

Übersichtsartikel

Jens Rettig* und David R. Stevens

Synaptische Transmission im Immunsystem

<https://doi.org/10.1515/nf-2016-0052>

Zusammenfassung: Die Freisetzung von Neurotransmittern an Synapsen gehört zu den wichtigsten Mechanismen im zentralen Nervensystem. In den zurückliegenden Jahrzehnten konnten viele Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen, die diesem Prozess zugrunde liegen, gesammelt werden. Die hochregulierte Exozytose, die auf dem SNARE-Komplex („soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“) und seinen regulatorischen Molekülen basiert, ist das Merkmal des Nervensystems sowohl in Neuronen als auch in neuroendokrinen Zellen. Zellen des Immunsystems benutzen einen ähnlichen Mechanismus, um zytotoxische Substanzen aus sekretorischen Granulen freizusetzen. Diese Sekretion findet an Kontaktzonen mit Zelle statt, die mit Viren oder Bakterien infiziert sind sowie Krebszellen, um diese Bedrohung zu beseitigen. Diese Kontaktzonen werden als immunologische Synapsen bezeichnet im Hinblick auf die hochspezifische, zielgerichtete Exozytose von Effektormolekülen. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass Mutationen in den SNARE oder SNARE-interagierenden Proteinen die Grundlage für zahlreiche schwerwiegende immunologische Erkrankungen sind. Obwohl SNARE-Komplexe ubiquitär vorkommen und eine große Vielfalt an Fusionsereignissen an der Membran vermitteln, ist es überraschend, dass in vielen Fällen die gleichen SNARE – Proteine an der immunologischen Synapse beteiligt sind, die die Regulation der Exozytose von Transmittern und Hormonen in Neuronen und neuroendokrinen Zellen vermitteln. Diese Ähnlichkeiten zeigen die Möglichkeit auf, dass Erkenntnisse, die von immunologischen Synapsen erhalten wurden, auch auf neuronale Synapsen zutreffen, insbesondere im Bereich der präsynaptischen Funktion. Da immunologische Synapsen (IS) innerhalb von etwa 30 Minuten gebildet und wieder abgebaut werden, ermöglicht

die Verwendung von Immunzellen, die aus humanem Blut gewonnen wurden, nicht nur die Untersuchung der molekularen Mechanismen der synaptischen Transmission in menschlichen Zelle, sondern auch Untersuchungen der Bildung und des Abbaus dieser „Synapsen“ mittels bildgebender Verfahren. In diesem Übersichtsartikel vergleichen wir die Ähnlichkeit der Synapsen des Nerven- und Immunsystems und gehen dabei auf unsere Erkenntnisse der Arbeiten der letzten Jahre ein.

Schlüsselwörter: Chromaffinzellen; Immunologische Synapse; SNARE-Proteine; Zytotoxische T-Lymphozyten

Einleitung

Eine Synapse (gr. syn ‚zusammen‘ und haptēin ‚greifen‘) bezeichnet die Kontaktstelle zwischen zwei Zellen, an der über die Freisetzung von Botenstoffen Information übertragen wird. Sie wird üblicherweise unterteilt in Präsynapse, synaptischer Spalt und Postsynapse. Eine riesige Anzahl an Synapsen (ca. 10¹³) im Menschen kommen vor zwischen Neuronen des zentralen Nervensystems und bilden die Grundlage für plastische Prozesse wie Lernen, Gedächtnisbildung und Demenz. Beta-Zellen im Pankreas und Chromaffinzellen in der Nebenniere nutzen ähnliche Mechanismen, um Botenstoffe wie Insulin und Adrenalin freizusetzen, welche dann über den Blutstrom auf viele Zielzellen systemisch wirken. Sowohl natürliche Killerzellen des angeborenen Immunsystems als auch T-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems bilden auf der Suche nach Pathogenen hochspezifische Kontaktstellen mit Antigen-präsentierenden Zellen aus. An diesen Kontaktstellen findet die gezielte Freisetzung von zytotoxischen Substanzen statt, die diese Zielzellen abtöten. Sie werden immunologische Synapsen genannt. Genetische Studien in immun-defizienten Patienten zeigten dabei, dass diese immunologische Synapse (IS) in ihrer Funktion verblüffende Parallelen mit Synapsen im ZNS und neuroendokrinen System aufweist. Obwohl sie als Synapsen bezeichnet werden, gibt es wichtige Unterschiede zwischen immunologischen und neuronalen Synapsen. Es gibt wenig Ähnlichkeit zwischen der Zielzellerkennung durch T-Lymphozyten, wie weiter unten diskutiert wird, und dem

*Korrespondenzautor: Jens Rettig, Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg, E-Mail: jrettig@uks.eu

David R. Stevens, Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg, E-Mail: david.stevens@uks.eu

Erkennungsprozess der neuronalen Synapse, ein faszinierender Bereich (Akins und Biederer, 2006), der jedoch nicht in diesem Artikel behandelt wird. Wir werden uns auf den präsynaptischen Mechanismus konzentrieren, da immunologische Synapse keine postsynaptischen Organisation von Rezeptoren benötigen, eine Notwendigkeit bei echten Synapsen. Die Chromaffinzelle der Nebenniere, die als ein Model für regulatorische Exozytose genutzt wird, bildet auch keinen Kontakt zur Zielzelle aus. Beide, Neurone und Chromaffinzellen generieren große Reserven an Vesikeln und einen präsynaptischen Apparat, der den Transfer der Vesikel vom releasable pool über docking und priming organisiert. T-Lymphozyten fehlt ein reserve pool und sie besitzen keinen releasable pool. Dieses wird im Text diskutiert. T-Lymphozyten exprimieren Komponenten des Fusionsapparates und docking und priming findet doch statt.

Allein im letzten Jahrzehnt wurden Proteine wie Syntaxin11, Munc13-4, Munc18-2 und Rab27a identifiziert, deren Mutation aufgrund des vollständigen Ausfalls der Funktion der immunologischen Synapse zu letalen Immunphänotypen führt (Janka, 2012). Diese Ergebnisse zeigen grundsätzliche Ähnlichkeiten zwischen Exozytose von Lymphozyten und neuronalen und neuroendokrinen Zellen. Im Gegensatz zu Synapsen im ZNS und neuroendokrinen Geweben bilden sich immunologische Synapsen innerhalb von 30 Minuten und werden schnell abgebaut, sodass neue Zielzellen gefunden werden können. So ist neben der Untersuchung der Synapsenfunktion auch die Untersuchung der Synapsenbildung und des Synapsenabbaus mit hochauflösenden Methoden möglich. Zusammen mit der Verfügbarkeit menschlichen Materials aus Primärblood eröffnet das Studium der immunologischen Synapse damit Erkenntnisse, die im Rückschluss auf die neuronalen Synapsen übertragbar sind. Im Falle der präsynaptischen Funktion und dem Recycling des exozytotischen Apparates scheint dies zuzutreffen.

In diesem Übersichtsartikel fassen wir die Prozesse der Bildung, der Funktion und des Abbaus der immunologischen Synapse zusammen und vergleichen diese Prozesse, wo möglich, mit Erkenntnissen aus Chromaffinzellen der Nebenniere.

Synapsenbildung

Neuronale Synapsen werden als Antwort auf interzelluläre Interaktionen von Adhäsionsmolekülen gebildet (Akins und Biederer, 2006). Beide, Neuroligin-Proteine und SynCAM1, sind Marker für postsynaptische Kontaktstellen.

Sobald Neurone mit einem dieser Marker, auch in non-neuronalen Zellen, in Kontakt kommen, wird eine präsynaptische Spezialisierung in den Neuronen induziert. Adhäsionsmoleküle akkumulieren an diesen Kontaktstellen und ziehen andere assoziierte Moleküle an, die an der Bildung der Aktiven Zone beteiligt sind. Die Moleküle der aktiven Zone und des Exozytoseapparates interagieren mit Bindungsstellen der zytosolischen Bereiche der Adhäsionsmoleküle und untereinander. In Neuronen und Chromaffinzellen wirken große Multi-Domänen-Proteine wie Bassoon und Piccolo als Gerüst und organisieren die Strukturen, die für den Transfer der Vesikel vom Reserve Pool zum Docking- und Priming Apparat nötig sind (Gundelfinger et al., 2015). Diese Organisationsmoleküle werden mit anderen Komponenten der aktiven Zone, wie Piccolo, Bassoon, Syntaxin, RIM, Munc-18, ELKS2/CAST, SNAP-25 und n-Cadherin in Transportvesikeln zu den präsynaptischen Kompartimenten geliefert. Diese Transportvesikel wandern entlang von Mikrotubuli (Bury und Sabo, 2016). Die Moleküle der aktiven Zone und ihre Transportvesikel werden im Soma generiert, genauso wie synaptische Vesikel und LDCVs. In Neuronen erfolgt dieser Transport über lange Distanzen. In Chromaffinzellen sind die Distanzen viel kürzer, aber die Organisation ist ähnlich. Die aktive-Zone – Proteine sind nicht nur am Docking und Priming beteiligt, sie ziehen auch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle an, die für die stimulierte Exozytose notwendig sind. Bis jetzt ist es nicht gelungen, jedem einzelnen Molekül eine bestimmte Funktion zuzuordnen. Studien, in denen einzelne Moleküle herunterreguliert (knockdown) oder entfernt wurden (knockout), haben überraschend geringfügige Unterschiede im Phänotyp gezeigt (Südhof, 2012). Es mag sein, dass die vielen Interaktionen dieser Multi-Domän-Proteine eine funktionelle Redundanz hervorrufen, besonders in bereits entwickelten Geweben.

Chromaffinzellen der Nebenniere kontrollieren über die Sekretion von den Katecholaminen (Adrenalin und Noradrenalin) wichtige physiologische Parameter, wie zum Beispiel den Blutdruck und den Herzschlag. Die Katecholamine werden in large dense core vesicles (LDCVs) gespeichert, die eine Vielzahl von Maturierungsschritten durchlaufen (Fig. 1). Die Biogenese dieser Granulen steht jedoch nicht im Blickfeld dieser Übersicht. Die v-SNARE Proteine Synaptobrevin und die Synaptotagmine werden mit Rab3, Synaptophysin, vATPase, und Neurotransmitter Transporter (VMAT bei Chromaffinzellen) erworben während des Trafficking durch das trans-Golgi und endosomale Kompartimente, wo viele dieser Verbindungen wiederverwertet werden. Nach dem Transport zur Plasmamembran werden die LDCVs in einem Docking-Prozess an

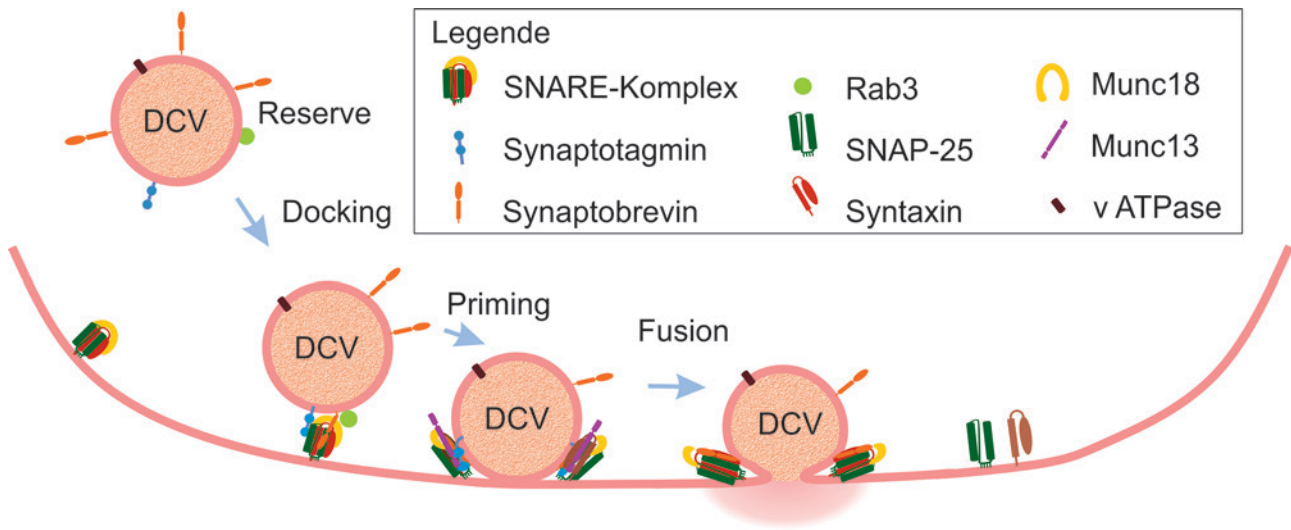


Abb. 1: Synapsenfunktion in Chromaffinzellen der Nebenniere. Cartoon mit den wichtigsten Schritten der LDCV-Reifung und den beteiligten Proteinen. LDCVs aus dem Reserve Pool im Zellinneren werden über das Zytoskelett zur Plasmamembran transportiert und dort verankert. Nach diesem Docking-Prozess werden LDCVs an der Plasmamembran durch den Priming-Prozess fusionskompetent gemacht. Anschließend erfolgt nach Ca^{2+} -Einstrom die Fusion mit der Plasmamembran und die Freisetzung der Katecholamine.

der Plasmamembran verankert. Chromaffinzellen dienen als Modell zur Erforschung präsynaptischer Prozesse.

und Fusion von LDCVs in Chromaffinzellen beteiligt (Stevens et al., 2011).

Docking, Priming und Fusion von LDCVs in Chromaffinzellen

Der Docking-Komplex wird über eine Interaktion der beiden plasmamembranständigen SNARE-Proteine Syntaxin1 und SNAP-25 mit dem vesikelständigen Protein Synaptotagmin initiiert (de Wit et al., 2009). Die Verfügbarkeit von Syntaxin1 und damit die Effizienz des Docking-Prozesses wird dabei durch Munc18 reguliert. Das gedockte LDCV ist damit aber noch nicht fusionskompetent, sondern muss erst einen weiteren Maturierungsprozess, das sogenannte Priming, durchlaufen. Munc13-Proteine sind für das Priming der meisten Synapsen unbedingt notwendig. Sie katalysieren den Zusammenbau des SNARE-Komplexes aus Syntaxin1, SNAP-25 und dem vesikelständigen SNARE-Protein Synaptobrevin2. Vor Kurzem wurde gezeigt, dass Munc13 Proteine auch beim Priming-Prozess in Chromaffinzellen beteiligt sind (Man et al., 2015). Der SNARE-Komplex kann dann, nach Einstrom von Ca^{2+} in die Präsynapse und Bindung des Ca^{2+} an Synaptotagmin, die Fusion des LDCVs mit der Plasmamembran und die Ausschüttung der Katecholamine vermitteln. Eine Vielzahl weiterer Proteine, wie z. B. Complexin und CAPS, ist darüber hinaus an der Regulation von Docking, Priming

Synapsenbildung in CTLs

Zytotoxische T-Lymphozyten patrouillieren auf der Suche nach Infektionen durch das komplette menschliche Gewebe. Sie werden im Blutstrom transportiert, durchdringen Gefäßwände und migrieren durch sämtliche Organe des Körpers. Haben Sie infiziertes Gewebe detektiert, können sie nach Aktivierung eine große Anzahl an Zielzellen hintereinander abtöten, man spricht von „serial killing“. Von offensichtlich großer Wichtigkeit ist dabei die Präzision der Zielerkennung, denn CTLs sollen nur diejenigen Zellen abtöten, die körperfremdes Material präsentieren. Demzufolge existiert ein großer Gegensatz zwischen Chromaffinzellen, die einen großen Pool an freisetzbaren LDCVs vorhalten, und CTLs, die nur wenige CGs bereithalten und diese bei Bedarf zur IS transportieren.

Die Bildung der IS beginnt mit der Erkennung von präsentierten Antigenen auf der Oberfläche der Zielzellen durch T-Zell-Rezeptoren der CTLs (Abb. 2). Die Präsentation erfolgt durch MHC (major histocompatibility complex)-Komplexe, die durch das Proteasom degradierte Peptide im endoplasmatischen Retikulum binden und diese nach Transport zur Plasmamembran auf der Zelloberfläche präsentieren. Die Mehrzahl der präsentierten Peptide ist nicht körperfremd und führen dementsprechend zu keiner Im-

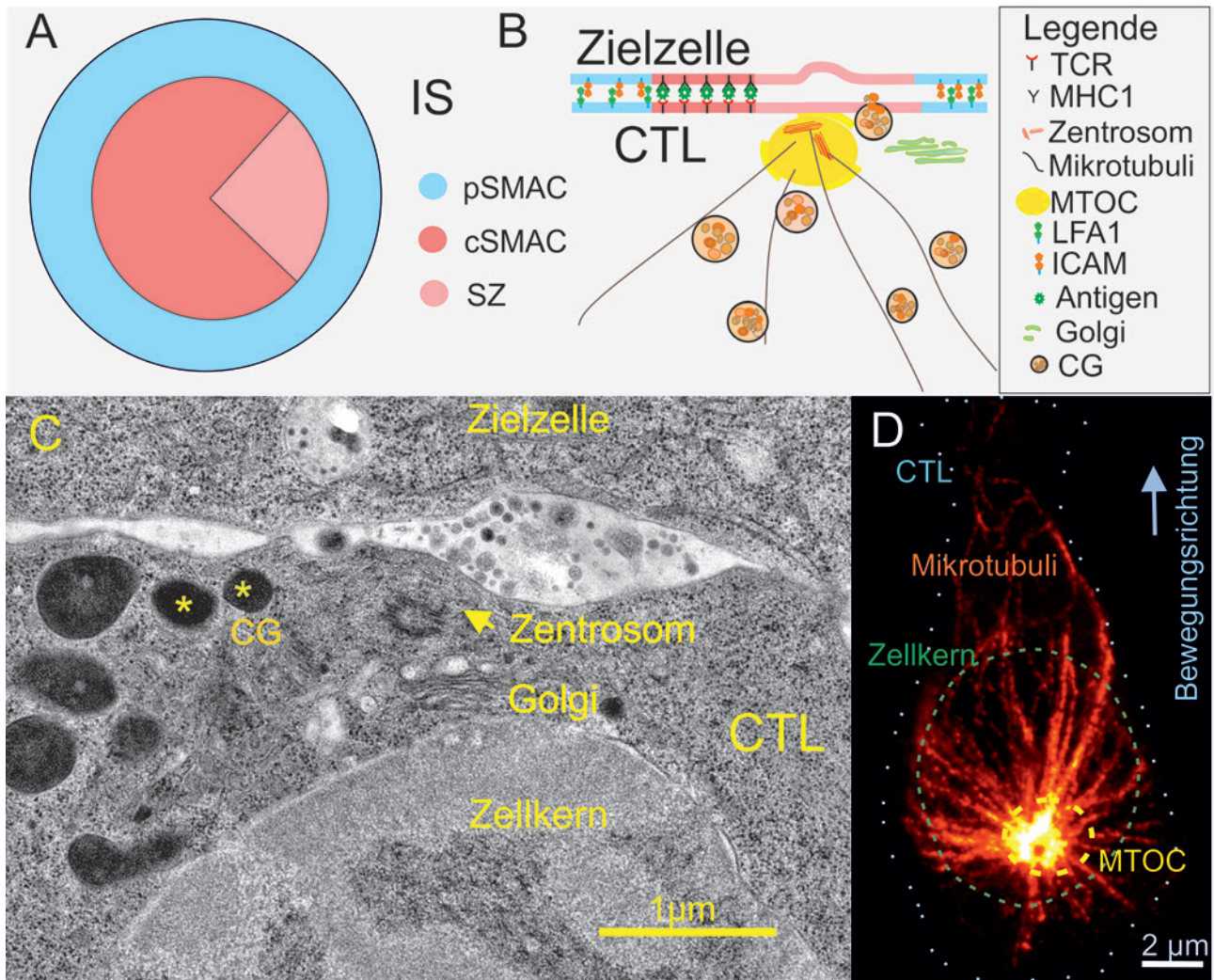


Abb. 2: Wichtige subzelluläre Areale zytotoxischer T-Lymphozyten. **A** Nach Kontakt mit einer Antigen-präsentierenden Zelle bilden zytotoxische T-Lymphozyten eine immunologische Synapse (IS) aus. Die IS lässt sich in den peripheren und zentralen „supramolecular activation cluster“ unterteilen (Blick von oben). Im cSMAC befindet sich die sekretorische Zone (SZ), an der die Fusion der zytotoxischen Granula (CG) erfolgt. **B** CGs werden entlang des Zytoskeletts zur IS transportiert. **C** Eine elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die Kontaktstelle zur Zielzelle (IS) sowie einige CGs, die entlang des Zentrosoms (MTOC) zur IS transportiert wurden. **D** Stimulated emission depletion (STED) Aufnahme einer primären CTL mit angefärbten Mikrotubuli und Zentrosom (MTOC).

munantwort. Umgekehrt ist die Erkennung körperfremder Peptide durch die T-Zell-Rezeptoren hochspezifisch und triggert die nachfolgende Kaskade, an deren Ende das Abtöten der Antigen-präsentierenden Zelle durch Freisetzung zytotoxischer Substanzen aus CG steht.

Bindung der T-Zell-Rezeptoren (TCR) führt zunächst zu einer Stärkung der Kontaktstelle durch Interaktion der Adhäsionsmoleküle LFA1 (CTL) und ICAM1 (Zielzelle).

Wie in Neuronen spielt der Adhäsionsprozess eine Hauptrolle in der Generierung und Erhaltung der Kontaktstelle – genauso wie in der Signalgebung, obwohl der Zielzellerkennung in CTLs wenig mit der Zielerkennung in Neuronen gemeinsam hat. Im Gegensatz zur neuronalen

synaptischen Entwicklung gibt es hier keine Organisation der postsynaptischen Antwort. Die Induktion des Zelltods erfolgt durch die Internalisierung des zytotoxischen Moleküls Granzym, welche durch die gleichzeitig freigesetzten Proteine Granulysin und Perforin erleichtert wird.

Es bildet sich ein sogenannter „supramolecular activation cluster (SMAC)“, wobei der T-Zell-Rezeptor das Zentrum besetzt (central SMAC; cSMAC) und die Adhäsionsmoleküle kreisförmig darum angeordnet sind (peripheral SMAC; pSMAC). Die Konzentration der T-Zell-Rezeptoren im cSMAC lockt Signalmoleküle wie Kinasen an und führt über Aktivierung von Phospholipasen zur Bildung von DAG und IP₃. Das gebildete IP₃ induziert die Entleerung

der Ca^{2+} -Speicher im ER und führt zur Aktivierung der CRAC (calcium release-activated calcium)-Kanäle in der Plasmamembran. Der resultierende Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration initiiert nun eine starke Polarisierung der T-Zelle und den zielgerichteten Transport der CGs und anderer Vesikel zur IS. Zunächst transloziert das Centrosom („microtubule organizing center (MTOC)“) vom der Zielzelle abgewandten Ende der Zelle zu einer Position unmittelbar unterhalb der IS. Ausgehend vom MTOC findet nun eine Polymerisation sowohl von Aktin als auch von Tubulin statt (Abb. 3). Aktinpolymerisation überbrückt den finalen Transport der CGs zur IS. Die Tubulin-Polymerisation ermöglicht die Projektion der Mikrotubuli ins Innere der Zelle. Entlang dieses entstandenen Zytoskeletts werden nun mittels Dynein- und Myosin-abhängigen Transport diverse Vesikelarten in sequenzieller Weise zur IS gebracht.

Die ersten Vesikel, die innerhalb der ersten Minute nach Zellkontakt eintreffen, sind Rab11-positive Recycling-Endosomen. Befunde aus unserem Labor konnten zeigen, dass diese Recycling-Endosomen essenziell für den Transport von Cargo sind, der später für das Docking, Priming und die Fusion zytotoxischer Granula benötigt wird (Marshall et al., 2015). Zu den identifizierten Proteinen auf Recycling-Endosomen, die in VAMP8-abhängiger Weise mit der Plasmamembran an der IS fusionieren, gehören Syntaxin11 und Munc13-4. Die plasmamembranständigen SNARE- und SNARE-assoziierte Proteine akkumulieren in einem Teil des cSMAC und bilden die sogenannte Sekretionsdomäne. Ähnlich wie bei der aktiven Zone in neuronalen Synapsen findet ausschließlich in diesem Bereich Docking, Priming und Fusion zytotoxischer Granula statt. Die ersten CGs erreichen die IS wenige Minuten nach Kontaktbildung, und die Fusion von durchschnittlich 1-2 Granula/CTL ist etwa 15 Minuten nach Kontaktbildung abgeschlossen.

Docking, Priming und Fusion zytotoxischer Granula in CTLs

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind Teil des adaptiven Immunsystems und töten Antigen-präsentierende Zellen durch die Freisetzung der zytotoxischen Substanzen Perforin und Granzym aus zytotoxischen Granula. CGs sind mit Lysosomen-verwandte Organellen, die etwas größer sind als LDCVs von Chromaffinzellen und ebenfalls einen dichten Kern aus Proteinen enthalten. Nahezu sämtliches Wissen über die molekularen Mechanismen von Docking, Priming und Fusion zytotoxischer Granula basiert auf leta-

ren Immunerkrankungen wie dem Griscelli-Syndrom oder der familiären hämophagozytischen Lymphohistiozytose (FHL) (Janka, 2012; de Saint Basile et al., 2010).

Patienten mit Griscelli-Syndrom Typ2 haben Mutationen im GTP-bindenden Protein Rab27a und zeigen neben Albinismus eine Immunschwäche, die ohne Knochenmarktransplantation tödlich verläuft. In CTLs interagiert Rab27a mit MyosinV und sorgt für das korrekte Docking von CGs an der Plasmamembran der IS. Darüber hinaus interagiert Rab27a mit Munc13-4, einem Mitglied der Munc13-Familie. Wie seine Isoformen in ZNS und im neuroendokrinen System ist Munc13-4 für das Priming zytotoxischer Granula verantwortlich. Mutationen im Munc13-4 Gen führen zur ebenfalls tödlich verlaufenden Immunschwäche FHL Typ 3, da CTLs dieser Patienten keine Zielzellen mehr abtöten können (Ménager et al., 2007). Auch Mutationen in Munc18-2 führen zu FHL, in diesem Fall Typ 5, und sind auf die bereits in neuronalen Synapsen beschriebene Funktion von Munc18 beim Docking-Prozess zurückzuführen. Die Fusion zytotoxischer Granula wird, ebenso wie die Exozytose von LDCVs in Chromaffinzellen, durch SNARE-Proteine vermittelt. Auch in diesem Fall wurde ein plasmamembranständiges SNARE-Protein, Syntaxin11, durch menschliche Mutationen, die zu FHL Typ 4 führen, identifiziert (Kögl et al., 2013). Weitere Komponenten des fusions-vermittelnden SNARE-Komplexes sind Synaptobrevin2 auf der Vesikelmembran sowie vermutlich SNAP-23 in der Plasmamembran. Im Gegensatz zu neuronalen Synapsen ist an der immunologischen Synapse bisher ungeklärt, ob Synaptotagmin oder andere Ca^{2+} -bindende Proteine beim eigentlichen Fusionsprozess eine Rolle spielen. Die Übersicht der an Docking, Priming und Fusion von CG beteiligten Proteine verdeutlicht die verblüffende Übereinstimmung mit den molekularen Mechanismen an der neuronalen Synapse (Abb. 3) (Becherer et al., 2012).

Synapsenabbau

In ihrer Funktion als „serial killer“ müssen CTLs in der Lage sein, ihre Synapsen nach erfolgreicher Fusion von CGs schnell abzubauen. Deshalb erfolgt bereits 15-30 Minuten nach Etablierung des ersten Kontakts mit einer Antigen-präsentierenden Zelle der koordinierte Abbau der IS. Die Lebenszeit einer immunologischen Synapse ist viel kürzer als die einer neuronalen Synapse, obwohl in beiden Synapsen das Wiederverwerten der Vesikelbestandteile wichtig ist für ihre Funktion. T-Zell-Rezeptoren sowie an der Fusion beteiligte, integrale Plasmamembran-Pro-

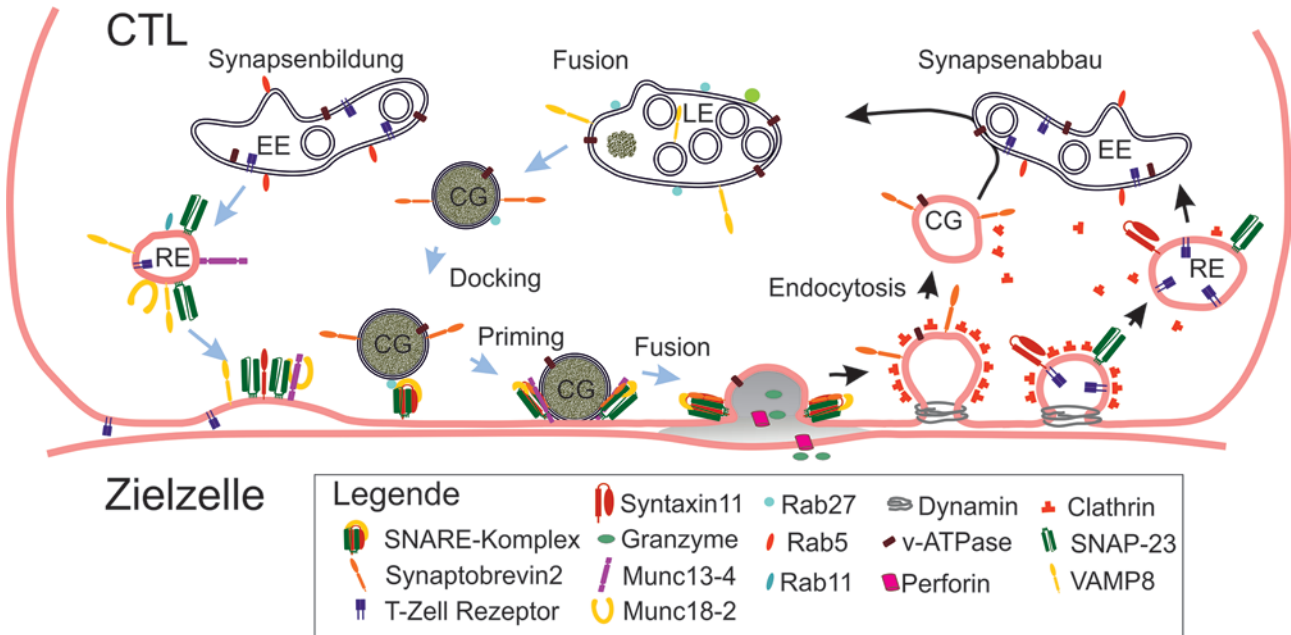


Abb. 3: Synapsenbildung, Synapsenfunktion und Synapsenabbau in zytotoxischen T-Lymphozyten. Links: Die Bildung der immunologischen Synapse (IS) startet mit der Abschnürung von Recycling-Endosomen von frühen Endosomen. Die Recycling-Endosomen werden zur IS transportiert und fusionieren in VAMP8-abhängiger Weise mit der Plasmamembran. Recycling-Endosomen bringen Proteine, die für das spätere Docking, Priming und Fusion der zytotoxischen Granula (CG) benötigt werden, zur IS. Mitte: Nach erfolgter Maturierung über späte Endosomen und Lysosomen polarisieren CGs zur Plasmamembran und werden dort verankert (Docking). Nach dem Priming durch das Protein Munc13-4 vermittelt der SNARE-Komplex die Fusion. Rechts: Entleerte CGs werden durch Endozytose in das Zellinnere gebracht und verschmelzen dort mit frühen Endosomen.

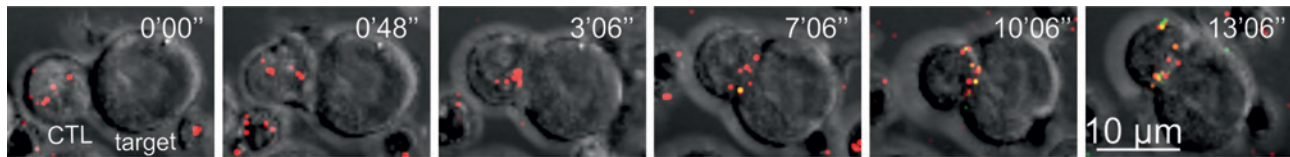
teine wie Syntaxin11 werden über Recycling-Endosomen in das Zellinnere zurückgeholt und entweder degradiert oder auf Stufe der frühen Endosomen in den Recycling-Pathway eingespeist.

Auch die Membrankomponenten von CGs werden im Rahmen des Synapsenabbaus wiederverwertet. Wie wir kürzlich mithilfe einer Synaptobrevin2-mRFP Knockin-Maus zeigen konnten, erfolgt das Recycling jedoch nicht über Recycling-Endosomen, sondern über einen unabhängigen Weg (Chang et al., 2016). Synaptobrevin2, das für die CG Fusion verantwortliche vSNARE (Matti et al., 2013), bleibt unmittelbar nach der Fusion in Clusters an der Plasmamembran und kann mit einem monoklonalen Antikörper gegen den luminalen (intravesikulären) Bereich des Proteins detektiert werden (Abb. 4). Innerhalb weniger Minuten wird Synaptobrevin2, zusammen mit weiteren CG Membranproteinen, wie z. B. der vesikulären H^+ -ATPase, an der IS endozytiert. Wie die Endozytose synaptischer Vesikel in Neuronen (Soykan et al., 2016), ist auch die Endozytose der CG in CTLs durch Clathrin und Dynamin vermittelt. Des Weiteren spielt das Synaptobrevin2-spezifische Adapterprotein CALM (Koo et al., 2011) eine essenzielle Rolle. Nach erfolgter Endozytose werden die CGs angesäuert und gelangen über frühe endosoma-

le Kompartimente in späte Endosomen. Hier werden sie erneut mit zytotoxischen Komponenten wie Granzym B befüllt und stehen nach diversen Maturierungsschritten für weitere Fusionsprozesse an neugebildeten Synapsen zur Verfügung. Etwa 50% der Killing-Effizienz, die CTLs auszeichnet, wird durch das effiziente Recycling von CG-Membranproteinen erreicht. Der Synapsenabbau inklusive der Endozytoseprozesse ist dabei schnell genug, um bereits nach wenigen Minuten erneut eine neue IS bilden und weitere Antigen-präsentierende Zellen abtöten zu können (Chang et al., 2016).

Fazit

Die immunologische Synapse zwischen zytotoxischen T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen besitzt viele Ähnlichkeiten mit den neuronalen Synapsen im zentralen Nervensystem. Zusätzlich zur Untersuchung der präsynaptischen Funktion ist in CTLs der Zugang zu den Prozessen der Synapsenbildung und des Synapsenabbaus möglich. Dazu verfügen wir über ein System, das die Erforschung dieser Prozesse mit hochauflösenden live- bildge-



Synaptobrevin2-mRFP anti-RFP488

Abb. 4: Visualisierung der Endozytose zytotoxischer Granula in Echtzeit. Konfokalmikroskopische Aufnahmenserie einer zytotoxischen T Lymphozyte (CTL) in Kontakt mit einer Antigen-präsentierenden Zelle (target). Die zytotoxischen Granula sind durch die endogene Expression von Synaptobrevin2-mRFP rot gefärbt. In der Badlösung befindet sich ein mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff markierter anti-Synaptobrevin2 -Antikörper, der nur an das Synaptobrevin2 binden kann, wenn sich dieses nach Vesikelfusion in der Plasmamembran befindet. Die Serie beginnt mit dem Kontakt zwischen CTL und Zielzelle (0'00''), zum Zeitpunkt 3'06'' hat sich eine immunologische Synapse gebildet (erkennbar an der Polarisierung der Granula zur Zielzelle). Im nächsten Bild (7'06'') hat die Fusion einzelner CG stattgefunden, denn der grüne Antikörper bindet an das rote Synaptobrevin2 in der Plasmamembran (gelb). Am Ende der Serie (13'06'') ist zu erkennen, dass mehrere CGs durch Endozytose in das Zellinnere transportiert wurden.

benden Verfahren ermöglicht. Zusammen mit der Verfügbarkeit von primärem Material aus Menschen gibt es also Argumente, die immunologische Synapse als zukünftiges Modellsystem für Aspekte der synaptischen Funktion heranzuziehen.

Abkürzungen

CG	zytotoxisches Granulum
CRAC	„calcium release-activated calcium“
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
FHL	familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose
IS	immunologische Synapse
LDCV	„large dense-core vesicle“
MHC	„major histocompatibility complex“
MTOC	Mikrotubuli Organisations-Zentrum
SMAC	„supramolecular activation cluster“
SNARE	„soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“
TCR	T-Zell Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

Literatur

- Akins, M.R. and Biederer, T. (2006). Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 83–89.
- Becherer, U., Medart, M.R., Schirra, C., Krause, E., Stevens, D. and Rettig, J. (2012). Regulated exocytosis in chromaffin cells and cytotoxic T lymphocytes: how similar are they? *Cell Calcium* 52, 303–312.
- Bury, L.A.D. and Sabo, S.L. (2016). Building a terminal: mechanisms of presynaptic development in the CNS. *Neuroscientist* 22, 372–391.
- Chang, H.-F., Bzeih, H., Schirra, C., Chitrala, P., Halimani, M., Cordat, E., Krause, E., Rettig, J. and Pattu, V. (2016). Endocytosis of cytotoxic granules is essential for multiple

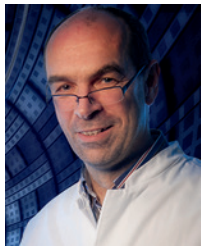
killing of target cells by T lymphocytes. *J. Immunol.* 197, 2473–2484.

- Gundelfinger, E.D., Reissner, C. and Garner, C.C. (2015). Role of Bassoon and Piccolo in Assembly and Molecular Organization of the Active Zone. *Front. Synaptic Neurosci.* 7, 19.
- Janka, G.E. (2012). Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Annu. Rev. Med.* 63, 233–246.
- Kögl, T., Müller, J., Jessen, B., Schmitt-Graeff, A., Janka, G., Ehl, S., zur Stadt, U. and Aichele, P. (2013). Hemophagocytic lymphohistiocytosis in syntaxin-11-deficient mice: T-cell exhaustion limits fatal disease. *Blood* 121, 604–613.
- Koo, S.J., Puchkov, D. and Haucke, V. (2011). AP180 and CALM: Dedicated endocytic adaptors for the retrieval of synaptobrevin 2 at synapses. *Cell Logist.* 1, 168–172.
- Man, K.N.M., Imig, C., Walter, A.M., Pinheiro, P.S., Stevens, D.R., Rettig, J., Sørensen, J.B., Cooper, B.H., Brose, N. and Wojcik, S.M. (2015). Identification of a Munc13-sensitive step in chromaffin cell large dense-core vesicle exocytosis. *Elife* 4.
- Marshall, M.R., Pattu, V., Halimani, M., Maier-Peuschel, M., Müller, M.-L., Becherer, U., Hong, W., Hoth, M., Tschernig, T., Bryceson, Y.T. et al. (2015). VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *J. Cell. Biol.* 210, 135–151.
- Matti, U., Pattu, V., Halimani, M., Schirra, C., Krause, E., Liu, Y., Weins, L., Chang, H.F., Guzman, R., Olausson, J. et al. (2013). Synaptobrevin2 is the v-SNARE required for cytotoxic T-lymphocyte lytic granule fusion. *Nat. Commun.* 4, 1439.
- Ménager, M.M., Ménasché, G., Romao, M., Knapnougél, P., Ho, C.-H., Garfa, M., Raposo, G., Feldmann, J., Fischer, A. and de Saint Basile, G. (2007). Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. *Nat. Immunol.* 8, 257–267.
- De Saint Basile, G., Ménasché, G. and Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 568–579.
- Soykan, T., Maritzen, T. and Haucke, V. (2016). Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 17–23.
- Stevens, D.R., Schirra, C., Becherer, U. and Rettig, J. (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. *Front. Synaptic Neurosci.* 3, 2.
- Südhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11–25.

De Wit, H., Walter, A.M., Milosevic, I., Gulyás-Kovács, A., Riedel, D., Sørensen, J.B. and Verhage, M. (2009). Synaptotagmin-1 docks secretory vesicles to syntaxin-1/SNAP-25 acceptor complexes. *Cell* 138, 935–946.

Anmerkung: Übersetzung der englischen Version des Artikels online verfügbar unter <https://doi.org/10.1515/nf-2016-A052>

Autoreninformationen



Univ.-Prof. Dr. Jens Rettig
Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg
Tel: +49 6841 1616400
Fax: +49 6841 1616402
E-Mail: jrettig@uks.eu

Jens Rettig studierte Biologie und Chemie an der Ruhr-Universität Bochum und promovierte anschließend bei Olaf Pongs am Zentrum für molekulare Neurobiologie in Hamburg über beta-Untereinheiten spannungsabhängiger Kalium-Kanäle. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der University of Washington in Seattle bei Bill Catterall leitete er eine Nachwuchsgruppe in der Abteilung von Erwin Neher am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Seit 2000 ist er Professor für Physiologie an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg. Momentan fungiert er dort als einer von zwei Gründungsdirektoren des Centrums für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) sowie als Sprecher des SFB 894 „Ca²⁺-Signale: Molekulare Mechanismen und Integrative Funktionen“. Seit 2008 ist er Mitglied der Deutschen Akademie der Wissenschaften Leopoldina und seit 2009 Mitglied des Councils der „International Union of Physiological Sciences (IUPS)“.



David R. Stevens
Universität des Saarlandes, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM), Abteilung Zelluläre Neurophysiologie, Gebäude 48, 66421 Homburg
Tel: +49 6841 1616405
Fax: +49 6841 1616402
E-Mail: david.stevens@uks.eu

David R. Stevens studierte Biologie an der Texas A&M University und promovierte danach an der University of Texas in Galveston über GABAerge Transmission im lateralen Septum. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der University of California in Irvine bei Carl Cotman arbeitete er als Instructor an der Harvard Medical School im Department of Psychiatry. Anschließend wechselte er als wissenschaftlicher Mitarbeiter an die Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf bei Helmut Haas, um dann an der Universität des Saarlandes mit Bernd Lindemann an Geschmacksrezeptoren zu arbeiten. Seit 2001 leitet er eine Arbeitsgruppe am Lehrstuhl für Zelluläre Neurophysiologie der Universität des Saarlandes.