

Die synaptische Architektur der äußeren plexiformen Schicht der Säugetierretina

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften**

Vorgelegt beim Fachbereich 15 der
Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt am Main.

von **Christian Puller**
aus Lübbecke

Frankfurt am Main, 2009

D30

vom Fachbereich 15 (Biowissenschaften) der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

Gutachter: Prof. Dr. Heinz Wässle und Prof. Dr. Leo Peichl

Datum der Disputation: 25. Mai 2009

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
I. Einleitung	9
I.1 Die Säugetierretina	9
I.1.1 Photorezeptoren	11
I.1.2 Bipolarzellen	13
I.1.3 Horizontalzellen	14
I.2 Synaptische Architektur der OPL	17
I.2.1 Chemische Synapsen: die Zapfenendfüßchen	17
I.2.2 Elektrische Synapsen: die <i>gap junctions</i>	20
I.2.3 Protocadherine	24
I.3 Der S-Zapfen-Signaltransduktionsweg	25
I.4 Zielsetzung	27
II. Material und Methoden	29
II.1 Versuchstiere	29
II.2 Genotypisierung der Clm1-Mäuse	29
II.3 Vorbereitende Präparation für die Immunhistochemie	31
II.4 Indirekte Immunfluoreszenz	32
II.4.1 Retinapräparation	32
II.4.2 Immunfärbung der Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie	34
II.4.3 Epi- und konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie	35
II.6 Analyse der Spezifität von Antikörpern mittels <i>Western Blot</i>	36
II.6.1 Anfertigung eines Retina-Totalhomogenats	36
II.6.2 Proteinmengenbestimmung des Totalhomogenats	37
II.6.3 SDS-PAGE und <i>Western Blot</i>	38
II.6.4 Immunfärbung der Blot-Membran und Chemolumineszenz-Reaktion	39
II.7 <i>pre-embedding</i> Immunzytochemie	40
II.8 Transmissionselektronenmikroskopie	42
II.9 Mikroinjektion von Horizontalzellen	42
II.10 Verwendete Primär- und Sekundäntikörper	44
II.11 Bildbearbeitung und –auswertung	49
II.12 Lösungen und Puffer	50

II.13 Chemikalien und Reagenzien.....	52
II.14 Geräte und Hilfsmittel.....	53
III. Ergebnisse	55
III.1 Anatomische Eigenschaften des S-Zapfenendfüßchens der Mausretina.....	55
III.1.1 Postsynaptische Expression von mGluR6.....	55
III.1.2 Invaginierungen am Zapfenendfüßchen.....	56
III.1.3 Größe der Basis von Zapfenendfüßchen.....	60
III.1.4 Postsynaptische Expression von ionotropen GluRs der OFF-Bipolarzellen.....	61
III.1.5 Kontakte von OFF-Bipolarzellen am Zapfenendfüßchen.....	64
III.1.6 Horizontalzellkontakte am S-Zapfenendfüßchen der Mausretina.....	67
III.1.7 Syntaxin-4 am Zapfenendfüßchen der Mausretina.....	70
III.1.8 Syntaxin-4 und GABA-Rezeptoren am S-Zapfenendfüßchen der Makakenretina.....	71
III.2 <i>Gap junctions</i> und ZO-1 in der Säugetier-Retina.....	75
III.2.1 ZO-1 in der Retina.....	75
III.2.2 ZO-1 und Cx50 in der Kaninchenretina.....	76
III.2.3 ZO-1, Cx57 und Cx36 in der OPL von Maus- und Kaninchenretinae.....	78
III.2.4 ZO-1 am Zapfenendfüßchen in der Makakenretina.....	80
III.2.5 ZO-1 und GluRs unterhalb von Zapfenendfüßchen.....	82
III.2.6 ZO-1 und Cx36 an S-Zapfen der Makaken- und der Mausretina.....	85
III.2.7 <i>Tight</i> und <i>adherens junction</i> -assoziierte Proteine in der Retina.....	89
III.3 Protocadherin β 16 und GluRs in der OPL der Makakenretina.....	95
III.3.1 Protocadherin β 16 am Zapfenendfüßchen.....	95
III.3.2 Protocadherin β 16 am S-Zapfenendfüßchen.....	98
III.3.3 AMPA- und Kainat-Rezeptoren am Zapfenendfüßchen.....	98
IV. Diskussion	101
IV.1 Anatomische Besonderheiten des S-Zapfenendfüßchens.....	101
IV.2 Existiert eine Grün-OFF-Signalweg in der Mausretina?.....	103
IV.3 ZO-1 in der Säugetierretina.....	107
IV.3.1 Architektur von <i>gap junctions</i>	109
IV.3.2 Modulation von Horizontalzellen.....	113
IV.4 Protocadherin β 16.....	117
V. Zusammenfassung	120
Literaturverzeichnis.....	122
Danksagung.....	134
Eidesstattliche Erklärung.....	135
Curriculum Vitae.....	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Säugetierretina.	10
Abbildung 2: Bipolarzelltypen der Mausretina.	13
Abbildung 3: Schema der Horizontalzelltypen in der Maus-, der Kaninchen- und der Primatenretina.	15
Abbildung 4: OFF-Bipolarzellkontakte am Zapfenendfüßchen.	17
Abbildung 5: Die Struktur des Zapfenendfüßchens der Makakenretina.	18
Abbildung 6: Lokalisation von GluR5 auf vertikalen Kryoschnitten der Makakenretina.	19
Abbildung 7: Lokalisation von GluR4 und GluR6/7 am Zapfenendfüßchen.	20
Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer <i>gap junction</i> .	21
Abbildung 9: Elektrische Kopplung verschiedener Neurone der Mausretina.	22
Abbildung 10: S-Zapfenbipolarzellen der Maus und des Makakens.	25
Abbildung 11: Blau-ON/Gelb-OFF-Signalübertragung in der Primatenretina.	27
Abbildung 12: Expression von mGluR6 am S-Zapfenendfüßchen.	55
Abbildung 13: mGluR6 und PNA am Zapfenendfüßchen.	56
Abbildung 14: PNA am S-Zapfenendfüßchen.	57
Abbildung 15: Analyse der PNA-Markierung an Zapfenendfüßchen der Mausretina mit ImageJ.	58
Abbildung 16: Histogramm der Fluoreszenzflächen von PNA an einzelnen S- und M-Zapfen.	59
Abbildung 17: Proteinbänder der Zapfenendfüßchen.	60
Abbildung 18: Die basalen Membranen der Zapfenendfüßchen.	60
Abbildung 19: Histogramm der Glypho-Flächen an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.	61
Abbildung 20: Expression von GluR5 am Zapfenendfüßchen.	62
Abbildung 21: Histogramm der Fluoreszenzflächen von GluR5 an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.	62
Abbildung 22: Expression von GluR1 am Zapfenendfüßchen.	63
Abbildung 23: Histogramm der Fluoreszenzflächen von GluR1 an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.	64
Abbildung 24: OFF-Bipolarzellkontakte am Zapfenendfüßchen.	65
Abbildung 25: Histogramm der Fluoreszenzflächen von NK3R an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.	66
Abbildung 26: Histogramm der Fluoreszenzflächen von HCN4 an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.	66

Abbildung 27: Histogramm der Fluoreszenzflächen von Calsenilin an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.	67
Abbildung 28: Horizontalzellkontakte am S-Zapfenendfüßchen.	68
Abbildung 29: Reduktion der Horizontalzellkontakte am S-Zapfenendfüßchen der Mausretina.	69
Abbildung 30: Syntaxin-4 am Zapfenendfüßchen der Mausretina.	70
Abbildung 31: Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen der Mausretina.	71
Abbildung 32: Lokalisation von Syntaxin-4 und GABA-Rezeptoren am Zapfenendfüßchen der Makakenretina.	72
Abbildung 33: Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen der Makakenretina.	73
Abbildung 34: Verteilung von Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen der Makakenretina.	73
Abbildung 35: GABA-Rezeptoren am S-Zapfenendfüßchen der Makakenretina.	74
Abbildung 36: ZO-1 in der Säugetierretina.	76
Abbildung 37: ZO-1 und Cx50 auf A-Typ Horizontalzellen in der Kaninchenretina.	77
Abbildung 38: ZO-1 und Cx50 unter Zapfenendfüßchen in der Kaninchenretina.	78
Abbildung 39: ZO-1 und Cx57 in der Maus- und der Kaninchenretina.	79
Abbildung 40: ZO-1 und Cx36 in der OPL auf vertikalen Kryoschnitten der Maus- und Kaninchenretina.	80
Abbildung 41: ZO-1 und Cx36 in der OPL der Makakenretina.	81
Abbildung 42: ZO-1 und GluRs auf der Ebene der <i>desmosome-like junctions</i> in der OPL der Makakenretina.	82
Abbildung 43: ZO-1 und GluR2/3 unterhalb der Zapfenendfüßchen in der Kaninchenretina.	83
Abbildung 44: GluR2 unterhalb der Zapfenendfüßchen in der Mausretina.	84
Abbildung 45: ZO-1 am S-Zapfen auf H1 Horizontalzellen in der Makakenretina.	85
Abbildung 46: ZO-1 am S-Zapfenendfüßchen in der Makakenretina.	86
Abbildung 47: Cx36 unterhalb der S-Zapfenendfüßchen in der Makakenretina.	87
Abbildung 48: Reduktion von ZO-1 unterhalb der S-Zapfenendfüßchen in der Mausretina.	88
Abbildung 49: Cx36 am S-Zapfenendfüßchen der Mausretina.	89
Abbildung 50: ZO-1 und Occludin in der Mausretina.	91
Abbildung 51: ZO-1 und Occludin in der Makaken- und der Kaninchenretina.	92
Abbildung 52: ZO-1 und Occludin in der Mausretina.	93
Abbildung 53: <i>Western-Blot</i> -Analyse von ZO-1- und Occludin-Antikörpern.	94
Abbildung 54: Pcdh β 16 und GluR3 am Zapfenendfüßchen.	95

Abbildung 55: Pcdh β 16 am Zapfenendfüßchen.	96
Abbildung 56: Pcdh β 16 und GluR3 an unterschiedlichen Zapfenendfüßchen.	97
Abbildung 57: Pcdh β 16 am S-Zapfenendfüßchen.	98
Abbildung 58: AMPA-Rezeptoruntereinheiten am Zapfenendfüßchen.	99
Abbildung 59: GluR3 und GluR6/7 unterhalb des Zapfenendfüßchens.	100
Abbildung 60: Schema der synaptischen Kontakte am Zapfenendfüßchen der Säugetierretina.	108
Abbildung 61: Modell der Verteilung von Proteinen an den hier untersuchten <i>gap junctions</i> .	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für PCR-Hauptansatz	30
Tabelle 2: Pipettierschema für die BSA-Eichreihe	37
Tabelle 3: Primärantikörper zur Antigen-Detektion für <i>Western Blots</i> (WB) und für Präparate der Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie (EM).	45
Tabelle 4: Sekundärantikörper und Reagenzien für die Fluoreszenzmikroskopie	49
Tabelle 5: Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung	50
Tabelle 6: Chemikalien bzw. Reagenzien und deren Bezugsquellen	52
Tabelle 7: Geräte bzw. Hilfsmittel und deren Bezugsquellen	53

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid [engl.] – α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol Propionsäure
AS	Aminosäure(n)
BB	„blaue Bipolarzelle“
BSA	bovine serum albumin [engl.] – Rinderserumalbumin
CaBP	Calbindin
cAMP	zyklisches (cyclic [engl.]) Adenosinmonophosphat
Clm	Clomeleon
Cx	Connexin
Cy3	Inocarbocyanin 3
DAB	3-3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DB	diffuse Bipolarzelle
dk	donkey [engl.]; Esel
DNA	deoxyribonucleic acid [engl.] – Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	enhanced chemilumiscence [engl.] - verbesserte Chemolumiszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
engl.	englisch
FMB	Flat-Midget-Bipolarzelle (flat [engl.] – flach; midget [engl.] – klein)
g	Gramm
GABA	gamma-aminobutyric acid [engl.] – gamma-Aminobuttersäure
GABA-R	GABA-Rezeptor
GCL	ganglion cell layer [engl.] – Ganglienzellschicht
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GluR	Glutamatrezeptor(en)
Glypho	Glykogenphosphorylase
gp	guinea pig [engl.] – Meerschweinchen
GST	Glutathion-S-Transferase
gt	goat [engl.] – Ziege
Gus	Gustducin
h	Stunde(n)
HCN4	Hyperpolarisations-aktivierte, zyklisches (cyclic [engl.]) Nukleotid gesteuerte Ionenkanal-Untereinheit 4

HPLC	high performance liquid chromatography [engl.] – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	horseradish peroxidase [engl.] – Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
ILM	inner limiting membrane [engl.] – innere Grenzmembran
INL	inner nuclear layer [engl.] – innere Körnerschicht
IPL	inner plexiform layer [engl.] – innere plexiforme Schicht
IS	innere Segmente
kDa	Kilodalton
L	long-wavelength sensitive [engl.] – empfindlich für langwelliges Licht
M	medium-wavelength sensitive [engl.] – empfindlich für mittelwelliges Licht
M	Mol
MAGUK	Membran-assoziiertes Guanylatkinasen-Homolog
mg	Milligramm
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid [engl.] – Boten-Ribonukleinsäure
ms	Maus
mV	Millivolt
NDS	normal donkey serum [engl.] – Normales Eselserum
NFL	nerve fiber layer [engl.] – Nervenfaserschicht
NGS	normal goat serum [engl.] – Normales Ziegenserum
NK3R	Neurokinin-3 Rezeptor
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTA	nicht Triaden-assoziiert
OLM	outer limiting membrane [engl.] – äußere Grenzmembran
ONL	outer nuclear layer [engl.] – äußere Körnerschicht
OPL	outer plexiform layer [engl.] – äußere plexiforme Schicht
OS	outer segments [engl.] – äußere Segmente
PB	phosphate buffer [engl.] – Phosphatpuffer
PBS	phosphate buffered saline [engl.] – phosphatgepufferte Salzlösung
Pcdh	Protocadherin
PCR	polymerase chain reaction [engl.] – Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii [lat.] – Kraft des Wassers; der negative, dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration in einer Lösung
PKARIIB	Proteinkinase A, regulatorische Untereinheit IIβ

PNA	peanut agglutinin [engl.] – Erdnussagglutinin
PSD	PSD-95, <i>Discs large</i> und ZO-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rb	rabbit [engl.] – Kaninchen
RT	Raumtemperatur
S	short-wavelength sensitive [engl.] – empfindlich für kurzwelliges Licht
SBFSEM	serial block-face scanning electron microscopy [engl.] – serielle Blockoberflächen-Abtastelektronenmikroskopie
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis [engl.] – Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
STED	stimulated emission depletion [engl.] – stimulierte Emissionsunterdrückung
TA	Triaden-assoziiert
TBE	Trizma-Borsäure-EDTA
TBST	tris buffered saline + Tween 20 [engl.] – Tris-gepufferte Salzlösung + Tween 20
U	Umdrehungen
WB	<i>Western Blot</i>
ZO-1	Zonula Occludens-1
ZONAB	ZO-1-associated nucleic acid-binding protein [engl.] – ZO-1-assoziiertes Nukleinsäure-bindendes Protein

I. Einleitung

Die visuelle Wahrnehmung, und dabei insbesondere das Farbsehen, bildet den wichtigsten Sinn zur Orientierung in der Umwelt. Die Verarbeitung der visuellen Information beginnt bereits innerhalb der ersten Verschaltungsebene der lichtsensitiven Neurone (Photorezeptoren) der Retina. Dies geschieht durch den synaptischen Kontakt miteinander und mit den Neuronen zweiter Ordnung der inneren Retina. Die Erforschung dieser ersten synaptischen Schicht kann also einen Beitrag zum Verständnis der grundlegenden Mechanismen des Sehens leisten. Als Teil des zentralen Nervensystems ist die Retina außerdem ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung der synaptischen Kommunikation zwischen Neuronen und der Funktion einzelner Zelltypen in neuronalen Netzwerken, wie sie auch im Gehirn zu finden sind.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die synaptische Architektur der äußeren plexiformen Schicht der Säugetierretina mittels immunzytochemischer Methoden untersucht. Als Modellsysteme wurden dafür Retinae von Makaken, Kaninchen und Mäusen herangezogen.

I.1 Die Säugetierretina

Während der Embryogenese entwickelt sich die Säugetierretina aus der lateralen Wand des Neuralrohrs. Im adulten Stadium ist sie ca. 200 µm dick und liegt im Augenhintergrund dem Pigmentepithel und der Aderhaut auf. Innerhalb der Retina sind fünf verschiedene Klassen neuronaler Zellen und die Müllerzellen (Gliazellen) in diskreten Schichten angeordnet (Abb. 1). Die Zellkörper der Photorezeptoren, liegen in der äußeren Körnerschicht (ONL¹). Die inneren (IS) und äußeren Segmente (OS²) dieser Zellen sind dem Licht abgewandt und stehen mit dem Pigmentepithel in Kontakt. In der äußeren

¹ outer nuclear layer [engl.]

² outer segments [engl.]

plexiformen Schicht (OPL³) sind die Photorezeptoren mit Horizontalzellen und Bipolarzellen verschaltet, deren Zellkörper in der inneren Körnerschicht (INL⁴) lokalisiert sind. Sowohl die Dendriten als auch die Axonterminalien der Horizontalzellen bilden synaptische Kontakte mit den Photorezeptoren aus und bilden demnach ein laterales Netzwerk in der OPL.

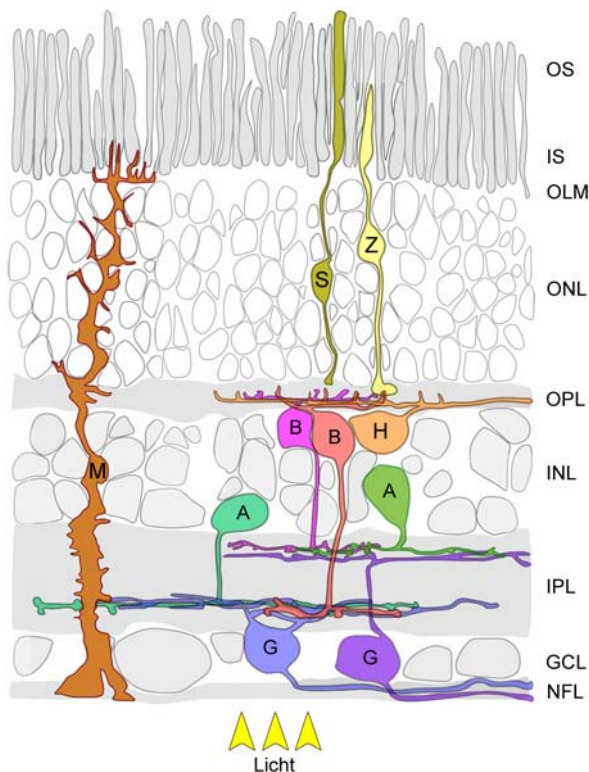


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Säugetierretina. *OS*, äußere Segmente. *IS*, innere Segmente. *OLM*, äußere Grenzmembran. *ONL*, äußere Körnerschicht. *OPL*, äußere plexiforme Schicht. *INL*, innere Körnerschicht. *IPL*, innere plexiforme Schicht. *GCL*, Ganglienzellschicht. *NFL*, Nervenfaserschicht. *S*, Stäbchen-Photorezeptoren. *Z*, Zapfen-Photorezeptoren. *B*, Bipolarzelle. *H*, Horizontalzelle. *A*, Amakrinzelle. *G*, Ganglienzelle. *M*, Müllerzelle. (Modifiziert nach Euler et al., 2008)

Die Bipolarzellen hingegen senden ihre Axone zur vertikalen Reizweiterleitung in die innere plexiforme Schicht (IPL⁵) und innervieren dort die Amakrin- und Ganglienzellen. Die Zellkörper der Ganglienzellen befinden sich in der Ganglienzellschicht (GCL⁶). Der größte Teil der Amakrinzellkörper ist hingegen in der INL gelegen. Es existieren aber auch Amakrinzelltypen, deren Zellkörper in der GCL lokalisiert sind. Die Axone der Ganglienzellen sammeln sich in der Nervenfaserschicht (NFL⁷), wo sie gemeinsam den

³ outer plexiform layer [engl.]

⁴ inner nuclear layer [engl.]

⁵ inner plexiform layer [engl.]

⁶ ganglion cell layer [engl.]

⁷ nerve fiber layer [engl.]

optischen Nerv bilden, durch welchen die Lichtantworten der Ganglienzellen an das Gehirn geleitet werden. Die Müllerzellen durchziehen nahezu die gesamte Retina. Ihre Zellkörper sind in der INL gelegen, während ihre Terminalien die innere bzw. die äußere Grenzmembran (OLM⁸) bilden.

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat wird sowohl von den Photorezeptoren in der OPL als auch von den Bipolarzellen in der IPL freigesetzt. In diesem vertikalen Signalweg (Photorezeptoren → Bipolarzellen → Ganglienzellen) findet die Reizweiterleitung nur bei den Ganglienzellen durch Aktionspotentiale statt. Photorezeptoren und Bipolarzellen bilden hingegen graduierte Potentiale aus.

Bei der Depolarisation von Horizontalzellen und etwa der Hälfte der Amakrinzelltypen wird durch diese Zellen der inhibitorisch wirkende Neurotransmitter GABA⁹ ausgeschüttet. Neben GABA setzen diese Amakrinzellen meist noch weitere neuromodulatorische Substanzen frei (z.B. Acetylcholin, Dopamin oder Serotonin). Die zweite Hälfte der Amakrinzelltypen setzt bei Erregung Glyzin als inhibitorischen Neurotransmitter frei.

Durch den Fokus der hier vorliegenden Studie auf die OPL werden die dort verschalteten Neurone (Photorezeptoren, Horizontal- und Bipolarzellen) sowie die Eigenschaften ihrer chemischen und elektrischen Synapsen im Folgenden noch einmal genauer vorgestellt.

I.1.1 Photorezeptoren

Die Photorezeptoren der Retina wandeln den Lichtreiz in ein elektrisches Signal um. Die lichtempfindlichen Bereiche dieser Zellen sind die äußeren Segmente, in denen die Sehpigmente, die Opsine, lokalisiert sind. Durch die Lichtquantenabsorption wird eine Enzymkaskade ausgelöst, welche eine Abnahme der Membranleitfähigkeit bedingt und dadurch zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt. Dunkelheit ruft hingegen eine Depolarisation des Photorezeptors hervor, welche die Ausschüttung des Glutamats zur Folge hat (Übersichtsartikel von Burns und Baylor, 2001).

In der Retina von Säugetieren existieren zwei Arten von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen. Die hohe Lichtempfindlichkeit der Stäbchen ist an skotopische Lichtver-

⁸ outer limiting membrane [engl.]

⁹ gamma-aminobutyric acid [engl.] – Gamma-Aminobuttersäure

hältnisse angepasst. Deshalb reicht die Absorption einzelner Photonen aus, um eine Potentialänderung in diesen Zellen hervorzurufen. Die weniger empfindlichen Zapfen dienen hingegen dem photopischen Sehen und vermitteln das Farbsehen. Letzteres wird durch die Expression unterschiedlicher Opsine ermöglicht, welche eine spezifische Empfindlichkeit nur für bestimmte Wellenlängen des Lichts aufweisen. Im Primaten existieren deshalb drei Zapfentypen, welche empfindlich für Licht kurzer (blau, S-Zapfen¹⁰), mittlerer (grün, M-Zapfen¹¹) oder langer (rot, L-Zapfen¹²) Wellenlängen sind (Übersichtsartikel von Nathans, 1999). Andere Säugetiere besitzen zumeist nur zwei Zapfentypen (S- und M-Zapfen), wobei die Empfindlichkeit des S-Opsins z.B. in der Mausretina vom blauen in den ultravioletten Bereich des Lichtspektrums verschoben ist. Bei der Maus liegt eine weitere Besonderheit vor, denn in ihrer Retina exprimieren viele Zapfen sowohl das S- als auch das M-Opsin (Übersichtsartikel von Lukáts et al., 2005). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit spielt diese Besonderheit allerdings keine Rolle, und die Doppelpigment-Zapfen werden der Einfachheit halber in diesem und den folgenden Kapiteln als M-Zapfen bezeichnet.

In der Gesamtheit der Zapfenpopulation machen die S-Zapfen im Primaten als auch in der Maus mit 5 – 10 % den kleinsten Anteil aus, und sie sind in regelmäßigen Abständen über die Retina hinweg angeordnet (*Affe*: Marc und Sperling, 1977; de Monasterio et al., 1985; Martin und Grünert, 1999; *Maus*: Haverkamp et al., 2005). S- und M-Zapfen haben sich vor über 500 Millionen Jahren aus einem „Urzapfen“ entwickelt. Diese spektral unterschiedliche Übertragungswege (S und M) erlaubten nun erstmalig einen Vergleich der Lichtantworten innerhalb des Sehsystems und ermöglichte damit wiederum die eigentliche Farbwahrnehmung. Deshalb wird dieser S-/M-Signalweg als das ursprüngliche System des Farbsehens betrachtet. Das trichromatische Farbsehen wurde erst vor ca. 35 Millionen Jahren durch das Auftreten eines dritten, rot-empfindlichen Zapfentyps ermöglicht und ist damit vergleichsweise jung (Übersichtsartikel von Mollon, 1989; Lamb et al., 2007).

¹⁰ short-wavelength sensitive

¹¹ medium-wavelength sensitive

¹² long-wavelength sensitive

I.1.2 Bipolarzellen

Die Säugetierretina besitzt etwa neun oder zehn hauptsächlich Zapfen-gesteuerte Bipolarzelltypen und einen Stäbchen-gesteuerten Bipolarzelltyp (*Maus*: Ghosh et al., 2004; Pignatelli und Strettoi, 2004; Wässle et al., 2009; *Kaninchen*: MacNeil et al., 2004; *Affe*: Boycott und Wässle, 1991) (Abb. 2).

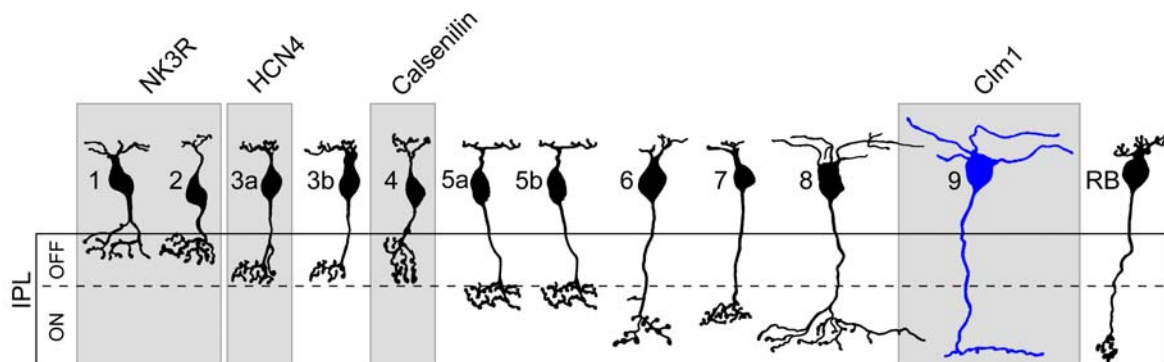


Abbildung 2: Bipolarzelltypen der Mausretina. OFF-Zapfenbipolarzellen der Typen 1 – 4 und ON-Zapfenbipolarzellen der Typen 5 – 9 sowie die Stäbchenbipolarzelle (RB¹³) werden gezeigt. Die Einteilung in ON- und OFF-Zellen lässt sich anhand der Stratifizierung ihrer Axonterminalien in der IPL erkennen. Des Weiteren werden die verwendeten Bipolarzellmarker angezeigt: Antikörper gegen NK3R¹⁴ für Typen 1 und 2, HCN4¹⁵ für Typ 3a und Calsenilin für Typ 4 bzw. die in der Clm1-Mauslinie durch Clomeleon-Expression markierte Typ 9 ON-Zapfenbipolarzelle. (Modifiziert nach Wässle et al., 2009)

Eine physiologische Einteilung dieser Zelltypen lässt sich anhand ihrer Lichtantworten treffen: ON¹⁶-Bipolarzellen depolarisieren bei einem Lichtreiz, OFF¹⁷-Bipolarzellen werden hingegen bei einsetzender Dunkelheit erregt. ON-Bipolarzellen zeigen also ein signalumkehrendes Antwortverhalten auf das vom Photorezeptor freigesetzte Glutamat und reagieren mit einer Depolarisation auf das Ausbleiben des Neurotransmitters bei Helligkeit. Diese Signalumkehr wird durch mGluR6 vermittelt, einem metabotropen Glutamatrezeptor der Gruppe III, welcher auf den dendritischen Spitzen dieser Zellen liegt.

¹³ rod bipolar cell [engl.]

¹⁴ Neurokinin-3 Rezeptor

¹⁵ Hyperpolarisations-aktivierte, zyklisches (cyclic [engl.]) Nukleotid gesteuerte Ionenkanal-Untereinheit 4

¹⁶ englisch für „An“

¹⁷ englisch für „Aus“

OFF-Bipolarzellen exprimieren jedoch ionotrope Glutamatrezeptoren (GluR) der AMPA¹⁸-Untereinheit GluR1 sowie der Kainat-Untereinheiten GluR5 – 7 und KA2. Sie reagieren deshalb signalerhaltend – also mit einer Depolarisation auf die Glutamatausschüttung des Photorezeptors bei Dunkelheit (Übersichtsartikel von Dingledine et al., 1999; Brandstätter und Hack, 2001).

Weitere Unterscheidungsmerkmale dieser zwei Zellklassen finden sich auch in ihren morphologischen Eigenschaften wieder. ON-Bipolarzellen invaginieren den Photorezeptor mit ihren Dendriten, OFF-Bipolarzellen bilden hingegen flache Synapsen an der Basis der Photorezeptorsynapse (s. Kap. I.2.1). Des Weiteren enden die Axone der OFF-Bipolarzellen in den äußeren Schichten der IPL; die Axone der ON-Bipolarzellen in den inneren Schichten (Abb. 2) (Übersichtsartikel von Masland, 2001).

Zur Markierung der Maus-Bipolarzellen wurden inzwischen verschiedene Antikörper sowie transgene Mauslinien beschrieben (Wässle et al., 2009). Abbildung 2 zeigt die in der hier vorliegenden Studie verwendeten Zellmarker für verschiedene OFF-Zapfenbipolarzellen und für die Typ 9 ON-Zapfenbipolarzelle.

I.1.3 Horizontalzellen

In den meisten Säugetierretinae existieren zwei Typen von Horizontalzellen. Sie unterscheiden sich zunächst einmal in ihrer Morphologie und der Größe ihrer dendritischen Felder (Übersichtsartikel von Peichl et al., 1998). Bei der Maus und der Ratte wurde nur ein Horizontalzelltyp beschrieben (Suzuki und Pinto, 1986; Peichl und González-Soriano, 1994). Die Dendriten dieser Horizontalzelle sind mit Zapfen verschaltet, die Axonterminalien mit den Stäbchen (Abb. 3). In Anlehnung an die Horizontalzelltypen anderer Säuger werden gemeinhin solche, die ein Axon hervorbringen, B-Typ genannt. Im Gegensatz zu „klassischen“ Neuronen, die über ihre Dendriten innerviert werden und deren Ausgangssynapsen von den Axonterminalien gebildet werden, erhalten Horizontalzellen mit B-Typ-Morphologie auch über die Axonterminalien erregenden Eingang (von den Stäbchen).

¹⁸ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid [engl.]; α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol Propionsäure

Wie bei den meisten anderen Säugern üblich, besitzt die Kaninchenretina neben einer B-Typ-Horizontalzelle (mit Axonterminal) noch eine axonlose Horizontalzelle des Typs A (Bloomfield und Miller, 1982; Dacheux und Raviola, 1982). Die Dendriten der A-Typ-Horizontalzellen sind ausschließlich mit Zapfen verschaltet (Abb. 3) (Hack und Peichl, 1999; Pan und Massey, 2007).

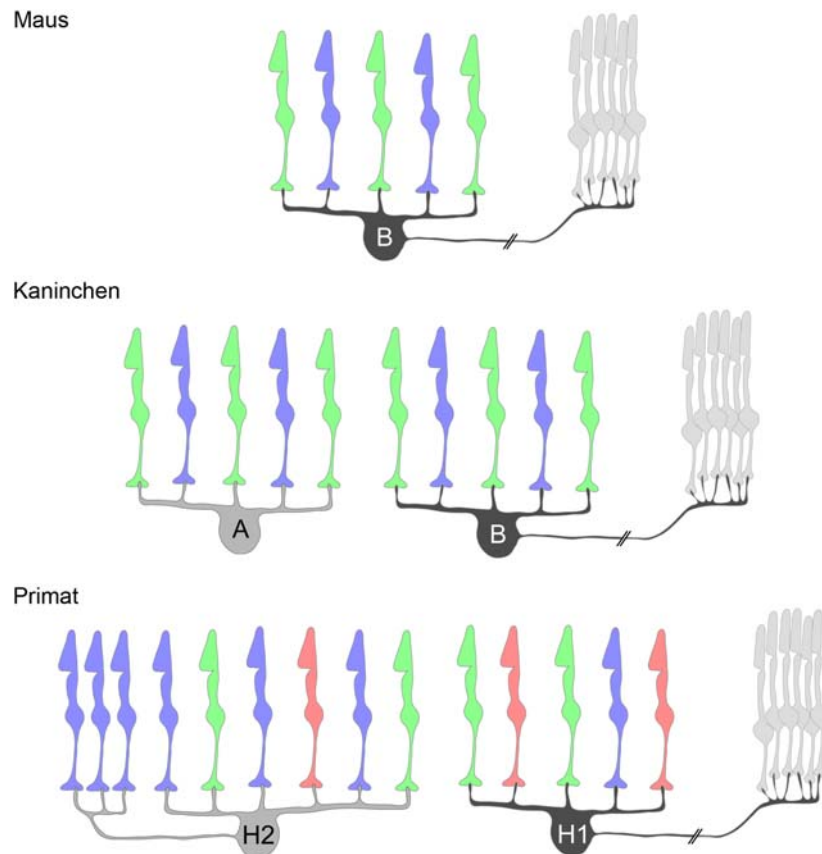


Abbildung 3: Schema der Horizontalzelltypen in der Maus-, der Kaninchen- und der Primatenretina. In der Maus und dem Kaninchen sind die Horizontalzellen unspezifisch mit allen S- und M-Zapfen im dendritischen Feld verschaltet, wobei die Zellen des B-Typs mit ihren Axonterminalien die Stäbchen kontaktieren. In der Primatenretina besitzt die H1-Zelle eine äquivalente Morphologie. Sie ist aber nur spärlich mit S-Zapfen verschaltet. Die H2-Zelle hat hingegen eine starke Präferenz für S-Zapfen und kontaktiert diese sowohl mit ihren Dendriten als auch mit dem Axonterminal.

In der Primatenretina finden sich ebenfalls zwei Horizontalzelltypen. Die H1-Horizontalzelle entspricht der B-Typ-Horizontalzelle anderer Säuger. Ihre Dendriten stehen mit Zapfen in Kontakt, und sie besitzt ein Axonterminal, welches von den Stäbchen

synaptischen Eingang bekommt. Die H2-Horizontalzelle besitzt ebenfalls ein Axon. Dieses ist aber vergleichsweise kurz und bildet Synapsen mit Zapfen aus (Kolb et al., 1980; Wässle et al., 1989, 2000; Übersichtsartikel von Boycott, 1988). Darüber hinaus sind diese beiden Horizontalzelltypen Zapfen-selektiv verschaltet. Die H1-Horizontalzelle kontaktiert überwiegend M- und L-Zapfen in ihrem dendritischen Feld, während die H2-Zelle nur wenige oder gar keine Zapfen dieser Typen kontaktiert. Sie wird über ihre Dendriten und Axonterminalien hauptsächlich von S-Zapfen innerviert (Abb. 3) (Ahnelt und Kolb, 1994a, b; Dacey et al., 1996; Goodchild et al., 1996; Chan und Grünert, 1998).

Diese Selektivität der Horizontalzellkontakte ist im Kaninchen nicht vorhanden (Hack und Peichl, 1999). In der Mausretina fand eine eingehende Untersuchung der Horizontalzellkontakte hinsichtlich einer eventuellen Zapfentyp-spezifischen Verschaltung noch nicht statt. Auf Grund der Ausstattung mit nur einem Horizontalzelltyp wird solch eine Spezifität aber nicht erwartet (Übersichtsartikel von Peichl et al., 1998).

Bei Erregung durch Glutamat verursachen Horizontalzellen eine laterale Inhibition von Photorezeptoren (negative Rückkopplung) und Bipolarzellen (vorwärts gerichtete Weiterleitung) durch die Freisetzung von GABA (Übersichtsartikel von Wu, 1992; Kamermans und Spekreijse, 1999; Schwartz, 2002). Sie dienen damit der Kontrastverstärkung, der Adaptation an die Intensität des Umgebungslichts, und sie formen ein inhibitorisches Umfeld der rezeptiven Felder von Bipolarzellen (Übersichtsartikel von Peichl et al., 1998; Dacey, 1999). Der genaue Mechanismus der Transmitterfreisetzung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Im Laufe der letzten Jahre mehren sich zudem Hinweise auf eine nicht-GABAerge, ephaptische Inhibition der Photorezeptoren durch Horizontalzellen, welche sich direkt auf den Calcium-Einstrom an den Photorezeptorterminalien auswirkt (Übersichtsartikel von Kamermans und Spekreijse, 1999; Kamermans und Fahrenfort, 2004).

Horizontalzellen formen ein stark ausgedehntes Netzwerk, welches zwischen den Dendriten und, soweit vorhanden, den Axonterminalien homologer Zelltypen durch elektrische Synapsen, den so genannten *gap junctions*, ausgebildet wird (Kaneko, 1971; Dacheux und Raviola, 1982; Bloomfield et al., 1995) (s. Kap. 1.2.2). Das Ausmaß dieser elektrischen Kopplung wird durch Botenstoffe wie Dopamin, Retinsäure oder Stickstoffmonoxid moduliert, deren Freisetzung wiederum von der Stärke des Umgebungslichts abhängig ist (Teranishi et al., 1983; Perlman und Ammermüller, 1994; Lu und McMahon, 1997; Weiler et al., 1999; Xin und Bloomfield, 1999, 2000; He et al., 2000; Pottek und Weiler, 2000; Übersichtsartikel von Weiler et al., 2000).

I.2 Synaptische Architektur der OPL

Die neuronalen Verschaltungen in der OPL unterliegen einer extrem komplexen Architektur, welche sich aus chemischen und elektrischen Synapsen zusammensetzt. Das Zapfenendfüßchen weist dabei eine für das zentrale Nervensystem einzigartige Organisation auf.

I.2.1 Chemische Synapsen: die Zapfenendfüßchen

Je nach Spezies und der Lage des Photorezeptors in der Retina (zentral oder peripher) kann eine einzelne Bandsynapse, das Zapfenendfüßchen, viele hundert postsynaptische Kontakte mit Horizontal- und Bipolarzellen aufweisen (Chun et al., 1996). Diese Kontakte sind präzise am Zapfenendfüßchen angeordnet. Postsynaptisch zu den Proteinbändern, an welchen die mit Glutamat gefüllten Vesikel gebunden sind, befinden sich die in das Zapfenendfüßchen invaginierenden Fortsätze der Horizontal- und ON-Bipolarzellen (Abb. 4, Abb. 5).

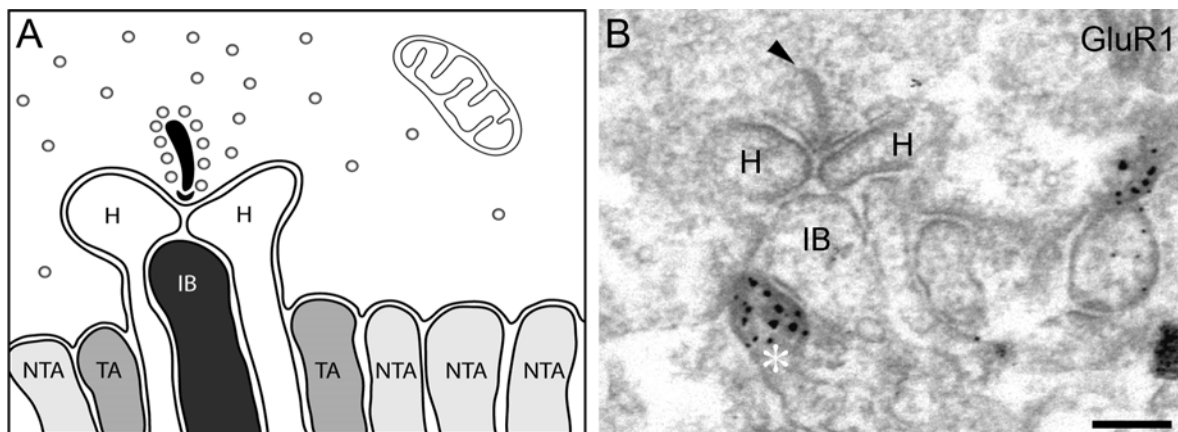


Abbildung 4: OFF-Bipolarzellkontakte am Zapfenendfüßchen. **A,** Schematische Darstellung einer Triade des Zapfenendfüßchens. *H*, Horizontalzelle; *IB*, invaginierende Bipolarzelle; *TA*, Triaden-assoziierte OFF-Bipolarzelle; *NTA*, nicht Triaden-assoziierte OFF-Bipolarzelle. **B,** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Triade eines Zapfenendfüßchens der Makakenretina. An einem OFF-Bipolarzellfortsatz in TA-Position ist eine GluR1-immunreaktive Markierung erkennbar (Sternchen). Die Pfeilspitze weist auf das präsynaptische Proteinband. Maßstab: 0,2 µm. (Aus Puller et al., 2007)

Zwei Horizontalzellendendriten bilden dabei die lateralen Elemente und mindestens ein ON-Bipolarzellendendrit das zentrale Element dieser so genannten Triade. Das Zapfenendfüßchen der Primatenretina besitzt je nach Region zwischen 20 und 40 solcher Triaden und eine entsprechende Anzahl präsynaptischer Proteinbänder (Abb. 5B) (Missotten, 1965; Dowling und Boycott, 1966; Calkins et al., 1996; Chun et al., 1996).

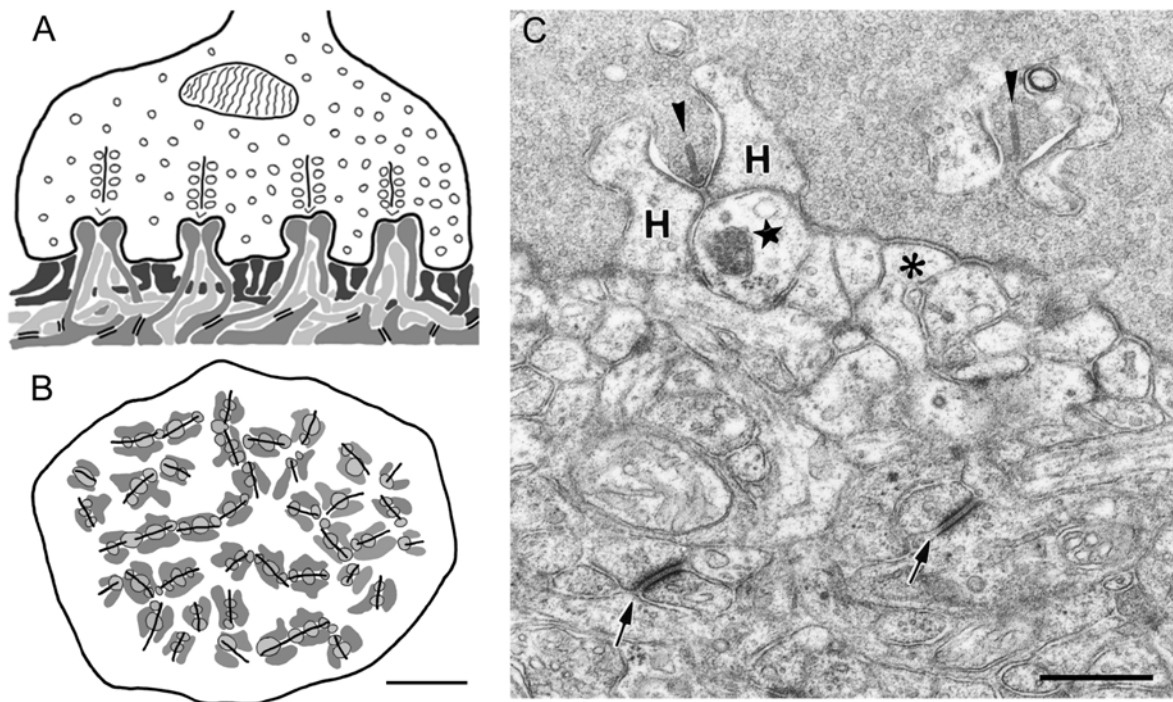


Abbildung 5: Die Struktur des Zapfenendfüßchens der Makakenretina. **A**, Schematische Zeichnung eines Zapfenendfüßchens im vertikalen Schnitt. Man erkennt die Proteinbänder mit den daran gebundenen Vesikeln oberhalb der Triaden. Mittelgrau: Horizontalzellfortsätze. Hellgrau: ON-Bipolarzellfortsätze. Dunkelgrau: basale Kontakte der OFF-Bipolarzellen. Schwarze, gepaarte Striche unterhalb der Basis des Zapfenendfüßchens: *desmosome-like junction*. **B**, Rekonstruktion eines Zapfenendfüßchens im Horizontalschnitt. Kurze, schwarze Linien zeigen die Proteinbänder. Die Horizontalzellendendriten (mittelgrau) und die ON-Zapfen-Bipolarzellendendriten (hellgrau) sind zu sehen. Basale Kontakte von OFF-Bipolarzellen sind nicht dargestellt. Sie bedecken fast die gesamte Basis des Zapfenendfüßchens. **C**, Elektronenmikroskopische Aufnahme im synaptischen Bereich des Zapfenendfüßchens (oberer Bildrand). Die Pfeilspitzen weisen auf Proteinbänder. Postsynaptisch dazu befinden sich die Horizontalzellendendriten (H) und ON-Bipolarzellendendriten (Stern). Der Asterisk markiert einen basalen Kontakt einer OFF-Bipolarzelle. Außerdem sind zwei *desmosome-like junctions* erkennbar (Pfeile). Maßstabsbalken: B, 2 µm; C, 0,5 µm. (Aus Haverkamp et al., 2000)

OFF-Bipolarzellen bilden hingegen flache Kontakte an der Basis des Zapfenendfüßchens aus (Dowling und Boycott, 1966). Wie einleitend erwähnt bestehen die dort exprimierten Glutamatrezeptoren hauptsächlich aus den Untereinheiten GluR1 (Abb. 4B), GluR5 (Abb.

6), GluR6/7 (Abb. 7) und KA2 (*Maus/Ratte*: Haverkamp et al., 2003; Übersichtsartikel von Brandstätter und Hack, 2001; *Primat*: Haverkamp et al., 2001a, b; Puller et al., 2007). Die flachen Kontakte unterscheiden sich wiederum in ihrer Triaden-assoziierten (TA) bzw. nicht Triaden-assoziierten (NTA) Position (Abb. 4A) (Boycott und Hopkins, 1993; Hopkins und Boycott, 1997). GluR1 und GluR6/7 sind dabei vorwiegend in der TA-Position, GluR5 in der NTA-Position zu finden (Haverkamp et al., 2001a, b; DeVries et al., 2006; Puller et al., 2007). Dementsprechend konnte im Primaten gezeigt werden, dass GluR1 und GluR6/7 nicht mit GluR5 in demselben postsynaptischen Fortsatz kolokalisiert sind (Haverkamp et al., 2001b; Puller et al., 2007). Die exprimierte GluR-Untereinheit (AMPA oder Kainat) und die Position des postsynaptischen Elements relativ zur Triade bestimmen dabei das Antwortverhalten der OFF-Bipolarzelle aus (DeVries, 2000; DeVries et al., 2006).

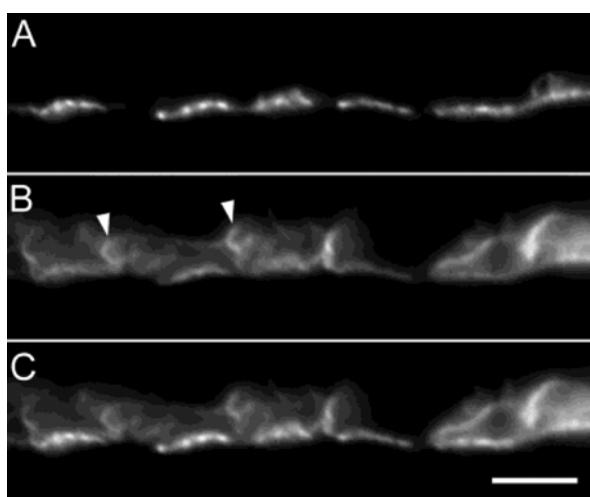


Abbildung 6: Lokalisation von GluR5 auf vertikalen Kryoschnitten der Makakenretina. **A – C,** Fluoreszenzfärbung von GluR5 (A) und PSD-95 (B) zur Markierung der Photorezeptorterminalien. Die GluR5-Immunreaktion zeigt sich jeweils als punktiertes Band unterhalb von sechs Zapfenendfüßchen (A). Das Mischbild von A und B in C zeigt, dass die GluR5-Bänder mit der Basis der Zapfenendfüßchen zusammenfallen. Neben den Zapfenendfüßchen sind auch zwei Stäbchen-terminalien zu sehen (Pfeilspitzen). Maßstab: 5 µm. (Aus Haverkamp et al., 2001b)

Neben mGluR6 als Rezeptor der ON-Bipolarzellen sind auch ionotrope GluRs der AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR2/3 und GluR4 innerhalb der Invaginationen am Photorezeptor auf den Spitzen der Horizontalzellfortsätze lokalisiert (Abb. 7A – C) (*Maus/Ratte*: Übersichtsartikel von Brandstätter und Hack, 2001; *Kaninchen*: Deng et al., 2006; Pan und Massey, 2007; *Primat*: Haverkamp et al., 2000, 2001a). Darüber hinaus formen die Horizontalzellendendriten ca. 1,5 µm unterhalb des Zapfenendfüßchens noch eine weitere postsynaptische Zone, die so genannten *desmosome-like junctions* (Missotten, 1965; Raviola und Gilula, 1975; Boycott und Hopkins, 1993) (Abb. 5A, C). Beim Primaten werden an diesen Membranspezialisierungen von je zwei benachbarten Horizontalzellendendriten abermals GluR2/3 und GluR4 sowie auch GluR6/7 exprimiert (Abb. 7)

(Haverkamp et al., 2000, 2001a, b). In der Mausretina wurde bislang noch nicht von einer GluR-Expression in diesen Bereichen der OPL berichtet. In der Kaninchenretina konnte hingegen die Lokalisation von GluR2/3 und GluR4 analog zum Primaten unterhalb des Zapfenendfüßchens gezeigt werden (Pan und Massey, 2007). Allerdings ist die Funktion der Rezeptorexpression in einem so weit vom Ort der Glutamatfreisetzung entfernten Bereich bislang ungeklärt.

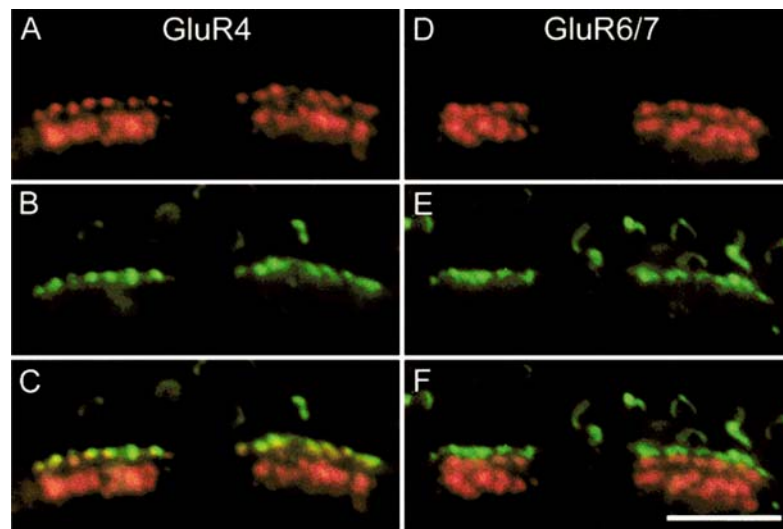


Abbildung 7: Lokalisation von GluR4 und GluR6/7 am Zapfenendfüßchen. **A – F,** Fluoreszenzfärbung von GluR4 bzw. GluR6/7 und Bassoon zur Markierung der präsynaptischen Proteinbänder an je zwei Zapfenendfüßchen auf vertikalen Kryoschnitten der Makakenretina. **A – C,** Die GluR4-Immunreaktion erscheint als Doppelband am Zapfenendfüßchen (A). Das obere Band ist in den Invaginierungen dicht mit den Proteinbändern (B) assoziiert. Es gibt die Lokalisation von GluR4 auf den invaginierenden Horizontalzellendendriten wieder. Das untere GluR4-Band zeigt die Immunreaktion an den *desmosome-like junctions*. **C,** Mischbild von A und B. **D – F,** GluR6/7 ist ebenfalls als Doppelband erkennbar (A). Im Mischbild von D und E wird deutlich, dass das obere Band erwartungsgemäß weiter von den Proteinbändern (E) entfernt liegt, als es für GluR4 der Fall ist. Dort wird GluR6/7 von OFF-Bipolarzellen an basalen Kontakten zum Zapfenendfüßchen exprimiert. Das untere GluR6/7-Band zeigt wiederum die Rezeptorlokalisierung an den *desmosome-like junctions*. Maßstabsbalken: 5 μm . (Aus Haverkamp et al., 2001b)

I.2.2 Elektrische Synapsen: die *gap junctions*

Im Nervensystem sowie auch in anderen zellulären Netzwerken des Körpers bilden verschiedenste Neurone durch die so genannten *gap junctions* elektrische Synapsen miteinander aus. *Gap junctions* sorgen in Membranen eukaryotischer Zellen für eine

Kopplung zur interzellulären Kommunikation und ermöglichen eine passive Diffusion von Ionen und Molekülen bis zu einer Größe von etwa 1 kDa. Sie bestehen aus membranüberspannenden, porenbildenden Proteinkomplexen, den Connexonen, und erlauben in Neuronen die Weiterleitung elektrischer Potentiale, ohne dass dafür ein Transmitter benötigt wird. Ein Connexon (oder auch Hemikanal) besteht aus sechs Untereinheiten, den Connexinen, und formt durch Bindung an das Connexon der benachbarten Zelle den interzellulären zytoplasmatischen Kontakt (Abb. 8) (Übersichtsartikel von Söhl et al., 2005).

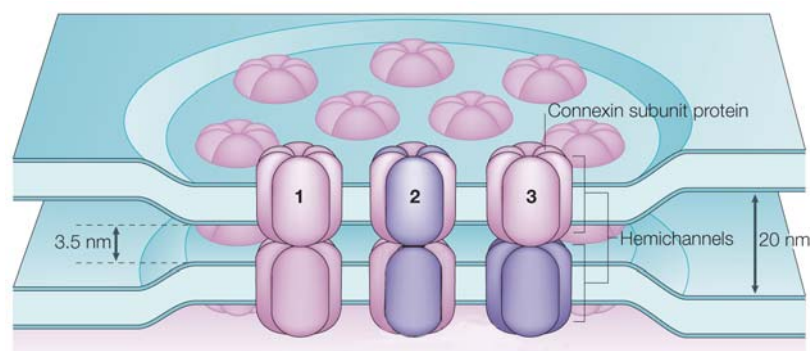


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer *gap junction*. In den so genannten *plaques*¹⁹ können mehrere tausend Hemikanäle (engl.: *Hemichannels*) enthalten sein. Die Untereinheiten (engl.: *subunits*) der Hemikanäle und die gegenüberliegenden Hemikanäle selbst können in unterschiedlichen Anordnungen auftreten: homomer-homotypisch (1), bi-heteromer (2) oder homomer-heterotypisch (3). (Aus Söhl et al., 2005)

Abbildung 9 gibt einen Überblick über die von Neuronen der Mausretina exprimierten Connexine. Die Nomenklatur der Connexin-Isoformen erfolgt entsprechend ihres Molekulargewichts in Kilodalton. Das Connexin (Cx) mit einem Gewicht von 36 kDa (Cx36) ist im zentralen Nervensystem weit verbreitet. In der IPL der Retina sorgt es – teils an *gap junctions* zusammen mit Cx45 – für eine homo- oder heterologe elektrische Kopplung von Bipolar- Amakrin- und Ganglienzellen (Feigenspan et al., 2001; Güldenagel et al., 2001; Mills et al., 2001; Deans et al., 2002; Hidaka et al., 2004; Han und Massey, 2005; Maxeiner et al., 2005; Schubert et al., 2005a; Dedek et al., 2006; Li et al., 2008). Cx45 wird aber sehr wahrscheinlich auch an *gap junctions* zwischen bistratifizierten Ganglienzellen ohne Beteiligung von Cx36 exprimiert (Schubert et al., 2005b).

¹⁹ plaque [frz.] – Platte, Fleck, Schild

In der OPL ist Cx36 Bestandteil der *gap junctions* zwischen Photorezeptoren (Lee et al., 2003; Feigenspan et al., 2004; Li und DeVries, 2004; Massey, 2008). Außerdem sorgt es für eine elektrische Kopplung der Dendriten von OFF-Bipolarzellen (Feigenspan et al., 2004).

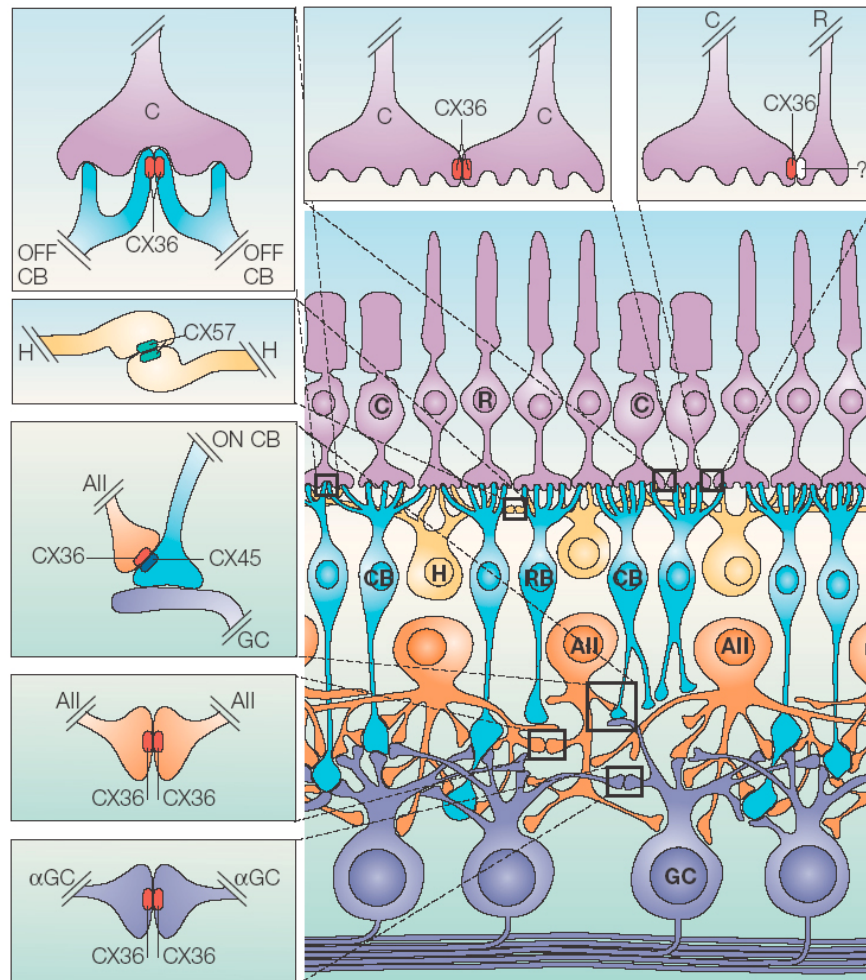


Abbildung 9: Elektrische Kopplung verschiedener Neurone der Mausretina. Cx36 sorgt in der OPL für die homologe Kopplung der Dendriten von Bipolarzellen (*OFF-CB*) und für die der Zapfenendfüßchen (*C*). Das dem Cx36 gegenüberliegende Connexin der Hemikanäle von Stäbchenterminalien (*R*) ist noch unbekannt. Die *gap junctions* zwischen Horizontalzellen (*H*) werden von Cx57 geformt. In der IPL findet eine heterologe Kopplung von AII-Amakrinzellen und ON-Zapfenbipolarzellen (*ON CB*) durch Cx36 und Cx45 statt. Cx36 formt außerdem *gap junctions* zwischen α -Ganglienzellen (αGC) und AII-Amakrinzellen. Die homologe Kopplung von bistratifizierten Ganglienzellen durch Cx45 wird in diesem Schema nicht gezeigt. (Aus Söhl et al., 2005)

Die *gap junctions* von Horizontalzellendendriten und -axonterminalien der Mausretina setzen sich aus Cx57 zusammen (Hombach et al., 2004; Shelley et al., 2006; Janssen-Bienhold et al., 2009). In der Kaninchenretina vermittelt Cx57 hingegen nur die Kopplung der

Axonterminalien von B-Typ Horizontalzellen (Pan et al., 2007a). Diese Zellen bilden zwar auch dendritische Netzwerke miteinander aus, das dafür verantwortliche Connexin ist aber bislang unbekannt (O'Brien et al., 2006; Pan et al. 2007b). Das Connexin der *gap junctions* zwischen A-Typ-Horizontalzellen ist Cx50 (O'Brien et al., 2006).

Zudem wurde in der Mausretina eine Expression von Cx45 in den Grenzbereichen der inneren OPL zur INL gezeigt. Es ist jedoch unklar, ob diese Cx-Isoform dort an *gap junctions* zwischen Neuronen oder Gliazellen beteiligt ist (Güldenagel et al., 2000; Zahs et al., 2003; Kihara et al., 2008). In der OPL der Primatenretina konnte neben der Expression von Cx36 noch kein weiteres Connexin gefunden werden (Übersichtsartikel von Massey, 2008).

I.2.2.1 Zonula Occludens-1

Connexine interagieren mit verschiedenen Proteinen, welche ihrerseits regulatorischen oder stabilisierenden Einfluss auf die *gap junction* haben können (Übersichtsartikel von Giepmans, 2004). Eines dieser Proteine ist Zonula Occludens-1 (ZO-1) (Stevenson et al., 1986). ZO-1 ist ein zytosolisches MAGUK²⁰-Protein, und es wurde ursprünglich als Gerüstprotein für die Formation von *tight* und *adherens junctions* identifiziert. Je nach Art dieser Zell-Zell-Verbindungen verankert es dort Transmembranproteine wie Occludin oder Cadherine mit dem Zytoskelett (Übersichtsartikel von Hartsock und Nelson, 2008). In späteren Studien wurde darüber hinaus die Interaktion von ZO-1 mit verschiedenen Connexin-Isoformen festgestellt, wobei die Rolle von ZO-1 an *gap junctions* bislang ungeklärt ist (Übersichtsartikel von Giepmans, 2004). In der Mausretina ist ZO-1 mit Cx36 in der OPL und in der IPL assoziiert, sowie mit Cx45 in der IPL (Li et al., 2004, 2008; Ciolofan et al., 2006, 2007). Interessanterweise wurde im Rahmen der Studie von Ciolofan et al. (2007) eine Anhäufung von ZO-1 unterhalb der Zapfenendfüßchen in der Mausretina gezeigt, die nur teilweise mit Cx36 assoziiert war. Der übrige Teil des dort detektierten ZO-1 konnte keinem Connexin zugeordnet werden.

²⁰ Membran-assoziertes Guanylatkinasen-Homolog

I.2.3 Protocadherine

Protocadherine bilden die größte Gruppe in der Familie von Calcium-abhängigen Zelladhäsionsmolekülen, den Cadherinen. Die Protocadherine lassen sich entsprechend ihres genetischen Ursprungs und ihrer molekularen Struktur in fünf Untergruppen einteilen. Die größte Gruppe mit 52 verschiedenen Protocadherinen, welche im zentralen Nervensystem von Säugetieren exprimiert werden, sind die genetisch geclusterten Protocadherine. Diese lassen sich ihrerseits entsprechend ihrer konservierten zytoplasmatischen Domänen in α -, β - und γ - Protocadherine unterteilen. Eine andere Gruppe von etwa 20 Protocadherinen setzt sich hingegen aus Proteinen zusammen, welche von nicht-geclusterten Genen kodiert werden (δ - Protocadherine und solche, die in keine der anderen Gruppen einzuordnen sind). Es wird angenommen, dass Protocadherine durch zumeist homologe Bindung eine Schlüsselrolle in der Ausbildung und Organisation von typspezifischen neuronalen Netzwerken während der Entwicklung spielen. Dies geschieht, indem Neuronen durch Kombination der Expression verschiedener Protocadherine eine einzigartige Identität verliehen wird, welche wiederum mögliche Bindungspartner anzieht oder abstößt (Übersichtsartikel von Hilschmann et al., 2001; Frank und Kemler, 2002; Morishita und Yagi, 2007; Yagi, 2008).

In der Retina wurden manche Protocadherine bzw. die sie kodierende mRNA²¹ nur während der Ontogenese im Gewebe gefunden, andere dagegen wurden auch im adulten Gewebe nachgewiesen (Rattner et al., 2001; Hirano et al., 2002; Wang et al., 2002; Kallenbach et al., 2003; Reiners et al., 2005; Gaitan und Bouchard, 2006; Junghans et al., 2008; Lefebvre et al., 2008; Redies et al., 2008). Im Rahmen der Studie von Junghans et al. (2008) konnte in der OPL von Retinae adulter Mäuse Protocadherin β 16 (Pcdh β 16) an synaptischen Bereichen zwischen Horizontalzellen und Photorezeptoren, sowie an flachen Kontakten möglicher OFF-Bipolarzellen am Zapfenendfußchen lokalisiert werden.

²¹ messenger ribonucleic acid [engl.] – Boten-Ribonukleinsäure

I.3 Der S-Zapfen-Signaltransduktionsweg

Durch die komplexe, synaptische Interaktion von Photorezeptoren, Horizontal- und Bipolarzellen findet also bereits in der OPL eine Aufspaltung des Lichtsignals statt. Dieses modulierte Signal wird über die Bipolarzellen in spezifische Bereiche der IPL weitergeleitet. Dabei stellen die verschiedenen Bipolarzelltypen mit ihren speziellen Merkmalen getrennte Kanäle dar und übertragen unterschiedliche Eigenschaften des Lichtsignals, wie z.B. Zeit, Ort oder Farbe. Folglich geschieht an den Synapsen der Zapfen-Photorezeptoren, den Zapfenendfüßchen, die Aufspaltung der modulierten Lichtantwort in parallele Übertragungswege, welche bis in die visuellen Zentren des Gehirns erhalten bleiben können (Roska und Werblin, 2001; Übersichtsartikel von Boycott und Wässle, 1999; Dacey, 2000; Wässle, 2004; Field und Chichilnisky, 2007).

Einer dieser Übertragungswege ist die Blau-ON-Signaltransduktion, welche bei der Hyperpolarisation des S-Zapfens stattfindet („blaues Licht an“). Dadurch findet eine Erregung der in Abbildung 2 blau gekennzeichneten Typ 9 Bipolarzelle statt. Sie kontaktiert in der Mausretina ausschließlich die so genannten „wahren“ S-Zapfen, welche nur das S-Opsin exprimieren (Abb. 10A, B) (Haverkamp et al., 2005).

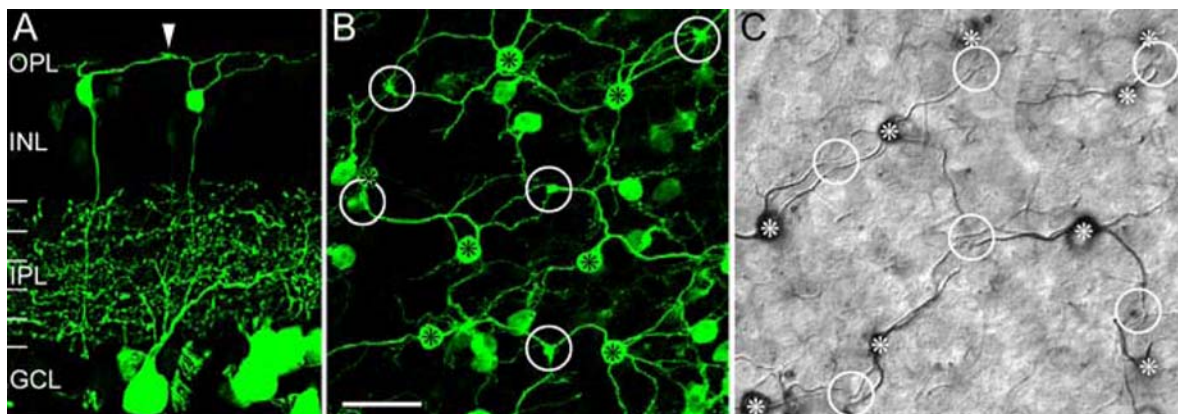


Abbildung 10: S-Zapfenbipolarzellen der Maus und des Makakens. **A, B,** Fluoreszenzfärbung der Clm1-exprimierenden Neurone in der Clm1-Mausretina auf vertikalen Kryoschnitten (A) und im Retinaganzpräparat (B). Die Pfeilspitze in A weist auf eine wahrscheinliche Kontaktstelle zweier S-Zapfenbipolarzellen (Typ 9) mit einem S-Zapfenendfüßchen. Analog dazu sind diese Kontaktstellen in B mit Kreisen markiert. **C,** Peroxidase-Färbung der S-Zapfenbipolarzellen im Retinaganzpräparat des Makaken mit Antikörpern gegen Cholecystinin. Die dendritischen Kontakte der Bipolarzellen mit S-Zapfen sind wiederum mit Kreisen gekennzeichnet. Hinsichtlich der Zelldichte und der Morphologie der Dendriten wird eine große Ähnlichkeit zwischen den S-Zapfenbipolarzellen der Maus und des Makaken deutlich. Die Somata der Bipolarzellen sind in B und C mit Sternchen markiert. Maßstabsbalken in B: A, 28,7 μm ; B, C, 20 μm . (Modifiziert nach Haverkamp et al., 2005)

In der Retina von Tieren der Clm1-Mauslinie (Berglund et al., 2006) exprimiert die S-Zapfen-selektive ON-Bipolarzelle neben anderen Neuronen das fluoreszierende Protein Clomeleon (Clm). Mit der Clm1-Maus wird zum ersten Mal eine spezifische Markierung dieser Zelle möglich und dadurch ein Zugang zur Analyse dieses Zelltyps und des Blau-ON-Signalwegs in der Mausretina geschaffen.

S-Zapfenbipolarzellen – auch „blaue Bipolarzellen“ (BBs) genannt – sind ebenfalls aus Retinae anderer Säugetiere bekannt, oder es wurden in letzteren zumindest Bipolarzellen mit sehr ähnlicher Morphologie gefunden (*Erdhörnchen*: Linberg, 1996; Li und DeVries, 2006; *Ratte*: Euler und Wässle, 1995; *Kaninchen*: Famiglietti, 1981; Jeon und Masland, 1995; MacNeil und Gaul, 2008; *Katze*: Cohen und Sterling, 1990; *Affe*: Mariani, 1984; Kouyama und Marshak, 1992; Wässle et al., 1994, siehe auch Abb. 10C).

Die größten Fortschritte in der Analyse des Signaltransduktionswegs von S-Zapfen über S-Zapfenbipolarzellen auf Ganglienzellen konnten bislang in der Primatenretina gemacht werden. Wie bereits in Kapitel I.4 besprochen, weisen die beiden Horizontalzelltypen der Primatenretina (H1 und H2) eine spezifische Verschaltung mit S- bzw. M-/L-Zapfen auf. Dadurch findet eine farbkodierte Modulation der Lichtantwort noch vor der Transduktion des Reizes in die IPL statt. Darüber hinaus wurden Ganglienzelltypen identifiziert, welche von den S-Zapfenbipolarzellen innerviert werden bzw. solche mit einer entsprechenden ON-Antwort auf einen kurzweiligen Lichtreiz (Übersichtsartikel von Dacey und Packer, 2003). Im Mittelpunkt dieser Studien steht die so genannte „kleine bistratifizierte Ganglienzelle“ (Dacey, 1993; Ghosh et al., 1997). Wie der Name besagt, besitzt sie ein kleines dendritisches Feld, über welches sie sowohl in der OFF- als auch in der ON-Schicht der IPL Eingang von bestimmten Bipolarzellen bekommt, wodurch ein Gelb-OFF/Blau-ON-opponentes rezeptives Feld dieser Zelle erzeugt wird (Dacey und Lee, 1994; Calkins et al., 1998; Ghosh und Grünert, 1999; Field et al., 2007). Die Blau-ON-Komponente der Lichtantwort dieser Ganglienzelle entsteht bei der Innervierung durch die S-Zapfenbipolarzelle. Die Gelb-OFF-Komponente wird wiederum durch Eingang von diffusen, also unselektiv mit M- und L-Zapfen verschalteten OFF-Bipolarzellen verursacht (Abb. 11) (Übersichtsartikel von Dacey, 2000; Calkins, 2001).

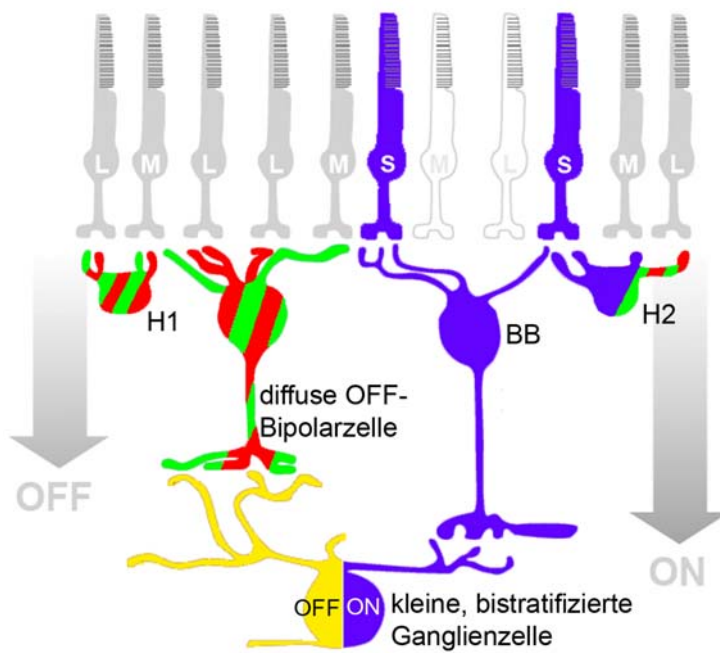


Abbildung 11: Blau-ON/Gelb-OFF-Signalübertragung in der Primatenretina. Das Schema zeigt die farbkodierte Verschaltung der bislang identifizierten Neurone in diesem Transduktionsweg. *BB*, blaue Bipolarzelle. (Modifiziert nach Dacey, 2000)

I.4 Zielsetzung

Wie zuvor erwähnt, wurden die grundlegenden Mechanismen der retinalen Farbverarbeitung in Trichromaten bereits eingehend analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Verschaltung bestimmter Typen von Horizontal- und Bipolarzellen mit den Photorezeptoren einen Farbantagonismus schafft, welcher den Grundstein für die Verarbeitung chromatischer Information in der Retina legt. Es sollte nun in der Retina von Mäusen – als Modellsystem für Dichromaten – untersucht werden, ob die zellulären Voraussetzungen für diesen Farbantagonismus auch hier zu finden sind. Dazu sollten neben einer Analyse der grundlegenden anatomischen Eigenschaften des S-Zapfenendfüßchens und der Expressionsdichte von GluR1 und GluR5 am S-Zapfen auch die synaptischen Kontakte verschiedener OFF-Bipolarzelltypen sowie die der Horizontalzellen an S-Zapfen untersucht werden. Eine typspezifische Reduktion dieser Kontakte am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den M-Zapfen wäre ein Hinweis auf die Existenz eines möglichen Grün-OFF-Signaltransduktionswegs im dichromatischen Sehsystem.

Ein weiteres Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Lokalisation von Protocadherin $\beta 16$ in der OPL der Makakenretina. Primatenretinae lassen im Vergleich zu

Retinae muriner Säuger oftmals eindeutiger Aussagen über zelltypspezifische Expressionsmuster und synaptische Strukturen zu. Deshalb sollte diese Studie neue Hinweise auf eine mögliche Funktion von Pcdh β 16 in der Säugetierretina liefern.

Außerdem wurde eine vergleichende Studie der Verteilung von Zonula Occludens-1 in der Makaken-, der Kaninchen- und der Mausretina durchgeführt, um einen Einblick in die Funktion dieses Proteins an elektrischen Synapsen in der OPL zu gewinnen. Von besonderem Interesse war dabei die Klärung der Frage nach einer möglichen Rolle der ZO-1-Expression unterhalb des Zapfenendfüßchens, welche von Ciolofan et al. (2007) dokumentiert wurde.

II. Material und Methoden

II.1 Versuchstiere

Zur Untersuchung wurden verschiedene Säugetierspezies verwendet. Zum einen fanden die Experimente an Mausretinae von adulten Tieren des wildtypischen Stammes C57BL/6J statt. Darüber hinaus wurden verschiedene Arbeiten an adulten Tieren der transgenen Mauslinie Clomeleon-1 (Clm1) vorgenommen (Berglund et al., 2006). Das von diesen Mäusen exprimierte Clomeleon ist ein unter Kontrolle des *thyl*-Promotors genetisch kodierter, ratiometrischer Fluoreszenzindikator für die intrazelluläre Konzentration von Chloridionen. Dieser Indikator besteht aus dem Fusionsprodukt von einem gelb- und einem cyan-fluoreszierenden Protein, dessen Fluoreszenzsignal durch Antikörper gegen grün-fluoreszierendes Protein (GFP) verstärkt werden konnte. Außerdem standen Retinae von Cx36 *knock-out*²² (Cx36^{-/-}) Mäusen zur Verfügung (Güldenagel et al., 2001). Dies sind gentechnisch veränderte Mäuse, in welchen das Gen zur Kodierung des Proteins Connexin36 (Cx36) gezielt zerstört wurde. Letzteres wird deshalb nicht im Gewebe dieser Tiere exprimiert. Des Weiteren wurden Retinae von adulten Makaken (*Macaca fascicularis*) und Chinchilla Bastard Kaninchen für die Untersuchungen verwendet.

II.2 Genotypisierung der Clm1-Mäuse

Zur Feststellung des Genotyps der Clm1-Mäuse wurde zur DNA²³-Analyse die PCR²⁴-Methode verwendet, weil die Tiere einen wildtypischen Phänotyp aufwiesen. Dabei wird eine Polymerase genutzt, um bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren, welche für die transgenen Tiere im Vergleich zum Wildtyp spezifisch sind. Im Falle der Clm1-Mäuse wurden deshalb Teile der Nukleotidsequenzen vervielfältigt, welche das Clm-Protein

²² engl. für „außer Gefecht setzen“

²³ deoxyribonucleic acid [engl.] – Desoxyribonukleinsäure

²⁴ polymerase chain reaction [engl.] – Polymerase-Kettenreaktion

kodieren. Die verwendeten Oligonukleotide (*Primer*, MWG Biotech) hatten folgende Nukleotidsequenzen:

Primer A: 5'-TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA GG-3'

Primer B: 5'-GTC GTC CTT GAA GAA GAT GGT GC-3'

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden die Schwanzspitzen verwendet. Zur Auflösung der Schwanzspitzen wurden diese dann jeweils in 500 µl Schwanzlysispuffer mit 20 µl Proteinase K in einem Thermoschüttler (Eppendorf) über Nacht bei 55 °C und 1100 U/min inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben daraufhin für 10 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben 5 min mit 13.000 U/min bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert und je 4 µl des Überstands in PCR-Reaktionsgefäße (Biozym) pipettiert. Nach Anfertigung des PCR-Hauptansatzes (Tab. 1, Reagenzien von Qiagen) wurden daraus nun je 21 µl zur Probe in die Reaktionsgefäße gegeben.

Tabelle 1: Pipettierschema für PCR-Hauptansatz

Probenanzahl	10	20	40
	Menge der zuzugebenden Substanz [µl]		
HPLC ²⁵ -Wasser	105	210	420
Magnesiumchlorid	17,5	35	70
10x PCR Puffer	25	50	100
<i>Q-Solution</i>	50	100	200
dNTPs ²⁶	5	10	20
<i>Primer A</i>	2,5	5	10
<i>Primer B</i>	2,5	5	10
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2,5	5	10

Danach wurden die Reaktionsgefäße in einen *PCR Thermal Cycler* (MJ Research, Bio Rad) platziert und das entsprechende Programm zur Vervielfältigung der DNA-Fragmente aktiviert.

²⁵ high performance liquid chromatography [engl.] – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

²⁶ Desoxyribonukleosidtriphosphat

Dieses Programm beinhaltete folgenden Zyklus:

94 °C – 60 sec; Aktivierung der Polymerase

94 °C – 30 sec; Aufspaltung des DNA-Stranges

60 °C – 30 sec; Anlagerung der Primer an den DNA-Strang

72 °C – 60 sec; DNA-Fragmentsynthese

Dieser Zyklus wurde 38x wiederholt. Abschließend wurden die Reaktionsgefäße für 10 min bei 72 °C gehalten, um die Synthese der neu entstandenen Fragmente abzuschließen, bevor die Proben auf 4 °C abgekühlt wurden.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte mittels eines Agarosegels (1,5 % Agarose in 0,5x Trizma-Borsäure-EDTA²⁷ (TBE)). Dafür wurde den Proben je 5 µl 6x DNA-Ladepuffer (Fermentas) zugegeben und auf das Gel zusammen mit einem Größenstandard (*SmartLadder*, Eurogentec) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 1 – 2 h in einer horizontalen Gelkammer (Bio-Rad) gefüllt mit 0,5x TBE bei ca. 130 mV.

Anschließend wurde das Gel zum Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente ca. 15 min in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert und danach ca. 15 min in Aqua bidest. gewaschen. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. Während der Bestrahlung des Gels im UV-Transilluminator (Stratagene) wurde die Fluoreszenz-Emission mit der Software EagleEye (Stratagene) gemessen und dokumentiert. Bei *Cln1*-positiven Tieren erschien eine fluoreszierende Bande im Gel bei einer Laufweite, die ca. 550 Basenpaaren entsprach.

II.3 Vorbereitende Präparation für die Immunhistochemie

Die Betäubung der Mäuse erfolgte mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (DeltaSelect). Nach Betäubung der Tiere wurde das Genick durchtrennt, die Augen seziiert und die Linse zusammen mit dem Glaskörper in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,4) entnommen. Die hinteren Augenbecher wurden daraufhin zur Immersionsfixierung der Retinae in 2 oder 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PB gegeben. Die Fixierzeiten hingen von der Art der weiterführenden Versuche ab.

²⁷ Ethylendiamintetraacetat

Nach der Fixierung wurden die Retinae in PB aus dem Augenbecher herauspräpariert und von eventuell noch anhaftendem Pigmentepithel und Glaskörperresten befreit. Daraufhin wurde das Gewebe 3 x 10 min in PB gewaschen.

Die Tötung der Makaken und Kaninchen erfolgte durch die intravenöse Injektion einer Überdosis Pentobarbital (Sigma). Daraufhin wurden die Augen entnommen, und die Präparation der Retinae erfolgte wie zuvor beschrieben. Im Falle der Makaken geschah dies im Anschluss an andere Untersuchungen, die mit den hier durchgeführten Experimenten nicht in Verbindung standen und auf letztere keinerlei Auswirkung hatten.

II.4 Indirekte Immunfluoreszenz

II.4.1 Retinapräparation

Um Gefrierschnitte anzufertigen, wurde das Gewebe zum Gefrierschutz nach Fixieren und Waschen in eine Saccharose-Reihe bei 4 °C gegeben (2 h in 10 % Saccharose in PB, 2 h in 20 % Saccharose in PB, über Nacht 30 % Saccharose mit 0,02 % Natriumazid in PB). Natriumazid wurde ebenfalls verschiedenen anderen Lösungen beigegeben und sollte das Wachstum von Bakterien und Pilzen im entsprechenden Medium verhindern. Am nächsten Tag wurde das Gewebe für ca. 15 min bei Raumtemperatur (RT) im Einbettmedium (Jung) inkubiert und daraufhin auf die Objektträgerplatte des Kryostaten (Leica CM 3050S) aufgefroren. Nach passender Orientierung des Gewebes auf der Objektträgerplatte wurden nun die Dünnschnitte angefertigt (Schnittdicke 16 µm bei Vertikal- und 35 µm bei Horizontalschnitten), auf Objektträgern (Menzel SuperFrost Plus) aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren. Die Temperatur des Objektträgerkopfes betrug während des Schneidens -17 °C und die der Kammer des Kryostaten -21 °C.

War eine horizontale Gewebeansicht für die Untersuchungen von Vorteil, wurden neben horizontal ausgerichteten Gefrierschnitten auch Retinaganzpräparate für die Immunfärbung verwendet. Dazu wurde das Gewebe nach Präparation aus dem Augenbecher heraus auf passende Größe getrimmt und in der zuvor beschriebenen Saccharose-Reihe inkubiert. Anschließend wurde es auf einem Objektträger ausgebreitet, und zusammen mit diesem kurz über einem mit flüssigem Stickstoff abgekühlten Kupferblock eingefroren und wieder

aufgetaut. Dieser Vorgang ist notwendig, damit die verwendeten Antikörper das Gewebe durchdringen können, indem die Zellmembranen zuvor durch das Gefrieren permeabilisiert werden. Daraufhin wurde das Gewebe 3 x 10 min in PB gewaschen und dann frei schwimmend in MultiWell-Platten (Nunc) weiterbehandelt (s. Kapitel II.4.2).

Horizontale Gefrierschnitte boten sich im Gegensatz zur Benutzung von Retinaganzpräparaten an, sobald einer der verwendeten Antikörper sehr viel unspezifische Hintergrundfärbung im Gewebe verursachte oder ein Antikörper nicht ausreichend in das Gewebe penetrierte. Zur Optimierung der Antikörperpenetration bei Retinaganzpräparaten wurden aber auch horizontal gerissene Retinapräparate von unfixiertem, noch lebendem Gewebe angefertigt. Die Tötung der Tiere erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Präparation der Retinae wurde jedoch in Ames' Medium durchgeführt, welches mit einer Mischung aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid begast wurde, um den pH-Wert des Mediums bei 7,4 – 7,5 konstant zu halten. Dazu wurden Retinastücke von ca. 2 – 3 mm Kantenlänge in Ames' Medium mit der Photorezeptorseite auf eine Nitrozellulosefiltermembran (Millipore) aufgelegt. Daraufhin wurde die Membran mitsamt der Retina aus dem Ames' Medium heraus auf Filterpapier gelegt, um damit Reste des Mediums abziehen und besseren Halt des Gewebes auf der Nitrozellulosemembran zu erreichen. Danach wurde das Präparat wieder in das Ames' Medium gebracht und eine weitere Filtermembran aufgelegt, nun auf die nach oben zeigende Ganglienzellschicht der Retina. Jetzt wurde das Präparat ein weiteres Mal aus dem Medium genommen und auf Filterpapier gelegt. Nachdem der Puffer dadurch weitestgehend entfernt war, konnte die obere Membran vorsichtig mit der Pinzette abgehoben werden, wobei sich die äußeren Segmente der Photorezeptoren ablösten und auf der unteren Membran zurückblieben. Die Membran mit dem übrigen Gewebe wurde zurück in das Ames' Medium gebracht, um ein weiteres Mal eine Membran aufzulegen, danach das Medium abzusaugen und dann die neu aufgebrachte Membran von der Retina außerhalb des Mediums abzuheben. Bei mehrfacher Wiederholung dieses Arbeitsschrittes (ca. 2 – 3x) konnte dadurch die äußere Körnerschicht abgetragen und eine intensivere Immunfärbung in der OPL erzeugt werden. Die Präparate wurden nun vor der anschließenden Immunfärbung für 10 oder 15 min mit 4 % PFA in PB fixiert und nach der Fixierung mehrmals in PB gewaschen.

II.4.2 Immunfärbung der Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Kryoschnitte wurden nun mit einem PAP-Pen (SCI science services) auf den Objektträgern umrandet, um ein Verlaufen der Inkubationslösung zu vermeiden und daraufhin 3 x 10 min mit PB bei RT gewaschen. Retinaganzpräparate wurden direkt in der MultiWell-Platte 3 x 15 min mit PB bei RT auf einem Schüttler gewaschen. Die Immunfärbung von horizontal gerissenem Gewebe mitsamt der Filtermembran wurde entsprechend der Behandlung der Retinaganzpräparate durchgeführt und wird hier deshalb nicht weiter explizit erwähnt. Die Inkubation des Primärantikörpers (Kap. II.10, Tab. 3) erfolgte bei RT für eine Dauer von ca. 24 h bei Kryoschnitten oder von 1 – 3 Tagen auf einem Schüttler bei Retinaganzpräparaten. Dazu wurde der Antikörper in einer tierserumhaltigen Inkubationslösung verdünnt (3 % NDS²⁸ oder NGS²⁹ und 1 % BSA³⁰ in PB mit 0,02 % Natriumazid). Die Seren wurden entsprechend der Herkunft (Esel oder Ziege) der später verwendeten Sekundärantikörper gewählt. Sie dienten zur Vermeidung der sehr unvorteilhaften Hintergrundfärbung, indem unspezifische Bindungen des ersten und besonders des zweiten Antikörpers durch die in der Inkubationslösung enthaltenen Proteine weitgehend verhindert wurden. Bei Doppelfärbungen wurde ein Gemisch aus Primärantikörpern hergestellt. Außerdem enthielten die Inkubationslösungen 0,5 oder 1 % Triton X-100. Dieses nichtionische Detergens diente zur weiteren Permeabilisierung des Gewebes über das Einfrieren und Auftauen hinaus, um eine noch bessere Antikörperpenetration zu gewährleisten.

Nach dem sich hier anschließenden Waschgang (3 x 10 min für Schnitte; 4 x 15 min für Retinaganzpräparate) wurden die Schnitte 1 h und Retinaganzpräparate 3 h bei RT im Sekundärantikörper bzw. bei Doppelfärbungen in einem Gemisch aus solchen inkubiert (Kap. II.10, Tab. 4). Die Sekundärantikörper wurden zuvor wiederum mit den jeweils für die Primärantikörper verwendeten Inkubationslösungen verdünnt und daraufhin 6 min bei 13.000 U/min abzentrifugiert, bevor sie auf das Gewebe gegeben wurden.

Abschließend wurden die Präparate 3 x 10 min (Schnitte) oder 4 x 15 min (Retinaganzpräparate) in PB gewaschen und die Schnitte auf den Objektträgern mit Aqua Poly/Mount

²⁸ normal donkey serum [engl.] – Normales Eselserum

²⁹ normal goat serum [engl.] – Normales Ziegenserum

³⁰ bovine serum albumin [engl.] – Rinderserumalbumin

(Polysciences) eingedeckelt. Die Retinaganzpräparate wurden dazu aus den Multiwellplatten entnommen und auf Objektträgern ausgebreitet, bevor das Eindeckeln erfolgte. Das Aqua Poly/Mount dient im Allgemeinen zur Befestigung des Gewebes auf dem Objektträger unter einem Deckgläschen, ohne dass dabei optische Artefakte (z.B. Lichtabsorption oder -streuung, Autofluoreszenz usw.) entstehen. Darüber hinaus wird durch dieses Einbettmedium einem frühzeitigen, lichtinduzierten Ausbleichen der Präparate vorgebeugt.

II.4.3 Epi- und konfokale Laser Scanning Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Fluoreszenzpräparate wurde an zwei unterschiedlichen Mikroskopen vorgenommen. Zum einen wurde das Fluoreszenzmikroskop »AXIO Imager.Z1« (Zeiss) mit den Öl-Immersionsobjektiven Plan-Apochromat 63x/1,40 und EC Plan-Neofluar 100x/1,30 (Zeiss) verwendet. Als Lichtquelle benutzt dieses Mikroskop eine Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 100 W, Osram), die verwendeten Fluoreszenzfilter sind Tabelle 4 zu entnehmen. Dieses Mikroskop war mit einem ApoTome (Zeiss) ausgestattet, dessen im Fluoreszenzstrahl oszillierendes Gitter für eine Reduktion des Streulichts in der Fokusebene sorgte. Die Bildaufnahme an diesem Mikroskop erfolgte mit einer gekühlten CCD-Kamera AxioCam MRm (Zeiss) und der Software AxioVision v4.6 (Zeiss).

Des Weiteren wurden Bildaufnahmen der Fluoreszenzpräparate mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop angefertigt, dem LSM 5 Pascal Scan-Modul auf einem Axioskop MOT (Zeiss) unter Benutzung der Öl-Immersionsobjektive Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil und Plan-Apochromat 63x/1,40 Oil (Zeiss). Als Lichtquelle verwendet dieses Gerät bei der Bildaufnahme – statt des wie zuvor beschriebenen, gefilterten Lichts einer Quecksilber-Kurzbogenlampe – einen Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm und einer maximalen Ausgangsleistung von 5 mW sowie einem Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 450 – 514 nm und einer maximalen Ausgangsleistung von 200 mW. Entsprechend der erzeugten Laserlichtwellenlängen wird der HeNe-Laser zur Anregung des Fluorochroms Cy3 und der Ar-Laser zur Anregung von Alexa Fluor 488 verwendet. Zur Bedienung der Mikroskopelemente und zur Bildaufnahme wurde die Software LSM 5 Pascal v3.2 SP2 (Zeiss) verwendet. Die Aufnahme erfolgte mit einer Bildauflösung von 1024 x 1024 Pixel.

Mit beiden Mikroskopen wurden Bildstapelaufnahmen der Präparate angefertigt, d.h. dass nach einer Aufnahme die Fokusebene sukzessive entlang der Z-Achse um 0,3 bis 0,4 μm verschoben wurde, um daraufhin jeweils eine weitere Aufnahme desselben Bereichs durchzuführen.

II.6 Analyse der Spezifität von Antikörpern mittels *Western Blot*

Die Spezifität der Bindungseigenschaften unterschiedlicher Antikörper wurde mit Hilfe der *Western Blot* Analyse überprüft. Dabei wurden Proteine homogenisierter Retinae ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Daraufhin konnten die Massen solcher Proteine bestimmt werden, mit welchen die zu untersuchenden Antikörper reagierten.

II.6.1 Anfertigung eines Retina-Totalhomogenats

Zur Gewinnung retinaler Proteinextrakte wurden Totalhomogenate von Maus- und Kaninchenretinae angefertigt. Die Tötung der Tiere erfolgte wie in Kapitel II.3 beschrieben. Zur Entnahme der Retinae aus den Augenbechern wurden diese in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) unter Zugabe von einem Proteaseinhibitor im Mischungsverhältnis 1:500 gegeben. Die Retinae (4 Mausretinae bzw. etwa ein Viertel einer Kaninchenretina) wurden daraufhin in einem mit 1 ml Homogenisierungspuffer gefüllten Homogenisator übernommen und gründlich zerkleinert. Das Totalhomogenat wurde anschließend für 2 min mit 14.000 U/min bei einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert. Dem Homogenat wurde nun 1 ml 20%ige Trichloressigsäure zugesetzt und zum Fällen der Proteine 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 min mit 14.000 U/min bei 4 °C. Der Überstand konnte danach verworfen werden und das durch die Zentrifugation entstandene Proteinpellet wurde in 1 ml reinem, eiskaltem Aceton resuspendiert, um die Säure aus der Probe zu waschen. Anschließend wurde die Lösung noch einmal 10 min mit 14.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt zur Auswaschung der Säure mit Aceton wurde nun ein weiteres Mal wiederholt. Der Überstand wurde nun verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet.

Im Anschluss daran wurden 150 – 200 µl SDS³¹-Probenpuffer auf das Pellet gegeben und letzteres darin wieder aufgelöst. Die Probe wurde nun in einem Thermoschüttler (Eppendorf) für 20 min mit 1100 U/min bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde die Probe mittels eines Thermoblocks 5 – 10 min auf 95 °C erhitzt und anschließend noch einmal durchmischt. Die Probe wurde nun 2 min mit 14.000 U/min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt und davon je 1 x 2,5 µl und 1 x 5 µl zur späteren Proteinmengenbestimmung in zwei weitere Reaktionsgefäße gegeben. Der Überstand konnte jetzt bei -20 °C eingefroren und aufbewahrt werden.

II.6.2 Proteinmengenbestimmung des Totalhomogenats

Die Proteinmengenbestimmung der Homogenate aus Maus- und Kaninchenretinae wurde durchgeführt, um mit definierten bzw. für beide Spezies gleichen Proteinmengen weiterarbeiten zu können.

Zunächst wurde dazu eine BSA³²-Eichreihe nach folgendem Pipettierschema (Tab. 2) erstellt.

Tabelle 2: Pipettierschema für die BSA-Eichreihe

<i>Probennummer</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
BSA [µl]	0	4	8	16	24	32	40	80
Aqua bidest. [µl]	100	96	92	84	76	68	60	20
BSA-Gehalt [µg]	0	2	4	8	12	16	20	40

Nach Herstellung der in Tabelle 2 gezeigten Proben mittels einer BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml, wurden die zuvor aufgeteilten Retinahomogenate ebenfalls mit Aqua bidest. auf eine Gesamtmenge von jeweils 100 µl aufgefüllt. Zu jeder Probe (Retinahomogenate und BSA-Eichreihe) wurde anschließend 200 µl Amidoschwarz-Lösung beigemischt und gut durchmischt, um damit eine Färbung der Proteine für die spätere spektrophotometrische Messung zu erhalten. Die Proben wurden nun für 20 min bei RT inkubiert und daraufhin mit 13.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde den Proben je 1 ml Methanol-Eisessig (Mischungsverhältnis 10:1) zugegeben, um über-

³¹ sodium dodecylsulfate [engl.] – Natriumdodecylsulfat

³² bovine serum albumin [engl.] – Rinderserumalbumin

schüssiges Amidoschwarz auszuwaschen. Daraufhin wurden die Proben 5 min mit 13.000 U/min bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wieder in Methanol-Eisessig aufgelöst. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation farblos erschien. Der Überstand konnte dann verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet werden.

Anschließend wurden die Proben mit je 1 ml 1 M Natronlauge vermischt und 30 min bei RT inkubiert. Mit Hilfe eines Spektrophotometers konnte nun die Absorption der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen werden, wobei die Absorption reiner Natronlauge als Referenzwert verwendet wurde. Mit den so ermittelten Werten der BSA-Eichreihe konnte anschließend eine Eichkurve mittels der Software Excel 2002 (Microsoft) erstellt werden. Der Proteingehalt der Retinahomogenate wurde daraufhin basierend auf der spektrophotometrischen Messung ihrer jeweiligen Absorption mit dieser Eichkurve berechnet.

II.6.3 SDS-PAGE³³ und *Western Blot*

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im Totalhomogenat wurden Probenmengen mit einem Proteingehalt von jeweils 25 µg auf ein Tris-Acetat-Gradientengel (*NuPage*, 3 – 8 %, Invitrogen) zusammen mit einem Proteinstandard zur Größenbestimmung (*HiMark*, Invitrogen) aufgetragen. Dies erfolgte alternierend mit Totalhomogenaten von Maus- und Kaninchenretina. Die Spannung, welche an die mit Laufpuffer gefüllte vertikale Gelkammer (Invitrogen) angelegt wurde, betrug 140 mV. Nach Auftrennung des Proteingemisches erfolgte der Proteintransfer auf eine mit reinem Methanol getränkten und danach in Transferpuffer gewaschenen PVDF³⁴-Membran. Die Übertragungsdauer betrug 3 h bei einer Stromstärke von 200 mA in einer mit Transferpuffer gefüllten Tank-Blot-Kammer. Nach der Übertragung wurde die Blot-Membran kurz in Aqua bidest. und anschließend in Methanol gewaschen. Daraufhin wurde die Membran für ca. 2 min in Ponceau S inkubiert, um die Proteine anzufärben und damit die Güte des Proteintransfers zu prüfen. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff und bindet an positiv geladene Aminogruppen der Proteine. Er ließ sich im Anschluss daran durch erneutes

³³ Polyacrylamidgelektrophorese

³⁴ Polyvinylidenfluorid

Waschen der Blot-Membran in Aqua bidest. und nachfolgend in Methanol wieder entfernen.

II.6.4 Immunfärbung der Blot-Membran und Chemolumineszenz-Reaktion

Zur Antikörperinkubation wurde die PVDF-Membran in Methanol getaucht und danach kurz in Aqua bidest. gewaschen. Anschließend folgte eine Präinkubation in Tris-gepufferter Salzlösung mit 3 % BSA, 0,1 % Tween 20 (TBST) und 0,02 % Natriumazid für 1 h bei RT zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für die nachfolgende Antikörperreaktion. Das in dem Puffer enthaltene Tween 20 ist wie auch Triton X-100 ein nichtionisches Tensid, besitzt aber eine vergleichsweise mildere Wirkung. Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte daraufhin in TBST mit 0,02 % Natriumazid und darin entsprechend Tabelle 3 (Kap. II.10) verdünnten Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Dabei wurden jeweils Blotstreifen mit Proteinen der Maus- und Kaninchenretina zusammen in derselben Primärantikörper-Lösung inkubiert, um später einen besseren Vergleich der Immunreaktion anstellen zu können. Anschließend wurde die Blot-Membran 3 x 10 min in TBST gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit HRP³⁵-konjugierten Sekundärantikörpern (Sigma) mit 3 % BSA in TBST für 1 h bei RT. Zur Erkennung von Primärantikörpern aus dem Kaninchen bzw. aus der Maus wurden HRP-konjugierte Sekundärantikörper aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:20.000 bzw. 1:10.000 verwendet. Natriumazid hemmt die katalytische Wirkung von HRP, deshalb enthielt diese Inkubationslösung kein Azid. Die Blot-Membran wurde daraufhin 2 x 5 min in TBST und 3 x 5 min in Tris-gepufferter Salzlösung ohne Tween 20 gewaschen. Die folgende Chemolumineszenz-Reaktion wurde durch die Inkubation der Blot-Membran für 5 min in Dunkelheit bei RT mit einem ECL³⁶-Detektionssystem (GE Healthcare) hervorgerufen. Dieses Detektionssystem enthält Peroxid und das HRP-Substrat Acridan. HRP katalysiert die Oxidation von Acridan, und die dadurch entstehenden Acridiniumester erzeugen durch eine Reaktion mit Peroxid die Chemolumineszenz mit einer Wellenlänge von 430 nm. Auf die Blot-Membran wurde nun ein lichtempfindlicher Kodak Röntgenfilm Biomax MR (Sigma) aufgelegt (30 sec – 5 min). Anschließend wurde der Film maschinell

³⁵ horseradish peroxidase [engl.] - Meerrettichperoxidase

³⁶ enhanced chemiluminescence [engl.] - verbesserte Chemolumineszenz

entwickelt und fixiert (Curix 60, AGFA), wobei die belichteten Bereiche entsprechend der Orte der Antikörperreaktion auf der Blot-Membran als schwarze Banden erschienen.

II.7 *pre-embedding* Immunzytochemie

Nach der Tötung der Tiere wurden die Augen entnommen, Linse sowie Glaskörper entfernt und die hinteren Augenbecher mitsamt der Retinae 30 bzw. 60 min bei RT mit 4 % PFA in 0,1 M PB immersionsfixiert. Nach der Fixierung wurden die Augenbecher in 0,01 M phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) gewaschen, die Retinae herauspräpariert und zum Gefrierschutz in eine Saccharose-Reihe gegeben (2 h 10 % Saccharose in PBS, 2 h 20 % Saccharose in PBS, über Nacht 30 % Saccharose mit 0,02 % Natriumazid in PBS).

Das auf passende Größe getrimmte Stück der Retina wurde wie zuvor beschrieben, über einem gekühlten Kupferblock eingefroren und wieder aufgetaut, um eine gute Antikörperpenetration in das Gewebe zu gewährleisten. Triton X-100 findet zur Permeabilisierung der Membranen bei der *pre-embedding*-Immunzytochemie keine Verwendung, weil eine gute Strukturhaltung bei dieser Methode besonders wichtig ist. Der Einsatz von Triton X-100 würde an dieser Stelle für die spätere ultrastrukturelle Analyse zu einer zu großen Zellschädigung führen.

Zur anschließenden Herstellung von Vibratomschnitten wurde das Gewebe in quadratische Stücke mit einer Kantenlänge von ca. 3 mm geschnitten und flach in 4 % Agar eingebettet. Der Agar wurde zuvor auf 95 °C erhitzt und zum Einbetten des Gewebes kurz bei RT in einer Petrischale abgekühlt. Nachdem der Agar fest geworden war, konnte ein Block mitsamt dem darin liegenden Gewebe herausgeschnitten und mit Hilfe von handelsüblichem Sekundenkleber auf der Magnetplatte des Vibratoms VT 1000S (Leica) befestigt werden. Nach Befestigung der Platte in der mit PBS gefüllten und von Eis umgebenen Schneidewanne konnten nun die Schnitte angefertigt werden. Die Schnittgeschwindigkeit betrug ca. 0,4 mm/s bei einer Schnittfrequenz der Klinge von etwa 40 Hz. Die Schnittdicke betrug 60 µm. Die Schnitte wurden nun mit einem Pinsel aufgefangen und vorübergehend in einer mit PBS gefüllten Petrischale auf Eis aufbewahrt.

Die Vibratomschnitte wurden dann für 2 h mit NGS (10 %) und BSA (1 %) in PBS zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen präinkubiert. Die Inkubation mit dem in 3 %

NGS, 1 % BSA und 0,02 % Natriumazid in PBS verdünnten Primärantikörper (Tab. 3) erfolgte für 4 Tage bei 4 °C auf einem Schüttler. Daraufhin wurde das Gewebe 4 x 15 min in PBS bei RT gewaschen und für 2 h mit dem in der zuvor beschriebenen Lösung verdünnten biotinylierten Sekundärantikörper aus der Ziege (1:100; Vector, Burlingame, USA) inkubiert.

Jetzt konnten die Schnitte wieder in PBS gewaschen und für 2 h bei RT mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (*ABC elite Kit*, Vector; 1:100 in PBS) abgedunkelt inkubiert werden. Nachdem die Schnitte 2 x 15 min in PBS und 2 x 15 min Tris³⁷-Puffer (0,05 M, pH 7,6) gewaschen wurden, folgte eine Vorinkubation der Schnitte in 0,05 % 3-3'-Diaminobenzidin (DAB in Tris-Puffer, 10 min) mit einer anschließenden Inkubation in 0,05 % DAB mit 0,01 % Wasserstoffperoxid. Der frei werdende Wasserstoff aus der Reaktion der Peroxidase mit dem Wasserstoffperoxid reduziert das DAB. Das dabei entstehende Reaktionsprodukt ist lichtmikroskopisch sichtbar.

Danach wurden die Schnitte 2 x 15 min in 0,05 M Tris-Puffer und 2 x 15 min in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen, um sie anschließend für 1 h mit 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer nachzufixieren. Nach weiteren Waschgängen in Cacodylatpuffer und 4 x 15 min in Aqua bidest. konnte die Silberverstärkung des DAB-Produktes mit 3 % Hexamethylentetramin, 5 % Silbernitrat, 2,5 % Borax, 0,05 % Gold(III)-Chlorid-Chlorwasserstoffsäure und 2,5 % Natriumthiosulfat erfolgen. Alle Reagenzien wurden dafür in Aqua bidest. verdünnt.

Das anschließende Osmieren der Schnitte mit 0,5 % Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer für 30 min bei 4 °C diente dazu, das DAB-Produkt zusätzlich zur Silberverstärkung durch diesen Reaktionsschritt elektronendichter zu machen.

Nach dem Waschen (3 x 10 min in Cacodylatpuffer) erfolgte die Dehydrierung der Gewebeschnitte mit einer Ethanol-Reihe (je 15 min in 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 2 x 100 %) und mit der Inkubation in Propylenoxid (2 x 5 min).

Zur Überführung des Gewebes in das Einbettmedium Epon (ein Kunstharz) wurden die Vibratomschnitte zunächst 30 min in einer Lösung aus Propylenoxid und Epon (1:2) präinkubiert, bevor sie über Nacht bei RT in reinem Epon inkubiert wurden. Daraufhin konnten die Schnitte in frischem Epon eingebettet werden, um das Harz danach 2 Tage bei 60 °C auspolymerisieren zu lassen.

³⁷ Trishydroxymethylaminomethan

Nach der Einbettung wurden von den Präparaten vertikale Ultradünnschnitte (60 – 80 nm) mit Hilfe eines Ultracut S Mikrotoms (Reichert-Jung) angefertigt und auf Pioloform³⁸-beschichteten Kupfer-Lochträgernetzchen aufgefangen.

Abschließend wurde eine maschinelle Positivkontrastierung mit den Schwermetallsalzlösungen Uranylacetat und Bleicitrat mittels des Gerätes EM STAIN (Leica) durchgeführt, um die Feinstrukturen der Schnittpräparate sichtbar zu machen. Das verwendete Standardprogramm sieht eine Kontrastierung bei 25 °C von einer Stunde mit Uranylacetat und darauf folgend 20 min mit Bleicitrat vor. Uranylacetat reagiert mit Nucleinsäuren und Proteinen, Bleicitrat bewirkt hingegen eine Kontrasterhöhung sowohl von Proteinen und Nucleinsäuren als auch von Membranen sowie Glykogen.

II.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Die kontrastierten Ultradünnschnitte auf den Nickel- oder Kupferträgernetzchen wurden an dem Transmissionselektronenmikroskop EM 10 CR (Zeiss) ausgewertet. Für die Bildaufnahme stand eine BioScan Kamera (Gatan) zur Verfügung, die digitale Abbildungen mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten erfassen kann. Die Steuerung dieser Kamera sowie die erste Bearbeitung der Bilder wurde mit der Software Digital Micrograph 3.1 (Gatan) ausgeführt.

II.9 Mikroinjektion von Horizontalzellen

Im Rahmen einer von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten, ortsverteilten Forschergruppe (FOR701, Dynamik und Stabilität retinaler Verarbeitung) wurden unter maßgeblichen Beitrag von Dr. Luis Pérez de Sevilla Müller (AG Neurobiologie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg) Horizontalzellen der Mausretina iontophoretisch mit Lucifer Yellow und Neurobiotin injiziert.

³⁸ Polyvinylformaldehyd

Nach Tötung der Tiere durch Genickbruch wurde die Präparation der Retinae wie zuvor beschrieben in begastem Ames' Medium durchgeführt. Die Retinae wurden auf Stücke einer Größe von ca. 3 x 3 mm getrimmt und mit der Photorezeptorseite auf Nitrozellulosefiltermembranen befestigt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation der Präparate in Ames' Medium mit 10 µM DAPI³⁹ für 60 min bei RT. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA der Zellen bindet, und kann somit zur Markierung von Zellkörpern verwendet werden. Nach mehrmaligem Waschen in frischem Ames' Medium konnten die Zellkörper von Horizontalzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand ihrer Größe und der Lage in der INL identifiziert werden. Nun wurde 2 % Lucifer Yellow und 4 % Neurobition iontophoretisch mit Hilfe von scharfen Mikroelektroden in die Horizontalzellen injiziert. Nach erfolgreicher Injektion wurden die Präparate mit 4 % PFA in PB für 10 min fixiert und danach mehrmals in PB gewaschen. Um das injizierte Neurobiotin sichtbar zu machen, erfolgte nun eine Inkubation des Gewebes über Nacht bei 4 °C mit Cy3-konjugiertem Streptavidin, welches eine hohe Bindungsaffinität zu Biotin besitzt. Im Anschluss daran konnte eine Immunfärbung des Gewebes wie in II.4.2 beschrieben durchgeführt werden.

³⁹ 4',6-Diamidino-2-phenylindol

II.10 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

In Tabelle 3 sind die für diese Studie verwendeten Primärantikörper aufgelistet. Alle Antikörper gehören zur Familie der Immunglobuline Typ G (IgG). Den Antikörpern wird in Tabelle 3 das entsprechende Tier zugeordnet, in welchem sie erzeugt wurden: »rb«, rabbit⁴⁰, »gt«, goat⁴¹, »gp«, guinea pig⁴² und »ms«, Maus. Im Kaninchen und in der Ziege erzeugte Antikörper sind in der Regel polyklonal, aus der Maus stammende Antikörper hingegen monoklonal. Monoklonale Antikörper werden von einem einzelnen Zellklon bzw. von einer einem einzigen Zellklon abstammenden Zelllinie produziert. Die Bezeichnung des Zellklons ist sofern vom Hersteller angegeben in der Spalte »Wirt« in Klammern aufgeführt. Im Gegensatz dazu sind polyklonale Antikörper zwar ebenfalls gegen ein bestimmtes Protein gerichtet, stammen aber aus unterschiedlichen Zellen bzw. Zelllinien und detektieren ggf. unterschiedliche Antigene, was im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern schneller zu einer unspezifischen Immunreaktion im Gewebe führen kann.

⁴⁰ rabbit [engl.] - Kaninchen

⁴¹ goat [engl.] - Ziege

⁴² guinea pig [engl.] - Meerschweinchen

Tabelle 3: Primärantikörper zur Antigen-Detektion für *Western Blots* (WB) und für Präparate der Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie (EM). Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die genannten Verdünnungen auf Experimente für die Fluoreszenzmikroskopie.

Name	Wirt	Verdünnung	Immunogen	Bezugsquelle	Katalognummer
CaBP	ms	1:1000	Calbindin D-28k aus Hühnerdarm	Swant, Bellinzona, Schweiz	300
Calsenilin	ms (4085)	1:2000	Rekombinantes, humanes Calsenilin (Zaidi et al., 2002)	W. Wasco, Harvard Medical School, Charlestown, USA	-
Claudin-1	rb	1:100	C-terminales Peptid von humanem Claudin-1	Zymed, San Francisco, USA	51-9000
Cx36	rb	1:100 – 1:500	C-terminales Peptid von humanem Connexin 36	Zymed, San Francisco, USA	36-4600
Cx36	ms	1:100 – 1:500	C-terminales Peptid von Connexin 36 der Maus	Zymed, San Francisco, USA	37-4600
Cx50 (Cx40)	rb	1:500	C-terminales Peptid aus 19 Aminosäuren (AS) von Connexin 40 der Maus	Chemicon, Temecula, USA	alt: AB1726 neu: AG634
Cx57	rb	1:100 – 1:500	C-terminales Peptid von Connexin 57 der Maus (CSMSMILELSSIMKK) (Janssen-Bienhold et al., 2009)	U. Janssen-Bienhold, C.v.O.-Universität Oldenburg, Deutschland	-
Cx57	rb	1:100 – 1:500	Peptid einer internen Region von Connexin 57 der Maus, Ratte und des Hamsters	Zymed, San Francisco, USA	40-5000
E-Cadherin	ms	1:100	Fusionsprotein aus Maltose-bindendem Protein und einem Peptid entsprechend der cytoplasmatischen Domäne von humanem E-Cadherin	Zymed, San Francisco, USA	33-4000
GABA _A -R	ms (bd24)	1:50	GABA-Benzodiazepin-Rezeptor (α -Kette) aus dem Kortex des Rinds	Chemicon, Temecula, USA	MAB339
GABA _C -R	rb	1:100	AS-Sequenz spezifisch für die $\rho 1$ -Untereinheit der GABA _C -Rezeptoren aus der Ratte (Enz et al., 1996)		
GFP	rb	1:2000	GFP aus <i>Aequorea victoria</i>	Molecular Probes, Eugene, USA	A6255
GFP	gt	1:1000	Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und allen 246 AS von GFP aus <i>Aequorea victoria</i>	Rockland, Gilbertsville, USA	600-101-215
GluR1	rb	1:100	C-terminales Peptid von GluR1 der Ratte (SHSSGMPLGATGL)	Chemicon, Temecula, USA	AB1504
GluR2	ms (6C4)	1:100	Fusionsprotein mit den N-terminalen AS 175 – 430 von GluR2	BD Pharmingen, San Jose, USA	556341
GluR2/3	rb	1:100	C-terminales Peptid von GluR2 der Ratte (EGYNVYGIKSVKI)	Chemicon, Temecula, USA	AB1506

GluR3	gt	1:100 – 1:1000	C-terminales Peptid aus 20 AS von humanem GluR3	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc-7612
GluR4	rb	1:100	C-terminales Peptid von GluR4 der Ratte (RQSSGLAVIASDLP)	Chemicon, Temecula, USA	AB1508
GluR5	gt	1:100	C-terminales Peptid von humanem GluR5 (KLIREERGIRKQSSVHTV)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc-7616
GluR6/7	rb	1:500 – 1:1000	C-terminales Peptid von GluR6 der Ratte (KHTFNDRRLPGKETMA)	Sigma-Aldrich, Saint Luis, USA	G 7669
Glypho	gp & rb	1:1000 – 1:2000	Peptid der AS 826 – 841 von Glykogenphosphorylase aus Rattenmuskel (Pfeiffer-Guglielmi et al., 2003)	B. Hamprecht, Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland	-
HCN4	rb	1:500	Fusionsprotein aus GST und einem Peptid aus den AS 119 – 155 von humanem HCN4	Alamone, Jerusalem, Israel	APC-052
HCN4	gp	1:1000	Peptid aus den AS 1116 – 1201 aus HCN4 der Maus (Mataruga et al., 2007)	A. Mataruga, F. Müller, Forschungszentrum Jülich, Deutschland	-
mGluR6	rb	1:100	C-terminales Peptid von mGluR6 der Ratte (AAPPQNAEDAK)	Neuromics, Edina, USA	RA13105
NK3R	rb	1:500	Peptid aus AS 438 – 452 vom Neurokinin-3-Rezeptor der Ratte (Chang et al., 2006)	A. Hirano, Dept. of Neurobiology and Medicine, UCLA, Los Angeles, USA	-
Occludin	rb	1:100 (WB 1:500)	Fusionsprotein aus GST und einem Peptid der C-terminalen 150 AS von humanem Occludin	Zymed, San Francisco, USA	71-1500
Occludin	rb	1:100 (WB 1:500)	Peptid aus der N-terminalen Region der Occludine aus Mensch, Ratte, Maus, Hund und Orang-Utan	Zymed, San Francisco, USA	40-6100
Occludin	ms	1:100 (WB 1:300)	Fusionsprotein aus GST und 150 AS des C-terminalen Peptids von humanem Occludin	Zymed, San Francisco, USA	33-1500
Parvalbumin	rb	1:1000	Parvalbumin aus Rattenmuskel	Swant, Bellinzona, Schweiz	PV-28
Pcdh B16	rb	1:500 (EM 1:1500)	Peptid aus den AS 291 – 307 von Protocadherin beta 16 (Junghans et al., 2008)	D. Junghans, MPI für Immunbiologie, Freiburg, Deutschland	-
Piccolo	gp	1:800	GST-Fusionsprotein sap44a (AS 2172 – 2361 von Piccolo) (Cases-Langhoff et al., 1996; Fenster et al., 2000)	E. D. Gundelfinger, Leibniz Institut für Neurobiologie, Magdeburg, Deutschland	-
PSD-95	ms (7E3-1B8)	1:5000	Rekombinantes PSD-95 der Ratte	Affinity BioReagents, Golden, USA	MA1-046

S-Opsin	gt	1:100 – 1:1000	N-terminales Peptid von humanem blau-sensitivem Opsin (AS 1 – 50: EFYLFKNISSVGPWDGPQYH)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	sc-14363
S-Opsin JH455	rb	1:100	C-terminales Peptid von humanem, blau-sensitivem Opsin (Wang et al., 1992)	J. Nathans, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA	-
Syntaxin 4	rb	1:1000	Peptid aus AS 2 – 23 von Syntaxin 4 der Maus oder Ratte	Chemicon, Temecula, USA	AB5330
ZO-1	rb	1:500 – 1:1000 (WB 1:2000)	Fusionsprotein entsprechend der AS 463 – 1109 von humaner zonula occludens-1 cDNA	Zymed, San Francisco, USA	61-7300
ZO-1	ms	1:1000 (WB 1:2000)	Rekombinantes Fusionsprotein entsprechend der AS 334 – 634 von humanem zonula occludens-1	Zymed, San Francisco, USA	33-9100

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der Fluorochrome, welche an die IgG-Sekundärantikörper gebunden sind. Ausnahmen bildet darin zum einen das Cy3-konjugierte Streptavidin, welches kein Antikörper ist aber dennoch äquivalent zu den Sekundärantikörpern verwendet wurde. Dieses bakterielle Protein besitzt eine sehr hohe Affinität für Biotin und wurde zur Fluoreszenzfärbung des in die Horizontalzellen injizierten Neurobiotins verwendet. Des Weiteren ist Erdnussagglutinin (PNA⁴³) ein Fluorochrom-gekoppeltes Lektin, welches zur Detektion der Invaginierung von ON-Bipolarzellen an Zapfenendfüßchen verwendet wurde. Diese beiden Reagenzien wurden zusammen mit den Sekundärantikörpern in Lösung inkubiert und sind deshalb in Tabelle 4 mit aufgeführt.

In der Spalte »Art« wird erläutert, in welchem Tier die Antikörper erzeugt wurden und gegen welche Antikörper sie gerichtet sind. Zum Beispiel bezeichnet »dk α ms« einen im Esel erzeugten Antikörper, der spezifisch in der Maus erzeugte Antikörper detektiert. Die übrigen Abkürzungen entsprechen denen aus der zuvor gezeigten Tabelle 1.

Überdies werden die Hersteller bzw. Bezugsquellen und die für die Inkubation verwendeten Verdünnungen aufgelistet. Außerdem zeigt die Tabelle die Nummern der Zeiss-Fluoreszenzfiltersätze im Falle des Mikroskops »AXIO Imager.Z1« (Zeiss) inklusive der jeweiligen Wellenlänge des Lichts [λ], welche durch den entsprechenden Filter zur optimalen Anregung der Fluorochrome auf die Präparate trifft; sowie den Wellenlängenbereich, der nach Emission durch das Fluorochrom vom Mikroskop aufgenommen wird.

⁴³ peanut agglutinin [engl.]

Tabelle 4: Sekundärantikörper und Reagenzien für die Fluoreszenzmikroskopie

Konjugat	Art	Quelle	Verdünnung	Filter
Alexa Fluor 488	gt α rb	Molecular Probes, Eugene, USA	1:500	# 10 Anregung: $\lambda = 450 - 490$ nm Emission: $\lambda = 515 - 565$ nm
	gt α ms			
	dk α rb			
	dk α ms			
	dk α gt			
Cy3	gt α rb	Jackson IR/ Dianova, Hamburg, Deutschland	1:500	# 31 Anregung: $\lambda = 550 - 580$ nm Emission: $\lambda = 590 - 650$ nm
	gt α ms			
	dk α rb			
	dk α ms			
	dk α gp			
	dk α gt			
Cy3-Streptavidin	α Biotin			
Cy5	dk α gt		1:200	# 26 Anregung: $\lambda = 575 - 625$ nm Emission: $\lambda = 660 - 710$ nm
	dk α gp			
PNA (Alexa Fluor 594)	-	Molecular Probes, Eugene, USA		# 26 oder 31

II.11 Bildbearbeitung und -auswertung

Alle durch die zuvor beschriebenen Methoden gewonnenen Ergebnisse und die in Kapitel III gezeigten Abbildungen wurden mit Hilfe der Software Photoshop CS v8.0.1 und Illustrator v10.0.3 (Adobe Systems) erstellt bzw. nachbearbeitet.

Die Auswertung der Größe von Fluoreszenzbereichen (Kap. III.1) wurde mit dem Analysewerkzeug der Software ImageJ v1.38 (National Institutes of Health, Bethesda, USA) durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Bildpunktgrößen und der Schwellenwert von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Einzelkanal-Rohdaten) festgelegt. Anschließend wurden die zu analysierenden Bereiche pro Aufnahme manuell bestimmt, und es erfolgte die Flächenberechnung der Bildpunkte dieser Bereiche (s. Kap. III.1.2). Die so erhaltenen Größenwerte wurden mit der Software Excel 2002 (Microsoft) weiterverarbeitet.

II.12 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung

Lösung	Zusammensetzung
Agar	2 g Agar 50 ml PBS im Wasserbad bei 95 °C lösen
Agarose	1,8 g Agarose 150 ml 0,5x TBE mehrmals aufkochen
Ames' Medium	8,8 g Ames' Medium 1,932 g NaHCO ₃ in 1 L Aqua bidest. mit Gemisch aus 95 % O ₂ und 5 % CO ₂ begasen
Amidoschwarz	14,4 g Amidoschwarz 1 L methanolischer Essigsäure über Nacht lösen, abfiltrieren
Antikörperinkubationslösung (für Immunfluoreszenzfärbungen)	3 % NDS/NGS 1 % BSA 0,5 % oder 1 % Triton X-100 0,02 % NaN ₃ in PB
Antikörperinkubationslösung (<i>pre-embedding</i> Elektronenmikroskopie)	3 % NDS/NGS 1 % BSA 0,02 % NaN ₃ in PBS
Antikörperinkubationslösung (<i>Western Blot</i>)	3 % BSA 0,02 % NaN ₃ in TBST
Bleicitrat	kommerzielle Lösung von Leica
Cacodylatpuffer, 0,1 M, pH 7,4	2,14 g Dimethylarsinsäure Natriumsalz 50 ml Aqua bidest. pH mit 1 N HCl auf 7,4 einstellen auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen
DAPI	DAPI Stammlösung 0,1 mg/ml 1 :1000 in Ames' Medium verdünnen
Diaminobenzidin, 0,05%ig	0,05 % DAB in Tris-Puffer
EDTA-Lösung	0,5 M Ethylendiamintetraacetat einstellen auf pH 7,5 bzw. pH 8
Essigsäure, methanolisch	10 % Eisessig in Methanol
Ethidiumbromid (Gebrauchslösung, 1 µg/ml)	80 µl Stammlösung auf 400 ml mit Aqua bidest. auffüllen
Ethidiumbromid (Stammlösung)	0,5 % in Aqua bidest.
Glutaraldehyd, 2,5%ig	10 µl 25 % Glutaraldehyd (in Aqua bidest.) 90 µl PBS
Gold(III)-Chlorid-Chlorwasserstoffsäure	0,05 % in Aqua bidest.
Homogenisierungspuffer	10 ml PBS 1 Proteaseinhibitortablette
Laufpuffer (20x)	24,2 g Tris Base 35,8 g Tricin 4 g SDS 200 ml Aqua bidest. vor Gebrauch 1:20 in Aqua bidest.
Natriumazid Stammlösung	2 % NaN ₃ in Aqua bidest.

Lösung	Zusammensetzung
Osmiumtetroxid, 0,5%ig	0,5% Osmium aus 4%iger Stammlösung in 0,1 M Cacodylatpuffer
Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA in PB bei 60 – 65 °C verrühren bis die Lösung klar wird. Abfiltrieren.
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 0,01 M, pH 7,4	8,76 g NaCl 0,20 g KCl 50 ml 0,2 M PB pH 7,4 auf 1 L mit Aqua bidest. auffüllen
Phosphatpuffer (PB), 0,1 M, pH 7,4	21,71 g Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 2,62 g Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O in 1 L Aqua bidest.
Phosphatpuffer (PB), 0,2 M, pH 7,4	43,42 g Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 5,24 g Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O in 1 L Aqua bidest.
Pioloform	4 % Polyvinylformaldehyd in Chloroform
Präinkubationslösung <i>pre-embedding</i> Elektronenmikroskopie	10 % NDS oder NGS 1% BSA in PBS
Saccharose, 10/20/30%ig	10/20/30 % Saccharose 0,02 % NaN ₃ in PBS oder PB
Schwanzlysispuffer	0,5 ml 5 M Natriumchloridlösung 0,25 ml 1 M Trizmalösung pH 8,0 auf 25 ml mit Aqua bidest. auffüllen
SDS-Probenpuffer	2 g SDS 10 ml Glycerol 3,03 g Tris Base 100 µl 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0 10 mg Bromphenolblau mit HCl auf pH 8,5 einstellen 30 mg 1,4-Dithioreitol pro ml Puffer hinzufügen
Silbernitrat	5 % in Aqua bidest.
TBE 10x	108 g Trima-Base 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 1000 ml mit Aqua bidest. Auffüllen zum Gebrauch 1:20 auf 0,5x TBE verdünnen
Transferpuffer	4,1 g Bicine 5,25 g BisTris 2 ml EDTA pH 7,5 50 ml 5 % Methanol auf 1000 ml mit Aqua bidest. auffüllen
Trichloressigsäure	20 % in Aqua bidest.
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	100 mM NaCl 50 mM Trishydroxymethylaminomethan pH 7,6 mit HCl einstellen 0,1 % Tween 20 für TBST
Triton X-100 Stammlösung	5% Triton X-100 0,05 % NaN ₃ in PBS
Uranylacetat, 1,5%ig, pH 5,2	1,5 % Uranylacetat in 70 % Ethanol lösen

II.13 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Chemikalien bzw. Reagenzien und deren Bezugsquellen

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
<i>ABC elite Kit</i>	Vector, Burlingame, USA
Aceton	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ames' Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Amidoschwarz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua Poly/Mount	Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschland
Bicine	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BisTris	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bleicitrat (Ultrastain 2)	Leica, Nussloch, Deutschland
Borax (Dinatriumtetraborat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA Fraktion V	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cacodylat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNA-Ladepuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DTT	Boehringer, Mannheim, Deutschland
ECL-Detektionssystem	GE Healthcare, München, Deutschland
EDTA	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gold(III)-Chlorid-Chlorwasserstoffsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hexamethylentetramin	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>HiMark</i> Proteinstandard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	DeltaSelect, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lucifer Yellow	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	KMF, Lohmar, Deutschland
NDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
NGS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Osmiumtetroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pentobarbital	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pioloform	Plano, Wetzlar, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteaseinhibitortablette	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
Reagenzien für PCR-Hauptansatz	Qiagen, Hilden, Deutschland
Saccharose D(+)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>SmartLadder</i>	Eurogentec, Köln, Deutschland
TFM Einbettmedium	Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tricin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat	Agar Scientific (über Plano, Wetzlar, Deutschland)

II.14 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 7: Geräte bzw. Hilfsmittel und deren Bezugsquellen

Gerät/Hilfsmittel	Bezugsquelle
AXIO Imager.Z1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axioskop MOT	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
AxioVision v4.6	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
BioScan Kamera	Gatan, München, Deutschland
BlastP v2.2.18 (bl2seq)	National Institutes of Health, Bethesda, USA
CCD-Kamera AxioCam MRm	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Curix 60	AGFA, Leverkusen, Deutschland

Gerät/Hilfsmittel	Bezugsquelle
Digital Micrograph 3.1	Gatan, München, Deutschland
EagleEye	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
EM STAIN	Leica, Nussloch, Deutschland
Excel 2002	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Gelkammer (horizontal)	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelkammer (vertikal) XCell SureLock	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Illustrator v10.0.3	Adobe Systems, Neu-Isenburg, Deutschland
ImageJ v1.38	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Kodak Röntgenfilm Biomax MR	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kohlendioxid	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Kryostat CM 3050S	Leica, Nussloch, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LSM 5 Pascal	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
MultiWell-Platten	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Nitrozellulosefiltermembran	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Objekträger SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Öl-Immersionsojektive Plan-Neofluar 40x/1,30; Plan-Apochromat 63x/1,40; EC Plan-Neofluar 100x/1,30	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PAP-Pen	SCI science services, München, Deutschland
<i>PCR Thermal Cycler</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Photoshop CS v8.0.1	Adobe Systems, Neu-Isenburg, Deutschland
Photospektrometer LC-55	Perkin-Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
PVDF-Membran	Schleicher und Schuell BioScience, Dassel, Deutschland
Sauerstoff	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Stickstoff	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transmissionselektronenmikroskop EM 10 CR	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Tris-Acetat-Gel (NuPage, 3 – 8 %)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ultracut S Mikrotom	Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland
UV-Transilluminator	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Vibratom VT 1000S	Leica, Nussloch, Deutschland
Vortex	Scientific Industries, Bohemia, USA

III. Ergebnisse

III.1 Anatomische Eigenschaften des S-Zapfenendfüßchens der Mausretina

III.1.1 Postsynaptische Expression von mGluR6

Die S-zapfenspezifische Typ 9 Bipolarzelle wurde auf Grund der Stratifikation ihrer Axonterminalien als ON-Bipolarzelle klassifiziert (Ghosh et al., 2004). Die dendritische Expression von mGluR6 war dementsprechend zu erwarten, sie ist bislang aber noch nicht bewiesen worden. Die hier durchgeführten Experimente an Retinae der Clm1-Maus konnten zeigen, dass mGluR6 auf den dendritischen Spitzen der Typ 9 Bipolarzelle lag (Abb. 12). Darüber hinaus ließ sich erkennen, dass der Großteil von mGluR6 am S-Zapfenendfüßchen durch die Typ 9 Bipolarzelle exprimiert wurde.

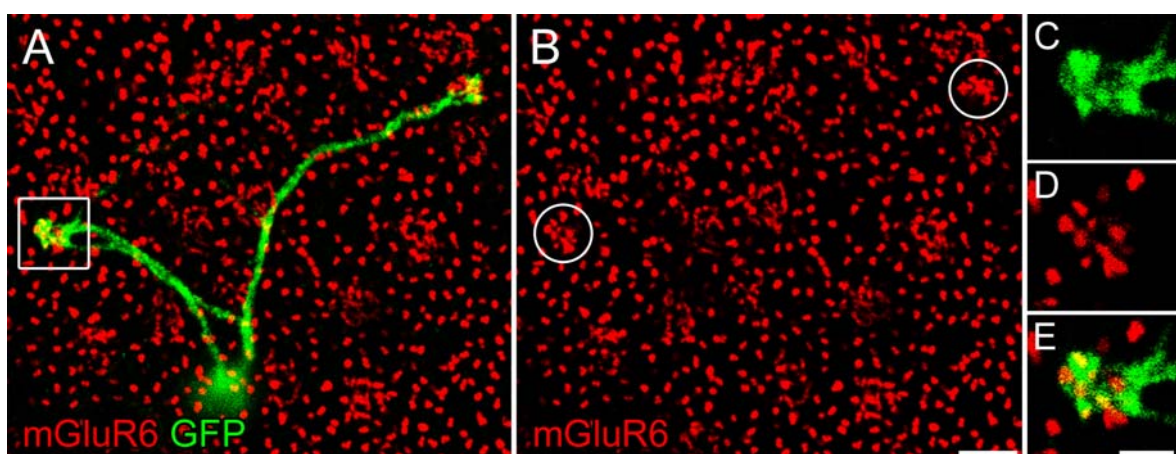


Abbildung 12: Expression von mGluR6 am S-Zapfenendfüßchen. **A, B,** Projektion von konfokalen Bildstapelaufnahmen eines Retinaganzpräparats der Clm1-Maus gefärbt mit mGluR6 und GFP. Die Identifikation zweier S-Zapfenendfüßchen wird durch die dendritischen Kontakte der Typ 9 Bipolarzelle ermöglicht (umkreist in B). **C – E,** Vergrößerung des markierten Bereichs in A. Gezeigt wird ein einzelner optischer Schnitt der Doppelfärbung. Maßstabsbalken: A, B, 5 µm; C – E, 2 µm.

III.1.2 Invaginierungen am Zapfenendfüßchen

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, wird die Färbung von mGluR6 am Zapfenendfüßchen oftmals durch die hohe Dichte der mGluR6-Färbung an den Stäbchenterminalien überlagert. Die Markierung von mGluR6 war deshalb zur Analyse von Bereichen der Invaginierungen am Zapfenendfüßchen ungeeignet.

Aus diesem Grund wurde stattdessen Erdnuss-Agglutinin (PNA) verwendet. PNA ist ein Lektin, das spezifisch und ausschließlich an Glykoproteine von Membranen der Zapfen und nicht an die der Stäbchen bindet (Blanks und Johnson, 1983). Die Färbung von PNA fiel im retinalen Gewebe mit mGluR6 zusammen, weil die PNA-Bindung in den Bereichen der Invaginierungen des Zapfenendfüßchens besonders intensiv war (Mataruga et al., 2007 und Abb. 13 in dieser Studie).

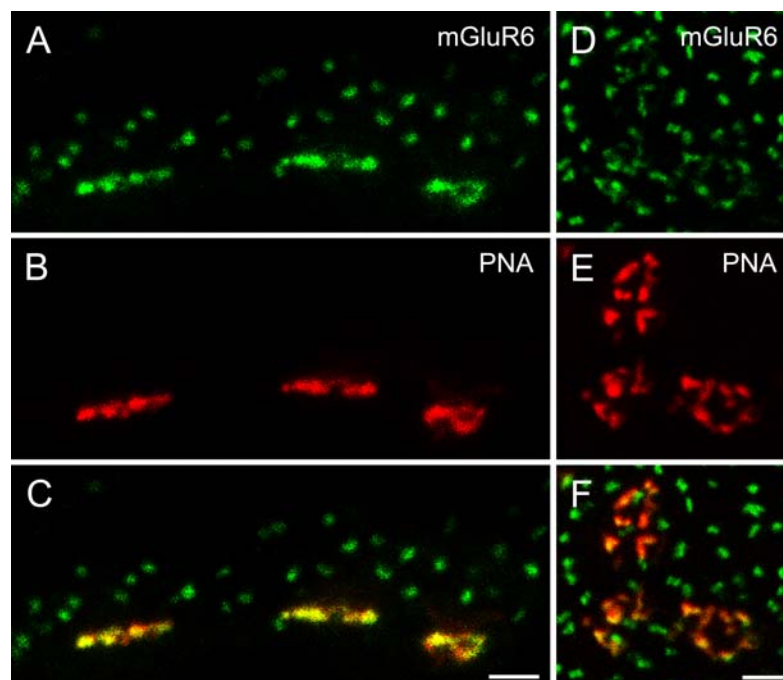


Abbildung 13: mGluR6 und PNA am Zapfenendfüßchen. **A – F,** Doppelfärbung von mGluR6 und PNA auf vertikalen Kryoschnitten (**A – C**) und im Ganzpräparat (**D – F**) der Mausretina. Es werden jeweils drei Zapfenendfüßchen gezeigt. Alle Maßstabsbalken: 2 μ m.

Zur vergleichenden Analyse der Invaginierungen an S- und M-Zapfen wurden Doppelfärbungen von PNA und GFP an Retinae der Clm1-Maus durchgeführt. Eine Markierung des ganzen Photorezeptors inklusive des Zapfenendfüßchens durch S-Opisin-

Antikörper ist in der Mausretina im Gegensatz zum Makaken erst nach phototoxischer Schädigung der Retina und einer dadurch bedingten Umverteilung der Opsine in den Zapfen möglich (Haverkamp et al., 2005). Um jedoch pathologische Veränderungen in der OPL zu vermeiden, die durch so eine Behandlung eventuell entstehen könnten, wurde in diesem und den nachfolgenden Experimenten die Färbung der dendritischen Endigungen von Typ 9 Bipolarzellen in der Clm1-Mauslinie zur Markierung der Lage von S-Zapfenendfüßchen verwendet.

In der Primatenretina ist die PNA-Färbung am S-Zapfenendfüßchen wesentlich dichter gepackt als an M- oder L-Zapfen, was auf eine geringere Größe des S-Zapfenendfüßchens bei gleicher Anzahl der Invaginationen zurückzuführen ist (Haverkamp et al., 2001a). Aus den hier durchgeführten Experimenten an der Mausretina geht allerdings eine deutliche Reduktion der PNA-Färbung am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfen hervor (Abb. 14).

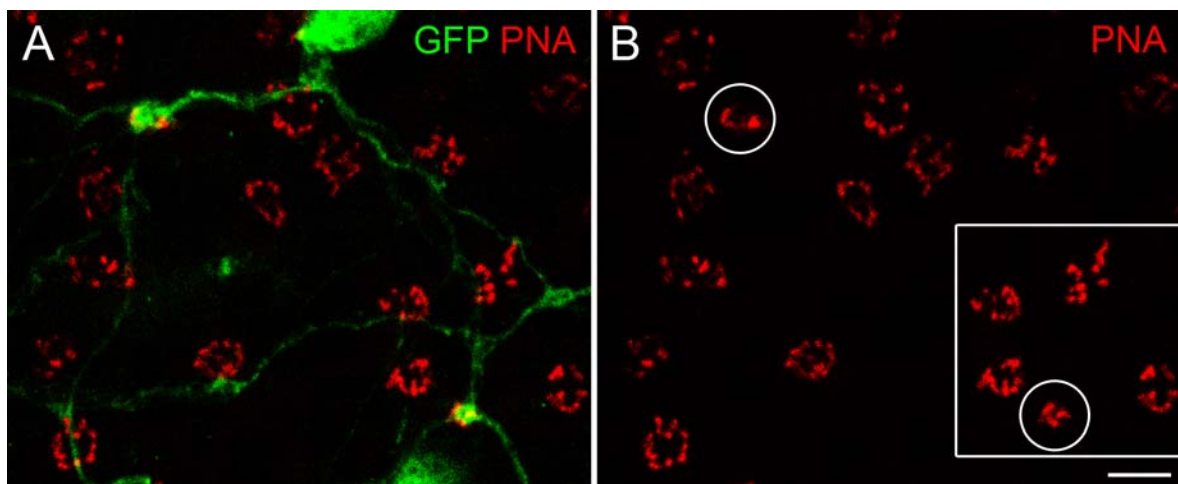


Abbildung 14: PNA am S-Zapfenendfüßchen. **A, B,** Doppelfärbung von PNA und GFP im Retinaganzpräparat der Clm1-Mausretina. Die Position von S-Zapfenendfüßchen kann durch die dendritischen Kontakte von Typ 9 Bipolarzellen identifiziert werden (umkreist in B). Der umrahmte Bereich in B wird in Abbildung 15 erneut gezeigt. Maßstabsbalken: 5 µm.

Die PNA-Färbung ließ sich nicht als punktierte Markierung auflösen. Deshalb war es nicht möglich, damit die Anzahl einzelner Invaginationen am jeweiligen Zapfenendfüßchen zuverlässig zu bestimmen. Um die Bereiche der Invaginationen trotzdem zu messen und um einen gesicherten Vergleich zwischen den Zapfentypen vornehmen zu können, wurden die Fluoreszenzbilder mit der Software ImageJ (National Institutes of Health, USA) analysiert.

Nach Bestimmung der S-Zapfenendfüßchen in Doppelfärbungen an Retinae von mindestens zwei C1m1-Mäusen wurde die zu untersuchende Einzelfärbung – in diesem Falle das PNA – als Graustufenbild in die Software geladen. Die Pixelgrößen sowie die eigentliche Bildgröße wurden definiert und die Farbwerte umgekehrt. Nach der manuellen Festlegung einer Rauschwertgrenze zur Definition des eigentlichen Fluoreszenzsignals konnten daraufhin die Flächen der Fluoreszenzmarkierung berechnet werden. Dafür wurden jeweils die Fluoreszenzflächen pro Zapfenendfüßchen markiert. Fünf davon sind beispielhaft in Abbildung 15 gezeigt. Sie entsprechen dem Ausschnitt aus Abbildung 14B, innerhalb welcher die PNA-Färbung an einem S-Zapfenendfüßchen und an vier M-Zapfenendfüßchen zu sehen ist. Entsprechend des hier gewählten Ausschnitts wurden immer solche Fluoreszenzmarkierungen an M-Zapfenendfüßchen analysiert, die einem S-Zapfenendfüßchen eng benachbart waren. Dies sollte Unterschiede in den Messergebnissen verhindern, die sonst allein auf Unterschiede in der Qualität bzw. Intensität der Fluoreszenzfärbung über das Präparat hinweg zurückzuführen gewesen wären.

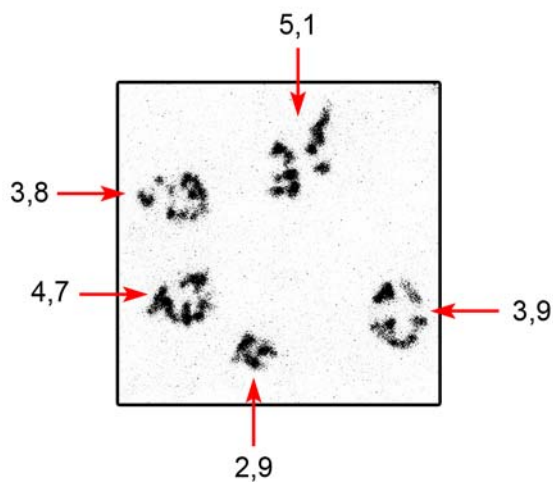


Abbildung 15: Analyse der PNA-Markierung an Zapfenendfüßchen der Mausretina mit ImageJ. Die Ergebnisse der Berechnung einzelner Fluoreszenzflächen pro Zapfenendfüßchen sind an den Zahlenwerten [μm^2] abzulesen. Die PNA-Färbung des S-Zapfenendfüßchens befindet sich am unteren Bildrand und besitzt den kleinsten Wert von $2,9 \mu\text{m}^2$.

Die ermittelten Fluoreszenzflächen von PNA pro Zapfenendfüßchen sind in Abbildung 16 dargestellt. In diesem und allen weiteren Histogrammen in Kapitel III.1 wurde zur vergleichenden Darstellung der Häufigkeitsverteilungen die maximale Anzahl analysierter Zapfenendfüßchen für die jeweilige Population (S bzw. M) auf 1 normiert.

Die PNA-Markierung an M-Zapfenendfüßchen ($n = 149$) besaß im Mittel eine Fläche von $5,2 \mu\text{m}^2$ mit einer Standardabweichung von $1,1 \mu\text{m}^2$. Die PNA-Fläche an S-Zapfenendfüßchen ($n = 30$) war hingegen $\bar{\varnothing} 3,4 \pm 0,9 \mu\text{m}^2$ groß. Mit der Software Excel (Microsoft,

USA) wurden die Ergebnisse ausgehend von einer Normalverteilung durch einen t-Test für zwei unabhängige Stichproben überprüft. Dieser Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied für die besagten Mittelwerte ($p < 0,001$). Der qualitative Eindruck einer Reduktion konnte also mittels der beschriebenen Messung belegt werden.

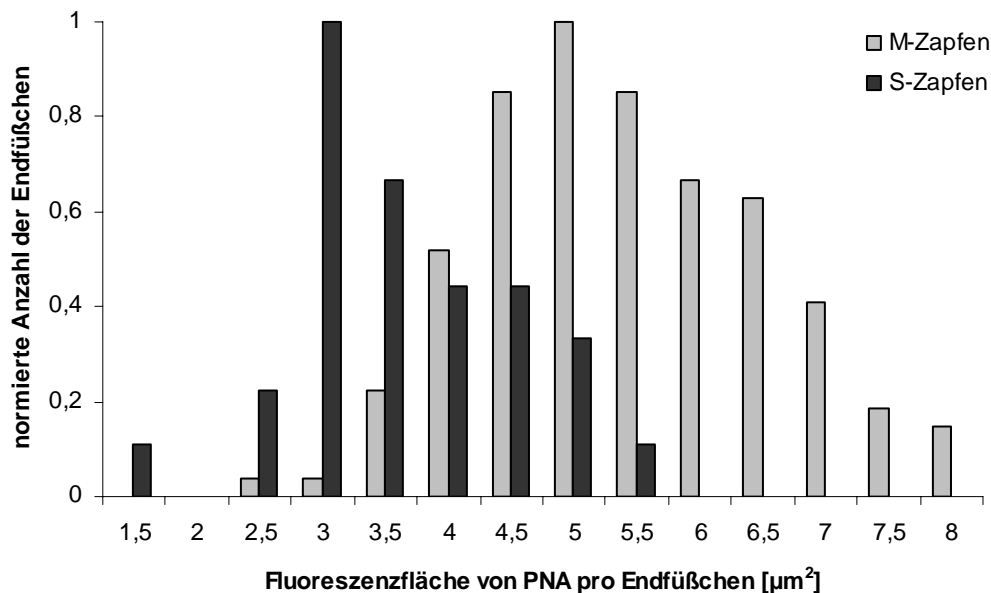


Abbildung 16: Histogramm der Fluoreszenzflächen von PNA an einzelnen S- und M-Zapfen.

Eine genauere Auskunft über die Anzahl der Invaginationen am Zapfenendfüßchen kann eine Färbung der präsynaptischen Proteinbänder mit Piccolo liefern (Dick et al., 2001). In der Mausretina erwies sich eine Zählung der Proteinbänder aber als schwierig, weil die Proteinbänder der Stäbchenterminalien die der Zapfenendfüßchen oftmals überlagerten und dadurch eine ausführliche Analyse unmöglich machten (Abb. 17). Von einer ausführlichen Untersuchung der Proteinbänder am S-Zapfenendfüßchen wurde auf Grund dieser Schwierigkeiten abgesehen. An insgesamt 7 M-Zapfenendfüßchen konnten jedoch je 10 ($n = 5$) bzw. 9 ($n = 2$) Proteinbänder gezählt werden.

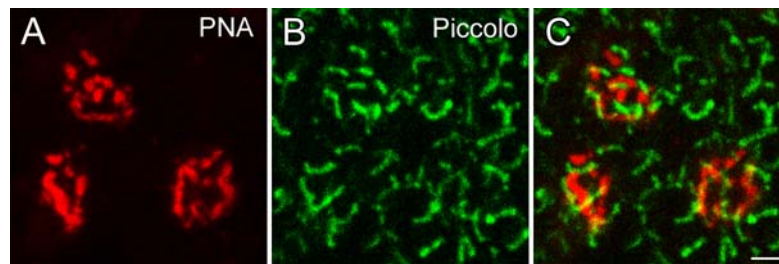


Abbildung 17: Proteinbänder der Zapfenendfüßchen. **A – C**, Doppelfärbung von PNA und Piccolo im Ganzpräparat der Mausretina. Gezeigt sind drei mit PNA markierte Zapfenendfüßchen und die Färbung der Proteinbänder durch Piccolo an diesen Zapfen und an den Stäbchenterminalien in ihrer Umgebung. Die Zählung der Proteinbänder ist nur am oberen Zapfenendfüßchen möglich. Maßstabsbalken: 2 μm .

III.1.3 Größe der Basis von Zapfenendfüßchen

Um zu prüfen, ob die vergleichsweise kleinen Bereiche der Invaginierung am S-Zapfenendfüßchen mit der allgemeinen Größe des Zapfenendfüßchens korrelierten, wurden Clm1-Retinae mit Glykogenphosphorylase (Glypho) gegengefärbt (Abb. 18). Glypho färbt in der Mausretina neben weiteren Zelltypen den gesamten Zapfen (Haverkamp et al., 2005) und eignete sich deshalb in der OPL zur Markierung des Zapfenendfüßchens. Die Doppelfärbung zeigte keinen offensichtlichen Unterschied in der Fläche von S- und M-Zapfenendfüßchen.

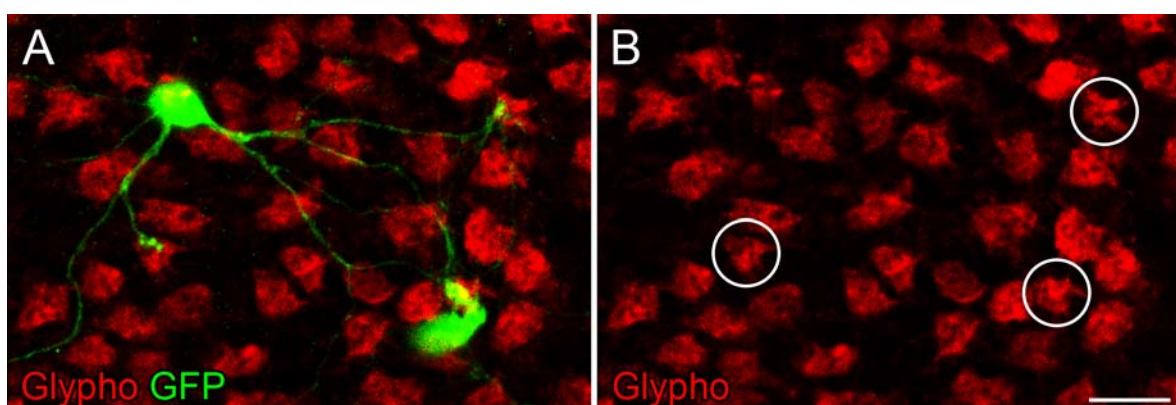


Abbildung 18: Die basalen Membranen der Zapfenendfüßchen. **A, B**, Doppelfärbung von GFP und Glypho im Ganzpräparat der Clm1-Mausretina. Drei der mit Glypho gefärbten Zapfenendfüßchen können als S-Zapfenendfüßchen identifiziert werden (umkreist in B). Maßstabsbalken: 10 μm .

Die Fluoreszenzfläche einzelner Zapfenendfüßchen wurde wiederum wie im vorherigen Kapitel mit ImageJ und Excel berechnet bzw. ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, dass es im Mittel einen kleinen, aber dennoch hochsignifikanten Unterschied zwischen den Größen von S- und M-Zapfenendfüßchen gab ($p < 0,001$). M-Zapfenendfüßchen besaßen eine Größe von $\varnothing 26,5 \pm 4,9 \mu\text{m}^2$ ($n = 288$). Die basalen Membranen der S-Zapfenendfüßchen wiesen hingegen eine Fläche von nur $\varnothing 22,4 \pm 4,3 \mu\text{m}^2$ auf ($n = 25$). Die ermittelten Werte sind in Abbildung 19 zusammengefasst.

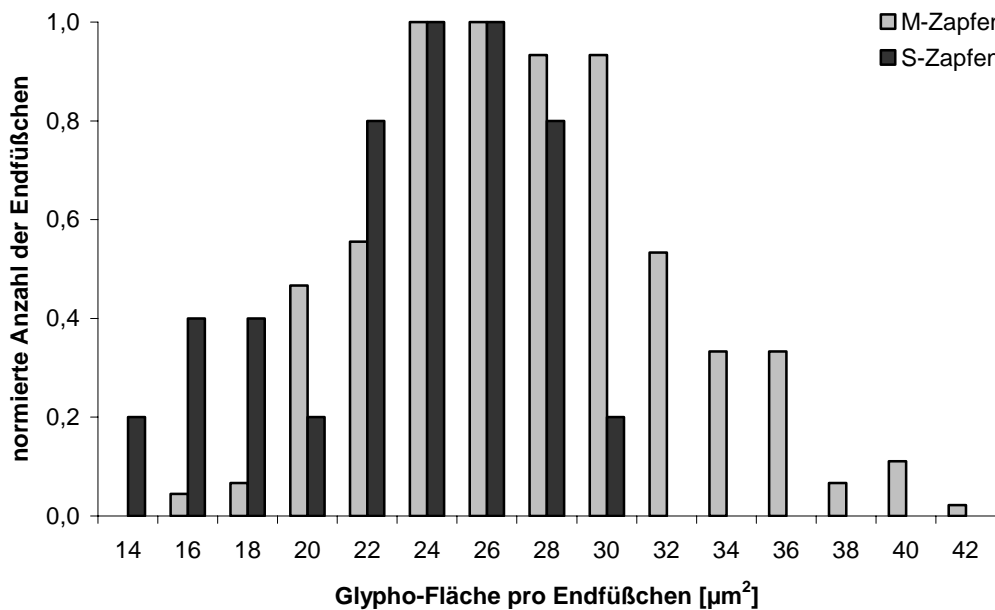


Abbildung 19: Histogramm der Glypho-Flächen an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.

III.1.4 Postsynaptische Expression von ionotropen GluRs der OFF-Bipolarzellen

Postsynaptisch zum Zapfenendfüßchen werden die ionotropen GluR-Untereinheiten GluR1 und GluR5 auf Dendriten der OFF-Bipolarzellen exprimiert. Wie bereits in der Mausretina gezeigt wurde, ist die Kainatrezeptor-Untereinheit GluR5 am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den M-Zapfen reduziert (Haverkamp et al., 2005).

Dieses Ergebnis konnte durch Doppelfärbung von GFP und GluR5 an Retinae von Clm1-Mäusen noch einmal bestätigt werden. Während an M-Zapfenendfüßchen dichte Anhäufungen von GluR5 zu finden waren, erschienen an S-Zapfenendfüßchen nur vereinzelte GluR5-immunreaktive Punkte (Abb. 20).

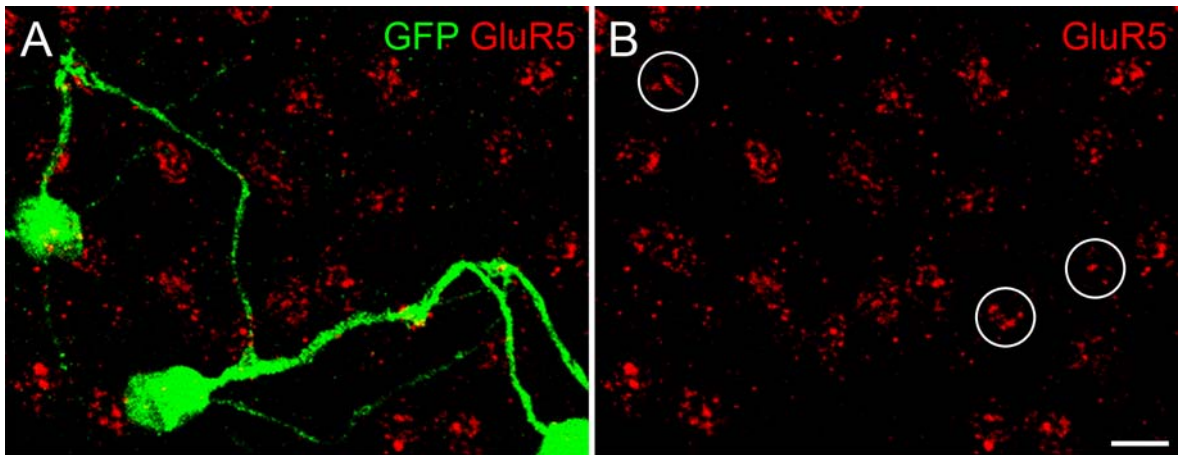


Abbildung 20: Expression von GluR5 am Zapfenendfüßchen. **A, B,** Doppelfärbung von GFP und GluR5 im Ganzpräparat der Clm1-Mausretina. Die Positionen der Zapfenendfüßchen können durch die postsynaptischen Anhäufungen von GluR5 identifiziert werden. Die drei gezeigten S-Zapfenendfüßchen sind in B umkreist. Maßstabsbalken: 5 µm.

Ähnlich wie bei der PNA-Färbung ließen sich die GluR5-Anhäufungen nicht immer in einzelne immunreaktive Punkte auflösen, sodass Auszählungen an S- und M-Zapfenendfüßchen kaum möglich waren. Für eine vergleichende Analyse wurden deshalb auch hier Fluoreszenzflächenberechnungen mit ImageJ durchgeführt (Abb. 21).

Die Fluoreszenzflächen der summierten GluR5-immunreaktiven Punkte pro M-Zapfenendfüßchen besaßen eine Größe von $\bar{\varnothing} 3,6 \pm 1,2 \mu\text{m}^2$. Am S-Zapfenendfüßchen belief sich diese Größe auf einen Mittelwert von nur $2,0 \pm 0,8 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,001$).

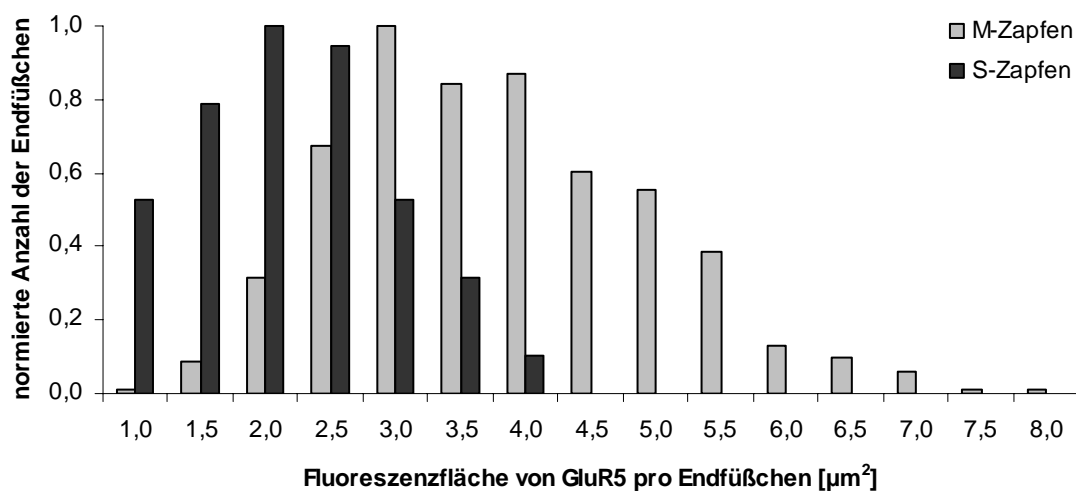


Abbildung 21: Histogramm der Fluoreszenzflächen von GluR5 an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.

Die für GluR5 festgestellte Reduktion am S-Zapfen zeigte sich ebenfalls für die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 in der Doppelfärbung mit GFP in der Clm1-Maus. Auch bei dieser Färbung waren nur noch wenige GluR1-immunreaktive Punkte an den S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den postsynaptischen Anhäufungen an M-Zapfen zu erkennen (Abb. 22).

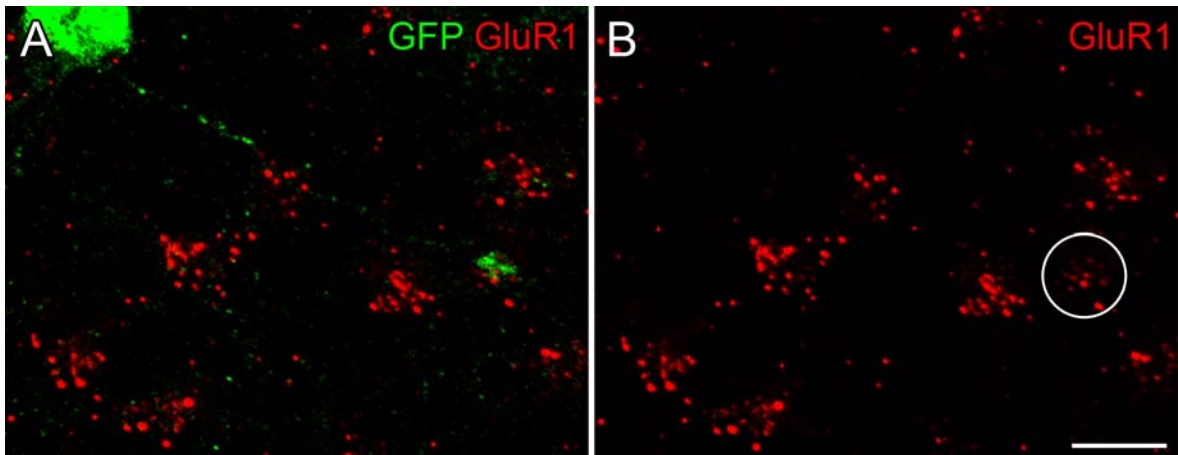


Abbildung 22: Expression von GluR1 am Zapfenendfüßchen. **A, B,** Doppelfärbung von GFP und GluR1 im Ganzpräparat der Clm1-Mausretina. Die Positionen der Zapfenendfüßchen können wiederum durch die postsynaptischen Anhäufungen von GluR1 identifiziert werden. Ein einzelnes S-Zapfenendfüßchen wird durch den Dendriten der Typ 9 Bipolarzelle markiert (umkreist in B). Maßstabsbalken: 5 μm .

Die Flächenberechnung der GluR1-Punkte belegte abermals die in Abbildung 22 gezeigte Reduktion am S-Zapfenendfüßchen. Dort belief sich die Fläche der GluR1-Punkte pro Zapfenendfüßchen im Mittel auf $1,5 \pm 0,6 \mu\text{m}^2$ ($n = 17$). An M-Zapfenendfüßchen wurde hingegen eine Fluoreszenzfläche von $\varnothing 2,9 \pm 0,8 \mu\text{m}^2$ berechnet ($n = 89$) ($p < 0,001$). Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 23 zusammengefasst.

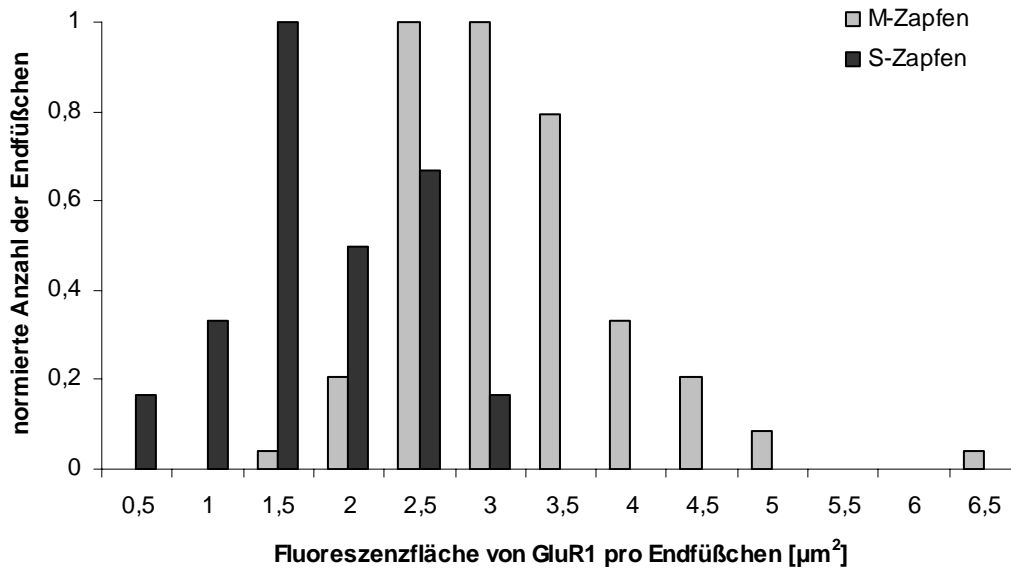


Abbildung 23: Histogramm der Fluoreszenzflächen von GluR1 an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.

III.1.5 Kontakte von OFF-Bipolarzellen am Zapfenendfüßchen

Als Folge der Reduktion ionotroper GluRs am S-Zapfenendfüßchen wurde eine Verminderung der Kontakte von OFF-Bipolarzellen am S-Zapfen im Vergleich zu den übrigen Zapfen erwartet. Die Untersuchung der OFF-Bipolarzellkontakte am Zapfenendfüßchen erfolgte durch Dreifachfärbungen von GFP, Glypho und subtypspezifischen Markern für OFF-Bipolarzellen an Retinae von *C1m1*-Mäusen. Die verwendeten Bipolarzellmarker waren Antikörper gegen NK3R für die Typen 1 und 2, HCN4 für Typ 3a und Calsenilin, ein Calcium-bindendes Protein, für Typ 4 (Haverkamp et al., 2003, 2008; Mataruga et al., 2007; Wässle et al., 2009).

Es zeigte sich, dass die Zapfenendfüßchen beider Populationen jeweils sehr inhomogen durch den jeweiligen OFF-Bipolarzelltyp kontaktiert wurden. Es fand sich teils eine größere, teils eine nur geringe Anzahl von dendritischen Bipolarzellfortsätzen sowohl an S- als auch an M-Zapfenendfüßchen (Abb. 24). Die qualitative Analyse der Kontakte von OFF-Bipolarzellen bot dementsprechend kein klares Bild hinsichtlich der erwarteten Reduktion am S-Zapfenendfüßchen.

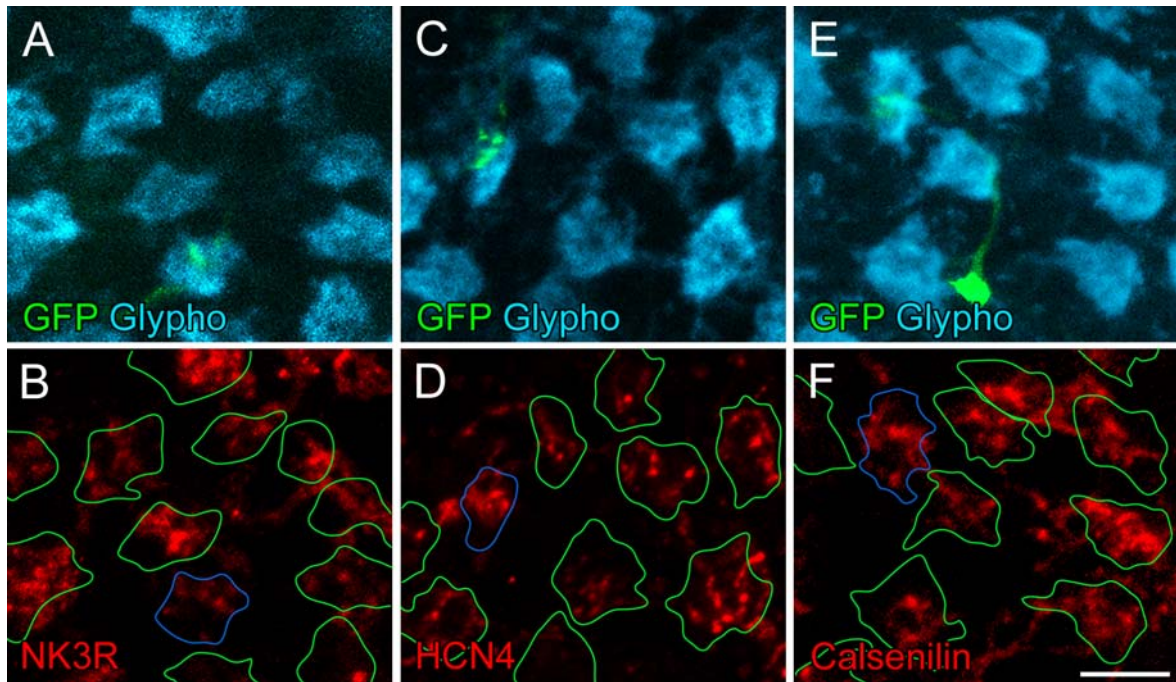


Abbildung 24: OFF-Bipolarzellkontakte am Zapfenendfüßchen. **A – F,** Dreifachfärbungen von GFP, Glypho und NK3R (A, B) bzw. HCN4 (C, D) und Calsenilin (E, F) in Ganzpräparaten der Clm1-Mausretina. A, C und E zeigen Glypho-markierte Zapfenendfüßchen, von denen je einer durch den Kontakt einer Typ 9 Bipolarzelle als S-Zapfen identifiziert werden kann. Die Flächen der Zapfenendfüßchen wurden umrandet (M-Zapfen grün, S-Zapfen blau) und jeweils in B, D und F übertragen. Dort sind jeweils die Bipolarzellmarker derselben Bereiche wie in A, C und E zu sehen. Maßstabsbalken: 5 μm .

Anschließend wurde geprüft, ob eine quantitative Auswertung der Fluoreszenzfärbungen eine genauere Aussage treffen konnte. Besonders im Falle der NK3R-Färbung war eine direkte Auszählung der dendritischen Bipolarzellkontakte allerdings nicht möglich, weil zwei Bipolarzelltypen durch NK3R markiert wurden. Darüber hinaus war die Calsenilin-Färbung der Dendriten (von Bipolarzellen des Typs 4) oftmals sehr diffus. Deshalb wurde zur Analyse der Fluoreszenzbilder abermals wie bereits in Kapitel III.1.2 beschrieben die Software ImageJ herangezogen, um damit die summierten Bipolarzell-Fluoreszenzflächen pro Zapfenendfüßchen zu berechnen.

Anders als beim ersten Eindruck durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war durch die Quantifizierung ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den NK3R-Fluoreszenzflächen am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu denen am M-Zapfenendfüßchen festzustellen (Abb. 25). Der Mittelwert der Fluoreszenzflächen von NK3R am M-Zapfenendfüßchen betrug $5,0 \pm 1,7 \mu\text{m}^2$ ($n = 80$). Am S-Zapfenendfüßchen fand sich hingegen eine Fläche von nur $2,0 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$ ($n = 13$) ($p < 0,001$).

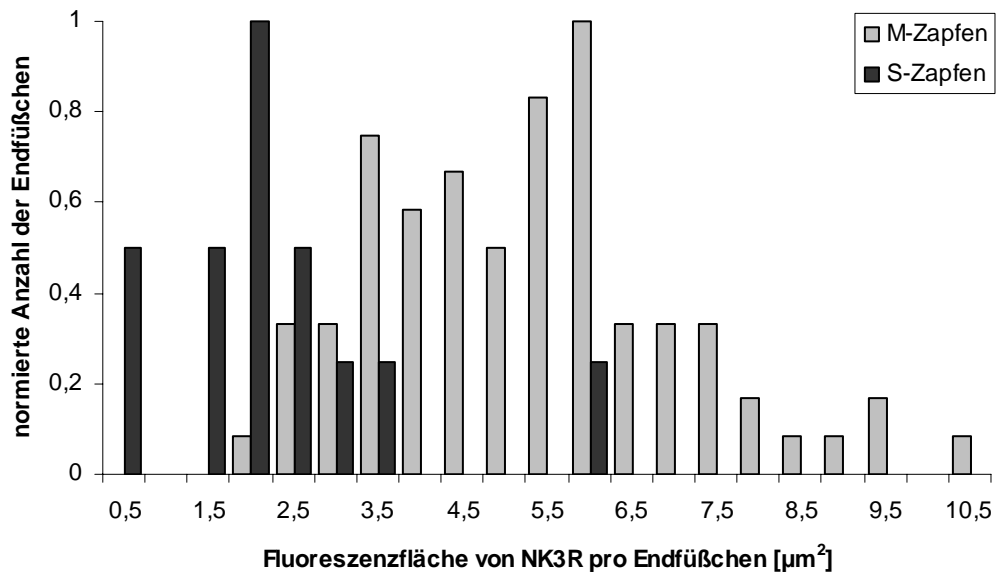


Abbildung 25: Histogramm der Fluoreszenzflächen von NK3R an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.

Im Gegensatz zu den NK3R-Fluoreszenzflächen bestand für die Typen 3a und 4 kein signifikanter Unterschied in ihren Kontakten zu S- und M-Zapfen. Die Fluoreszenzflächen von HCN4 am M-Zapfenendfüßchen betragen im Mittel $1,9 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$ ($n = 32$), am S-Zapfenendfüßchen $1,8 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$ ($n = 8$) ($p > 0,05$) (Abb. 26).

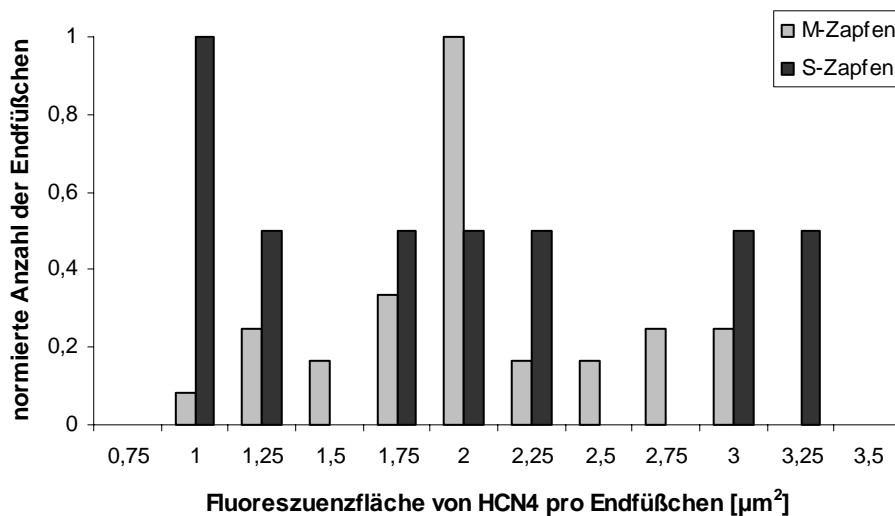


Abbildung 26: Histogramm der Fluoreszenzflächen von HCN4 an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.

Für Calsenilin wurde eine Fluoreszenzfläche am M-Zapfenendfüßchen mit einer Größe von $\bar{O} 2,4 \pm 1,1 \mu\text{m}^2$ gefunden ($n = 44$). An S-Zapfen war die mittlere Fläche von $1,9 \pm 1,1 \mu\text{m}^2$ ($n = 11$) nur minimal geringer (Abb. 27). Dieser Unterschied zeigte dementsprechend wiederum keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$)

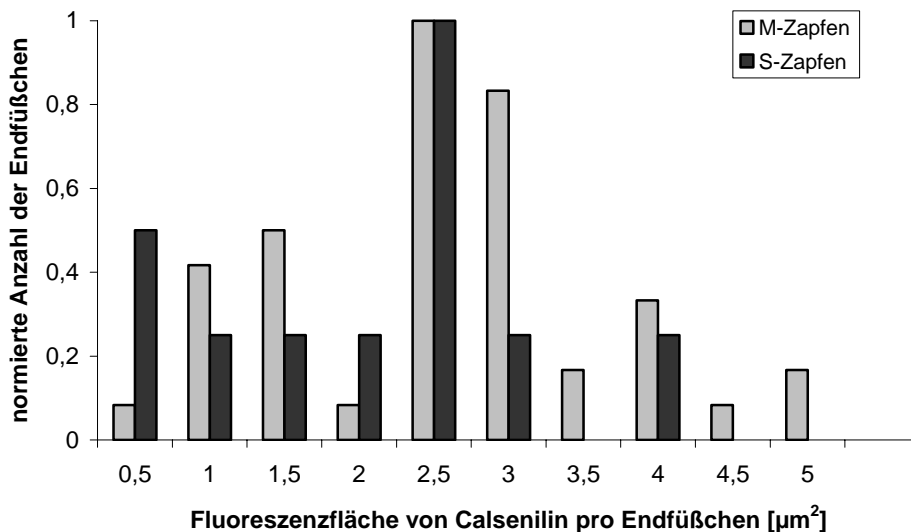


Abbildung 27: Histogramm der Fluoreszenzflächen von Calsenilin an einzelnen S- und M-Zapfenendfüßchen.

III.1.6 Horizontalzellkontakte am S-Zapfenendfüßchen der Mausretina

Mit Hilfe der PNA-Färbung konnte in Kapitel III.1.2 eine Reduktion der Bereiche der Invaginationen an S-Zapfenendfüßchen von etwa 25 % im Vergleich zu den übrigen Zapfen ermittelt werden. Neben den dendritischen Spitzen der ON-Bipolarzellen sind ebenfalls die Dendriten der Horizontalzellen an diesen Invaginationen beteiligt. Deshalb wurde geprüft, ob sich die zuvor erwähnte Reduktion ebenfalls in einer Verringerung der synaptischen Kontakte von Horizontalzellen widerspiegelt.

Horizontalzellen der Mausretina lassen sich mit Antikörpern gegen das Calcium-bindende Protein Calbindin (CaBP) markieren (Peichl und González-Soriano, 1994). Ein Nachweis der Horizontalzellkontakte an S-Zapfenendfüßchen durch Färbungen mit CaBP erwies sich allerdings als ungeeignet. Selbst bei Verwendung eines Markers für Zapfenendfüßchen

(wie z.B. GluR5) machte das sehr dichte Netzwerk der Horizontalzell-Axonterminalien eine genaue Analyse der dendritischen Kontakte zu den Zapfenendfüßchen weitestgehend unmöglich. Abbildung 28 zeigt eine Doppelfärbung von GFP und CaBP in der Clm1-Mausretina. Bei einer Analyse der Bildstapelaufnahmen wurde klar, dass etwa die Hälfte der am S-Zapfenendfüßchen erkennbaren Horizontalzellfortsätze den Axonterminalien zuzuordnen sind. Insgesamt erschienen die S-Zapfenendfüßchen also nur schwach von Horizontalzellendendriten kontaktiert.

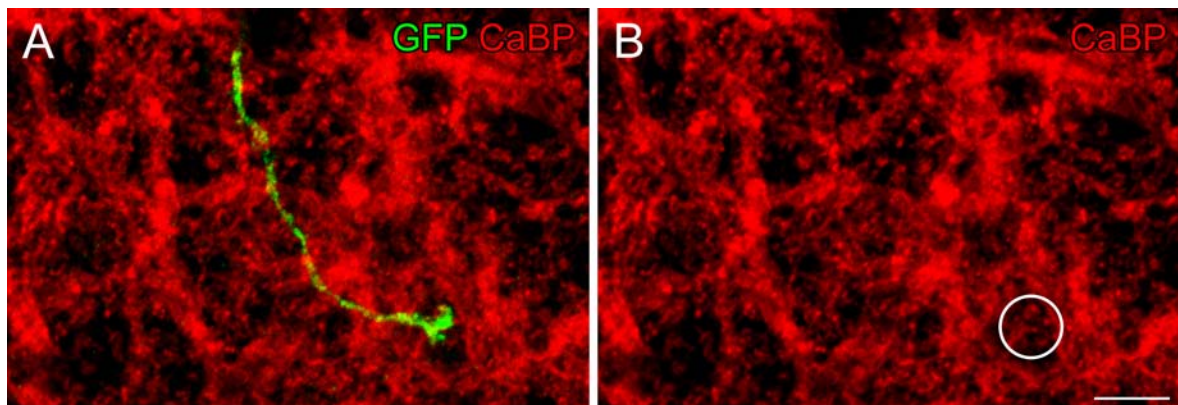


Abbildung 28: Horizontalzellkontakte am S-Zapfenendfüßchen. **A, B,** Retinaganzpräparat der Clm1-Maus gefärbt gegen GFP und den Horizontalzellen mittels CaBP. Die Identifikation eines S-Zapfenendfüßchens wird durch den dendritischen Kontakt der Typ 9 Bipolarzelle ermöglicht (umkreist). Maßstabsbalken: 10 μm .

Um ein eindeutigeres Bild der Horizontalzellkontakte an den S-Zapfenendfüßchen der Mausretina zu erhalten, wurden Horizontalzellen mit Neurobiotin injiziert. Neurobiotin ist klein genug, um die *gap junctions* zwischen den Horizontalzellen zu durchdringen. Wird eine einzelne Horizontalzelle damit injiziert, ist es deshalb möglich ein räumlich begrenztes Horizontalzellnetzwerk zu markieren (Vaney, 1991; Weiler et al., 1999). Der Vorteil dieser Methode im Gegensatz zur CaBP-Färbung ist, dass dabei nur die Horizontalzellkörper und -dendriten markiert werden, weil die Länge und der geringe Durchmesser der Axone eine Diffusion des Neurobiotins in die Axonterminalien weitgehend verhindern.

In Abbildung 29 sind zwei solcher injizierten Horizontalzellnetzwerke in der Clm1-Maus gezeigt. Innerhalb der Netzwerke kann die Position von jeweils einem S-Zapfenendfüßchen durch die dendritischen Kontakte von Typ 9 Bipolarzellen identifiziert werden. Die vorläufigen Ergebnisse durch die CaBP-Färbungen wurden hiermit bekräftigt, weil

durch diese Versuche eine klare Reduktion der Horizontalzellkontakte an S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfenendfüßchen erkennbar wurde.

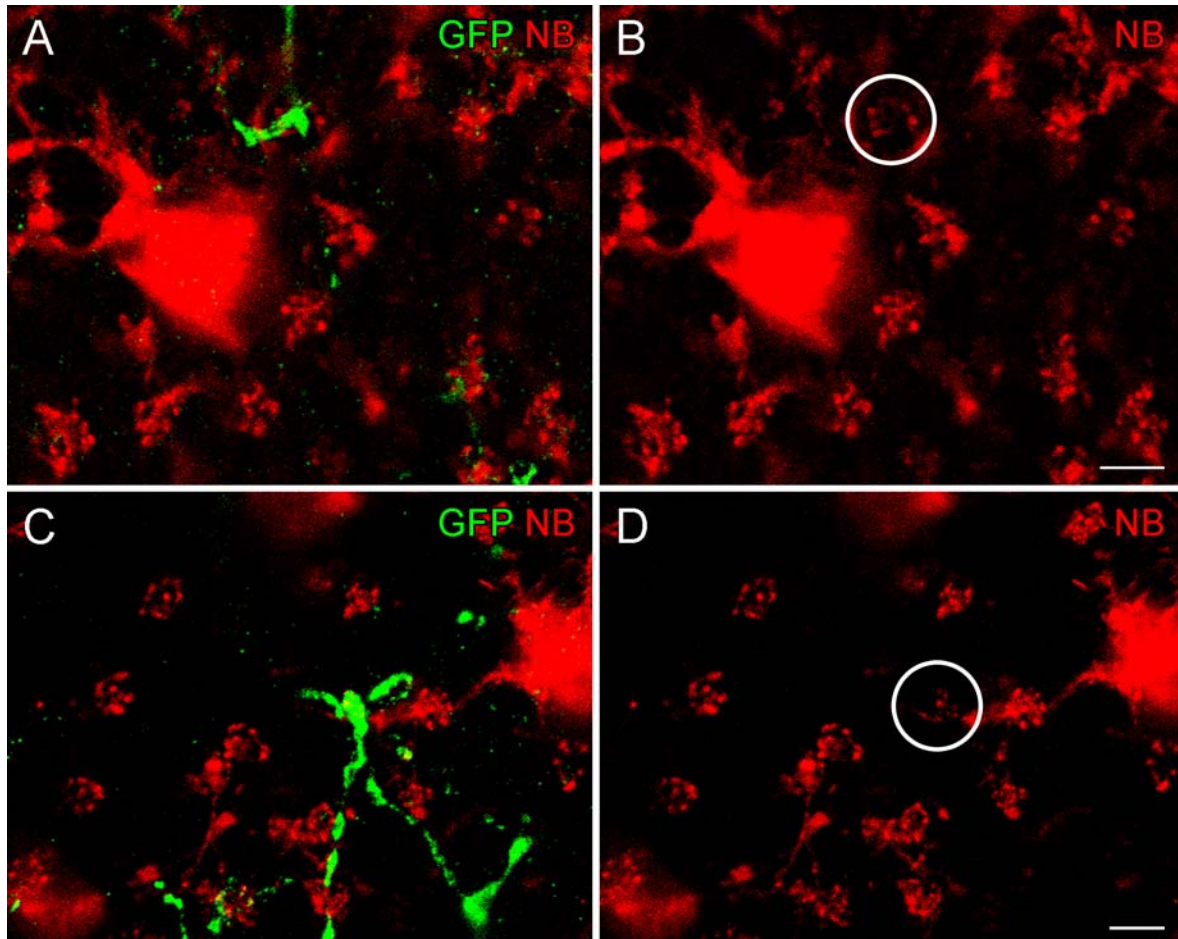


Abbildung 29: Reduktion der Horizontalzellkontakte am S-Zapfenendfüßchen der Mausretina. **A, B** und **C, D**, Zwei mit Neurobiotin injizierte Horizontalzellnetzwerke (NB), gegengefärbt mit GFP im Retinaganzpräparat der Clm1-Maus. Die Fokusebene befindet sich in der OPL. Auf Grund ihrer Fluoreszenzstärke ist dennoch in A, B und C, D je ein Horizontalzellkörper aus der INL erkennbar. Es kann jeweils ein S-Zapfenendfüßchen anhand der Bipolarzellkontakte identifiziert werden (umkreist in B und D). Alle Maßstabsbalken: 5 μ m.

III.1.7 Syntaxin-4 am Zapfenendfüßchen der Mausretina

Im Rahmen der Analyse von Horizontalzellkontakten am Zapfenendfüßchen wurde ebenfalls die Verteilung des Proteins Syntaxin-4 untersucht. Verschiedene Syntaxin-Isoformen (1 – 4) sind mit SNAP-25 und Synaptobrevin an der Bildung von SNARE⁴⁴-Komplexen beteiligt, welche ihrerseits die Vesikel zur Transmitterfreisetzung mit den Zellmembranen fusionieren (Übersichtsartikel von Jahn und Scheller, 2006). Die Isoform Syntaxin-4 liegt in der OPL der Maus-, Ratten- und Kaninchenretina auf den invaginierenden Fortsätzen der Dendriten und Axonterminalien von Horizontalzellen (Hirano et al., 2007). Es wird deshalb vermutet, dass Syntaxin-4 in diesen Bereichen möglicherweise an der exozytotischen Freisetzung von GABA durch Horizontalzellen beteiligt ist.

Bei genauer Betrachtung der Syntaxin-4-Färbung in der OPL der Mausretina wird allerdings deutlich, dass Syntaxin-4 nicht nur auf Höhe der Invaginationen des Zapfenendfüßchens lokalisiert ist. In der Doppelfärbung mit GluR5 zur Markierung der Basis von Zapfenendfüßchen zeigt sich, dass die Syntaxin-4-Immunreaktion auch unterhalb des GluR5-Bands erscheint (Abb. 30).

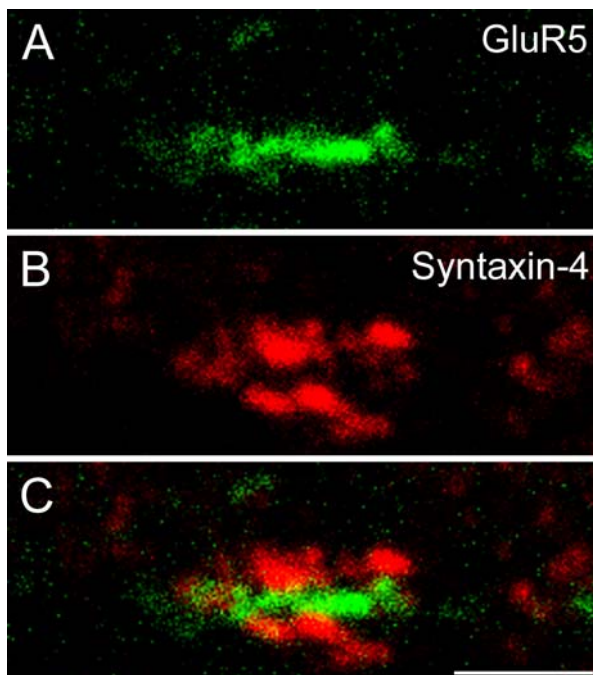


Abbildung 30: Syntaxin-4 am Zapfenendfüßchen der Mausretina. **A – C**, Doppelfärbung von GluR5 und Syntaxin-4 auf einem vertikalen Kryoschnitt der Mausretina. Es wird die Färbung an einem einzelnen Zapfenendfüßchen gezeigt. Maßstabsbalken: 5 μ m.

⁴⁴ soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor [engl.]

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die S-Zapfenendfüßchen der Mausretina nur vergleichsweise schwach von Horizontalzellen kontaktiert wurden, war analog dazu eine nur geringe Expression von Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen zu erwarten. Die Analyse der Syntaxin-4-Immunreaktion am S-Zapfenendfüßchen ergab jedoch, dass die Anhäufungen dieses Proteins am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfenendfüßchen nur geringfügig kleiner waren (Abb. 31).

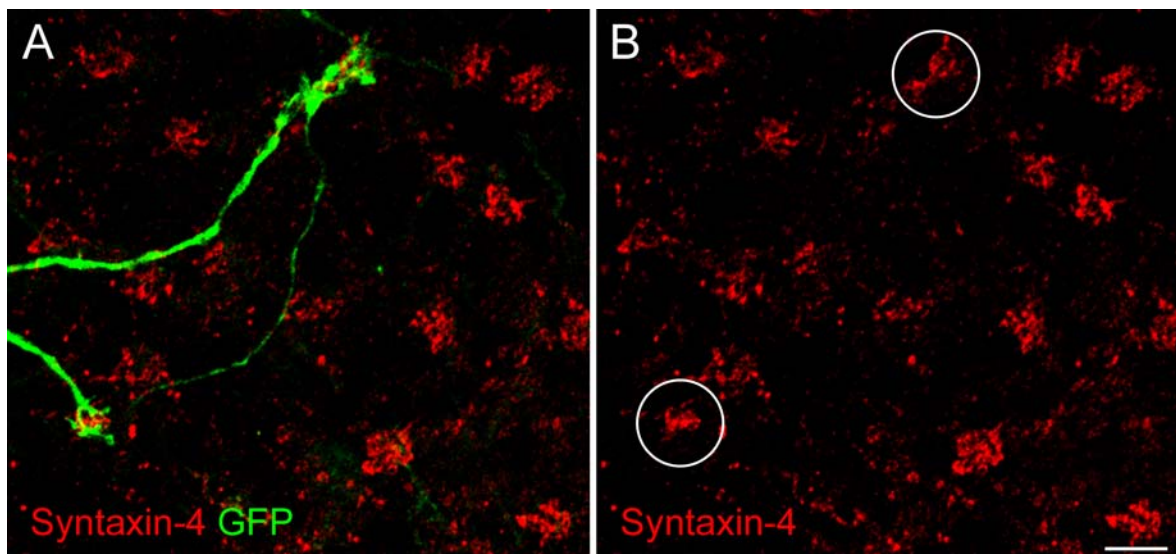


Abbildung 31: Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen der Mausretina. **A, B,** Doppelfärbung von GFP und Syntaxin-4 an horizontal gerissenen Ganzpräparaten der Clm1-Mausretina. Es sind Anhäufungen von Syntaxin-4 an verschiedenen Zapfenendfüßchen zu erkennen, wovon zwei als S-Zapfenendfüßchen identifiziert werden können (umkreist in B). Durch das Entfernen der ONL sind zwischen den Anhäufungen an den Zapfenendfüßchen nur noch wenige Syntaxin-4-immunreaktive Punkte zu sehen, die mit den Horizontalzell-Axonterminalien assoziiert sind. Maßstabsbalken: 5 μ m.

III.1.8 Syntaxin-4 und GABA-Rezeptoren am S-Zapfenendfüßchen der Makakenretina

Im Anschluss an die Syntaxin-4-Färbungen in der Mausretina wurde die Verteilung dieses Proteins in der Makakenretina untersucht. Syntaxin-4 war auch im Primaten sowohl in den Invaginationen als auch unterhalb des Zapfenendfüßchens in der Ebene der Desomosom-ähnlichen Kontakte zwischen Horizontalzellen zu finden (Abb. 32). Obwohl Syntaxin-4 wie zuvor erwähnt mit der Freisetzung von GABA in Verbindung gebracht wird, fiel es durch seine Verteilung am Zapfenendfüßchen nicht mit den GABA-Rezeptoren (GABA-

Rs) zusammen. Im Primaten liegen die ionotropen GABA_A- und GABA_C-Rs in dem Bereich zwischen der Basis des Zapfenendfüßchens und den *desmosome-like junctions* zwischen Horizontalzellen (Haverkamp et al. 2000). Sie werden dort auf den Dendriten der Bipolarzellen exprimiert (Übersichtsartikel von Yang, 2004).

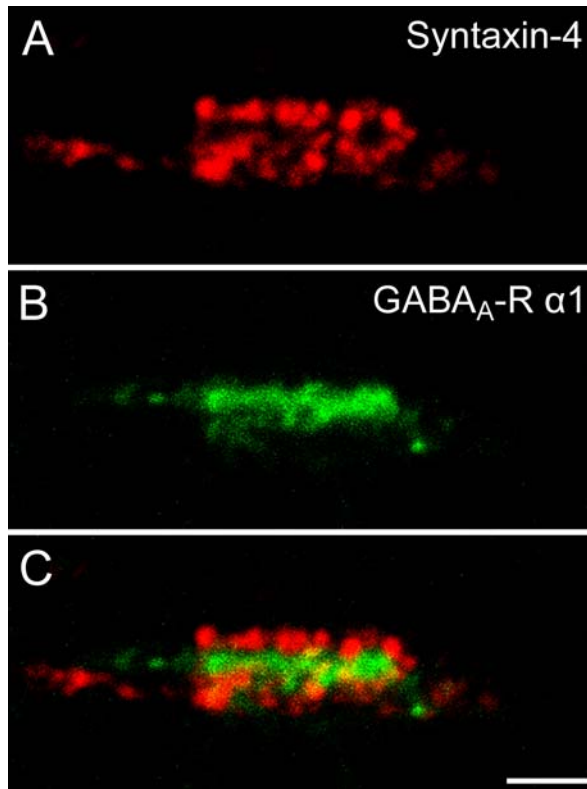


Abbildung 32: Lokalisation von Syntaxin-4 und GABA-Rezeptoren am Zapfenendfüßchen der Makakenretina. **A – B,** Doppelfärbung von Syntaxin und der $\alpha 1$ -Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren (GABA_A-R) an einem einzelnen Zapfenendfüßchen auf einem vertikalen Kryoschnitt der Makakenretina. Maßstab: 2 μm .

Die Färbung von Syntaxin-4 an Retinaganzpräparaten des Makaken zeigte noch einmal, dass Syntaxin-4 in diesem Tier an Zapfenendfüßchen und auch Stäbchenterminalien lokalisiert ist. Letztere werden durch die Syntaxin-4-Punkte zwischen den Anhäufungen an den Zapfenendfüßchen sichtbar. Bemerkenswert war jedoch, dass Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen in viel stärkerem Maße angehäuft war, als an M- oder L-Zapfenendfüßchen (Abb. 33). Im Gegensatz zur Mausretina markierte der Antikörper gegen S-Opisin nicht nur die äußeren Segmente der S-Zapfen, sondern die gesamte Photorezeptorzelle (Goodchild et al., 1996; Chan und Grünert, 1998). Deshalb war es hier möglich, mittels S-Opisin-Immunreaktion die S-Zapfenendfüßchen direkt sichtbar zu machen.

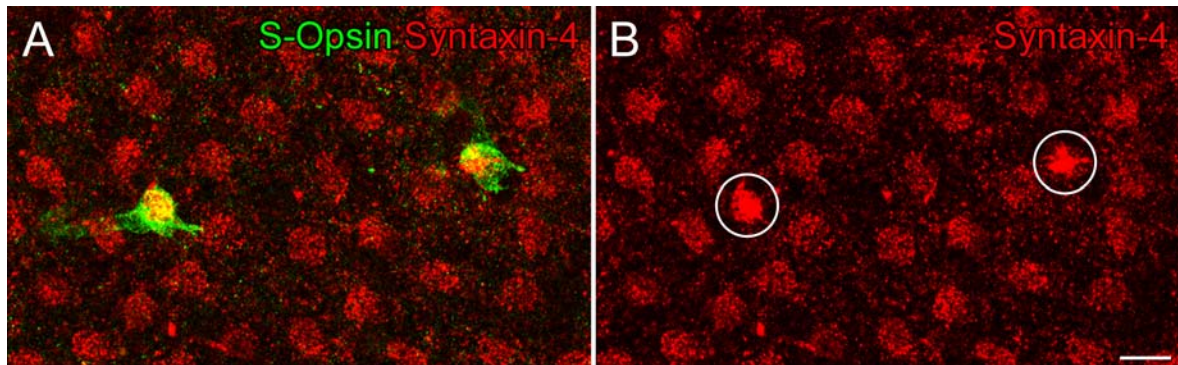


Abbildung 33: Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen der Makakenretina. **A, B,** Doppelfärbung von Syntaxin-4 und S-Opsin zur Markierung der S-Zapfenendfüßchen im Ganzpräparat der Makakenretina. Die Position der S-Zapfenendfüßchen ist in B umkreist. Maßstabsbalken: 10 μm .

Die Wiederholung dieser Färbung an vertikalen Kryoschnitten konnte ein genaueres Bild der Syntaxin-4-Verteilung am Zapfenendfüßchen bieten (Abb. 34). Die vermehrte Immunreaktion von Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen, welche bereits im Retinaganzpräparat beobachtet werden konnte, erschien auch hier. Interessanterweise rührte sie hauptsächlich von einer extrem starken Immunreaktion unterhalb des S-Zapfenendfüßchens her.

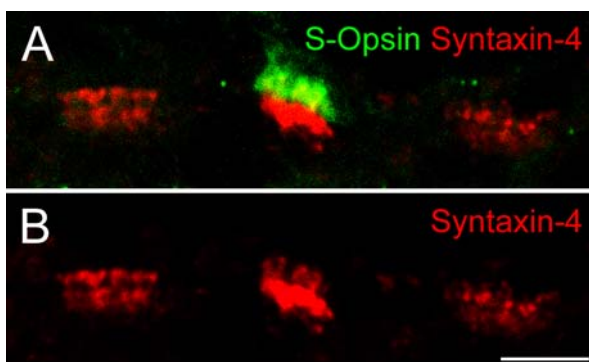


Abbildung 34: Verteilung von Syntaxin-4 am S-Zapfenendfüßchen der Makakenretina. **A, B,** Doppelfärbung von Syntaxin-4 und S-Opsin zur Markierung der S-Zapfenendfüßchen auf einem vertikalen Kryoschnitt der Makakenretina. Maßstabsbalken: 5 μm .

Um zu prüfen, ob durch eine eventuell verstärkte GABA-Freisetzung unterhalb des S-Zapfenendfüßchens auch eine veränderte Expression von GABA-Rezeptoren zu finden war, wurden Doppelfärbungen von S-Opsin und zwei verschiedenen Untereinheiten von GABA_A- bzw. GABA_C-Rezeptoren durchgeführt. Im Falle der $\alpha 1$ -Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren lag keine offensichtliche Änderung in der Stärke der Immunreaktion am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfen vor (Abb. 35A, B). Die leicht verringerte Größe der immunreaktiven Fläche von GABA_A ($\alpha 1$) war hier höchstwahrscheinlich auf die etwas kleinere Größe der S-Zapfenendfüßchen

zurückzuführen und entsprach damit keiner maßgeblichen Reduktion. Die Immunreaktion der ρ -Untereinheit der GABA_C-Rezeptoren erschien am S-Zapfenendfüßchen hingegen leicht reduziert (Abb. 35C, D). Auf Grund der insgesamt eher schlechten Färbequalität des hier verwendeten Antikörpers gegen GABA_C (ρ) sind jedoch noch weitere Experimente notwendig, um dieses vorläufige Ergebnis abzusichern.

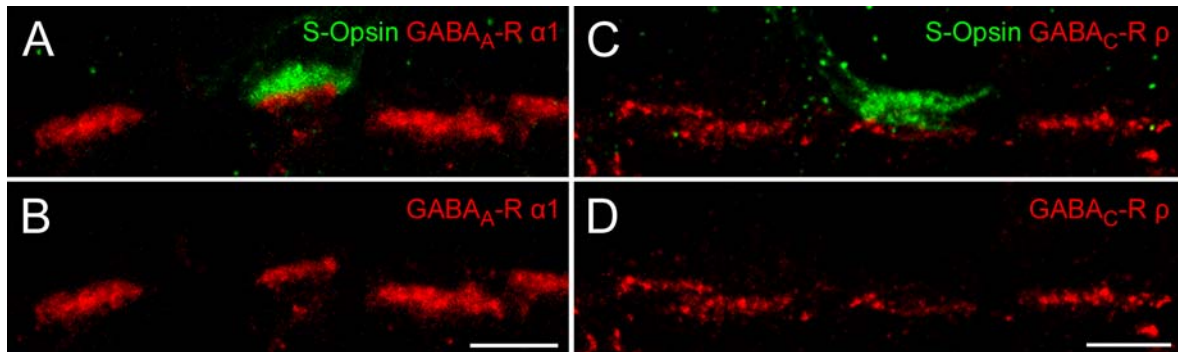


Abbildung 35: GABA-Rezeptoren am S-Zapfenendfüßchen der Makakenretina. **A, B,** Doppelfärbung von der $\alpha 1$ -Untereinheit der GABA_A-Rezeptoren (GABA_A-R) und S-Opsin auf einem vertikalen Kryoschnitt der Makakenretina. **C, D,** Doppelfärbung von der ρ -Untereinheit der GABA_C-Rs und S-Opsin auf einem vertikalen Kryoschnitt der Makakenretina. Alle Maßstabsbalken: 5 μ m.

III.2 *Gap junctions* und ZO-1 in der Säugetierretina

III.2.1 Allgemeine Expression von ZO-1 in der Retina

Die Expression von Zonula Occludens-1 (ZO-1) in der Kaninchen- und der Makakenretina (Abb. 36B, C) ähnelte sehr dem bereits bekannten Expressionsmuster in der Mausretina (Li et al., 2004; Ciolofan et al., 2006, 2007; und Abb. 36A in dieser Studie). Die *tight junctions* zwischen Müllerzellen und Photorezeptoren in der äußeren Grenzmembran (OLM) erschienen bei allen Spezies stark gefärbt, und es ließ sich eine hauptsächlich punktierte Immunfärbung in der äußeren und inneren plexiformen Schicht (OPL und IPL) erkennen. Außerdem waren in der Maus- und Makakenretina die *tight junctions* zwischen den Endothelzellen von Blutgefäßen und manche Amakrinzellkörper in der inneren Körnerschicht (INL) und der Ganglienzellschicht (GCL) gefärbt. Die ZO-1-Punkte in der OPL der Maus und des Makaken waren in regelmäßigen Abständen angehäuft, was als Hinweis auf eine Expression an bzw. unter den Zapfenendfüßchen galt. Besonders auffällig erschien dies im Makaken. In der Kaninchenretina erschienen diese Anhäufungen weniger auffällig. Im Gegensatz dazu traten in diesem Tier in der inneren OPL größere immunreaktive Strukturen auf, welche nicht den Blutgefäßen zugeordnet werden konnten, weil die Kaninchenretina nicht vaskularisiert ist. Hingegen war eine Assoziation dieser Strukturen zu Bipolar- oder Horizontalzellen wahrscheinlich, weil ihre Dendriten in diesen inneren Bereichen der OPL verlaufen.

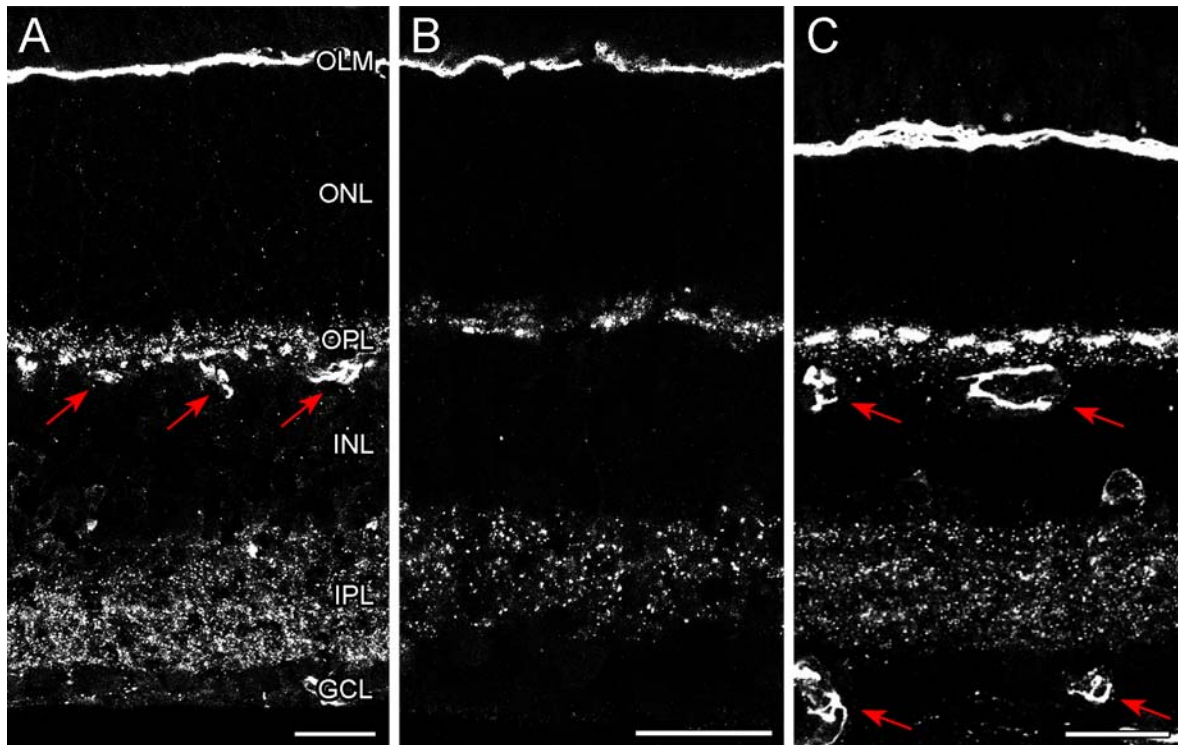


Abbildung 36: ZO-1 in der Säugetierretina. **A – C** zeigt eine Projektion konfokaler Bildstapel-aufnahmen von ZO-1-gefärbten, vertikalen Kryschnitten der Maus- (A), Kaninchen- (B) und Makakenretina (C). Die Pfeile weisen in der INL und GCL der Maus- und der Makakenretina auf *tight junctions* zwischen den Endothelzellen der Blutgefäße. Alle Maßstabsbalken: 20 μ m.

III.2.2 ZO-1 und Cx50 in der Kaninchenretina

Kaninchenretinae wurden gegen Calbindin (CaBP), ein Calcium-bindendes Protein, und ZO-1 gefärbt. CaBP diente als Marker für A-Typ Horizontalzellen (Röhrenbeck et al., 1987). Die Doppelfärbung zeigte, dass die großen ZO-1-immunreaktiven Strukturen an den Kreuzungen der Primärdendriten der A-Typ Horizontalzellen auftraten (Abb. 37A, B). Diese Färbungen erinnerten stark an die Arbeiten von O'Brien et al. (2006, ihre Abbildung 4), durch welche sie *gap junctions* mit Cx50 zwischen den A-Typ Horizontalzellendriten nachweisen konnten. Abbildung 37C – E beweist die Assoziation von ZO-1 mit Cx50 an diesen *gap junctions*. Außerdem wurde durch die Größe der *plaques* deutlich, dass die Färbungen nur im geringen Maße zusammenfielen. ZO-1 formte vielmehr eine Abgrenzung um die *gap junction* herum und durchkreuzte dieselbe mit einer gitterähnlichen Struktur, was auch bei kleineren *gap junctions* festgestellt werden konnte (Abb. 37F – H).

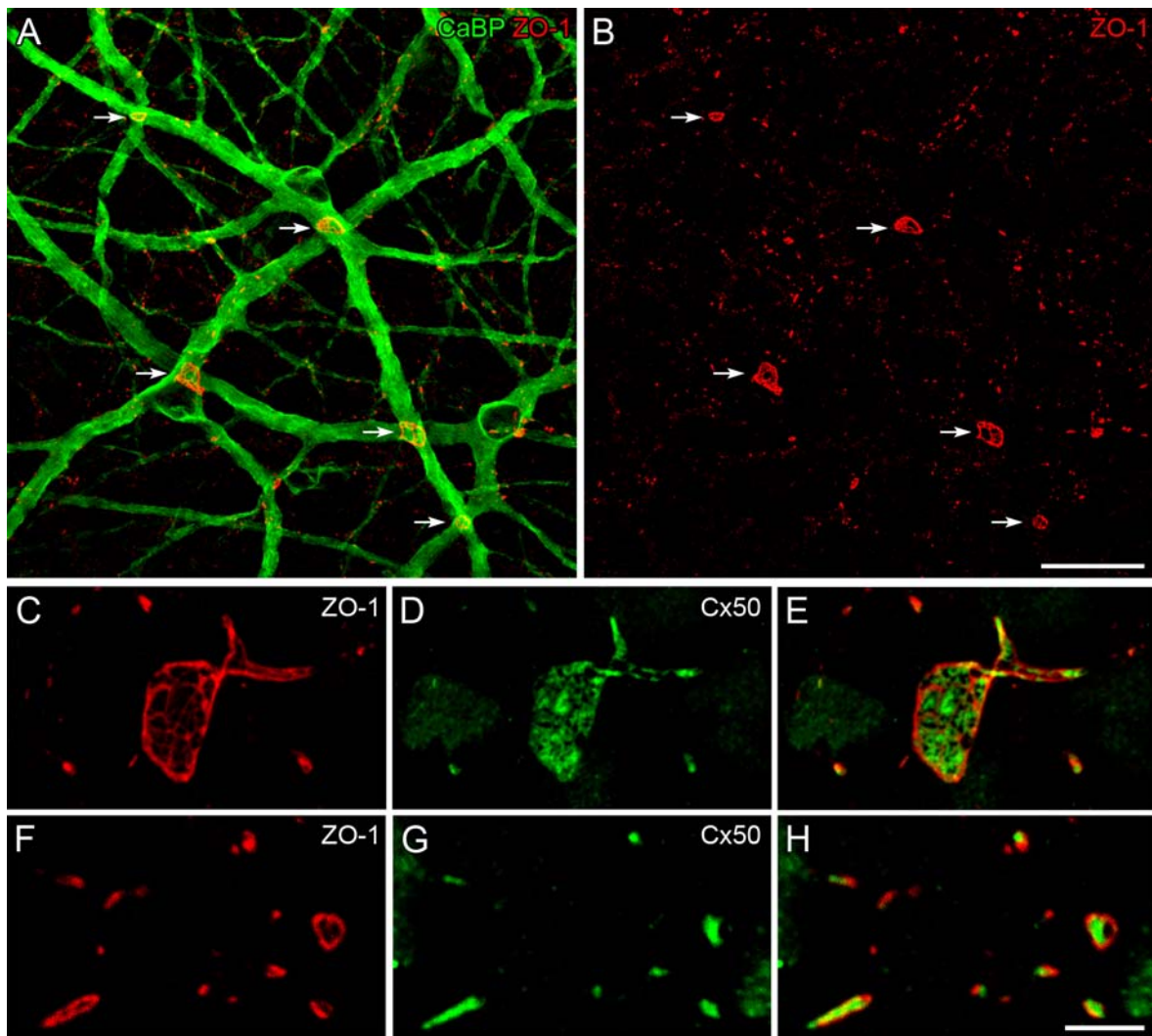


Abbildung 37: ZO-1 und Cx50 auf A-Typ Horizontalzellen in der Kaninchenretina. **A, B,** Ganzpräparat der Kaninchenretina gefärbt mit Antikörpern gegen ZO-1 und Calbindin (CaBP) zur Markierung der A-Typ Horizontalzellen. Die ZO-1-Färbung erscheint punktiert sowie als große Strukturen (Pfeile). **C – H,** Ganzpräparat der Kaninchenretina gefärbt gegen ZO-1 und Cx50. Ein großer Cx50 immunreaktiver *plaque* (C – E) und äquivalente kleinere *gap junctions* (F – H) sind gezeigt. Maßstabsbalken: A, B, 25 μm , C – H, 5 μm .

In derselben Arbeit von O'Brien et al. (2006) wurde ebenfalls von Cx50-Anhäufungen unter den Zapfenendfüßchen in der Kaninchenretina berichtet (ihre Abbildung 11 G), welche ebenfalls von A-Typ Horizontalzellen exprimiert werden. Dies sind diejenigen Bereiche, in denen die Dendriten der Horizontalzellen aufeinandertreffen und abermals *gap junctions* untereinander ausbilden bevor sie in das Zapfenendfüßchen invaginieren. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls im Rahmen dieser Doktorarbeit bestätigt werden (Abb. 38A, B). Die Vermutung lag nahe, dass ZO-1 analog zu den *plaques* auch hier mit Cx50 assoziiert ist. Die in Abbildung 38C – E gezeigte Doppelfärbung bestätigte dies. Cx50 fiel mit ZO-1 unter den Zapfenendfüßchen zusammen.

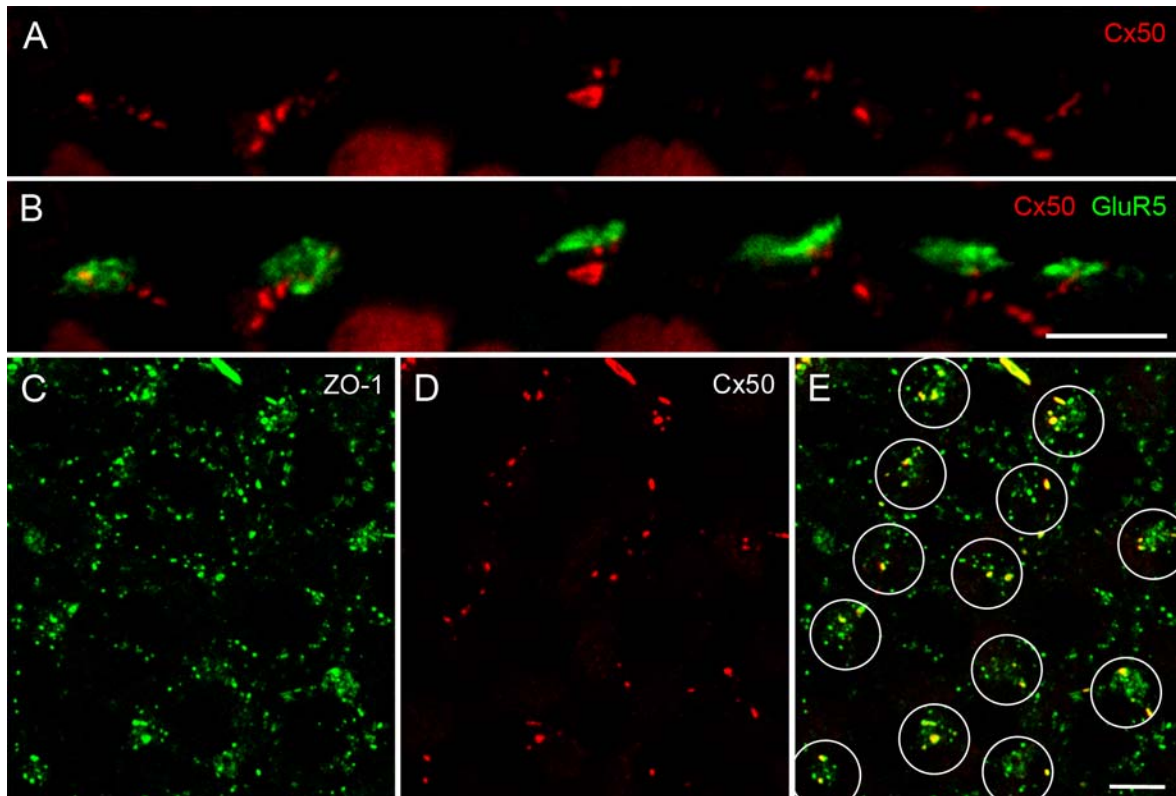


Abbildung 38: ZO-1 und Cx50 unter Zapfenendfüßchen in der Kaninchenretina. **A, B,** Vertikale Kryoschnitte gefärbt gegen Cx50 und GluR5. GluR5 ist auf den dendritischen Spitzen von OFF-Bipolarzellen lokalisiert und wurde zur Markierung der Zapfenendfüßchen verwendet. Cx50 ist lose unter den Zapfenendfüßchen angehäuft. Der Cx50-Antikörper färbt außerdem manche Zellkörper in der INL, die teilweise an den unteren Bildrändern zu erkennen sind. **C – E,** Ganzpräparat der Kaninchenretina gefärbt gegen ZO-1 und Cx50. In E werden die wahrscheinlichen Orte der Zapfenendfüßchen sichtbar (Kreise). Alle Maßstabsbalken: 5 µm.

III.2.3 ZO-1, Cx57 und Cx36 in der OPL von Maus- und Kaninchenretinae

Um der Frage nachzugehen, ob ZO-1 auch in der Mausretina von Horizontalzellen exprimiert wird, wurden letztere mit Neurobiotin injiziert und dieses mit Cy3 konjugiertem Streptavidin sichtbar gemacht und mit ZO-1 gegengefärbt. Abbildung 39A – C zeigt die Anhäufungen von ZO-1 1 – 2 µm unterhalb zweier Zapfenendfüßchen. Hier wird deutlich, dass ZO-1 auf den Horizontalzeldendriten lokalisiert ist. Ciolofan et al. (2007) fanden in ihrer Studie ebenfalls Anhäufungen von ZO-1 unter den Zapfenendfüßchen, jedoch war dieses nicht mit Cx57 assoziiert. Es ist allerdings bekannt, dass Cx57 für die elektrische Kopplung von Horizontalzellen in der Mausretina verantwortlich ist (Hombach et al., 2004, Shelley et al., 2006) und auf den Dendriten sowie den Axonterminalien zur dendrodendritischen und axo-axonalen Kopplung dieser Zellen exprimiert wird (Janssen-Bienhold et al. 2009). Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von Cx57 erneut untersucht, indem

es mit PSD-95 als Marker für Photorezeptorterminalien gefärbt wurde (Koulen et al., 1998). Dadurch konnten deutliche Anhäufungen von Cx57 unterhalb der Zapfenendfüßchen und vereinzelte Punkte unterhalb von Stäbchenterminalien festgestellt werden (Abb. 39D – F). In der Doppelfärbung mit ZO-1 zeigte sich, dass Cx57 unterhalb der Zapfenendfüßchen an den dendro-dendritischen *gap junctions* mit ZO-1 zusammenfiel. An den axo-axonalen *gap junctions* in der äußeren OPL auf der Ebene der Stäbchenterminalien war Cx57 hingegen nicht mit ZO-1 assoziiert.

In der Kaninchenretina wird Cx57 von B-Typ Horizontalzellen an axo-axonalen *gap junctions* exprimiert (Pan et al., 2007a). Vergleichbar mit den Ergebnissen aus der Mausretina ist Cx57 auch hier nicht mit ZO-1 assoziiert (Abb. 39J – L).

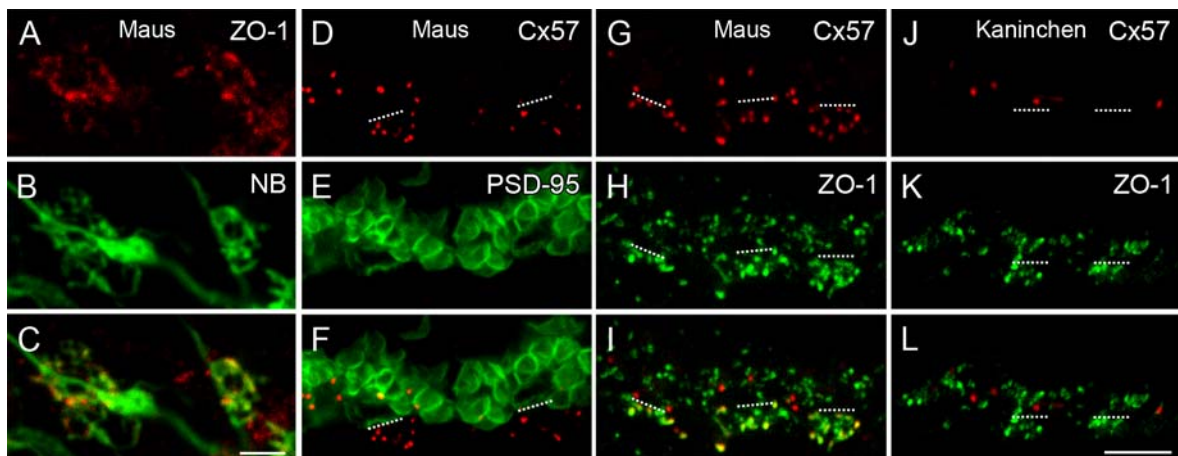


Abbildung 39: ZO-1 und Cx57 in der Maus- und der Kaninchenretina. **A – C,** Ganzpräparat der Mausretina gefärbt mit ZO-1 nach Mikroinjektion von Neurobiotin in Horizontalzellen (NB). Die Abbildung zeigt einen optischen Schnitt durch die Ebene 1 – 2 µm unterhalb der dendritischen Spitzen der Horizontalzellen, in der sich die ZO-1-Punkte unter zwei Zapfenendfüßchen im Fokus befinden. **D – F,** Doppelfärbung der Photorezeptorterminalien mit PSD-95 und Cx57 auf vertikalen Kryoschnitten der Mausretina. Die basalen Membranen von zwei Zapfenendfüßchen sind mit gestrichelten Linien in D und F markiert. **G – I,** Vertikale Schnitte der Mausretina gefärbt mit Cx57 und ZO-1. Drei mutmaßliche Zapfenendfüßchen sind mit gestrichelten Linien markiert. **J – L,** Doppelfärbung von Cx57 und ZO-1 in der Kaninchenretina. Die Cx57-Färbung erscheint nur oberhalb der Zapfenendfüßchen (gestrichelte Linien). Alle Maßstabsbalken: 2 µm.

In dieser Studie konnte ZO-1 an den *gap junctions* zwischen Horizontalzellen unterhalb der Zapfenendfüßchen gezeigt werden. In der Mausretina wurde bereits bewiesen, dass der übrige Anteil der ZO-1-Punkte unterhalb der Zapfenendfüßchen und auf Höhe der Stäbchenterminalien in der äußeren OPL mit Cx36 assoziiert ist (Ciolofan et al., 2007). Cx36 ist an *gap junctions* in diesen Bereichen zwischen OFF-Bipolarzellendriten unterhalb der Zapfenendfüßchen und an solchen zwischen den Photorezeptorterminalien

beteiligt (Übersichtsartikel von Söhl et al., 2005). Die Kollokalisierung von Cx36 und ZO-1 an diesen *gap junctions* konnte in der Mausretina bestätigt und in der Kaninchenretina gezeigt werden (Abb. 40A – C, G – I). Das gleiche Ergebnis wurde mit Doppelfärbungen von ZO-1 und Cx36 in der Makakenretina erzielt (s. Kap. III.3.4, Abb. 41). Die Doppelfärbung von Cx36 und ZO-1 wurde ebenfalls auf vertikalen Kryoschnitten der Retina von Cx36^{-/-} Mäusen durchgeführt (Abb. 40D – F). Erwartungsgemäß war keine spezifische Cx36-Immunreaktion erkennbar. Qualitativ zeigte sich jedoch kein Unterschied im Expressionsmuster von ZO-1 im Vergleich zum Wildtyp.

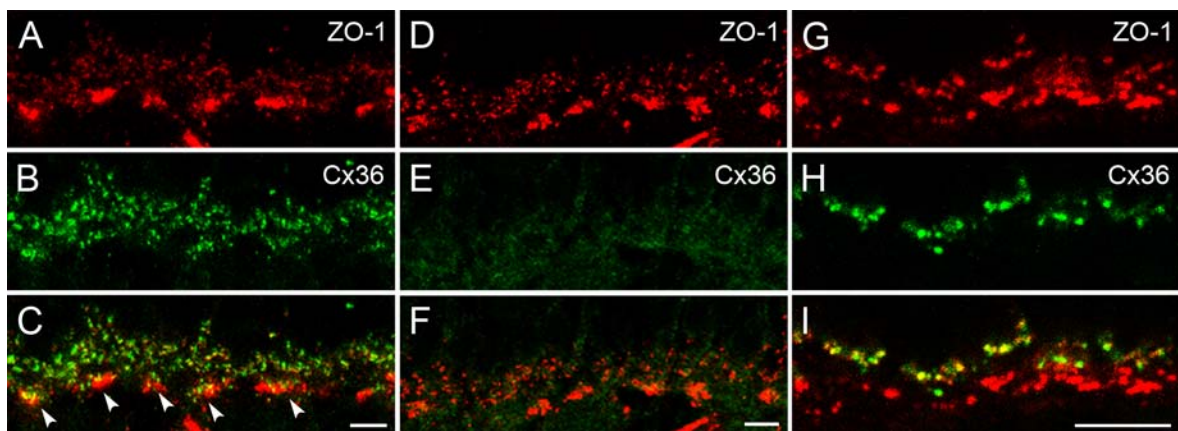


Abbildung 40: ZO-1 und Cx36 in der OPL auf vertikalen Kryoschnitten der Maus- und Kaninchenretina. **A – C**, Färbung von ZO-1 und Cx36 in der OPL der wildtypischen Mausretina. Die Expression unterhalb der Zapfenendfüßchen ist durch Pfeilspitzen markiert. **D – F**, Färbung von ZO-1 und Cx36 in der OPL der Cx36^{-/-} Maus. **G – I**, In der OPL der Kaninchenretina ist Cx36 ebenfalls in der äußeren OPL zu finden und mit ZO-1 kollokalisiert. ZO-1 in der inneren OPL ist wiederum nicht mit Cx36 assoziiert. Alle Maßstabsbalken: 5 µm.

III.2.4 ZO-1 am Zapfenendfüßchen in der Makakenretina

Zur Untersuchung der ZO-1-Expression in der OPL der Makakenretina wurden zunächst vertikale Kryoschnitte gegen ZO-1 und Parvalbumin gefärbt. Parvalbumin färbt beide Horizontalzelltypen (H1 und H2) in der Primatenretina (Röhrenbeck et al., 1989). In Abbildung 41A – C ist ZO-1-Immunreaktion jeweils als Doppelband an zwei Zapfenendfüßchen zu sehen. Das untere Band kollokalisierte mit Horizontalzeldendriten in der Ebene der *desmosome-like junctions*. Dort wurde die Expression ionotroper Glutamatrezeptoren (GluR) als weitere postsynaptische Zone durch Horizontalzellen neben der ihrer dendritischen Spitzen in den Invaginierungen nachgewiesen (Haverkamp et al., 2000). Das

obere ZO-1-Band war hingegen nicht mit den Horizontalzellen assoziiert. Die übrigen ZO-1-Punkte in der inneren OPL lagen entweder auf Horizontalzellkörpern oder ihren Dendriten. Außerdem wurden weitere ZO-1-Punkte kurz unterhalb der Endigungen von Horizontalzell-Axonterminalien gefunden. Die genaue Position dieser Punkte und des oberen ZO-1-Bandes konnte mit einer Färbung der Photorezeptorterminalien mit PSD-95 untersucht werden (Abb. 41D – F). Das obere ZO-1-Band lag dicht an bzw. unter der Basis der Zapfenendfüßchen, während die übrigen ZO-1-Punkte in der äußeren OPL eng mit den Stäbchenterminalien assoziiert waren. Um zu überprüfen, ob ZO-1 auch hier mit Cx36 kolokalisiert ist, wurde zunächst das Expressionsmuster von Cx36 in dieser Spezies genauer untersucht. Es zeigte sich, dass auch in diesem Tier das gewohnte Cx36-Expressionsmuster in der OPL erschien (Abb. 41G – I). Es ließen sich Cx36-Punkte dicht unterhalb der Basis des Zapfenendfüßchens sowie Punkte an den Membranen der Stäbchenterminalien erkennen. In der Doppelfärbung von ZO-1 und Cx36 zeigte sich ihre erwartete Kolokalisation, wobei das untere ZO-1-Band nicht mit Cx36 assoziiert war (Abb. 41J – L).

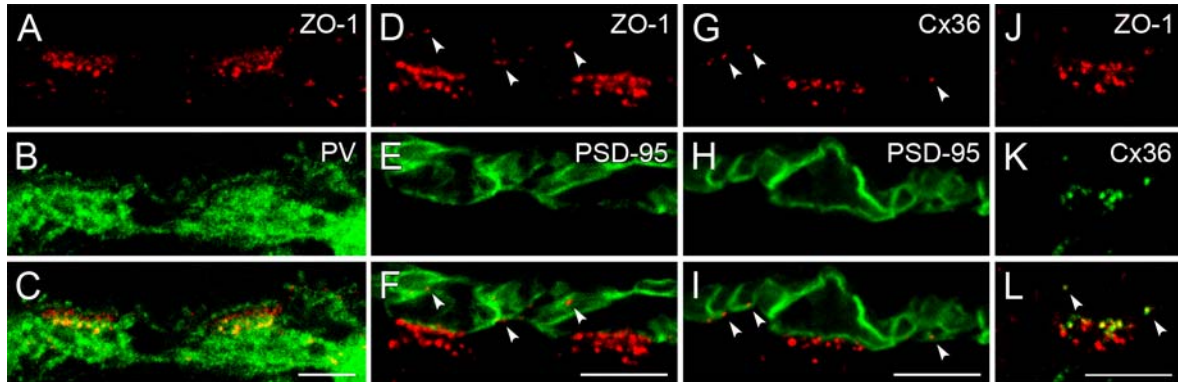


Abbildung 41: ZO-1 und Cx36 in der OPL der Makakenretina. **A – C**, Vertikaler Kryoschnitt gefärbt gegen ZO-1 und dem Horizontalzellmarker Parvalbumin. **D – C**, Färbung von ZO-1 und den Photorezeptorterminalien mit PSD-95. Die ZO-1-immunreaktiven Punkte in der äußeren OPL an den Membranen der Stäbchenterminalien sind mit Pfeilspitzen markiert. **G – I**, Färbung von Cx36 und PSD-95. Cx36 ist ebenfalls an den Membranen der Stäbchenterminalien zu finden (Pfeilspitzen). **J – L**, Färbung von ZO-1 und Cx36. ZO-1 ist im oberen Band und an den Stäbchenterminalien (Pfeilspitzen) mit Cx36 kolokalisiert. Alle Maßstäbsbalken: 5 μ m.

III.2.5 ZO-1 und GluRs unterhalb von Zapfenendfüßchen

Es war nun nahe liegend, dass das ZO-1 im unteren, auf den Horizontalzellendendriten gelegenen Band ebenso wie in den anderen Spezies an den dendro-dendritischen *gap junctions* zwischen Horizontalzellen beteiligt war. Diese Hypothese konnte allerdings nicht bestätigt werden, weil in der Primatenretina die Connexine der Horizontalzellen noch unbekannt sind und dementsprechend keine Antikörper für ihre Markierung zur Verfügung standen.

Um eine andere Funktion von ZO-1 auf der Ebene der *desmosome-like junctions* dennoch auszuschließen, wurden Doppelfärbungen von ZO-1 und GluR2/3, GluR4 bzw. GluR6/7 durchgeführt. Diese GluR-Untereinheiten werden von den Horizontalzellen an ihren *desmosome-like junctions* exprimiert (Haverkamp et al., 2001a,b). Auf vertikalen Kryoschnitten konnte die Lage von ZO-1 im Bereich der *desmosome-like junctions* noch einmal gezeigt werden (Abb. 42A – C). Wie erwartet war ZO-1 hier nicht mit den GluRs kolokalisiert. Die GluR- und ZO-1-Punkte fielen zwar nicht zusammen, sie waren jedoch eng benachbart. Die wird in der Horizontalansicht deutlich (Abb. 42D – L).

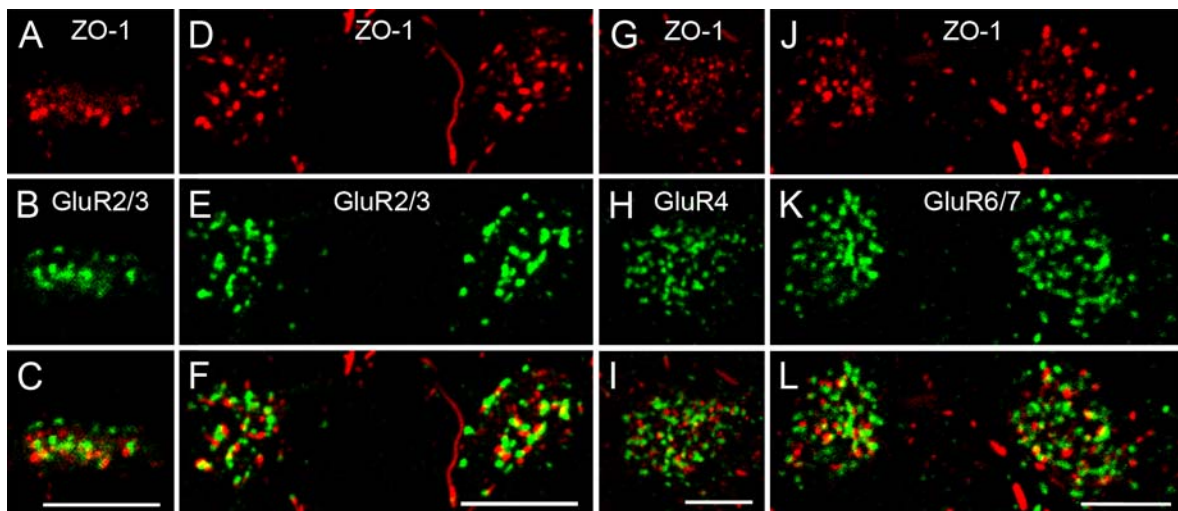


Abbildung 42: ZO-1 und GluRs auf der Ebene der *desmosome-like junctions* in der OPL der Makakenretina. **A – C**, Vertikaler Kryoschnitt gefärbt gegen ZO-1 und GluR2/3. Es wird die Färbung an einem einzelnen Zapfenendfüßchen gezeigt. **D – L**, Retinaganzpräparate jeweils gefärbt gegen ZO-1 und GluR2/3 (**D – F**), GluR4 (**G – I**) und GluR6/7 (**J – L**). Gezeigt sind optische Schnitte in der Ebene der *desmosome-like junctions* an je zwei (**D – F** und **J – L**) bzw. einem (**G – I**) Zapfenendfüßchen. Alle Maßstabsbalken: 5 μ m.

Es ist bekannt, dass auch in der Kaninchenretina ionotrope GluRs unterhalb der Zapfenendfüßchen zu finden sind (Pan und Massey, 2007). Um zu prüfen, ob in dieser Spezies die *gap junctions* wie beim Primaten eng mit den GluRs assoziiert sind, wurden Gewebepräparate gegen GluR2/3 und Cx50 doppelt gefärbt. Es kam bei dieser Färbung zu unvorhergesehenen Kreuzreaktionen zwischen den Primärantikörpern, da nach üblicher und auch nach sequentieller Inkubation der Antikörper kein ausreichend spezifisches Fluoreszenzsignal erkennbar war. Deshalb wurde wie zuvor im Makaken ein indirekter Nachweis durch eine Doppelfärbung mit ZO-1 und GluR2/3 durchgeführt.

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten ein dem Makaken sehr ähnliches Bild. In Abbildung 43 sind beispielhaft die Anhäufungen von ZO-1 und GluR2/3 an vier Zapfenendfüßchen zu sehen. Es werden optische Schnitte gezeigt, die hauptsächlich die Bereiche unterhalb der Zapfenendfüßchen wiedergeben.

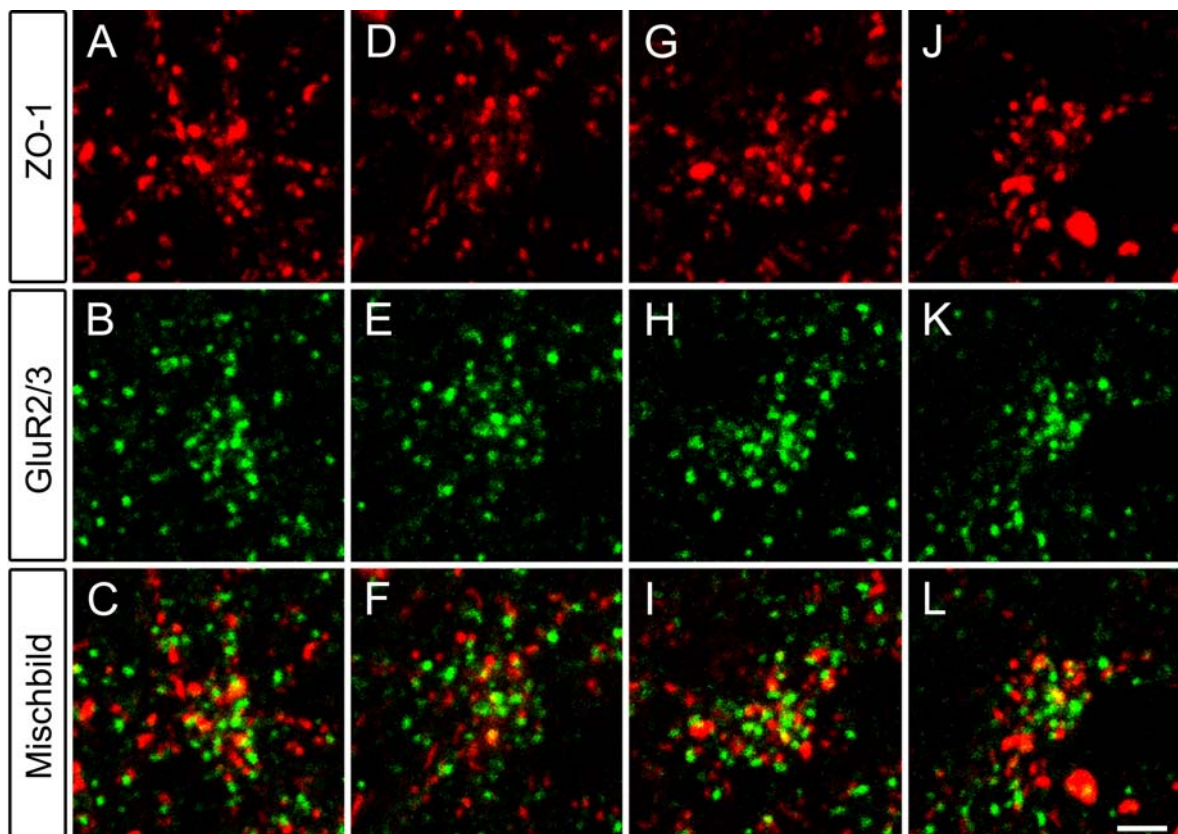


Abbildung 43: ZO-1 und GluR2/3 unterhalb der Zapfenendfüßchen in der Kaninchenretina. **A – L,** Färbung von ZO-1 und GluR2/3 im Retinaganzpräparat. Gezeigt werden Anhäufungen der immunreaktiven Punkte unterhalb von insgesamt vier Zapfenendfüßchen. In den äußeren Bereichen eines jeden Bildteils ist die mit Stäbchenterminalien assoziierte Immunreaktion zu sehen. Maßstabsbalken: 2 μm .

Auf Grund der geringen Größe der Zapfenendfüßchen und einer leichten Quetschung der Präparate durch das Eindeckeln konnte es allerdings nicht vermieden werden, einige GluR2/3-immunreaktive Punkte mit einzubeziehen, die in den Invaginationen der Zapfenendfüßchen lokalisiert sind. Trotzdem wird deutlich, dass auch im Kaninchen eine enge Assoziation von ZO-1 und GluR2/3 vorlag. Der Antikörper gegen GluR6/7 zeigte in der OPL der Kaninchenretina kein spezifisches Färbesbild. Deshalb wurde diese GluR-Untereinheit hier nicht weiter untersucht.

In der Mausretina wurden AMPA-Rezeptoren in früheren licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen nur in den Invaginationen und an den basalen Membranen der Photorezeptorterminalien gefunden (Hack et al., 2001). Bei genauerer Betrachtung wurde jedoch klar, dass auch in dieser Spezies ionotrope GluRs unterhalb der Zapfenendfüßchen lagen (Abb. 44). Vertikale Kryoschnitte wurden mit GluR5 gefärbt, um die basalen Bereiche der Zapfenendfüßchen zu markieren. In der Doppelfärbung mit GluR2 konnte damit deutlich gemacht werden, dass diese GluR-Untereinheit auch unterhalb der GluR5-immunreaktiven Bänder zu finden war – also auf der gleichen Ebene wie die *desmosome-like junctions* in der OPL des Makaken. Eine mögliche Assoziation mit Cx57 bzw. ZO-1 wurde nicht überprüft. Auf Grund der Ergebnisse vom Makaken und dem Kaninchen ist dies jedoch sehr wahrscheinlich.

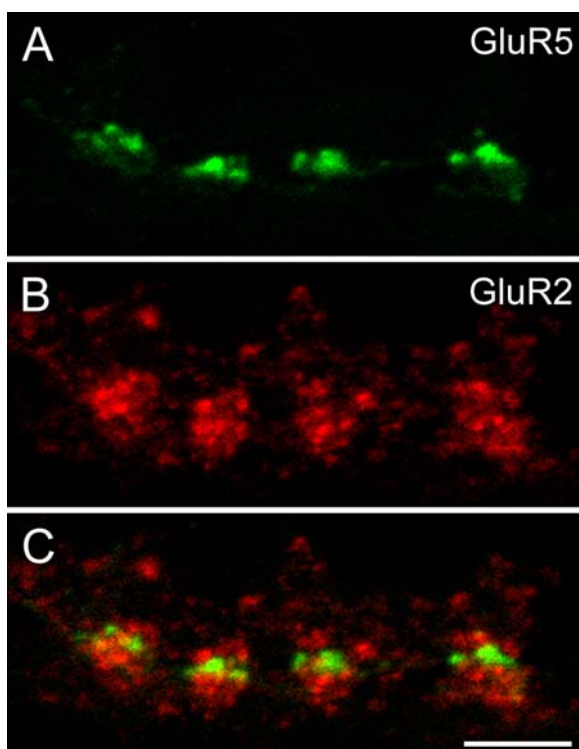


Abbildung 44: GluR2 unterhalb der Zapfenendfüßchen in der Mausretina. **A – C,** Färbung von GluR5 und GluR2 auf einem vertikalen Kryoschnitt. Durch GluR5 sind die basalen Bereiche von vier Zapfenendfüßchen markiert. Maßstabsbalken: 5 μm .

III.2.6 ZO-1 und Cx36 an S-Zapfen der Makaken- und der Mausretina

Beim Primaten ist eine Verminderung der Anzahl von Horizontalzellproteinen am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfen ein guter Hinweis auf typspezifische Expression besagter Proteine durch H1 Horizontalzellen, weil dieser Zelltyp den S-Zapfen nur spärlich kontaktiert (Dacey et al., 1996; Goodchild et al., 1996). Deshalb wurden nun Doppelfärbungen mit S-Opisin (JH455) zur Markierung der S-Zapfen und ZO-1 durchgeführt.

In Abbildung 45A – C wird deutlich, dass unterhalb des S-Zapfenendfüßchens nur noch wenige ZO-1-immunreaktive Punkte zu finden waren, die unter den übrigen Zapfen stark angehäuft sind. Deshalb konnte von einer typspezifischen Expression von ZO-1 durch H1 Horizontalzellen ausgegangen werden. Darüber hinaus wurden in dieser Horizontalansicht des gefärbten Gewebes strichförmige, ZO-1-immunreaktive Strukturen sichtbar. Diese lagen mit Elementen des Zytoskeletts von H1 Horizontalzeldendriten zusammen. Letztere zeigten eine Kreuzreaktion mit dem S-Opisin-Antikörper. Durch eine Doppelfärbung mit CaBP als Marker für H2 Horizontalzellen (Röhrenbeck et al., 1989, Wässle et al., 2000) konnte sichergestellt werden, dass H2 Horizontalzellen nicht gefärbt waren (Abb. 45D – F).

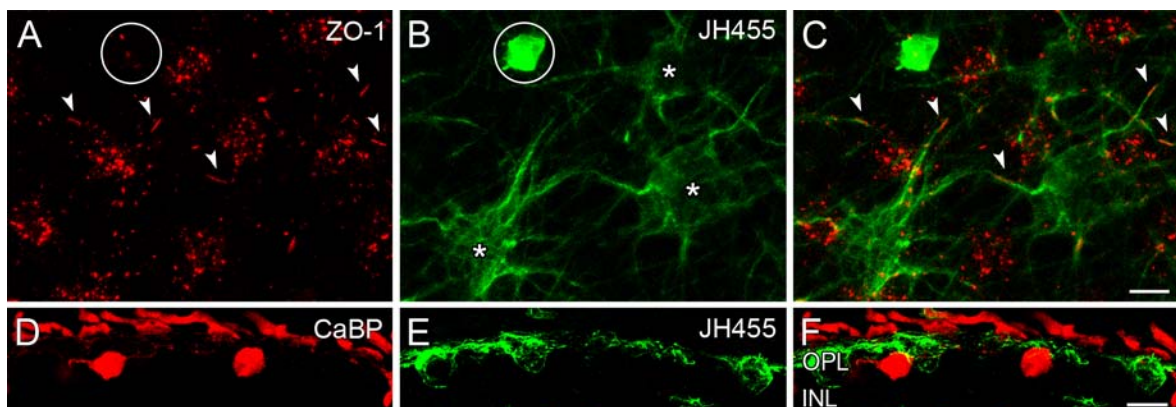


Abbildung 45: ZO-1 an S-Zapfen auf H1 Horizontalzellen in der Makakenretina. **A – C,** Retinaganzpräparat gefärbt gegen ZO-1 und S-Opisin (JH455). Die Position des S-Zapfenendfüßchens ist mit einem Kreis markiert. Die Pfeilspitzen deuten auf Strich-ähnliche, ZO-1-immunreaktive Strukturen. Gefärbte Horizontalzellkörper sind mit Sternchen gekennzeichnet. **D – F,** Vertikaler Kryoschnitt gefärbt gegen S-Opisin JH455 und CaBP, einem Marker für H2 Horizontalzellen. Maßstabsbalken: A – C, 5 μ m, D – F, 10 μ m.

Anschließend wurde die Doppelfärbung der S-Zapfenendfüßchen und ZO-1 auf vertikalen Kryoschnitten vorgenommen, um ein genaueres Bild der zuvor beobachteten Reduktion zu erhalten (Abb. 46). Es stellte sich heraus, dass die ZO-1-Immunreaktivität in der Ebene der *desmosome-like junctions* (unteres Band) unterhalb der S-Zapfenendfüßchen nahezu vollständig fehlt. Dieses Ergebnis war im Rahmen der zuvor festgestellten Expression von ZO-1 durch H1 Horizontalzellen zu erwarten. Diese Reduktion war in ähnlichem Maße ebenfalls auch für das obere, mit Cx36 kolokalisierte ZO-1-Band zu beobachten.

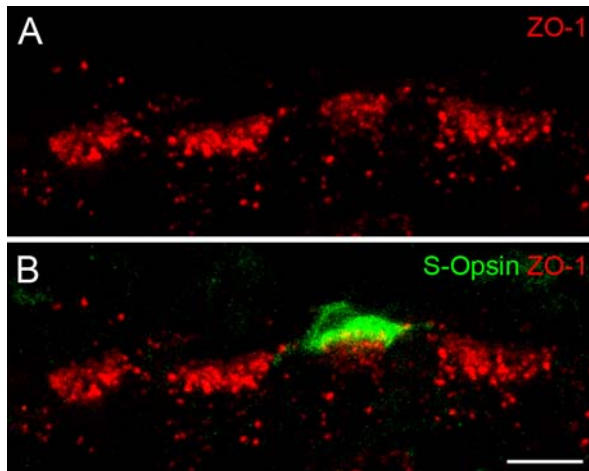


Abbildung 46: ZO-1 am S-Zapfenendfüßchen in der Makakenretina. **A, B,** Färbung von ZO-1 und S-Opsin auf einem vertikalen Kryoschnitt. Anhäufungen von ZO-1 an vier Zapfenendfüßchen werden gezeigt. Eines davon ist immunreaktiv für S-Opsin. Maßstab: 5 µm.

Analog zur Reduktion von ZO-1 im oberen Band am S-Zapfenendfüßchen sollte damit auch eine verminderte Cx36-Expression in diesem Bereich einhergehen. Diese wurde bereits von Massey (2008) indirekt an möglichen S-Zapfenendfüßchen gezeigt. Um eine gesicherte Aussage treffen zu können, wurden Retinaganzpräparate mit einer Färbung von Cx36 und S-Opsin angefertigt. Damit bestätigte sich die Reduktion von Cx36 am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfen (Abb. 47).

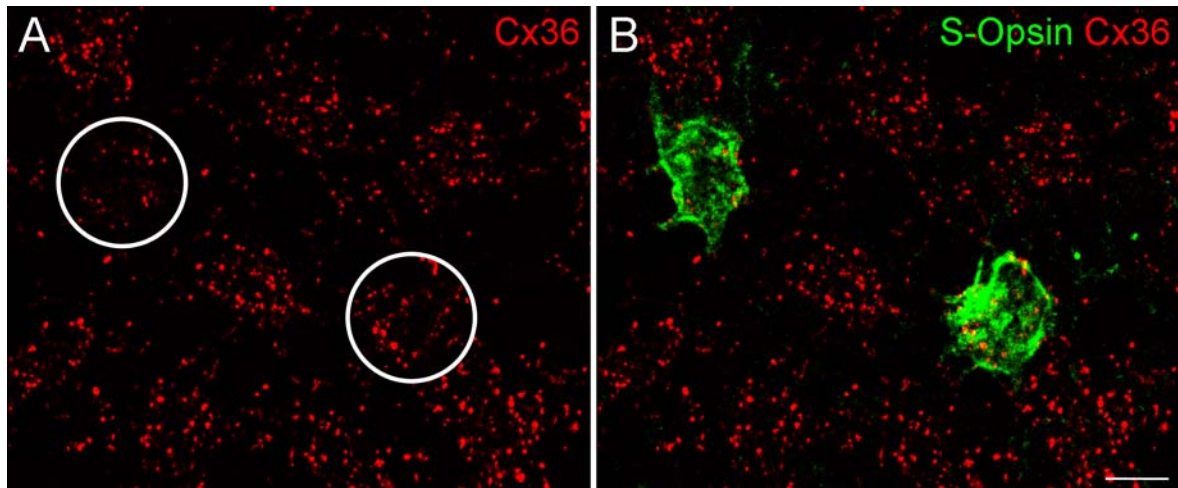


Abbildung 47: Cx36 unterhalb der S-Zapfenendfüßchen in der Makakenretina. **A, B,** Retinaganzpräparat gefärbt gegen ZO-1 und S-Opsin. Die Positionen der in B gezeigten S-Zapfenendfüßchen sind in A mit Kreisen markiert. Maßstabsbalken: 5 μm .

Im Anschluss an die Arbeiten an der Makakenretina wurde die ZO-1-Expression unterhalb der S-Zapfenendfüßchen der Mausretina untersucht. In Kapitel III.2 wurde bereits gezeigt, dass das S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfen viel schwächer von den Horizontalzellen kontaktiert wird. Diese Reduktion der Horizontalzellkontakte sollte sich in einer Reduktion von ZO-1 unterhalb des Zapfenendfüßchens widerspiegeln. Außerdem ist nun ebenfalls bekannt, dass OFF-Bipolarzellen der Typen 1 und/oder 2 das S-Zapfenendfüßchen weitgehend meiden (reduzierte NK3R-Immunreaktion, Kap. III.1.5). Diese Reduktion sollte wiederum – ähnlich wie im Makaken – in einer leichten Verminderung der Expression von Cx36 bzw. ZO-1 in diesen Bereichen unterhalb des S-Zapfenendfüßchens wieder zu finden sein. Dementsprechend zeigte sich in den hier an der Clm1-Mausretina durchgeführten Experimenten, dass ZO-1 unterhalb der S-Zapfenendfüßchen sehr stark reduziert war (Abb. 48).

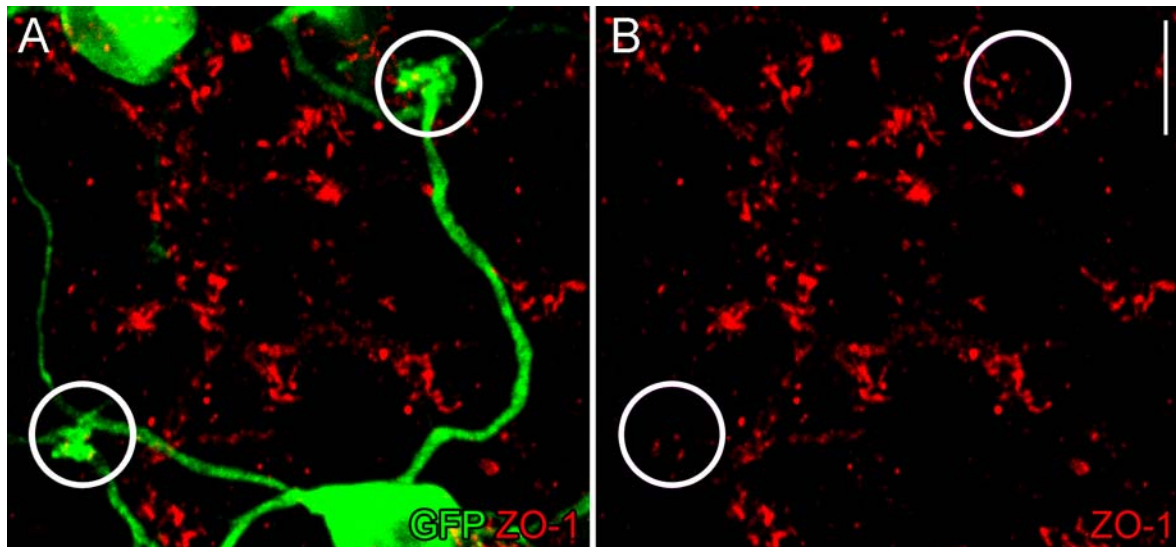


Abbildung 48: ZO-1 unterhalb der S-Zapfenendfüßchen in der Mausretina. **A, B,** Retinaganzpräparat der Clm1-Maus gefärbt gegen ZO-1 und GFP. Am oberen und unteren Bildrand in A sind Zellkörper von Typ 9 Bipolarzellen zu erkennen. Durch die dendritischen Kontakte dieser Zellen können zwei S-Zapfenendfüßchen identifiziert werden (Kreise). Maßstabsbalken: 10 μm .

Auf Grund der Stärke der ZO-1-Reduktion bekräftigte sich die Annahme von der Minderung in der Dichte sowohl der *gap junctions* zwischen Horizontalzellen als auch solcher zwischen Bipolarzellen. Eine Doppelfärbung von Cx57 und GFP an Retinaganzpräparaten der Clm1-Maus zur direkten Prüfung der *gap junction*-Dichte unterhalb der S-Zapfenendfüßchen und zur Unterstützung der Aussagen aus Kap. III.1.6 blieb erfolglos. Sowohl der kommerzielle als auch der Cx57-Antikörper aus privater Quelle waren auf Grund ungenügender Penetration nur schlecht für Färbungen an solchen Präparaten geeignet.

Die Analyse der Expression von Cx36 unterhalb der S-Zapfenendfüßchen erwies sich ebenfalls als schwierig, weil die OPL der Mausretina eine sehr hohe Dichte von *gap junctions* mit Cx36 aufwies (s. Kap. III.2.3, Abb. 40). Die Dreifachfärbung von Cx36, GFP und Glykogenphosphorylase im Retinaganzpräparat der Clm1-Maus ließ aus diesem Grund keine sichere Aussage zu (Abb. 49). Obwohl eine Fokusebene auf Höhe der Zapfenendfüßchen gezeigt ist, werden die Cx36-immunreaktiven *gap junctions* unterhalb der Zapfenendfüßchen von denen zwischen den Photorezeptoren überlagert. Dadurch konnten im Gegensatz zum Makaken die Anhäufungen von Cx36 unterhalb der Zapfenendfüßchen nicht immer zuverlässig als solche erkannt werden. Insgesamt erwies sich aber kein offensichtlicher Unterschied zwischen der Cx36-Expression unter S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfen.

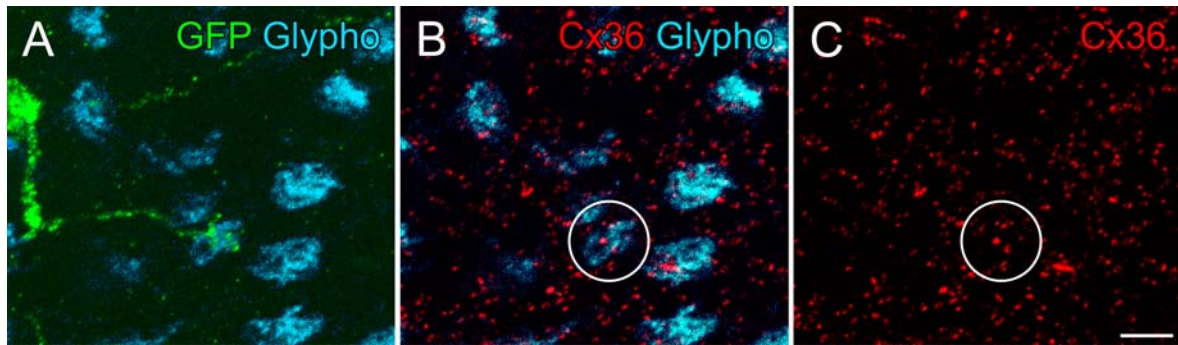


Abbildung 49: Cx36 an S-Zapfenendfüßchen der Mausretina. **A – C**, Dreifachfärbung von Cx36, GFP und Glykogenphosphorylase (Glypho) im Retinaganzpräparat der Clm1-Maus. **A**, Eines der mit Glypho gefärbten Zapfenendfüßchen in der Mitte der Abbildung kann durch den Clm-immunreaktiven Bipolarzellkontakt als S-Zapfenendfüßchen identifiziert werden. **B, C**, Färbung von Glypho und Cx36 im gleichen Ausschnitt wie in A. Die Position des S-Zapfenendfüßchens ist mit einem Kreis markiert. Maßstabsbalken: 5 μm .

III.2.7 *Tight* und *adherens junction*-assoziierte Proteine in der Retina

Die räumliche Struktur von ZO-1 an den großen *gap junctions* zwischen A-Typ Horizontalzellen der Kaninchenretina ließ den Schluss zu, dass ZO-1 nicht als Gerüstprotein direkt mit den Connexinen interagiert. Dieses Erscheinungsbild legte vielmehr eine Funktion von ZO-1 als intrazelluläre Komponente von *tight* oder *adherens junctions* nahe, welche die elektrischen Synapsen umzäunen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Doppelfärbungen von ZO-1 mit Antikörpern gegen verschiedene Transmembranproteine durchgeführt, welche mit ZO-1 an solchen Zell-Zell-Kontakten interagieren.

Für diese Untersuchung standen Antikörper gegen Claudin-1, Occludin und E-Cadherin zur Verfügung. Diese integralen Membranproteine sorgen zumeist durch homologe Interaktion die Adhäsion der Zellpartner in der extrazellulären Matrix. Claudine und Occludin sind an der Bildung von *tight junctions* beteiligt, Cadherine sind hingegen an *adherens junctions* exprimierte Proteine (Übersichtsartikel von Hartsock und Nelson, 2008). Das Vorkommen bzw. die Lokalisierung dieser Proteine wurde bereits in anderen Studien an Retinae verschiedener Säugetiere immunbiochemisch bzw. immunhistochemisch untersucht (Tserentsoodol et al., 1998; Paffenholz et al., 1999; Morcos et al., 2001; Campbell et al., 2006). In den plexiformen Schichten der Retina wurden allerdings keine Immunreaktionen gefunden. Letztere beschränkten sich auf die *tight junctions* zwischen den Endothelzellen der Blutgefäße und zwischen den retinalen Pigment-

epithelzellen im Falle von Claudin und Occludin, bzw. auf die äußere Grenzmembran im Falle von Cadherin.

Die in den vorgenannten Arbeiten gezeigten immunhistochemischen Ergebnisse besitzen jedoch hinsichtlich der plexiformen Schichten nur geringe Aussagekraft. Die Immunreaktionen vieler Antikörper sind in diesen Schichten oftmals nur schwach oder gar nicht vorhanden, sobald das Gewebe zu stark fixiert wird. Die Empfindlichkeit für Fixationszeiten oder -substanzen wird sofort deutlich, wenn beispielsweise die hier gezeigten ZO-1-Immunfärbungen mit denen aus Paffenholz et al. (1999) oder auch Campbell et al. (2006) verglichen werden. In den letztgenannten Studien sind die äußere Grenzmembran und die vaskulären Endothelzellen zwar gefärbt, in den plexiformen Schichten lässt sich jedoch kaum eine spezifische Färbung erkennen. Deshalb wurden die Färbungen von Claudin, Occludin und Cadherin im Rahmen der hier vorliegenden Studie wiederholt.

Die Bereiche der hier untersuchten Synapsen zeigten keine Immunreaktivität für Claudin-1 und E-Cadherin. Die Verteilung der übrigen Subtypen von Claudinen und Cadherinen in der Retina wurde nicht analysiert. Die Retinae der Maus, des Kaninchens und des Makaken waren jedoch in gleicher Weise immunreaktiv für Occludin. Beispielhaft für alle drei Spezies wird in Abbildung 50 die Doppelfärbung von ZO-1 und Occludin gezeigt. Die Färbung beider Proteine kolokalisiert in nahezu allen Bereichen. Die Occludin-Färbung war jedoch etwas schwächer unterhalb der Zapfenendfüßchen, und die ZO-1-immunreaktiven Amakrinzellkörper in der Maus und im Affen waren negativ für Occludin. Ein weiterer Unterschied lag darin, dass Occludin im Gegensatz zu ZO-1 die Müllerzellen in der inneren Retina schwach färbte.

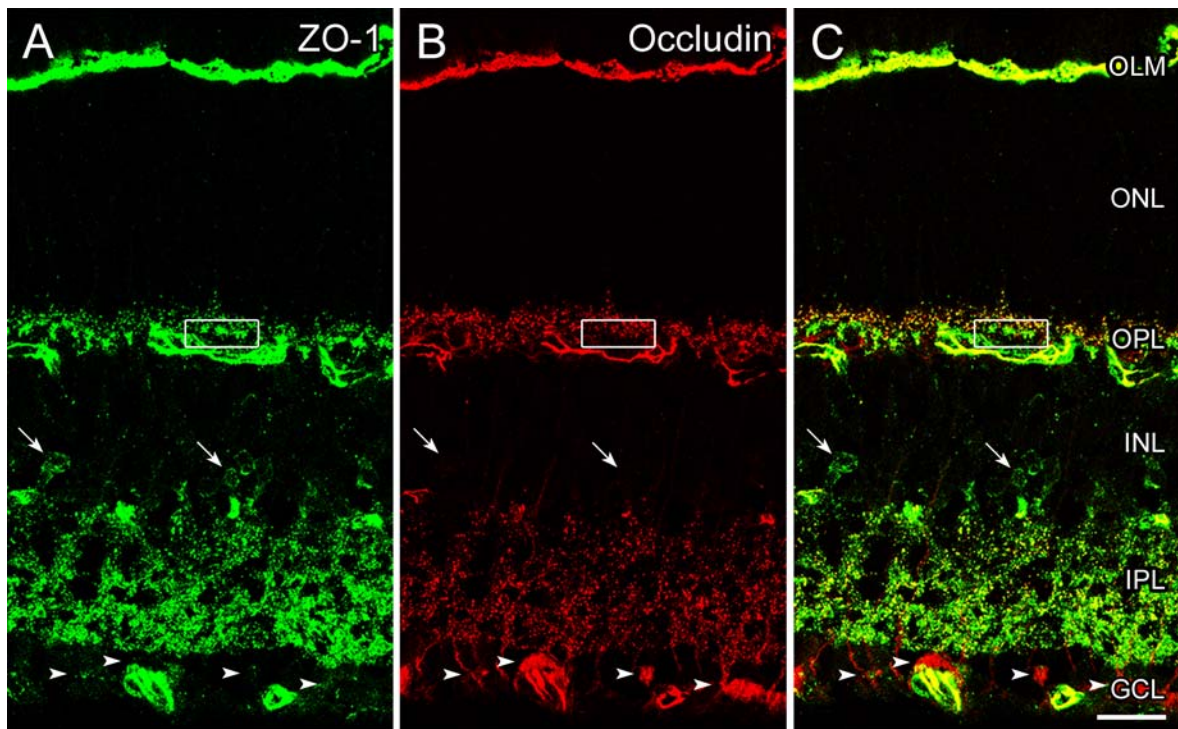


Abbildung 50: ZO-1 und Occludin in der Mausretina. **A – C** Vertikaler Krioschnitt gefärbt mit ZO-1 und Occludin. Die Rechtecke markieren beispielhaft die Position von ZO-1-immunreaktiven *gap junctions* unterhalb von drei Zapfenendfüßchen. Diese sind wie auch die ZO-1-immunreaktiven Amakrinzellkörper negativ für Occludin (Pfeile). Die Pfeilspitzen weisen auf Occludin-immunreaktive Fortsätze von Müllerzellen. Maßstabsbalken: 20 μm .

Die Unterschiede in der ZO-1- und Occludin-Färbung unterhalb des Zapfenendfüßchens wurden auch im Makaken deutlich (Abb. 51A – C). Die Occludin-Immunreaktion war nur schwach oder gar nicht an den *gap junctions* mit Cx36 zu sehen, welche durch die kleineren ZO-1-immunreaktiven Punkte markiert sind. Die größeren, mit den *desmosome-like junctions* assoziierten ZO-1-Punkte waren hingegen immunreaktiv für Occludin und mit letzterem kolokalisiert. Es blieb ungewiss, ob dieser Unterschied der wahren Proteinverteilung entsprach oder auf bloße Färbeunterschiede der Antikörper zurückzuführen war.

Die Doppelfärbung von ZO-1 und Occludin im Kaninchen zeigte, dass Occludin auch an den großen *gap junctions* der A-Typ Horizontalzellen mit ZO-1 kolokalisiert war (Abb. 51D – F). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass ZO-1 nahezu ausschließlich an der Bildung von *tight junctions* in der Retina beteiligt ist.

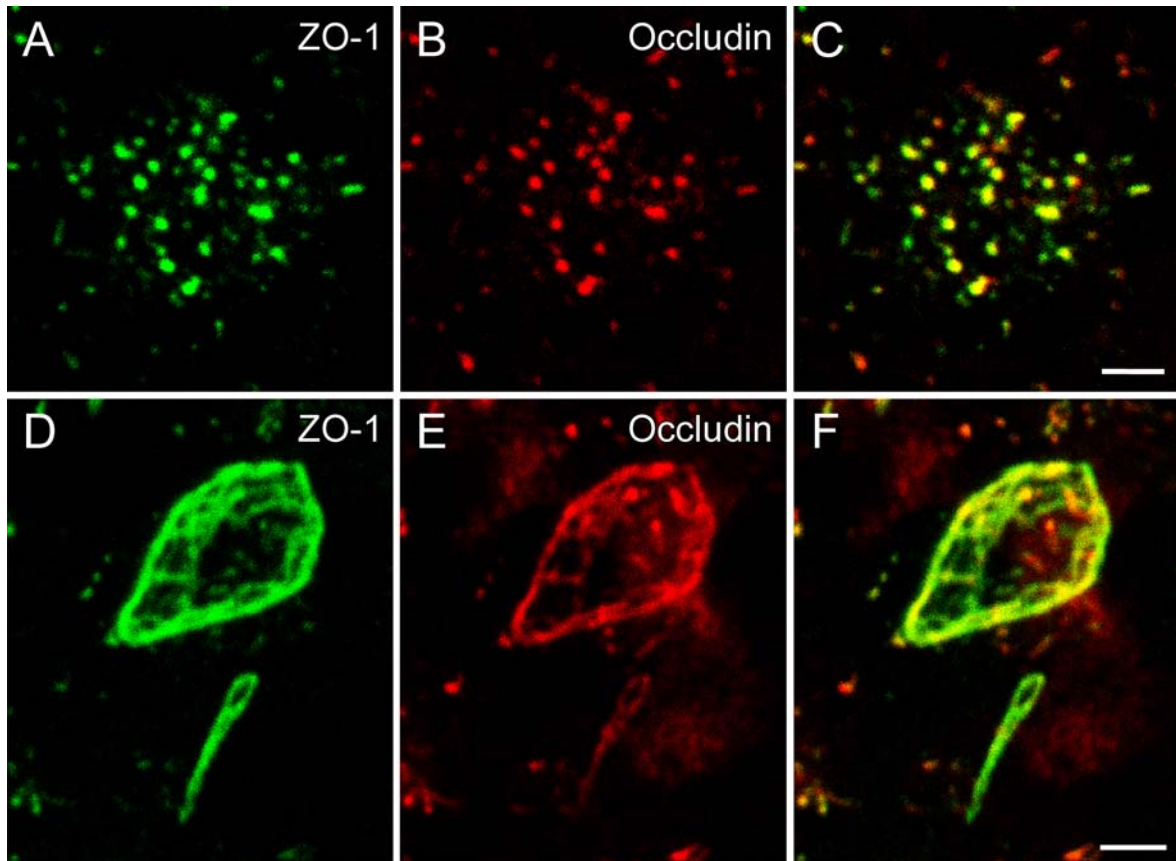


Abbildung 51: ZO-1 und Occludin in der Makaken- und der Kaninchenretina. **A – C,** Doppelfärbung von ZO-1 und Occludin unterhalb eines Zapfenendfüßchens im Retinaganzpräparat des Makakens. **D – F,** Doppelfärbung von ZO-1 und Occludin an den großen *gap junctions* zwischen den Primärdendriten der A-Typ Horizontalzellen im Retinaganzpräparat der Kaninchenretina. Alle Maßstabsbalken: 2 μm .

Der Verdacht einer Kreuzreaktion des Occludin-Antikörpers mit ZO-1 wurde durch das in der gesamten Retina doch sehr ähnliche Färbemuster von Occludin und ZO-1 nahe gelegt. Die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktion eines Antikörpers mit einem „fremden“ Protein steigt mit zunehmender Homologie der Peptidsequenz des Immunogens mit dem unspezifisch erkannten Protein. Zur Herstellung des polyklonalen Antikörpers, welcher bei den zuvor gezeigten Versuchen Verwendung fand, wurden Kaninchen mit einem Peptid der C-terminalen 150 Aminosäuren von humanem Occludin immunisiert. Die Peptidsequenzen wurden mit Hilfe der Software BlastP bl2seq (National Institutes of Health, USA) nach Tatusova und Madden (1999) analysiert. Zwischen besagter Sequenz von Occludin (oder auch des kompletten Proteins) und der gesamten ZO-1-Peptidsequenz bestanden keine signifikanten Homologien, ungeachtet der Betrachtung von humanem oder murinem Occludin bzw. ZO-1. Grundlegend war die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktion des Occludin-Antikörpers mit dem ZO-1-Protein also gering.

Zur experimentellen Absicherung wurden dennoch die immunhistochemischen Färbungen mit einem monoklonalen Antikörper wiederholt, welcher ebenfalls eine Sequenz dieser Region von Occludin erkennt. Außerdem stand ein Antikörper zur Verfügung, welcher an Aminosäuresequenzen der N-terminalen Bereiche des Occludins binden sollte. Bei Verwendung des monoklonalen Occludin-Antikörpers in Doppelfärbungen mit ZO-1 auf Retinapräparaten der Maus und des Makakens stellte sich heraus, dass die Occludin-Immunreaktion auf die *tight junctions* zwischen den Endothelzellen der Blutgefäße beschränkt war. Dort war Occludin erwartungsgemäß mit ZO-1 kolokalisiert (Abb. 52). In der Kaninchenretina fand dementsprechend keine Immunreaktion statt, weil sie nicht vaskularisiert ist. Dieser Occludin-Antikörper zeigte also das aus der Literatur bekannte Färbemuster. Bei Verwendung des N-terminal bindenden Occludin-Antikörpers waren die gesamten Retinae aller Spezies so stark gefärbt, dass sich eine spezifische Immunreaktion nur erahnen ließ. Deshalb fand dieser Antikörper für detaillierte, immunhistochemische Versuche keine Verwendung.

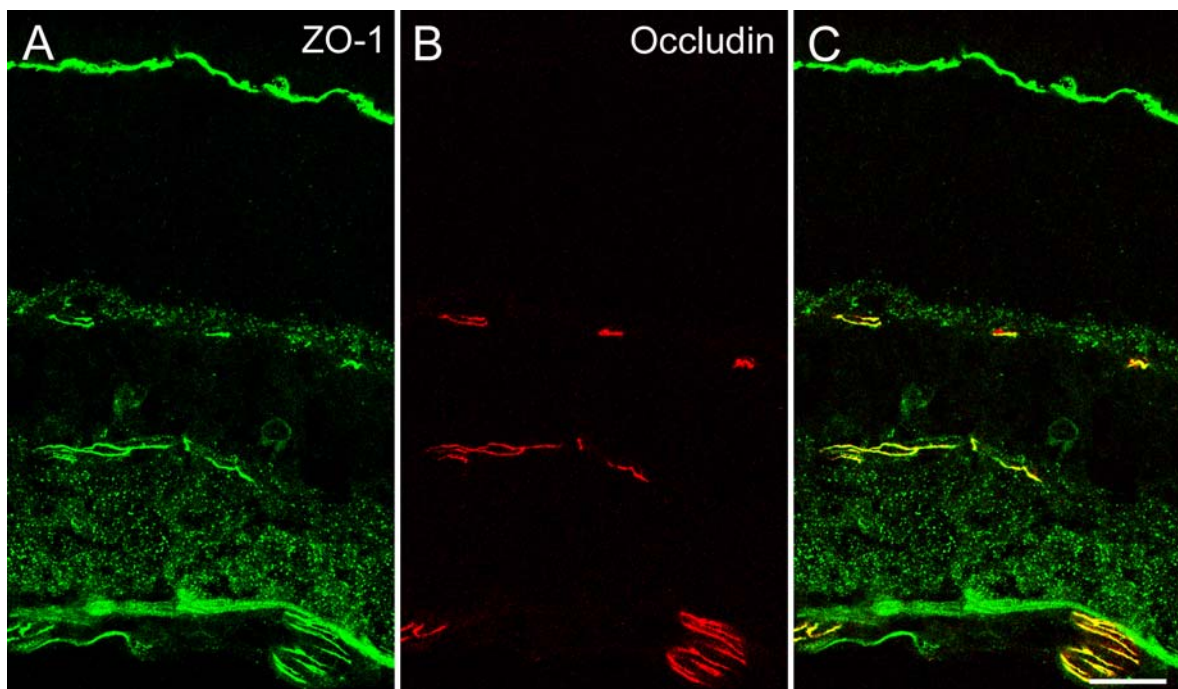


Abbildung 52: ZO-1 und Occludin in der Mausretina. **A – C** Vertikaler Kryoschnitt gefärbt mit ZO-1 und dem monoklonalen Occludin-Antikörper. Maßstabsbalken: 20 μm .

Zur Prüfung der Spezifität der unterschiedlichen Occludin-Antikörper wurden im Anschluss an die Immunhistochemie proteinbiochemische Untersuchungen mittels *Western-Blot*-Analyse an Maus- und Kaninchenretinae durchgeführt.

Beide in dieser Studie verwendeten ZO-1-Antikörper markierten Proteinbanden von ca. 225 kDa. Diese entspricht der aus der Literatur bekannten Größe des ZO-1-Proteins (Stevenson et al., 1986). Der polyklonale Antikörper markiert darüber hinaus jedoch noch leichtere, unspezifische Proteinbanden. Trotzdem zeigen beide Antikörper bei allen hier untersuchten Spezies ein völlig gleiches Färbemuster bei immunhistochemischen Versuchen.

Die proteinbiochemischen Ergebnisse für Occludin waren im Vergleich zur Immunhistochemie und zur Sequenzanalyse sehr uneinheitlich oder sogar widersprüchlich. Alle drei Occludin-Antikörper zeigten unspezifische Kreuzreaktionen bei einem Proteingewicht von derselben Größe wie ZO-1 im Totalhomogenat der Kaninchenretina. Der polyklonale, C-terminal bindende Occludin-Antikörper zeigte diese Kreuzreaktion ebenfalls im Homogenat der Mausretina. Der monoklonale Occludin-Antikörper markierte bei der Maus hingegen gar keine Proteinbanden. Eine spezifische Markierung von Proteinbanden bei der erwarteten Occludin-Größe von ca. 65 kDa (Furuse et al., 1993) wurde nur mit den polyklonalen Occludin-Antikörpern festgestellt.

Keine der hier gezeigten Proteinbanden waren auf eine unspezifische Kreuzreaktion der Sekundärantikörper zurückzuführen. Parallel zu den Experimenten wurden Negativkontrollen auf Blotstreifen mit den Sekundärantikörpern ohne vorhergehende Primärantikörper-Inkubation durchgeführt, welche nach Entwicklung keine Proteinmarkierung aufwiesen.

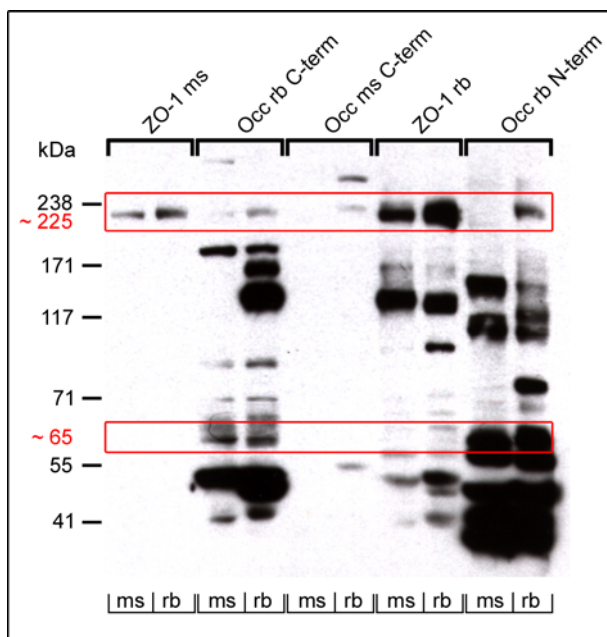


Abbildung 53: *Western-Blot*-Analyse von ZO-1- und Occludin-Antikörpern. Proteine aus Totalhomogenaten von Maus- (ms) und Kaninchen- (rb) Retinae wurden mit verschiedenen Antikörpern gegen ZO-1 und Occludin markiert. Die Größen des Proteinstandards sind am linken Bildrand aufgetragen. Die roten Kästen mit nebenstehenden Größenangaben entsprechen dem Proteingewicht von ZO-1 (ca. 225 kDa) bzw. Occludin (ca. 65 kDa).

III.3 Protocadherin β 16 und GluRs in der OPL der Makakenretina

III.3.1 Protocadherin β 16 am Zapfenendfüßchen

Bei der Untersuchung von Protocadherin β 16 (Pcdh β 16) in der Makakenretina wurde ein sehr ähnliches Verteilungsmuster dieses Proteins im Vergleich zur Mausretina (Junghans et al., 2008) gefunden. Die postsynaptische Lokalisation von Pcdh β 16 am Zapfenendfüßchen zeigte sich auch hier. Darüber hinaus fiel Pcdh β 16 mit GluR3 am Zapfenendfüßchen zusammen – sowohl in den Invaginationen, als auch in der Ebene der *desmosome-like junctions* unterhalb der Zapfenendfüßchen (Abb. 54).

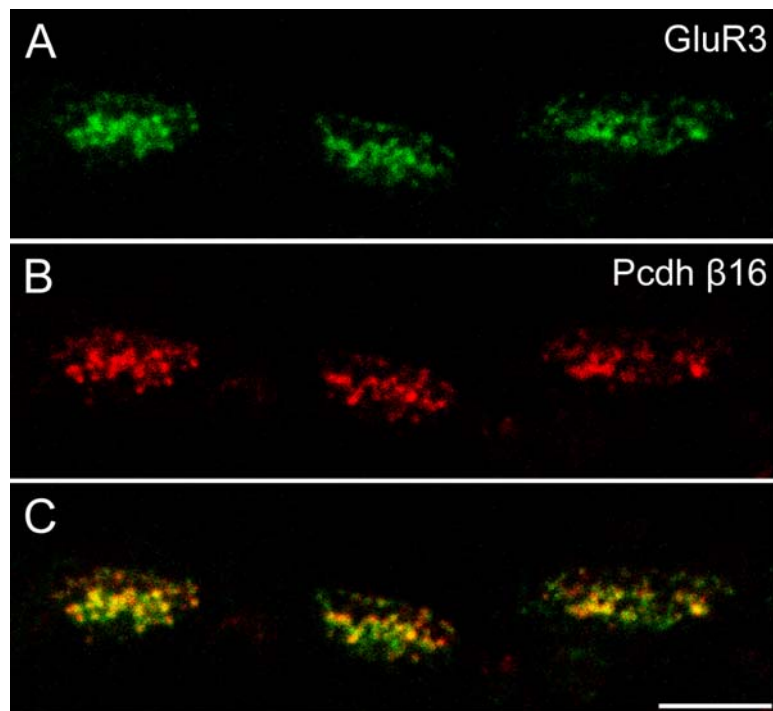


Abbildung 54: Pcdh β 16 und GluR3 am Zapfenendfüßchen. **A – C**, Doppelfärbung von GluR3 und Pcdh β 16 an drei Zapfenendfüßchen in einem vertikalen Kryoschnitt der Makakenretina. Maßstabsbalken: 5 μ m.

Die Verteilung von Pcdh β 16 konnte auch auf ultrastruktureller Ebene mittels der *pre-embedding* Immunzytochemie bestätigt werden (Abb. 55A, C). Die Färbung durch das DAB-Produkt zeigt eine Konzentration der Pcdh β 16-Immunreaktivität an den Orten der

Rezeptorexpression auf den dendritischen Spitzen der Horizontalzellen in den Invaginierungen des Zapfenendfüßchens und an den *desmosome-like junctions*.

Darüber hinaus wurden in diesen Präparaten auch Reaktionsprodukte von Pcdh β 16 in flachen Kontakten von OFF-Bipolarzellen am Zapfenendfüßchen festgestellt (Abb. 55B, C). Dieser Befund war wiederum übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Mausretina (Junghans et al., 2008). Interessanterweise waren die gefärbten Spitzen der Bipolarzellendendriten meist in einer Triaden-assoziierten Position zu finden.

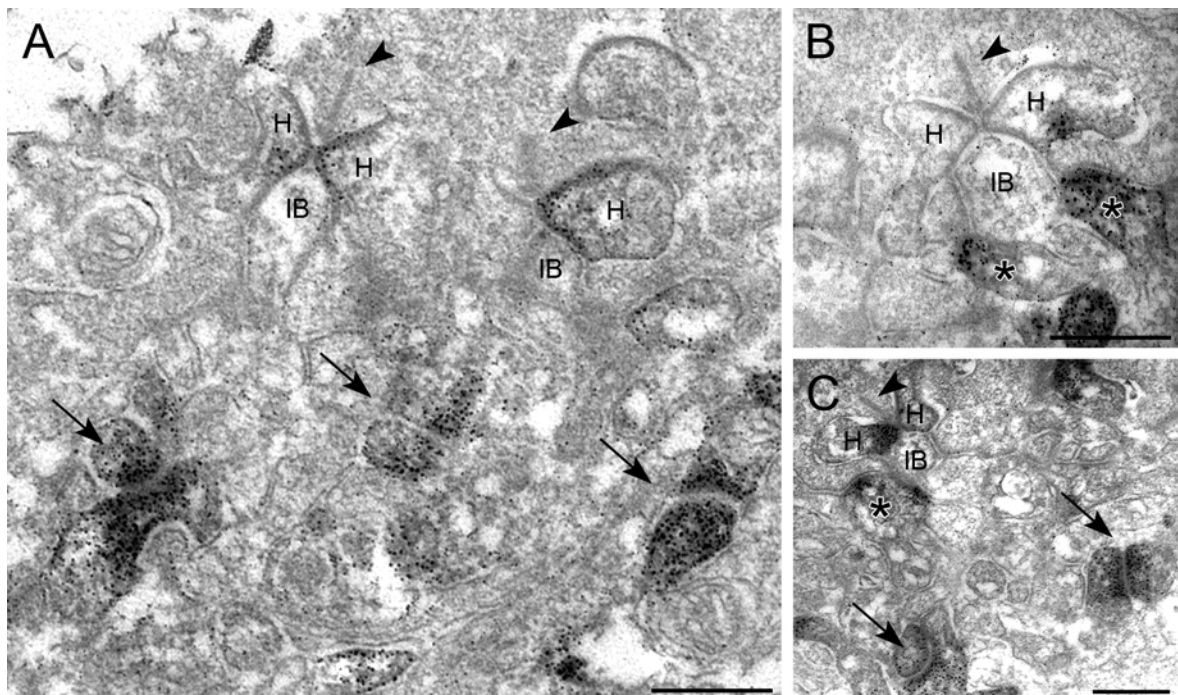


Abbildung 55: Pcdh β 16 am Zapfenendfüßchen. **A – C,** Elektronenmikroskopische Aufnahmen silberverstärkter DAB-Färbung von Pcdh β 16 an verschiedenen Zapfenendfüßchen der Makakenretina. Auf den vertikalen Ultradünnschnitten sind jeweils präsynaptisch zu den Triaden die Proteinbänder erkennbar (Pfeilspitzen). Die Triadenelemente sind mit H (Horizontalzellendendrit) und IB (invaginierender Bipolarzellendendrit) gekennzeichnet. Die Pfeile weisen auf Pcdh β 16-gefärbte *desmosome-like junctions*. In B und C sind flache, Triaden-assoziierte Kontakte von OFF-Bipolarzellen am Zapfenendfüßchen gezeigt (Sternchen). Alle Maßstabsbalken: 0,5 μ m.

Abbildung 56 zeigt noch einmal die Kolokalisation von Pcdh β 16 und GluR3. Im Gegensatz zu Experimenten mit vertikalen Kryoschnitten war bei Pcdh β 16-Färbungen im Retinaganzpräparat oftmals keine oder eine nur extrem schwache Immunreaktion in den Invaginierungen feststellbar, was möglicherweise auf eine unzureichende Penetration des Antikörpers zurückzuführen war.

In der horizontalen Ansicht fiel auf, dass an manchen Zapfenendfüßchen sehr viel weniger Pcdh β 16 angehäuft war, wohingegen die Zahl der GluR3-immunreaktiven Punkte nicht

reduziert war. Diese Zapfenendfüßchen traten zudem in einem relativ gleichen Abstand zueinander auf. Das dadurch entstehende Mosaik erinnerte an die Verteilung der S-Zapfenendfüßchen.

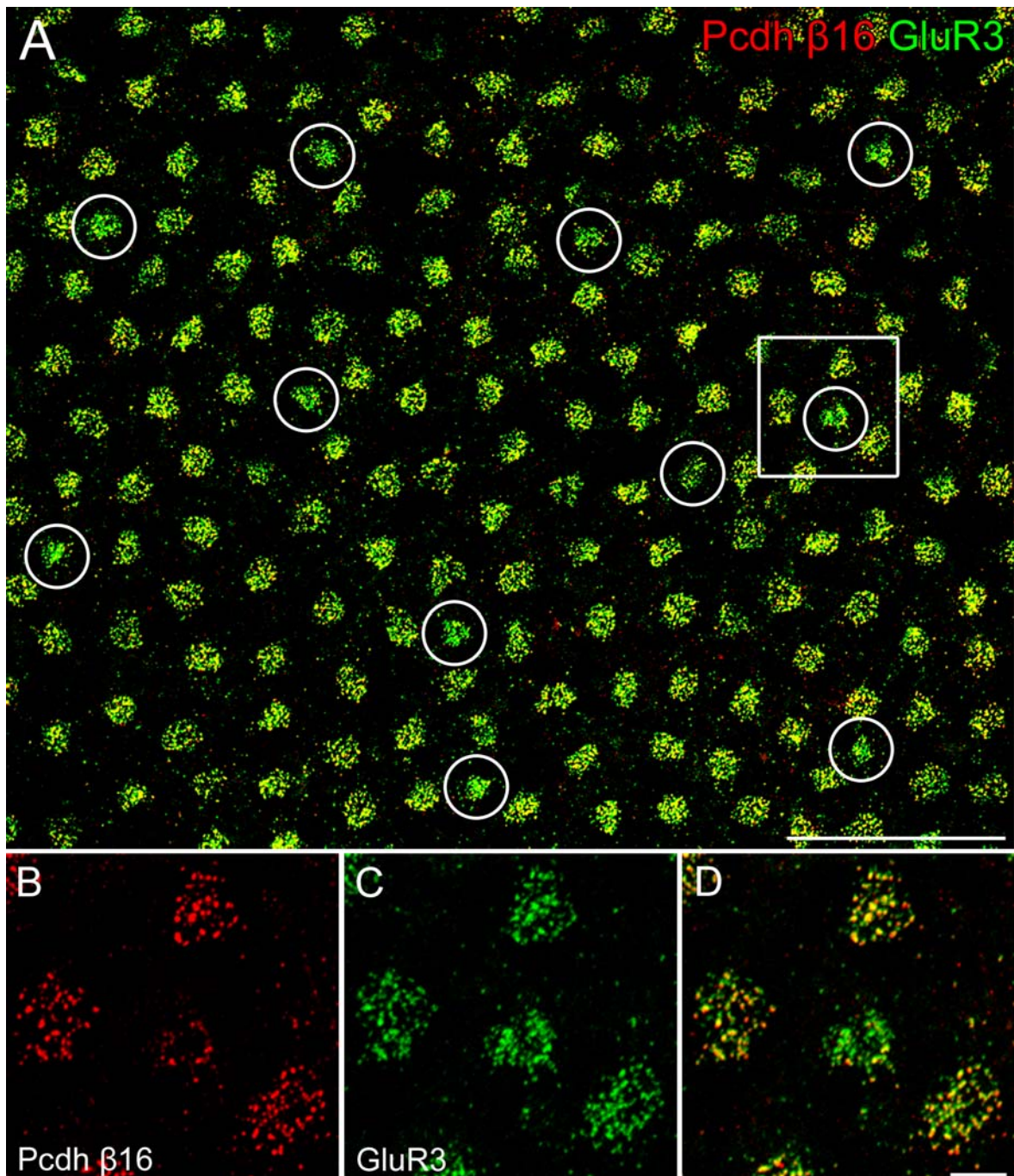


Abbildung 56: A – D, Doppelfärbung von Pcdh β 16 und GluR3 im Ganzpräparat der Makakenretina. Die Übersichtsaufnahme (A) zeigt manche Zapfenendfüßchen, die eine vergleichsweise schwache Pcdh β 16-Immunreaktivität zeigen, obwohl dort GluR3 normal stark angehäuft ist (umkreist). B – D zeigen eine Vergrößerung des in A umrahmten Bereichs. Maßstabsbalken: A, 50 μ m; B – D, 5 μ m.

III.3.2 Protocadherin β 16 am S-Zapfenendfüßchen

Um zu prüfen, ob Pcdh β 16 am S-Zapfenendfüßchen reduziert war, wurden Doppelfärbungen von S-Opsin und Pcdh β 16 angefertigt. Dadurch zeigte sich eine deutlich verminderte Pcdh β 16-Immunreaktion am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich mit M- und L-Zapfenendfüßchen (Abb. 57).

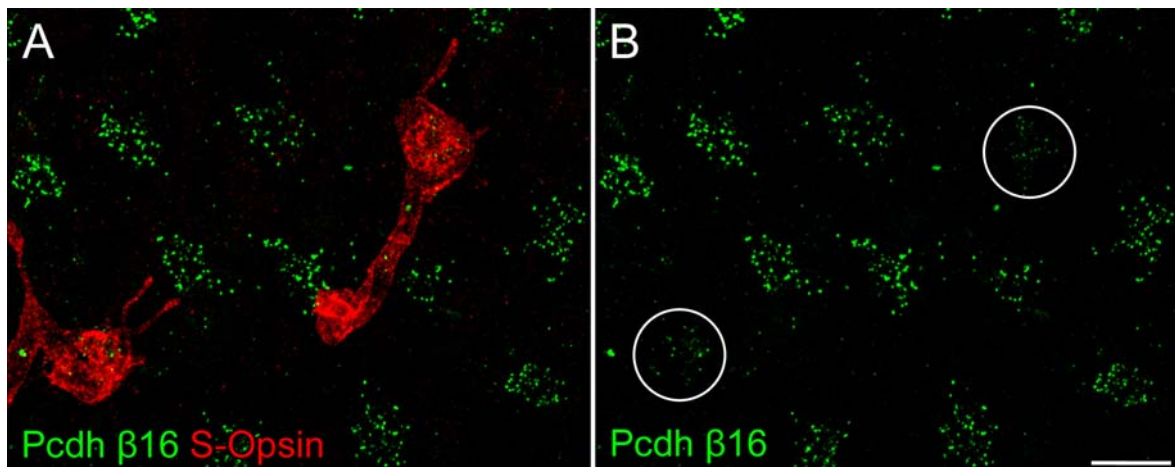


Abbildung 57: Pcdh β 16 am S-Zapfenendfüßchen **A, B**, Doppelfärbung von Pcdh β 16 und S-Opsin im Ganzpräparat der Makakenretina. Die Positionen der beiden mit S-Opsin markierten S-Zapfenendfüßchen sind in B umkreist. Maßstabsbalken: 10 μ m.

III.3.3 AMPA- und Kainat-Rezeptoren am Zapfenendfüßchen

Die Pcdh β 16-Reduktion am S-Zapfen deutete auf eine typspezifische Expression dieses Proteins durch H1 Horizontalzellen an den Invaginationen und den *desmosome-like junctions* hin. Anschließend sollte geprüft werden, ob die Lokalisation von Pcdh β 16 nicht nur typspezifisch ist, sondern sich eventuell auch auf bestimmte GluR-Untereinheiten (auf AMPA- oder Kainatrezeptoren) beschränkt. Dafür musste zunächst die Zusammensetzung der GluRs an den Horizontalzellsynapsen hinsichtlich einer möglichen Koexpression unterschiedlicher Rezeptoruntereinheiten an einzelnen Synapsen untersucht werden. Erwartungsgemäß wurde im Rahmen dieser Analyse eine Kollokalisierung der AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR2/3 bzw. GluR3 und GluR4 am Zapfenendfüßchen gefunden (Abb. 58).

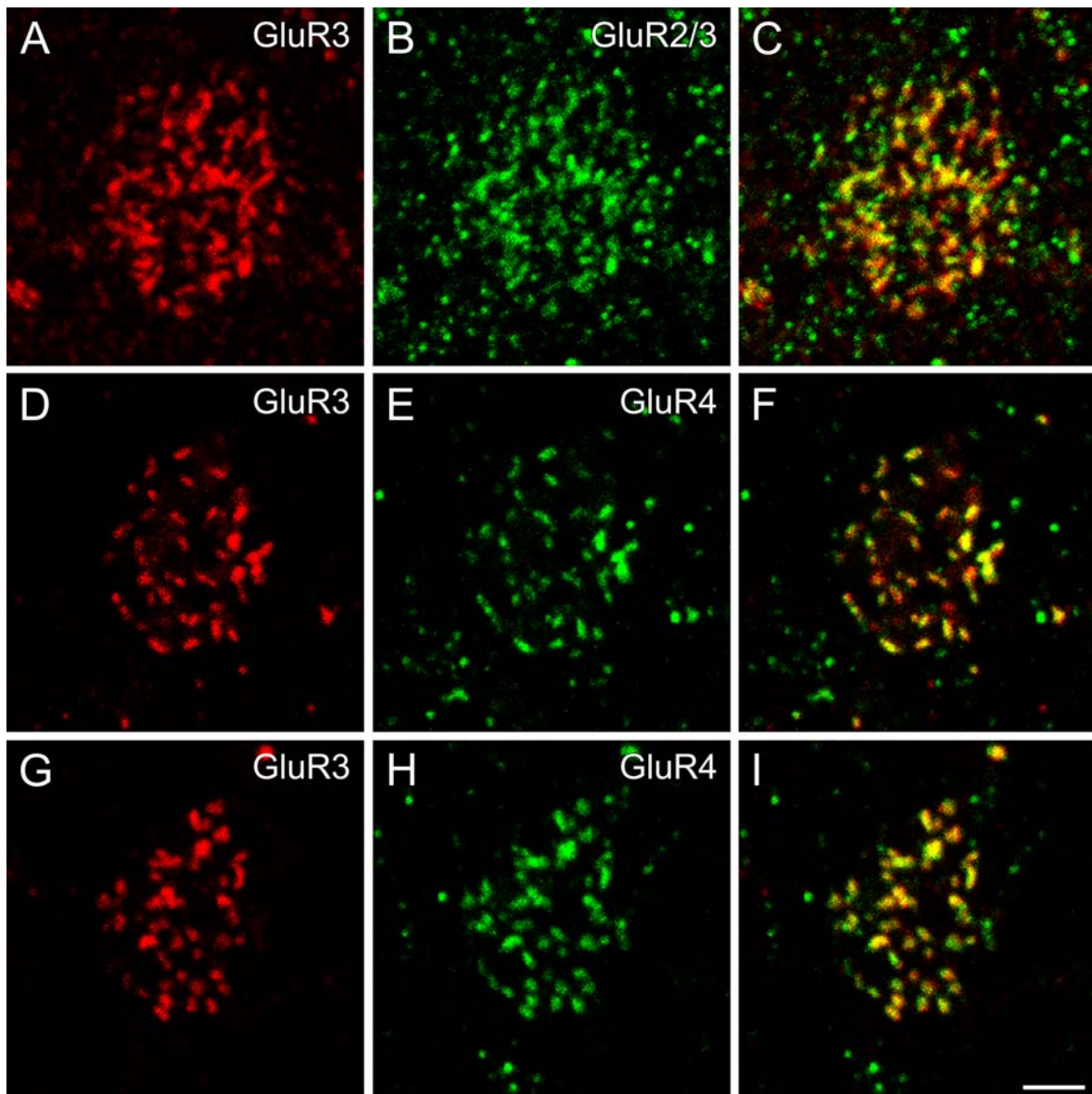


Abbildung 58: AMPA-Rezeptoruntereinheiten am Zapfenendfüßchen. **A – C**, Projektion einzelner Bildstapelaufnahmen des gesamten Bereichs der *desmosome-like junctions* und der Invaginierungen einer Doppelfärbung von GluR3 und GluR2/3 an einem einzelnen Zapfenendfüßchen. Der Antikörper gegen GluR2/3 erzeugt in Kombination mit GluR3 eine unspezifische, gepunktete Färbung in der Retina. Die spezifische Immunreaktion kann jedoch durch die Kolokalisation mit GluR3 festgestellt werden. **D – I**, Doppelfärbung von GluR3 und GluR4 an einem einzelnen Zapfenendfüßchen. Zu sehen sind die Färbungen an den Invaginierungen (**D – F**) und an den *desmosome-like junctions* (**G – I**). Maßstabsbalken: 2 μ m.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluR2/3 und GluR4 in denselben postsynaptischen Bereichen kolokalisiert waren, wurden Doppelfärbungen von GluR3 und GluR6/7 angefertigt, um die am Zapfenendfüßchen exprimierten Kainat-Rezeptoruntereinheiten auf ihre Verteilung hin zu prüfen. Durch die dabei festgestellte Kolokalisation vieler GluR3- und GluR6/7-immunreaktiver Punkte stellte sich heraus, dass auch diese AMPA- und Kainat-Rezeptoruntereinheiten auf der Ebene der

desmosome-like junctions größtenteils auf denselben Zellfortsätzen zu finden waren (Abb. 59). Darüber hinaus erschienen GluR6/7-immunreaktive Punkte, welche nicht mit GluR3 kolokalisiert vorlagen. Außerdem konnten GluR3-immunreaktive Punkte unterhalb des Zapfenendfüßchens detektiert werden, die ihrerseits wiederum nicht mit GluR6/7 kolokalisierten.

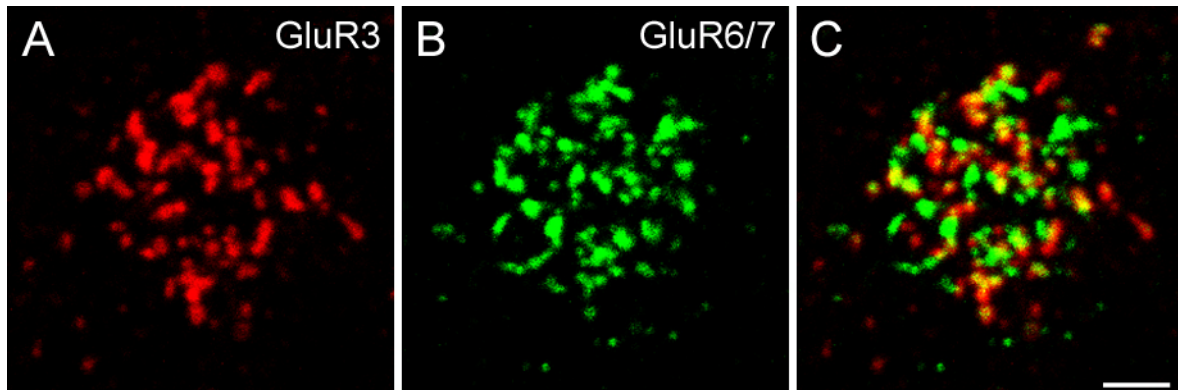


Abbildung 59: GluR3 und GluR6/7 unterhalb des Zapfenendfüßchens. **A – C**, Doppelfärbung von GluR3 und GluR6/7 im Ganzpräparat der Makakenretina. Gezeigt wird eine Projektion von Bildstapelaufnahmen der Färbung an einem einzelnen Zapfenendfüßchen auf Höhe der Basis des Zapfenendfüßchens und den *desmosome-like junctions*. Die GluR3-Färbung an den Invaginierungen ist dementsprechend nicht in die Abbildung einbezogen. Maßstabsbalken: 2 μ m.

Auf Grund der zuvor festgestellten Expression von Pcdh β 16 durch H1 Horizontalzellen und der nun vorgefundenen Kolokalisation von AMPA- und Kainat-Rezeptoruntereinheiten, erübrigte sich die Analyse einer GluR-subtypspezifischen Verteilung von Pcdh β 16.

IV. Diskussion

IV.1 Anatomische Besonderheiten des S-Zapfenendfüßchens

In der vorliegenden Arbeit wurde das S-Zapfenendfüßchen an der Clm1-Mauslinie untersucht. Durch GFP-Färbungen der S-zapfenspezifischen Typ 9 Bipolarzelle war damit erstmals eine zuverlässige Markierung der S-Zapfenendfüßchen möglich (Haverkamp et al., 2005).

Die Bereiche der Invaginierungen an S- und M-Zapfenendfüßchen wurden durch PNA-Färbungen ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass die Gesamtfläche der Invaginierungen an S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu der des M-Zapfens um ca. 35 % reduziert war. Beim Primaten unterscheiden sich die S-Zapfenendfüßchen ebenfalls hinsichtlich der PNA-Färbung von den M- und L-Zapfen (Haverkamp et al., 2001a; Lee et al., 2005). Der Unterschied beruht jedoch bloß auf einer dichteren Packung der Invaginierungen statt auf einer Reduktion, wie sie hier in der Mausretina dokumentiert werden konnte. In der humanen Retina sowie im Makaken konnte bei dem Vergleich von M-/L-Zapfen und S-Zapfen kein Unterschied in der Anzahl präsynaptischer Proteinbänder festgestellt werden. Letztere waren im S-Zapfen allerdings kürzer und analog zur PNA-Färbung dichter angeordnet (Ahnelt et al., 1990; Haverkamp et al., 2001a). Die Zählung der präsynaptischen Proteinbänder von S- und M-Zapfen in der Mausretina hätte ein eindeutiges Ergebnis bezüglich der Anzahl der Triaden liefern können. Diese Analyse war aber nur für wenige M-Zapfen möglich. Die hier ermittelte Zahl von 9 – 10 Proteinbändern pro Endfüßchen stimmt allerdings mit den elektronenmikroskopischen Daten von Tsukamoto et al. (2001) überein, die ebenfalls von durchschnittlich 10 Proteinbändern berichteten. Basierend auf den Ergebnissen der PNA-Färbungen wären demnach im S-Zapfenendfüßchen weniger Proteinbänder zu erwarten.

Für die Mausretina bedeutet diese Reduktion ganz konkret eine Minderung in der Anzahl synaptischer Kontakte von invaginierenden Zellen – also von ON-Bipolar- und Horizontalzellen. Für Horizontalzellen wurde dementsprechend eine Reduktion ihrer synaptischen Kontakte am S-Zapfenendfüßchen gezeigt. Die funktionelle Bedeutung dieser Reduktion und ihre möglichen Auswirkungen für die Farbverarbeitung in der Mausretina bleiben jedoch unklar. Sie werden im folgenden Kapitel IV.2 noch einmal ausführlicher diskutiert.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden neben den Typ 9 Zellen keine weiteren ON-Bipolarzellen bezüglich ihrer synaptischen Kontakte am S-Zapfenendfüßchen untersucht. Es ist jedoch geplant, die S-Zapfenkontakte von ON-Bipolarzellen des Typs 7 mit Hilfe der Gus⁴⁵-GFP Mauslinie (Huang et al., 2003) einer genaueren Analyse zu unterziehen. Zur Markierung der Dendriten der übrigen ON-Zapfenbipolarzellen (Typen 5a/b, 6 und 8) stehen bislang leider noch keine Antikörper oder genetisch modifizierte Mauslinien zur Verfügung (Übersicht in Wässle et al., 2009). Eine Reduktion der synaptischen Kontakte diffuser ON-Bipolarzellen am S-Zapfenendfüßchen wurde bereits in der Primatenretina gezeigt (Lee et al., 2004, 2007). Die hier mittels PNA-Färbungen erzielten Ergebnisse deuten auf ein ähnliches Phänomen in der Mausretina hin. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Dendriten verschiedener ON-Bipolarzellen durch die invaginierenden Fortsätze der Typ 9 Bipolarzelle „verdrängt“ werden und deshalb flache Kontakte am S-Zapfenendfüßchen ausbilden. Flache Synapsen bei ON-Zapfenbipolarzellen wurden bereits in der Primatenretina dokumentiert (Calkins et al., 1996; Hopkins und Boycott, 1996). Durch Färbungen mit mGluR6 bei gleichzeitiger Markierung der basalen Membran des Zapfenendfüßchens kann möglicherweise festgestellt werden, ob diese Art der synaptischen Verschaltung am S-Zapfenendfüßchen der Mausretina vermehrt in Erscheinung tritt. In diesem Falle sollten mGluR6-immunreaktive Punkte sowohl an der basalen Membran des Endfüßchens als auch in den Invaginierungen zu finden sein.

Für eine vermehrte Anzahl flacher Kontakte von ON-Bipolarzellen am S-Zapfenendfüßchen sprechen auch die Ergebnisse der hier durchgeführten Flächenanalyse von basalen Endfüßchenmembranen. In der humanen Retina ist die Fläche der S-Zapfenendfüßchen ca. 50 % kleiner als die der M-/L-Zapfen (Ahnelt et al., 1990). Die Größe der S-Zapfenendfüßchen war zwar in der Mausretina im Vergleich zu den übrigen Zapfenendfüßchen ebenfalls statistisch signifikant reduziert – jedoch nur um ca. 15 %. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den verminderten Flächen der Invaginierungen und der Reduktion der OFF-Bipolarzellkontakte.

Bezüglich der OFF-Bipolarzellkontakte wurde eine starke Reduktion der Glutamat-rezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR5 am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfen festgestellt. Die GluR5-Reduktion am S-Zapfenendfüßchen konnte bereits von Haverkamp et al. (2005) dokumentiert werden. Sie wurde hier jedoch noch einmal im Detail untersucht. Demnach lag die Reduktion von GluR5 bei ca. 46 %. Im Falle von GluR1 war die Reduktion um 48 % mit GluR5 vergleichbar. Mit anderen Worten waren

⁴⁵ Gustducin

am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfen nur noch etwas mehr als die Hälfte der Rezeptoren vorhanden, die dort üblicherweise durch OFF-Bipolarzellen exprimiert werden. Im Erdhörnchen konnte ebenfalls eine starke Reduktion von GluR5 am S-Zapfenendfüßchen festgestellt werden (Li und DeVries, 2004, 2006). In der späteren Studie wurde an Retinae dieser dichromatischen Tiere gezeigt, dass verschiedene Bipolarzelltypen S-/M-zapfenselektiv verschaltet sind und ein dementsprechend chromatisch unterschiedliches Antwortverhalten besitzen. Die OFF-Bipolarzellen der Typen b3 und b7 exprimieren nur bzw. hauptsächlich GluRs der Kainat-Untereinheiten (DeVries, 2000). Es sind gleichzeitig diejenigen Typen, welche mit ihren Dendriten die S-Zapfen meiden (Grün-OFF) und somit sehr wahrscheinlich für die GluR5-Reduktion am S-Zapfen verantwortlich sind.

IV.2 Existiert ein Grün-OFF-Signalweg in der Mausretina?

Die Analyse der OFF-Bipolarzellkontakte an Zapfenendfüßchen der Mausretina ergab einen eindeutigen Befund. Die Dendriten der OFF-Bipolarzelltypen 3a (HCN4-Markierung) und 4 (Calsenilin-Markierung) zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Kontakte zu S- und M-Zapfen. Es konnte allerdings eine starke Reduktion der Fluoreszenzfläche von NK3R am S-Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den übrigen Zapfenendfüßchen um 60 % festgestellt werden. Der Antikörper gegen NK3R markiert die OFF-Bipolarzelltypen 1 und 2 (Wässle et al., 2009). Deshalb kann die Reduktion am S-Zapfenendfüßchen darauf zurückzuführen sein, dass entweder einer der beiden Zelltypen den Kontakt zum S-Zapfenendfüßchen meidet, oder dass beide Typen weniger stark vom S-Zapfen innerviert werden. Zur Klärung dieses Sachverhalts werden derzeit Untersuchungen an der Clm12-Mauslinie durchgeführt. In den Retinae dieser Tiere wird Clomeleon in verschiedenen Neuronen exprimiert – wie auch in der Clm1-Mauslinie, bloß in anderen Zelltypen. Wie von Wässle et al. (2009) gezeigt wurde, können mit Hilfe der Clm12-Maus die OFF-Bipolarzellen des Typs 2 markiert werden. Die anatomische Untersuchung der dendritischen Kontakte dieser Zellen wird demnach Aufschluss darüber liefern, ob die NK3R-Reduktion am S-Zapfenendfüßchen die Verschaltung der Typ 2 Zelle widerspiegelt. Parallel zu diesen anatomischen Arbeiten werden auch elektro-physiologische Ableitungen dieser Bipolarzelle bei chromatisch alternierender Lichtreizung durchgeführt, um auf diesem Wege eine mögliche Spezifität im dendritischen

Verschaltungsmuster dieser Bipolarzelle zu ermitteln. Die elektrophysiologischen Arbeiten werden im Rahmen einer DFG-geförderten Zusammenarbeit⁴⁶ mit dem Labor von Thomas Euler am Max Planck Institut für medizinische Forschung (MPIImF) in Heidelberg durchgeführt. Außerdem steht für die Ableitungen die *thyl*-mitoCFP-P-Mauslinie zur Verfügung (Misgeld et al., 2007). In den Retinae dieser Tiere können die Zellkörper von Typ 1 Bipolarzellen identifiziert und ihre Lichtantworten entsprechend der Typ 2 Zelle analysiert werden. Die vorläufigen Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen sprechen für eine Grün-OFF-Antwort der Typ 2 Zelle. Typ 1 Zellen besitzen hingegen gemischte Blau-/Grün-OFF-Antworten. Diese Befunde deuten auf eine nicht-selektive Verschaltung der Typ 1 OFF-Bipolarzelle hin, wohingegen die Typ 2 Bipolarzelle die S-Zapfenendfüßchen mit ihren Dendriten zu meiden scheint. Die anatomische Absicherung dieser Ergebnisse steht noch aus; ebenso wie die Analyse der Typ 3b OFF-Bipolarzellen, deren Markierung jetzt durch Antikörper gegen PKARII β ⁴⁷ möglich ist (Mataruga et al., 2007; Wässle et al., 2009).

Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Typ 2 Zelle allein für die zuvor erwähnte Reduktion von GluR1 und GluR5 am S-Zapfenendfüßchen verantwortlich ist. Bei der Durchführung meiner Diplomarbeit wurde bereits gezeigt, dass weder GluR1 noch GluR5 auf den dendritischen Spitzen der Typ 2 Bipolarzelle lokalisiert sind. Es liegt deshalb nahe, dass dieser Bipolarzelltyp Glutamatrezeptoren der KA-Untereinheiten exprimiert (Puller, 2005). Unabhängig von den noch ausstehenden Ergebnissen der Untersuchung von Typ 3b Bipolarzellen, ist die Stärke dieser GluR-Reduktion deshalb eher darauf zurückzuführen, dass das S-Zapfenendfüßchen (neben der Meidung durch Typ 2 Bipolarzellen) in der Gesamtheit auch schwächer von den übrigen OFF-Bipolarzellen kontaktiert wird. Ein Befund in dieser Richtung hat sich bei der hier durchgeführten Studie bereits angedeutet. Die Reduktion der dendritischen Kontakte von Typ 3a und Typ 4 Bipolarzellen am S-Zapfenendfüßchen war zwar nur sehr gering und statistisch nicht signifikant – allerdings könnten sich diese kleinen Unterschiede durch eine höhere Anzahl analysierter Zapfenendfüßchen noch festigen. Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch Studien der Verschaltung von DB3 OFF-Bipolarzellen im Primaten (Lee et al., 2007).

⁴⁶ FOR701 – Dynamik und Stabilität retinaler Verarbeitung

⁴⁷ Proteinkikinase A, regulatorische Untereinheit I β

In der Marmosetretina konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die *flat midget*⁴⁸ Bipolarzelle (FMB) den Kontakt mit S-Zapfenendfüßchen meidet (Lee et al., 2005; aber siehe auch Klug et al., 2003). Weil diese GluR-Untereinheit von den FMBs exprimiert wird, ist auch im Marmoset nur sehr wenig GluR1 an der Basis des S-Zapfenendfüßchens zu finden (Puller et al., 2007). Es ist davon auszugehen, dass die Studie der Glutamatrezeptorexpression auf OFF-Bipolarzellendriten in der Mausretina zu weiteren Erkenntnissen hinsichtlich dieses Sachverhalts führen wird.

Die hier und durch Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe in Heidelberg gewonnenen Ergebnisse sprechen stark für die Existenz einer Grün-OFF-Signaltransduktion in der Mausretina, welche von der OPL in die IPL durch die OFF-Bipolarzelle des Typs 2 geleistet wird. Außerdem wurde bereits von Ganglienzellen in der Mausretina berichtet, welche analog zur kleinen, bistratifizierten Ganglienzelle der Primatenretina Grün-OFF/Blau-ON-Antworten auf entsprechende Lichtreize entwickelten (Ekesten und Gouras, 2005). Diese Resultate wurden aber durch Extrazellulärableitungen erzielt, bei denen keine Aussagen über die Morphologie dieser Ganglienzellen gemacht werden konnten. Die morphologische Identifizierung und physiologische Charakterisierung der bis heute unbekanntenen Amakrin- und Ganglienzellen, die an dieser Grün-OFF/Blau-ON-Verschaltung beteiligt sind, sind weitere Ziele zur Erforschung des retinalen Schaltkreises für das dichromatische Farbsehen.

Die morphologische Identifizierung solcher Zellen soll nun mittels SBFSEM⁴⁹-Analyse zur großräumigen, dreidimensionalen Rekonstruktion besagter Schaltkreise auf ultrastruktureller Ebene ermöglicht werden (Übersichtsartikel von Briggman und Denk, 2006). Ein entsprechend automatisiertes Elektronenmikroskop steht jetzt am MPIImF zur Verfügung.

Weiterführende, elektrophysiologische Untersuchungen an der S-zapfenspezifischen Typ 9 ON-Bipolarzelle sollen außerdem klären, welche Mechanismen bei der Weiterleitung von S-Zapfensignalen und bei der Entstehung der farbantagonistischen Farbverarbeitung eine Rolle spielen. Die kleine, bistratifizierte Ganglienzelle der Primatenretina wird in der OFF-Schicht durch Bipolarzellen der Typen DB2 und DB3 innerviert (Ghosh et al., 1997; Calkins et al., 1998). Wird der OFF-Eingang pharmakologisch blockiert, verkleinert sich

⁴⁸ flat [engl.] – flach; midget [engl.] – winzig, zwergenhaft. Die Namensgebung der FMBs beruht zum einen auf der Tatsache, dass sie die für OFF-Bipolarzellen üblichen flachen Kontakte zum Zapfen ausbilden. Zum anderen kontaktieren sie in der zentralen Retina jeweils nur ein Zapfenendfüßchen und analog dazu in der IPL nur eine *midget* Ganglienzelle (Boycott und Wässle, 1991).

⁴⁹ serial block-face scanning electron microscopy [engl.] – serielle Blockoberflächen-Abtastelektronenmikroskopie

die Gelb-OFF-Komponente der Ganglienzellantwort zwar deutlich, sie ist aber dennoch vorhanden. Dies deutet auf eine farbantagonistische Komponente hin, welche bereits in der OPL bei den Horizontalzellen gelegen ist. Möglicherweise wird ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren benötigt, um das Antwortverhalten der kleinen, bistratifizierten Ganglienzelle zu erzeugen: sowohl ihre Innervierung durch OFF-Bipolarzellen in der IPL, als auch die Inhibition der S-Zapfen durch H2 Horizontalzellen in der OPL, welche durch die S-ON-Bipolarzelle auf die Ganglienzelle übertragen wird. (Übersichtsartikel von Dacey, 2000). Neueste Ergebnisse aus der Primatenretina zeigen in der Tat den Einfluss von Horizontalzellen auf die rezeptiven Felder der Ganglienzellen (Davenport et al., 2008). Die stark vermehrte Expression von Syntaxin-4 unterhalb des S-Zapfenendfüßchens in der Makakenretina, wie sie in Kapitel III.2 gezeigt wurde, könnte möglicherweise bei der Inhibition der S-Zapfen durch H2 Horizontalzellen eine Rolle spielen. Es ist anzunehmen, dass sie analog zur Expressionsstärke eine vermehrte Ausschüttung von GABA widerspiegelt. Es ist zudem wahrscheinlich, dass die GABA-Ausschüttung eine ebenso große Wirkung auf die ON-Bipolarzellen postsynaptisch zum S-Zapfen hat. Es konnte gezeigt werden, dass GABA einen depolarisierenden Effekt auf ON-Bipolarzellen haben kann (Varela et al., 2005; Dübel et al., 2006). Indem diese ON-Bipolarzellen eine stark erhöhte Chloridionenkonzentration in ihren Dendriten aufweisen, kommt es bei der Ausschüttung von GABA durch Horizontalzellen zu einem Chloridionenausstrom. Dieser Ausstrom führt sodann zur Depolarisation der Zellen. So ein Vorgang würde wiederum die eventuell durch H2 Horizontalzellen erzeugte Gelb-OFF-Antwort unterstützen bzw. verstärken. Die erhöhte Syntaxin-4-Expression war nur unterhalb der S-Zapfenendfüßchen und nicht innerhalb der Invaginationen festzustellen. Dies könnte abermals dafür sprechen, dass der Mechanismus der vermehrten GABA-Freisetzung eher die Bipolarzellen beeinflusst.

In der bereits erwähnten Studie von Davenport et al. (2008) werden allerdings erneut Beweise für einen nicht-GABAergen, ephaptischen Mechanismus der Inhibition von Zapfen durch Horizontalzellen geliefert. Es wäre möglich, dass die Zapfen weitgehend durch die Beeinflussung des extrazellulären pH-Werts inhibiert werden, während sich die GABA-Ausschüttung verstärkt auf die Bipolarzellen auswirkt.

Die Horizontalzelle der Mausretina ähnelt nun noch stärker der H1 Horizontalzelle des Primaten, weil auch sie die S-Zapfenendfüßchen weniger stark kontaktiert. Trotz dieser verminderten Anzahl der Kontakte an solchen Zapfenendfüßchen wurde dort eine vergleichsweise normale Expression von Syntaxin-4 gefunden. Die Auswirkungen auf die

Farbverarbeitung in der murinen Retina bleiben in dieser Hinsicht unklar. Es bedarf also weiterer, elektrophysiologischer Untersuchungen an der *Clm1*-Maus, um die Wirkung der Horizontalzellen am S-Zapfenendfüßchen zu entschlüsseln.

IV.3 ZO-1 in der Säugetierretina

Zonula Occludens-1 (ZO-1) ist ein MAGUK-Protein und wurde ursprünglich als zytoplasmatisches Gerüstprotein an *tight* und *adherens junctions* entdeckt (Übersichtsartikel von Hartsock und Nelson, 2008). Es interagiert aber auch mit Connexinen an elektrischen Synapsen (Übersichtsartikel von Giepmans, 2004). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von ZO-1 und seine Assoziation mit verschiedenen *gap junctions* in der OPL der Säugetierretina untersucht.

Die vergleichende Analyse des Expressionsmusters von ZO-1 in den Retinae von Mäusen, Kaninchen und Makaken ergab ein sehr einheitliches Bild (Abb. 60). In der OPL aller drei Spezies fiel ZO-1 mit Cx36 zusammen, welches an der Bildung von *gap junctions* zwischen Dendriten von OFF-Bipolarzellen und zwischen Photorezeptorterminalien auf der Seite der Zapfenendfüßchen beteiligt ist (Feigenspan et al., 2004). Darüber hinaus wird ZO-1 an *gap junctions* unterhalb der Zapfenendfüßchen typspezifisch von Horizontalzellen exprimiert. In der Mausretina ist es folglich mit Cx57 an dendro-dendritischen *gap junctions* von Horizontalzellen assoziiert, in der Kaninchenretina mit Cx50 der axonlosen A-Typ Horizontalzellen sowohl unter den Zapfenendfüßchen als auch an den großen *plaques*. Beim Makaken liegt ZO-1 ebenfalls unterhalb des Zapfenendfüßchens in der Ebene der *desmosome-like junctions* auf Dendriten von H1 Horizontalzellen.

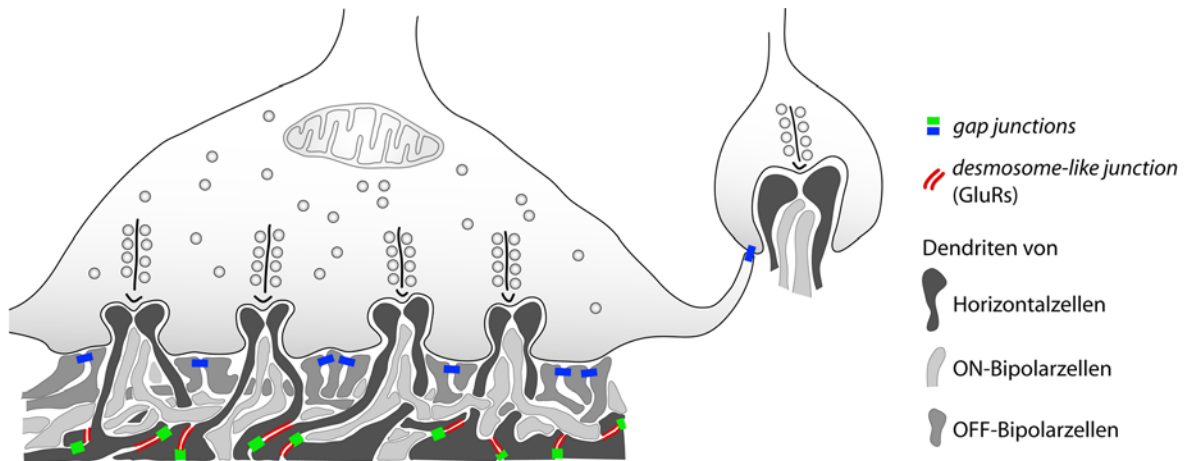


Abbildung 60: Schema der synaptischen Kontakte am Zapfenendfüßchen der Säugetierretina. ZO-1 ist an *gap junctions* zwischen den OFF-Bipolarzellen und zwischen den Photorezeptorterminalien zu finden (blaue Rechtecke). Außerdem wird ZO-1 an *gap junctions* von Horizontalzellen unterhalb des Zapfenendfüßchens exprimiert (grüne Rechtecke). Es ist dort eng mit den Glutamatrezeptoren an *desmosome-like junctions* benachbart.

Die in dieser Arbeit gezeigte Kollokalisierung von ZO-1 und Cx57 unterhalb des Zapfenendfüßchens in der Mausretina wurde von Ciolofan et al. (2007) nicht gefunden. Sie haben trotz Verwendung des gleichen, kommerziellen Cx57-Antikörpers anscheinend keine Immunreaktion in diesen Bereichen der OPL festgestellt. In ihrer Studie wurde hingegen ein starkes Immunsignal in den Invaginationen der Photorezeptorterminalien detektiert. Letzteres wurde in wesentlich schwächerer Form gelegentlich auch bei den hier durchgeführten Experimenten sowohl mit dem kommerziellen, als auch mit dem Cx57-Antikörper aus privater Quelle beobachtet. Es hob sich aber kaum von der Hintergrundfluoreszenz ab und ging durch die Anpassung der Laserstärke an das eigentliche Signal bei der Aufnahme verloren. Janssen-Bienhold et al. (2009) erhielten in ihrer Studie von Cx57 äquivalente Ergebnisse zu der hier vorliegenden Arbeit. Darüber hinaus konnten sie mittels Experimenten an *Cx57-knock-out*-Mäusen zeigen, dass die Cx57-Färbung in den Invaginationen unspezifisch sind, weil sie in den *knock-out*-Mäusen noch vorhanden war. Die *Cx57-knock-out*-Mäuse wurden ebenfalls von Ciolofan et al. (2007) untersucht. Dabei stellte sich allerdings heraus, dass ein weiterer der von ihnen verwendeten, kommerziell verfügbaren Cx57-Antikörper trotz sonst exakt gleicher Färbequalität im Gewebe der *knock-out*-Mäuse noch eine Reaktion hervorrief.

Diese widersprüchlichen Färbungen könnten eventuell auf die Art der Gewebepreparation zurückzuführen sein. Hier und für die Studie von Janssen-Bienhold et al. (2009) wurden die Retinae nach Tötung der Tiere nur schwach immersionsfixiert. Ciolofan et al. (2007) verwendeten hingegen Gewebe von perfundierten Tieren, teils unter Zugabe von

Pikrinsäure und Acrolein, was nicht zuletzt auch aus eigener Erfahrung oftmals zu qualitativ schlechten Färbungen oder auch zu Kreuzreaktionen mancher Antikörper führen kann.

Eine Spezifität der Immunreaktion von Cx57 in den Invaginierungen kann also durch die Resultate von Janssen-Bienhold et al. (2009) ausgeschlossen werden. Untersuchungen von Cx57 auf B-Typ Horizontalzellen der Kaninchenretina sprechen ebenfalls dagegen (Cha et al., 2008). Zudem konnte in anderen, elektrophysiologischen Studien an Retinae von Cx57-*knock-out*-Mäusen indirekt gezeigt werden, dass Cx57 wahrscheinlich nicht auf den dendritischen Spitzen der Horizontalzellen in den Invaginierungen (zur Bildung von Hemichannels) lokalisiert ist (Shelley et al., 2006; Dedek et al., 2008).

IV.3.1 Architektur von *gap junctions*

Den besten Einblick in mögliche Funktionen von ZO-1 in der Retina bieten die A-Typ Horizontalzellen des Kaninchens. Die Größe der Connexin-*plaques* erlaubte eine gute Auflösung der räumlichen Struktur von ZO-1 zusammen mit Cx50. An diesen *gap junctions* formt ZO-1 eine zaunähnliche Abgrenzung um die Connexine statt direkt mit ihnen zusammenzufallen (Abb. 61). Eine direkte Interaktion von ZO-1 und den Connexinen, wie sie oftmals postuliert wurde (Übersichtsartikel von Giepmans, 2004), wäre an solchen Synapsen allenfalls nur mit Connexinen an den äußeren Rändern möglich. Die dort vorgefundenen Strukturen erinnerten stark an die elektronenmikroskopisch untersuchte Architektur der von *tight junctions* umschlossenen *gap junctions* zwischen Endothelzellen der Kaninchenkornea (Raviola et al., 1980). Wiederum mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnten auch weitere Analogien direkt in der OPL der Retina gezeigt werden. So wurden in der Katze von Kolb (1977) *adherens junctions* gefunden, welche dort die *gap junctions* der Horizontalzellen umgeben. Des Weiteren werden in der aktuellen Studie von Janssen-Bienhold et al. (2009) Cx57-immunreaktive *gap junctions* von Maus-Horizontalzellen beschrieben, die abermals von *adherens junctions* umschlossen sind.

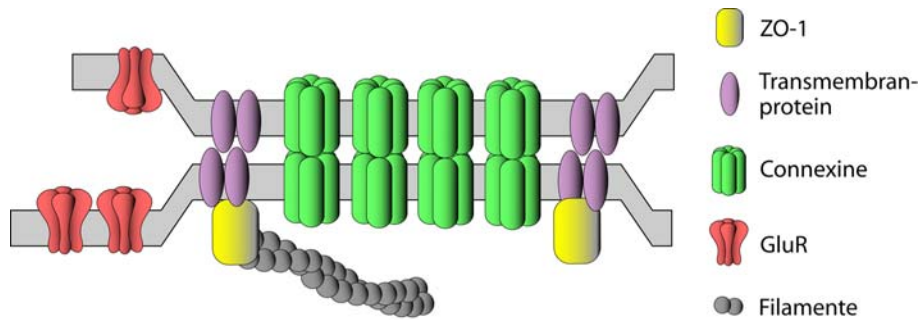


Abbildung 61: Modell der Verteilung von Proteinen an den hier untersuchten *gap junctions*. Die Connexine sind eng mit den Glutamatrezeptoren (GluRs) an den *desmosome-like junctions* assoziiert. Die *gap junction* wird von *tight* oder *adherens junctions* begrenzt, an denen ZO-1 die Transmembranproteine mit dem Zytoskelett verankert, statt direkt mit den Connexinen zu interagieren.

Die lichtmikroskopische Analyse von ZO-1 und Cx57 im Rahmen der hier vorliegenden Studie zeigte eine Kolokalisation dieser Proteine. Die Struktur der großen Connexin-*plaques* im Kaninchen und die ultrastrukturellen Resultate von Janssen-Bienhold et al. (2009) legen jedoch nahe, dass die hier in der Maus gefundene Kolokalisation von ZO-1 und Cx57 bloß auf die geringe Größe der *gap junctions* bzw. auf die dafür mangelnde Auflösung der konfokalen Mikroskopie zurückzuführen ist. ZO-1 könnte demnach auch an den anderen, kleineren *gap junctions* diese *tight-/adherens-junction*-ähnlichen Strukturen ausbilden, statt ausschließlich mit den Connexinen zu interagieren.

Neben den vorgenannten Befunden spricht besonders im Falle von Cx57 ein weiteres Argument für diese Hypothese. Als MAGUK-Protein besitzt ZO-1 drei PDZ-Domänen⁵⁰ (Übersichtsartikel von González-Mariscal et al., 2000), durch welche es mit verschiedenen Connexinen interagieren kann (Li et al., 2004; Flores et al., 2008; Übersichtsartikel von Giepmans, 2004). Im Gegensatz zu anderen Connexinen besitzt Cx57 allerdings kein PDZ-Bindemotiv (Ciolofoan et al., 2007), was einer direkten Interaktion mit ZO-1 im klassischen Sinne widerspricht.

Die Befunde aus Versuchen mit der *Cx36-knock-out*-Maus können nur unter bestimmten Voraussetzungen die Hypothese einer Funktion von ZO-1 als *tight-* oder *adherens-junction*-Protein an *gap junctions* unterstützen. Färbungen von ZO-1 an Retinae dieser Tiere ergaben qualitativ keinen offensichtlichen Unterschied zu wildtypischen Gewebe, obwohl in der OPL alle Cx36-immunreaktiven Punkte mit ZO-1 kolokalisiert waren. Bei einer direkten Interaktion von ZO-1 und Cx36 wäre in den *knock-out*-Mäusen eine

⁵⁰ Bindestellen für Protein-Protein-Interaktionen; benannt nach den Proteinen, in welchen sie urspr. entdeckt wurden: PSD-95, Discs large und ZO-1.

offensichtliche Änderung im Expressionsmuster von ZO-1 zu erwarten gewesen. Das Ausbleiben dieser Änderung könnte zur Ursache haben, dass ZO-1 eben auch an den *gap junctions* mit Cx36 eine andere Funktion erfüllt, als die Connexine direkt mit dem Zytoskelett zu verankern. Jedoch wird Cx36 nur auf Seite der Zapfenendfüßchen exprimiert, und es bleibt ungeklärt, ob ZO-1 in der äußeren OPL nicht eventuell von den Stäbchenterminalien exprimiert wird und dort gegebenenfalls mit einem bislang unbekanntem Connexin assoziiert ist.

ZO-1 fällt auch unterhalb des Zapfenendfüßchens mit Cx36 zusammen. Eine Änderung der ZO-1-Immunreaktion in diesen Bereichen der Cx36-*knock-out*-Maus könnte auf Grund der vergleichsweise geringen Zahl dieser *gap junctions* nicht so offensichtlich gewesen sein. Möglicherweise kann eine Doppelfärbung von ZO-1 und Cx57 in der Cx36-*knock-out*-Maus zeigen, ob alle „übrigen“ ZO-1-Punkte mit Cx57 kolokalisiert sind.

Eine weitere mögliche Erklärung der unveränderten ZO-1-Lokalisation könnte ein „unvollständiger“ *knock-out* von Cx36 in diesem Tier sein. In diesem Falle könnten immer noch Teilstücke des Connexins exprimiert werden, die zwar funktionslos sind und nicht mehr von Antikörpern erkannt werden können – aber trotzdem noch (durch Erhaltung des PDZ-Bindemotivs) die Fähigkeit zur Interaktion mit ZO-1 besitzen.

Eine Assoziation von ZO-1 und Cx36 wurde mit immunhistochemischen und proteinbiochemischen Methoden an retinalem Mausgewebe gezeigt (Ciolofan et al., 2006, 2007). Die ältere Studie beinhaltet ebenfalls die Untersuchung von ZO-1 in Retinae von Cx36-*knock-out*-Mäusen. In der IPL wurde dort eine leichte Verminderung von ZO-1 festgestellt, allerdings eine auffällig stärkere von ZO-2. Dieses Protein ist eine weitere von insgesamt drei ZO-Isoformen, welche in der inneren Retina exprimiert wird und dort mit ZO-1 und Cx36 assoziiert ist (Ciolofan et al., 2006). In der OPL konnte hingegen eine deutliche Reduktion von ZONAB⁵¹ dokumentiert werden, welches dort mit ZO-1 und Cx36 zusammenfällt. Diese Ergebnisse weisen eher auf eine Interaktion von ZO-2 und ZONAB mit den Connexinen hin, anstelle von ZO-1 als direkten Interaktionspartner. Dass trotzdem eine Bindung zwischen ZO-1 und Cx36 gezeigt werden konnte, mag auf unterschiedliche Funktionen von ZO-1 in der Retina zurückzuführen sein. Dafür könnte die Tatsache sprechen, dass in der IPL eine schwache Reduktion der ZO-1-gefärbten Punkte bei Experimenten mit der Cx36-*knock-out*-Maus vorlag. Außerdem erscheint auch im Kaninchen an den großen *plaques* das Cx50 an den äußeren Rändern mit ZO-1 kolokalisiert. Eventuell erfüllt ZO-1 in diesen Grenzbereichen sowohl die Rolle eines

⁵¹ ZO-1-associated nucleic acid-binding protein [engl.] – ZO-1-assoziiertes Nukleinsäure-bindendes Protein

Gerüstproteins für die Connexine und wirkt ebenfalls als Bindeglied zwischen Zytoskelett und Transmembranprotein. Die Möglichkeit besteht auf Grund der Proteinstruktur: ZO-1 kann mit seiner ersten PDZ-Domäne an Cx36 binden (Li et al., 2004), es bindet mit der GUK-Domäne an Occludin und mit dem Prolin-reichen, C-terminalen Abschnitt an Aktinfilamente des Zytoskeletts (Fanning et al., 1998).

Weil nun viele Gründe für die klassische Rolle von ZO-1 als *tight* oder *adherens junction* Protein sprachen, wurde nach einem integralen Membranprotein an den *gap junctions* der Retina gesucht, welches den extrazellulären Kontakt mit der gegenüberliegenden Zelle vermittelt (Abb. 60). Im Gegensatz zu Claudin-1 und E-Cadherin gab es bei der immunhistochemischen Untersuchung von Occludin, dem Transmembranprotein der *tight junctions*, zunächst einen positiven Befund in beiden plexiformen Schichten. Dieser konnte aber nur mit einem der drei verwendeten Antikörper erhalten werden, die sich gegen unterschiedliche Epitope von Occludin richteten. Darüber hinaus zeigten die Occludin-Antikörper bei proteinbiochemischen Untersuchungen im *Western Blot* unspezifische Kreuzreaktionen mit ZO-1. Es ist aber nicht sicher, ob die dort beobachteten Kreuzreaktionen auch wirklich bei immunhistochemischen Färbungen zum Tragen kommen. Zum Beispiel zeigte auch der polyklonale ZO-1-Antikörper viele unspezifische Reaktionen mit leichteren Proteinen als ZO-1 auf der *Blot*-Membran. Lichtmikroskopisch erschien bei seiner Verwendung aber das exakte gleiche Reaktionsmuster wie mit dem monoklonalen ZO-1-Antikörper, der auf dem *Blot* sehr spezifisch nur die ZO-1-Bande detektiert hat. Außerdem zeigte ein Vergleich der Peptidsequenzen von Occludin und ZO-1, dass die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktion der Antikörper eher gering ist. Trotzdem kann durch die mangelnde Konsistenz der Ergebnisse kein endgültiges Urteil über die Occludin-Färbungen in der Retina gefällt werden. Die Frage nach einer konkreten Rolle von ZO-1 an den *gap junctions* bleibt also offen. Aus diesem Grunde sind Experimente mit ZO-1-Färbung zur STED⁵²-mikroskopischen Analyse geplant. Mit einem STED-Mikroskop ist eine Auflösung fluoreszenzgefärbter Strukturen bis weit unter 100 nm möglich (Hell, 2003). Falls die Hypothese einer Formation von *tight* oder *adherens junctions* mit Beteiligung von ZO-1 um *gap junctions* zuträfe, würden sich die ZO-1-gefärbten Punkte unterhalb der Photorezeptorterminalien durch solch ein stark erhöhtes Auflösungsvermögen gegebenenfalls als Ringe bzw. als Zaun-ähnliche Strukturen

⁵² stimulated emission depletion [engl.] – stimulierte Emissionsunterdrückung

darstellen lassen – analog zu ZO-1 an den Connexin-*plaques* der A-Typ Horizontalzellen des Kaninchens.

IV.3.2 Modulation von Horizontalzellen

Bereits seit einigen Jahren ist für die Primatenretina bekannt, dass ionotrope Glutamatrezeptoren (GluRs) unterhalb der Zapfenendfüßchen an den *desmosome-like junctions* zwischen Horizontalzellen exprimiert werden (Haverkamp et al., 2000, 2001a, 2001b). Obwohl eine modulatorische Rolle dieser Rezeptoren vermutet wurde, konnte sie bislang noch nicht bestätigt werden. Zwischenzeitlich wurde die Anhäufung von GluRs auch unterhalb der Zapfenendfüßchen in der Kaninchenretina gefunden (Pan und Massey, 2007), und sie konnte in der hier vorliegenden Studie in der Mausretina gezeigt werden. Die Expression von GluRs durch Horizontalzellen unterhalb der Zapfenendfüßchen – zusätzlich zu der „üblichen“ Lage von GluRs auf ihren dendritischen Spitzen in den Invaginationen – scheint demnach ein Phänomen zu sein, welches die Horizontalzellen vieler, wenn nicht aller Säugetiere auszeichnet.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die GluRs der *desmosome-like junctions* sehr eng mit den *gap junctions* der Horizontalzellen assoziiert sind. Dabei ist es unwahrscheinlich, dass die *gap junctions* an diesen Stellen eher zufällig durch das bloße Aufeinandertreffen der Horizontalzellendendriten ausgebildet werden. In der Makaken- und Kaninchenretina wurden *gap junctions* bzw. ZO-1 auch an Kreuzungen der Primärdendriten von Horizontalzellen gefunden. In der Mausretina existiert kein Hinweis auf *gap junctions* an solchen Kontaktpunkten der Primärdendriten. Letztere müssten durch das extrem dichte Netzwerk der Horizontalzellendendriten in diesem Tier dennoch in großer Zahl vorhanden sein. Darüber hinaus ist das Netzwerk der H1 Horizontalzellen im Primaten ähnlich dicht – trotzdem wurde ZO-1 nur an vergleichsweise wenigen Stellen außerhalb der Bereiche des Zapfenendfüßchens nachgewiesen.

Die Bedeutung dieser räumlichen Korrelation von GluRs und Connexinen erschließt sich leider nicht aus den hier durchgeführten Experimenten. Jedoch ist das Auftreten so eng assoziierter chemischer und elektrischer Synapsen auf ein und demselben Zellfortsatz aus anderen neuronalen Systemen bekannt. So treten zum Beispiel gemischte Synapsen aus Cx35 und NMDA⁵³-Rezeptoren auf den Mauthnerzellen von Knochenfischen auf

⁵³ N-Methyl-D-Aspartat

(Übersichtsartikel von Pereda et al., 2004). Die elektrische Leitfähigkeit wird dort cAMP⁵⁴-abhängig durch Dopamin oder Calcium-abhängig durch die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren moduliert. Solche Synapsen wurden ebenfalls im Rückenmark und in der unteren Olive der *Medulla oblongata* identifiziert (Rash et al., 1996).

Diese Studien im Zusammenhang mit den hier gezeigten Ergebnissen legen den Schluss nahe, dass die Leitfähigkeit der *gap junctions* von Horizontalzellen neben Dopamin ebenfalls durch die Aktivierung der GluRs moduliert werden kann. Das Horizontalzellennetzwerk reagiert auf das Umgebungslicht auf dreierlei Weise: bei hoher und niedriger Lichtintensität wird die interzelluläre Kopplung reduziert, während sie bei mittleren Intensitäten am stärksten ist (Xin und Bloomfield, 1999). Einer der wichtigsten Botenstoffe für die Modulation dieser Kopplung ist Dopamin (Übersichtsartikel von Weiler et al., 2000). Dopamin wird durch Amakrinzellen ausgeschüttet und aktiviert auf parakrinem Wege in der OPL die D₁-Rezeptoren der Horizontalzellen, wodurch in der Zelle vermehrt cAMP synthetisiert wird. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung der Connexine durch Proteinkinase A und damit zur Herabsetzung der elektrischen Leitfähigkeit der *gap junction* (Piccolino et al., 1984; Lasater, 1987; Hampson et al., 1994; McMahon, 1994; He et al., 2000).

Dopamin wird in der Retina bei Belichtung ausgeschüttet (Weiler et al., 1997). Die hier aufgezeigte Möglichkeit der Leitfähigkeitsänderung von *gap junctions* zwischen Horizontalzellen durch Glutamat bzw. Calcium könnte einen Modulationsmechanismus bei Dunkelheit beschreiben, der diese Lücke schließt.

Bei einer Depolarisation in Dunkelheit tritt Calcium durch AMPA-Rezeptoren und spannungsgesteuerte Calciumkanäle in die Horizontalzellen ein (Solessio und Lasater, 2002; Schubert et al., 2006), wobei die Wirksamkeit des einströmenden Calciums bislang ungeklärt ist. Spray et al. (1982) berichteten von Calciumkonzentrationen, die mit 40 bis 400 µM weit über dem physiologischen Normalwert lagen, bevor sie auf die Leitfähigkeit von *gap junctions* wirken konnten. Außerdem waren *gap junctions* zwischen Horizontalzellen des Katzenfisches unempfindlich für Calciumkonzentrationen im physiologischen Bereich von 100 bis 700 nM (DeVries und Schwartz, 1989). Im Gegensatz dazu zeigten Studien von Lazrak und Peracchia (1993) an Tumorzellen eine Änderung der elektrischen Kopplung bereits bei einer Calciumkonzentration von nur 500 nM. Zudem würde das geringe Volumen der Horizontalzellendendriten unterhalb des Zapfenendfüßchens zu einer wenigstens kurzzeitig starken Erhöhung der

⁵⁴ zyklisches (cyclic [engl.]) Adenosinmonophosphat

Calciumkonzentration in diesen Bereichen führen, bevor durch die Calcium-bindenden Proteine wieder eine Homöostase in der Zelle hergestellt werden kann. Darüber hinaus gibt es neuere Befunde, welche die Regulation der Permeabilität von Cx43 durch Calcium und Calmodulin in HeLa-Zellen beweisen (Lurtz und Luis, 2007).

Neben dem Einfluss von Dopamin und anderen Botenstoffen, könnte die enge Nachbarschaft der chemischen und elektrischen Synapsen unterhalb der Zapfenendfüßchen also ebenfalls zu einer Modulation der Kopplung von Horizontalzellen führen und diese zweite Expressionsebene von GluRs erklären.

Pan und Massey (2007) konnten im Kaninchen zeigen, dass auch unterhalb der Invaginationen von Stäbchenterminalien ionotrope GluRs auf den Axonterminalien der Horizontalzellen liegen. Falls auch die *gap junctions* der Axonterminalien der zuvor beschriebenen Modulation durch Calcium unterliegen, könnte der Befund einer engen Assoziation dieser GluRs mit den Connexinen die zuvor aufgestellte Hypothese unterstützen. Die geplanten Doppelfärbungen von GluR3 und Cx57 (das Connexin der B-Typ-Axonterminalien im Kaninchen) werden darüber voraussichtlich genaueren Aufschluss erbringen.

Durch die Untersuchung der GluR-Untereinheiten unterhalb des Zapfenendfüßchens in der Makakenretina wurde festgestellt, dass auf der Höhe der *desmosome-like junctions* die analysierten AMPA-Rezeptoren (GluR2/3, GluR3 und GluR4) sowie die dort exprimierte Kainat-Untereinheiten GluR6/7 zusammenfielen. Darüber hinaus erschienen GluR6/7-immunreaktive Punkte, welche nicht mit AMPA-Rezeptoren (-Rs) zusammenlagen. Diese waren hauptsächlich der Expression durch OFF-Bipolarzellen an den flachen Kontakten am Zapfenendfüßchen zuzuordnen. Außerdem wurden GluR3-immunreaktive Punkte unterhalb des Zapfenendfüßchens gefunden, die ihrerseits wiederum nicht mit GluR6/7 zusammenfielen – höchstwahrscheinlich auf Grund ihrer Expression durch H2 Horizontalzellen, welche GluR2/3 und GluR4, aber kein GluR6/7 auf ihren Dendriten tragen (Haverkamp et al., 2001b).

In Neuronen ist eine Koexpression von AMPA- und Kainat-Rs nicht ungewöhnlich und wurde bereits durch elektrophysiologische, proteinbiochemische sowie molekularbiologische Methoden nachgewiesen (Übersichtsartikel von Ozawa et al., 1998; Dingledine et al., 1999). Die konkrete Kolokalisation von AMPA- und Kainat-Rs in denselben synaptischen Zellfortsätzen wurde bislang aber noch nicht dokumentiert (vgl. z.B. Vickers et al., 1993). Besonders interessant daran ist, dass H1 Horizontalzellen der Primatenretina

ausschließlich AMPA-Rs auf ihren dendritischen Spitzen tragen – an den *desmosome-like junctions* exprimieren sie jedoch sowohl AMPA- als auch Kainat-R (Haverkamp et al., 2001a, b), welche jetzt in kolokalisierter Position gezeigt wurden. Dieses spezielle Expressionsmuster könnte gegebenenfalls durch den Mechanismus des GluR-vermittelten Calciumeinstroms an den *desmosome-like junctions* erklärt werden. Es ist bekannt, dass die Beteiligung von Q/R-editiertem GluR2 bei der Bildung (homo- bzw.) hetero-tetramerer AMPA-Rs die Calcium-Leitfähigkeit solcher Kanäle extrem herabsetzt (Hollmann et al., 1991; Burnashev et al., 1992). Die zusätzliche Expression von Kainat-Rs mit GluR6 könnte diese Herabsetzung kompensieren und für einen verstärkten Calcium-Einstrom sorgen. Es existieren auch GluR6-Isoformen, deren Calcium-Leitfähigkeit nach dem gleichen Prinzip wie im Falle von GluR2 herabgesetzt wird (Egebjerg und Heinemann, 1993; Köhler et al., 1993). GluR6 besitzt jedoch in beiden Formen eine bei weitem höhere Calcium-Leitfähigkeit als AMPA-Rs mit GluR2 (Übersichtsartikel von Ozawa et al., 1998). Untersuchungen an Horizontalzellen der Mausretina belegten tatsächlich eine Beteiligung von Kainat-Rs am Calcium-Einstrom in die Zellen (Schubert et al., 2006). Der dort durch Kainat-Rs vermittelte Anteil am Calcium-Strom war geringer als der von AMPA-Rs, was eventuell auf die vergleichsweise kleine Menge der exprimierten Rezeptoruntereinheiten zurückzuführen ist. Die immunzytochemisch nachweisbare Menge der exprimierten Kainat-Rs von Horizontalzellen der murinen Retina ist weitaus kleiner als bei H1 Zellen im Primaten (vgl. *Maus/Ratte*: Brandstätter et al., 1997; Haverkamp und Wässle, 2000; *Makake/Marmoset*: Haverkamp et al., 2001b; Puller et al., 2007). Deshalb ist zu erwarten, dass der Effekt des Calcium-Einstroms durch Kainat-Rs im Primaten noch größere Wirkung besitzt.

Sollte die Hypothese einer gezielten Verstärkung des Calcium-Einstroms an den *desmosome-like junctions* zur Modulation der *gap junctions* von H1 Horizontalzellen zutreffen, so hätte dies zur logischen Konsequenz, dass H2 Zellen von so einem Mechanismus weniger stark betroffen oder gar gänzlich ausgeschlossen sind. Wie zuvor erwähnt exprimieren sie keine der immunzytochemisch erkennbaren Kainat-Rs (Haverkamp et al., 2001b).

Bei der Betrachtung der ZO-1-Expression durch Horizontalzellen fällt außerdem auf, dass dieses Protein nicht nur typspezifisch verteilt ist, sondern auch auf die dendrodendritischen *gap junctions* beschränkt ist. Dieses Phänomen ist sogar in der Mausretina zu beobachten, obwohl die *gap junctions* der Dendriten und die der Axonterminalien von ein

und demselben Connexin gebildet werden. Interessanterweise wurde an Horizontalzellen der Goldfischretina nachgewiesen, dass sich der Effekt von Dopamin auf die Connexin-Dichte zwischen Dendriten und Axonterminalien unterscheidet (Baldrige et al., 1987). Durch die Dopamin-Applikation sank die Zahl der Connexine dendro-dendritischer *gap junctions* in einem hohen Maße, während die axo-axonalen *gap junctions* weniger stark beeinträchtigt wurden. Zudem wurde kürzlich an vaskulären Endothelzellen gezeigt, dass Dopamin die Permeabilität von *tight junctions* mit Occludin und ZO-1 beeinflussen kann (Bhattacharya et al., 2008).

In ihrer Gesamtheit deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ZO-1 nicht nur zur strukturellen Integrität der *gap junction* dient. Eventuell spielt dieses Protein auch eine Rolle bei der Steuerung der *gap junctions* durch Dopamin.

IV.4 Protocadherin β 16

Die Familie der Cadherine ist an der Formation von *adherens junctions* zwischen Zellen beteiligt und sorgt dadurch für strukturelle Integrität und Polarisation von Zellen in Gewebeverbänden. Darüber hinaus spielen Cadherine eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung neuronaler Netzwerke. Es wird angenommen, dass einer der größten Unterfamilien der Cadherine, den Protocadherinen, besonders im zentralen Nervensystem dafür eine besondere Bedeutung zukommt. Die Protocadherine der Gruppen α , β , γ und δ besitzen durch ihre Funktion als Zelloberflächen-Adhäsionsmoleküle und ihrer großen Vielfalt mit über 70 Genen die nötigen Voraussetzungen, um für die Spezifität eines so komplexen Netzwerks zu sorgen (Übersichtsartikel von Hilschmann et al., 2001; Frank und Kemler, 2002). Zudem mehren sich Hinweise auf eine Beteiligung der Protocadherine nicht bloß an der Formation Zelltyp-spezifischer Netzwerke, sondern auch ganz direkt an der Ausbildung und Erhaltung neuronaler Synapsen (Übersichtsartikel von Brusés, 2000; Benson et al., 2001).

Vor kurzem konnte in der Säugetierretina erstmals ein an spezifischen Synapsen lokalisiertes Protocadherin nachgewiesen werden. Protocadherin β 16 (Pcdh β 16) wurde in der adulten Mausretina an Synapsen in der IPL und in den inneren und äußeren Segmenten der Photorezeptoren gefunden. Zudem konnte es in der OPL auf den invaginierenden Fortsätzen von Horizontalzellen und an flachen Kontakten am Zapfenendfüßchen

nachgewiesen werden (Junghans et al., 2008). In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Analyse der Verteilung von Pcdh β 16 in der OPL der Makakenretina durchgeführt, um die Expression von Pcdh β 16 bestimmten Zelltypen und Synapsen zuordnen zu können.

Die in der Primatenretina erhaltenen Befunde gleichen denen der Mausretina. Entsprechend der Zielsetzung konnte durch die starke Reduktion von Pcdh β 16 am S-Zapfenendfüßchen indirekt festgestellt werden, dass dieses Protein nur von H1 Horizontalzellen exprimiert wird und dementsprechend nicht auf H2 Zellen zu finden ist. Zudem Pcdh β 16 mit den GluRs der H1 Zellen zusammen. Diese Tatsache unterstreicht die sowohl Zelltyp- als auch Synapsen-spezifische Funktion dieses Proteins. Ein funktioneller Zusammenhang mit bestimmten GluR-Untereinheiten scheint allerdings nicht zu bestehen, weil die untersuchten AMPA-Rezeptoren (GluR2/3 und GluR4) von beiden Horizontalzellen exprimiert werden. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Formation der H2 Horizontalzellsynapsen durch ein anderes Pcdh unterstützt bzw. gesteuert wird.

Mittels elektronenmikroskopischer Methoden konnte die Lage von Pcdh β 16 an den flachen Synapsen am Zapfenendfüßchen bestätigt werden. Darüber hinaus zeigten sich die Pcdh β 16-immunreaktiven Spitzen der OFF-Bipolarzellendendriten in Triaden-assoziiierter (TA) Position. Wie zuvor schon erwähnt, existieren in der Primatenretina vier Typen von OFF-Bipolarzellen; drei diffuse Bipolarzellen (DB1 – 3) sowie die FMB (Boycott und Wässle, 1991). FMBs bilden vorwiegend TA-Kontakte am Zapfenendfüßchen aus (Kolb, 1970; Hopkins und Boycott, 1997). Allerdings sind auch die Dendriten der anderen, diffusen Bipolarzellen in TA-Position zu finden. Unter ihnen besitzt wiederum die DB3 verhältnismäßig viele TA-Kontakte zum Zapfenendfüßchen (Hopkins und Boycott, 1997). Die nahezu ausschließliche Lokalisation von Pcdh β 16 in TA-Position ist deshalb ein deutlicher Hinweis auf die Pcdh β 16-Expression durch FMBs oder Bipolarzellen des Typs DB3. Die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 sowie auch große Teile der Kainatrezeptor-Untereinheit GluR6/7 wurden am Zapfenendfüßchen der Primatenretina in TA-Positionen gefunden (Haverkamp et al., 2001a, b; Puller et al., 2007). GluR1 wird dabei (in der Retina des Marmosets) hauptsächlich durch die FMBs exprimiert (Puller et al., 2007). Eine Doppelfärbung von GluR1 und Pcdh β 16 würde deshalb bei einer Kollokalisierung der Proteine die Hypothese der Pcdh β 16-Expression durch FMBs unterstützen. Die Durchführung dieses Experiments war allerdings nicht möglich, weil beide Antikörper aus dem Kaninchen stammen. Ein direkter Beweis der Lokalisation von Pcdh β 16 auf den dendritischen Spitzen der FMBs wäre im Marmoset möglich. Dort lassen sich die FMBs selektiv mit Antikörpern gegen das Kohlenhydrat-Epitop CD15 markieren (Chan et al.,

2001). Im Makaken besteht ebenfalls die Möglichkeit der immunzytochemischen Markierung der FMBs mit Antikörpern gegen das Calcium-bindende Protein Recoverin (Milam et al., 1993; Wässle et al., 1994). Diese Antikörper färben aber gleichzeitig in noch stärkerem Maße die Photorezeptoren, sodass eine Analyse der dendritischen Spitzen von FMBs in Retinae dieser Tiere unmöglich ist.

In der IPL konnte Pcdh β 16 von Junghans et al. (2008) auf prä- und postsynaptischer Seite gezeigt werden. Obwohl an *adherens junctions* bzw. Synapsen zumeist homologe Typen von Protocadherinen miteinander interagieren, wurde Pcdh β 16 in der OPL von Mausretinae (Junghans et al., 2008) und von Makakenretinae (diese Studie) nur auf der postsynaptischen Seite der Photorezeptorterminalien gefunden. Interessant wäre nun die Erforschung der präsynaptischen Protocadherine, die in der OPL mit Pcdh β 16 interagieren und zur Formation der Synapse führen. Als erster Schritt müsste jedoch zunächst die Generierung bzw. Klassifizierung weiterer Antikörper gegen spezifische Pcdh-Untereinheiten erfolgen, von denen bislang leider nur wenige existieren.

Das wohl bekannteste retinale Protocadherin ist Pcdh 15, welches den genetisch nicht geclusterten Protocadherinen zugeordnet wird. Zusammen mit anderen Proteinen, wie z.B. Cadherin 23, dem Gerüstprotein Harmonin und dem Motorprotein Myosin, spielt es eine wichtige Rolle im Krankheitsbild des *Usher-Syndroms* (Übersichtsartikel von Reiners et al., 2006). Bei dieser genetisch bedingten Krankheit kommt es zu einer fehlerhaften Expression der vorgenannten Proteine, was auch zu Störungen des Gleichgewichtssinns und zu Taubheit führt. Darüber hinaus wird eine *Retinitis Pigmentosa* durch das Fehlen der sonst üblichen Interaktion dieser Proteine in Photorezeptoren verursacht. Die eintretende Photorezeptordegeneration ist nicht heilbar und führt zur Blindheit der Patienten.

In der Arbeitsgruppe um Joshua Sanes konnten mit Hilfe unterschiedlicher Mausmodelle Fortschritte in der funktionellen Analyse von γ -Protocadherinen gemacht werden (Wang et al., 2002; Weiner et al., 2005; Lefebvre et al., 2008). Im Rückenmark sowie in der Retina dieser Tiere konnte gezeigt werden, dass die γ -Protocadherine eine entscheidende Rolle für das Überleben der Tiere und die Ausbildung synaptischer Kontakte spielen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen an Pcdh β 16 liefern keinen genaueren Einblick in die Funktion dieses Proteins bzw. der β -Protocadherine. Detaillierte Aussagen ließen sich gegebenenfalls mit Hilfe einer genetisch modifizierten Mauslinie machen, in der die Expression von β -Protocadherinen gestört oder ganz unterbunden ist.

V. Zusammenfassung

In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) der Säugetierretina sind die Photorezeptoren mit den Horizontal- und den Bipolarzellen verschaltet. Diese erste neuronale Verschaltungsebene des Sehsystems birgt eine hochkomplexe Architektur aus chemischen und elektrischen Synapsen. Sie ermöglicht die Modulation des Lichtsignals sowie die Aufspaltung der Signale in parallele Übertragungswege. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden verschiedene Synapsensysteme in der OPL von Maus-, Kaninchen-, und Makakenretinae mittels immunhistochemischer Färbetechniken licht- und elektronenmikroskopisch untersucht.

In der Mausretina wurden die anatomischen Eigenschaften der Endfüßchen blauempfindlicher (S-) Zapfen untersucht. Die S-Zapfenendfüßchen waren um 15 % kleiner als die der M-Zapfen, die Bereiche der Invaginationen am S-Zapfenendfüßchen hingegen um 35 %. Eine deutliche Reduktion der Horizontalzellkontakte ging damit einher. Die Zahl der postsynaptisch von OFF-Bipolarzellen exprimierten Glutamatrezeptor- (GluR) Untereinheiten GluR1 und GluR5 war am S-Zapfenendfüßchen um fast 50 % kleiner als an M-Zapfen. Dieser Befund spiegelte die geringe Anzahl synaptischer Kontakte von OFF-Bipolarzellen am S-Zapfen wider. Die OFF-Bipolarzelltypen 1 und/oder 2 waren für diese Reduktion verantwortlich. Diese Befunde sind ein erster Hinweis für den sogenannten Grün-OFF-Signalweg in der Mausretina.

In der Makakenretina wurde die Verteilung von Protocadherin $\beta 16$ (Pcdh $\beta 16$) untersucht. Es konnte auf postsynaptischer Seite an den Photorezeptorterminalien gezeigt werden. Pcdh $\beta 16$ lag auf den invaginierenden Spitzen von Dendriten der H1 Horizontalzellen sowie an ihren *desmosome-like junctions* unterhalb der Zapfenendfüßchen. An diesen Orten fielen die Pcdh $\beta 16$ -immunreaktiven Punkte mit den dort von H1 Zellen exprimierten GluR-Untereinheiten GluR2 – 4 und GluR6/7 zusammen. Im Zuge dieser Analyse wurde ebenfalls eine Kolo-kalisation dieser AMPA- (GluR2 – 4) und Kainat- (GluR6/7) Rezeptoren an *den desmosome-like junctions* festgestellt. Darüber hinaus zeigte eine elektronenmikroskopische Untersuchung, dass Pcdh $\beta 16$ auch an flachen Synapsen in Triaden-assoziiierter Position am Zapfenendfüßchen zu finden ist. Dies kann als Hinweis auf eine Expression durch *flat midget* Bipolarzellen oder Bipolarzellen des Typs DB3

gewertet werden. Dies lässt vermuten, dass dieses Protein an der Formation zelltypspezifischer Kontakte bzw. Synapsen beteiligt ist.

In einer vergleichenden Studie der synaptischen Verteilung des zytoplasmatischen Gerüstproteins Zonula Occludens-1 (ZO-1) in Makaken-, Kaninchen- und Mausretinae zeigte sich ein sehr einheitliches sowie auch zelltypspezifisches Verteilungsmuster. ZO-1 fiel bei allen Spezies mit Connexin 36 (Cx36) an den *gap junctions* zwischen Photorezeptorterminalien und zwischen den Dendriten von OFF-Bipolarzellen zusammen. Außerdem ist ZO-1 mit *gap junctions* bestimmter Horizontalzellen assoziiert: In der OPL der Kaninchenretina fiel es mit Cx50 zusammen, dem Connexin der axonlosen A-Typ Horizontalzellen. An den großen *gap junctions* zwischen den Primärdendriten dieser Zellen bildete ZO-1 jedoch eine Zaun-ähnliche Struktur als Abgrenzung um die *gap junctions* herum, anstatt direkt mit den Connexinen kolokalisiert zu sein. Eine direkte Interaktion mit den Connexinen wird durch die räumliche Anordnung weitgehend ausgeschlossen, was auf eine Funktion von ZO-1 als *tight-* oder *adherens junction* Protein hindeutet. In der Mausretina fiel ZO-1 mit Cx57 an dendro-dendritischen *gap junctions* zwischen den Maus-Horizontalzellen zusammen. In der Makakenretina sind die Connexine der Horizontalzellen noch nicht bekannt. Trotzdem ließ sich ZO-1 den dendro-dendritischen *gap junctions* zwischen H1 Horizontalzellen zuordnen.

Darüber hinaus zeigte sich eine enge Assoziation dieser dendro-dendritischen *gap junctions* mit den GluRs unterhalb der Zapfenendfüßchen an den *desmosome-like junctions*. Der von den GluRs ermöglichte Calcium-Einstrom könnte sich durch die räumliche Nähe zu den Connexinen modulierend auf die Leitfähigkeit der elektrischen Synapsen auswirken.

Literaturverzeichnis

- Ahnelt P, Keri C, Kolb H (1990)** Identification of pedicles of putative blue-sensitive cones in the human retina. *J Comp Neurol* 293:39-53.
- Ahnelt P, Kolb H (1994a)** Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: a Golgi-electron microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol* 343:406-427.
- Ahnelt P, Kolb H (1994b)** Horizontal cells and cone photoreceptors in primate retina: a Golgi-light microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol* 343:387-405.
- Baldrige WH, Ball AK, Miller RG (1987)** Dopaminergic regulation of horizontal cell gap junction particle density in goldfish retina. *J Comp Neurol* 265:428-436.
- Benson DL, Colman DR, Huntley GW (2001)** Molecules, maps and synapse specificity. *Nat Rev Neurosci* 2:899-909.
- Berglund K, Schleich W, Krieger P, Loo LS, Wang D, Cant NB, Feng G, Augustine GJ, Kuner T (2006)** Imaging synaptic inhibition in transgenic mice expressing the chloride indicator, Clomeleon. *Brain Cell Biol* 35:207-228.
- Bhattacharya R, Sinha S, Yang SP, Patra C, Dutta S, Wang E, Mukhopadhyay D (2008)** The neurotransmitter dopamine modulates vascular permeability in the endothelium. *J Mol Signal* 3:14.
- Blanks JC, Johnson LV (1983)** Selective lectin binding of the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 221:31-41.
- Bloomfield SA, Miller RF (1982)** A physiological and morphological study of the horizontal cell types of the rabbit retina. *J Comp Neurol* 208:288-303.
- Bloomfield SA, Xin D, Persky SE (1995)** A comparison of receptive field and tracer coupling size of horizontal cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 12:985-999.
- Boycott B, Wässle H (1999)** Parallel processing in the mammalian retina: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1313-1327.
- Boycott BB (1988)** Horizontal cells of mammalian retinae. *Neurosci Res Suppl* 8:97-111.
- Boycott BB, Hopkins JM (1993)** Cone synapses of a flat diffuse cone bipolar cell in the primate retina. *J Neurocytol* 22:765-778.
- Boycott BB, Wässle H (1991)** Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur J Neurosci* 3:1069-1088.
- Brandstätter JH, Hack I (2001)** Localization of glutamate receptors at a complex synapse. The mammalian photoreceptor synapse. *Cell Tissue Res* 303:1-14.
- Brandstätter JH, Koulen P, Wässle H (1997)** Selective synaptic distribution of kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina. *J Neurosci* 17:9298-9307.
- Briggman KL, Denk W (2006)** Towards neural circuit reconstruction with volume electron microscopy techniques. *Curr Opin Neurobiol* 16:562-570.
- Brusés JL (2000)** Cadherin-mediated adhesion at the interneuronal synapse. *Curr Opin Cell Biol* 12:593-597.
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992)** Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189-198.

- Burns ME, Baylor DA (2001)** Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu Rev Neurosci* 24:779-805.
- Calkins DJ (2001)** Seeing with S cones. *Prog Retin Eye Res* 20:255-287.
- Calkins DJ, Tsukamoto Y, Sterling P (1996)** Foveal cones form basal as well as invaginating junctions with diffuse ON bipolar cells. *Vision Res* 36:3373-3381.
- Calkins DJ, Tsukamoto Y, Sterling P (1998)** Microcircuitry and mosaic of a blue-yellow ganglion cell in the primate retina. *J Neurosci* 18:3373-3385.
- Campbell M, Humphries M, Kennan A, Kenna P, Humphries P, Brankin B (2006)** Aberrant retinal tight junction and adherens junction protein expression in an animal model of autosomal dominant Retinitis pigmentosa: the Rho(-/-) mouse. *Exp Eye Res* 83:484-492.
- Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Appeltauer U, Takei K, Kindler S, Veh RW, De Camilli P, Gundelfinger ED, Garner CC (1996)** Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur J Cell Biol* 69:214-223.
- Cha J, Pan F, Massey SC, Chun MH, Kim IB (2008)** An electron microscopic study of connexin 50 and 57 in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: E-Abstract 3047.
- Chan TL, Grünert U (1998)** Horizontal cell connections with short wavelength-sensitive cones in the retina: a comparison between New World and Old World primates. *J Comp Neurol* 393:196-209.
- Chan TL, Martin PR, Clunas N, Grünert U (2001)** Bipolar cell diversity in the primate retina: morphologic and immunocytochemical analysis of a new world monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. *J Comp Neurol* 437:219-239.
- Chang B, Heckenlively JR, Bayley PR, Brecha NC, Davisson MT, Hawes NL, Hirano AA, Hurd RE, Ikeda A, Johnson BA, McCall MA, Morgans CW, Nusinowitz S, Peachey NS, Rice DS, Vessey KA, Gregg RG (2006)** The nob2 mouse, a null mutation in *Cacna1f*: anatomical and functional abnormalities in the outer retina and their consequences on ganglion cell visual responses. *Vis Neurosci* 23:11-24.
- Chun MH, Grünert U, Martin PR, Wässle H (1996)** The synaptic complex of cones in the fovea and in the periphery of the macaque monkey retina. *Vision Res* 36:3383-3395.
- Ciolofan C, Li XB, Olson C, Kamasawa N, Gebhardt BR, Yasumura T, Morita M, Rash JE, Nagy JI (2006)** Association of connexin36 and zonula occludens-1 with zonula occludens-2 and the transcription factor zonula occludens-1-associated nucleic acid-binding protein at neuronal gap junctions in rodent retina. *Neuroscience* 140:433-451.
- Ciolofan C, Lynn BD, Wellershaus K, Willecke K, Nagy JI (2007)** Spatial relationships of connexin36, connexin57 and zonula occludens-1 in the outer plexiform layer of mouse retina. *Neuroscience* 148:473-488.
- Cohen E, Sterling P (1990)** Convergence and divergence of cones onto bipolar cells in the central area of cat retina. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 330:323-328.
- Dacey DM (1993)** Morphology of a small-field bistratified ganglion cell type in the macaque and human retina. *Vis Neurosci* 10:1081-1098.
- Dacey DM (1999)** Primate retina: cell types, circuits and color opponency. *Prog Retin Eye Res* 18:737-763.
- Dacey DM (2000)** Parallel pathways for spectral coding in primate retina. *Annu Rev Neurosci* 23:743-775.
- Dacey DM, Lee BB (1994)** The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature* 367:731-735.

- Dacey DM, Lee BB, Stafford DK, Pokorny J, Smith VC (1996)** Horizontal cells of the primate retina: cone specificity without spectral opponency. *Science* 271:656-659.
- Dacey DM, Packer OS (2003)** Colour coding in the primate retina: diverse cell types and cone-specific circuitry. *Curr Opin Neurobiol* 13:421-427.
- Dacheux RF, Raviola E (1982)** Horizontal cells in the retina of the rabbit. *J Neurosci* 2:1486-1493.
- Davenport CM, Detwiler PB, Dacey DM (2008)** Effects of pH buffering on horizontal and ganglion cell light responses in primate retina: evidence for the proton hypothesis of surround formation. *J Neurosci* 28:456-464.
- de Monasterio FM, McCrane EP, Newlander JK, Schein SJ (1985)** Density profile of blue-sensitive cones along the horizontal meridian of macaque retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:289-302.
- Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL (2002)** Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* 36:703-712.
- Dedek K, Pandarinath C, Alam NM, Wellershaus K, Schubert T, Willecke K, Prusky GT, Weiler R, Nirenberg S (2008)** Ganglion cell adaptability: does the coupling of horizontal cells play a role? *PLoS ONE* 3:e1714.
- Dedek K, Schultz K, Pieper M, Dirks P, Maxeiner S, Willecke K, Weiler R, Janssen-Bienhold U (2006)** Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 24:1675-1686.
- Deng Q, Wang L, Dong W, He S (2006)** Lateral components in the cone terminals of the rabbit retina: horizontal cell origin and glutamate receptor expression. *J Comp Neurol* 496:698-705.
- DeVries SH (2000)** Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron* 28:847-856.
- DeVries SH, Li W, Saszik S (2006)** Parallel processing in two transmitter microenvironments at the cone photoreceptor synapse. *Neuron* 50:735-748.
- DeVries SH, Schwartz EA (1989)** Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J Physiol* 414:351-375.
- Dick O, Hack I, Altrrock WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2001)** Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *J Comp Neurol* 439:224-234.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999)** The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dowling JE, Boycott BB (1966)** Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 166:80-111.
- Dübel J, Haverkamp S, Schleich W, Feng G, Augustine GJ, Kuner T, Euler T (2006)** Two-photon imaging reveals somatodendritic chloride gradient in retinal ON-type bipolar cells expressing the biosensor Clomeleon. *Neuron* 49:81-94.
- Egebjerg J, Heinemann SF (1993)** Ca²⁺ permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:755-759.
- Ekesten B, Gouras P (2005)** Cone and rod inputs to murine retinal ganglion cells: evidence of cone opsin specific channels. *Vis Neurosci* 22:893-903.
- Enz R, Brandstätter JH, Wässle H, Bormann J (1996)** Immunocytochemical localization of the GABA_A receptor rho subunits in the mammalian retina. *J Neurosci* 16:4479-4490.

- Euler T, Hausselt SE, Margolis DJ, Breuninger T, Castell X, Detwiler PB, Denk W (2008)** Eyecup scope-optical recordings of light stimulus-evoked fluorescence signals in the retina. *Pflüger's Arch/Europ J Physiol* DOI 10.1007/s00424-008-0603-5
- Euler T, Wässle H (1995)** Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361:461-478.
- Famiglietti EV Jr. (1981)** Functional architecture of cone bipolar cells in mammalian retina. *Vision Res* 21:1559-1563.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM (1998)** The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273:29745-29753.
- Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Söhl G, Willecke K, Ammermüller J, Weiler R (2004)** Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *J Neurosci* 24:3325-3334.
- Feigenspan A, Teubner B, Willecke K, Weiler R (2001)** Expression of neuronal connexin36 in AII amacrine cells of the mammalian retina. *J Neurosci* 21:230-239.
- Fenster SD, Chung WJ, Zhai R, Cases-Langhoff C, Voss B, Garner AM, Kaempf U, Kindler S, Gundelfinger ED, Garner CC (2000)** Piccolo, a presynaptic zinc finger protein structurally related to bassoon. *Neuron* 25:203-214.
- Field GD, Chichilnisky EJ (2007)** Information processing in the primate retina: circuitry and coding. *Annu Rev Neurosci* 30:1-30.
- Field GD, Sher A, Gauthier JL, Greschner M, Shlens J, Litke AM, Chichilnisky EJ (2007)** Spatial properties and functional organization of small bistratified ganglion cells in primate retina. *J Neurosci* 27:13261-13272.
- Flores CE, Li X, Bennett MV, Nagy JI, Pereda AE (2008)** Interaction between connexin35 and zonula occludens-1 and its potential role in the regulation of electrical synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12545-12550.
- Frank M, Kemler R (2002)** Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14:557-562.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. (1993)** Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788.
- Gaitan Y, Bouchard M (2006)** Expression of the delta-protocadherin gene Pcdh19 in the developing mouse embryo. *Gene Expr Patterns* 6:893-899.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H (2004)** Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469:70-82.
- Ghosh KK, Grünert U (1999)** Synaptic input to small bistratified (blue-ON) ganglion cells in the retina of a new world monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. *J Comp Neurol* 413:417-428.
- Ghosh KK, Martin PR, Grünert U (1997)** Morphological analysis of the blue cone pathway in the retina of a New World monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*. *J Comp Neurol* 379:211-225.
- Giepmans BN (2004)** Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62:233-245.
- González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A (2000)** MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11:315-324.
- Goodchild AK, Chan TL, Grünert U (1996)** Horizontal cell connections with short-wavelength-sensitive cones in macaque monkey retina. *Vis Neurosci* 13:833-845.

- Güldenagel M, Ammermüller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Söhl G, Willecke K, Weiler R (2001)** Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J Neurosci* 21:6036-6044.
- Güldenagel M, Söhl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K (2000)** Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *J Comp Neurol* 425:193-201.
- Hack I, Frech M, Dick O, Peichl L, Brandstätter JH (2001)** Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina. *Eur J Neurosci* 13:15-24.
- Hack I, Peichl L (1999)** Horizontal cells of the rabbit retina are non-selectively connected to the cones. *Eur J Neurosci* 11:2261-2274.
- Hampson EC, Weiler R, Vaney DI (1994)** pH-gated dopaminergic modulation of horizontal cell gap junctions in mammalian retina. *Proc Biol Sci* 255:67-72.
- Han Y, Massey SC (2005)** Electrical synapses in retinal ON cone bipolar cells: subtype-specific expression of connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13313-13318
- Hartsock A, Nelson WJ (2008)** Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778:660-669.
- Haverkamp S, Ghosh KK, Hirano AA, Wässle H (2003)** Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *J Comp Neurol* 455:463-476.
- Haverkamp S, Grünert U, Wässle H (2000)** The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron* 27:85-95.
- Haverkamp S, Grünert U, Wässle H (2001a)** The synaptic architecture of AMPA receptors at the cone pedicle of the primate retina. *J Neurosci* 21:2488-2500.
- Haverkamp S, Grünert U, Wässle H (2001b)** Localization of kainate receptors at the cone pedicles of the primate retina. *J Comp Neurol* 436:471-486.
- Haverkamp S, Specht D, Majumdar S, Zaidi NF, Brandstätter JH, Wasco W, Wässle H, Tom Dieck S (2008)** Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calsenilin and contact cones as well as rods. *J Comp Neurol* 507:1087-1101.
- Haverkamp S, Wässle H (2000)** Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424:1-23.
- Haverkamp S, Wässle H, Duebel J, Kuner T, Augustine GJ, Feng G, Euler T (2005)** The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. *J Neurosci* 25:5438-5445.
- He S, Weiler R, Vaney DI (2000)** Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 418:33-40.
- Hell SW (2003)** Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* 21:1347-1355.
- Hidaka S, Akahori Y, Kurosawa Y (2004)** Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *J Neurosci* 24:10553-10567.
- Hilschmann N, Barnikol HU, Barnikol-Watanabe S, Götz H, Kratzin H, Thinnies FP (2001)** The immunoglobulin-like genetic predetermination of the brain: the protocadherins, blueprint of the neuronal network. *Naturwissenschaften* 88:2-12.
- Hirano AA, Brandstätter JH, Vila A, Brecha NC (2007)** Robust syntaxin-4 immunoreactivity in mammalian horizontal cell processes. *Vis Neurosci* 24:489-502.
- Hirano S, Wang X, Suzuki ST (2002)** Restricted expression of protocadherin 2A in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 98:119-123.

- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991)** Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büsow 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.
- Hopkins JM, Boycott BB (1996)** The cone synapses of DB1 diffuse, DB6 diffuse and invaginating midget, bipolar cells of a primate retina. *J Neurocytol* 25:381-390.
- Hopkins JM, Boycott BB (1997)** The cone synapses of cone bipolar cells of primate retina. *J Neurocytol* 26:313-325.
- Huang L, Max M, Margolskee RF, Su H, Masland RH, Euler T (2003)** G protein subunit G gamma 13 is coexpressed with G alpha o, G beta 3, and G beta 4 in retinal ON bipolar cells. *J Comp Neurol* 455:1-10.
- Jahn R, Scheller RH (2006)** SNAREs - engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631-643.
- Janssen-Bienhold U, Trümpler J, Hilgen G, Schultz K, De Sevilla Müller LP, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R (2009)** Connexin57 is expressed in dendro-dendritic and axo-axonal gap junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. *J Comp Neurol* 513:363-374.
- Jeon CJ, Masland RH (1995)** A population of wide-field bipolar cells in the rabbit's retina. *J Comp Neurol* 360:403-412.
- Junghans D, Heidenreich M, Hack I, Taylor V, Frotscher M, Kemler R (2008)** Postsynaptic and differential localization to neuronal subtypes of protocadherin beta16 in the mammalian central nervous system. *Eur J Neurosci* 27:559-571.
- Kallenbach S, Khantane S, Carroll P, Gayet O, Alonso S, Henderson CE, Dudley K (2003)** Changes in subcellular distribution of protocadherin gamma proteins accompany maturation of spinal neurons. *J Neurosci Res* 72:549-556.
- Kamermans M, Fahrenfort I (2004)** Ephaptic interactions within a chemical synapse: hemichannel-mediated ephaptic inhibition in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 14:531-541.
- Kamermans M, Spekrijse H (1999)** The feedback pathway from horizontal cells to cones. A mini review with a look ahead. *Vision Res* 39:2449-2468.
- Kaneko A (1971)** Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina. *J Physiol* 213:95-105.
- Kihara AH, Santos TO, Paschon V, Matos RJ, Britto LR (2008)** Lack of photoreceptor signaling alters the expression of specific synaptic proteins in the retina. *Neuroscience* 151:995-1005.
- Klug K, Herr S, Ngo IT, Sterling P, Schein S (2003)** Macaque retina contains an S-cone OFF midget pathway. *J Neurosci* 23:9881-9887.
- Köhler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1993)** Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainite receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10:491-500.
- Kolb H (1970)** Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 258:261-283.
- Kolb H (1977)** The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *J Neurocytol* 6:131-153.

- Kolb H, Mariani A, Gallego A (1980)** A second type of horizontal cell in the monkey retina. *J Comp Neurol* 189:31-44.
- Koulen P, Fletcher EL, Craven SE, Brecht DS, Wässle H (1998)** Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. *J Neurosci* 18:10136-10149.
- Kouyama N, Marshak DW (1992)** Bipolar cells specific for blue cones in the macaque retina. *J Neurosci* 12:1233-1252.
- Lamb TD, Collin SP, Pugh EN Jr (2007)** Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci* 8:960-976.
- Lasater EM (1987)** Retinal horizontal cell gap junctional conductance is modulated by dopamine through a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7319-7323.
- Lazrak A, Peracchia C (1993)** Gap junction gating sensitivity to physiological internal calcium regardless of pH in Novikoff hepatoma cells. *Biophys J* 65:2002-2012.
- Lee EJ, Han JW, Kim HJ, Kim IB, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, Chun MH (2003)** The immunocytochemical localization of connexin 36 at rod and cone gap junctions in the guinea pig retina. *Eur J Neurosci* 18:2925-2934.
- Lee SC, Grünert U (2007)** Connections of diffuse bipolar cells in primate retina are biased against S-cones. *J Comp Neurol* 502:126-140.
- Lee SC, Jusuf PR, Grünert U (2004)** S-cone connections of the diffuse bipolar cell type DB6 in macaque monkey retina. *J Comp Neurol* 474:353-363.
- Lee SC, Telkes I, Grünert U (2005)** S-cones do not contribute to the OFF-midget pathway in the retina of the marmoset, *Callithrix jacchus*. *Eur J Neurosci* 22:437-47.
- Lefebvre JL, Zhang Y, Meister M, Wang X, Sanes JR (2008)** γ -Protocadherins regulate neuronal survival but are dispensable for circuit formation in retina. *Development* 135:4141-4151.
- Li W, DeVries SH (2004)** Separate blue and green cone networks in the mammalian retina. *Nat Neurosci* 7:751-756.
- Li W, DeVries SH (2006)** Bipolar cell pathways for color and luminance vision in a dichromatic mammalian retina. *Nat Neurosci* 9:669-675.
- Li X, Kamasawa N, Ciolofan C, Olson CO, Lu S, Davidson KG, Yasumura T, Shigemoto R, Rash JE, Nagy JI (2008)** Connexin45-containing neuronal gap junctions in rodent retina also contain connexin36 in both apposing hemiplaques, forming bihomotypic gap junctions, with scaffolding contributed by zonula occludens-1. *J Neurosci* 28:9769-9789.
- Li X, Olson C, Lu S, Kamasawa N, Yasumura T, Rash JE, Nagy JI (2004)** Neuronal connexin36 association with zonula occludens-1 protein (ZO-1) in mouse brain and interaction with the first PDZ domain of ZO-1. *Eur J Neurosci* 19:2132-2146.
- Linberg KA, Suemune S, Fisher SK (1996)** Retinal neurons of the California ground squirrel, *Spermophilus beecheyi*: a Golgi study. *J Comp Neurol* 365:173-216.
- Lu C, McMahon DG (1997)** Modulation of hybrid bass retinal gap junctional channel gating by nitric oxide. *J Physiol* 499:689-699.
- Lukáts A, Szabó A, Röhlich P, Víg B, Szél (2005)** A Photopigment coexpression in mammals: comparative and developmental aspects. *Histol Histopathol* 20:551-574.
- Lurtz MM, Louis CF (2007)** Intracellular calcium regulation of connexin43. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C1806-1813.

- MacNeil MA, Gaul PA (2008)** Biocytin wide-field bipolar cells in rabbit retina selectively contact blue cones. *J Comp Neurol* 506:6-15.
- MacNeil MA, Heussy JK, Dacheux RF, Raviola E, Masland RH (2004)** The population of bipolar cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 472:73-86.
- Marc RE, Sperling HG (1977)** Chromatic organization of primate cones. *Science* 196:454-456.
- Mariani AP (1984)** Bipolar cells in monkey retina selective for the cones likely to be blue-sensitive. *Nature* 308:184-186.
- Martin PR, Grünert U (1999)** Analysis of the short wavelength-sensitive ("blue") cone mosaic in the primate retina: comparison of New World and Old World monkeys. *J Comp Neurol* 406:1-14
- Masland RH (2001)** The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4:877-886.
- Massey SC (2008)** Circuit functions of gap junctions in the mammalian retina. In: *The Senses: A Comprehensive Reference (Editiert von Basbaum AI, Kaneko A, Shepherd GM, Westheimer G), Seiten 457-471. San Diego: Academic Press.*
- Mataruga A, Kremmer E, Müller F (2007)** Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *J Comp Neurol* 502:1123-1137.
- Maxeiner S, Dedek K, Janssen-Bienhold U, Ammermüller J, Brune H, Kirsch T, Pieper M, Degen J, Krüger O, Willecke K, Weiler R (2005)** Deletion of connexin45 in mouse retinal neurons disrupts the rod/cone signalling pathway between AII amacrine and ON cone bipolar cells and leads to impaired visual transmission. *J Neurosci* 25:566-576.
- McMahon DG (1994)** Modulation of electrical synaptic transmission in zebrafish retinal horizontal cells. *J Neurosci* 14:1722-1734.
- Milam AH, Dacey DM, Dizhoor AM (1993)** Recoverin immunoreactivity in mammalian cone bipolar cells. *Vis Neurosci* 10:1-12.
- Mills SL, O'Brien JJ, Li W, O'Brien J, Massey SC (2001)** Rod pathways in the mammalian retina use connexin 36. *J Comp Neurol* 436:336-350.
- Misgeld T, Kerschensteiner M, Baryre FM, Burgess RW, Lichtman JW (2007)** Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. *Nat Methods* 4:559-561.
- Missotten, L (1965)** The Ultrastructure of the Human Retina. *Brussels: Editions Arscia S.A.*
- Mollon JD (1989)** "Tho' she kneel'd in that place where they grew..." The uses and origins of primate colour vision. *J Exp Biol* 146:21-38.
- Morcus Y, Hosie MJ, Bauer HC, Chan-Ling T (2001)** Immunolocalization of occludin and claudin-1 to tight junctions in intact CNS vessels of mammalian retina. *J Neurocytol* 30:107-123.
- Morishita H, Yagi T (2007)** Protocadherin family: diversity, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 19:584-592.
- Nathans J (1999)** The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron* 24:299-312.
- O'Brien JJ, Li W, Pan F, Keung J, O'Brien J, Massey SC (2006)** Coupling between A-type horizontal cells is mediated by connexin 50 gap junctions in the rabbit retina. *J Neurosci* 26:11624-11636.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998)** Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.

- Paffenholz R, Kuhn C, Grund C, Stehr S, Franke WW (1999)** The arm-repeat protein NPRAP (neurojungin) is a constituent of the plaques of the outer limiting zone in the retina, defining a novel type of adhering junction. *Exp Cell Res* 250:452-464.
- Pan F, Keung JW, Snuggs MB, Kim IB, O'Brien J, Massey SC (2007a)** Expression of Connexin 57 by Horizontal Cell Axon Terminals in the Rabbit Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: ARVO E-Abstract 2848.
- Pan F, Massey SC (2007)** Rod and cone input to horizontal cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 500:815-831.
- Pan F, Mills SL, Massey SC (2007b)** Screening of gap junction antagonists on dye coupling in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 24:609-618.
- Peichl L, González-Soriano J (1994)** Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci* 11:501-517.
- Peichl L, Sandmann D, Boycott BB (1998)** Comparative anatomy and function of mammalian horizontal cells. In: *Development and Organization of the Retina (Editiert von Chalupa LM und Finlay BL)*. Seiten 147-172. New York: Plenum Press.
- Pereda AE, Rash JE, Nagy JI, Bennett MV (2004)** Dynamics of electrical transmission at club endings on the Mauthner cells. *Brain Res Brain Res Rev* 47:227-44.
- Perlman I, Ammermüller J (1994)** Receptive-field size of L1 horizontal cells in the turtle retina: effects of dopamine and background light. *J Neurophysiol* 72:2786-2795.
- Pfeiffer-Guglielmi B, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B (2003)** Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J Neurochem* 85:73-81.
- Piccolino M, Neyton J, Gerschenfeld HM (1984)** Decrease of gap junction permeability induced by dopamine and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in horizontal cells of turtle retina. *J Neurosci* 4:2477-2488.
- Pignatelli V, Strettoi E (2004)** Bipolar cells of the mouse retina: a gene gun, morphological study. *J Comp Neurol* 476:254-266.
- 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.
- Puller C (2005)** Diplomarbeit: Glutamatrezeptor-Expression auf Bipolarzellen in der Primaten- und Mausretina. *eDoc-Server der Max Planck Gesellschaft, Dokumentenidentifikationsnummer 256177*
- Puller C, Haverkamp S, Grünert U (2007)** OFF midget bipolar cells in the retina of the marmoset, *Callithrix jacchus*, express AMPA receptors. *J Comp Neurol* 502:442-454.
- Rash JE, Dillman RK, Bilhartz BL, Duffy HS, Whalen LR, Yasumura T (1996)** Mixed synapses discovered and mapped throughout mammalian spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4235-4239.
- Rattner A, Smallwood PM, Williams J, Cooke C, Savchenko A, Lyubarsky A, Pugh EN, Nathans J (2001)** A photoreceptor-specific cadherin is essential for the structural integrity of the outer segment and for photoreceptor survival. *Neuron* 32:775-786.
- Raviola E, Gilula NB (1975)** Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *J Cell Biol* 65:192-222.
- Raviola E, Goodenough DA, Raviola G (1980)** Structure of rapidly frozen gap junctions. *J Cell Biol* 87:273-279.

- Redies C, Heyder J, Kohoutek T, Staes K, Van Roy F (2008)** Expression of protocadherin-1 (Pcdh1) during mouse development. *Dev Dyn* 237:2496-2505.
- Reiners J, Märker T, Jürgens K, Reidel B, Wolfrum U (2005)** Photoreceptor expression of the Usher syndrome type 1 protein protocadherin 15 (USH1F) and its interaction with the scaffold protein harmonin (USH1C). *Mol Vis* 11:347-355.
- Reiners J, Nagel-Wolfrum K, Jürgens K, Märker T, Wolfrum U (2006)** Molecular basis of human Usher syndrome: deciphering the meshes of the Usher protein network provides *insights into the pathomechanisms of the Usher disease*. *Exp Eye Res* 83:97-119.
- Röhrenbeck J, Wässle H, Boycott BB (1989)** Horizontal Cells in the Monkey Retina: Immunocytochemical staining with antibodies against calcium binding proteins. *Eur J Neurosci* 1:407-420.
- Röhrenbeck J, Wässle H, Heizmann CW (1987)** Immunocytochemical labelling of horizontal cells in mammalian retina using antibodies against calcium-binding proteins. *Neurosci Lett* 77:255-260.
- Roska B, Werblin F (2001)** Vertical interactions across ten parallel, stacked representations in the mammalian retina. *Nature* 410:583-587.
- Schubert T, Degen J, Willecke K, Hormuzdi SG, Monyer H, Weiler R (2005a)** Connexin36 mediates gap junctional coupling of alpha-ganglion cells in mouse retina. *J Comp Neurol* 485:191-201.
- Schubert T, Maxeiner S, Krüger O, Willecke K, Weiler R (2005b)** Connexin45 mediates gap junctional coupling of bistratified ganglion cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 490:29-39.
- Schubert T, Weiler R, Feigenspan A (2006)** Intracellular calcium is regulated by different pathways in horizontal cells of the mouse retina. *J Neurophysiol* 96:1278-1292.
- Schwartz EA (2002)** Transport-mediated synapses in the retina. *Physiol Rev* 82:875-891.
- Shelley J, Dedek K, Schubert T, Feigenspan A, Schultz K, Hombach S, Willecke K, Weiler R (2006)** Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. *Eur J Neurosci* 23:3176-3186.
- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K (2005)** Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6:191-200.
- Solessio E, Lasater EM (2002)** Calcium-induced calcium release and calcium buffering in retinal horizontal cells. *Vis Neurosci* 19:713-725.
- Spray DC, Stern JH, Harris AL, Bennett MV (1982)** Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to H and Ca ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:441-445.
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986)** Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766.
- Suzuki H, Pinto LH (1986)** Response properties of horizontal cells in the isolated retina of wild-type and pearl mutant mice. *J Neurosci* 6:1122-1128.
- Tatusova TA, Madden TL (1999)** BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 15;174:247-250.
- 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.
- Tserentsoodol N, Shin BC, Suzuki T, Takata K (1998)** Colocalization of tight junction proteins, occludin and ZO-1, and glucose transporter GLUT1 in cells of the blood-ocular barrier in the mouse eye. *Histochem Cell Biol* 110:543-551.

- Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, Sterling P (2001)** Microcircuits for night vision in mouse retina. *J Neurosci* 21:8616-8623.
- Vaney DI (1991)** Many diverse types of retinal neurons show tracer coupling when injected with biocytin or Neurobiotin. *Neurosci Lett* 125:187-190.
- Varela C, Blanco R, De la Villa P (2005)** Depolarizing effect of GABA in rod bipolar cells of the mouse retina. *Vision Res* 45:2659-2667.
- Vickers JC, Huntley GW, Edwards AM, Moran T, Rogers SW, Heinemann SF, Morrison JH (1993)** Quantitative localization of AMPA/kainate and kainate glutamate receptor subunit immunoreactivity in neurochemically identified subpopulations of neurons in the prefrontal cortex of the macaque monkey. *J Neurosci* 13:2982-2992.
- Wang SZ, Adler R, Nathans J (1992)** A visual pigment from chicken that resembles rhodopsin: amino acid sequence, gene structure, and functional expression. *Biochemistry* 31:3309-3315.
- Wang X, Weiner JA, Levi S, Craig AM, Bradley A, Sanes JR (2002)** Gamma protocadherins are required for survival of spinal interneurons. *Neuron* 36:843-854.
- Wässle H, Boycott BB, Röhrenbeck J (1989)** Horizontal Cells in the Monkey Retina: Cone connections and dendritic network. *Eur J Neurosci* 1:421-435.
- Wässle H, Dacey DM, Haun T, Haverkamp S, Grünert U, Boycott BB (2000)** The mosaic of horizontal cells in the macaque monkey retina: with a comment on biplexiform ganglion cells. *Vis Neurosci* 17:591-608.
- Wässle H, Grünert U, Martin PR, Boycott BB (1994)** Immunocytochemical characterization and spatial distribution of midget bipolar cells in the macaque monkey retina. *Vision Res* 34:561-579.
- Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S (2009)** Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci* 29:106-117.
- Wässle H. (2004)** Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5:747-757.
- Weiler R, Baldrige 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, He S, Vaney DI (1999)** Retinoic acid modulates gap junctional permeability between horizontal cells of the mammalian retina. *Eur J Neurosci* 11:3346-3350.
- Weiler R, Pottek M, He S, Vaney DI (2000)** Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. *Brain Res Brain Res Rev* 32:121-129.
- Weiner JA, Wang X, Tapia JC, Sanes JR (2005)** Gamma protocadherins are required for synaptic development in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8-14.
- Wu SM (1992)** Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. *Curr Opin Neurobiol* 2:462-468.
- Xin D, Bloomfield SA (1999)** Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol* 405:75-87.
- Xin D, Bloomfield SA (2000)** Effects of nitric oxide on horizontal cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 17:799-811.
- Yagi T (2008)** Clustered protocadherin family. *Dev Growth Differ* 1:131-140.
- Yang XL (2004)** Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol* 73:127-150.

Zahs KR, Kofuji P, Meier C, Dermietzel R (2003) Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina. *J Comp Neurol* 455:531-546.

Zaidi NF, Berezovska O, Choi EK, Miller JS, Chan H, Lilliehook C, Hyman BT, Buxbaum JD, Wasco W (2002) Biochemical and immunocytochemical characterization of calsenilin in mouse brain. *Neuroscience* 114:247-263.

Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an Prof. Dr. Heinz Wässle für die Möglichkeit, in seiner Abteilung am MPI für Hirnforschung mitwirken zu dürfen, und für die Begutachtung der hier vorliegenden Doktorarbeit. Ich bedanke mich ebenfalls für die offene Bürotür, sowie für die fortwährende, großzügige Unterstützung meiner Arbeit und meiner Person in allen Belangen.

PD Dr. Silke Haverkamp danke ich für die großartige Betreuung meiner Arbeit, für die Ruhe, die Geduld und das Vertrauen.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Leo Peichl für die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Ich danke Dr. Thomas Euler und Tobias Breuninger für die gute Zusammenarbeit und Thomas Euler sowie Dr. Xavier Castell dafür, dass sie sich die Zeit genommen haben, einem Fremdling ihre Methoden zu lehren.

Des Weiteren gilt mein Dank all jenen, die meine Arbeit durch ihre technische Assistenz erleichtert haben: Walter Hofer, Brigitte Marshallsay, Gong Sun Nam und Brigitte Sinke.

Luis Pérez de Sevilla Müller danke ich für die Unterstützung bei der Mikroinjektion von Horizontalzellen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen aufrichtigen Dank an alle derzeitigen und viele ehemalige Mitarbeiter der Abteilung Neuroanatomie richten, die mich in meiner Zeit am MPI freundschaftlich oder auch fachlich begleitet haben. Ich danke Euch für die einzigartige Atmosphäre und das Miteinander.

Die Menschen aus meinem privaten Umfeld und ihre wertvollen Beiträge zu meiner Arbeit wurden an dieser Stelle nicht vergessen. Jedoch spreche ich ihnen lieber einmal persönlich meinen Dank aus.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Christian Puller, diese Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Frankfurt am Main, den 27. Februar 2009

Christian Puller

Christian Puller – CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Vorname: Christian
Name: Puller
Geburtstag: 27. Mai, 1979
Geburtsort: Lübbecke
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Adresse: Fröbelstr. 10
60487 Frankfurt a.M.
Telefon Mobil: 0177 – 308 18 77
E-Mail: puller@mpih-frankfurt.mpg.de



AUSBILDUNG

- Seit 2005 Doktorarbeit „Die synaptische Architektur der äußeren plexiformen Schicht der Säugetierretina“ am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main unter der Betreuung von PD Dr. Silke Haverkamp und Prof. Dr. Heinz Wässle
- 2004 – 2005 Externe Diplomarbeit „Glutamatrezeptor-Expression auf Bipolarzellen der Primaten- und Mausretina“ am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main unter der Betreuung von PD Dr. Silke Haverkamp und apl. Prof. Dr. Josef Ammermüller
- 1999 – 2004 Studium der Biologie an der Carl-von-Ossietzky-Universität, Oldenburg
- 1998 – 1999 Zivildienst im Kinderhaus Lintelmann, Rahden
- 1989 – 1998 Besuch des Söderblom-Gymnasiums, Espelkamp

FORSCHUNGSaufenthalte

- 2006 Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg, unter der Betreuung von Dr. Thomas Euler
- 2004 National Vision Research Institute of Australia, Melbourne, Australien, unter der Betreuung von Prof. Dr. Ulrike Grünert

STIPENDIEN UND FÖRDERMITTEL

- Seit 2009 Mitarbeiter in der DFG-geförderten Forschergruppe FOR701, „Dynamik und Stabilität retinaler Verarbeitung“
- 2005 – 2008 Stipendiat der „International Max Planck Research School for Structure and Function of Biological Membranes“

PUBLIKATIONEN

Puller C, Pérez de Sevilla Müller L, Janssen-Bienhold U, Haverkamp S, 2009. ZO-1 and the spatial organization of gap junctions and glutamate receptors in the outer plexiform layer of the mammalian retina. *J Neurosci.* 29(19):6266-6275

Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S, 2009. Cone Contacts, Mosaics and Territories of Bipolar Cells in the Mouse Retina. *J Neurosci.* 29(1):106-117

Puller C, Haverkamp S, Grünert U, 2007. OFF midget bipolar cells in the retina of the marmoset, *Callithrix jacchus*, express AMPA receptors. *J Comp Neurol.* 502(3):442-454.

KONFERENZBEITRÄGE

- 2008 Retinal Connexin Meeting, Nov. 21 – 22, Amsterdam, Holland (Vortrag)
- New Frontiers in Neurophotronics, Oct. 20 – 23, Bordeaux, Frankreich (Poster)
- 2007 Annual Symposium of the Max Planck Institute for Brain Research, Dec. 7, Frankfurt am Main, Deutschland (Vortrag)
- European Retina Meeting, Oct. 4 – 6, Frankfurt am Main, Deutschland (Poster)
- 31st Göttingen Neurobiology Conference and 7th Meeting of the German Neuroscience Society, Feb. 17 – 20, Göttingen, Deutschland (Poster)
- 2006 5th Forum of European Neuroscience, July 8 – 12, Wien, Österreich (Poster)

REFERENZEN

PD Dr. Silke Haverkamp

Max-Planck-Institut für Hirnforschung
Abteilung Neuroanatomie
Deutschordenstraße 46
D-60528 Frankfurt am Main, Deutschland
Tel.: +49 (0)69 96769 - 236
Fax: +49 (0)69 96769 - 206
E-Mail: haverkamp@mpih-frankfurt.mpg.de

Prof. Dr. Heinz Wässle

Max-Planck-Institut für Hirnforschung
Abteilung Neuroanatomie
Deutschordenstraße 46
D-60528 Frankfurt am Main, Deutschland
Tel.: +49 (0)69 96769 - 219
Fax: +49 (0)69 96769 - 206
E-Mail: waessle@mpih-frankfurt.mpg.de

Dr. Thomas Euler

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung
Abteilung biomedizinische Optik
Jahnstr. 29
D-69120 Heidelberg, Deutschland
Tel.: +49 (0)6221 486 - 320
Fax: +49 (0)6221 486 - 325
E-Mail: Thomas.Euler@mpimf-heidelberg.mpg.de

Prof. Dr. Ulrike Grünert

National Vision Research Institute
Victorian College of Optometry
Cnr Cardigan & Keppel Streets
Carlton, VIC 3053, Australia
Tel.: +61 (0)3 9349 7480
Fax: +61 (0)3 9349 7484
E-Mail: uhg@unimelb.edu.au