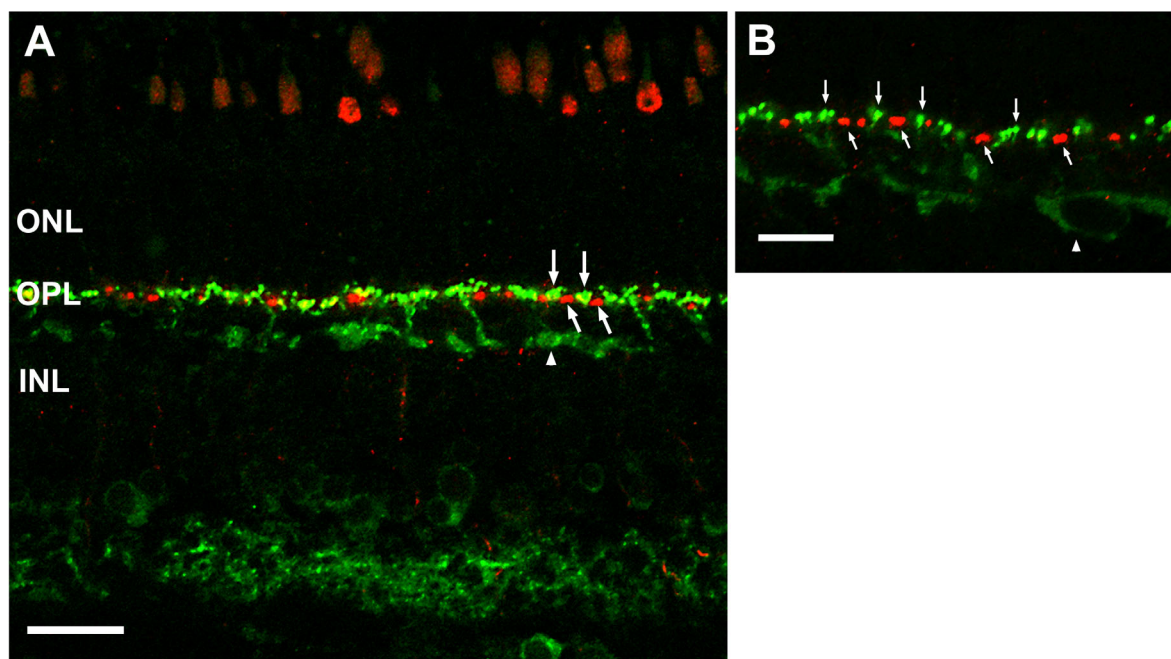


Abb. 3-9: Anti-RAR α - und anti-GRIP-Doppelmarkierung im Querschnitt der Karpfenretina. (A), (B) Querschnitte der Retina wurde mit Antikörpern gegen RAR α und GRIP inkubiert. Die Überlagerung des anti-GRIP-ir Signals (grün, senkrechte Pfeile) mit dem anti-RAR α -ir Signal (rot, schräge Pfeile) zeigt, daß die beiden Signale in der OPL nicht kolokalisiert sind. Mit dem GRIP-Antikörper werden auch einzelne H4-Zellen (Pfeilspitzen) markiert. Balken $\cong 25 \mu\text{m}$ (A) bzw. $15 \mu\text{m}$ (B).

Auf ultrastruktureller Ebene lieferte eine elektronenmikroskopische Analyse weitere Hinweise für die These, daß die bzw. eine anti-RAR α -immunoreaktive Komponente in den Dendri-

ten von Zapfen-Horizontalzellen lokalisiert ist (Abb. 3-10 und 3-11). In Quer- und Tangentialschnitten von Photorezeptorterminalien wurden mit dem RAR α -Antikörper vor allem zentrale Strukturen in den distalen Bereichen der *Pedicles* markiert, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um in die *Pedicles* invaginierende Horizontalzelldendriten handelt. Etwas seltener wurden auch laterale Dendriten der Horizontalzellen in direkter Nachbarschaft zu den *Ribbon*-Synapsen markiert (Abb. 3-10). In einem Querschnitt durch die OPL war deutlich zu erkennen, daß lediglich Strukturen in den *Pedicles* durch den Antikörper markiert wurden, während in den *Spherules* keinerlei Markierungen beobachtet wurden. Auch auf elektronenmikroskopischer Ebene markierte der RAR α -Antikörper sowohl einzelne Zapfenterminalien als auch die Endigungen von Doppelzapfen (Abb. 3-11). Die anti-RAR α -Immunoreaktivität in der OPL ist also sehr wahrscheinlich auf die Dendriten der Zapfen-Horizontalzellen beschränkt.

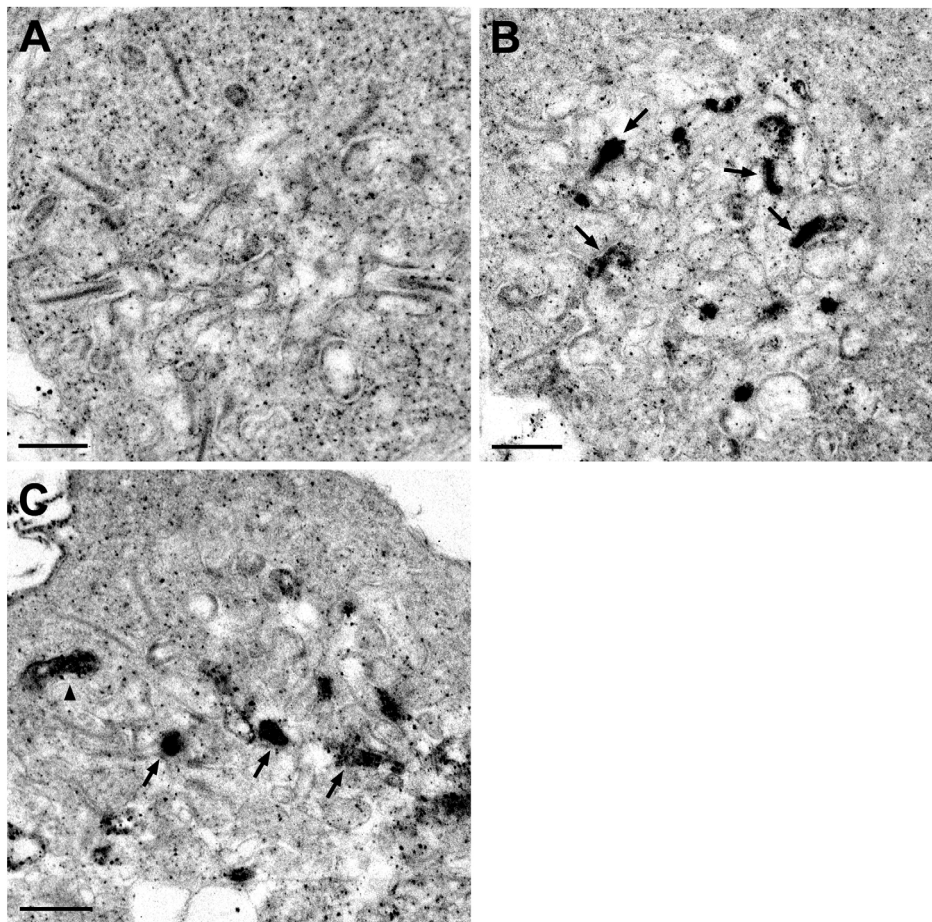


Abb. 3-10: Ultrastrukturelle Lokalisation der anti-RAR α -IR in den *Pedicles*. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eines Querschnittes (C) bzw. eines Tangentialschnittes (B) zeigen, daß vor allem invaginierende HC-Dendriten im distalen Bereich der *Pedicles* markiert werden (Pfeile). Seltener werden auch laterale HC-Dendriten nahe den *Ribbons* markiert (C, Pfeilspitze). (A) Kontrolle, Tangentialschnitt, in dem der RAR α -Antikörper weggelassen wurde. Balken \cong 0,5 μ m.

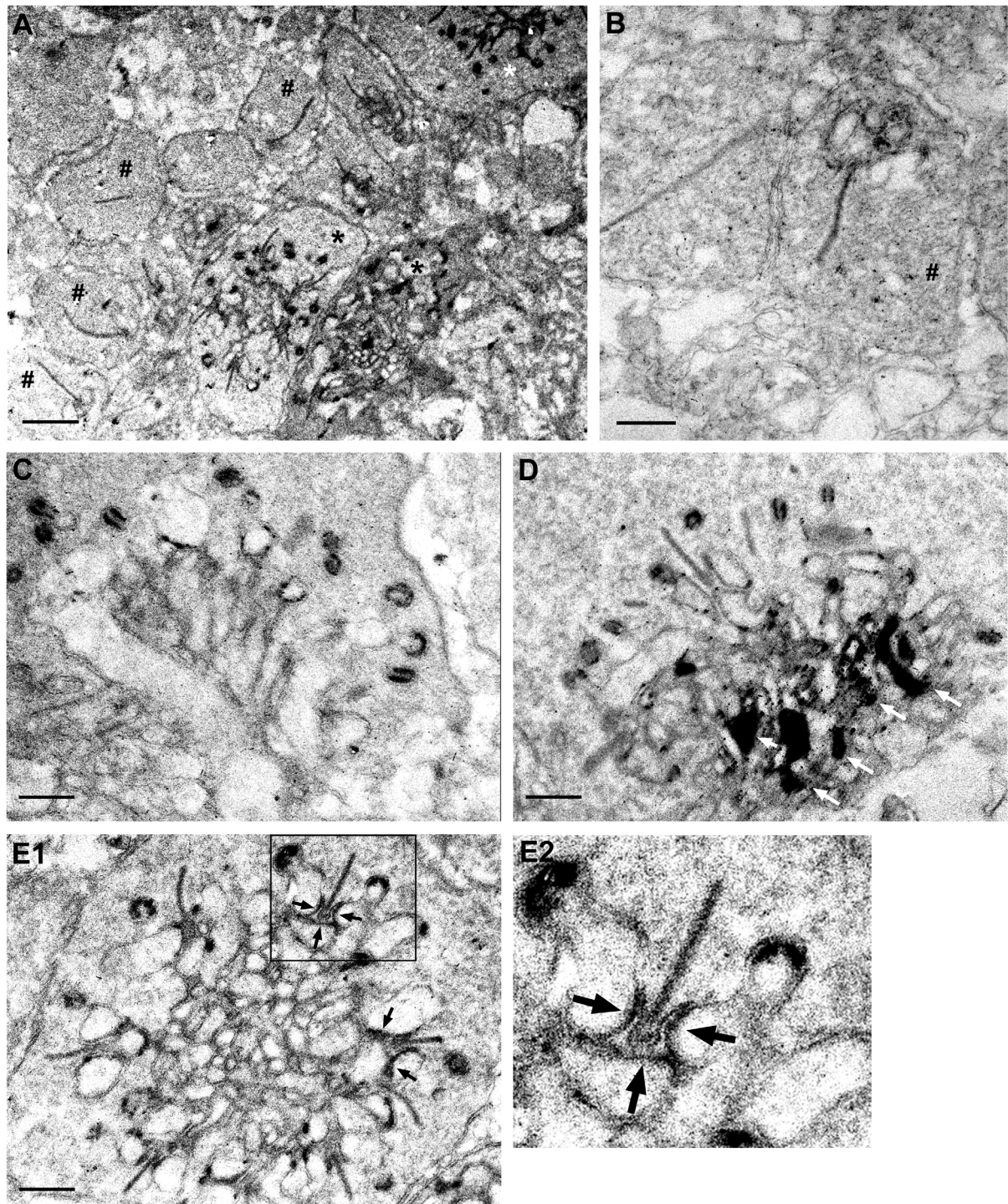


Abb. 3-11: Ultrastrukturelle Lokalisation der anti-RAR α -IR in der OPL. (A) Die anti-RAR α -IR in der OPL ist auf Strukturen in den *Pedicles* (*) beschränkt. (B) In den *Spherules* (#) sind keine Markierungen nachzuweisen. (D) Im Vergleich zur Kontrolle (C) sind die in die *Pedicles* invaginierenden HC-Dendriten deutlich markiert (Pfeile). (E1) Markierungen im Bereich der *Ribbons* sind auf die HC-Dendriten beschränkt (in E2 vergrößert dargestellt). Balken: A \cong 1 μ m; B - E2 \cong 0,5 μ m.

3.1.3 Lichtabhängige Modulation der anti-RAR α -Immunoreaktivität

Um festzustellen, ob die RAR α -ir Proteine in der Karpfenretina lichtabhängigen Veränderungen unterworfen sind, wurden sowohl Querschnitte hell- bzw. dunkeladaptierter Karpfenretinen immunhistologisch als auch subzelluläre Fraktionen unterschiedlich adaptierter Retinen immunbiochemisch untersucht. Weder das 43 kDa- noch das 46 kDa-Protein zeigten in der Membranfraktion nach den unterschiedlichen Adaptationsbedingungen Unterschiede in der Immunoreaktivität (Abb. 3-12 A). Dagegen konnte die 40 kDa-Komponente in der Membranfraktion der helladaptierten Retina im Vergleich zur dunkeladaptierten kaum noch detektiert werden. In der cytosolischen Fraktion zeigte das 40 kDa-Protein keine Unterschiede. Da die Inkubation einer Membranfraktion mit Alkaliner Phosphatase zu einer Verstärkung des 40 kDa-Signals führte (Abb. 3-12 B), könnte der Verlust dieses Signals in der helladaptierten Retina mit einer Phosphorylierung im Bereich des vom Antikörper erkannten Epitops dieses Proteins erklärt werden.

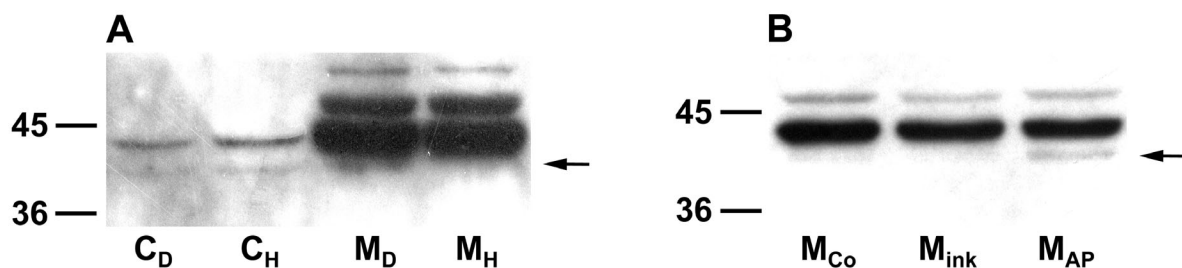


Abb. 3-12: Einfluß unterschiedlicher Lichtadaptationsbedingungen und von Alkaliner Phosphatase auf die anti-RAR α -IR in retinalen Fraktionen. (A) Der Einfluß einer Hell- (H) bzw. Dunkeladaptation (D) auf die anti-RAR α -IR von cytosolischen (C) und Membranproteinen (M) wurde mittels eines Immunoblots untersucht. (B) Der Einfluß von Alkaliner Phosphatase (AP) auf die anti-RAR α -IR von Membranproteinen wurde ebenfalls mittels Immunoblotting analysiert. Eine Kontrolle (Co) blieb unbehandelt während eine weitere (ink) ohne AP inkubiert wurde. Eine Helladaptation führt zum Verlust des 40 kDa-Signals (Pfeil), welches wiederum durch Inkubation mit AP intensiviert wird. Die beiden Balken repräsentieren die jeweiligen Markerproteine.

Wie im Immunoblot zeigten sich auch im Querschnitt der Karpfenretina kaum Änderungen der anti-RAR α -IR zwischen hell- und dunkeladaptierten Retinen. Während im Immunoblot eine Helladaptation mit dem Verlust eines immunoreaktiven Signals, der 40 kDa-Bande, einherging, schien in der helladaptierten mit TX-100 inkubierten Retina im Vergleich zur dunkeladaptierten die anti-RAR α -IR in der OPL leicht verstärkt zu sein (vgl. Abb. 3-13 A und C). Dieser Effekt war allerdings nur sehr schwach und nur in einigen Schnitten zu beobachten. Daneben fiel lediglich noch das Fehlen der anti-RAR α -IR in den Photorezeptoren in der

dunkeladaptierten ohne TX-100 inkubierten Retina auf (Abb. 3-13 B). Der Adaptationszustand der Retina scheint demnach keinen oder nur einen untergeordneten Einfluß auf die RAR α -immunoreaktiven Proteine in der Karpfenretina auszuüben.

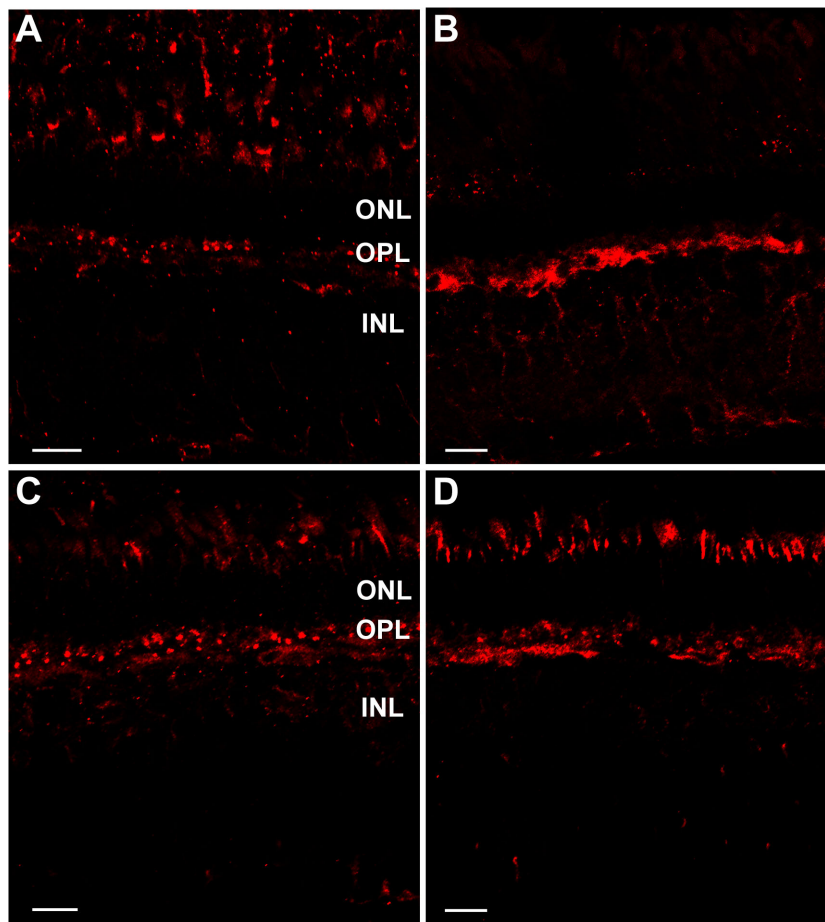


Abb. 3-13: Auswirkungen des Lichtadaptationszustands auf die anti-RAR α -IR im Querschnitt der Karpfenretina. Querschnitte von dunkel- (A, B) bzw. helladaptierten (C, D) Retinen wurden in Gegenwart (A, C) bzw. Abwesenheit (B, D) von TX-100 mit dem Antikörper inkubiert. Der Adaptationszustand hat keinen Einfluß auf die anti-RAR α -IR. Balken \cong 25 μ m.

3.2 [3 H]RA-Bindungstest

Bei dem zunächst durchgeführten *Charcoal*-Test wurden die verschiedenen retinalen Fraktionen nach der Inkubation mit [3 H]RA nur einmal mit der Dextran/*Charcoal*-Suspension inkubiert. Die beobachtete RA-Bindung zeigte dabei im [3 H]RA-Konzentrationsbereich von 2 - 50 nM keine bzw. kaum Anzeichen von Sättigung. Anders verhielt es sich, wenn die Inkubation mit der aktivierten Holzkohle wiederholt wurde. In dem Fall konnte sowohl für cytosolische als auch für Membranproteine eine Sättigung der [3 H]RA-Bindung beobachtet werden. Der Anteil an unspezifischer Bindung betrug dabei für cytosolische Proteine weniger als 10 %, während er für Membranproteine zwar stärker schwankte aber nicht mehr als 50 % betrug. Die doppelte Inkubation mit der *Charcoal*-Suspension und die jeweils folgenden Zentrifugationen machten es notwendig, den Proteinverlust während des Tests zu bestimmen. Die Be-

stimmung des Proteinverlustes mittels der Proteinnachweismethode nach Bradford (1976) ergab, daß bei einer Proteinausgangskonzentration von $0,45 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ der Proteinverlust sowohl in der cytosolischen als auch in der Membranfraktion unabhängig von der verwendeten RA-Konzentration (2 nM bis $1 \mu\text{M}$) war. Bei einer RA-Konzentration von 40 nM nahm der Proteinverlust in beiden Fraktionen linear mit der eingesetzten Proteinmenge zu. Es zeigte sich dabei, daß erst ab einer Proteinausgangskonzentration von $0,2 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ genug Protein für eine anschließende Szintillationsmessung im Ansatz verblieb. Der Proteinverlust im Konzentrationsbereich von 20 - $100 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ entsprach dabei in etwa der Formel $y = 0,685x + 5,6827$, wobei y den Proteinverlust bei der Ausgangskonzentration x darstellt.

Ein wichtiges Kriterium bei der Charakterisierung der Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor besteht in dem Zusammenhang zwischen eingesetzter Rezeptorkonzentration und der resultierenden Ligandenbindung. Hier sollte im Normalfall eine lineare Zunahme der Ligandenbindung bei steigender Rezeptorkonzentration beobachtet werden. Sowohl in der cytosolischen als auch in der Membranfraktion ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen der $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Bindung und der eingesetzten Proteinmenge im Konzentrationsbereich von $0,2 - 1,0 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ (Abb. 3-14). Die $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Konzentration betrug dabei 40 nM und die Inkubationszeit 60 Minuten.

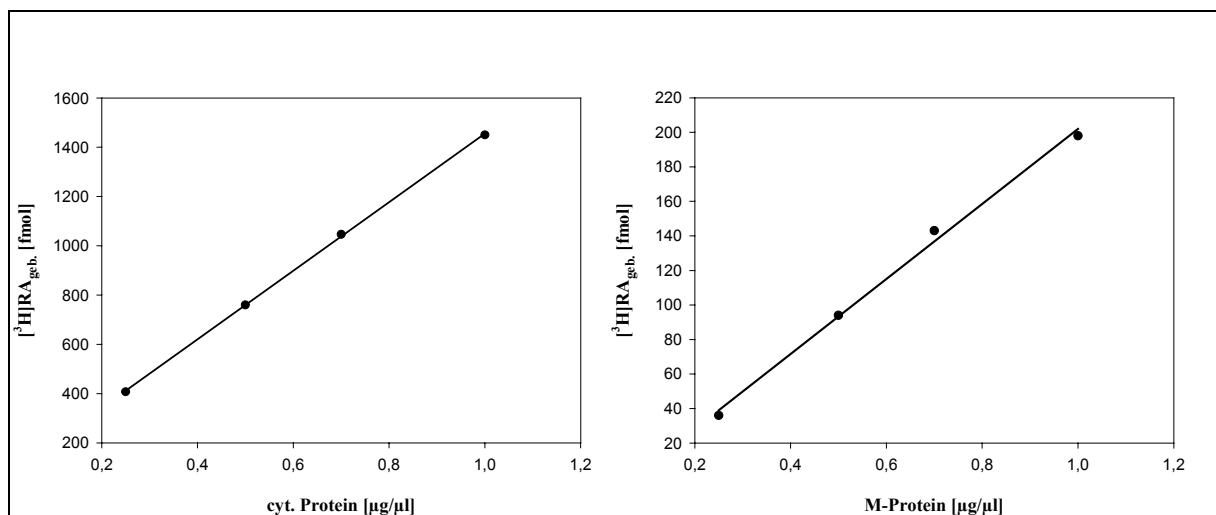


Abb. 3-14: Abhängigkeit der $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Bindung von der Rezeptorkonzentration. Sowohl in der cytosolischen (links) als auch in der Membranfraktion (rechts) ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Bindung und der Proteinkonzentration.

Ein weiteres wichtiges Kriterium besteht in dem Zusammenhang zwischen der Ligandenbindung und der Inkubationszeit. Um die Zeitabhängigkeit der $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Bindung an cytosolische

und Membranbindungsstellen zu analysieren, wurden jeweils 0,4 µg/µl der entsprechenden Fraktionen mit 40 nM [3 H]RA bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (2 - 300 Minuten) inkubiert. Dabei zeigte sich, daß die [3 H]RA-Bindung in dem untersuchten Inkubationszeitraum unabhängig von der Inkubationszeit war (Abb. 3-15). In den anschließenden Versuchen wurden daher Proteinkonzentrationen von 0,40 bzw. 0,45 µg/µl und Inkubationszeiten von 60 bzw. 90 Minuten gewählt.

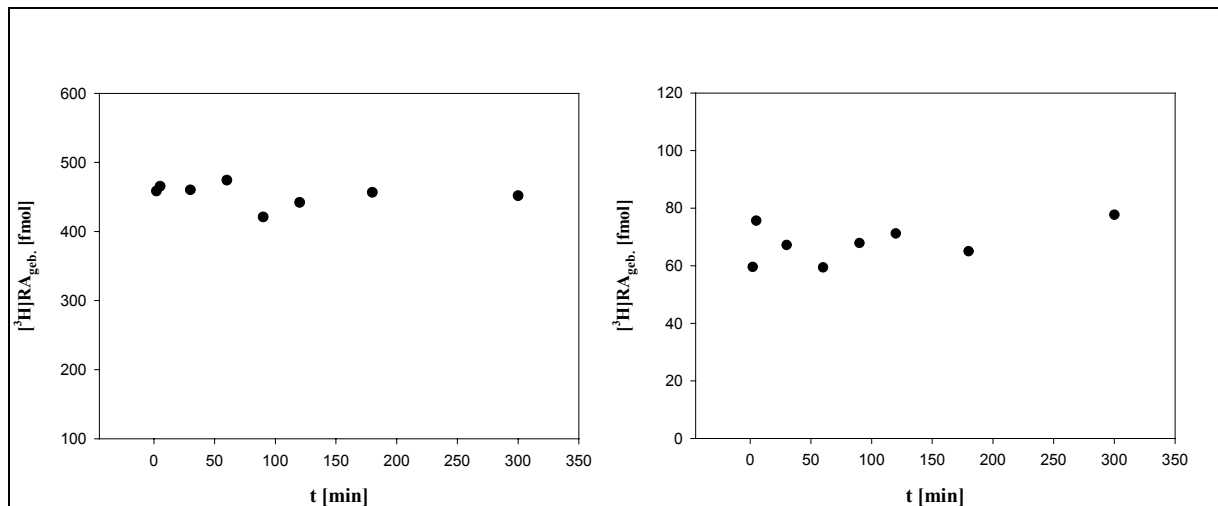


Abb. 3-15: Zeitabhängigkeit der [3 H]RA-Bindung an cytosolische und Membranproteine. Sowohl in der cytosolischen (links) als auch in der Membranfraktion (rechts) ist die [3 H]RA-Bindung unabhängig von der Inkubationszeit für Inkubationszeiträume von 2 bis 300 Minuten.

3.2.1 Dissoziationskonstanten (K_D) der [3 H]RA-Bindung

Zur Bestimmung der K_D -Werte der [3 H]RA-Bindung an cytosolische bzw. Membranbindungsstellen wurden die entsprechenden Fraktionen mit steigenden [3 H]RA-Konzentrationen inkubiert. Abbildung 3-16 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experiments zur Bestimmung des K_D -Wertes der [3 H]RA-Bindung an cytosolische Bindungsstellen. Die Auswertung aller Versuche ($n = 3$) mittels *Scatchard Plots* ergab einen K_D -Wert von ca. 12,7 nM ($\pm 0,9$ nM) und eine Anzahl an Bindungsstellen B_{\max} von 21,5 pmol / mg ($\pm 4,5$ pmol / mg). Die jeweils durchgeführten *Hill Plots* ergaben einen Hill-Koeffizienten von 0,99 ($\pm 0,03$), was auf nichtinteragierende Bindungsstellen hindeutet. Für die [3 H]RA-Bindung an Membranbindungsstellen (Abb. 3-17) ergab die Auswertung aller Versuche ($n = 4$) eine Dissoziationskonstante K_D von 35,8 nM ($\pm 7,4$ nM) und eine Anzahl an Bindungsstellen B_{\max} von 6,5 pmol / mg ($\pm 0,8$ pmol / mg) sowie einen Hill-Koeffizienten von 0,96 ($\pm 0,03$). Demnach

enthält die Membranfraktion der Karpfenretina ebenfalls eine homogene Rezeptorpopulation mit nichtinteragierenden Bindungsstellen und einer relativ hohen Affinität zu ihrem Liganden.

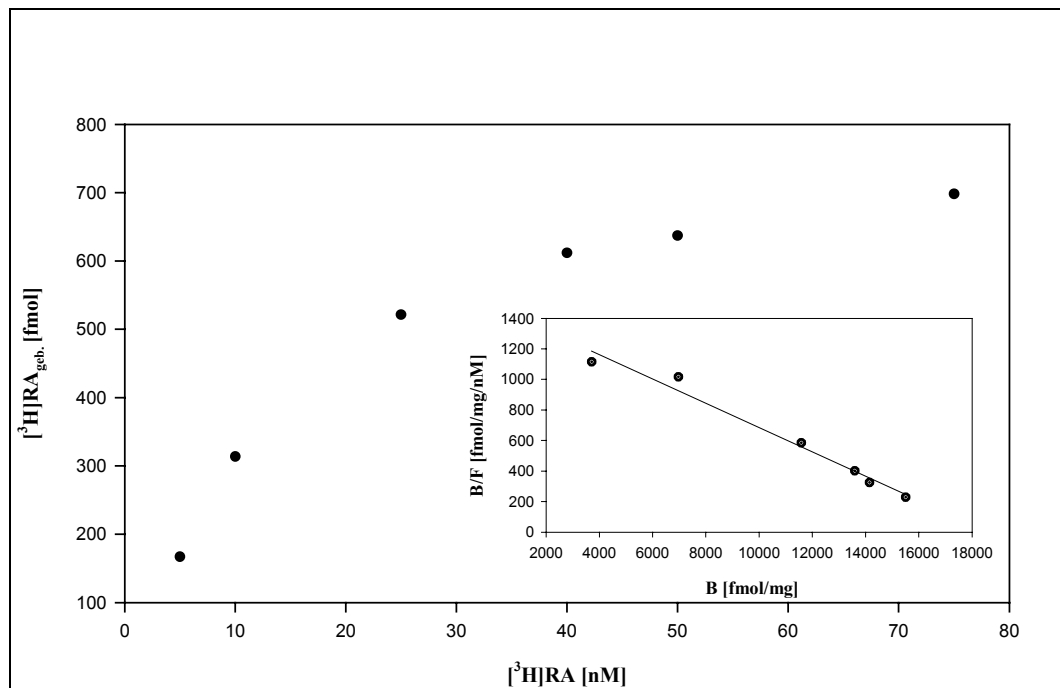


Abb. 3-16: Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Bindung an cytosolische Bindungsstellen. Cytosolische Proteine wurden mit steigenden $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Konzentrationen inkubiert. Dargestellt sind die Meßwerte eines repräsentativen Experiments. Der Einschub zeigt den *Scatchard Plot* dieser Meßwerte, B = Menge der spezifisch gebundenen $[^3\text{H}]\text{RA}$, F = Konzentration der ungebundenen $[^3\text{H}]\text{RA}$.

3.2.2 Pharmakologie der $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Bindung

Die Pharmakologie der $[^3\text{H}]\text{RA}$ -Bindung an cytosolische und Membranbindungsstellen wurde durch Verwendung verschiedener potentieller Inhibitoren untersucht. Dabei wurden cytosolische und Membranproteine vor der Inkubation mit 40 nM $[^3\text{H}]\text{RA}$ mit jeweils steigenden Konzentrationen der verschiedenen Substanzen präinkubiert. Die Menge an gebundener $[^3\text{H}]\text{RA}$ wurde daraufhin gemessen und in Relation zum Kontrollwert ohne Inhibitor gesetzt. Die Stereospezifität der Bindungsstellen wurde durch Verwendung der Stereoisomere RA (*all trans*-RA), 13-*cis*-RA und 9-*cis*-RA analysiert. Daneben wurde das inhibitorische Potential der RA-Vorstufen ROL (*all trans*-ROL) und RAL (*all trans*-RAL) getestet. Mit der Verwendung von Dopamin als Inhibitor wurde nach Hinweisen für eine Interaktion des DA- und des RA-Signalweges gesucht. Auch die Liganden der PKC, Phosphatidylserin (PtdSer) und PDBu, wurden auf ihr inhibitorisches Potential hin analysiert. Schließlich wurden auch Inhibitorkombinationen getestet.

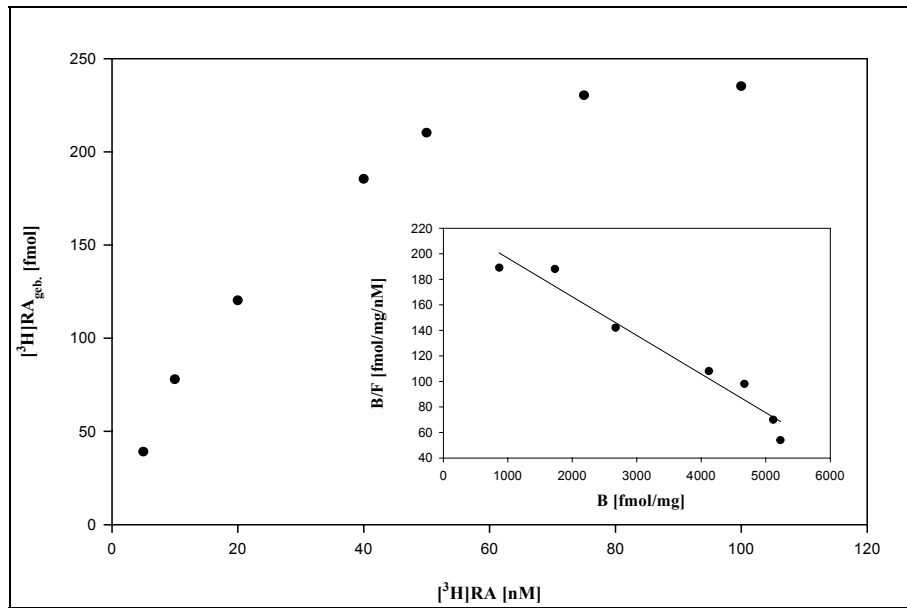


Abb. 3-17: Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die [^3H]RA-Bindung an Membranbindungsstellen. Membranproteine wurden mit steigenden [^3H]RA-Konzentrationen inkubiert. Dargestellt sind die Meßwerte eines repräsentativen Experiments. Der Einschub zeigt den *Scatchard Plot* dieser Meßwerte, B = Menge der spezifisch gebundenen [^3H]RA, F = Konzentration der ungebundenen [^3H]RA.

Unmarkierte RA erwies sich, wie zu erwarten war, als effektivster Inhibitor der Bindung von [^3H]RA an cytosolische Bindungsstellen. Mit unmarkierter RA konnte die [^3H]RA-Bindung beinahe vollständig (96 %) inhibiert werden. Die RA-Konzentration, mit der die Bindung um 50 % inhibiert werden konnte (IC_{50}) betrug dabei 46,8 nM, was damit in etwa der [^3H]RA-Konzentration im Ansatz (40 nM) entsprach. Mit 96 % Inhibition war 13-*cis*-RA ähnlich effektiv, wobei 13-*cis*-RA mit einem IC_{50} -Wert von 2,8 μM eine geringere Affinität zu den Bindungsstellen besaß. 9-*cis*-RA und RAL konnten die Bindung im untersuchten Konzentrationsbereich immerhin noch um 85 % bzw. 90 % inhibieren, zeigten aber mit IC_{50} -Werten von 5,5 bzw. 14,8 μM noch geringere Affinitäten zu den Bindungsstellen als 13-*cis*-RA. PDBu zeigte erst bei sehr hohen Konzentrationen inhibitorische Wirkung (Abb. 3-18 und Tab. 3-1). ROL wurde in einem Versuch getestet (nicht gezeigt). Dabei zeigte ROL erst bei einer Konzentration von 400 μM einen leichten inhibitorischen Effekt. Da aber auch RA in jenem Versuch nur eine Inhibition von etwa 80 % bewirkte, war die Qualität der [^3H]RA möglicherweise nicht mehr ausreichend. In einem weiteren Versuch wurde die inhibitorische Wirkung von PtdSer untersucht (nicht gezeigt). PtdSer inhibierte die [^3H]RA-Bindung in einem Konzentrationsbereich von 40 nM bis 400 μM jeweils um 55 - 60 %. Daneben verstärkte es den inhibitorischen Effekt von RA, was als Hinweis für verschiedene Bindungsstellen gedeutet werden kann, aber auch andere Ursachen haben kann, z.B. einen Verdünnungseffekt durch Bildung

von Micellen mit RA. Eine gemeinsame Inkubation von RA mit 9-*cis*-RA bzw. 13-*cis*-RA ergab keine kombinatorischen Inhibitionseffekte.

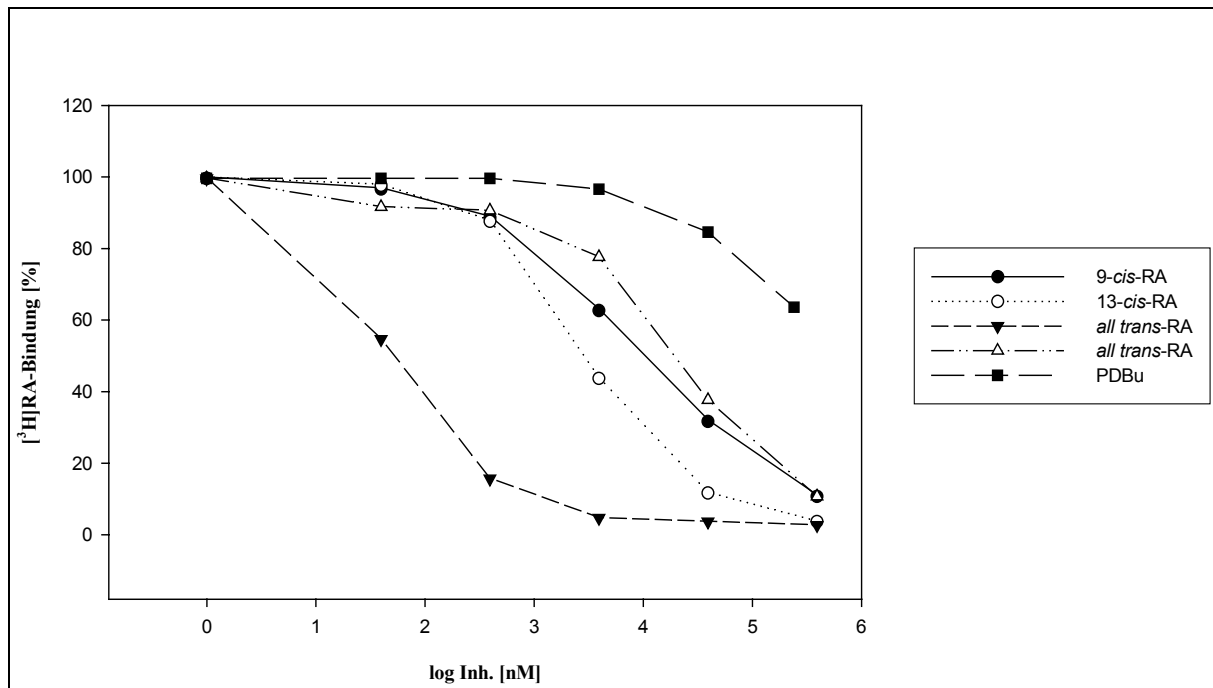


Abb. 3-18: Pharmakologie der [^3H]RA-Bindung an cytosolische Bindungsstellen. Cytosolische Proteine wurden vor der Inkubation mit [^3H]RA (40 nM) mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors präinkubiert. *All trans*-RA ist der effektivste Inhibitor, da sie die [^3H]RA-Bindung fast vollständig inhibieren kann.

Die wichtigsten Ergebnisse der Analyse der [^3H]RA-Bindung an Membranbindungsstellen sind in Abbildung 3-19 und Tab. 3-1 zusammengefaßt. RA zeigte dabei als Inhibitor eine besondere Eigenschaft: im Konzentrationsbereich von 40 nM bis 40 μM war RA der stärkste Inhibitor der [^3H]RA-Bindung mit einer maximalen Inhibition von ca. 58 % und einem IC_{50} -Wert von ca. 93 nM. Die Verwendung höherer RA-Konzentrationen hatte dann aber keine weitere Inhibition zur Folge, sondern führte im Gegensatz dazu, daß mehr [^3H]RA gebunden wurde als in der Kontrolle ohne Inhibitor. Dieses Phänomen war auf RA beschränkt. Weder die Verwendung von 13-*cis*-RA noch die von RAL als Inhibitor führten zu ähnlichen Effekten. Daraus resultierte, daß 13-*cis*-RA bei 400 μM ein effektiverer Inhibitor war als RA, da es die [^3H]RA-Bindung um ca. 62,5 % inhibieren konnte. RAL konnte im untersuchten Konzentrationsbereich die Bindung immerhin noch um 52 % inhibieren. Die IC_{50} -Werte von 13-*cis*-RA und RAL betrugen 2,8 bzw. 7,7 μM . 9-*cis*-RA erwies sich als sehr schwacher Inhibitor mit einer maximalen Inhibition von etwa 30 %, während DA überhaupt keinen inhibitorischen Effekt besaß.

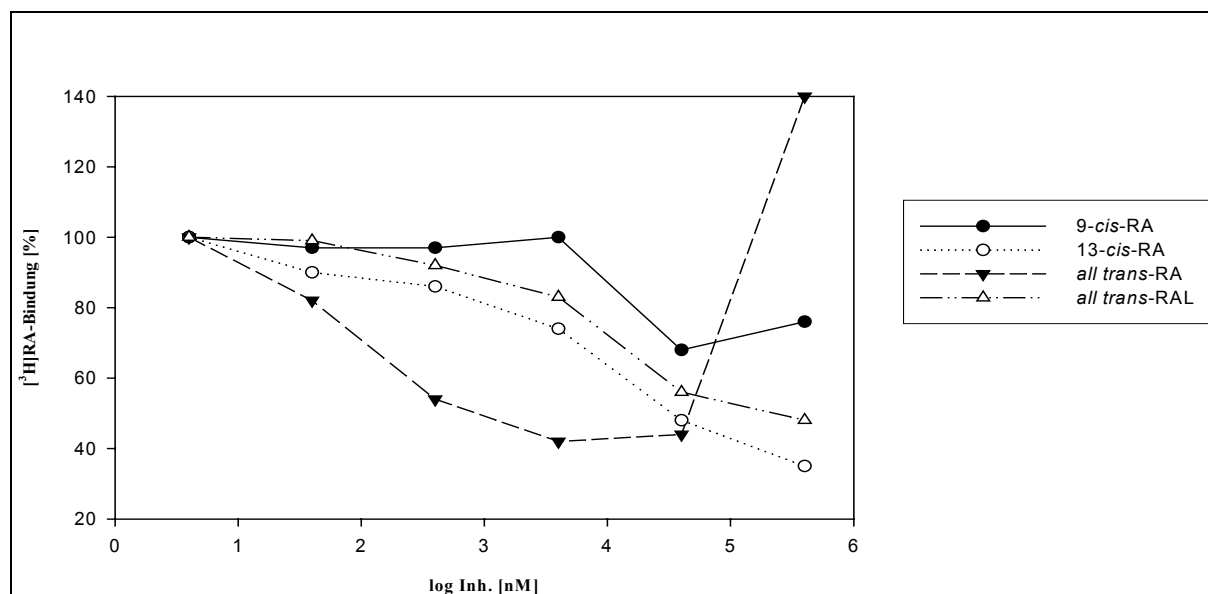


Abb. 3-19: Pharmakologie der [^3H]RA-Bindung an Membranbindungsstellen. Membranproteine wurden vor der Inkubation mit [^3H]RA (40 nM) mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors präinkubiert. Dabei erweist sich *all trans*-RA bei niedrigen Konzentrationen zwar als effektivster Inhibitor, bei einer Konzentration von 400 μM führt sie aber zu einer [^3H]RA-Bindung, die über den Kontrollwert hinausgeht.

Ebenso wie mit DA konnten auch mit PtdSer und PDBu keine inhibitorischen Effekte erzielt werden. In einigen Versuchen konnten durch unterschiedliche Substanzen nur geringe Inhibitionen beobachtet werden. Dies ging vermutlich auf die bei längerer Lagerung nachlassende Qualität der markierten RA zurück. Durch ROL ließ sich keine Inhibition erzielen, allerdings war auch hier die [^3H]RA-Lösung schon etwas älter.

Tab. 3-1: Zusammenfassung der inhibitorischen Effekte einiger untersuchter Verbindungen auf die [^3H]RA-Bindung in der cytosolischen und der Membranfraktion. Die Daten wurden mittels *SigmaPlot* (Systat) ermittelt.

| Inhibitor | Cytosol | | Membran | |
|-----------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | max. Inhibition [%] | IC ₅₀ | max. Inhibition [%] | IC ₅₀ |
| <i>all trans</i> -RA | 96 | 47 nM | 58 | 93 nM |
| 13- <i>cis</i> -RA | 96 | 2,8 μM | 63 | 2,8 μM |
| 9- <i>cis</i> -RA | 85 | 5,5 μM | 30 | 11,5 μM |
| <i>all trans</i> -RAL | 90 | 14,8 μM | 53 | 7,7 μM |
| PDBu | 49 | 88,3 μM | 0 | - |
| Dopamin | - | - | 0 | - |

3.3 [³H]RA-bindende Proteine in der Karpfenretina

Die Analyse RA-bindender Proteine wurde mittels einer Photoaffinitätsmarkierungsmethode durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Methode, die in ihrer ursprünglichen Form von Bernstein *et al.* (1995) beschrieben wurde. Bei dieser Methode werden cytosolische bzw. extrahierte Membranproteine mit [³H]RA inkubiert und anschließend mit UV bestrahlt, wodurch eine kovalente Verknüpfung der RA mit den entsprechenden Proteinen bewirkt wird. Die markierten Proben werden dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Auch hier wurde die Spezifität der Interaktionen jeweils durch Präinkubation mit verschiedenen potentiellen Inhibitoren untersucht.

3.3.1 [³H]RA-bindende Proteine in Cytosol und Membranfraktion

Durch eine Inkubation mit [³H]RA und anschließender Bestrahlung mit UV wurden sowohl in der cytosolischen als auch in der Membranfraktion eine ganze Reihe verschiedener Proteine radioaktiv markiert (Abb. 3-20). Die M_r -Bestimmung für die markierten Proteine wurde näherungsweise durch Vergleich ihrer Laufstrecken im Gel mit denen der entsprechenden Markerproteine vorgenommen. Die Bestimmung der Intensität der Markierung erfolgte densitometrisch. Molekulargewichte und Markierungsintensität sind in Tabelle 3-2 zusammengefaßt. Es konnte allerdings nicht immer zwischen zwei womöglich eng benachbarten Einzelbanden und einzelnen dickeren Banden unterschieden werden. Im 16 kDa-Bereich des Cytosols z.B. sind vermutlich zwei Proteine markiert, obwohl in der Tabelle nur ein 16 kDa-Protein aufgeführt ist. Durch die Photoaffinitätsmarkierung wurden in der Membranfraktion Proteine mit M_r -Werten von 31 kDa, 39 kDa, 76-78 kDa und ca. 120 kDa besonders intensiv und Proteine mit M_r -Werten von 34 kDa, 35 - 36 kDa, 41 kDa und 43 kDa deutlich markiert. In der cytosolischen Fraktion wurden ein 22 - 23 kDa-Protein besonders intensiv sowie ein 16 kDa-, ein 52 kDa-, ein 53 - 54 kDa- und ein ca. 120 kDa-Protein deutlich markiert.

Ein Problem der verwendeten UV-Markierungsmethode bestand darin, daß vermutlich nicht nur spezifisch gebundene [³H]RA mit den entsprechenden Proteinen kovalent verbunden wurde, so daß nicht sicher war, ob es sich bei allen markierten Proteinen um RA-bindende Proteine handelte, die im Kontext eines RA-Signalweges stehen. Um die Spezifität der Interaktion zu testen, wurden verschiedene potentielle Inhibitoren verwendet, mit denen im Falle einer spezifischen Interaktion das Markierungssignal abgeschwächt werden sollte (s. Kap. 3.3.2). Im Mittelpunkt der weitergehenden Untersuchungen stand das 43 kDa-Protein, da es das gleiche Molekulargewicht aufwies wie eines der RAR α -ir Proteine (vgl. Abb 3-20).

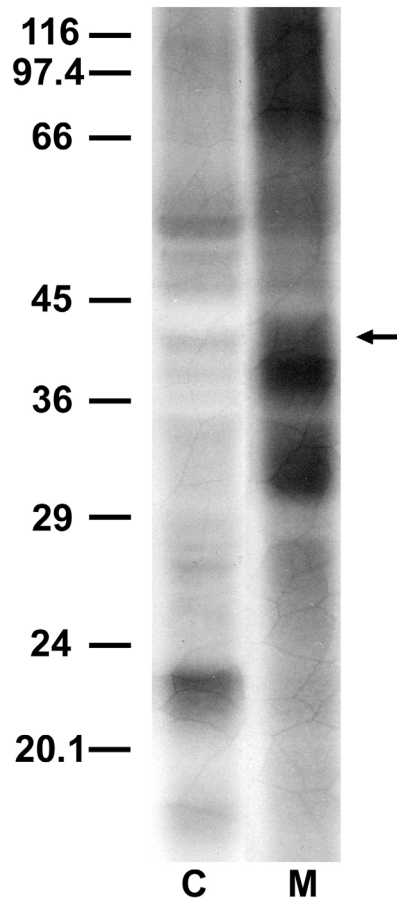


Abb. 3-20: [^3H]RA-bindende Proteine im Cytosol und in der Membranfraktion. Cytosolische (C) und Membranproteine (M) wurden mit [^3H]RA inkubiert, mit UV bestrahlt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Autoradiogramm zeigt eine Vielzahl markierter Proteine in beiden Fraktionen. In der Membranfraktion ist u.a. ein 43 kDa-Protein mit [^3H]RA markiert (Pfeil). Die Balken repräsentieren jeweils Markerproteine mit den angegebenen Molekulargewichten.

Tab. 3-2: Molekulargewichte der mit der Photoaffinitätsmethode markierten Proteine und die Intensität ihrer Markierung. Mark.-Int. = Markierungsintensität.

| Cytosol | | Membran | |
|-------------|------------|-------------|------------|
| M_r [kDa] | Mark.-Int. | M_r [kDa] | Mark.-Int. |
| 16 | ++ | 23 | + |
| 22,5 | +++++ | 27-28 | + |
| 25 | + | 31 | +++ |
| 26,5 | + | 34 | ++ |
| 27,5 | + | 35-36 | ++ |
| 29 | + | 39 | +++++ |
| 33,5 | + | 41 | ++ |
| 35 | + | 43 | ++ |
| 36,5 | + | 47 | + |
| 38,5 | + | 55 | + |
| 41 | + | 58 | + |
| 46,5 | + | 76-78 | ++++ |
| 50 | + | 120 | +++++ |
| 52 | ++ | | |
| 53-54 | ++ | | |
| 120 | ++ | | |

3.3.2 Pharmakologische Charakterisierung der [^3H]RA-bindenden Proteine

Die Spezifität und Pharmakologie der [^3H]RA-bindenden Proteine in der cytosolischen und der Membranfraktion wurden durch Verwendung verschiedener potentieller Inhibitoren untersucht. Dabei wurden cytosolische bzw. Membranproteine mit den verschiedenen Inhibitoren präinkubiert, anschließend mit der markierten RA inkubiert und schließlich mit UV bestrahlt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei ergaben sich im Hinblick auf die Inhibierbarkeit der [^3H]RA-Bindung vor allem in der cytosolischen Fraktion z.T. erhebliche Unterschiede zum *Charcoal*-Bindungstest. Führt eine Präinkubation cytosolischer Proteine mit einer im Vergleich zur markierten RA hundertfachen Konzentration unmarkierter RA im *Charcoal*-Test noch zu einer Inhibition der [^3H]RA-Bindung um ca. 95 % (vgl. Abb. 3-18), so bewirkte eine solche Präinkubation im UV-Markierungstest lediglich eine partielle Inhibition der [^3H]RA-Bindung an ein cytosolisches Protein. Erst bei einem 10^4 -fachen Überschuß an unmarkierter RA wurde die [^3H]RA-Bindung aller cytosolischen Proteine signifikant inhibiert (Abb. 3-21). Möglicherweise wurden durch die UV-Markierungsmethode viele Proteine unspezifisch markiert, was dann durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren nicht inhibiert werden konnte.

Auch die Interaktion der [^3H]RA-bindenden Membranproteine mit RA zeigte im UV-Markierungstest Unterschiede im Vergleich zum *Charcoal*-Test. Zwar wurde die [^3H]RA-Bindung durch einige der deutlich markierten Membranproteine durch eine Präinkubation mit einem hundertfachen bzw. tausendfachen Überschuß an unmarkierter RA signifikant inhibiert (Abb. 3-21), was durchaus die Ergebnisse aus dem *Charcoal*-Test widerspiegelte (vgl. Abb. 3-19). Aber mit einem 10^4 -fachen Überschuß an unmarkierter RA konnte die Bindung im UV-Markierungstest noch wesentlich stärker inhibiert werden, während eine solche Präinkubation im *Charcoal*-Test eine verstärkte [^3H]RA-Bindung zur Folge hatte.

Die Auswirkungen einer Präinkubation mit 13-*cis*-RA auf die [^3H]RA-Bindung in beiden Fraktionen ähnelten denen der Präinkubation mit unmarkierter RA, mit der Ausnahme, daß ein hundertfacher Überschuß eine etwas geringere Inhibition der [^3H]RA-Bindung an die Membranproteine zur Folge hatte als ein tausendfacher (Abb. 3-22). Dies entsprach allerdings auch den Ergebnissen aus dem *Charcoal*-Test. Im untersten Bereich des Autoradiogramms in Abbildung 3-22 ist noch ein 13-14 kDa-Membranprotein zu erkennen, dessen RA-Bindung ebenfalls durch 13-*cis*-RA inhibiert wurde, das auf den meisten anderen Autoradiogrammen aber nicht mehr zu sehen war.

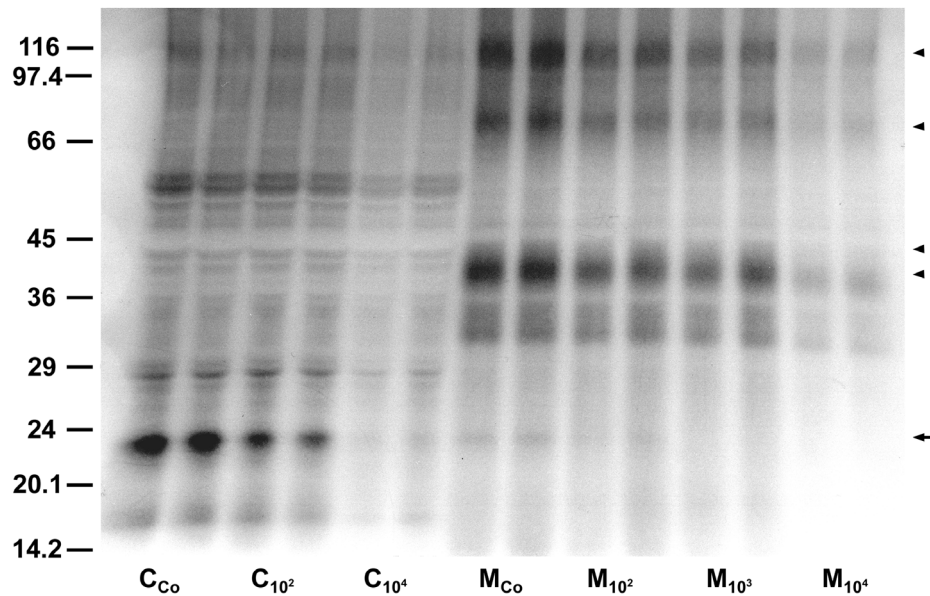


Abb. 3-21: Einfluß von RA auf die [^3H]RA-Bindung [^3H]RA-bindender Proteine. Die Präinkubation cytosolischer Proteine (C) mit unmarkierter RA führte lediglich zu einer deutlichen Inhibition der [^3H]RA-Bindung eines Proteins (Pfeil). In der Membranfraktion (M) wurde die [^3H]RA-Bindung zusätzlicher Proteine durch RA relativ deutlich inhibiert (Pfeilköpfe). Die Balken auf der linken Seite repräsentieren die entsprechenden Markerproteine. Co = Kontrolle ohne Inhibitor; 10^2 , 10^3 , 10^4 = Überschuß des Inhibitors.

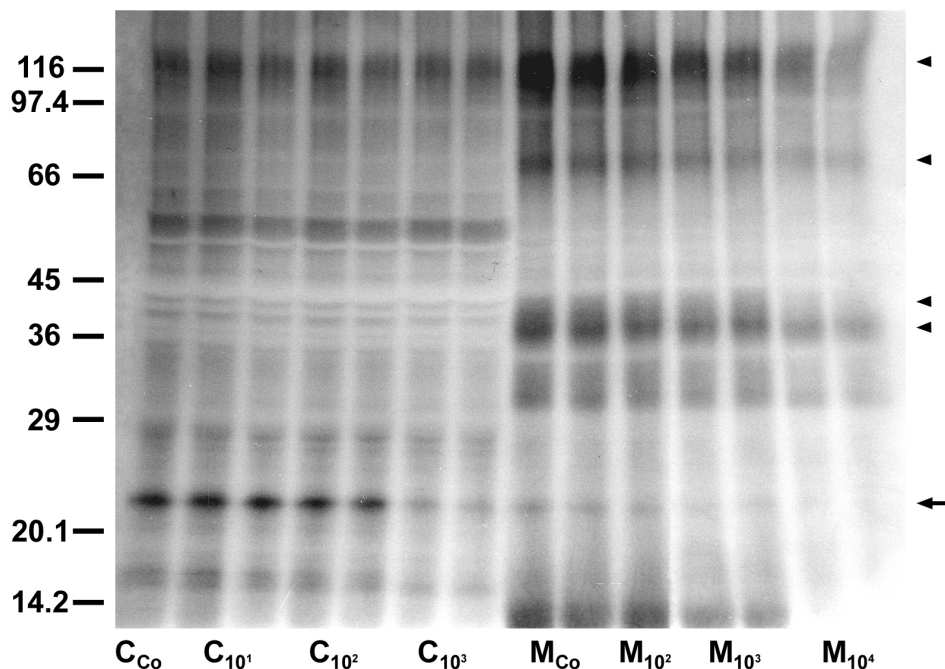


Abb. 3-22: Einfluß von 13-*cis*-RA auf die [^3H]RA-Bindung [^3H]RA-bindender Proteine. Anders als bei den Inhibitionsversuchen mit RA (vgl. Abb. 3-21) ist eine Präinkubation von Membranproteinen (M) mit einem 100-fachen Überschuß (10^2) an 13-*cis*-RA nicht so effektiv wie mit einem tausendfachen (10^3). Die Balken auf der linken Seite repräsentieren die entsprechenden Markerproteine. C = Cytosol; Co = Kontrolle.

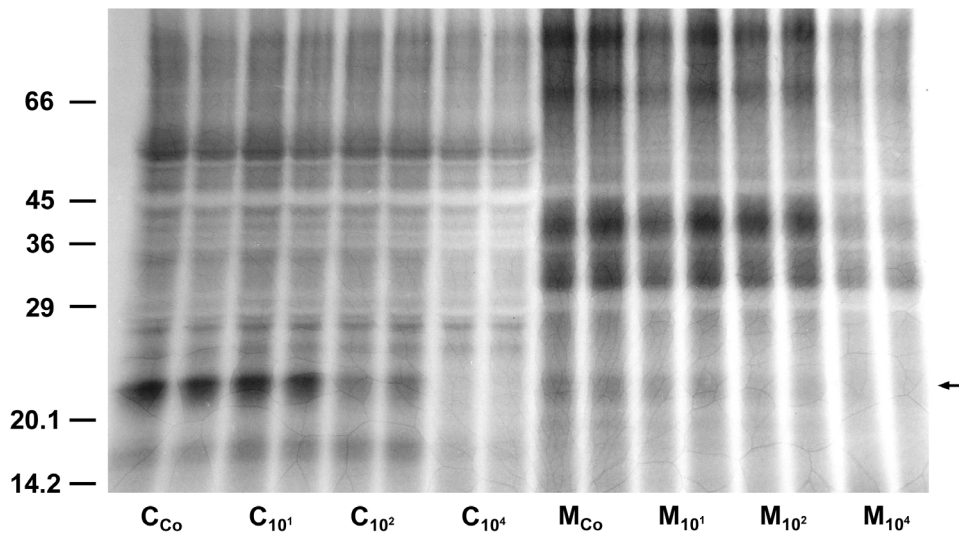


Abb. 3-23: Einfluß von RAL auf die [^3H]RA-Bindung [^3H]RA-bindender Proteine. Cytosolische (C) und Membranproteine (M) wurden mit steigenden Konzentrationen an RAL präinkubiert und anschließend mit [^3H]RA inkubiert. Das Autoradiogramm zeigt, daß die [^3H]RA-Bindung lediglich eines ca. 23 kDa-Proteins in beiden Fraktionen (Pfeil) durch RAL deutlich inhibiert werden kann. Die Balken auf der linken Seite repräsentieren die entsprechenden Markerproteine. Co = Kontrolle ohne Inhibitor.

Im *Charcoal*-Test zeigten ROL und RAL im Hinblick auf ihr inhibitorisches Potential deutliche Unterschiede, so konnte mit RAL die [^3H]RA-Bindung sowohl in der cytosolischen als auch in der Membranfraktion um mehr als 50 % inhibiert werden, während ROL nur bei einem sehr großen Überschuß im Bindungsansatz eine leichte Inhibition der Bindung in der cytosolischen Fraktion bewirkte. Im UV-Markierungstest zeigten beide sehr ähnliche Auswirkungen auf die [^3H]RA-Bindung der [^3H]RA-bindenden Proteine in beiden Fraktionen. Die Auswirkungen einer Präinkubation mit RAL auf die [^3H]RA-Bindung in beiden Fraktionen ähnelte dabei denen einer Präinkubation mit ROL (nicht gezeigt) sehr stark. Sowohl in der cytosolischen als auch in der Membranfraktion führte eine Präinkubation mit RAL erst ab einem 10^4 -fachen Überschuß im Vergleich zur [^3H]RA-Konzentration zu einer signifikanten Inhibition der [^3H]RA-Bindung einzelner Proteine. Lediglich die [^3H]RA-Bindung des 23 kDa-Proteins in der cytosolischen und der Membranfraktion, welche auch durch RA bzw. 13-*cis*-RA in beiden Fraktionen inhibiert wurde, konnte durch geringere Konzentrationen von RAL und auch von ROL inhibiert werden (Abb. 3-23). Eine leichte Inhibition wurde auch bei der [^3H]RA-Bindung des 76 - 78 kDa-Membranproteins durch geringere RAL-Konzentrationen beobachtet. Ohne inhibitorische Effekte auf die [^3H]RA-Bindung durch Proteine beider Fraktionen blieben Präinkubationen mit den PKC-Liganden PtdSer und PDBu (nicht gezeigt).

3.3.3 [³H]RA-Bindung durch ein RAR α -ähnliches Protein

Um festzustellen, ob in der Karpfenretina ein RAR α -ähnliches Membranprotein exprimiert wird, welches RA bindet, galt es zunächst eine Korrelation zwischen den anti-RAR α -immunoreaktiven und den [³H]RA-bindenden Proteinen herzustellen. Dazu wurden verschiedene retinale Fraktionen mit [³H]RA inkubiert, mit Hilfe der UV-Photoaffinitätsmethode markiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proben wurden daraufhin mittels Western-Blotting auf Nitrozellulose geblottet. Von der Nitrozellulosemembran wurde dann zunächst ein Autoradiogramm angefertigt und anschließend wurden mit dem RAR α -Antikörper die RAR α -ähnlichen Proteine auf der Membran visualisiert, wobei der sekundäre Antikörper AP-konjugiert war. Da die Anfertigung eines Autoradiogramms von einem Blot mit Tritium-markierten Proteinen aufgrund der zwischen Blot und Film platzierten Folie nur sehr schwache Signale lieferte, musste für die Anfertigung eines Autoradiogramms eine entsprechend lange Expositionszeit gewählt werden, was wiederum zu einem starken Hintergrundsignal führte. Dennoch konnten auf dem Autoradiogramm deutlich einige markierte Proteine erkannt werden (Abb. 3-24). Eine Überlagerung des Autoradiogramms mit dem Immunoblot ergab, daß das 43 kDa-Protein, welches das intensivste anti-RAR α -immunoreaktive Signal in der Membranfraktion erzeugte, auf dem Blot absolut deckungsgleich war mit dem durch [³H]RA markierten 43 kDa-Membranprotein, welches durch das Autoradiogramm visualisiert wurde. Die Bestrahlung mit UV führte zwar zu einer Abnahme der anti-RAR α -immunoreaktiven Signale im M_r-Bereich von 40 - 46 kDa in der Membranfraktion, sie hatte aber auch eine leichte Anhebung des 43 kDa-Signals um etwa 0,5 kDa im Immunoblot zur Folge, wenn sie im Anschluß an eine Inkubation mit RA erfolgte (Abb. 3-24 B).

Im Weiteren wurde nun eine weitergehende Charakterisierung der [³H]RA-Bindung dieses 43 kDa-Membranproteins durchgeführt. Dazu wurden zunächst die anti-RAR α -immunoreaktiven Proteine im M_r-Bereich von 40 - 46 kDa mittels präparativer Gelelektrophorese (PGE) partiell isoliert, wobei die 40 kDa-Komponente in keiner der Fraktionen detektiert werden konnte. Abbildung 3-25 zeigt die Verteilung der 43 kDa- und der 46 kDa-Komponenten in den schließlich erhaltenen Fraktionen.

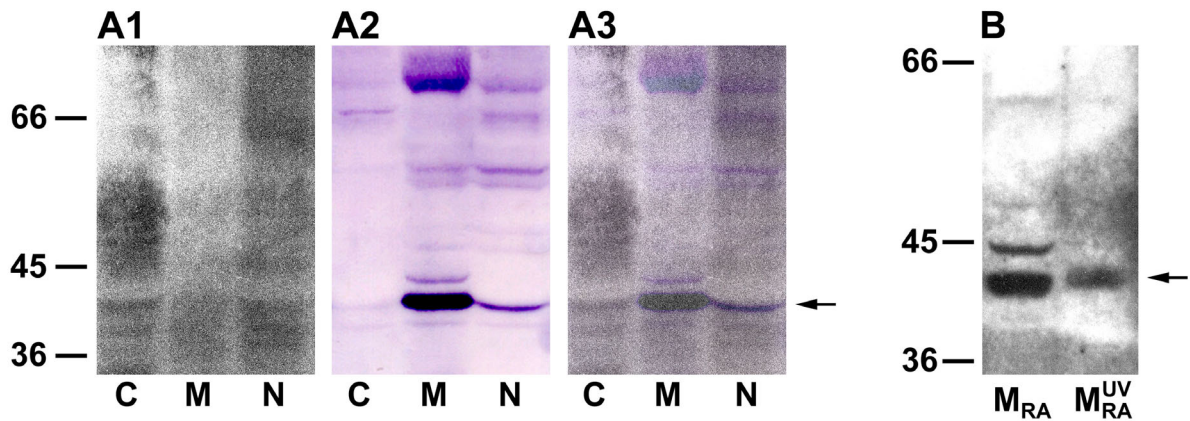


Abb. 3-24: Korrelation zwischen der anti-RAR α -IR und der RA-Bindung. Proteine aus einer cytosolischen (C), einer Membran- (M) und einer Kernfraktion (N) wurden mit [3 H]RA markiert, aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. (A1) Das Autoradiogramm zeigt verschiedene mit [3 H]RA markierte Proteine in allen Fraktionen. (A2) Der Immunoblot zeigt die anti-RAR α -immunoreaktiven Proteine in den entsprechenden Fraktionen. (A3) Die Überlagerung beider offenbart, daß das RAR α -ähnliche Membranprotein mit dem M_r von 43 kDa deckungsgleich ist mit einem [3 H]RA-bindenden Membranprotein (Pfeil). (B) Die Inkubation einer Membranfraktion mit RA führte nach Bestrahlung mit UV zu einem leichten *Shift* (ca. 0,5 kDa) des 43 kDa-Signals im Immunoblot (Pfeil). Die Balken repräsentieren jeweils die entsprechenden Markerproteine.

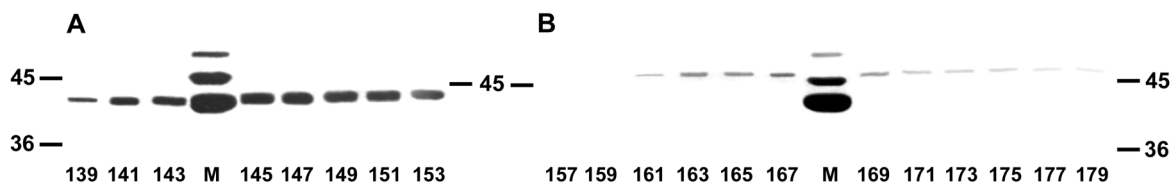


Abb. 3-25: Anti-RAR α -IR in den PGE-Fractionen. Eine Membranfraktion wurde mittels präparativer Gelelektrophorese aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mit dem RAR α -Antikörper auf das Vorhandensein anti-RAR α -ir Proteine hin untersucht. (A) Der Immunoblot zeigt die Fraktionen, die die 43 kDa-Komponente enthalten. (B) Der Immunoblot zeigt die Fraktionen, die die 46 kDa-Komponente enthalten. In beiden Fällen wurde jeweils eine Membranfraktion (M) als Kontrolle aufgetragen. Die Balken repräsentieren die jeweiligen Markerproteine.

Um zu testen, ob Proteine aus PGE-Fractionen mit Hilfe des UV-Markierungstests ebenfalls mit [3 H]RA markiert werden konnten, wurde er mit einer PGE-Fraktion, die die 43 kDa-Komponente enthielt, durchgeführt. Diese Fraktion stammte allerdings aus einer früheren präparativen Gelelektrophorese. In dieser PGE-Fraktion wurde ein Protein im M_r -Bereich von 43 kDa mit [3 H]RA markiert (Abb. 3-26). Diese Markierung konnte durch Präinkubation mit unmarkierter RA partiell inhibiert werden (Abb. 3-26 A). Die [3 H]RA-Bindung durch das 43

kDa Protein in der PGE-Fraktion konnte ebenfalls durch Präinkubation mit dem RAR α -Antikörper partiell inhibiert werden (Abb. 3-26 B, C), was darauf hindeutet, daß das [3 H]RA-bindende 43 kDa-Protein mit dem Antikörper interagiert und daß die Antikörper-Interaktionssequenz mit der LBD des Proteins möglicherweise überlappt.

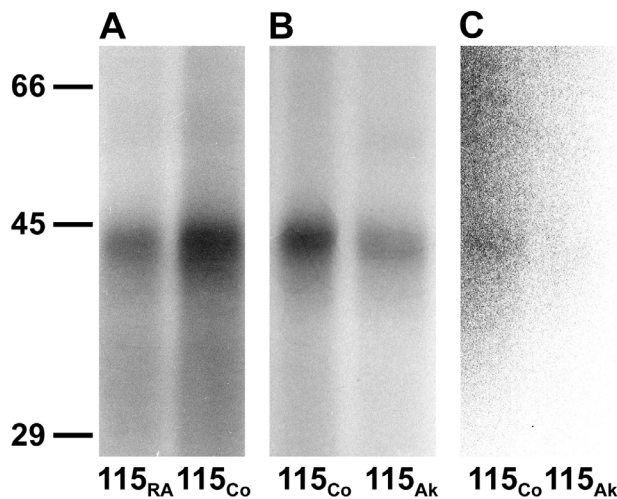


Abb. 3-26: Einfluß von RA und des RAR α -Antikörpers auf die [3 H]RA-Bindung des isolierten 43 kDa-Membranproteins. (A) Die Präinkubation mit unmarkierter RA inhibierte partiell die [3 H]RA-Bindung in einer anti-RAR α -ir PGE-Fraktion. (B, C) Die Präinkubation mit dem RAR α -Antikörper (Ak) inhibierte ebenfalls die [3 H]RA-Bindung in der Fraktion, wie die Autoradiogramme eines Gels (B) und eines Blots (C) zeigen. Die Balken auf der linken Seite repräsentieren die entsprechenden

Markerproteine. Co = Kontrolle ohne den jeweiligen Inhibitor.

3.4 Isolierung und Identifikation des anti-RAR α -immunoreaktiven RA-bindenden 43 kDa-Proteins

Sowohl die immunbiochemischen Untersuchungen als auch die Bindungsstudien deuteten auf ein 43 kDa-Protein in der Membranfraktion als einen potentiellen Kandidaten für das gesuchte Protein hin, welches die RA-Effekte auf die Horizontalzellen in der Fischretina vermittelt. Speziell die Beobachtung, daß der RAR α -Antikörper die [3 H]RA-Bindung durch das 43 kDa-Protein zu inhibieren vermochte, führte dazu, daß die weiteren Experimente eine Isolierung und Identifikation dieses 43 kDa-Proteins zum Ziel hatten.

3.4.1 Isolierung des 43 kDa-Proteins

Die Isolierung des 43 kDa-Proteins erfolgte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese. Dabei wurden sowohl Membranfraktionen als auch PGE-Fractionen zweidimensional aufgetrennt. Die Isolierung des Proteins wurde durchgeführt, um anschließend mittels einer massenspektrometrischen Analyse eine Sequenzierung des Proteins durchführen zu können. Da nur unspezifisch gefärbte Proteine massenspektrometrisch untersucht werden können, wurde das RAR α -immunoreaktive 43 kDa-Protein in den unspezifisch gefärbten Gelen durch eine Überlagerung jener Gele mit einem parallel durchgeführten Immunoblot identifiziert.

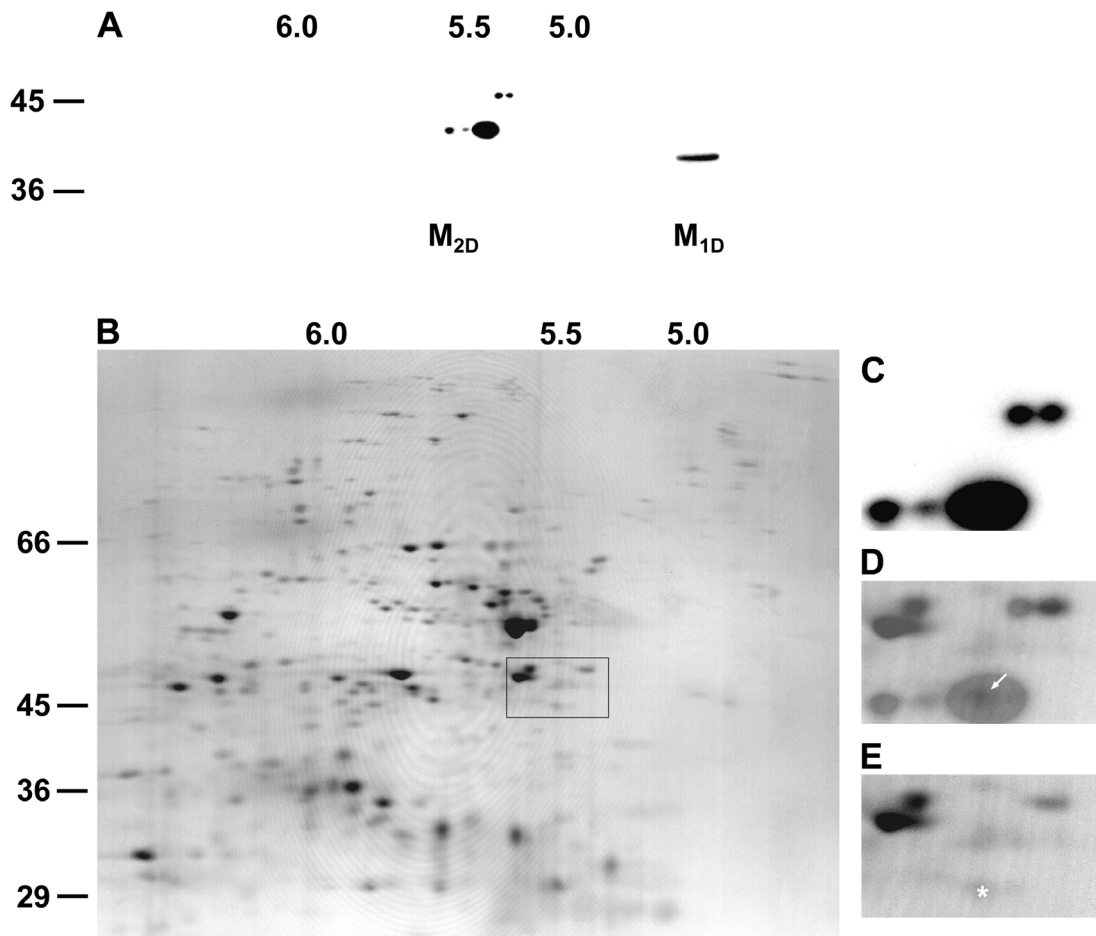


Abb. 3-27: Isolierung des 43 kDa-Proteins aus einer Membranfraktion der Karpfenretina. Mehrere Membranfraktionen wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mittels verschiedener Proteinnachweismethoden gefärbt. (A) Immunoblot einer zweidimensional aufgetrennten Membranfraktion (M_{2D}). Die $RAR\alpha$ -ir Hauptkomponente (43 kDa) lag im pI -Bereich von 5,4 bis 5,5. (B) Coomassie-Brillantblau-gefärbte zweidimensional aufgetrennte Membranfraktion. Ein Bereich des Gels ist in (D) und (E) vergrößert dargestellt. (C) Vergrößerter Abschnitt aus dem Immunoblot, der zu dem Gelabschnitt aus (D) und (E) korrespondiert. (D) Überlagerung des Immunoblot- und des Gelabschnitts. Der Pfeil deutet das unspezifisch gefärbte Protein im Gel an, welches zum $RAR\alpha$ -ir Protein korrespondiert. In (E) wurde dieses Protein mit einem Stern markiert. Dieses Protein wurde anschließend aus den Gelen ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die Balken links repräsentieren die entsprechenden Markerproteine. M_{1D} = zum Vergleich eindimensional aufgetrennte Membranfraktion

Die zweidimensionale Auftrennung sowohl der Membranfraktion (Abb. 3-27) als auch der $RAR\alpha$ -immunoreaktiven PGE-Fractionen (Abb. 3-25 und 3-28) ergaben für das 43 kDa-Protein einen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,4 bis 5,5. Daneben konnten noch zwei weitere schwach immunoreaktive Komponenten im pI -Bereich von 5,5 bis 5,7 detektiert werden. Das $RAR\alpha$ -immunoreaktive 46 kDa-Protein enthielt ebenfalls mindestens zwei Komponenten im

pI-Bereich von etwa 5,4 kDa. Das 40 kDa-Protein konnte nach zweidimensionaler Auftrennung nicht mehr detektiert werden.

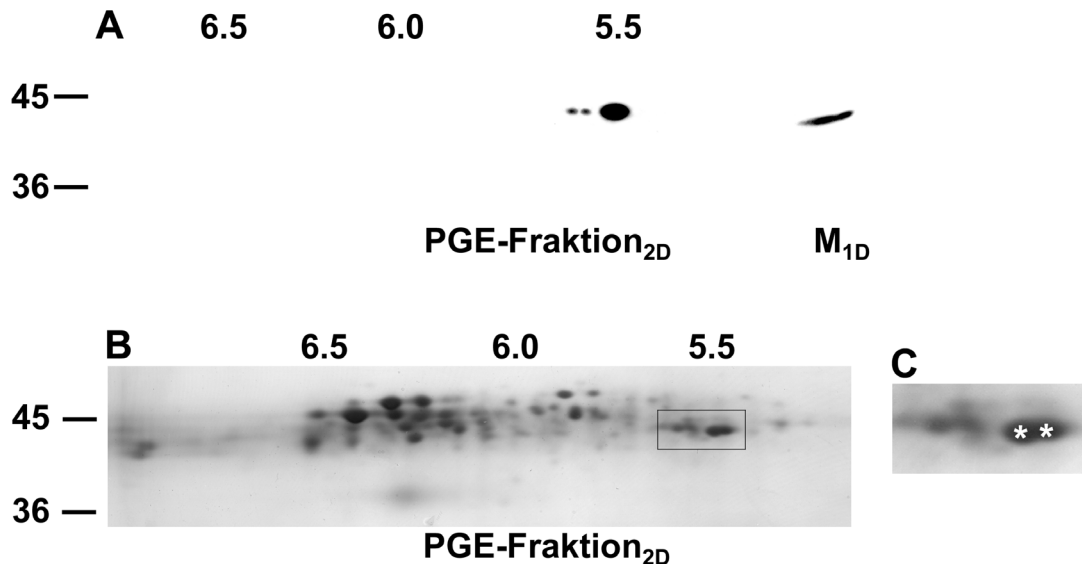


Abb. 3-28: Isolierung des 43 kDa-Proteins aus einer PGE-Fraktion. Proteine einer Membranfraktion wurden mittels PGE nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. RAR α -ir Fraktionen wurden dann mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels verschiedener Proteinnachweismethoden gefärbt. (A) Immunoblot einer zweidimensional aufgetrennten PGE-Fraktion. Die immunoreaktive Hauptkomponente besaß einen pI von etwa 5,5. (B) Silber-gefärbte zweidimensional aufgetrennte PGE-Fractionen (2). (C) Der vergrößerte Bildausschnitt von (B) enthält die Komponenten, die zu den RAR α -ir Proteinen in (A) korrespondierten (Sterne). Die Balken links repräsentieren die entsprechenden Markerproteine. M_{1D} = zum Vergleich eindimensional aufgetrennte Membranfraktion

Nach der Überlagerung mit dem jeweiligen Immunoblot wurde aus den unspezifisch gefärbten Gelen jeweils das Protein ausgeschnitten, das in bezug auf das Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt und daher auch der Position im Gel mit der anti-RAR α -immunoreaktiven 43 kDa-Komponente korrespondierte. Die Proben wurden daraufhin massenspektrometrisch analysiert.

3.4.2 Identifikation des 43 kDa-Proteins

Die Identifikation des ausgewählten Proteins erfolgte mittels Elektrospray-Ionisation-Massenspektroskopie (ESI-MS) und wurde in der Abteilung Neuroanatomie / Molekulare Hirnforschung der Universität Bochum von C. Alev durchgeführt. Das 43 kDa-Protein wurde dabei mittels MudPIT (*multidimensional protein identification technology*) analysiert. Die

MudPIT-Analyse stellt eine Kombination aus mehrdimensionaler chromatographischer Auftrennung und anschließender Tandem-Massenspektroskopie dar. Das ausgewählte Protein wurde zunächst mit Trypsin gespalten, woraufhin die erhaltenen Fragmente mittels der MudPIT-Analyse aufgetrennt, sequenziert und nach SEQUEST-Algorithmen identifiziert wurden.

Es wurde aus neun Gelen jeweils das 43 kDa-Protein ausgeschnitten und zur Analyse eingebracht. Von den neun Proben wurden sechs analysiert, wobei jeweils zwei gemeinsam untersucht wurden. Die erhaltenen Sequenzen sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Die Datenbankanalysen ergaben keine Homologien zwischen den erhaltenen Sequenzen einerseits und Retinoidrezeptoren oder bekannten RA-bindenden Proteinen andererseits. Stattdessen wiesen die Sequenzen die größte Homologie zu dem hypothetischen Zebrafisch-Protein MGC73056 (Akzessionsnummer BC059511) auf. MGC73056 stellt ein Homolog zur α -Enolase der Säuger dar, also einem cytoplasmatischen Enzym, das eine Reaktion der Glykolyse katalysiert.

Tab. 3-3: Peptidsequenzen des 43 kDa-Proteins nach der MudPIT-Analyse.

| Probe | Aufgetrennte Fraktion | Färbemethode | Peptidsequenzen |
|-------|--|-------------------------|--|
| 1 + 4 | M-Fraktion (300 µg); M-Fraktion (400 µg) | Coomassie-Brillantblau | <i>DATNVGDEGGFAPNILENKEALELLK</i> ; <i>SPDDPDRYISPDELADLYK</i> ; <i>HIADLAGNPEVILPVPAFNVINGGSHAGNK</i> |
| 2 + 5 | M-Fraktion (300 µg); extrahierte M-Fraktion (450 µg) | Coomassie-Kolloidalblau | <i>DATNVGDEGGFAPNILENKEALELLK</i> ; <i>YISPDELADLYK</i> ; <i>IDQFMLELDGTENK</i> ; <i>AAVPSGASTGIYEALRL</i> ; <i>IGAEVYHNLK</i> |
| 6 + 9 | PGE-Fraktionen (147, 148, 153 und 154); extrahierte M-Fraktion (450 µg) | Silber | <i>DATNVGDEGGFAPNILENKEALELLK</i> ; <i>YISPDKLADLYK</i> ; <i>YISPDELADLYK</i> ; <i>AAVPSGASTGIYEALRL</i> |

Da die Datenbankanalysen keine Hinweise auf Proteine lieferten, die nicht mit der Enolase verwandt waren, galt es nun die putative Enolase auf Nukleotidebene nachzuweisen und die vollständige cDNA-Sequenz zu erhalten.

3.4.3 Isolierung und Sequenzierung der cDNA des 43 kDa-Proteins

Die Isolierung und Sequenzierung der cDNA, die für das 43 kDa-Protein kodiert, erfolgte unter Anwendung verschiedener PCR-Techniken. Die cDNA wurde mittels RT-PCR aus einer Karpfenretina gewonnen. Die Isolierung der putativ für das 43 kDa-Protein kodierenden cDNA erfolgte unter Verwendung eines Primerpaares, welches für die kodierenden Regionen

zweier der mittels der MudPIT-Analyse erhaltenen Sequenzen entworfen wurde. Die Grundlage dafür bildete die cDNA, die für das Zebrafisch-Protein MGC73056 kodiert. Der mittels dieses Primerpaares amplifizierte und sequenzierte Bereich diente anschließend als Ausgangspunkt für eine 3'-RACE-PCR und eine 5'-RACE-PCR, mit deren Hilfe der komplette kodierende cDNA-Bereich der putativen Karpfenenolase gewonnen werden konnte. Der kodierende cDNA-Abschnitt wurde dann mittels der EMBOSS Transseq-Software in die entsprechende Proteinsequenz übersetzt (Abb. 3-29). Die putative Karpfen-Enolase besitzt auf Nukleotidebene 94 % Homologie mit der putativen Zebrafisch-Enolase, 81 % Homologie mit der α -Enolase vom Menschen und von der Maus und 77 % Homologie mit der Neuronenspezifischen γ -Enolase (NSE) vom Menschen.

Auf Proteinebene besitzt die Karpfen-Enolase 97 % Homologie mit dem Zebrafisch-Protein, 89 % Homologie mit der α -Enolase vom Menschen und von der Maus und 83 % Homologie mit der γ -Enolase vom Menschen. Das abgeleitete Karpfen-Protein besitzt einen theoretischen pI von 5,58, welcher mit dem mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ermittelten pI von etwa 5,5 relativ gut übereinstimmt. Allerdings besitzt das abgeleitete Karpfenprotein ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 47 kDa, während das Molekulargewicht des '43 kDa-Proteins' aufgrund seiner Laufeigenschaften im Polyacrylamidgel eben mit 43 kDa bestimmt wurde.

Ausgehend von der These, daß ein spezifischer Antikörper nur die Peptidsequenz erkennt, die zu seiner Herstellung verwendet wurde und gegen die er also gerichtet ist, wurde auch noch der Versuch unternommen, mittels PCR eine cDNA zu isolieren, die für ein Protein kodiert, welches sowohl Enolase-spezifische Sequenzen als auch die zur Immunisierung eingesetzte RAR α -spezifische Peptidsequenz enthielt. Dazu wurde das Primerpaar, welches zur Isolierung der Enolase-cDNA eingesetzt wurde, zusammen mit einem Primerpaar getestet, welches in beide Leserichtungen für den Nukleotidbereich entwickelt wurde, der für jenes RAR α -spezifische Peptid kodiert. Die RAR α -spezifischen Primer wurden auf der Grundlage eines *Alignments* von RAR α -cDNA-Sequenzen verschiedener Spezies entwickelt. Der Einsatz dieser Primer führte allerdings in keiner der untersuchten Kombinationen zur Amplifizierung eines cDNA-Abschnitts (nicht gezeigt).

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ATG | TCC | ATC | CTG | AAG | ATC | CAT | GCT | CGT | GAA | ATC | TTT | GAC | TCC | CGT | GGA | AAC | CCC | ACT | GTG | GAG |
| Met | Ser | Ile | Leu | Lys | Ile | His | Ala | Arg | Glu | Ile | Phe | Asp | Ser | Arg | Gly | Asn | Pro | Thr | Val | Glu |
| GTT | GAT | CTC | TAC | ACC | AAG | AAA | GGT | CTC | TTC | AGA | GCT | GCA | GTG | CCC | AGT | GGC | GCT | TCT | ACT | GGC |
| Val | Asp | Leu | Tyr | Thr | Lys | Lys | Gly | Leu | Phe | Arg | Ala | Ala | Val | Pro | Ser | Gly | Ala | Ser | Thr | Gly |
| ATC | TAT | GAA | GCC | CTT | GAG | CTC | CGT | GAC | AAT | GAC | AAG | ACA | CGT | TAT | CTG | GGC | AAA | GGT | GTC | TCA |
| Ile | Tyr | Glu | Ala | Leu | Glu | Leu | Arg | Asp | Asn | Asp | Lys | Thr | Arg | Tyr | Leu | Gly | Lys | Gly | Val | Ser |
| AAA | GCT | GTT | GAG | CAT | ATC | AAT | AAA | TCA | ATT | GCA | CCT | GCT | CTG | GTT | AGC | CAG | AAC | GTG | TCA | GTC |
| Lys | Ala | Val | Glu | His | Ile | Asn | Lys | Ser | Ile | Ala | Pro | Ala | Leu | Val | Ser | Gln | Asn | Val | Ser | Val |
| TTG | GAG | CAG | GAG | AAG | ATC | GAT | AAG | CTG | ATG | CTT | GAT | ATG | GAT | GGC | ACT | GAA | AAC | AAG | TCA | AAG |
| Leu | Glu | Gln | Glu | Lys | Ile | Asp | Lys | Leu | Met | Leu | Asp | Met | Asp | Gly | Thr | Glu | Asn | Lys | Ser | Lys |
| TTT | GGT | GCT | AAT | GCC | ATC | CTG | GGC | GTT | TCC | CTG | GCT | GTG | TGC | AAG | GCT | GGT | GCT | GCA | GAG | AAG |
| Phe | Gly | Ala | Asn | Ala | Ile | Leu | Gly | Val | Ser | Leu | Ala | Val | Cys | Lys | Ala | Gly | Ala | Ala | Glu | Lys |
| GGC | GTC | CCC | CTC | TAC | CGC | CAC | ATC | GCA | GAC | CTC | GCT | GGC | AAC | CCA | GAA | GTC | ATT | CTC | TCT | GTC |
| Gly | Val | Pro | Leu | Tyr | Arg | His | Ile | Ala | Asp | Leu | Ala | Gly | Asn | Pro | Glu | Val | Ile | Leu | Ser | Val |
| CCT | GCC | TTC | AAT | GTT | ATC | AAC | GGT | GGC | TCC | CAC | GCC | GGC | AAC | AAG | CTG | GCT | ATG | CAG | GAG | TTC |
| Pro | Ala | Phe | Asn | Val | Ile | Asn | Gly | Gly | Ser | His | Ala | Gly | Asn | Lys | Leu | Ala | Met | Gln | Glu | Phe |
| ATG | ATC | CTG | CCT | GTC | GGT | GCN | AGC | AAC | TTC | AAA | GAG | GCC | ATG | CGC | ATT | GGT | GCT | GAA | GTT | TAT |
| Met | Ile | Leu | Pro | Val | Gly | Ala | Ser | Asn | Phe | Lys | Glu | Ala | Met | Arg | Ile | Gly | Ala | Glu | Val | Tyr |
| CAC | AAC | CTG | AAG | AAT | GTC | ATT | AAG | GAG | AAG | TAC | GGC | AAA | GAT | GCC | ACC | AAT | GTG | GGC | GAT | GAA |
| His | Asn | Leu | Lys | Asn | Val | Ile | Lys | Glu | Lys | Tyr | Gly | Lys | Asp | Ala | Thr | Asn | Val | Gly | Asp | Glu |
| GGT | GGA | TTC | GCT | CCC | AAC | ATC | CTT | GAG | AAC | AAA | GAA | GCT | CTG | GAG | CTG | CTG | AAG | AAT | GCC | ATT |
| Gly | Gly | Phe | Ala | Pro | Asn | Ile | Leu | Glu | Asn | Lys | Glu | Ala | Leu | Glu | Leu | Leu | Lys | Asn | Ala | Ile |
| AGC | AAA | GCC | GGC | TAC | ACC | GAC | AAG | ATT | GTG | ATC | GGC | ATG | GAT | GTG | GCT | GCC | TCT | GAG | TTC | TAC |
| Ser | Lys | Ala | Gly | Tyr | Thr | Asp | Lys | Ile | Val | Ile | Gly | Met | Asp | Val | Ala | Ala | Ser | Glu | Phe | Tyr |
| AAG | GGT | GGC | AAG | TAC | GAC | CTG | GAC | TTC | AAA | TCA | CCT | GAT | GAC | CCC | AGC | CGT | TAT | ATC | AGC | CCT |
| Lys | Gly | Gly | Lys | Tyr | Asp | Leu | Asp | Phe | Lys | Ser | Pro | Asp | Asp | Pro | Ser | Arg | Tyr | Ile | Ser | Pro |
| GAC | CAG | CTG | GCT | GAC | CTT | TAC | AGG | AGC | TTT | GTC | AAG | GAT | TAT | CCT | GTG | GTC | TCC | ATT | GAG | GAT |
| Asp | Gln | Leu | Ala | Asp | Leu | Tyr | Arg | Ser | Phe | Val | Lys | Asp | Tyr | Pro | Val | Val | Ser | Ile | Glu | Asp |
| CCA | TTT | GAC | CAG | GAT | GAC | TGG | GAA | GCC | TGG | ACC | AAC | TTC | ACT | GCC | AGC | ACT | GAC | ATC | CAG | GCG |
| Pro | Phe | Asp | Gln | Asp | Asp | Trp | Glu | Ala | Trp | Thr | Asn | Phe | Thr | Ala | Ser | Thr | Asp | Ile | Gln | Ala |
| GTG | GGT | GAT | GAC | CTC | ACT | GTG | ACC | AAC | CCC | AAG | CGC | ATC | GCT | AAA | GCC | GTG | TCT | GAC | AAG | GCC |
| Val | Gly | Asp | Asp | Leu | Thr | Val | Thr | Asn | Pro | Lys | Arg | Ile | Ala | Lys | Ala | Val | Ser | Asp | Lys | Ala |
| TGC | AAC | TGC | CTG | CTA | CTC | AAA | GTC | AAC | CAG | ATC | GGA | TCC | GTC | ACC | GAG | TCC | CTT | CAG | GCC | TGT |
| Cys | Asn | Cys | Leu | Leu | Leu | Lys | Val | Asn | Gln | Ile | Gly | Ser | Val | Thr | Glu | Ser | Leu | Gln | Ala | Cys |
| AAG | ATG | GCC | CAG | TCT | AAT | GGA | TGG | GGA | GTG | ATG | GTC | AGC | CAC | CGT | TCT | GGA | GAG | ACA | GAG | GAC |
| Lys | Met | Ala | Gln | Ser | Asn | Gly | Trp | Gly | Val | Met | Val | Ser | His | Arg | Ser | Gly | Glu | Thr | Glu | Asp |
| ACC | TTC | ATC | GCT | GAC | CTT | GTG | GTC | GGA | CTC | TGC | ACT | GGC | CAG | ATC | AAG | ACT | GGT | GCT | CCC | TGC |
| Thr | Phe | Ile | Ala | Asp | Leu | Val | Val | Gly | Leu | Cys | Thr | Gly | Gln | Ile | Lys | Thr | Gly | Ala | Pro | Cys |
| CGG | TCT | GAC | CCC | CTG | GCC | CAG | TAC | AAT | CAG | CTG | CTG | AGG | ATT | GAG | GAG | GAG | CTT | GGT | GAC | AAG |
| Arg | Ser | Asp | Pro | Leu | Ala | Gln | Tyr | Asn | Gln | Leu | Leu | Arg | Ile | Glu | Glu | Glu | Leu | Gly | Asp | Lys |
| GCT | CGT | TTT | GCT | GGC | AAG | AAC | TTC | AGG | AGG | CCC | ATC | TGA | | | | | | | | |
| Ala | Arg | Phe | Ala | Gly | Lys | Asn | Phe | Arg | Arg | Pro | Ile | * | | | | | | | | |

Abb. 3-29: cDNA-Sequenz der putativen Karpfen-Enolase und die daraus abgeleitete Proteinsequenz. Der dargestellte kodierende Sequenzbereich für die putative Karpfen-Enolase besitzt 94 % Homologie mit der cDNA-Sequenz der putativen Zebrafisch-Enolase. Die mit der EMBOSS-Transseq-Software daraus abgeleitete Proteinsequenz besitzt 97 % Homologie mit dem Zebrafisch-Protein.

4 Diskussion

RA evoziert in der Fischretina verschiedene physiologische und morphologische Prozesse, deren Gemeinsamkeit darin liegt, daß sie alle auch im Kontext der Helladaptation der Retina ablaufen (s. Kap. 1.3.3). Diese durch RA hervorgerufenen Prozesse sowie die Beobachtung, daß die RA-Konzentration in der Retina im Verlauf der Helladaptation ansteigt, lassen RA als einen potentiellen Lichtsignal-vermittelnden Neuromodulator erscheinen. Die Mechanismen, die den durch RA hervorgerufenen Prozessen zugrunde liegen, und damit auch das Substrat, über das RA seine Wirkung(en) entfaltet, sind bislang unbekannt. Am besten untersucht ist bisher der Einfluß der RA auf die GJIC zwischen Horizontalzellen, der offensichtlich über eine externe Bindungsstelle auf den Horizontalzellen vermittelt wird (Zhang & McMahon, 2000). Das Hauptziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung und Identifikation dieser Bindungsstelle bzw. dieses RA-bindenden Proteins in der Karpfenretina. Daneben sollte noch überprüft werden, ob die Existenz weiterer Bindungsstellen nachgewiesen werden konnte.

Zunächst wurde ein Bindungstest entwickelt, mit dem unter Verwendung Tritium-markierter RA die Existenz einer Membran-assoziierten Bindungsstelle nachgewiesen und deren Charakterisierung vorgenommen wurde. Parallel dazu wurde ein modifizierter Markierungs-Test nach Bernstein *et al.* (1995) verwendet, mit dem RA-bindende Proteine nachgewiesen und partiell charakterisiert wurden. Da die physiologischen Befunde einer früheren Studie darauf hindeuteten, daß die RA-Bindungsstelle RAR-ähnliche Charakteristika aufweist, wurden diverse Retinoidrezeptor-spezifische Antikörper in verschiedenen immunchemischen Ansätzen getestet. Auf diese Weise konnten mehrere anti-RAR α -immunoreaktive Proteine in der Retina nachgewiesen und anti-RAR α -IR zellulär und subzellulär lokalisiert werden. Die Korrelation zwischen RA-Bindung und anti-RAR α -IR führte schließlich zu einem 43 kDa-Protein, welches sich nach seiner Isolation und anschließender Identifikation mittels Massenspektroskopie als Enolase-ähnliches Protein erwies bzw. zu erweisen schien. Letztlich liefert diese Arbeit weitere Hinweise für die These, daß RA als Neuromodulator in der Fischretina fungiert.

4.1 Charakterisierung der RA-Bindung in der Retina

4.1.1 Der Bindungstest

Die zur Analyse von Membran-Bindungsstellen am häufigsten verwendeten Bindungstests sind Zentrifugationstests, bei denen die Membranen aus dem Ansatz mit dem radioaktiv mar-

kierten Liganden einfach abzentrifugiert werden, und Filterbindungstests, bei denen der Bindungsansatz z.B. durch einen Glasfaserfilter filtriert wird, an den die Bindungsstellen mit gebundenem Liganden adsorbieren. Die Verwendung eines Filterbindungstests, der zur Analyse der Bindung des Phorbolesters PDBu in verschiedenen Fraktionen der Fischretina angewendet wurde (Janssen-Bienhold *et al.*, 1995), erwies sich für die Analyse der [3 H]RA-Bindung als untauglich, da mit diesem Test weder eine saturierbare noch eine inhibierbare Bindung in verschiedenen retinalen Fraktionen nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich konnte die unspezifische Interaktion der RA mit den Proteinen durch den Waschpuffer nicht unterbunden werden. Dieses Problem hätte vermutlich auch bei einem Zentrifugationstest Bestand gehabt. Daher wurde im Folgenden ein spezieller *Charcoal*-Adsorptionstest entwickelt. Solche Tests wurden seit Ende der sechziger Jahre zur Analyse der Steroidbindung an die entsprechenden Kernrezeptoren verwendet (Murphy, 1967; Baxter & Tomkins, 1971). Aber auch die Bindung von Steroiden an solubilisierte Membranrezeptoren wurde mit diesem Test analysiert (Zhu *et al.*, 2003a, b). Eine detaillierte Studie der für den *Charcoal*-Test wichtigen Parameter wurde von Sablonnière *et al.* (1994) veröffentlicht. Der Test basiert darauf, daß die in Suspension befindlichen Holzkohle (*Charcoal*)-Teilchen ungebundene Steroide binden und anschließend abzentrifugiert werden.

Mehrere Versuche haben gezeigt, daß mit einer einmaligen Inkubation mit der *Charcoal*-Suspension nur eine schwache Sättigung der [3 H]RA-Bindung sowohl an cytosolische als auch an Proteine aus Kernextrakten nachzuweisen war. Wurde allerdings der nach der Zentrifugation verbleibende Überstand ein zweites Mal mit der Suspension inkubiert, so konnte anschließend eine deutliche Sättigung der [3 H]RA-Bindung in allen getesteten Fraktionen, einschließlich der Membranfraktion, beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, daß die Kohleteilchen bei der zweiten Inkubation mit den unspezifischen Bindungsstellen konkurrierten. Die Nachteile einer wiederholten Inkubation bestanden zum einen in dem damit verbundenen Proteinverlust, der allerdings quantifiziert werden konnte, und in dem nicht quantifizierten Verlust an spezifisch gebundener [3 H]RA. Der letzte Punkt ist vor allem vor dem Hintergrund ein Problem, daß nach der ersten Zentrifugation die Konzentration an freiem Liganden und damit auch die Konzentration an gesamtem Liganden dramatisch verringert wird, wodurch Bindungsstellen mit schneller *off-rate* bzw. mit geringer Affinität zum Liganden aufgrund verstärkter Dissoziation des Liganden kaum nachgewiesen werden können. Dennoch wurde dieser modifizierte *Charcoal*-Test mangels praktikabler Alternativen zur Analyse der RA-Bindung in der Membranfraktion der Karpfenretina verwendet

4.1.2 [³H]RA-Bindung in der Retina

Die Analyse der [³H]RA-Bindung in der cytosolischen und der Membranfraktion der Retina mittels des modifizierten *Charcoal*-Tests ergab, daß die Bindung unmittelbar erfolgte und über einen Zeitraum von mindestens drei Stunden konstant blieb. Im Proteinkonzentrationsbereich von 0,2 - 1,0 µg/µl nahm die RA-Bindung proportional mit der Proteinmenge zu. Die ermittelten K_D-Werte betrugen für die cytosolischen Fraktion 12,7 nM (± 0,9 nM) und für die Membranfraktion 35,8 nM (± 7,4 nM). Die Hill-Koeffizienten beider Fraktionen betrugen jeweils ca. 1, was auf eine homogene Rezeptorpopulation in beiden Fraktionen hindeutet. Diese Deutung ist allerdings mit Einschränkungen versehen, da die Bindung aufgrund der Beschränkungen, die mit dem *Charcoal*-Test verbunden sind, nur im [³H]RA-Konzentrationsbereich von 5 - 100 nM getestet wurde. Höheraffine Bindungsstellen könnten nur mit entsprechend geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden, was wiederum eine höhere Proteinausgangskonzentration erfordert hätte. Dadurch wäre allerdings der Bereich des linearen Zusammenhangs zwischen Proteinkonzentration und RA-Bindung überschritten worden. Geringaffine Bindungsstellen und solche mit schneller *off-rate* könnten ihren Liganden zwischen den beiden Inkubationen mit der *Charcoal*-Suspension bzw. während der zweiten Inkubation durch Dissoziation verlieren. In der Studie von Zhang und McMahon (2000) war schon 8' nach Auswaschen der RA der entkoppelnde Effekt wieder aufgehoben, was auf eine schnelle Dissoziationsrate schließen ließ, während für die LBD des menschlichen RARα eine Dissoziationshalbwertszeit von etwa 40' bestimmt wurde, was eher einer langsamen Dissoziationsrate entspricht (Dallery *et al.*, 1993).

Der für die Membranbindungsstelle ermittelte K_D-Wert unterscheidet sich deutlich von denen der Kernrezeptoren, für die sich in der Literatur Werte zwischen 0,2 und 4 nM finden lassen. Bei der Bestimmung jener Werte wurden in der Regel die entsprechenden Rezeptoren RARα, β oder γ bzw. deren jeweilige LBD in *E. coli*- oder in COS-Zellen (modifizierte Nierenzellen des afrikanischen Grünaffen) transformiert bzw. transfiziert, woraufhin die jeweiligen Kernextrakte mittels *Charcoal*-Test (Dallery *et al.*, 1993; Scafonas *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998) oder mittels Säulenchromatographie (Allenby *et al.*, 1993, 1994) analysiert wurden. Auch CRABP-I und -II binden RA mit deutlich höherer Affinität und mit K_D-Werten von 0,4 - 2 nM (Norris *et al.*, 1994). Die kürzlich beschriebene neue Familie membrangebundener Progesteronrezeptoren besitzt für die [³H]Progesteron-Bindung K_D-Werte von 20 - 40 nM (Zhu *et al.*, 2003a, b), während die intrazellulären Rezeptoren K_D-Werte vornehmlich im einstelligen nanomolaren oder subnanomolaren Bereich aufweisen. Konträr dazu enthalten Membranen

des Kaninchen-Uterus eine 17β -Östradiol-Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten von 0,36 nM (Monje und Boland, 1999), die der von 0,4 nM eines intrazellulären ER β sehr ähnelt (Kuiper *et al.*, 1997). Möglicherweise handelt es sich bei der 17β -Östradiol-Membranbindungsstelle um einen translozierten Kernrezeptor (Razandi *et al.*, 1999). Der K_D -Wert für die RA-Membranbindungsstelle deutet demnach darauf hin, daß deren LBD sich von denen der RA-Rezeptoren und -Bindungsproteine unterscheidet.

Aufgrund der eingangs formulierten Einschränkungen besteht dennoch die Möglichkeit, daß die Membranfraktion zusätzlich eine hochaffine RAR-ähnliche Bindungsstelle enthält. Vor dem Hintergrund der These, daß RA in der Fischretina Adaptationsvorgänge initiieren soll, die erst bei kontinuierlicher Belichtung einsetzen, wäre es womöglich ein Vorteil eine Bindungsstelle zu nutzen, deren Affinität zur RA nicht so hoch ist wie die der Kernrezeptoren. RA spielt eine wichtige Rolle bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen in der Vertebratenretina (s. Kap. 1.3.2), und da solche Prozesse auch in der adulten Fischretina erfolgen, kann es nicht als unwahrscheinlich erachtet werden, daß die basalen RA-Konzentrationen in der Fischretina gegenüber z.B. der Säugerretina leicht erhöht sind. Während die retinalen Zellen den Einfluß der RA auf die Genexpression über CRABP-I oder -II zumindest partiell regulieren können, sind extrazelluläre Bindungsstellen, wenn sie keinen besonderen Modifikationen unterliegen reine Konzentrationssensoren. Eine hochaffine Bindungsstelle würde demnach häufig RA gebunden haben und kontinuierlich ein Hellsignal vermitteln. Andererseits sollte die Affinität des Rezeptors auch nicht zu gering sein, da RA letztlich doch nur ein Nebenprodukt des Phototransduktionszyklus ist, und ihre Konzentration während der Helladaptation nicht übermäßig stark ansteigen dürfte.

An den Bindungsstudien der RA-Bindung in der cytosolischen Fraktion manifestierten sich besonders deutlich die Einschränkungen des *Charcoal*-Tests. In der Literatur sind keine RA-Bindungsstellen beschrieben, die K_D -Werte zwischen 10 und 15 nM besitzen. Dagegen sind allerdings CRABP-I und -II im Cytosol lokalisiert (Saari *et al.*, 1978; Ong & Chytil, 1975, 1978), so daß zumindest eine Bindungsstelle mit einem K_D -Wert von etwa 1 nM in der cytosolischen Fraktion hätte nachgewiesen werden müssen. Ähnlich verhält es sich mit der PKC, die eine relativ geringe Affinität zur RA besitzt und erst bei Konzentrationen von 500 nM bis 1 μ M RA bindet (Radomska-Pandya *et al.*, 2000). Diese potentiell im Cytosol nachweisbaren hochaffinen bzw. geringaffinen Bindungsstellen konnten mit dem verwendeten Test aufgrund der eingesetzten [3 H]RA-Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. Davon abgese-

hen spielten die für das Cytosol gewonnenen Daten für die weitere Auswertung nur eine untergeordnete Rolle. Eine auffällige Beobachtung bestand allerdings darin, daß die unspezifische Bindung in der cytosolischen Fraktion bei weniger als 10 % lag, während sie in der Membranfraktion im Bereich von 40 - 50 % lag. In einem Experiment mit einer extrahierten Membranfraktion lag die unspezifische Bindung im Bereich der niedrigen [^3H]RA-Konzentrationen (2 - 40 nM) bei lediglich 10 - 25 %, was auf eine Interaktion der RA mit den Membranlipiden schließen läßt. Sowohl RA als auch, in stärkerem Ausmaß, ROL sind in der Lage Lipiddoppelschichten durch Interkalation zu stören, wenngleich die Interaktion auch nicht sehr ausgeprägt ist (Ortiz *et al.*, 1992). Offensichtlich konnte ein Teil der markierten RA, die in die Membranen interkaliert war, durch die Kohleteilchen nicht entfernt werden.

Die Studien, die die Auswirkungen von RA auf die HC-Physiologie zum Inhalt hatten, wiesen Diskrepanzen im Hinblick auf den Einfluß des RA-Isomers 9-*cis*-RA und damit auf die Art der Bindungsstelle auf. In der Studie von Zhang & McMahon (2000) konnten RA und 9-*cis*-RA die GJIC zwischen isolierten HC-Paaren eines Streifenbarsch-Hybriden ähnlich effektiv inhibieren. Dies läßt den Schluß zu, daß jener RA-Effekt über eine RAR-ähnliche Bindungsstelle vermittelt wird, da RA-Rezeptoren ähnliche Affinitäten für beide Isomere besitzen, während Retinoid X-Rezeptoren ausschließlich bzw. mit sehr viel höherer Affinität 9-*cis*-RA binden (Heyman *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1992; Allenby *et al.*, 1993). Die hohe Effektivität der RAR β - und RAR γ -spezifischen Agonisten CD2314 und CD666 deutet ebenfalls auf eine RAR-ähnliche Bindungsstelle hin. In der Studie von Pottek und Weiler (2000) blieb 9-*cis*-RA ohne Effekt auf die GJIC und die rezeptiven Felder von HC-Somata des Karpfens, während 13-*cis*-RA ähnlich effektiv war wie RA. Dies könnte sowohl als Argument gegen eine RAR-ähnliche Bindungsstelle gedeutet werden, da RA-Rezeptoren RA und 9-*cis*-RA gegenüber 13-*cis*-RA zumindest leicht präferieren (Idres *et al.*, 2002), als auch gegen eine CRABP-ähnliche Bindungsstelle, da CRABP-I und -II ähnliche Affinitäten für 9-*cis*-RA und 13-*cis*-RA aufweisen bzw. 9-*cis*-RA sogar leicht präferieren (Fiorella & Napoli, 1991; Fiorella *et al.*, 1993; Norris *et al.*, 1994).

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin liegen, daß die Studien an verschiedenen Fischarten durchgeführt wurden, die leicht modifizierte bzw. vollkommen unterschiedliche Bindungsstellen enthalten könnten. Die Ergebnisse der pharmakologischen Analyse der Membran-Bindungsstelle der Karpfenretina bestätigten dann auch eher die Ergebnisse aus der Studie von Pottek und Weiler, da 13-*cis*-RA zwar eine geringere Affinität ($\text{IC}_{50} =$

2,8 μM) als RA ($\text{IC}_{50} = 93 \text{ nM}$) zur Bindungsstelle besaß, aber bei höheren Konzentrationen eine im Vergleich zu RA (58 %) ähnlich hohe bzw. höhere (63 %) maximale Inhibition der [^3H]RA-Bindung erzielte. Mit 9-*cis*-RA konnte auch bei hohen Konzentrationen nur eine maximale Inhibition von etwa 30 % beobachtet werden. Diese Daten, sowie die Fähigkeit von RAL die [^3H]RA-Bindung um mindestens 53 % inhibieren zu können, können als weiteres Argument gegen ein RAR- oder CRABP-ähnliche Bindungsstelle gedeutet werden, da bisher weder für RA-Rezeptoren noch für RA-Bindungsproteine eine RAL-Bindung mit vergleichbarer Pharmakologie nachgewiesen werden konnte. Für das Phänomen, daß unmarkierte RA bei hohen Konzentrationen die [^3H]RA-Bindung in der Membranfraktion zu fördern schien, statt sie zu inhibieren, liegt keine plausible Erklärung vor.

Auch bei den Inhibitionsstudien konnten mit der cytosolischen Fraktion sehr viel klarere Ergebnisse erzielt werden, so inhibierte unmarkierte RA die [^3H]RA-Bindung nahezu komplett, bei einem IC_{50} -Wert von 47 nM, der der eingesetzten Konzentration von [^3H]RA (40 nM) in etwa entsprach. Auch in der cytosolischen Fraktion war 13-*cis*-RA ein effektiverer Inhibitor der [^3H]RA-Bindung als 9-*cis*-RA. Sehr ungewöhnlich war die Beobachtung, daß RAL die [^3H]RA-Bindung sowohl an die Membran- als auch an die cytosolische Bindungsstelle effektiv inhibieren konnte. Kein bekanntes RA-bindendes Protein besitzt vergleichbare Affinitäten zu den RA-Isomeren und zu RAL. In einer einzigen Studie wurde beschrieben, daß ROL an RA-Rezeptoren aus menschlichen Neuroblastoma-Zellen band, allerdings war ROL ein 35-fach schwächerer Inhibitor der [^3H]RA-Bindung als RA; RAL war in jener Studie ein 500-fach schwächerer Inhibitor (Repa *et al.*, 1993). Sowohl die cytosolische als auch die Membran-Bindungsstelle könnten demnach völlig neuartige bis dato unbeschriebene Bindungsstellen sein. Interessanterweise führt ein Aminosäureaustausch (Q108R) im CRBP der Ratte dazu, daß das Protein eine dreifach geringere Affinität zum ROL erhält, dafür aber mit vergleichbarer Affinität RA, 13-*cis*-RA und RAL bindet (Stump *et al.*, 1991), so daß also nicht ausgeschlossen ist, daß ein RA-bindendes Protein existiert, dessen RA-Bindung sowohl durch 13-*cis*-RA als auch durch RAL inhibiert werden kann. Ein Austausch einer der beiden oder beider für die RA-Bindung wichtigen Arginin-Reste (R111Q bzw. R131Q) im CRABP reduziert zwar dessen Affinität zu RA, ermöglicht aber nicht die Bindung von ROL (Zhang *et al.*, 1992).

4.2 RA-bindende Proteine in der Retina

Der Nachweis RA-bindender Proteine wurde mit einer modifizierten Photoaffinitäts-Markierungsmethode nach Bernstein *et al.* (1995) durchgeführt. Dabei wird die an die jeweilige Bindungsstelle gebundene RA durch Bestrahlung mit UV-Licht aktiviert, mit der Folge, daß sie eine kovalente Bindung mit dem entsprechenden Protein ausbildet. Die Entfernung ungebundener markierter RA erfolgte durch eine Fällung des Proteins mit Aceton. Die markierten Proteine wurden dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Wie beim Bindungstest wurden verschiedene unmarkierte Liganden eingesetzt, um die Spezifität bzw. die Pharmakologie der Interaktionen zu überprüfen.

Verschiedene Proteine wurden auf diese Weise sowohl in der solubilisierten Membranfraktion als auch in der cytosolischen Fraktion markiert. In der Membranfraktion wurden vier Proteine (31 kDa, 39 kDa, 76 -78 kDa und ~120 kDa) besonders intensiv, vier weitere deutlich (34 kDa, 35 - 36 kDa, 41 kDa, 43 kDa) und weitere drei eher schwach markiert (23 kDa, 27 -28 kDa, 47 kDa, 55 kDa und 58 kDa). Im Cytosol wurden ein Protein (22,5 - 23 kDa) besonders deutlich, vier weitere deutlich (16 kDa, 52 kDa, 53-54 kDa und ~120 kDa) und zehn eher schwach bis ganz schwach markiert (25 - 50 kDa). Eine Verringerung der [³H]RA-Konzentration im Inkubationsansatz von ursprünglich 2 µM auf 40 nM hatte mit Ausnahme von Intensitätsverschiebungen keine signifikanten Auswirkungen auf das Bandenmuster im Autoradiogramm.

Aufgrund der näherungsweise bestimmten M_r -Werte kann natürlich keine Identifikation der markierten Proteine erfolgen. Gerade bei den schwach markierten Proteinen spielt womöglich neben einer geringen Affinität auch unspezifische Bindung eine Rolle, da unspezifische Bindung besonders in komplexen Fraktionen, wie sie hier verwendet wurden, ein Problem darstellt (Bayley & Knowles, 1977). In der cytosolischen Fraktion der Rinderretina wurden mit dieser Methode drei Proteine markiert (16 kDa, 23 kDa und 55 kDa), wobei es sich bei dem 16 kDa-Protein um CRABP handelte, während über die Identität der beiden anderen Proteine Unklarheit herrscht (Bernstein *et al.*, 1995). Bei dem cytosolischen 16 kDa-Protein in der Karpfenretina könnte es sich daher ebenfalls um eine CRABP-Isoform handeln. In der Membranfraktion der Rinderretina wurden vor allem ein 23 kDa- und ein 35 kDa-Protein markiert, deren Identität ebenfalls unklar ist (Bernstein *et al.*, 1995). Immerhin wurden alle von Bernstein *et al.* (1995) in der Rinderretina nachgewiesenen RA-bindenden Proteine auch in der

Karpfenretina markiert, zumindest im Hinblick auf die Existenz RA-bindender Proteine mit entsprechenden Molekulargewichten.

In der mitochondrialen Fraktion des Rinderherzens wurde ein 31 kDa-Protein (ANT) mit [3 H]RA markiert (Notario *et al.*, 2003). Eine ANT könnte daher auch für die 31 kDa-Bande in der Membranfraktion der Karpfenretina verantwortlich sein, allerdings zeigte die Herz-ANT nur eine geringe Affinität zur RA, da sie erst mit 3 μ M [3 H]RA schwach markiert wurde, während das 31 kDa-Protein in der Retina schon mit 40 nM deutlich markiert wurde. Eine naheliegende Vermutung könnte darin bestehen, daß RA metabolisierende Enzyme durch die Photoaffinitätsmethode markiert werden. Die RA-4-hydroxylase, ein mikrosomales CYP26-Enzym, die laut Datenbankanalyse im Zebrafisch ein M_r von etwa 56 kDa besitzt, könnte für die 55 kDa-Bande in der Membranfraktion verantwortlich sein. Auch eine UDP-Glukuronosyltransferase (UGT) der Rattenleber wurde mit [3 H]RA markiert (Little & Radominska, 1997) und könnte für die 55 kDa-Bande verantwortlich sein. Allerdings ist bisher noch keine UGT-Aktivität in der Retina irgendeiner Spezies beschrieben worden, lediglich in der Cornea des Kaninchens (Watkins *et al.*, 1991). Auch eine RALDH könnte markiert worden sein. Die RALDH-1 der Hühnerretina besitzt ein M_r von etwa 55 kDa (Mey *et al.*, 2001), so daß es sich bei der cytosolischen 53 - 54 kDa-Bande um eine RALDH handeln könnte.

Einige markierte Proteine zeigten in bezug auf ihr M_r Ähnlichkeiten mit Proteinen, die in bestimmten Zell-Linien bzw. Zelltypen retinoyliert werden. Funktion und Zustandekommen von Retinoylierungen sind immer noch nicht genau bekannt, dennoch liegt die Vermutung nahe, daß RA eine gewisse ‚Paßform‘ für die retinoylierten Proteine besitzt und daß die retinoylierten Proteine eine gewisse Affinität zur RA aufweisen. In HL-60 (*human myeloid leukemia*)-Zellen stellt Vimentin das Hauptzielprotein für Retinoylierungen dar (Takahashi & Breitman, 1994). Vor dem Hintergrund, daß ein Zebrafisch-Vimentin ein theoretisches M_r von 52,5 kDa besitzt, könnte es sich beim markierten cytosolischen 52 kDa-Protein um das Karpfen-Vimentin handeln. Ebenfalls in HL-60-Zellen werden zwei Proteine retinoyliert (47 kDa und 51 kDa), die in 2D-Gelen mit RI α und RII α komigrieren (Takahashi *et al.*, 1991), den regulatorischen Untereinheiten der Typ I- und Typ II-Proteinkinase A. Bei dem 46 kDa-Protein im Cytosol bzw. dem 47 kDa-Protein in der Membran (oder bei beiden) könnte es sich demnach um eine regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A handeln. Myhre *et al.* (1996) beschrieben die Retinoylierung eines 16 kDa-Proteins in einer Leber- und einer Nierenfraktion der Ratte, ohne allerdings eine genaue Identifizierung des Proteins vorzunehmen.

Zhang & McMahon (2000) postulierten in ihrer Studie, daß RA entweder an ein Protein in unmittelbarer Nähe der *Gap junction*-Proteine oder direkt an die Connexine bindet und dadurch eine Verringerung der Öffnungswahrscheinlichkeiten der Kanäle induziert, da ihr entkoppelnder Effekt unabhängig von cytosolischen Faktoren erfolgt. Bisher gibt es allerdings noch keine Studie, die eine RA-Bindung durch Connexine nachweisen konnte bzw. zum Inhalt hatte. Ein Vergleich der Molekulargewichte der bisher in der Fischretina nachgewiesenen Connexine und der in der Membranfraktion markierten Proteine eröffnet die Möglichkeit, daß es sich bei dem 55 kDa-Protein um ein Karpfen-Homolog des Zebrafisch-Cx55,5 handeln könnte (Dermietzel *et al.*, 2000). Bei dem 35 - 36 kDa-Protein könnte es sich um ein Karpfen-Homolog von Cx35 (O'Brien *et al.*, 1996) handeln, während sich das Karpfen-Homolog von Cx27.5 (Dermietzel *et al.*, 2000) hinter der 27 - 28 kDa-Bande verbergen könnte. Die 43 kDa-Bande könnte schließlich das Karpfen-Cx43 (Dermietzel *et al.*, 2000) repräsentieren, dessen Beteiligung an HC-*Gap junctions* diskutiert wird (Janssen-Bienhold *et al.*, 2001).

Die Analyse der Pharmakologie der [³H]RA-Bindung an die Proteine sollte die Zuordnungsmöglichkeiten bestimmter Proteine einschränken bzw. genauere Hinweise auf die Identität der markierten Proteine und die Spezifität der Markierung liefern. Doch nicht nur in bezug auf die Anzahl der Bindungsstellen sondern auch in bezug auf die Pharmakologie der Bindung zeigten die Ergebnisse der Photoaffinitätsmethode und des *Charcoal*-Tests z.T. erhebliche Unterschiede. Der gravierendste Unterschied bestand darin, daß alle getesteten ‚Inhibitoren‘ (RA, 9-*cis*-RA, 13-*cis*-RA, RAL und ROL) erst bei einem 10⁴-fachen Überschuß eine deutliche Inhibition der [³H]RA-Bindung in der cytosolischen Fraktion bewirkten. Lediglich die Bindung an das 22,5 - 23 kDa-Protein konnte mit geringeren Konzentrationen inhibiert werden, wobei das Protein keine deutliche Präferenz für einen der Inhibitoren zeigte. Auch in der Membranfraktion war die Bindung an das 23 kDa-Protein am leichtesten zu inhibieren, ohne daß es Unterschiede zwischen der Wirksamkeit der Inhibitoren gab. In bezug auf die Bindung an die übrigen Membranproteine konnten für die Inhibitoren RA und 13-*cis*-RA ähnliche Beobachtungen gemacht werden wie im *Charcoal*-Test. Die einzige Ausnahme ergab sich für den 10⁴-fachen Überschuß an unmarkierter RA, der beim *Charcoal*-Test eine enorme Verstärkung der [³H]RA-Bindung zur Folge hatte, während er beim Markierungsversuch die stärkste inhibitorische Wirkung entfaltete.

Für alle diese pharmakologischen Befunde gibt es keine plausiblen Erklärungen. Offensichtlich scheint die Photoaffinitätsmethode trotz der Befunde von Bernstein *et al.* (1995) für kom-

komplexe Fraktionen nicht gut geeignet zu sein. In den meisten der jüngeren Studien wurde diese Methode daher auch mit aufgereinigten Proteinen (Chen & Radomska-Pandya, 2000; Radomska-Pandya *et al.*, 2000, 2001; Radomska-Pandya & Chen, 2002; Tomás *et al.*, 2002) bzw. mit einzelnen Proteindomänen (Rengarajan *et al.*, 2001) durchgeführt. Experimente mit aus Membranfraktionen gewonnenen PGE-Fraktionen, die immerhin partiell aufgereinigte Proteine enthielten, zeigten daher auch im Hinblick auf die Inhibierbarkeit der [³H]RA-Bindung bessere Ergebnisse. Von zwei getesteten PGE-Fraktionen enthielt eine Proteine im M_r-Bereich von 44 - 45 kDa, die weder anti-RAR α -immunoreaktiv waren noch RA banden, und die andere Proteine im M_r-Bereich von 41 - 43 kDa, in der sowohl eine anti-RAR α -immunoreaktive Komponente als auch ein RA-bindendes Protein jeweils mit einem M_r von etwa 43 kDa enthalten war. Die [³H]RA-Bindung in der Fraktion konnte durch einen 10²-fachen Überschuß an unmarkierter RA zu etwa 60 % inhibiert werden (densitometrische Analyse), und auch eine Präinkubation mit dem RAR α -Antikörper führte zu einer signifikanten Inhibition der Bindung (30 - 40 %). Dies offenbarte einerseits einen möglichen Kandidaten für die Vermittlung der RA-Effekte auf die HC-Kopplung, da in diesem Protein die Interaktion mit einem RAR-Antikörper und mit RA zusammenliefen, und zeigte andererseits die bevorzugte Eignung von aufgereinigten bzw. partiell isolierten Proteinen für die Photoaffinitätsmethode, da Inhibitionseffekte bei einzelnen Proteinen besser dargestellt werden können.

4.3 Anti-RAR α -immunoreaktive Proteine in der Retina

4.3.1 Lokalisation der anti-RAR α -ir Proteine in der Retina

Da der entkoppelnde Effekt von RA auf isolierte HC-Paare in der Fischretina über eine RAR-ähnliche Bindungsstelle vermittelt wird (Zhang & McMahon, 2000), wurden mittels verschiedener immunochemischer Methoden einschließlich Elektronenmikroskopie und unter Verwendung verschiedener Retinoidrezeptor-spezifischer Antikörper die Verteilung Retinoidrezeptor-ähnlicher Proteine in der Karpfenretina untersucht. Der Schwerpunkt der Betrachtung lag dabei in der distalen INL und der OPL, wo die HC-Somata und -Dendriten und die sie kopplenden *Gap junctions* lokalisiert sind. Lediglich mit dem Antikörper, der spezifisch gegen die C-terminale Domäne des RAR α 1 des Menschen (Ser₄₄₃ - Pro₄₆₂) gerichtet ist, konnten immunoreaktive Komponenten im Bereich der distalen INL und der OPL detektiert werden. Im Querschnitt der Retina wurde in der INL eine diffuse Markierung der in den äußerst distalen Schichten gelegenen Horizontalzellen beobachtet, während sich entlang der OPL ein deutlich punktiertes aggregatartiges Markierungsmuster beobachten ließ. Daneben wurden auch Photorezeptor-Außensegmente markiert.

Mehrere Beobachtungen deuten darauf hin, daß sowohl die anti-RAR α -IR in der distalen INL als auch die in der OPL auf Horizontalzellen begrenzt ist. So wiesen dissoziierte Bipolarzellen kein anti-RAR α -IR auf, während dissoziierte Horizontalzellen sowohl im bzw. um den Kern herum als auch an den Dendritenendigungen deutliche Markierungen zeigten und darüber hinaus ihre gesamte Oberfläche diffus markiert war. Kolokalisationsexperimente mit FRet 43, welches vor allem rot- und grünsensitive (Doppel-)Zapfen markiert (Larison & Bremiller, 1990), an isolierten Photorezeptoren zeigten vor allem eine deutliche Markierung der Außen-segmente und der *Pedicles* von FRet 43-markierten (Doppel-)Zapfen und etwas schwächer und seltener eine Markierung der Innensegmente. In Quer- und Tangentialschnitten der Retina konnte ebenfalls im Bereich der *Pedicles* eine Kolokalisation von anti-RAR α -IR mit anti-FRet 43-IR und mit anti-Calendrin-IR dergestalt beobachtet werden, daß die anti-RAR α -IR von den Markierungen durch die anderen Antikörper jeweils umhüllt wurde. Da auch Cal-dendrin postsynaptischer Bestandteil der Photorezeptorsynapsen in den terminalen Dendriten von Horizontalzellen ist (Schultz *et al.*, 2004), kann dies als weiterer Hinweis dafür angesehen werden, daß die anti-RAR α -IR in den *Pedicles* auf invaginierende HC-Dendriten zurück-geht. Auch auf ultrastruktureller Ebene ließen sich keine Hinweise für anti-RAR α -ir Kompo-nenten auf Photorezeptorseite oder auf BP-Dendriten innerhalb der *Pedicles* finden. Stattdes-sen waren invaginierende HC-Dendriten im äußerst distalen Bereich der *Pedicles* deutlich markiert. Seltener und schwächer waren die Ausläufer der HC-Dendriten in der Nähe der *Ribbon*-Synapsen im etwas weniger distalen Bereich der *Pedicles* markiert.

Die anti-RAR α -IR war räumlich deutlich getrennt von der anti-GRIP-IR, was auf eine Be-schränkung der anti-RAR α -ir Proteine auf Zapfen-Horizontalzellen hindeutet, da GRIP (Glu-tamatrezeptor-interagierendes Protein) in der Karpfenretina nur in H4-Zellen lokalisiert wer-den kann (Garms, 2003). Sowohl die RA-Effekte auf die Physiologie von H1- und H2-Zellen (Potttek & Weiler, 2000, Zhang & McMahon, 2000), als auch die Kolokalisation mit FRet 43 in den *Pedicles* deuten auf anti-RAR α -IR in H1- und H2-Zellen hin, da nach dem Modell von Stell *et al.* (1975) für die HC-Verschaltungen in der Retina rot- und grünsensitive Doppelzap-fen präsynaptische Kontakte mit H1- und H2-Zellen ausbilden (Stell & Lightfoot, 1975; Stell *et al.*, 1975, 1982). Auch die Lage der diffus markierten Horizontalzellen in der äußerst dista-len INL deutet auf diese beiden Zelltypen hin. Allerdings kann die Existenz von anti-RAR α -ir Komponenten auch in H3-Zellen nicht ausgeschlossen werden, zumal nach dem Kamermans-Modell für HC-Verschaltungen in der Fischretina auch H3-Zellen mit grün- und rotsensitiven Zapfen synaptische Kontakte ausbilden (Kamermans *et al.*, 1991)

Auch die Photorezeptor-Außensegmente der menschlichen sowie der Rinder- und Rattenretina zeigen anti-RAR α -IR (Janssen *et al.*, 1999), aber das Vorhandensein irgendwelcher Komponenten des RA-Signalweges bzw. von Proteinen, die immunoreaktiv gegen entsprechende Antikörper sind, in Horizontalzellen ist ein neuer Befund. Die Effekte der RAR-Isoformenspezifischen Agonisten auf die HC-Kopplung lassen zwar auf eine RAR β,γ -ähnliche Bindungsstelle schließen (Zhang & McMahon, 2000), Hemikanalströme isolierter Horizontalzellen aber werden durch Applikation des RAR α -Antikörpers reduziert (McMahon, D, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, persönliche Mitteilung). Diese widersprüchlichen Daten in bezug auf den Isoformen-Charakter der RAR-ähnlichen Bindungsstelle stellen die Spezifität des RAR α -Antikörpers in Frage. Zumal Retinoidrezeptoren in der Regel ausschließlich im Kern lokalisiert sind (Katzenellenbogen & Katzenellenbogen, 1996). Auch eine kürzlich nachgewiesene Spleißvariante des menschlichen RAR α 1 ist im Kern von B-Lymphozyten lokalisiert, obgleich ihr die DBD fehlt (Parrado *et al.*, 2001). Zwar ist nicht auszuschließen, daß eine weitere Spleißvariante des Kernrezeptors existiert, der zusätzlich die Kernlokalisationssequenz fehlt, und die mittels spezifischer Interaktionsdomänen von entsprechenden Transportproteinen zur Plasmamembran transportiert werden kann. Aber ebenso gut könnte der Antikörper ein Epitop auf einem HC-spezifischen Membranprotein erkennen, das gar nicht mit den Retinoidrezeptoren verwandt ist.

Nicht eindeutig kann auch die Frage nach der Lage des vom Antikörper erkannten Epitops beantwortet werden. Das anti-RAR α -IR-Muster im Querschnitt war davon abhängig, ob die Inkubation mit dem Antikörper in Gegenwart oder Abwesenheit von TX-100 erfolgte. In Gegenwart von TX-100 war die punktierte Markierung in der OPL besonders intensiv, während die diffuse Markierung der Horizontalzellen stark abgeschwächt war. In Abwesenheit von TX-100 ergab sich ein entgegengesetztes Bild. Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß das Epitop in den *Pedicles* intrazellulär lokalisiert ist. Physiologisch erzielte RA allerdings nur Effekte, wenn sie extern appliziert wurde, über Dialyse in die Zellen injiziert verblieb sie ohne Effekt (Zhang & McMahon, 2000). Auch die Inhibition des Hemikanalstroms von isolierten Horizontalzellen erfolgte mit dem extern applizierten Antikörper (s.o.). Dies kann nur so gedeutet werden, daß das Epitop extrazellulär innerhalb einer sehr kompakten Struktur liegt, die in der *in situ*-Situation nicht vom Antikörper erreicht werden kann und die erst in Gegenwart von TX-100 bzw. nach Dissoziation der Horizontalzellen für den Antikörper erreichbar wird. Auch die *Pedicles* dissoziierter Photorezeptoren wurden nur in Gegenwart von TX-100 markiert. Der einzige bisweilen zu beobachtende Unterschied zwischen hell- und

dunkeladaptierten Retinen zeigte sich ebenfalls nur bei einem Vergleich zwischen TX-100-positiven und TX-100-negativen Inkubationen. Die Markierung der Photorezeptor-Außensegmente in dunkeladaptierten Retinen war in Abwesenheit von TX-100 im Vergleich zu den helladaptierten Retinen stark verringert. Im Bereich der distalen INL und der OPL zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen hell- und dunkeladaptierten Retinen.

4.3.2 Charakterisierung der anti-RAR α -immunoreaktiven Proteine

Mittels des RAR α -Antikörpers wurde die Verteilung der RAR α -ir Proteine in verschiedenen Fraktionen der Karpfenretina analysiert. Zum Vergleich wurden auch retinale und Gehirnfractionen von Maus und Ratte untersucht. Der Antikörper erkannte drei Karpfen-spezifische immunoreaktive Proteine im M_r -Bereich von 40 kDa, 43 kDa und 46 kDa. Nach Expression in HeLa-Zellen erkennt der Antikörper in Kernfraktionen der entsprechenden HeLa-Zellen ein Protein im M_r -Bereich von ~ 60 kDa (Herstellerangaben). Ein 58 kDa-Protein konnte in einer Kernfraktion des Rattenhirns sowie im Totalhomogenat sowohl der Ratten- als auch der Mäuseretina und sogar in einer Membranfraktion der Mäuseretina nachgewiesen werden. Bei diesem Protein handelt es sich vermutlich um den Kernrezeptor RAR α , gegen den der Antikörper gerichtet ist, und der, auf mRNA-Ebene, im Gehirn sowohl der Ratte als auch der Maus exprimiert wird (Zetterström *et al.*, 2004). In der Membranfraktion des Rattenhirns konnte dieses Protein nicht detektiert werden. Aufgrund der für diesen Punkt nur spärlich vorliegenden Daten kann nicht geklärt werden, ob es sich bei dem 58 kDa-Protein in der Membranfraktion der Mäuseretina um einen an die Membran translozierten Kernrezeptor handelt, oder ob die Trennung zwischen Membran- und Kernfraktion der Mausretina nicht ausreichend gut erfolgte. In allen Fraktionen konnten weitere immunoreaktive Proteine im höheren M_r -Bereich nachgewiesen werden, allerdings zeigten diese nur sehr schwache Signale. Das 58 kDa-Protein konnte auch im Totalhomogenat sowie in der Membran- und Kernfraktion der Karpfenretina detektiert werden, allerdings war das immunoreaktive Signal sehr viel schwächer als bei Ratte und Maus und im Vergleich zu den 40 - 46 kDa-Proteinen.

Alle drei anti-RAR α -ir Proteine in der Karpfenretina waren in der Membranfraktion angereichert und im Cytosol und in der Kernfraktion nur in sehr geringem Umfang enthalten. Das 43 kDa- und 46 kDa-Protein zeigten in mehrerer Hinsicht ein ähnliches Verhalten, während sich das 40 kDa-Protein deutlich von den beiden unterschied. So zeigten sich bei den beiden größeren Proteinen keinerlei lichtadaptationsabhängige Unterschiede, während das 40 kDa-

Protein nach 40-minütiger Helladaptation nicht mehr detektiert werden konnte. Auch ein Dephosphorylierungsexperiment mit Alkaliner Phosphatase zeigte keine Auswirkungen auf die beiden größeren Proteine, während das 40 kDa-Protein nach einer Dephosphorylierung ein deutlich stärkeres Signal ergab. Bei dem 40 kDa-Protein könnte es sich demnach um ein Phosphoprotein handeln, das im Rahmen einer Helladaptation innerhalb des vom Antikörper erkannten Epitops phosphoryliert und daraufhin nicht mehr erkannt wird. In der Vertebratenretina ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen im Rahmen von Lichtadaptationsvorgängen ein weit verbreitetes Phänomen, eine ganze Reihe von Proteinen werden z.B. während der Helladaptation in Horizontalzellen phosphoryliert (Janssen-Bienhold *et al.*, 1993). Das 40 kDa-Protein konnte allerdings im Gegensatz zu den anderen beiden nicht in mit Horizontalzellen angereicherten Fraktionen nachgewiesen werden.

In bezug sowohl auf sein Phosphorylierungsverhalten während der Lichtadaptation als auch auf sein M_r gleicht das 40 kDa-Protein der unphosphorylierten Isoform von Cx43, dessen M_r mit dem in dieser Arbeit verwendeten Gelsystem ebenfalls mit 40 kDa bestimmt wurde (Schütte *et al.*, 2001). Eine weitere Übereinstimmung mit Cx43 zeigte das Protein in bezug auf sein Verhalten bei zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung, da Cx43 einen theoretischen pI von etwa 9 besitzt und somit in dem in dieser Arbeit verwendeten System nicht aufgetrennt werden könnte. Auch das 40 kDa-Protein konnte im Gegensatz zu den anderen beiden nach 2D-Auftrennung nicht mehr detektiert werden. Da jedoch Befunde dafür sprechen, daß Cx43 in Horizontalzellen exprimiert wird (Janssen-Bienhold *et al.*, 2001), scheint es sich bei dem 40 kDa-Protein nicht um Cx43 zu handeln. Und die Beobachtung, daß sich das anti-RAR α -IR-Muster im Querschnitt der Karpfenretina während der Helladaptation im Bereich der INL und der OPL nicht signifikant änderte, spricht gegen eine Beteiligung dieses Proteins an den RA-Effekten auf die HC-Physiologie.

Das 43 kDa- und das 46 kDa-Protein konnten mittels 2D-Gelelektrophorese in mehrere putative Isoformen im pI -Bereich von 5,3 - 5,6 aufgetrennt werden. Das 43 kDa-Protein konnte sogar aus einer PGE-Fraktion in die putativen Isoformen aufgetrennt werden. Auch bei dem 43 kDa-Protein kann es sich nicht um Cx43 handeln, da es durch Lichtadaptation bzw. Dephosphorylierung mit Alkaliner Phosphatase nicht modifiziert wird und da es einen für Connexine viel zu sauren pI aufweist. Außerdem folgten bei einer PGE, deren Fraktionen sowohl auf anti-Cx43-IR als auch auf anti-RAR α -IR getestet wurden, die anti-Cx43-ir Fraktionen auf die anti-RAR α -ir Fraktionen mit dem 43 kDa-Protein und zeigten dabei kaum Über-

schneidungen. Theoretisch könnte es sich bei den beiden Proteinen um Spleißisoformen des RAR α handeln. Zwar besitzen die meisten Retinoidrezeptoren isoelektrische Punkte im leicht basischen Bereich (7 - 8), aber ein Vergleich des RAR α 1 vom Menschen (Giguere *et al.*, 1987) und dessen Spleißvariante RAR α 1 Δ BC (Parrado *et al.*, 2001) zeigt, daß die kleinere Variante des Rezeptors nicht nur 11 kDa kleiner ist, sondern einen theoretischen *pI* von 6,12 aufweist gegenüber einem theoretischen *pI* von 8,21 seines großen Verwandten. Alternative Spleißvarianten könnten natürlich auch *pI*-Werte im Bereich von 5,5 und entsprechende Molekulargewichte aufweisen.

4.4 Identifikation des 43 kDa-Proteins

4.4.1 Das 43 kDa-Protein besitzt keine Homologie mit RA-Rezeptoren

Die Identität des membranassoziierten 43 kDa HC-Proteins, in dem RA-Bindungseigenschaft und anti-RAR α -IR zusammenzulaufen scheinen, wurde mittels einer massenspektroskopischen Methode, der MudPIT (*multidimensional protein identification technology*), bestimmt. Dazu wurde das Protein mittels 2D-Gelelektrophorese isoliert und anschließend in unspezifisch gefärbten Gelen durch einen Vergleich der 2D-Auftrennungsmuster mit einem Immunoblot identifiziert. Die Überlagerung verschiedener Gele mit einem Immunoblot deutete wiederholt auf ein ganz bestimmtes Protein in den unspezifisch gefärbten Gelen hin, welches daraufhin aus den entsprechenden Gelen ausgeschnitten und mittels MudPIT an der Universität Bochum analysiert wurde. Die dabei erhaltenen Peptidsequenzen besaßen ausschließlich Homologie mit dem Enzym Enolase, wobei die Sequenzen die größte Homologie zu dem putativen Zebrafisch-Protein MGC73056 (Akzessions-Nr.: BC059434.1) besaßen, welches seinerseits ein Homolog der α -Enolase der Säuger repräsentiert. Basierend auf der Nukleotidsequenz des Zebrafisch-Proteins wurden *Primer* für die kodierenden Bereiche von zwei der erhaltenen Sequenzen entwickelt. Das damit aus der Karpfenretina gewonnene Amplikon wurde sequenziert und mittels RACE-PCR verlängert, anschließend kloniert und schließlich sequenziert bis eine komplette Karpfen-Enolase-cDNA vom Start- bis zum Stop-Codon vorlag. Die daraus resultierende putative Karpfen-Enolase besaß auf Nukleotidebene 94 % Homologie zur putativen Zebrafisch-Enolase und etwa 81 % Homologie zur α -Enolase der Säuger. Auf Proteinebene betrug die Homologie 97 % zur Zebrafisch- und 89 % zur Säuger- α -Enolase. Das Karpfen-Protein besaß keine Homologie zu Retinoidrezeptoren oder zu CRABP-I und -II von Zebrafisch bzw. Säuger, wie eine Datenbankanalyse ergab. Da verschiedene 2D-Gele in der Regel keine exakt übereinstimmenden 2D-Auftrennungsmuster aufweisen, kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß die Protein-*Spots*, die infolge der

Überlagerung der Gele mit dem Blot in bezug auf ihre Lokalisation in den 2D-Mustern als miteinander korrelierend angesehen wurden, *de facto* nur benachbarte Protein-*Spots* waren, so daß die weitergehende Analyse mit einem nicht-anti-RAR α -ir Protein durchgeführt wurde.

Die fehlende Homologie des identifizierten Proteins mit RA-interagierenden Proteinen bestätigte die Ergebnisse des Bindungstests, die eine für die bisher bekannten RA-interagierenden Proteine ungewöhnliche Pharmakologie der Bindungsstelle ergaben und folglich auch keine Ähnlichkeit der Bindungsstellen nahelegten. Die Frage, ob die putative Enolase RA binden kann, läßt sich theoretisch nur schwer beantworten. Die Voraussetzung dafür wäre entweder ein gemeinsames Bindungsmotiv der bisher beschriebenen RA-bindenden Proteine oder eine offensichtliche Homologie einer Enolasedomäne mit einer Bindungsdomäne eines RA-bindenden Proteins. Ein Vergleich von RA-Bindungsdomänen verschiedener Proteine, die mit RA interagieren (RAR, CRABP, PKC α und UGT) ergibt eine Sequenz bestimmter Aminosäure-Seitenketten, die mehr oder weniger in allen Proteinen enthalten ist (Radomska-Pandya *et al.*, 2000). Diese Sequenz (xxRxxVxxxxWxR^x/xxxNDxxxxLxxxVxELxxxxVxx) läßt sich nicht in der Karpfen-Enolase wiederfinden. Sie besitzt allerdings auch keine Homologie zur ANT oder zum UCP1, welche ebenfalls RA binden (Tomás *et al.*, 2002; Notario *et al.*, 2003), und auch die bei Radomska-Pandya *et al.* verglichenen Sequenzen, speziell die der UGT und die CRABP-Sequenzen, weisen bei einzelnen Aminosäuren Abweichungen auf, so daß es sich bei dieser Sequenz nicht um eine klar definierte RA-Bindungssequenz handelt.

Verschiedene Proteine, die mit RA interagieren, zeigen in bezug auf ihre LBD deutliche Unterschiede. CRABP-I und -II zählen zu der Großfamilie der Lipid-bindenden Proteine, deren charakteristische Bindungstasche aus einem sogenannten β -barrel-Motiv besteht. Dabei umhüllen zwei orthogonale Faltblätter den Liganden, binden und stabilisieren ihn. Die Carboxylgruppe der RA interagiert in CRABP mit einer charakteristischen RYR-Triade (in CRABP-II: Arg₁₁₁, Tyr₁₃₄ und Arg₁₃₂), die sich in der Karpfen-Enolase nicht finden läßt. Das Ende des β -Iononringes hat Zugang zum umgebenden Medium, wodurch vermutlich die RA-Übergabe an Rezeptoren oder an metabolisierende Enzyme ermöglicht wird (Jones *et al.*, 1988; Kleywegt *et al.*, 1994; Newcomer, 1995; Chen *et al.*, 1995; Chaudhuri *et al.*, 1999). Auch beim extrazellulären epididymalen RABP (ERABP) wird die Bindungstasche durch ein β -barrel gebildet. Hier befindet sich der β -Iononring allerdings am tiefsten innerhalb des *barrels* und die Isoprenkette von *all trans*-RA ist so ‚gefaltet‘, daß sie eine 8-*cis*-ähnliche Konfiguration einnimmt (Newcomer, 1993, 1995; Pattanayek & Newcomer, 1999). ERABP bindet

daher auch im Gegensatz zu CRABP keine am β -Iononring modifizierten RA-Derivate (Ong & Chytil, 1988). In der charakteristischen LBD der Retinoidrezeptoren liegt RA innerhalb eines antiparallelen α -helikalen ‚Sandwiches‘ gebunden vor. Die je nach Retinoidrezeptor beteiligten 11 - 12 Helices bilden dabei eine dreischichtige Struktur (Renaud *et al.*, 1995; Bourguet *et al.*, 1995). Die unterschiedlichen Präferenzen der verschiedenen Isoformen gehen auf einzelne Aminosäureaustausche innerhalb dieser LBD zurück, von besonderer Bedeutung sind dabei einzelne Arg- und Lys-Reste (Klaholz *et al.*, 1998; Tate & Grippo, 1995; Lamour *et al.*, 1996; Keidel *et al.*, 1997; Scafonas *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998). CYP2C8, ein Enzym, das am RA-Metabolismus beteiligt ist (Marill *et al.*, 2000), besitzt ebenfalls eine Bindungsstelle, die hauptsächlich von Helices gebildet wird, die aber im peripheren Bereich des Proteins liegt, da das Protein nach Inkubation mit Palmitinsäure als Dimer mit zwei Palmitinsäuremolekülen im Dimer-*Interface* kristallisiert (Schoch *et al.*, 2004). Diese Realisierung verschiedener RA-Bindungsmotive läßt die Möglichkeit offen, daß die putative Karpfen-Enolase trotz des Fehlens bekannter RA-Bindungsmotive dennoch in der Lage sein könnte, RA zu binden.

Die Enolase als putativer Membran-assoziiertes (m) RA-Rezeptor bzw. als putatives Membran-assoziiertes RABP ist nicht verwandt mit den intrazellulären (i) mit RA-interagierenden Proteinen. Auch bei den anderen Mitgliedern der Kernrezeptor-Großfamilie herrscht Unklarheit über die Verwandtschaft zwischen den Membranbindungsstellen und den entsprechenden intrazellulären Rezeptoren. Obschon vor über 30 Jahren membrangebundene Steroidhormonbindungsstellen beschrieben wurden (Blyth *et al.*, 1971), wurde erst ein membrangebundener Rezeptor bzw. eine Familie von membrangebundenen Rezeptoren identifiziert (Thomas *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003a, b). Diese Familie membrangebundener Progesteronrezeptoren ist nicht verwandt mit den intrazellulären, sondern zeigt stattdessen Charakteristika von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Zhu *et al.*, 2003b). Darüber hinaus ist der Verwandtschaftsgrad der beschriebenen membrangebundenen Steroidhormonrezeptoren bzw. -Bindungsstellen mit den entsprechenden intrazellulären relativ unklar. Der synthetische Ligand Diphenylacrylamid z.B., der nicht an iER α und iER β bindet, ahmte dennoch den Einfluß von E₂ auf die G-Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C in hypothalamischen Neuronen u.a. der Maus nach (Qiu *et al.*, 2003). Diese Beobachtung deutet zumindest auf Unterschiede zwischen beiden Rezeptoren hin. Mittels eines gegen die LBD des iER gerichteten Antikörpers konnten in Uterus-Membranen des Kaninchens zusätzlich zu einem Protein mit dem M_r des iER immunoreaktive Proteine mit geringeren Molekulargewichten nachgewiesen werden. Der

Antikörper inhibierte auch die [^3H]E₂-Bindung in der mikrosomalen Fraktion des Uterus (Monje & Boland, 1999). Dieser Befund läßt mehrere Deutungen zu, da nicht geklärt wurde, welche der immunoreaktiven Komponenten für die E₂-Effekte über die Membran verantwortlich waren. Die Transfektion von iER α bzw. iER β in CHO-Zellen hatte jeweils die Expression nur eines mRNA-Transkriptes zur Folge, aber von den exprimierten Rezeptoren translozierten jeweils 2 - 3 % in bzw. an die Membran und aktivierten dort G-Proteine (Razandi *et al.*, 1999). In menschlichen Endothelzellen ließ sich mittels eines Antikörpers gegen die LBD des iPR ein membrangebundenes PR-ähnliches Protein nachweisen, das durch einen Antikörper gegen die DBD des iPR nicht erkannt wurde (Welter *et al.*, 2003). Dies könnte dahingehend gedeutet werden, daß es sich bei dem mPR um eine Spleißisoform des iPR handelt. Es scheint also im Hinblick auf ihre Verwandtschaft zu den entsprechenden Kernrezeptoren eine gewisse Vielfalt bei den Membran-assoziierten Steroidhormonrezeptoren bzw. -Bindungsstellen zu geben.

4.4.2 Die Enolase als multifunktionelles Protein

Die Enolase war lange Zeit ausschließlich dafür bekannt, ein Schlüsselenzym der Glykolyse darzustellen (Übersicht in: Wold, 1971), wobei das α -Enolase-Gen kein ‚house-keeping‘-Gen ist, da seine Expression - zumindest in der Hefe - mit dem pathophysiologischen, metabolischen und Entwicklungszustand der Zelle variiert (McAlister & Holland, 1982). Die Enolase (2-Phospho-*D*-glycerathydrolase, E.C. 4.2.1.11) ist ein Metalloenzym, welches die Dehydrierung von 2-Phospho-*D*-glycerat in Phosphoenolpyruvat und im Zuge der Glukoneogenese die umgekehrte Reaktion katalysiert. Es gibt drei Isoformen der Enolase (α , β und γ), die jeweils durch ein eigenes Gen kodiert werden. Die α -Enolase, die die größte Homologie zu dem in dieser Arbeit identifizierten Protein aufweist, zeigt eine nahezu ubiquitäre Verteilung im Organismus und wird daher im Vergleich zur Neuronen-spezifischen γ -Enolase als nichtneuronale Enolase (NNE) bezeichnet. In aktiver Form liegt die Enolase als Dimer vor.

Verschiedene Publikationen der zurückliegenden Jahre zeigen, daß es sich bei der α -Enolase um ein multifunktionelles Protein handelt (Übersichtsartikel: Pancholi, 2001). In diesem Punkt ähnelt die Enolase einem anderen Glykolyseenzym, der GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase, E.C. 1.2.1.12), welche eine Rolle bei so unterschiedlichen Prozessen wie der Membranfusion, der Phosphorylierung, dem RNA-Export aus dem Kern, der DNA-Replikation und -Reparatur und weiteren Prozessen spielt (Übersichtsartikel: Sirover, 1999). Die α -Enolase besitzt z.B. hohe Homologie zum *c-myc*-Promoter-bindenden Protein 1

(MBP-1; 37 kDa). Die Expression des α -Enolase-Gens in verschiedenen Zelllinien führt lediglich zu einem mRNA-Transkript, aus dem aber durch alternative Initiation der Translation zwei Proteine entstehen, von denen das kleinere (37 kDa) in der Lage ist, an den *c-myc* P2-Promotor zu binden und die Transkription des Protoonkogens zu inhibieren. Die α -Enolase spielt damit als Transkriptionsfaktor im Kern eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung (Feo *et al.*, 2000; Subramanian & Miller, 2000). Auch das Strukturprotein τ -Kristallin entsteht aus einem α -Enolase-mRNA-Transkript, besitzt in der Linse allerdings nur noch 5 % der Enolase-Aktivität in anderen Geweben (Wistow & Piatigorsky, 1987; Wistow *et al.*, 1988). α -Enolase fungiert auch als Stressprotein in Endothelzellen (Aaronson *et al.*, 1995) und spielt eine Rolle bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten, z.B. beim CAR (Krebs-assoziierte Retinopathie)-Syndrom (Adamus *et al.*, 1996). Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessanteste Funktion der α -Enolase besteht in ihrer Funktion als Plasminogen-Rezeptor in der Plasmamembran verschiedener Zellen, u.a. auch in Neuronen der Ratte (Miles *et al.*, 1991; Dudani *et al.*, 1993; Nakajima *et al.*, 1994; Redlitz *et al.*, 1995; López-Alemany *et al.*, 2003).

Die α -Enolase ist neben der γ -Enolase auch in synaptischen Plasmamembranen des Rattenhirns lokalisiert (Lim *et al.*, 1983; Ueta *et al.*, 2004), allerdings herrscht Unklarheit über die dortige Funktion der Enolase. Ungeklärt ist auch, wie die Enolase zur Plasmamembran gelangt, da sie nicht über die klassische Transportmaschinerie verfügt (Pancholi, 2001). Es wird spekuliert, daß posttranslationale Acylierungen und / oder Phosphorylierungen eine Rolle spielen könnten (Pancholi, 2001). Eine Datenbankanalyse (ELM) mit der Karpfen-Enolase hat die Existenz einiger potentieller Erkennungssequenzen von Klasse III-PDZ (PSD-95/SAP90 / Dlg / ZO-1-Homologie)- sowie einiger SH2 (Src-Homologie 2)- und SH3 (Src-Homologie 3)-Domänen ergeben. Über eine solche PDZ-Erkennungssequenz gelangt z.B. die N-methyl-D-aspartat-Rezeptor 2 β -Untereinheit zu den postsynaptischen *Terminals* neuronaler Dendriten oder der Mannose-6-phosphat-Rezeptor vom *trans*-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran (Nakagawa *et al.*, 2000; Setou *et al.*, 2000). Allerdings liegt keine der PDZ-Erkennungssequenzen am C-Terminus der Enolase, was z.B. für eine mögliche Spleißisoform nicht gelten muß. Die unterschiedlichen Funktionen und Lokalisationen der Enolase könnten also zusammenfassend das Ergebnis alternativer Initiationen der Proteintranslation sowie möglicherweise alternativen Spleißens des RNA-Transkripts einerseits und spezifischer Interaktionen dieser Enolase-, Isoformen' mit den jeweiligen zelltypspezifischen Proteinen andererseits darstellen. Unerklärlich bleibt momentan, aus welchem Grund die Enolase in der

Karpfenretina ausschließlich in HC-Membranen, und dort vor allem in den dendritischen Endigungen, und in den Membranen der Photorezeptor-Außensegmente enthalten sein soll. Auch kann mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden, auf welche Weise eine direkte oder indirekte Interaktion der Enolase mit den Connexinen erfolgen könnte.

Ein weiteres Problem besteht in der Erklärung der Kreuzreaktion der Karpfen-Enolase mit dem RAR α -Antikörper. Die Sequenz des zur Immunisierung eingesetzten Peptids zeigt keine nennenswerte Homologie mit irgendeiner Teilsequenz der Karpfen-Enolase. Innerhalb eines Sequenzabschnitts von 11 Aminosäuren (²⁶³SPDDPSRYISP²⁷³) lassen sich sechs Aminosäuren (SP_{DD}PS_{RYI}SP) mit dem Peptid einigermaßen in Einklang bringen, allerdings befinden sich auf dem Peptid zwischen den SP-Kombinationen 3 und 4 statt 2 und 3 Aminosäurereste (SP_{SLS}PS_{SNRS}SP), so daß es sich hier um eine eher schwache Erkennungssequenz handeln würde. Interessanterweise befindet sich das α -Enolase-Epitop ²⁵⁷DLDFKSPDDPSRYISP²⁷², das bei der Plasminogenbindung durch die Enolase in Neutrophilen und Monozyten eine Rolle spielt, in jenen Zellen an der Zelloberfläche (Miles *et al.*, 1991; Arza *et al.*, 1997), was wiederum gut zu den persönlich übermittelten Daten von McMahon passen würde, nach denen der extern applizierte RAR α -Antikörper Hemikanalströme von isolierten Horizontalzellen reduzierte. Sollte der RAR α -Antikörper tatsächlich mit der Enolase interagieren, so stellt sich die Frage, wieso in der Maus- oder Rattenretina kein entsprechendes Protein detektiert wird, da die Enolase-Sequenzen relativ hohe Homologie zeigen.

5 Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit der Anpassung der Lichtsensitivität der Retina an die jeweils herrschenden umgebenden Lichtverhältnisse erfolgen in der Vertebratenretina eine Vielzahl von Prozessen, in deren Verlauf die Physiologie und Morphologie der einzelnen retinalen Zellen modifiziert werden. Auf diese Weise kann die Retina einen dynamischen Arbeitsbereich innerhalb eines relativ kleinen Lichtintensitätsspektrums erhalten und dennoch innerhalb eines ungleich größeren Lichtintensitätsspektrums Informationen verarbeiten. Ausgelöst werden diese Prozesse durch neuromodulatorische Substanzen, deren Ausschüttung bzw. Synthese sinnvollerweise lichtkorreliert erfolgt. Einige dieser Modulatoren und deren Signalwege sind schon relativ gut beschrieben. So wird der Neuromodulator Dopamin z.B. infolge eines Lichtsignals von Amakrinzellen oder Interplexiformen Zellen ausgeschüttet und bindet dann an entsprechende Rezeptoren auf den Zielzellen, was zu einer Aktivierung einer bekannten Signalkaskade und schließlich zur Phosphorylierung bestimmter Proteine in den Zielzellen durch die Proteinkinase A führt. Andere Substanzen werden bisher nur als potentielle Neuromodulatoren diskutiert, da sie zwar bestimmte physiologische bzw. morphologische Prozesse, die im Zusammenhang mit der Lichtadaptation stehen, auszulösen vermögen, aber deren Wirkmechanismen nur ansatzweise oder gar nicht entschlüsselt sind.

Einer dieser potentiellen Neuromodulatoren ist die RA, die in der Vertebratenretina lichtkorreliert synthetisiert wird, und die sich aus dem Grunde in besonderer Weise als Lichtsignalvermittelnder Neuromodulator anbietet. In der Fischretina beeinflusst RA die Physiologie und Morphologie vor allem eines Zelltyps, der Horizontalzelle. RA induziert dabei in den Horizontalzellen ausnahmslos adaptative Änderungen, die auch im Zusammenhang mit einer kontinuierlichen Belichtung erfolgen, z.B. die Bildung von *Spinules*. Besonders gut untersucht ist der entkoppelnde Einfluß von RA auf Zapfen-Horizontalzellen, der über eine externe Bindungsstelle vermittelt und ohne die Beteiligung cytoplasmatischer Faktoren ausgeübt wird. Aber selbst dort ist, wie auch bei den anderen durch RA induzierten Effekten, relativ unklar, über welchen Mechanismus der RA-Einfluß vermittelt wird. In dieser Arbeit sollte daher mindestens eine Membranbindungsstelle charakterisiert und identifiziert werden, über die RA ihren neuromodulatorischen Einfluß ausüben kann, und somit weitere Hinweise für die These geliefert werden, daß RA eine neuromodulatorische Rolle in der Vertebratenretina spielt.

Zu diesem Zweck wurde zum einen ein Bindungstest entwickelt, mit dem, zusammen mit einer Photoaffinitäts-Markierungsmethode, die Bindung radioaktiv markierter RA an Membranproteine untersucht und eine partielle Charakterisierung der RA-bindenden Proteine vorgenommen wurde. Zum anderen wurden mittels eines RA-Rezeptor-spezifischen Antikörpers RAR-ähnliche Proteine in der Karpfenretina lokalisiert und charakterisiert, da der entkoppelnde Effekt der RA auf Horizontalzellen über eine RAR-ähnliche Bindungsstelle erfolgt.

Mit dem Bindungstest konnte lediglich eine Membranbindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich ($K_D = 36 \text{ nM}$) nachgewiesen werden, deren Pharmakologie sich von der der Retinoidrezeptoren und der zellulären RA-bindenden Proteinen signifikant unterschied. Mit der Photoaffinitäts-Markierungsmethode wurden dagegen verschiedene Membranproteine markiert. Eine pharmakologische Spezifität dieser Membranproteine bzw. ihrer Bindungsstellen konnte mit der Photoaffinitätsmethode allerdings nicht ermittelt werden. In einer PGE-Fraktion, die ein von einem RAR α -Antikörper erkanntes 43 kDa-Protein enthielt, konnte einerseits die Bindung Tritium-markierter RA an ein 43 kDa-Protein nachgewiesen und andererseits die [^3H]RA-Bindung sowohl mit unmarkierter RA als auch mit dem RAR α -Antikörper inhibiert werden.

Mit einem Antikörper, der gegen den menschlichen RAR α 1 gerichtet war, konnten drei Karpfenretina-spezifische immunoreaktive Membranproteine mit Molekulargewichten von 40 kDa, 43 kDa und 46 kDa nachgewiesen werden, von denen die beiden größeren auch in Horizontalzellen detektiert werden konnten. Die anti-RAR α -Immunoreaktivität in der Karpfenretina war neben etwas schwächeren Signalen in den Photorezeptor-Außensegmenten vornehmlich auf Zapfen-Horizontalzellen beschränkt und dort vor allem in den dendritischen Endigungen und in bzw. um den Kern herum lokalisiert. Im Immunoblot komigrierte das anti-RAR α -immunoreaktive Protein mit einem [^3H]RA-bindenden Protein.

Anti-RAR α -Immunoreaktivität und RA-Bindung liefen in dem 43 kDa-Protein zusammen, welches daher isoliert und mittels Massenspektroskopie identifiziert wurde. Als überraschendes Ergebnis der Identifikation stellte sich heraus, daß ein Enolase-ähnliches Protein die RA-Effekte auf die HC-Physiologie zu vermitteln scheint. Dieses Protein wurde abschließend auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen und seine komplette cDNA-Sequenz ermittelt.

6 Summary

The functional capacity of the vertebrate retina comprises a broad range of light intensities whereas its dynamic intensity range is much smaller. This requires the adaptation of the retinal light sensitivity to the respective ambient light conditions. Various processes occur during light adaptation leading to the modification of the physiology and morphology of the retinal cells. These adaptational processes are mediated by different neuromodulators, whose release or synthesis correlate with the ambient light conditions. Some of these modulators and their signaling pathways are well characterized. The neuromodulator dopamine for instance is released by amacrine or interplexiform cells in response to a light signal and subsequently binds to a dopamine receptor on its target cell. This leads to the activation of a well-known signaling pathway and, finally, to the phosphorylation of special proteins by the cAMP-dependent protein kinase. Other substances that cause light-adaptive physiological or morphological effects are discussed as putative neuromodulators because their respective signaling pathways are still unknown.

RA is one of these putative neuromodulators. Due to its light-correlated synthesis in the vertebrate retina RA is a promising candidate for acting as a light signal mediating modulator. In the fish retina RA especially effects the physiology and morphology of horizontal cells. In the latter RA causes only adaptive changes that are also induced by continuous light exposure, e.g. spinule formation. The uncoupling effect of RA on cone horizontal cells is relatively well characterized. It is mediated by an external binding site independently of cytoplasmic factors. Nevertheless, the underlying molecular mechanisms of the RA effects on horizontal cells are still unknown. Thus the aim of this work was to characterize and identify at least one RA membrane binding site that is required for the neuromodulatory influence of RA in the fish retina, and thereby provide further evidence for a neuromodulatory role of RA in the vertebrate retina.

For this purpose a binding assay was developed. In combination with a photoaffinity labeling assay, this assay was used for the analysis of tritium-labeled RA-binding to membrane proteins and for a partial characterization of the RA-binding proteins. A RAR-specific antibody was used for the analysis of the distribution of RAR-like proteins in the carp retina and their characterization, since the uncoupling effect of RA on horizontal cells is mediated by a RAR-like binding site.

The binding assay revealed one membrane binding site with a dissociation constant in the nanomolar range ($K_d = 36$ nM). This binding site showed a unique pharmacology compared to the retinoid receptors or other known RA-binding proteins. The photoaffinity labeling assay revealed the existence of several membrane-associated RA-binding proteins, but the pharmacology of these proteins and their binding sites respectively could not be determined. In a fraction of a preparative gel electrophoresis, containing a RAR α -immunoreactive 43 kDa protein, tritiated RA-binding by a 43 kDa protein could be demonstrated. Tritiated RA-binding by this protein was partially inhibited by unlabeled RA as well as by the RAR α antibody.

Using the RAR α -specific antibody, which was directed against the human RAR α 1, three specific immunoreactive membrane proteins with molecular weights of 40 kDa, 43 kDa and 46 kDa were detected in the carp retina. The 43 kDa protein and the 46 kDa protein were also detectable in horizontal cells of the carp retina. RAR α immunoreactivity was primarily localized at the dendritic tips and the region in and around the nucleus of cone horizontal cells. In addition, photoreceptor outer segments showed weak immunoreactivity. In an immunoblot a RAR α -immunoreactive protein comigrated with a [3 H]RA-binding protein.

The 43 kDa RAR α -immunoreactive [3 H]RA-binding protein was isolated by means of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and identified by means of mass spectrometry. The unexpected result of the identification was that the putative mediator of the RA effects on horizontal cell physiology was an enolase-like protein. Finally, the presence of this protein in the carp retina was demonstrated on the mRNA level and the complete coding sequence of its cDNA was determined.

7 Literatur

- Aaronson, RM, Graven, KK, Tucci, M, McDonald, RJ, Farber, HW (1995). Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *J Biol Chem* 270: 27752-27757.
- Adamus, G, Aptsiauri, N, Guy, J, Heckenlively, J, Flannery, J, Hargrave, PA (1996). The occurrence of serum autoantibodies against enolase in cancer-associated retinopathy. *Clin Immunol Immunopathol* 78: 120-129.
- Allenby, G, Bocquel, MT, Saunders, M, Kazmer, S, Speck, J, Rosenberger, M, Lovey, A, Kastner, P, Grippo, JF, Chambon, P, Levin, AA (1993). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc Natl Acad Sci* 90: 30-34.
- Allenby, G, Janocha, R, Kazmer, S, Speck, J, Grippo, JF, Levin, AA (1994). Binding of 9-*cis*-retinoic acid and all-*trans*-retinoic acid to retinoic acid receptors α , β , and γ . *J Biol Chem* 269: 16689-16695.
- Aronica, SM, Kraus, WL, Katzenellenbogen, BS (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci* 91: 8517-8521.
- Arza, B, Félez, J, Lopez-Aleman, R, Miles, LA, Muñoz-Cánoves, P (1997). Identification of an epitope of alpha-enolase (a candidate plasminogen receptor) by phage display. *Thromb Haemost* 78: 1097-1103.
- Baldrige, WH & Ball, AK (1991). Background illumination reduces horizontal cell receptive-field size in both normal and 6-hydroxydopamine-lesioned goldfish retinas. *Vis Neurosci* 7: 441-450.
- Barsony, J & Marx, SJ (1991). Rapid accumulation of cyclic GMP near activated vitamin D receptors. *Proc Natl Acad Sci* 88: 1436-1440.
- Baxter, JD & Tomkins, GM (1971). Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci* 68: 932-937.
- Bayley, H & Knowles, JR (1977). Photoaffinity labeling. *Methods Enzymol* 46: 69-114.
- Bernstein, PS, Choi, SY, Ho, YC, Rando, RR (1995). Photoaffinity labeling of retinoic acid-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci* 92: 654-658.
- Blaner, WS & Olson, JA (1994). Retinol and retinoic acid metabolism. In: Sporn, MB, Roberts, AB and Goodman, DS (eds): *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, Raven Press, New York: 229-256.
- Blaustein, JD, Lehman, MN, Turcotte, JC, Green, G (1992). Estrogen receptors in dendrites and axon terminals in the guinea pig hypothalamus. *Endocrinology* 131: 281-290.
- Blyth, CA, Freedman, RB, Rabin, BR (1971). Sex specific binding of steroid hormones to microsomal membranes of rat liver. *Nat New Biol* 230: 137-139.

- Boerman, MHEM & Napoli, JL (1996). Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis. Relative roles of microsomes and cytosol. *J Biol Chem* 271: 5610-5616.
- Bourguet, W, Ruff, M, Chambon, P, Gronemeyer, H, Moras, D (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* 375: 377-382.
- Bouzinba-Segard, H, Fan, XT, Perderiset, M, Castagna, M (1994). Synergy between phorbol esters and retinoic acid in inducing protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Comm* 204: 112-119.
- Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bruzzone, R, White, TW, Paul, DL (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238: 1-27.
- Bukauskas, FF, Jordan, K, Bukauskiene, A, Bennett, MVL, Lampe, PD, Laird, DW, Verselis, VK (2000). Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci* 97: 2556-2561.
- Bunt-Milam, AH & Saari, JC (1983). Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J Cell Biol* 97: 703-712.
- Carrer, HF, Araque, A, Buño, W (2003). Estradiol regulates the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 23: 6338-6344.
- Carystinos, GD, Alaoui-Jamali, MA, Phipps, J, Yen, L, Batist, G (2001). Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathion depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells. *Cancer ChemotherPharmacol* 47: 126-132.
- Chambon, P (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10: 940-954.
- Chaudhuri, BN, Kleywegt, GJ, Broutin-L'Hermite, I, Bergfors, T, Senn, H, Le Motte, P, Partouche, O, Jones, TA (1999). Structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with synthetic retinoids. *Acta Cryst* D55: 1850-1857.
- Chen, G & Radominska-Pandya, A (2000). Direct photoaffinity labeling of cellular retinoic acid-binding protein I (CRABP-I) with all-trans-retinoic acid: identification of amino acids in the ligand binding site. *Biochemistry* 39: 12568-12574.
- Chen, LX, Zhang, ZP, Scafonas, A, Cavalli, RC, Gabriel, JL, Soprano, KJ, Soprano, DR (1995). Arginine 132 of cellular retinoic acid-binding protein (type II) is important for binding of retinoic acid. *J Biol Chem* 270: 4518-4525.
- Cook, JE & Becker, DL (1995). Gap junctions in the vertebrate retina. *Microsc Res Tech* 31: 408-419.
- Cooke, BA, King, RJ, van der Molen, HJ (Eds.) (1988). *Hormones and their actions*. Elsevier. Amsterdam.
- Dallery, N, Sablonnière, B, Grillier, I, Formstecher, P, Dautrevaux, M (1993). Purification and functional characterization of the ligand-binding domain from the retinoic acid receptor α : evi-

- dence that sulfhydryl groups are involved in ligand-receptor interactions. *Biochemistry* 32: 12428-12436.
- Dearry, A & Burnside, B (1986). Dopaminergic regulation of cone retinomotor movement in isolated teleost retinas: I. Induction of cone contraction is mediated by D₂ receptors. *J Neurochem* 46: 1006-1021.
- Dermietzel, R, Kremer, M, Paputsoglu, G, Stang, A, Skerrett, IM, Gomès, D, Srinivas, M, Janssen-Bienhold, U, Weiler, R, Nicholson, BJ, Bruzzone, R, Spray, DC (2000). Molecular and functional diversity of neural connexins in the retina. *J Neurosci* 20: 8331-8343.
- Dilworth, FJ, & Chambon, P (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20: 3047-3054.
- Dirks, P, Tieding, S, Schneider, I, Mey, J, Weiler, R (2004). Characterization of retinoic acid neuro-modulation in the carp retina. *J Neurosci Res* 78: 177-185.
- Dräger, UC & McCaffery, P (1997). Retinoic acid and development of the retina. *Prog Ret Eye Res* 16: 323-351.
- Dudani, AK, Cummings, C, Hashemi, S, Ganz, PR (1993). Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells. *Thromb Res* 69: 185-196.
- Duester, G, Mic, FA, Molotkov, A (2003). Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143-144: 201-210.
- Ehring, GR, Kerschbaum, HH, Eder, C, Neben, AL, Fanger, CM, Khoury, RM, Negulescu, PA, Cahanlan, MD (1998). A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med* 188: 1593-1602.
- Eiberger, J, Degen, J, Romualdi, A, Deutsch, U, Willecke, K, Söhl, G (2001). Connexin genes in the mouse and human genome. *Cell Commun Adhes* 8: 163-165.
- Elfgang, C, Eckert, R, Lichtenberg-Fraté, H, Butterweck, A, Traub, O, Klein, RA, Hülser, DF, Willecke, K (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol* 129: 805-817.
- El-Tanani, MK & Green, CD (1997). Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11: 928-937.
- Feo, S, Arcuri, D, Piddini, E, Passantino, R, Giallongo, A (2000). ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett* 473: 47-52.
- Fiorella, PD & Napoli, JL (1991). Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. *J Biol Chem* 266: 16572-16579.

- Fiorella, PD, Giguere, V, Napoli, JL (1993). Expression of cellular retinoic acid-binding protein (type II) in *Escherichia coli*. Characterization and comparison to cellular retinoic acid-binding protein (type I). *J Biol Chem* 268: 21545-21552.
- Fischer, AJ, Wallman, J, Mertz, JR, Stell, WK (1999). Localization of retinoid binding proteins, retinoid receptors, and retinaldehyde dehydrogenase in the chick eye. *J Neurocytol* 28: 597-609.
- Garms, B (2003). Diplomarbeit: Untersuchungen zur Beteiligung von Glutamat-Rezeptor-interagierendem Protein (GRIP) an der synaptischen Plastizität in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) der Fischretina. Carl-von-Ossietzky Universität, Oldenburg.
- Gaur, VP, de Leeuw, AM, Milam, AH, Saari, JC (1990). Localization of cellular retinoic acid-binding protein to amacrine cells of rat retina. *Exp Eye Res* 50: 505-511.
- Giguere, V, Ong, ES, Segui, P, Evans, RM (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330: 624-629.
- Ghyselinck, NB, Dupe, V, Dierich, A, Messaddeq, N, Garnier, JM, Rochette-Egly, C, Chambon, P, Mark, M (1997). Role of the retinoic acid receptor beta (RAR β) during mouse development. *Int J Dev Biol* 41: 425-447.
- Gu, Q & Moss, RL (1998). Novel mechanisms for non-genomic action of 17 beta-oestradiol on kainate-induced currents in isolated rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol* 506: 745-754.
- Gudas, LJ, Sporn, MB, Roberts, AB (1994). Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: Sporn, MB, Roberts, AB and Goodman, DS (eds): *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, Raven Press, New York: 443-520.
- Guo, H, Acevedo, P, Parsa, FD, Bertram, JS (1992). Gap-junctional protein connexin 43 is expressed in dermis and epidermis of human skin: differential modulation by retinoids. *J Invest Dermatol* 99: 460-467.
- He, S, Weiler, R, Vaney, DI (2000). Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 418: 33-40.
- Heinzel, T, Lavinsky, RM, Mullen, TM, Soderstrom, M, Laherty, CD, Torchia, J, Yang, WM, Brard, G, Ngo, SD, Davie, JR, Seto, E, Eisenman, RN, Rose, DW, Glass, CK, Rosenfeld, MG (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387: 43-48.
- Heyman, RA, Mangelsdorf, DJ, Dyck, JA, Stein, RB, Eichele, G, Evans, RM, Thaller, C (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68: 397-406.
- Ho, MTP, Pownall, HJ, Hollyfield, JG (1989). Spontaneous transfer of retinoic acid, retinyl acetate, and retinyl palmitate between single unilamellar vesicles. *J Biol Chem* 264: 17759-17763.
- Hombach, S, Janssen-Bienhold, U, Söhl, G, Schubert, T, Büssow, H, Ott, T, Weiler, R, Willecke, K (2004). Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 19: 2633-2640.

- Hyatt, GA, Schmitt, EA, Marsh-Armstrong, N, Dowling, JE (1992). Retinoic acid-induced duplication of the zebrafish retina. *Proc Natl Acad Sci* 89: 8293-8297.
- Hyatt, GA, Schmitt, EA, Marsh-Armstrong, N, McCaffery, P, Dräger, UC, Dowling, JE (1996a). Retinoic acid establishes ventral retinal characteristics. *Development* 122: 195-204.
- Hyatt, GA, Schmitt, EA, Fadool, JM, Dowling, JE (1996b). Retinoic acid alters photoreceptor development *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* 93: 13298-13303.
- Hyatt, GA & Dowling, JE (1997). Retinoic acid. A key molecule for eye and photoreceptor development. *IOVS* 38: 1471-1475.
- Idres, N, Benoit, G, Flexor, MA, Lanotte, M, Chabot, GG (2001). Granulocytic differentiation of human NB4 promyelocytic leukemia cells induced by all-*trans* retinoic acid metabolites. *Cancer Res* 61: 700-705.
- Idres, N, Marill, J, Flexor, MA, Chabot, GG (2002). Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-*trans*-retinoic acid metabolites and isomers. *J Biol Chem* 277: 31491-31498.
- Janssen, JJM, Kuhlmann, ED, van Vugt, AHM, Winkens, HJ, Janssen, BPM, Deutman, AF, Driessen, CAGG (1999). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors in the mature retina: subtype determination and cellular distribution. *Curr Eye Res* 19: 338-347.
- Janssen-Bienhold, U, Nagel, H, Weiler, R (1993). *In vitro* phosphorylation in isolated horizontal cells of the fish retina: effects of the state of light adaptation. *Eur J Neurosci* 5: 584-593.
- Janssen-Bienhold, U, Buschmann-Gebhardt, B, Weiler, R (1995). Phorbol ester binding sites in the fish retina: correlation with stimulation of endogenous phosphorylation and protein kinase C activation. *J Neurochem* 65: 744-753.
- Janssen-Bienhold, U, Schultz, K, Hoppenstedt, W, Weiler, R (2001). Molecular diversity of gap junctions between horizontal cells. *Prog Brain Res* 131: 93-107.
- Jones, TA, Bergfors, T, Sedzik, J, Unge, T (1988). The three-dimensional structure of P2 myelin protein. *EMBO J* 7: 1597-1604.
- Kamermans, M, van Dijk, BW, Spekrijse, H (1991). Color opponency in cone-driven horizontal cells in carp retina. Aspecific pathways between cones and horizontal cells. *J Gen Physiol* 97: 819-843.
- Kamermans, M, & Spekrijse, H (1995). Spectral behavior of cone-driven horizontal cells in teleost retina. *Prog Ret Eye Res* 14: 313-360.
- Kaneko, A (1971). Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina. *J Physiol* 213: 95-105.
- Kang, JX, Bell, J, Leaf, A, Beard, RL, Chandraratna, RAS (1998). Retinoic acid alters the intracellular trafficking of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor and lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 95: 13687-13691.

- Kato, S, Negishi, K, Teranishi, T, Ishita, S (1991). The use of the carp retina in neurobiology: its uniqueness and application for neural network analyses of the inner retina. *Prog Neurobiol* 37: 287-327.
- Katzenellenbogen, JA & Katzenellenbogen, BS (1996). Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol* 3: 529-536.
- Keidel, S, Lamour, FPY, Apfel, CM (1997). Mutational analysis reveals that all-*trans*-retinoic acid, 9-*cis*-retinoic acid, and antagonist interact with distinct binding determinants of RAR α . *J Biol Chem* 272: 18267-18272.
- Kelley, MK, Turner, JK, Reh, TA (1994). Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. *Development* 120: 2091-2102.
- Klaholz, BP, Renaud, JP, Mitschler, A, Zusi, C, Chambon, P, Gronemeyer, H, Moras, D (1998). Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR γ . *Nature Struct Biol* 5: 199-202.
- Kleywegt, GJ, Bergfors, T, Senn, H, Le Motte, P, Gsell, B, Shudo, K, Jones, TA (1994). Crystal structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with all-*trans*-retinoic acid and a synthetic retinoid. *Structure* 2: 1241-1258.
- Kojima, R, Fujimori, T, Kiyota, N, Toriya, Y, Fukuda, T, Ohashi, T, Sato, T, Yoshizawa, Y, Takeyama, K, Mano, H, Masushige, S, Kato, S (1994). *In vivo* isomerization of retinoic acids. *J Biol Chem* 269: 32700-32707.
- Kuiper, G, Carlsson, B, Grandien, K, Enmark, E, Häggblad, J, Nilsson, S, Gustafsson, JA (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138: 863-870.
- Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamour, FPY, Lardelli, P, Apfel, CM (1996). Analysis of the ligand-binding domain of human retinoic acid receptor α by site-directed mutagenesis. *Mol Cell Biol* 16: 5386-5392.
- Lampron, C, Rochette-Egly, C, Gorry, P, Dollé, P, Mark, M, Lufkin, T, LeMeur, M, Chambon, P (1995). Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABP II) or in both CRABPI and CRABP II are essentially normal. *Development* 121: 539-548.
- Lan, NC, Bolger, MB, Gee, KW (1991). Identification and characterization of a pregnane steroid recognition site that is functionally coupled to an expressed GABA $_A$ receptor. *Neurochem Res* 16: 347-356.
- Larison, KD & Bremiller, R (1990). Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina. *Development* 109: 567-576.
- Laudet, V, Hänni, C, Coll, J, Catzeflis, F, Stéhelin, D (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 11: 1003-1013.

- Lehman, PA & Malany, AM (1989). Evidence for percutaneous absorption of isotretinoin from the photo-isomerization of topical tretinoin. *J Invest Dermatol* 93: 595-599.
- Levin, AA, Sturzenbecker, LJ, Kazmer, S, Bosakowski, T, Huselton, C, Allenby, G, Speck, J, Kratzeisen, C, Rosenberger, M, Lovey, A, Grippo, JF (1992). 9-*cis* retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature* 355: 359-361.
- Lieberherr, M, Grosse, B, Duchambon, P, Drueke, T (1989). A functional cell surface type receptor is required for the early action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the phosphoinositide metabolism in rat enterocytes. *J Biol Chem* 264: 20403-20406.
- Lim, L, Hall, C, Leung, T, Mahadevan, L, Whatley, S (1983). Neuron-specific enolase and creatin phosphokinase are protein components of rat brain synaptic plasma membranes. *J Neurochem* 41: 1177-1182.
- Liman, ER, Knapp, AG, Dowling, JE (1989). Enhancement of kainate-gated currents in retinal horizontal cells by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Brain Res* 481: 399-402.
- Little, JM & Radomska, A (1997). Application of photoaffinity labeling with [11,12-³H]all-*trans*-retinoic acid to characterization of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase(s) with activity toward retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 497-500.
- Lohnes, D, Mark, M, Mendelsohn, C, Dollé, P, Dierich, A, Gorry, P, Gansmuller, A, Chambon, P (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120: 2723-2748.
- López-Alemany, R, Longstaff, C, Hawley, S, Mirshahi, M, Fábregas, P, Jardí, M, Merton, E, Miles, LA, Félez, J (2003). Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against α -enolase. *Am J Hematol* 72: 234-242.
- Maden, M (1997). Retinoic acid and its receptors in limb regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 8: 445-453.
- Mangel, SC & Dowling, JE (1985). Responsiveness and receptive field size of carp horizontal cells are reduced by prolonged darkness and dopamine. *Science* 229: 1107-1109.
- Mangelsdorf, DJ & Evans, RM (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841-850.
- Marill, J, Cresteil, T, Lanotte, M, Chabot, GG (2000). Identification of human cytochrome P450s involved in the formation of all-*trans*-retinoic acid principal metabolites. *Mol Pharmacol* 58: 1341-1348.
- Marsh-Armstrong, N, McCaffery, P, Gilbert, W, Dowling, JE, Dräger, UC (1994). Retinoic acid is necessary for development of the ventral retina in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci* 91: 7286-7290.
- McAlister, L & Holland, MJ (1982). Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J Biol Chem* 257: 7181-7188.

- McCaffery, P, Lee, MO, Wagner, MA, Sladek, NE, Dräger, UC (1992). Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina. *Development* 115: 371-382.
- McCaffery, P, Mey, J, Dräger, UC (1996). Light-mediated retinoic acid production. *Proc Natl Acad Sci* 93: 12570-12574.
- McCaffery, P, Wagner, E, O'Neil, J, Petkovich, M, Dräger, UC (1999). Dorsal and ventral retinal territories defined by retinoic acid synthesis, break-down and nuclear receptor expression. *Mech Dev* 85: 203-214.
- McCaffery, PJ, Adams, J, Maden, M, Rosa-Molinar, E (2003). Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *Eur J Neurosci* 18: 457-472.
- McKenna, NJ & O'Malley, BW (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465-474.
- Mendelsohn, C, Lohnes, D, Décimo, D, Lufkin, T, LeMeur, M, Chambon, P, Mark, M (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development. (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120: 2749-2771.
- Mermelstein, PG, Becker, JB, Surmeier, DJ (1996). Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci* 16: 595-604.
- Mey, J, McCaffery, P, Klemeit, M (2001). Sources and sink of retinoic acid in the embryonic chick retina: distribution of aldehyde dehydrogenase activities, CRABP-I, and sites of retinoic acid inactivation. *Brain Res Dev Brain Res* 127: 135-148.
- Migliaccio, A, Di Domenico, M, Castoria, G, de Falco, A, Bontempo, P, Nola, E, Auricchio, F (1996). Tyrosine kinase/p21^{ras}/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15: 1292-1300.
- Miles, LA, Dahlberg, CM, Plescia, J, Félez, J, Kato, K, Plow, EF (1991). Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30: 1682-1691.
- Monje, P & Boland, R (1999). Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Mol Cell Endocrinol* 147: 75-84.
- Mori, M, Ghyselinck, NB, Chambon, P, Mark, M (2001). Systematic immunolocalization of retinoid receptors in developing and adult mouse eyes. *IOVS* 42: 1312-1318.
- Morriss-Kay, GM & Sokolova, N (1996). Embryonic development and pattern formation. *FASEB J* 10: 961-968.
- Murphy, BE (1967). Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 27: 973-990.
- Myhre, AM, Takahashi, N, Blomhoff, R, Breitman, TR, Norum, KR (1996). Retinoylation of proteins in rat liver, kidney, and lung in vivo. *J Lipid Res* 37: 1971-1977.

- Nakagawa, T, Setou, M, Seog, D, Ogasawara, K, Dohmae, N, Takio, K, Hirokawa, N (2000). A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* 103: 569-581.
- Nakajima, K, Hamanoue, M, Takemoto, N, Hattori, T, Kato, K, Kohsaka, S (1994). Plasminogen binds specifically to α -enolase on rat neuronal plasma membrane. *J Neurochem* 63: 2048-2057.
- Nakajima, T, Kitazawa, T, Hamada, E, Hazama, H, Omata, M, Kurachi, Y (1995). 17β -Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 294: 625-635.
- Napoli, JL (1996). Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 80: 52-62.
- Napoli, JL (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1440: 139-162.
- Newcomer, ME (1993). Structure of the epididymal retinoic acid binding protein at 2.1 Å resolution. *Structure* 1: 7-18.
- Newcomer, ME (1995). Retinoid-binding proteins: structural determinants important for function. *FASEB J* 9: 229-239.
- Norris, AW, Cheng, L, Giguere, V, Rosenberger, M, Li, E (1994). Measurement of subnanomolar retinoic acid binding affinities for cellular retinoic acid binding proteins by fluorimetric titration. *Biochim Biophys Acta* 1209: 10-18.
- Notario, B, Zamora, M, Viñas, O, Mampel, T (2003). All-*trans*-retinoic acid binds to and inhibits adenine nucleotide translocase and induces mitochondrial permeability transition. *Mol Pharmacol* 63: 224-231.
- O'Brien, J, Al-Ubaidi, MR, Ripps, H (1996). Connexin 35: a gap junctional protein expressed preferentially in the skate retina. *Mol Biol Cell* 7: 233-243.
- O'Farrell, PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007-4021.
- Ohkubo, S, Yamada, E, Endo, T, Ito, H, Hidaka, H (1984). Vitamin A acid-induced activation of Ca^{2+} -activated, phospholipid-dependent protein kinase from rabbit retina. *Biochem Biophys Res Comm* 118: 460-466.
- Ong, DE & Chytil, F (1978). Cellular retinoic acid-binding protein from rat testis. *J Biol Chem* 253: 4551-4554.
- Ong, DE & Chytil, F (1988). Presence of novel retinoic acid-binding proteins in the lumen of rat epididymis. *Arch Biochem Biophys* 267: 474-478.
- Orchinik, M, Murray, TF, Moore, FL (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252: 1848-1851.

- Orchinik, M, Murray, TF, Franklin, PH, Moore, FL (1992). Guanyl nucleotides modulate binding to steroid receptors in neuronal membranes. *Proc Natl Acad Sci* 89: 3830-3834.
- Ortiz, A, Aranda, FJ, Gómez-Fernández, JC (1992). Interaction of retinol and retinoic acid with phospholipid membranes. A differential scanning calorimetry study. *Biochim Biophys Acta* 1106: 282-290.
- Ottonello, S, Scita, G, Mantovani, G, Cavazzini, D, Rossi, GL (1993). Retinol bound to cellular retinol binding-protein is a substrate for cytosolic retinoic acid synthesis. *J Biol Chem* 268: 27133-27142.
- Pancholi, V (2001). Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58: 902-920.
- Parrado, A, Despouy, G, Kraïba, R, Le Pogam, C, Dupas, S, Choquette, M, Robledo, M, Larghero, J, Bui, H, Le Gall, I, Rochette-Egly, C, Chomienne, C, Padua, RA (2001). Retinoic acid receptor $\alpha 1$ variants, RAR $\alpha 1\Delta B$ and RAR $\alpha 1\Delta BC$, define a new class of nuclear receptor isoforms. *Nuc Acid Res* 29: 4901-4908.
- Pattanayek, R & Newcomer, ME (1999). Protein and ligand adaptation in a retinoic acid binding protein. *Protein Sci* 8: 2027-2032.
- Perlmann, T, Umesono, K, Rangarajan, PN, Forman, BM, Evans, RM (1996). Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* 10: 958-966.
- Pitts, JD & Finbow, ME (1986). The gap junction. *J Cell Sci Suppl* 4: 239-266.
- Posch, KC, Burns, RD, Napoli, JL (1992). Biosynthesis of all-*trans*-retinoic acid from retinal: recognition of retinal bound to cellular retinol binding protein (type I) as substrate by a purified cytosolic dehydrogenase. *J Biol Chem* 267: 19676-19682.
- Pottek, M & Weiler, R (2000). Light-adaptive effects of retinoic acid on receptive field properties of retinal horizontal cells. *Eur J Neurosci* 12: 437-445.
- Prystowsky, JH, Smith, JE, Goodman, DS (1981). Retinyl palmitate hydrolase activity in normal rat liver. *J Biol Chem* 256: 4498-4503.
- Qiu, J, Bosch, MA, Tobias, SC, Grandy, DK, Scanlan, TS, Rønnekleiv, OK, Kelly, MJ (2003). Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 23: 9529-9540.
- Radomska-Pandya, A, Chen, G, Czernik, PJ, Little, JM, Samokyszyn, VM, Carter, CA, Nowak, G (2000). Direct interaction of all-*trans*-retinoic acid with protein kinase C (PKC). *J Biol Chem* 275: 22324-22330.
- Radomska-Pandya, A, Chen, G, Samokyszyn, VM, Little, JM, Gall, WE, Zawada, G, Terrier, N, Magdalou, J, Czernik, P. (2001). Application of photoaffinity labeling with [3 H] all-*trans*- and 9-*cis*-retinoic acids for characterization of cellular retinoic acid-binding proteins I and II. *Protein Sci* 10: 200-211.

- Radominska-Pandya, A & Chen, G (2002). Photoaffinity labeling of human retinoid X receptor β (RXR β) with 9-*cis*-retinoic acid: identification of phytanic acid, docosahexaenoic acid, and lithocholic acid as ligands for RXR β . *Biochemistry* 41: 4883-4890.
- Ramirez, VD, Zheng, J, Siddique, KM (1996). Membrane receptors for estrogen, progesterone, and testosterone in the rat brain: fantasy or reality. *Cell Mol Neurobiol* 16: 175-198.
- Randolph, RK & Simon, M (1997). Metabolism of all-*trans*-retinoic acid by cultured human epidermal keratinocytes. *J Lipid Res* 38: 1374-1383.
- Rastinejad, F, Wagner, T, Zhao, Q, Khorasanizadeh, S (2000). Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J* 19: 1045-1054.
- Razandi, M, Pedram, A, Greene, GL, Levin, ER (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 13: 307-319.
- Redlitz, A, Fowler, BJ, Plow, EF, Miles, LA (1995). The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem* 227: 407-415.
- Renaud, JP, Rochel, N, Ruff, M, Vivat, V, Chambon, P, Gronemeyer, H, Moras, D (1995). Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-*trans* retinoic acid. *Nature* 378: 681-689.
- Rengarajan, K, Pohl, J, Nickerson, J (2001). Photoaffinity labeling of human IRBP with all-*trans*-retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 268-274.
- Repa, JJ, Hanson, KK, Clagett-Dame, M (1993). All-*trans*-retinol is a ligand for the retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci* 90: 7293-7297.
- Rial, E, González-Barroso, M, Fleury, C, Iturrizaga, S, Sanchis, D, Jiménez-Jiménez, J, Ricquier, D, Gubern, M, Bouillaud, F (1999). Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *EMBO J* 18: 5827-5833.
- Rigobello, MA, Scutari, G, Friso, A, Barzon, E, Artusi, S, Bindoli, A (1999). Mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c induced by retinoic acids. *Biochem Pharmacol* 58: 665-670.
- Ripps, H, Qian, H, Zakevicius, J (2002). Pharmacological enhancement of hemi-gap-junctional currents in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci Methods* 121: 81-92.
- Rivedahl, E, Yamasaki, H, Sanner, T (1994). Inhibition of gap junctional intercellular communication in syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis* 15: 689-694.
- Rogers, M, Berestecky, JM, Hossain, MZ, Guo, HM, Kadle, R, Nicholson, BJ, Bertram, JS (1990). Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and protein. *Mol Carcinog* 3: 335-343.
- Roosendaal, B, Quirarte, GL, McGaugh, JL (2002). Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala β -adrenoceptor-cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *Eur J Neurosci* 15: 553-560.

- Ross, AC (1993). Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J* 7: 317-327.
- Ross, AC & Hämmerling, UG (1994). Retinoids and the immune system. In: Sporn, MB, Roberts, AB and Goodman, DS (eds): *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, Raven Press, New York: 521-544.
- Saari, JC, Futterman, S, Bredberg, L (1978). Cellular retinol- and retinoic acid-binding proteins of bovine retina. Purification and properties. *J Biol Chem* 253: 6432-6436.
- Saari, JC (1994). Retinoids in photosensitive systems. In: Sporn, MB, Roberts, AB and Goodman, DS (eds): *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*, Raven Press, New York: 351-385.
- Saari, JC, Huang, J, Asson-Batres, MA, Champer, RJ, Garwin, G, Crabb, JW, Possin, DE, Milam, AH (1995a). Evidence of retinoid metabolism within cells of inner retina. *Exp Eye Res* 60: 209-212.
- Saari, JC, Champer, RJ, Asson-Batres, MA, Garwin, GG, Huang, J, Crabb, JW, Milam, AH (1995b). Characterization and localization of an aldehyde dehydrogenase to amacrine cells of bovine retina. *Vis Neurosci* 12: 263-272.
- Sablonnière, B, Dallery, N, Grillier, I, Formstecher, P, Dautrevaux, M (1994). Physicochemical parameters affecting the charcoal adsorption assay for quantitative retinoid-binding measurement. *Anal Biochem* 217: 110-118.
- Sakaguchi, Y, Cui, G, Sen, L (1996). Acute effects of thyroid hormone on inward rectifier potassium channel currents in guinea pig ventricular myocytes. *Endocrinology* 137: 4744-4751.
- Samokyszyn, VM, Gall, WE, Zawada, G, Freyaldenhoven, MA, Chen, G, Mackenzie, PI, Tephly, TR, Radomska-Pandya, A (2000). 4-Hydroxyretinoic acid, a novel substrate for human liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase(s) and recombinant UGT2B7. *J Biol Chem* 275: 6908-6914.
- Scafonas, A, Wolfgang, CL, Gabriel, JL, Soprano, KJ, Soprano, DR (1997). Differential role of homologous positively charged amino acid residues for ligand binding in retinoic acid receptor α compared with retinoic acid receptor β . *J Biol Chem* 272: 11244-11249.
- Schmidt, BMW, Gerdes, D, Feuring, M, Falkenstein, E, Christ, M, Wehling, M (2000). Rapid, nongenomic steroid actions: a new age? *Front Neuroendocrinol* 21: 57-94.
- Schoch, GA, Yano, JK, Wester, MR, Griffin, KJ, Stout, CD, Johnson, EF (2004). Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. *J Biol Chem* 279: 9497-9503.
- Schultz, K, Janssen-Bienhold, U, Gundelfinger, ED, Kreutz, MR, Weiler, R (2004). Calcium-binding protein caldendrin and CaMKII are localized in spinules of the carp retina. *J Comp Neurol* 479: 84-93.
- Schütte, F, Janssen-Bienhold, U, Hoppenstedt, W, Schultz, K, Dermietzel, R, Weiler, R (2001). Dopamine-induced modulation of connexin43 and its localisation in horizontal cells of the fish retina. In: *Göttingen Neurobiology Report 2001. Proceedings of the 4th Meeting of the German*

- Neuroscience Society 2001; Volume I, 28th Göttingen Neurobiology Conference*. Elsner, N & Kreutzberg, GW (eds). Thieme, Stuttgart, New York: 78.
- Setou, M, Nakagawa, T, Seog, DH, Hirokawa, N (2000). Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288: 1796-1802.
- Shevchenko, A, Wilm, M, Vorm, O, Mann, M (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-858.
- Shigematsu, Y & Yamada, M (1988). Effects of dopamine on spatial properties of horizontal cell responses in the carp retina. *Neurosci Res Suppl* 8: 69-80.
- Shih, TW, Lin, TH, Shealy, F, Hill, DL (1997). Nonenzymatic isomerization of 9-*cis*-retinoic acid catalyzed by sulfhydryl compounds. *Drug Metab Disp* 25: 27-32.
- Simon, A, Hellman, U, Wernstedt, C, Eriksson, U (1995). The retinal pigment epithelial-specific 11-*cis* retinol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases. *J Biol Chem* 270: 1107-1112.
- Simoncini, T, Fornari, L, Mannella, P, Varone, G, Caruso, A, Liao, JK, Genazzani, AR (2002). Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor α with phosphatidylinositol 3-OH kinase. *Steroids* 67: 935-939.
- Simoncini, T, Rabkin, E, Liao, JK (2003). Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 198-203.
- Sirover, MA (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1432: 159-184.
- Sporn, MB & Roberts, AB (1985). What is a retinoid? In: *Retinoids, Differentiation and Disease*. Ciba Foundation Symposium, no. 113: 1-5, Pitman, London.
- Spray, DC & Burt, JM (1990). Structure-activity relations of the cardiac gap junction channel. *Am J Physiol* 258: 195-205.
- Spray, DC & Dermietzel, R (1996). *Gap junctions in the nervous system*. RG Landes Company. Austin. Texas.
- Stell, WK & Lightfoot, DO (1975). Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. *J Comp Neurol* 159: 473-502.
- Stell, WK, Lightfoot, DO, Wheeler, TG, Leeper, HF (1975). Goldfish retina: functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses. *Science* 190: 989-990.
- Stell, WK, Kretz, R, Lightfoot, DO (1982). Horizontal cell connectivity in goldfish. *Prog Clin Biol Res* 13: 51-75.
- Stump, DG, Lloyd, RS, Chytil, F (1991). Site-directed mutagenesis of rat cellular retinol-binding protein. Alteration in binding specificity resulting from mutation of glutamine 108 to arginine. *J Biol Chem* 266: 4622-4630.

- Subramanian, A & Miller, DM (2000). Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the *c-myc* protooncogene. *J Biol Chem* 275: 5958-5965.
- Suzuki, R, Shintani, T, Sakuta, H, Kato, A, Ohkawara, T, Osumi, N, Noda, M (2000). Identification of RALDH-3, a novel retinaldehyde dehydrogenase, expressed in the ventral region of the retina. *Mech Dev* 98: 37-50.
- Szuts, EZ & Harosi, FI (1991). Solubility of retinoids in water. *Arch Biochem Biophys* 287: 297-304.
- Takahashi, N, Liapi, C, Anderson, WB, Breitman, TR (1991). Retinoylation of the cAMP-binding regulatory subunits of type I and type II cAMP-dependent protein kinase in HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* 290: 293-302.
- Takahashi, N & Breitman, TR (1994). Retinoylation of vimentin in the human myeloid leukemia cell line HL60. *J Biol Chem* 269: 5913-5917.
- Takashima, Y, Nakajima, T, Washitake, M, Anmo, T, Sugiura, M, Matsumaru, H (1979). Stability of retinol analogs. VIII. Pyrolysis and photolysis of retinoic acid in aqueous ethanolic solution. *Chem Pharm Bull* 27: 12-22.
- Takens-Kwak, BR & Jongsma, HJ (1992). Cardiac gap junctions: three distinct single channel conductances and their modulation by phosphorylating treatments. *Eur J Physiol* 422: 198-200.
- Tanenbaum, DM, Wang, Y, Williams, SP, Sigler, PB (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci* 95: 5998-6003.
- Tate, BF & Grippo, JF (1995). Mutagenesis of the ligand binding domain of the human retinoic acid receptor α identifies critical residues for 9-*cis*-retinoic acid binding. *J Biol Chem* 270: 20258-20263.
- Teranishi, T, Negishi, K, Kato, S (1983). Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina. *Nature* 301: 243-246.
- Thomas, P, Zhu, Y, Pace, M (2002). Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* 67: 511-517.
- Tischkau, SA & Ramirez, VD (1993). A specific membrane binding protein for progesterone in rat brain: sex differences and induction by estrogen. *Proc Natl Acad Sci* 90: 1285-1289.
- Tomás, P, Ledesma, A, Rial, E (2002). Photoaffinity labeling of the uncoupling protein UCP1 with retinoic acid: ubiquinone favors binding. *FEBS Lett* 526: 63-65.
- Tornqvist, K, Yang, XL, Dowling, JE (1988). Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina. III. Effects of prolonged darkness and dopamine on electrical coupling between horizontal cells. *J Neurosci* 8: 2279-2288.
- Towbin, H, Staehelin, T, Gordon, J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76: 4350-4354.

- Ueta, H, Nagasawa, H, Oyabu-Manabe, Y, Toida, K, Ishimura, K, Hori, H (2004). Localization of enolase in synaptic plasma membrane as an $\alpha\gamma$ heterodimer in rat brain. *Neurosci Res* 48: 379-386.
- Umino, O, Lee, Y, Dowling, JE (1991). Effects of light stimuli on the release of dopamine from interplexiform cells in the white perch retina. *Vis Neurosci* 7: 451-458.
- Urbach, J & Rando, RR (1994). Isomerization of all-*trans*-retinoic acid to 9-*cis*-retinoic acid. *Biochem J* 299: 459-465.
- Valera, S, Ballivet, M, Bertrand, D (1992). Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci* 89: 9949-9953.
- Valverde, MA, Rojas, P, Amigo, J, Cosmelli, D, Orio, P, Bahamonde, MI, Mann, GE, Vergara, C, Latorre, R (1999). Acute activation of maxi-K channels (*hSlo*) by estradiol binding to the β subunit. *Science* 285: 1929-1931.
- Van Buskirk, R & Dowling, JE (1981). Isolated horizontal cells from carp retina demonstrate dopamine-dependent accumulation of cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci* 78: 7825-7829.
- Vane, FM, Stoltenborg, JK, Buggé, CJL (1982). Determination of 13-*cis*-retinoic acid and its major metabolite, 4-oxo-13-*cis*-retinoic acid, in human blood by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromat* 227: 471-484.
- Vaney, DI (1994). Patterns of neuronal coupling in the retina. *Prog Ret Eye Res* 13: 301-355.
- Vellani, V, Reynolds, AM, McNaughton, PA (2000). Modulation of the synaptic Ca^{2+} current in salamander photoreceptors by polyunsaturated fatty acids and retinoids. *J Physiol* 529: 333-344.
- Vuilleminot, BR, Pulling, LC, Palmisano, WA, Hutt, JA, Belinsky, SA (2004). Carcinogen exposure differentially modulates RAR- β promoter hypermethylation, an early and frequent event in mouse lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 25: 623-629.
- Wagner, HJ & Djamgoz, MBA (1993). Spinules: a case for retinal synaptic plasticity. *TINS* 16: 201-206.
- Wagner, E, McCaffery, P, Mey, J, Farhangfar, F, Applebury, ML, Dräger, UC (1997). Retinoic acid increases arrestin mRNA levels in the mouse retina. *FASEB J* 11: 271-275.
- Wagner, E, McCaffery, P, Dräger, UC (2000). Retinoic acid in the formation of the dorsoventral retina and its central projections. *Dev Biol* 222: 460-470.
- Waldegger, S, Beisse, F, Apfel, H, Breit, S, Kolb, HA, Häussinger, D, Lang, F (1995). Electrophysiological effects of progesterone on hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1266: 186-190.
- Watkins 3rd, JB, Wirthwein, DP, Sanders, RA (1991). Comparative study of phase II biotransformation in rabbit ocular tissues. *Drug Metab Dispos* 19: 708-713.
- Weatherman, RV, Fletterick, RJ, Scanlan, TS (1999). Nuclear receptor ligands and ligand-binding domains. *Annu Rev Biochem* 68: 559-581.
- Weiler, R & Wagner, HJ (1984). Light-dependent change of cone-horizontal cell interactions in carp retina. *Brain Res* 298: 1-9.

- Weiler, R, Kohler, K, Janssen, U (1991). Protein kinase C mediates transient spinule-type neurite outgrowth in the retina during light adaptation. *Proc Natl Acad Sci* 88: 3603-3607.
- Weiler, R, Baldridge, WH, Mangel, SC, Dowling, JE (1997). Modulation of endogenous dopamine release in the fish retina by light and prolonged darkness. *Vis Neurosci* 14: 351-356.
- Weiler, R, Schultz, K, Pottek, M, Tieding, S, Janssen-Bienhold, U (1998). Retinoic acid has light-adaptive effects on horizontal cells in the retina. *Proc Natl Acad Sci* 95: 7139-7144.
- Weiler, R, He, S, Vaney, DI (1999). Retinoic acid modulates gap junctional permeability between horizontal cells of the mammalian retina. *Eur J Neurosci* 11: 3346-3350.
- Welter, BH, Hansen, EL, Saner, KJ, Wei, Y, Price, TM (2003). Membrane-bound progesterone receptor expression in human aortic endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 51: 1049-1055.
- Wen, YD, Perissi, V, Staszewski, LM, Yang, WM, Krones, A, Glass, CK, Rosenfeld, MG, Seto, E (2000) The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *Proc Natl Acad Sci* 97: 7202-7207.
- Wendling, O, Ghyselinck, NB, Chambon, P, Mark, M (2001). Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* 128: 2031-2038.
- White, JA, Beckett-Jones, B, Guo, YD, Dilworth, FJ, Bonasoro, J, Jones, G, Petkovich, M (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450 (CYP26). *J Biol Chem* 272: 18538-18541.
- Williams, SP & Sigler, PB (1998). Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393: 392-396.
- Wistow, G & Piatigorsky, J (1987). Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science* 236: 1554-1556.
- Wistow, GJ, Lietman, T, Williams, LA, Stapel, SO, de Jong, WW, Horwitz, J, Piatigorsky, J (1988). Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *J Cell Biol* 107: 2729-2736.
- Wolburg, H & Kurz-Isler, G (1996). Modulation of connexon density in gap junctions of fish horizontal cells. In: Spray, DC and Dermietzel, R (eds): *Gap junctions in the nervous system*. RG Landes Company, Austin, Texas: 123-134.
- Wold, F (1971). Enolase. In: Boyer, PD (ed.): *The enzymes*. Academic Press, New York: 499-538.
- Xin, D & Bloomfield, SA (1999). Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol* 405: 75-87.
- Yang, XL, Fan, TX, Shen, W (1994). Effects of prolonged darkness on light responsiveness and spectral sensitivity of cone horizontal cells in carp retina *in vivo*. *J Neurosci* 14: 326-334.
- Zetterström, RH, Lindqvist, E, de Urquiza, AM, Tomac, A, Eriksson, U, Perlman, T, Olson, L (1999). Role of retinoids in the CNS: differential expression of retinoid binding proteins and receptors and evidence for presence of retinoic acid. *Eur J Neurosci* 11: 407-416.

- Zhang, DQ & McMahon, DQ (2000). Direct gating by retinoic acid of retinal electrical synapses. *Proc Natl Acad Sci* 97: 14754-14759.
- Zhang, DQ & McMahon, DG (2001). Gating of retinal horizontal cell hemi gap junction channels by voltage, Ca^{2+} , and retinoic acid. *Mol Vis* 7: 247-252.
- Zhang, J, Liu, ZP, Jones, TA, Gierasch, LM, Sambrook, JF (1992). Mutating the charged residues in the binding pocket of cellular retinoic acid-binding protein simultaneously reduces its binding affinity to retinoic acid and increases its thermostability. *Proteins* 13: 87-99.
- Zhang, ZP, Gambone, CJ, Gabriel, JL, Wolfgang, CL, Soprano, KJ, Soprano, DR (1998). Arg²⁷⁸, but not Lys²²⁹ or Lys²³⁶, plays an important role in the binding of retinoic acid by retinoic acid receptor γ . *J Biol Chem* 273: 34016-34021.
- Zhu, Y, Rice, CD, Pang, Y, Pace, M, Thomas, P (2003a). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 100: 2231-2236.
- Zhu, Y, Bond, J, Thomas, P (2003b). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci* 100: 2237-2242.
- Zoidl, G, Bruzzone, R, Weickert, S, Kremer, M, Zoidl, C, Mitropoulou, G, Srinivas, M, Spray, DC, Dermietzel, R (2004). Molecular cloning and functional expression of zfCx52.6: a novel connexin with hemichannel-forming properties expressed in horizontal cells of the zebrafish retina. *J Biol Chem* 279: 2913-2921.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in Posterform veröffentlicht:

Schuetten, F, Janssen-Bienhold, U, Weiler, R (2002). Identification and characterization of retinoic acid-binding proteins in the fish retina. *3rd Forum of European Neuroscience*: p. 296.

Schütte, FH, Janssen-Bienhold, U, Weiler, R, (2003). Identification and characterization of retinoic acid-binding proteins in the carp retina. *IOVS* 44: E-Abstract 3513.

Schütte, FH, Janssen-Bienhold, U, Weiler, R (2003). Identification and characterization of retinoic acid-binding proteins in the carp retina. *Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference and the 5th Meeting of the German Neuroscience Society 2003*. Elsner, N & Zimmermann, H (eds). Thieme, Stuttgart, New York: p 514.

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold möchte ich mich besonders bedanken für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Viele interessante Diskussionen und Anregungen einerseits sowie aufmunternde und motivierende Gespräche in schwierigeren Phasen andererseits waren mir eine große Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Reto Weiler danke ich besonders für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Dr. Konrad Schultz und bei Frau Susanne Wallenstein möchte ich mich herzlich bedanken für die sehr intensive Unterstützung im Rahmen der histologischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Frau Dr. Petra Dirks möchte ich nicht nur für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten herzlich danken, sondern auch für die vielen wissenschaftlich und weniger wissenschaftlich geprägten Gespräche, die eine interessante und unterhaltsame Abwechslung in meinen Laboralltag gebracht haben.

Der ganzen AG Neurobiologie und Herrn Peter Kanje danke ich für das nette Arbeitsklima und die vielen größeren und kleineren Hilfestellungen in den vergangenen Jahren.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, deren fortwährende Unterstützung mir mein Studium und diese Arbeit sehr erleichtert haben.

Und Friedrich Nietzsche (1844-1900) danke ich für die Einordnung meines Tuns der vergangenen Jahre in einen größeren Kontext:

„Der Wert davon, daß man zeitweilig eine strenge Wissenschaft streng betrieben hat, beruht nicht gerade in den Ergebnissen: denn diese werden, im Verhältnis zum Meere des Wissenswerten, ein verschwindend kleiner Tropfen sein. Aber es ergibt einen Zuwachs an Energie, an Schlußvermögen, an Zähigkeit der Ausdauer; man hat gelernt, einen *Zweck zweckmäßig* zu erreichen. Insofern ist es sehr schätzbar, in Hinsicht auf Alles, was man später treibt, einmal ein wissenschaftlicher Mensch gewesen zu sein.“

(aus: *Menschliches, Allzumenschliches*)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Frank Schütte
Geburtsdatum: 03.07.1972
Geburtsort: Varel
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1979-1983 Grundschule in Neuenburg
1983-1985 Orientierungsstufe in Zetel
1985-1992 Gymnasium in Varel

Wehrdienst

1992-1993 Grundwehrdienst in Delmenhorst und Oldenburg

Berufsausbildung

1993-1995 Ausbildung zum Biologisch-Technischen Assistenten mit Abschluß
am IFBA („Die Schule“) in Oldenburg

Hochschulstudium

1995 Beginn des Biologiestudiums an der C.-v.-O.-Universität Oldenburg
1997 Vordiplom
2000-01 Diplomarbeit bei P.D. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold, AG Neurobiologie
2001 Diplom
2001-04 Stipendiat im EGK/IGK *Neurosensory Science and Systems* an der C.-v.-O.-
Universität Oldenburg, dabei Durchführung einer Promotionsarbeit bei apl.
Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold, AG Neurobiologie

Zetel, 01. Dezember 2004

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Frank Schütte