

Aus dem Bereich der Anatomie / Neuroanatomie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

**Untersuchung des postnatalen Expressionsmusters des
synaptischen Proteins RIBEYE in der Mausretina**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011

vorgelegt von Andreas Michael Jungbauer
geboren am 30.05.1983 in Hoechst

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	S. 01
1.1	Summary	S. 02
2.	Einleitung	S. 04
2.1	Die Retina	S. 04
	2.1.1 Retinales Pigmentepithel.....	S. 05
	2.1.2 Aussensegment.....	S. 05
	2.1.3 Innensegment.....	S. 06
	2.1.4 Äußere Grenzmembran.....	S. 06
	2.1.5 Äußere Körnerschicht.....	S. 06
	2.1.6 Äußere plexiforme Schicht.....	S. 06
	2.1.7 Innere Körnerschicht.....	S. 07
	2.1.8 Innere plexiforme Schicht.....	S. 07
	2.1.9 Ganglienzellschicht.....	S. 08
3.	Synapsen	S. 09
	3.1 Elektrische Synapsen.....	S. 09
	3.2 Chemische Synapsen.....	S. 11
	3.3 Chemische Synapsen der Retina.....	S. 13
4.	Die Ribbonsynapse	S. 14
4.1	Molekularer Aufbau der Ribbonsynapse.....	S. 17
4.2	Physiologische Eigenschaften der Ribbonsynapse.....	S. 20
5.	Markerproteine aus der immunhistochemischen Untersuchung	S. 23
5.1	Synaptophysin.....	S. 23
5.2	NCAM.....	S. 24
5.3	CtBP2.....	S. 25
6.	Zielstellung der Arbeit	S. 26

7.	Material und Methoden	S. 28
7.1	Untersuchungsmaterial und Versuchstiere.....	S. 28
7.2	Materialliste.....	S.29
7.3	Puffer und Lösungen.....	S. 31
8.	Immunfluoreszenzen	S. 33
8.1	Allgemeine Bemerkungen zur Immunfluoreszenz.....	S. 33
8.2	Direkte Immunfluoreszenz.....	S. 33
8.3	Indirekte Immunfluoreszenz.....	S. 34
8.4	Durchführung der Immunfloreszenz.....	S. 35
	8.4.3 Durchführung der Einzel-Immunfuoreszenz.....	S. 36
	8.4.4 Durchführung der Doppel-Immunfluoreszenz.....	S. 37
8.5	Auswertung der Immunfluoreszenz.....	S. 38
9.	Western-Blot Untersuchung	S. 39
9.1	Präparation der Retina.....	S. 39
9.2	Probenvorbereitung.....	S. 39
9.3	Trenngel.....	S. 40
9.4	Sammelgel.....	S. 40
9.5	Proteintransfer mit dem Nassblot-Verfahren.....	S. 41
9.6	Stripping der Blot-Membranen.....	S. 42
9.7	Auftragschemata der Blot-Membran.....	S. 42
10.	Ergebnisse	S. 44
10.1	Biochemischer Nachweis von RIBEYE in der Netzhaut.....	S. 45
10.2	Lokalisation / Verteilung von RIBEYE innerhalb der Netzhaut.....	S. 47
	10.2.1 Stadium „P0“ (Tag der Geburt).....	S. 47
	10.2.2 Stadium P1 (erster Tag nach der Geburt).....	S. 49
	10.2.3 Entwicklungsstadium P2.....	S. 55
	10.2.4 Dritter Tag nach der Geburt.....	S. 56
	10.2.5 Vierter postnataler Tag.....	S. 58
	10.2.6 Fünfter bis siebter Tag nach der Geburt.....	S. 61
	10.2.7 Tag acht bis zehn nach der Geburt.....	S. 64

	10.2.8 Dreizehnter und siebzehnter Tag nach der Geburt.....	S. 69
10.3	Differenzierung der synaptischen Zuordnung von „RIBEYE“.....	S. 72
	10.3.1 Westernblot Untersuchung zum Nachweis von „Synaptophysin“ und „NCAM“.....	S. 74
	10.3.2 Lokalisation von „Synaptophysin“ und „NCAM“ innerhalb der Retina.....	S. 81
11.	Diskussion.....	S. 87
12.	Literaturverzeichnis.....	S.95
13.	Danksagung.....	S. 100
14.	Lebenslauf.....	S. 101

Abkürzungsverzeichnis

A	Amakrine Zelle
AD	arciform densities
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BP	Basenpaare
CT	Zapfenterminale (cone cell terminal)
CtBP ₁	C-terminales-Bindungs-Protein 1 für das Adenovirus E1A-Protein
CtBP ₂	C-terminales-Bindungs-Protein 1 für das Adenovirus E1A-Protein
Dest. H ₂ O	Destilliertes Wasser
ECL	enhanced chemiluminescence
ELM	äußere Grenzmembran (external limiting membrane)
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
G _{OFF}	OFF-Ganglienzelle
G _{ON}	ON-Ganglienzelle
H	Horizontalzelle
HNK-1	Epitop von NCAM
Ig	Immunglobulin
iNBL	innere Neuroblastenschicht
INL	innere Körnerschicht (inner nuclear layer)
IPL	innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer)
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
IS	Innensegment der Photorezeptoren (inner segment)
kDa	Kilodalton
M	Müllerzelle
ME	Müllerendfüßchen

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAD+	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCAM	nerve-cell-adhesion molecule
NPG	N-propyl-gallat
oNBL	äußere Neuroblastenschicht
ONL	äußere Körnerschicht (outer nuclear layer)
OPL	äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)
OS	Aussensegment der Photorezeptoren (outer Segment)
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
RPE	retinales Pigmentepithel (retinal pigment epithelium)
RP	Reserve Pool
RRP	Rapidly Releasable Pool
RT	Stäbchenterminale (rod cell terminal)
SDS-Puffer	Sodiumdodecylsulfat - Puffer
SR	synaptische Ribbons
SV	synaptische Vesikel
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Radialschnitt durch eine adulte Affenretina ca. 5 mm von der Fovea centralis entferntS. 08
Abbildung 2:	Schematische Darstellung einer elektrischen Synapse mit angeschnittenen KanälenS. 10
Abbildung 3:	Funktionsmodell synaptischer Ribbons mit RIBEYE als wesentliche Protein-Komponente in präsynaptischen NervenendigungenS. 22
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der direkten- und der indirekten ImmunfluoreszenzS. 34
Abbildung 5:	Western Blot Untersuchung zum Nachweis des synaptischen Proteins „RIBEYE“ mit dem Antikörper „anti-RIBEYE U2656“S. 45
Abbildung 6:	Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P0S. 47
Abbildung 7:	Negativkontrolle zu den mit „anti-RIBEYE U2656“ gefärbten Netzhäuten im Entwicklungsstadium P0...S. 48
Abbildung 8:	Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P1S. 49
Abbildung 9:	Expressionsmuster von CtBP2 im Entwicklungsstadium P1S. 51

Abbildung 10:	Negativkontrolle zu den mit „anti-CtBP2“ gefärbten Netzhäute im Entwicklungsstadium P1S. 52
Abbildung 11:	Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P2S. 55
Abbildung 12:	Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P3S. 56
Abbildung 13:	Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters von „RIBEYE“ im Entwicklungsstadium P4S. 58
Abbildung 14:	Ausschnittsvergrößerung des Expressionsmusters von „RIBEYE“ im Entwicklungsstadium P4S. 59
Abbildung 15:	Übersichtsaufnahmen von Netzhäuten in den Entwicklungsstadien P5-P7S. 61
Abbildung 16:	Ausschnittsvergrößerung im Bereich der äußeren plexiformen Schicht von Netzhäuten in den Entwicklungsstadien P5-P7S. 63
Abbildung 17:	Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters von „RIBEYE“ am 8. postnatalen TagS. 65
Abbildung 18:	Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters von „RIBEYE“ am 9. postnatalen TagS. 65
Abbildung 19:	Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters von „RIBEYE“ am 10. postnatalen TagS. 65
Abbildung 20:	Ausschnittsvergrößerung des Expressionsmusters von „RIBEYE“ im Bereich der äußeren plexiformen Schicht am 8. postnatalen Tag.....S. 66

Abbildung 21:	Ausschnittsvergrößerung des Expressionsmusters von „RIBEYE“ im Bereich der äußeren plexiformen Schicht am 9. postnatalen Tag.....	S. 66
Abbildung 22:	Ausschnittsvergrößerung des Expressionsmusters von „RIBEYE“ im Bereich der äußeren plexiformen Schicht am 10. postnatalen Tag.....	S. 66
Abbildung 23:	Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P13	S. 69
Abbildung 24:	Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P17	S. 70
Abbildung 25:	Westernblot Untersuchung zum Nachweis von Synaptophysin	S. 74
Abbildung 26:	Westernblot Untersuchung zum Nachweis von NCAM	S. 74
Abbildung 27:	Übersichtsaufnahmen beim „adulten“ Tier Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“	S. 75
Abbildung 28:	Ausschnittsvergrößerung beim „adulten“ Tier im Bereich der äußeren plexiformen Schicht, Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“	S. 76
Abbildung 29:	Übersichtsaufnahmen beim „adulten“ Tier Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“	S. 78

- Abbildung 30: Ausschnittsvergrößerung beim „adulten“ Tier im Bereich der äußeren plexiformen Schicht, Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“S. 79
- Abbildung 31: Expressionsmuster von RIBEYE und Synaptophysin im Entwicklungsstadium P1. Übersichtsaufnahmen der Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“S. 83
- Abbildung 32: Expressionsmuster von RIBEYE und Synaptophysin im Entwicklungsstadium P1. Ausschnittsvergrößerung skleranaher Bereich der Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“S. 84
- Abbildung 33: Expressionsmuster von RIBEYE und NCAM im Entwicklungsstadium P1. Übersichtsaufnahme der Doppelimmunfluoreszenzen mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“S. 85
- Abbildung 34: Expressionsmuster von RIBEYE und NCAM im Entwicklungsstadium P1. Ausschnittsvergrößerung skleranaher Bereich der Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“ S. 86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung der untersuchten Entwicklungsstadien....S. 28
Tabelle 2:	Verwendete MaterialienS. 29
Tabelle 3:	Verwendete Puffer und LösungenS. 31
Tabelle 4:	Schematische Darstellung der verwendeten PrimärantikörperS.35
Tabelle 5:	Schematische Darstellung der verwendeten SekundärantikörperS.36
Tabelle 6:	Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-GeleS.40
Tabelle 7:	Schematische Darstellung der Bandenbeladung der Blot-Membran und der verwendeten AntikörperS.42
Tabelle 8:	Schematische Darstellung der Bandenbeladung der Blot-Membran und der verwendeten Antikörper nach dem ersten Stripping der MembranS. 43
Tabelle 9:	Schematische Darstellung der Bandenbeladung der Blot-Membran und der verwendeten Antikörper nach dem zweiten Stripping der Membran.....S. 43

1. Zusammenfassung

Untersuchung des postnatalen Expressionsmusters des synaptischen Proteins RIBEYE in der Mausretina

Die Ribbonsynapse ist eine spezialisierte chemische Synapse, die sich besonders durch ihre schnelle, tonische Freisetzung von Neurotransmittern auszeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die Entwicklung der synaptischen Ribbons, als Bestandteil der Ribbonsynapse, im Bereich der OPL (Terminalen von Stäbchen- und Zapfenphotorezeptorzellen) konzentriert. Das Synaptische Protein RIBEYE diente als Referenzprotein für die Lokalisation der synaptischen Ribbons. Zur Untersuchung des Expressionsmusters von RIBEYE wurden Cryoschnitte der Retina von Mäusen in den ersten Tagen der postnatalen Entwicklung angefertigt. Die Detektion des synaptischen Proteins RIBEYE erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz mittels U2656 und Anti-CtBP2. Zur Kontrolle der synaptischen Lokalisation dienten die Proteine Synaptophysin als präsynaptischer Marker und NCAM mit dem Epitop HNK-I als postsynaptischer Marker, welche ebenfalls durch Antikörper detektiert wurden.

Die Ergebnisse zeigten auf, dass die ersten RIBEYE-Signale am Tag der Geburt in der Retina (skleranah) nachweisbar sind, wo sie bereits eindeutig präsynaptisch lokalisiert sind. Mit Ausdifferenzierung der einzelnen retinalen Schichten kommt es innerhalb der Neuroblastenschicht zu einer kontinuierlichen Wanderung der RIBEYE-Signale vom skleranahen Bereich nach vitread, in den Bereich, der sich später entwickelnden OPL.

Mit Ausdifferenzierung der OPL am vierten postnatalen Entwicklungstag ist kein weiterer Wanderungsprozess, sondern lediglich ein Reifungsprozess der synaptischen Ribbons zu verzeichnen. Ihre letztendliche ultrastrukturelle Form mit den an der präsynaptischen Membran angehafteten Ribbons entwickelt die Ribbon-Synapse zwischen dem Tag P7 und P12. Eine generelle Aggregation des synaptischen Proteins „RIBEYE“, ist jedoch bis

kurz vor dem Zeitpunkt der Augenöffnung (bei Mäusen ca. 10.-12. Tag) nicht zu verzeichnen. Mit dem Zeitpunkt der Augenöffnung ist rein morphologisch ein deutlicher Entwicklungssprung an den synaptischen Ribbons zu erkennen.

Auf Grund der raschen Entwicklungssprünge innerhalb einzelner Stadien und der nachgewiesenen Assoziation zu Synaptophysin (vesikuläres Markerprotein) ist davon auszugehen, dass sich die synaptischen Ribbons in kleineren Vorläuferkomplexen assemblieren und somit innerhalb kürzester Zeit zu einer kompletten Baueinheit zusammenlagern können.

Diese Hypothese deckt sich auch mit Beobachtungen, dass synaptische Ribbons dynamische Ribbons Strukturen sind, die je nach Lichtintensität durch Abspaltung oder Anlagerung kleiner Baueinheiten verkürzt oder verlängert werden können (Grün et al., 1980).

1.1 Summary

Examination of the postnatal expression pattern of the synaptic protein RIBEYE in the retina of mice

A Ribbon synapse is a chemical synapse that is especially featured by its fast and tonic release of neurotransmitters.

We focused on the development of synaptic ribbons as a component of the ribbon synapse in the outer plexiform layer (rod cell terminal and cone cell terminal) of the retina. To detect synaptic ribbons, we used RIBEYE as reference protein. To examine the expression pattern of RIBEYE, cryoslides of mice retina in the first postnatal episode were prepared.

The detection of the synaptic protein RIBEYE was made by indirect immunolabelling with U2656 and Anti-CtBP₂.

To control the synaptic localisation, synaptophysin acts as presynaptic marker and NCAM with its epitope HNK-1 as postsynaptic marker. Both were also detected by antibodies.

The results showed, that at the day of birth the first RIBEYE signals can be verified in the retina (close to the sclera), located obviously presynaptic.

Within the limits of differentiation of the retinal layers, RIBEYE signals continuously moved from an area close to the sclera towards the vitreous, where the outer plexiform layer is going to develop.

At the fourth postnatal day, when the outer plexiform layer has developed, there was no further movement, but rather a process of maturation of the synaptic ribbons. Its final ultrastructural form with attached ribbons on the presynaptic membrane, can be seen between day P7 and P12 at the ribbon synapse. A general aggregation of RIBEYE is unverifiable until the day when mice open their eyes (12th - 12th postnatal day). At the time when mice open their eyes, there is a big process of development in the ribbons morphology.

Due to the fact of rapid developmental processes in between single stages and the proven association to synaptophysin (vesicular marker) we can figure out that synaptic ribbons assemble to smaller precursor complexes and form a complete structural unit in a short period of time.

This hypothesis aligns with the observation, that synaptic ribbons are dynamic structures which extend or shrink, depending on the intensity of light (Grün et al., 1980).

2. Einleitung

2.1 Die Retina

Um mit seiner Umwelt in Kontakt treten zu können ist es für jedes Lebewesen eine Grundvoraussetzung, die ihm zugesendeten Sinnesreize (Informationen) wahr zu nehmen und verarbeiten zu können. Unter den fünf menschlichen Sinnen fällt hierbei dem visuellen Sinn zweifelsfrei die größte Bedeutung zu.

Das für das menschliche Auge wahrnehmbare Lichtspektrum umfasst elektromagnetische Wellen der Wellenlänge im Bereich von etwa 380 nm (violett/blau) bis 750 nm (rot). Fällt Licht dieses Spektralbereiches in das Auge ein, muss es zuerst alle Schichten der Netzhaut durchdringen, bevor es in der äußersten Schicht, durch Photorezeptoren detektiert werden kann. Insgesamt besitzt das menschliche Auge etwa 120 Millionen dämmerungsempfindliche Stäbchenrezeptoren, welche für das Dämmerungssehen (skotoptische Sehen), und etwa 6 Millionen Zapfenrezeptoren, welche für das Farbsehen (photoptische Sehen) verantwortlich sind. Entwicklungsgeschichtlich differenziert sich die Netzhaut aus den Wänden des Augenbechers und ist somit ein neuroektodermaler Anhang des Diencephalons.

Die Phototransduktion wird durch die Absorption eines Lichtquanten durch die Sehpigmente in den Aussenschichten der Photorezeptoren (Stäbchen- und Zapfenrezeptoren) vermittelt. Insgesamt differenziert man beim Zapfenrezeptor zwischen drei Subtypen von Rezeptoren, die jeweils nur einen Sehfarbstoff enthalten. Das jeweilige Absorptionsmaximum liegt hierbei im blauen (420 nm), grünen (534 nm) und roten (564 nm) Spektralbereich. Beim Stäbchenrezeptor gibt es nur einen Sehfarbstoff, das Rhodopsin, dessen Absorptionmaximum bei 498 nm befindet. Gemeinsam haben alle Sehfarbstoffe, dass sie aus einem heptahelicalen transmembranösen Rezeptor (G-Protein) bestehen, an welchem jeweils ein für einen Sehfarbstoff spezifisches Aldehyd des Vitamin A gekoppelt ist.

Durch das auf die Netzhaut fallende Licht wird in den Photorezeptoren eine Enzymkaskade ausgelöst, wobei das 11-cis-Isomer des Retinals (Vitamin-A-Aldehyd) in die aktivierte all-trans-Form umgewandelt wird. Eine darauf folgende Kaskade biochemischer Prozess sorgt letztendlich dafür, dass ein optischer Reiz in einen elektrischen Impuls umgewandelt wird. Dieser auch als Phototransduktion bezeichneter Prozess ist der Grundstein für die spätere neuronale Signalweiterleitung von den Photorezeptoren bis ins ZNS. Histologisch betrachtet besitzt die menschliche Netzhaut eine Gesamtbreite von ca. 0,1-0,5 mm und ist in eine gut erkennbare äußere Schicht (retinales Pigmentepithel) und in eine wesentlich komplexer aufgebaute innere Schicht (neurosensorische Netzhaut) gegliedert. Der Schichtaufbau ist wie folgt gegliedert:

2.1.1 Retinales Pigmentepithel (RPE - retinal pigment epithelium)

Das retinale Pigmentepithel bildet die äußerste Schicht der Netzhaut und besteht aus einer einschichtigen Lage hexagonaler Zellen, die der Bruchmembran aufsitzen. Es stellen die Grenze zwischen der Retina und der darunter liegenden Aderhaut (Choroidea) dar. Es dient als funktioneller Lichtfilter und ist zur Phagozytose fähig. Neben seiner ernährenden Funktion, sezerniert es auch Wachstumsfaktoren, welche für den Stoffwechsel und der Differenzierung der Netzhaut von entscheidender Bedeutung sind.

2.1.2 Aussensegment (OS - outer segment)

In den Aussensegmenten der Photorezeptoren findet der wesentliche Teil der retinalen Signaltransduktion statt. In ihnen wird der Sehfärbstoff gespeichert. Die Aussensegmente stehen im Kontakt mit dem retinalen Pigmentepithel. Über ein modifiziertes Cilium sind die Aussensegmente mit dem Rest der Zelle verbunden.

2.1.3 Innensegment (IS - inner segment)

Im inneren Segment befindet sich der stoffwechselaktive Teil der Photorezeptoren, welcher Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum enthält. Da das Innensegment und das Aussensegment durch ein Verbindungscilium voneinander getrennt sind, müssen die hier produzierten Proteine aktiv vom Innen- in das Aussensegment transportiert werden.

2.1.4 Äußere Grenzmembran (ELM - external limiting membrane)

Die äußere Grenzmembran wird durch Ausläufer der Müllerschen Zellen und Zelladhäsionsverbindungen mit den Photorezeptoren gebildet. Sie ist eine nahezu undurchlässige Membran, die nur mittels kreisförmiger Öffnungen von den Photorezeptoren durchstoßen wird.

2.1.5 Äußere Körnerschicht (ONL - outer nuclear layer)

In der äußeren Körnerschicht sind die Zellkörper der Photorezeptoren enthalten. Die hier parallel nebeneinander gruppierten Somata erstrecken ihre photosensiblen Ausläufer in die Außensegmente.

2.1.6 Äußere plexiforme Schicht (OPL - outer plexiform layer)

Die Axone der Stäbchen- und Zapfenrezeptoren nehmen Kontakt zu den Bipolar- und Horizontalzellen auf. Hier beginnt die erste intraretinale Informationsverarbeitung. Neben Fortsätze der Müllerschen Stützfasern, die dieses Areal durchziehen, findet sich hier noch ein Geflecht von retinalen Kapillaren, das an der Übergangszone zur äußeren Körnerschicht liegt und ein Abkömmling der zentralen Netzhautarterie ist.

2.1.7 Innere Körnerschicht (INL - inner nuclear layer)

In der Inneren Körnerschicht befinden sich die Zellkörper der Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen. Außerdem sind hier die Zellkörper der Müllerschen Stützzellen angesiedelt.

- **Bipolarzellen:** Leiten die im Photorezeptor entstandenen Impulse vertikal an die Ganglienzellen weiter und verbinden somit die äußere und die innere Synapsenschicht der Netzhaut. Dabei unterscheidet man zwei Arten von Bipolarzellen. ON-Bipolarzellen reagieren auf einen Lichtreiz mit einer Depolarisation. Die nachgeschaltete Ganglienzelle wird somit als ON-Ganglienzelle bezeichnet. OFF-Bipolarzellen reagieren dagegen mit einer Hyperpolarisation. Die nachfolgende Ganglienzelle wird ebenfalls als OFF-Ganglienzelle bezeichnet. Im Normalfall handelt es sich um OFF-Bipolarzellen, welche die Ganglienzellen daran hindern im Dunkeln Aktionspotentiale zum Gehirn zu schicken.
- **Amakrinzellen:** Werden von den Bipolarzellen innerviert und modulieren über laterale Verknüpfung, auf Höhe der Synapsen zwischen Bipolar- und Ganglienzellen, den Signalfluss von den Photorezeptoren über die Bipolar- zu den Ganglienzellen. Sie sind maßgeblich an der Gestaltung der rezeptiven Felder retinaler Ganglienzellen beteiligt.
- **Horizontalzellen:** Sie verbinden über laterale Verschaltung mehrere Photorezeptoren mit Ganglienzellen und fügen so der eher punktförmigen Information der Bipolarzellen die Information der Umgebung hinzu. Ihre wesentliche Funktion wird hierbei der Lichtadaptation zugesprochen. Die laterale Verschaltung findet sich auf Höhe der Synapsen zwischen Bipolarzelle und den Photorezeptoren.

2.1.8 Innere plexiforme Schicht (IPL - inner plexiform layer)

In dieser Schicht findet die Verbindung von den Bipolarzellen zu den Ganglienzellen statt.

2.1.9 Ganglienzellschicht (GCL - ganglion cell layer)

Sie enthält die Zellkörper der Ganglienzellen, deren Axone gemeinsam in der Nervenfaserschicht verlaufen und sich zum Nervus opticus vereinigen.

Die Diversität an Nervenzellen mit ihren unterschiedlichen Morphologien und Funktionen, sowie die komplexen Verschaltungen unter- bzw. miteinander bildet die Grundlage für die vielfältigen und hochkomplexen Leistungen der Netzhaut (Wässle und Boycott, 1991; Peichl, 1992; Brandstätter et al., 1998). In der Netzhaut erfolgt somit eine Vorverarbeitung der wahrgenommenen Lichtreize, die den Nervus opticus an die höheren visuellen Zentren im ZNS weitergeleitet werden.

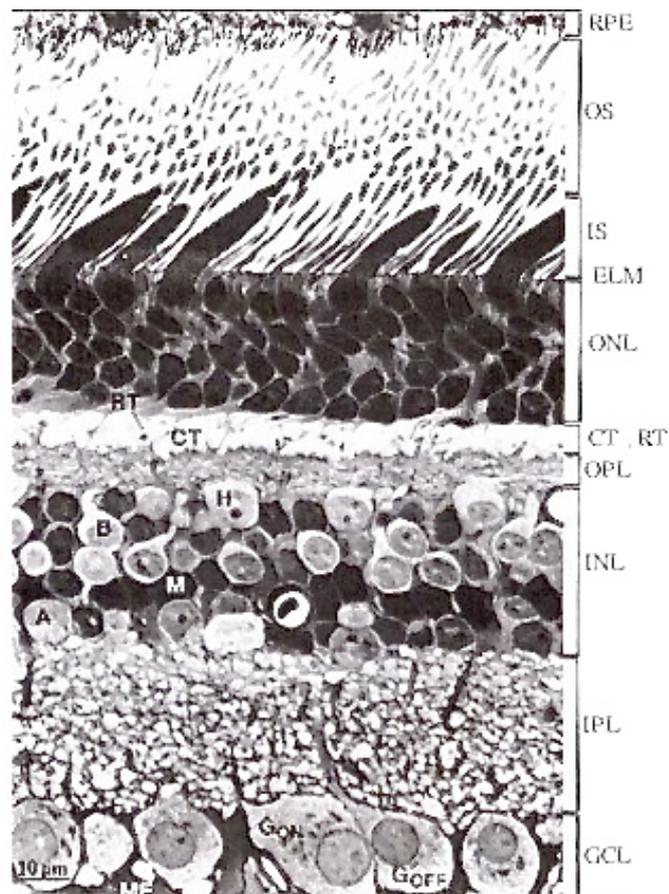


Abbildung 1: Radialschnitt durch eine adulte Affenretina ca. 5 mm von der Fovea centralis entfernt. In modifizierter Form, entnommen aus „The synaptic organisation of the brain“, Sterling, P. Fourth edition, 1998.

3. Synapsen

Der Begriff Synapse ist ein von dem Neurophysiologen Sir Charles S. Sherrington im Jahre 1897 geprägter Begriff, der sich aus den Worten „syn-“ (gr.: „zusammen“) und „haptin“ (gr.: „ergreifen“) zusammensetzt. Synapsen sind Kontaktstellen zwischen Nervenzellen und anderen Zellen (Muskel-, Sinnes- oder Drüsenzellen) oder zwischen Nervenzellen untereinander. Prinzipiell unterscheidet man zwei unterschiedliche Arten von Synapsen: elektrische und chemische Synapsen.

3.1 Elektrische Synapsen

Die Aufgabe der elektrischen Synapse besteht in der schnellen Übertragung einfacher Signale durch direkten Membrankontakt zweier benachbarter Zellen. Der Kontakt wird über so genannte gap junctions hergestellt, welche die Intrazellulärräume unmittelbar aneinander grenzender Zellen miteinander verbindet. Gap junctions sind Poren in der Zellmembran, die durch die Zusammenlagerung bestimmter Transmembranproteine, sog. Connexine, gebildet werden. Jeweils sechs Connexin-Moleküle kleiden eine Pore aus und bilden ein Connexon. Dabei kann die Größe der einzelnen Connexine zwischen 23 kDa und 62 kDa variieren. Entsteht in der Präsynapse eine Erregung, öffnen sich die Connexone. Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kDa, wie z.B. anorganische Ionen oder auch Glyzin können diesen Kanal passieren (Kandel et al., 2000). Auf diese Weise wird ein fast verzögerungsfreier Informationsfluss gewährleistet, der in den meisten Fällen eine sehr kurze Latenzzeit von ca. 0,1 ms hat. Die Modulation der Kanäle hängt sowohl von der Zusammensetzung der Connexone, als auch vom pH-Wert und der Phosphorylierung der Kanalproteine (Connexine) ab. Im Gegensatz zur chemischen Synapse, mangelt es bei der elektrischen Synapse an einem Verstärkungsmechanismus, so dass das präsynaptische Erregungspotential relativ stark sein muss, um einen postsynaptisch gerichteten Ionenstrom auslösen zu können.

Einleitung

In der Retina findet man elektrische Synapsen in beiden plexiformen Schichten. In der OPL sind Zapfen untereinander durch gap junctions verbunden; in der IPL sind es Stäbchenbipolarzellen mit Amakrinzellen und auch Amakrinzellen untereinander (Wässle und Boycott, 1991, Veruki und Hartveit, 2002).

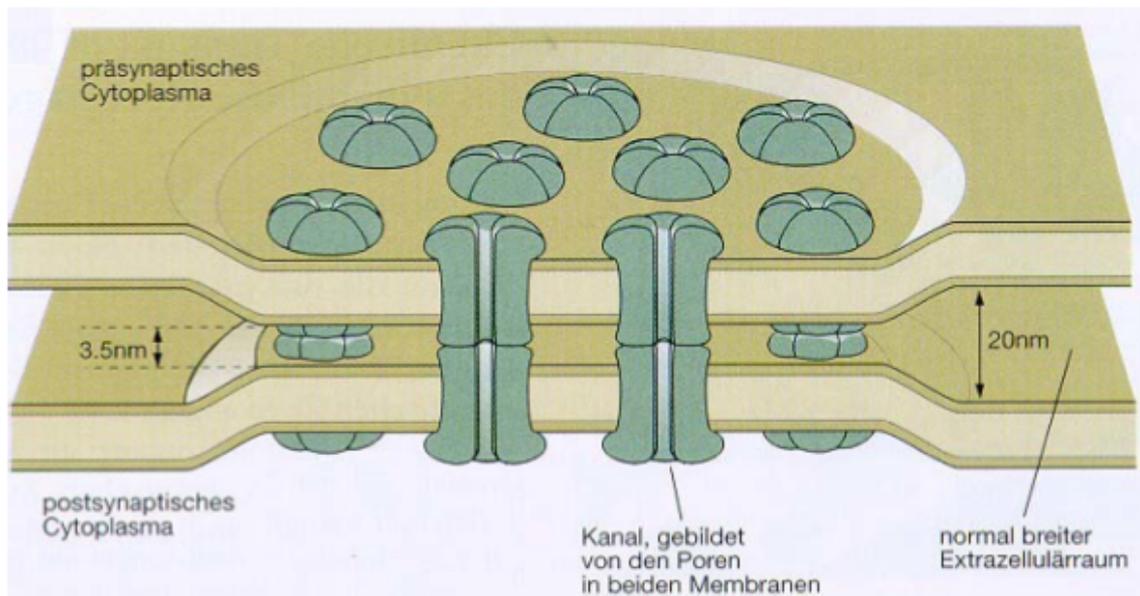


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer elektrischen Synapse mit angeschnittenen Kanälen. Elektrische Synapse mit Connexonen übernommen von Kandel et al. (2000). Ein Kanal wird von den Connexonen der prä- und postsynaptischen Seite gebildet.

3.2 Chemische Synapsen

Die chemische Synapse ist der am häufigsten verbreitete Synapsentyp. Im menschlichen Organismus erfolgt die Erregungsübertragung im ZNS fast ausschließlich über chemische Synapsen.

In der Regel sind Prä- und Postsynapse asymmetrisch aufgebaut, das heißt die beiden Synapsenenden weisen unterschiedliche physiologische Eigenschaften auf, woraufhin die Signalübertragung nur unidirektional erfolgen kann.

Im Gegensatz zur elektrischen Synapse, besteht bei der chemischen Synapse kein direkter zytoplasmatischer Kontakt zwischen Prä- und Postsynapse, da sie durch einen sog. synaptischen Spalt (10-100 nm) voneinander getrennt sind. Die Signalübertragung erfolgt hier indirekt über die Ausschüttung von Neurotransmittern, welche in der Präsynapse in Vesikeln gespeichert sind.

Kommt eine elektrische Erregung in Form eines Aktionspotentials an der Präsynapse an und depolarisiert diese über einen gewissen Schwellenwert, öffnen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle und extrazellulär gelegenes Kalzium strömt ins Zytosol ein.

Durch die Konformationsänderung kalziumbindender Proteine, besonders Synapto-tagmin, kommt es zur Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran der Präsynapse erfolgt in chemischen Synapsen in den sog. „Hot Spots“ (= aktive Zone). In einem als Exozytose bezeichnetem Prozess wird der Vesikelinhalt in den synaptischen Spalt abgegeben und die enthaltenen Neurotransmitter diffundieren an ligandenabhängige Rezeptoren der postsynaptischen Membran.

Unter den postsynaptischen Rezeptoren unterscheidet man, vereinfacht dargestellt, zwischen zwei Rezeptortypen: ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Ionotrope Rezeptoren bestehen aus membranständigen Proteinuntereinheiten, die einen Kanal bilden.

Durch die spezifische Bindung des Liganden oder eines Agonisten ändert sich durch Öffnung des Kanals die Leitfähigkeit der Zellmembran, was eine Änderung des postsynaptischen Membranpotentials nach sich zieht.

Metabotrope Rezeptoren hingegen haben keinen direkten Einfluss auf die Ionenströme und auf das Membranpotential.

Bei ihnen löst die Bindung des Liganden eine Second Messenger-Kaskade aus, die auf der intrazellulären Seite des Rezeptors stattfindet. Ob ein Neurotransmitter letztendlich ein EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potential) oder ein IPSP (inhibitorisches postsynaptisches Potential) hervorruft, hängt vom Rezeptor an der postsynaptischen Membran ab. Durch die Wirkung von abbauenden Enzymen im synaptischen Spalt werden die Neurotransmitter wieder von den Rezeptoren an der Postsynapse gelöst, so dass eine Repolarisation der Membran erfolgen kann. Einige Neurotransmitter werden von ortsständigen Gliazellen aufgenommen oder direkt in die Präsynapse zurückgeführt („re-uptake“).

Ein entscheidendes Merkmal von chemischen Synapsen ist, dass durch die Übersetzung der präsynaptischen Erregung in ein chemisches Signal die Möglichkeit der Signalverstärkung und der Signalmodulation geboten wird. Die Anzahl der freigesetzten Transmitter wird über die Anzahl der fusionierten Vesikel moduliert. Postsynaptisch kann eine weitere Signalverstärkung durch die Kopplung des Liganden an einen metabotropen Rezeptor auftreten, durch welchen es zur Aktivierung einer Second Messenger-Kaskade kommt.

Die Latenzzeit einer chemischen Synapse ist aufgrund der Übersetzung der elektrischen Signale in chemische Signale deutlich größer als bei der elektrischen Synapse. Sie kann zwischen 0,3 ms und vielen Millisekunden liegen.

3.3 Chemische Synapsen der Retina

In der Retina finden sich sowohl die konventionellen chemischen Synapsen, welche im vorhergehenden Abschnitt beschrieben sind, als auch die Ribbonsynapse. Die Ribbonsynapse steht im Mittelpunkt der hier vorliegenden Dissertation und wird nachfolgend genauer behandelt.

4. Die Ribbonsynapse

Die Ribbonsynapse ist eine spezialisierte chemische Synapse, die sich besonders durch Ihre schnelle, tonische Freisetzung von Neurotransmittern auszeichnet.

Anzutreffen sind sie charakteristisch im hoch spezialisiertem neuronalem Gewebe von Wirbeltieren, besonders in retinalen Photorezeptoren und in Bipolarzellen, an den Haarzellen der Cochlea im Innenohr, sowie in Melatonin sezernierenden Zellen in der Epiphyse (Sjöstrand and Smith, 1961; Dowling, 1987; Sterlin, 1998; Lenzi et al., 1999). Ausgenommen der epiphysalen Ribbonsynapsen, wo die Funktion noch nicht eindeutig geklärt ist, haben sich die Ribbons als eine essentielle Komponente des sensorischen Systems von Wirbeltieren entwickelt. Zwar haben Spezies übergreifende Studien gezeigt, dass Ribbons auch z.B. in *Drosophila* vorkommen, sich diese aber sowohl in ihren morphologischen Eigenschaften, als auch in deren Lokalisation zur aktiven Zone, von den eigentlichen Ribbonsynapsen unterscheiden.

In der Vertebratennetzhaut sind Ribbonsynapsen in der OPL (Terminalen von Stäbchen- und Zapfenphotorezeptorzellen) und in der IPL (Terminalen von Bipolarzellen) zu finden, wobei die Ribbons der IPL viel kleiner sind, als die in der OPL (Dowling, 1987). Die in der OPL lokalisierten Ribbonsynapsen gehen hier in einer schmalen Zone Verbindungen mit den Horizontal- und Bipolarzellen ein (Sterling, 1998). In der IPL gehen sie in einer etwas breiteren synaptischen Zone Verbindungen mit Amakrinen- und Bipolarzellen ein (Dowling, 1987).

Charakteristisch für die Ribbonsynapse sind die elektronenmikroskopisch erkennbaren, meist an der präsynaptischen Membran gelegenen, elektronendichten bandförmigen Strukturen, die synaptische Ribbons genannt werden (Dowling, 1987; Sterling, 1998) und den Anschein erwecken, dass Ribbons eine cytoskelettale Struktur besitzen. Dies wurde jedoch nicht bestätigt (Sterling, 1998).

Rekonstruktionen von Ultradünnschnitten zufolge sind synaptische Ribbons nicht einfach stabförmige Profile, sondern plattenartige, lamellenförmige Strukturen, die sich in der Krümmung der präsynaptischen Membran anpassen und ihr hufeisenförmig anliegen (McCartney und Dickson, 1985; Rao-Mirotnik et al., 1995). Die hufeisenförmige Struktur der Ribbonsynapse ist bei v.A. adultem Gewebe in der Immunfloreszenzmikroskopie gut zu erkennen und für die Ribbonsynapse sehr charakteristisch. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Verankerung der synaptischen Ribbons (SR) an der präsynaptischen Membran über sog. „Arciform Densities“ (AD) realisiert wird. Die „AD“ sind dachrinnenartig geformte Strukturen, welche eine Bogenlänge von bis zu 2 μm aufweisen und über ca. 20 nm lange, fadenförmige Proteinbrücken mit den synaptischen Ribbons verbunden sind. In den Photorezeptoren der OPL können die „AD“ den Membranverlauf der synaptischen Ribbons über eine Strecke von bis zu 70 % ohne Unterbrechung folgen, wobei sie in Form einer zelleinwärts gebogenen Rinne an der konkaven Seite der hufeisenförmigen „SR“ anliegen. (D.B. Gustavus, 2001)

In den präsynaptischen Nervenendigungen von Photorezeptoren sind Ribbonsynapsen senkrecht zur Plasmamembran lokalisiert (Gray und Pease, 1971; Schaeffer et al., 1982). An Stäbchenphotorezeptorzellen ist für gewöhnlich nur ein Ribbon lokalisiert (Gray und Pease, 1971; Sterling, 1983) und ist somit das einzige bekannte Säugetierneuron, dessen Transmitterquanten an singulärer Stelle abgegeben werden (Rao-Mirotnik et al., 1995). Dafür ist rein von der Morphologie her, das Ribbon in den Stäbchenterminalen länger (mehr als 700 nm) als in den Zapfenterminalen (Sparado et al., 1987). Die Rezeptorterminale von Zapfenphotorezeptoren hingegen können für gewöhnlich mehrere aktive Zonen mit jeweils einem synaptischen Ribbon beinhalten (Ahnelt et al., 1990). Beim Menschen kann so eine Zapfenterminale sogar mehr als 20 aktive Zonen enthalten (Ahnelt et al., 1990). Spezielle elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ribbonsynapse am basalen Ende im Bereich der aktiven Zone größer und kapazitätsreicher sind, als herkömmliche Synapsen (Schaeffer et al., 1982) und dass jedes Ribbon mit von Transmittern

beladenen synaptischen Vesikeln (Transmitter der Ribbons ist Glutamat) umgeben ist (Behrens U. D, 1998).

Die beladenen Vesikel sind über dünne Filamente mit dem Ribbon verbunden. Insgesamt befinden sich an ihrer Oberfläche ca. 600 synaptische Vesikel, wobei sich etwa 130 davon in der bereits beschriebenen verbreiterten aktiven Zone befinden (Rao-Mirotnik et al., 1995). Desweiteren wurde gezeigt, dass genau diese Verbindungsfilamente in Abhängigkeit ihrer An- und Abwesenheit, die Position der synaptischen Vesikel im Verhältnis zur Plasmamembran und der Synapse beeinflussen.

Ribbonsynapsen sind somit keine starren, sondern dynamische Strukturen deren Anzahl, Größe, Lage und Form in den Terminalen einem circadianen Rhythmus (Hell/Dunkel) unterlegen sind (Schmitz und Drenckhahn, 1993). Man findet beispielsweise tagsüber eine wesentlich höhere Anzahl an Ribbons in den Photorezeptorzellen (bis zu 4x so viele) als in der Nacht. Ebenfalls hat der circadiane Rhythmus auch eine Auswirkung auf die Größe der Synapsen. Nachts sind Ribbons länger, als am Tage (Jastrow et al., 1997).

4.1 Molekularer Aufbau der Ribbonsynapse

Betrachtet man die Verteilung der präsynaptischen Proteine in ihrer Gesamtheit, stellt man fest, dass die allgemeinen Proteinbestandteile von Ribbonsynapsen und konventionellen Synapsen, trotz zahlreicher Unterschiede in Form und Funktion, recht ähnlich sind. (Brandstätter et al., 1996; von Kriegstein et al., 1999). Die einzigen feststellbaren Unterschiede zwischen Ribbon- und konventionellen Synapsen sind, dass Ribbons „Syntaxin III“ anstatt „Syntaxin I“ zur Fusion benutzen (Morgans et al., 1996); L-Typ -, anstatt N-, P/Q-, oder R-Typ Kalziumkanäle besitzen (Heidelberger und Matthews, 1992; Nachman-Clewner et al., 1999) und dass Ribbons nicht in allen Spezies das Protein „Rabphilin“ und „Synapsin I“ enthalten (Mandell et al., 1990; von Kriegstein et al., 1990). All diese Unterschiede bewiesen sich funktionell jedoch als bedeutungslos. Durch Studien mit „Knock-out Mäusen“ konnte weder eine phänotypische Veränderung bei der Abwesenheit von „Rabphilin“ in konventionellen Synapsen (Schlüter et al., 1999), noch eine Änderung der synaptischen Übertragung beim Fehlen von „Synapsin I“ in Photorezeptorsynapsen gezeigt werden (Geppert et al., 1994).

Im Jahre 2000 gelang es Prof. F. Schmitz und seiner Arbeitsgruppe das Protein RIBEYE (RIB für synaptische Ribbons und EYE für Auge als Ursprungsgewebe) als Hauptbestandteil der Ribbonsynapsen zu identifizieren. RIBEYE ist ein ca. 984 - 988 Basenpaar (BP) langes und ca. 120 kDa grosses Protein, dessen Aminosäureanalyse von Rindern, Menschen und Ratten ein aus zwei unterschiedlichen Domänen bestehendes Protein ergab: Eine ca. 565 BP lange, Serin und Prolin reiche, N-terminale A-Domäne und eine aus ca. 420 BP bestehende, C-terminale B-Domäne. Die anfängliche Theorie, dass Ribbons primär membranöser Struktur sind wurde dadurch verworfen (Schmitz et al., 2000).

Nachforschungen in Protein-Datenbanken zeigten, dass die A-Domäne nicht homolog zu einem in der Datenbank verzeichneten Proteine war. Die Struktur der B-Domäne hingegen war nahezu identisch mit CtBP₂, welches zusammen mit CtBP₁ eine Familie von Transkriptionsrepressoren ausmacht (Schaeper et al., 1995; Katsanis and Fisher, 1998; Poortinga et al., 1998; Turner and Crossley, 1998; Zhang and Levine, 1990). Der Name „CtBP“ setzt sich zusammen aus: C-terminal binding protein for the adenovirus E1A-protein. CtBP₂ ist dabei lediglich eine Klonstruktur von CtBP₁ und funktionell homolog zu ihr.

Bis auf die letzten 20 N-terminalen Aminosäuren enthält die B-Domäne die komplette Sequenz von CtBP₂. Genomanalysen von RIBEYE brachten letztendlich hervor, dass beide Domänen vom selben Gen transkribiert werden, RIBEYE somit ein Fusionsprotein ist und dass CtBP₂ präexistent ist. (Clone RP11-114N8; Gen-Bank accession number AC013533). Durch fünf weitere beweisführende Linien konnte bestätigt werden, dass die Fusion der Ribbon spezifischen A-Domäne mit der als Transkriptionsfaktor bekannten B-Domäne kein Klonierungsartefakt darstellt, sondern dass dies eine evolutionäre neue Komponente der synaptischen Ribbons ist. Die A-Domäne hat vermutlich die Fähigkeit, Aggregate zu formen und für die Ausbildung stabiler Ribbonstrukturen zu sorgen, während die B-Domäne auf der Oberfläche der Ribbons präsentiert wird. Da der B-Domäne noch eine enzymatische Aktivität der NAD⁺ abhängigen 2-Hydroxysäure Dehydrogenase nachgewiesen werden konnte, kann gemutmaßt werden, dass diese Untereinheit als Enzym in der synaptischen Vesikelvorbereitung und als transkriptionaler Repressor eine wichtige Rolle spielt (Schmitz et al., 2000).

Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation der A- und B-Domäne erbrachten sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene das Resultat, dass die A-Domäne nur in der Retina, die B-Domäne jedoch ubiquitär (Retina, Herz, Leber, Gehirn, Niere, Lunge und Milz) nachweisbar war. Die gegen die B-Domäne eingesetzten Antikörper detektierten, neben ihrem eigentlichen Antigen, ein zusätzliches ca. 50 kDa grosses Protein, welches dem CtBP₂ entspricht (Schmitz et al., 2000).

Letztendlich stellte sich jedoch durch Doppel-Immunhistochemie Färbungen mit boviner Retina heraus, dass RIBEYE mit seinen beiden Untereinheiten eine spezifische Komponente der synaptischen Ribbons darstellt. Die A- und die B-Domäne konnten wie erwartet, sowohl in der IPL, als auch in der OPL mit ihrem für synaptische Ribbons charakteristischen, diskret gepunktetem Muster nachgewiesen werden (Schmitz et al., 1996; Wang et al., 1997).

Doppelimmunfärbungen mit Antikörpern gegen Synaptophysin, ein synaptischer Vesikelmarker und somit spezifisch für synaptische Endigungen (Navone et al., 1986) und Antikörper gegen RIBEYE stimmten damit überein, dass zum einen die OPL mit präsynaptischen Endigungen voll ist (Geppert et al., 1994) und zeigten zum andern, dass alle RIBEYE-Punkte (Signale) in Synaptophysin positiven Endigungen lokalisiert waren (Schmitz et al., 2000). Das Protein RIBEYE ist nicht nur das Hauptprotein der synaptischen Ribbons, sondern ist auch einzigartig für die Ribbonsynapse, da es in konventionellen Synapsen nicht nachgewiesen werden konnte (Schmitz et al., 2000; Wan et al., 2005).

Trotz all der oben genannten Fakten ist nicht davon aus zu gehen, dass das Protein RIBEYE eine generelle synaptische Komponente ist. Weder Immunhistochemische Blots auf Protein-, als auch auf mRNA Ebene von Hirngewebe konnten einen Beweis für die generelle Anwesenheit im Synapsengewebe erbringen. Lediglich bei Immunfärbungen mit Gewebe der Pinealisdrüse und in Haarzellen der Cochlea konnte in präsynaptischen Strukturen ein starkes positives Färbesignal für RIBEYE erbracht werden (Smith and Sjöstrand, 1961; Hopus and Arstila, 1964; Jastrow et al., 1997; Lenzi et al., 1999).

4.2 Physiologische Eigenschaften der Ribbonsynapse

Nach physiologischen Gesichtspunkten betrachtet nimmt die Ribbonsynapse eine besondere Stellung in der neuronalen Signalübertragung ein. Immunhistochemischer Studien zu Folge ähnelt der Aufbau der Ribbonsynapse sehr dem von konventionellen Synapsen (Brandstätter et al., 1996; von Kriegstein et al., 1999). Die synaptischen Vesikel scheinen vom selben Protein gebildet zu werden und der Mechanismus der Kalzium getriggerten Exozytose der synaptischen Vesikel unterliegt ebenfalls demselben, wie bei konventionellen Synapsen (Morgans et al., 1996; Nachman-Clewner et al., 1999). Die Ribbons selbst scheinen sich wahrscheinlich nicht aus den bekannten Bestandteilen konventioneller Synapsen entwickelt zu haben (Schmitz et al., 2000). Die Menge der freigesetzten Vesikel ist somit vom Grad der Depolarisierung der Photorezeptoren bzw. Bipolarzellen und dem damit verbundenen Kalziumeinstrom in die präsynaptische Membran abhängig (De Vries und Baylor, 1993).

In elektrophysiologischen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass Ribbonsynapsen, im Gegensatz zur phasischen Aktivität konventioneller chemischer Synapsen, zur permanenten, tonischen Glutamat Transmitter-freisetzung in der Lage sind (DeVries und Baylor, 1993). Diese tonische Freisetzung von Vesikel erlaubt der Ribbonsynapse einen kontinuierlichen Fluss von Informationen und kann über ein weites Spektrum sehr fein moduliert werden (Dowling, 1987).

Eine weitere Besonderheit dieser speziellen Synapsen ist die hohe Rate der Vesikelfreisetzung und deren ausgeprägte Fähigkeit der Modulation. Bei moderatem Kalziumspiegel wird eine Freisetzung von ca. 50 Vesikeln/sec induziert. Bei maximaler Kalzium Konzentration sind Ribbons jedoch in der Lage bis zu 500 Vesikel/sec freizusetzen (Rieke und Schwarz, 1996; von Gersdorff et al., 1996).

Im Vergleich zur maximalen Exozytose von bis zu 20 Vesikel/sec, wozu konventionelle hippocampale Synapsen in der Lage sind, ist dies eine bemerkenswerte Leistung (Stevens und Tsujimoto, 1995).

Ribbonsynapsen retinaler Bipolarzellen sind durch eine kompensatorische Endozytose in der Lage, innerhalb von 1-2 sec. nach Exozytose eine komplette Wiederherstellung der Membranoberfläche wieder durchzuführen (von Gersdorff et al., 1996). Diese besondere physiologische Eigenschaft schreibt man den Ribbons zu. Durch ihren kanulären Aufbau stellen sie ein „förderbandartiges“ Transportvehikel dar, welche die mit Transmittern beladenen Vesikel binden und einen kontinuierlichen und v.A. schnellen Transport zwischen dem Zytoplasma und der aktiven Zone der synaptischen Membran gewährleisten (Gray und Pease, 1971). Neuere Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass es sich bei den exozytierten Vesikeln um drei verschiedene Populationen handelt.

Die erste Population bezeichnet man als „Rapidly Releasable Pool“ (RRP). Sie befindet sich direkt an der aktiven Zone und ist somit zur sofortigen Exozytose bereit. Zur Freisetzung dieser Population bedarf es nur eines geringen Kalziumeinstroms. Die zweite Population ist von der aktiven Zone weiter entfernt. Sie dient als Vesikelnachschub für die erste Population und werden als „Reserve Pool“ (RP) bezeichnet. Hierfür ist eine weitaus höhere Konzentration an Kalziumionen erforderlich. Die dritte Population besteht aus der Gesamtheit der Vesikel im Photorezeptor-Terminal und dient als Reservoir der zweiten Population (von Gersdorff et al, 1996).

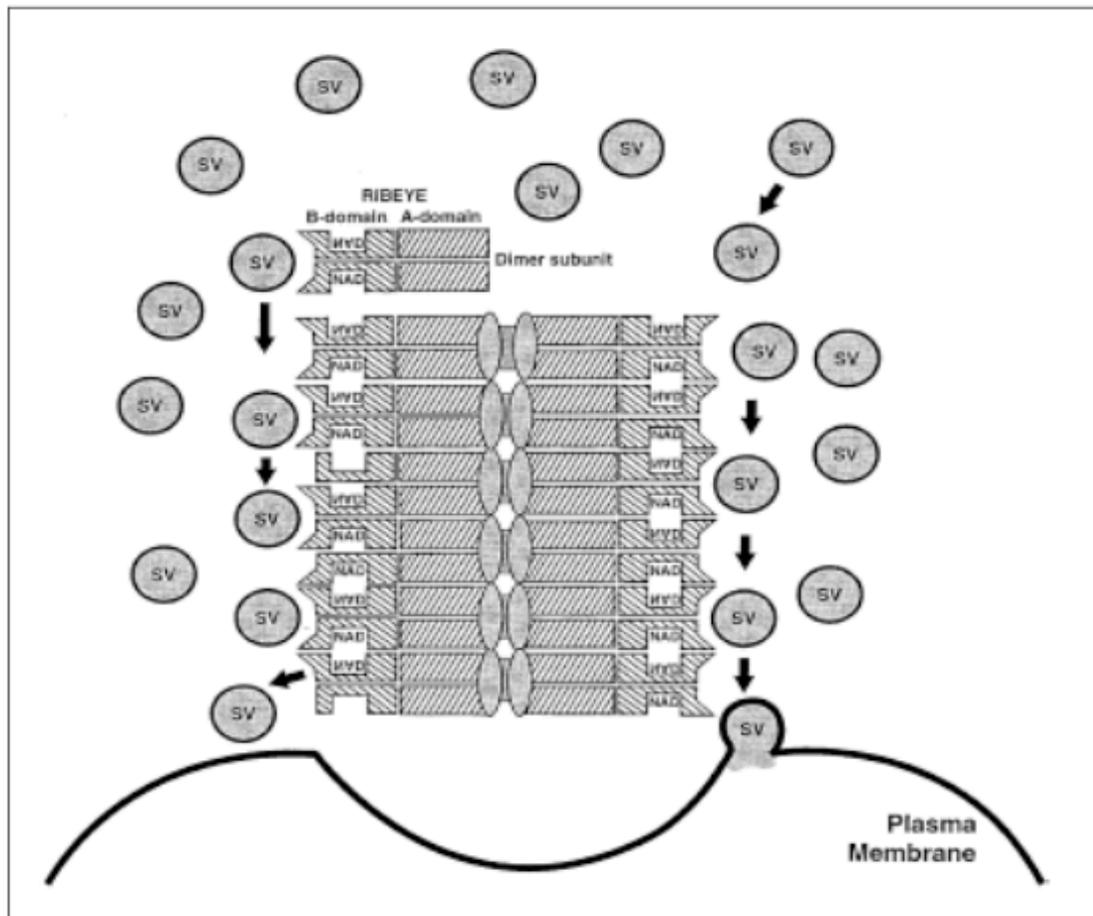


Abbildung 3: Funktionsmodell synaptischer Ribbons mit RIBEYE als wesentliche Proteinkomponente in präsynaptischen Nervenendigungen (nach Schmitz et al., 2000);
SV = synaptische Vesikel

Mit diesen speziellen physiologischen Eigenschaften können Ribbonsynapsen die visuellen und akustischen Signale mit einem Grad der Diskrimination zur Verfügung stellen, der vor allem für den optischen und auch den akustischen Sinn einmalig ist. Hierdurch bekommt die Ribbonsynapse die höchste Wichtigkeit für eine normale cerebrale Funktion. Sie versetzt diese hoch entwickelten Sinnesorgane in die Lage eine nicht nur schnelle, sondern auch effektive und auch kapazitätsreiche Erregungsübertragung zu ermöglichen (von Gersdorff et al., 1996).

5. Markerproteine aus der immunhistochemischen Untersuchung

5.1 Synaptophysin

Synaptophysin ist ein ca. 38 kDa schweres, aus vier transmembranen Domänen bestehendes integrales Glykoprotein, welches hoch spezifisch für synaptische Vesikel ist.

Man findet es in so gut wie allen neuroendokrinen Zellen vor, an denen eine synaptische Übertragung stattfindet. Vorzugsweise natürlich im Gehirn, Rückenmark und in der Retina.

In den Synapsen selber geht Synaptophysin zusammen mit Synaptobrevin einen Komplex ein, welcher in der Lage ist die synaptische Aktivität zu moduliert. Zum einen wird die Interaktion dieser beiden Proteine während der neuronalen Entwicklung hochreguliert (Becher et al., 1999) und zum anderen nimmt der Synaptophysin- / Synaptobrevin-Komplex unter der Bedingung einer lange anhaltenden synaptischen Überaktivität zu, was bereits im Kindlingmodell der Ratte gezeigt wurde (Hinz et al. Eur. J. Cell Biol. 80, 615-619, 2001). Trotz der bereits erhaltenen Erkenntnisse ist die genaue Funktion dieses Proteins bis heute noch unbekannt. In Tierversuchen mit inaktiviertem Synaptophysin-Gen konnte kein Unterschied zu einer normalen synaptischen Übertragung herausgearbeitet werden (Wikipedia.com; synaptophysin).

Aufgrund der oben genannten physiologischen Eigenschaften ist Synaptophysin ein hoch spezifisches Protein für synaptische Vesikel / Vesikeltransport, weshalb es in der hier vorliegenden Forschungsarbeit als Referenzprotein für die Lokalisation von synaptischen Vesikeln verwendet wurde. Bereits in vorangegangenen Studien (Kriegstein et Schmitz, 2003) hat sich Synaptophysin als ein nützlicher und zuverlässiger Marker für die Synaptogenese erwiesen.

5.2 NCAM

Der Begriff NCAM leitet sich aus dem Englischen ab und beschreibt eine Gruppe von Proteinen, die die sog. Zell-Zell-Adhäsion im tierischen Gewebe vermitteln (engl. nerve-cell-adhesion molecule). Hierbei handelt es sich um integrale Membranproteine, welche über die Zelloberfläche exprimiert werden und deren grundlegende Funktion es ist den Zusammenhalt von Gewebe zu ermöglichen und die Kommunikation der Zellen untereinander zu gewährleisten. Neuronale Zellerkennungsmoleküle werden aufgrund molekularstruktureller Merkmale in vier Hauptfamilien eingeteilt: Cadherine, Integrine, extrazelluläre Matrixmoleküle und Immunglobulin-(Ig-)Superfamilie, zu welcher die NCAMs gehören. Die Moleküle der NCAM-Familie bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die fünf Ig-Domänen enthält und entweder über Phosphatidylinositol in der Zellmembran verankert oder über eine Transmembrandomäne mit ihr verbunden ist (Cunningham et al., 1987).

Die Art der Befestigung an der Zellmembran und die Länge der intrazellulären Domäne sind strukturelle Faktoren und haben einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionsweise dieser Moleküle (Übersichtsartikel: Fields & Itoh, 1996). Durch alternative Spleißvorgänge entstehen die drei Hauptformen NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 (Cunningham et al., 1987), wobei durch seltenere Spleißvorgänge in der intrazellulären Domäne wiederum weitere 18 Isoformen entstehen können (Santoni et al., 1987), welche sich in der Art der Membranassoziation sowie im Vorhandensein von bestimmten extrazellulär Mikroexons unterscheiden (Goodman, 1996).

NCAM stellt ein typisches Beispiel für ein neuronales Erkennungsmolekül dar, da es sowohl im sich entwickelnden, als auch im ausgereiften Nervensystem stark exprimiert wird. Aufgrund seiner ausgeprägten Exprimierung und der ebenfalls hohen Spezifität für neuronales Gewebe, eignet sich NCAM hervorragend für Lokalisationsstudien mittels Immunfloreszenz im sich noch entwickelnden Nervengewebe.

Die Detektion der NCAM Moleküle in der hier vorliegenden Arbeit erfolgte über HNK-1, welches ein Kohlenhydratepitop von NCAM ist (Horstkorte R., 1993).

5.3 CtBP2

Die Bezeichnung „CtBP“ leitet sich aus dem Englischen ab und steht für: C-terminal binding protein for the adenovirus E1A-proteini. Sie beschreibt eine Familie von Transkriptionsrepressoren (Schaeper et al., 1995; Katsanis and Fisher, 1998; Poortinga et al., 1998; Turner and Crossley, 1998), deren Genort bei Mäusen auf Chromosom 7 und bei Menschen auf Chromosom 10 liegt. Das Genprodukt liefert zwei Proteine. Zum einen CtBP₁, welches ein Transkriptionsrepressor darstellt und zum anderen das ca. 49 kDa schwere Protein CtBP₂, eine vollständige Komponente des von mir untersuchten Proteins, RIBEYE. Analysen von Gendatenbanken haben gezeigt, dass CtBP₂ eine Klonstruktur mit 72%iger Ähnlichkeit zu CtBP₁ ist und bis auf die letzten 20 N-terminalen Aminosäuren in der kompletten Sequenz der B-Domäne von RIBEYE enthalten ist.

Wegen seiner Integrität in der B-Domäne von RIBEYE und somit seiner Koexistenz in der Ribbonsynapse, stellt CtBP₂ ein ausgezeichnetes Epitop für kontrollführende Immunfluoreszenzen dar. Es bietet sich somit die Möglichkeit die Entwicklung der Ribbonsynapse und des synaptischen Proteins RIBEYE mittels zwei unterschiedlicher Antikörper zu dokumentieren.

6. Zielstellung dieser Arbeit

Umfangreiche lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Studien dokumentierten bereits die Entwicklung von retinalen Ribbons und konventionellen Synapsen in der Mäuseretina (Olney 1968; Grün 1980).

In einer Forschungsarbeit über die Expression von synaptischen Membranproteinen an Ribbonsynapsen in der Mäuseretina (K. Kriegstein et F. Schmitz, 2003) konnte man bereits erkennen, dass die Bildung der Ribbonsynapse ein mehrschrittiger Prozess ist und dass die synaptischen Membranproteine zwar nicht zur selben Zeit exprimiert werden, diese aber in einem Zeitfenster zwischen dem vierten und fünften Tag nach der Geburt (P4 und P5) an den Ribbonsynapsen in Erscheinung treten. Dies geschah zeitgleich mit der Formierung der OPL, welche sich aus der oNBL (äußere neuroblastenschicht) entwickelte. Ein genauer Fokus auf die Expression von „RIBEYE“ selber wurde dabei jedoch nicht gelegt.

In der hier vorliegenden Forschungsarbeit habe ich das synaptische Protein „RIBEYE“ als Referenzprotein für die Lokalisation der synaptischen Ribbons durch immunhistochemische Färbungen gewählt.

Im Gegensatz zu anderen Studien, in denen nur einzelne Stadien der retinalen Entwicklung von synaptischen Ribbons beleuchtet wurden, konzentriert sich diese Studie auf eine kontinuierliche Entwicklungsanalyse vom Tag der Geburt (P0) bis zur letztendlichen Ausreifung der Retina. Durch den Einsatz von Doppelimmunfluoreszenzen soll ein genauer Bezug der synaptischen Ribbons zur Prä- und Postsynapse, sowohl zum Beginn der Synaptogenese, als auch bei deren Fertigstellung hergestellt werden.

Zielstellung dieser Arbeit

Zu diesem Zweck wurde eine Versuchsreihe mittels Kryoschnitten an Mäuseretina durchgeführt. Es soll untersucht werden, ob das synaptische Protein „RIBEYE“ bereits ab dem Tag der Geburt exprimiert wird und ob ein kontinuierlicher Wachstumsverlauf zu verzeichnen ist.

Der besondere Fokus liegt dabei auf den Ribbonsynapsen in der OPL, da diese zum einen größer sind und zum anderen in höherer Dichte vorhanden sind als in der IPL.

7. Material und Methoden

7.1 Untersuchungsmaterial und Versuchstiere

Für die Untersuchung der postnatalen Entwicklung der Ribbonsynapsen in der Retina wurden Mäuse des Auszuchtstammes Black-6-N verwendet. Da die zu untersuchenden Rezeptorproteine in Vorarbeiten bereits bei beiden Geschlechtern ubiquitär in der Netzhaut nachgewiesen wurden, ist dieser Punkt in dieser Studie nicht weiter berücksichtigt worden. Folgende Alters- und Entwicklungsstadien wurden dabei unterschieden.

Stadienbezeichnung	Entwicklungsstadium
P 0	Tag der Geburt
P 01	1. postnataler Tag
P 02	2. postnataler Tag
P 03	3. postnataler Tag
P 04	4. postnataler Tag
P 05	5. postnataler Tag
P 06	6. postnataler Tag
P 07	7. postnataler Tag
P 08	8. postnataler Tag
P 09	9. postnataler Tag
P 10	10. postnataler Tag
P 13	13. postnataler Tag
P 17	17. postnataler Tag
Adult	> 3 Wochen

Tabelle 1: Auflistung der untersuchten Entwicklungsstadien

Die Tiere wurden aus dem Medizinisch- Experimentellen- Zentrum der Universität des Saarlandes bezogen und in das Anatomische Institut (Abteilung Neuroanatomie) der Universität des Saarlandes gebracht. Die Tiere wurden immer in einem konstanten 12 Stunden hell / 12 Stunden dunkel Zyklus gehalten und am Morgen (ca. 10.00 Uhr) präpariert. Die hochträchtigen Mäuse wurden morgens und abends kontrolliert. Im Falle der erfolgten Geburt, wurde der Wurf bis zum nächsten Tag bei der Mutter belassen und dann als Stadium P1 präpariert. Die Tierhaltung erfolgte entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen.

7.2 Materialliste

Produkt	Hersteller
Acrylamid	Roth
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth
Anti-CtBP2	SIGMA-ALDRICH
Anti-HNK-1	SIGMA-ALDRICH
Anti-Synaptophysin	SIGMA-ALDRICH
Axiovert 200 M (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss
AxioCam MRm (Fluoreszenzkamera)	Zeiss
β -Mercaptoethanol	Roth
Biofuge fresco (Kühlzentrifuge)	Heraeus
Blot Papier	GE healthcare
Bromphenolblau	Roth
Chemiedoc XRS system	Bio-Rad
Chicken Alexxa 488	Molecular Probes
Deckgläser (diverse Größen)	Roth

Produkt	Hersteller
Dosierpipette	Eppendorf
ECL-1 (Chemielumineszenzlösung)	Amersham
ECL-2 (Chemielumineszenzlösung)	Amersham
Filter Sterilisation (Wasser)	Millipore
GAR-Cy 3	ZYMED Laboratories
GAR-Cy 2	Millipore
GAM Pox	SIGMA-ALDRICH
GAR Pox	SIGMA-ALDRICH
Glycerol	Roth
Isopropanol	Roth
Kryostat	Leica
Kühlkammer	Heraeus
Luminol	Roth
Magermilchpulver	Roth
Magnetrührer	Neolab
Objektrührer	Roth
pH-Meter	Inolab
Polyacrylamid Gel System	GE healthcare
Ponceau-S	Roth
Polypropylen Gefäße (untersch. Größen)	Greiner bio-one
Power pack für Gel System	GE healthcare
Präzisionswaage	Sartorius
PVDF Membran	GE healthcare
Schüttelapparat	Behr
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Roth

Produkt	Hersteller
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck
Thermomixer	Eppendorf
TRIS (Trizma base)	SIGMA-ALDRICH
Trichloressigsäure (Pulver)	Roth
TSL-4000	Schmitz et. al
U2656	SIGMA-ALDRICH
Vortex	VWR International
Western Blot Transfer Apparat	Hoefel scientific instrument

Tabelle 2: Verwendete Materialien

7.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Inhalt
PBS (Phosphate-Buffered-Saline)	40,0 g NaCl 1,0 g KCl 7,2 g Na ₂ HPO ₄ 1,2 g KH ₂ PO ₄ Mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen
Transfer-Puffer Western-Blot	15,125 g Tris 72,05 g Glycin 1000 ml Methanol Mit destilliertem Wasser auf 5 Liter auffüllen
SDS-Elektrophorese Puffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 1,0 g SDS

Bezeichnung	Inhalt
SDS Probenpuffer	1,6 g SDS 4 ml β -Mercaptoethanol 2 ml Glycerol 2 ml 1M Tris, pH 7,0 4 mg Bromphenolblau 2 ml destilliertes Wasser
Ponceau S Färbelösung	0,5 g Ponceau S 3 g Trichloressigsäure In 100 ml destilliertem Wasser lösen

Tabelle 3: *Verwendete Puffer und Lösungen*

8. Immunfluoreszenz

8.1 Allgemeine Bemerkungen zur Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz stellt einen Seitenzweig der Immunhistochemie dar und ist eine sehr elegante Methode, durch die Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Damit kann z.B. bestimmt werden, in welchem Gewebe das Protein vorhanden ist und auch in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist.

Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer gewissen Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Um den Antikörper im späteren Präparat sichtbar zu machen ist er mit einem Detektionssystem (Enzym oder fluoreszierende Farbstoffe) gekoppelt. Der Antikörper, der gegen das zu findende Epitop gerichtet ist, wird als Primärantikörper bezeichnet und sollte sich durch hohe Spezifität und Affinität auszeichnen um Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen zu vermeiden.

Der Nachweis von Antigenen kann auf direktem oder auf indirektem Wege erfolgen.

8.2 Direkte Immunfluoreszenz

Bei der direkten Immunfluoreszenz bindet ein antigen-spezifischer Antikörper (Primärantikörper) an das entsprechende Antigen und markiert es. Nicht gebundene Antikörper lassen sich wieder auswaschen.

8.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Im Gegensatz zur direkten Methode zeichnet sich die indirekte Immunfluoreszenz dadurch aus, dass das Markermolekül nicht an den Primärantikörper (1. AK), sondern an einen gegen den Primärantikörper gerichteten spezifischen Sekundärantikörper (2. AK) gebunden ist. Dieser identifiziert den „Antigen-Primärantikörper-Komplex“.

Bei der Negativprobe wird der Primärantikörper weggelassen und das zu untersuchende Gewebe nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Somit kann untersucht werden, ob der Fluoreszenz markierte Sekundärantikörper unspezifisch im Präparat bindet.

Aufgrund der mit der Kopplung des Markermoleküls an den Primärantikörper häufig einhergehende Beeinträchtigung der Funktion des Antikörpers, wird die indirekte Immunfluoreszenz der direkten Immunfluoreszenz vorgezogen. Desweiteren ist die indirekte Immunfluoreszenz um ein Vielfaches empfindlicher als die direkte Methode, da mehrere markierte Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können und es somit zu einer Signalverstärkung kommt.

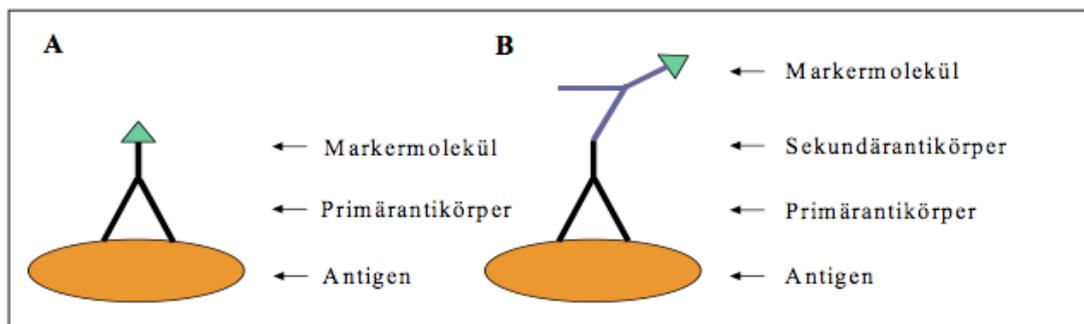


Abbildung 4: Schematische Darstellung der direkten und der indirekten Immunfluoreszenz

Bild A: Direkte Immunfluoreszenz. Der markierte Primärantikörper bindet direkt an das Antigen.

Bild B: Der Primärantikörper bindet an das Antigen. Der markierte Sekundärantikörper, bindet an den Primärantikörper.

8.4 Durchführung der Immunfloreszenz

Zur Darstellung des synaptischen Proteins RIBEYE in der Mäuseretina wurden die angefertigten Kryoschnitte, immunhistochemisch eingefärbt. Dazu wurden die in der Tabelle 2 aufgeführten Primärantikörper und in der Tabelle 3 aufgeführten Sekundärantikörper in den entsprechenden Verdünnungen verwendet. Als Verdünnungsmedium diente 1%ige PBS Lösung.

Alle zu verarbeitenden Schnitte des jeweiligen Stadiums wurden parallel verarbeitet, um die Färbebedingungen möglichst konstant zu halten.

Für die Negativkontrolle wurde anstatt des Primärantikörpers die selbe Menge an PBS verwendet. Alle folgenden Schritte blieben identisch.

Bei der Mehrfachdetektion wurde darauf geachtet werden, dass die Sekundärantikörper gegen eine andere Spezies präadsorbiert sind. Die Cy2- und Cy3-markierten Fluorochrome sind neben den Alexa 488 Fluorochromen am stabilsten und wurden aus diesem Grund bevorzugt verwendet.

Verwendete Primärantikörper

Antigen	Antikörper	Optimale Verdünnung	Tierart	Hersteller
Ribeye	U2656	1/500	Kaninchen (monoklonal)	SIGMA-ALDRICH
Synaptophysin	Anti-Synaptophysin	1/250	Maus (monoklonal)	SIGMA-ALDRICH
HNK-1	Anti-HNK-1	1/250	Maus (monoklonal)	SIGMA-ALDRICH
CtbP ₂	Anti-CtbP ₂	1/250	Maus (monoklonal)	SIGMA-ALDRICH

Tabelle 4: Schematische Darstellung der verwendeten Primärantikörper.

Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Antikörper	Optimale Verdünnung	Tierart	Hersteller
Kaninchen Ig's	GAR-Cy3	1/1000	Ziege	ZYMED Laboratories
Maus Ig's	Chicken Alexxa 488	1/1000	Hühnchen	Molecular Probes
Maus Ig's	GAM-Cy2	1/1000	Ziege	Millipore

Table 5: Schematische Darstellung der verwendeten Sekundärantikörper.

8.4.3 Durchführung der Einzel-Immunfluoreszenz

Vor der immunhistochemischen Verarbeitung wurde eine zweite Hitzefixierung der Kryoschnitte für 20 Minuten bei 45 °C durchgeführt. Nach Abkühlen der Objektträger wurde der Primärantikörper mit einer Eppendorf Pipette, in einem Volumen von 50µl pro Schnitt, auf den Objektträger aufpipettiert und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die feuchte Kammer wurde ausreichend mit destilliertem Wasser benetzt, um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern.

Nach erfolgreicher Inkubation wurden die Schnitte 3x für je 5 Minuten in PBS gewaschen um die nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Da es beim Waschen in einer Waschwanne häufig zur Ablösung der Kryoschnitte von den jeweiligen Objektträgern kam, wurden die Waschschrte per Hand durchgeführt. Hierfür wurden pro Waschgang jeweils 1,5 ml PBS auf die Objektträger auf- und später wieder abpipettiert.

Nach dem ersten Waschgang wurde die Objektträger trocken getupft und mit jeweils 50µl des Sekundärantikörper pro Schnitt für 1,5 Stunden, in einer feuchten Kammer, bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Sekundärantikörper und um das Hintergrundsignal möglichst gering zu halten, wurde die Waschzeit in PBS im zweiten Waschschrift auf 3 x 7 min erhöht.

Um das frühzeitige Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden, wurden auf die Schnitte jeweils 20 µl NPG gegeben und mit einem Deckglas eingedeckelt worden. Zur Stabilisierung ist das Deckglas am Rand mit schnelltrocknendem Nagellack fixiert worden. Die so hergestellten Präparate wurden bis zur mikroskopischen Untersuchung und digitalen Dokumentation bei 4 °C im Kühlraum, in einer Präparatmappe, aufbewahrt.

8.4.4 Durchführung der Doppel-Immunfluoreszenz

Um die Koloalitionen jeweils zweier Proteine innerhalb der sich entwickelnden Retina darstellen zu können, wurden Doppel-Immunfluoreszenzen durchgeführt.

Alle weiteren Schritte entsprechen denen der beschriebenen Abläufe für die Einfachfluoreszenz mit indirekter Immunfluoreszenz.

8.5 Auswertung der Immunfluoreszenz

Zur Analyse der Proteinverteilung in den fluoreszierenden Präparaten wurden Aufnahmen mit einer an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Kamera (AxioCam MRm) angefertigt. Die Aufnahme und Digitalisierung der Fluoreszenzbilder wurden mit dem Programm „AxioVision“ im „.zvi“ Format aufgenommen.

9. Western-Blot Untersuchung

9.1 Präparation der Retina

Die Tiere wurden mittels Äthernarkose betäubt und bei Eintritt vollständiger Areflexie mit einem Scherenschnitt decapitiert. Sodann wurden zügig und bei größter Vorsicht die Bulbi von frontal aus der Augenhöhle in toto enukleiert. Unter dem Lichtmikroskop folgte eine Stichinzision in die Cornea, um den gallertartigen Glaskörper vorsichtig zu entfernen und um die Retina möglichst in einem Stück zu entnehmen. Die beschriebene Präparation erfolgte unter dem Lichtmikroskop, in einer mit 1%igen PBS gefüllten Petrischale.

9.2 Probenvorbereitung

Direkt nach Präparation der Netzhäute aus den Stadien P 01, P 02 und adult wurden die Netzhäute eines jeden Stadiums mit 30 µl SDS-Puffer versehen und in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen für 15 Minuten bei 96 °C und 800 U/min im Thermoschüttler hitzedenaturiert.

Von dem verwendeten TSL 4000 wurden 30µl Proteinlösung mit 10µl SDS-Puffer versehen und ebenfalls in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen für 15 Minuten bei 96°C und 800 U/min im Thermoschüttler hitzedenaturiert. Nach erfolgreicher Denaturierung wurden die Reaktionsgefäße für 1 Minute bei 13000 U/min zentrifugiert und der erhaltene Überstand mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Die verwendeten Volumina sind dem Auftragschema (Tabelle 7) zu entnehmen.

Da der Blot im Verlauf mit unterschiedlichen Antikörpern behandelt werden sollte, wurde im Gel jeweils eine Spur zwischen den Taschen mit Probepuffer befüllt.

9.3 Trenngel

Das Trenngel wurde blasenfrei bis unter den Gestellrand eingefüllt und mit 200 µl Isopropanol überschichtet, was das Austrocknen des oberen Gelrandes verhinderte.

9.4 Sammelgel

Nach Konsistenzzunahme des Trenngels wurde das Isopropanol angegossen und die Geloberfläche mit destilliertem Wasser gespült. Kämme wurden eingesteckt und nach dem Beladungsschema (siehe Tabelle 2) beladen.

Gelbestandteile	Trenngel 10%ig	Sammelgel
Dest. H ₂ O	1 ml	3,15 ml
1 M Tris pH 8,8	1,27 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	1,25 ml
30% Acrylamid	1,67 ml	0,5 ml
10% SDS	50 µl	50 µl
50% Glycerol	1 ml	-
TEMED	3,3 µl	5 µl
10% APS	25 µl	37,5 µl
Gesamtvolumen	5 ml	5 ml

Tabelle 6 : Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele

9.5 Proteintransfer mit dem Nassblot-Verfahren

Die Proteinbanden wurden im Anschluss auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (BioRad) transferiert.

Der Transfer der Proteine erfolgte bei 100 V für 70 min.

Nach erfolgter Übertragung wurde die Membran kurz in destilliertem Wasser gespült.

Durch die darauffolgende reversible Färbung der Membran in 2%iger Ponceau-S-Lösung (2-3 min) konnte der erfolgreiche Transfer der Proteine, sowie die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung dargestellt werden. Überschüssige Ponceau-S-Lösung wurde mit destilliertem Wasser entfernt und die Intensität der Färbung mit dem „Chemidoc XRS System“ dokumentiert.

Durch die in der Färbelösung enthaltenen Trichloressigsäure kommt es zu einer zusätzlichen Fixierung der Proteine auf der Membran.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden wurden die Membranen für eine Stunde in frisch angesetzter 5%iger Magermilch/PBS-Lösung geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C im Kühlraum. Die jeweiligen Primärantikörper wurden in den entsprechenden Verdünnungen (siehe Tabelle 2) in einem Volumen von mindestens 10 ml 5%iger Magermilch/PBS-Lösung angesetzt, möglichst Luftblasen frei zusammen mit den Membranen in Plastikfolie eingeschweißt und auf einen Schütteltisch der Marke (Edmund Bühler Labortechnik) gelegt. Nicht gebundene Primärantikörper wurden danach durch dreimaliges, je 5-münütiges Waschen in PBS entfernt. Anschließend wurden die Membranen für 1 Stunde nach demselben Prinzip mit den Sekundärantikörpern in der entsprechenden Verdünnung, bei Raumtemperatur, auf einem Schütteltisch inkubiert. Nach erneutem dreimaligen, je 5-münütigem Waschen in PBS erfolgte die Visualisierung des Primär-/Sekundär-Antikörper-Komplexes. Dafür wurde der Membran ein Gemisch aus je 2 ml ECL-1 und 2 ml ECL-2 Lösung zugesetzt und die entstandene Chemolumineszenz mittels (Chemidoc XRS System) dokumentiert.

9.6 Stripping der Blot-Membranen

Um die Nitrozellulosemembranen mit den gebundenen Proteinen für weitere Detektionen verwenden zu können, wurden die gebundenen Antikörper mittels Blot-Stripping entfernt.

Hierfür wurde eine 1%ige SDS-PBS Lösung aufgeköcht und mit 1 ml β -Mercaptoethanol versehen. Nach Hinzugabe der Blots, erfolgte die Inkubation unter leichtem Schütteln für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Bevor die erneute Inkubation mit einem anderen Primärantikörper durchgeführt werden konnte, wurden die Blots je 3 x 5 min in PBS gewaschen und danach für eine Stunde in frisch angesetzter 5%iger Magermilch/PBS-Lösung bei Raumtemperatur geblockt.

9.7 Auftragschemata der Blot-Membran

Spalte	Inhalt	Protein	Aufgetragene Menge (μ l)	Primär Antikörper	Verdünnung	Sekundär Antikörper	Verdünnung
1	Proteinmarker		10				
2	SDS-Puffer		20				
3	Maus Retina P1	4 x Retina	40	U 2656	1 / 5000	GAR POX	1 / 10000
4	SDS-Puffer		20				
5	Maus Retina P2	6 x Retina	40	U 2656	1 / 5000	GAR POX	1 / 10000
6	SDS-Puffer		20				
7	Maus Retina adult	2 x Retina	40	U 2656	1 / 5000	GAR POX	1 / 10000
8	SDS-Puffer		20				
9	TSL 4000	Ribeye Fraction	30	U 2656	1 / 5000	GAR POX	1 / 10000

Table 7: Schematische Darstellung der Bandenbeladung der Blot-Membran und der verwendeten Antikörper.

Material und Methoden

Spalte	Inhalt	Protein	Aufgetragene Menge in (μ l)	Primär Antikörper	Verdünnung	Sekundär Antikörper	Verdünnung
1	Proteinmarker		10				
2	SDS-Puffer		20				
3	Maus Retina P1	4 x Retina	40	Anti-HNK-1	1 / 3000	GAM POX IgM	1 / 10000
4	SDS-Puffer		20				
5	Maus Retina P2	6 x Retina	40	Anti-HNK-1	1 / 3000	GAM POX IgM	1 / 10000
6	SDS-Puffer		20				
7	Maus Retina adult	2 x Retina	40	Anti-HNK-1	1 / 3000	GAM POX IgM	1 / 10000
8	SDS-Puffer		20				
9	TSL 4000	Ribeye Fraction	30	Anti-HNK-1	1 / 3000	GAM POX IgM	1 / 10000

Table 8: Schematische Darstellung der Bandenbeladung der Blot-Membran und der verwendeten Antikörper nach dem ersten Stripping der Membran.

Spalte	Inhalt	Protein	Aufgetragene Menge in (μ l)	Primär Antikörper	Verdünnung	Sekundär Antikörper	Verdünnung
1	Proteinmarker		10				
2	SDS-Puffer		20				
3	Maus Retina P1	4 x Retina	40	Anti-Synaptophysin	1 / 3000	GAM POX IgG	1 / 10000
4	SDS-Puffer		20				
5	Maus Retina P2	6 x Retina	40	Anti-Synaptophysin	1 / 3000	GAM POX IgG	1 / 10000
6	SDS-Puffer		20				
7	Maus Retina adult	2 x Retina	40	Anti-Synaptophysin	1 / 3000	GAM POX IgG	1 / 10000
8	SDS-Puffer		20				
9	TSL 4000	Ribeye Fraction	30	Anti-Synaptophysin	1 / 3000	GAM POX IgG	1 / 10000

Table 9: Schematische Darstellung der Bandenbeladung der Blot-Membran und der verwendeten Antikörper nach dem zweiten Stripping der Membran.

10. Ergebnisse

Die postnatale Entwicklung der synaptischen Ribbons in den Ribbonsynapsen der Retina (Photorezeptoren und Bipolarzellen) ist durch gezielte Immunhistochemie mit Antikörpern gegen den Hauptbestandteil der Synaptic Ribbons, dem Protein RIBEYE, ein gut zu dokumentierender Prozess.

Zur Detektion des synaptischen Proteins RIBEYE in der Netzhaut von Mäusen der Linie „C57/BL6N“ wurde der Primärantikörper „anti-RIBEYE U2656“ verwendet. Dieser ist ein spezifischer und polyklonaler Antikörper gegen „RIBEYE“, welcher bereits in mehreren unterschiedlichen Verfahren von der Arbeitsgruppe Prof. F. Schmitz zum Nachweis von „RIBEYE“ eingesetzt wurde (Erstbeschreibung des Antikörpers: Schmitz et al., 2000).

Um zu untersuchen, ob bereits in früheren postnatalen Stadien „RIBEYE“ exprimiert wird, wurde zu Beginn der Forschungsarbeiten eine Western-Blot Untersuchung durchgeführt. Hierfür wurden Netzhäute von Mäusen sowohl in einem sehr frühen Entwicklungsstadium („P1“), als auch von einem weitaus fortgeschritteneren Entwicklungsstadium („adult“) präpariert und in SDS-Puffer für 15 min bei 95°C aufgekocht. Die darin enthaltenen Proteine wurden somit in Lösung gebracht.

Als Positivkontrolle diente in diesen Experimenten die Proteinfraktion TSL 4000. Bei der Proteinfraktion TSL 4000 handelt es sich um den zweiten Überstand einer Proteinfraktion, welche man nach Homogenisierung und Aufreinigung von boviner Retina erhält (Schmitz et. al., 2000). In dieser Fraktion finden sich alle ribbonassoziierten Proteine.

10.1 Biochemischer Nachweis von RIBEYE in der Netzhaut

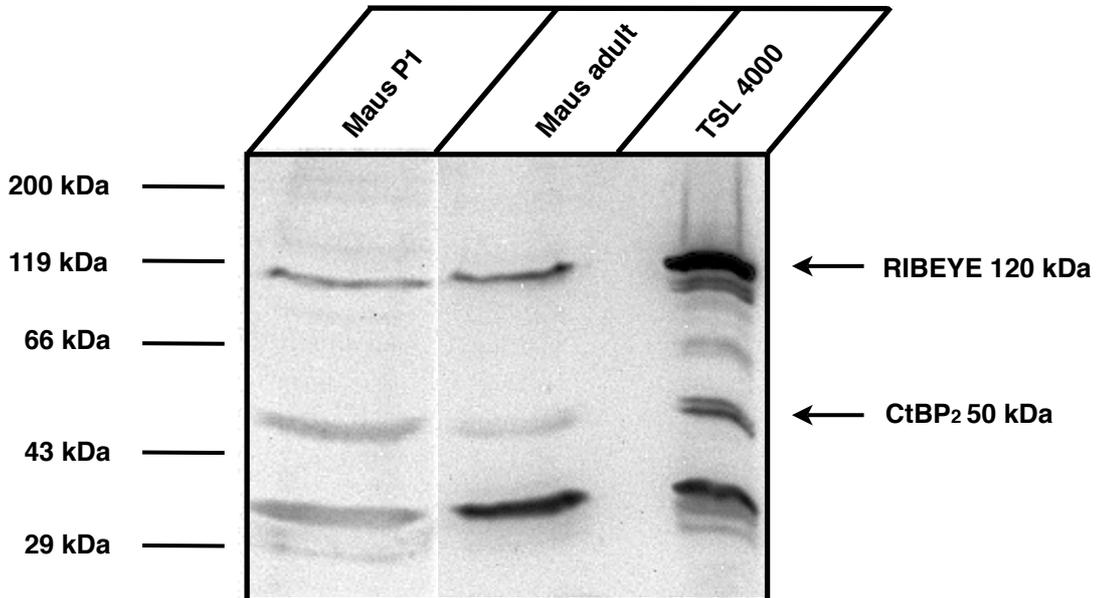


Abbildung 5: Western Blot Untersuchung zum Nachweis des synaptischen Proteins „RIBEYE“ mit dem Antikörper „anti-RIBEYE U2656“.

Spur 1: Wildtypische Mäuseretina im Entwicklungsstadium „P1“

Spur 2: Wildtypische Mäuseretina im Entwicklungsstadium „adult“

Spur 3: Extrakt von aufgereinigten „Synaptic Ribbons“

Wie auf dem vorliegenden Blot (Abb. 5) deutlich zu erkennen ist, konnte bereits im frühen postnatalen Entwicklungsstadium „P1“, ein eindeutiges Signal in der Höhe von 120 kDa gezeigt werden, welches dem spezifischen Gewicht von RIBEYE entspricht. Sowohl in diesem, als auch im „adulten“ Stadium (Tiere waren älter als 3 Wochen), in welchem der Nachweis von Ribbons bereits in Vorarbeiten gelungen ist, befanden sich die Signale in identischer Lokalisation zur Positivkontrolle (gereinigte „Synaptic Ribbons“ / TSL 4000). Der Antikörper „anti-RIBEYE U2656“ zeigte somit ein spezifisches Bindungsverhalten und ermöglicht den qualitativen Nachweis einer frühen postnatalen Expression von „RIBEYE“ bereits im Stadium „P1“.

Ergebnisse

Der Blot zeigt neben der Bande von 120 kDa für RIBEYE noch weitere Proteinbanden. Bei diesen handelt es sich am ehesten um stabile proteolytische Fragmente von RIBEYE.

Durch immunhistochemische Untersuchungen mit „anti-RIBEYE U2656“ wurde der Lokalisation der synaptischen Ribbons innerhalb der Netzhaut in den Entwicklungsstadien „P0“ (Tag der Geburt) bis „adult“ weiter nachgegangen.

10.2 Lokalisation / Verteilung von RIBEYE innerhalb der Netzhaut

10.2.1 Stadium „P0“ (Tag der Geburt)

Es wurden Kryoschnitte von Augen des Entwicklungsstadiums P0 (Tag der Geburt) angefertigt und ebenfalls mit „anti-RIBEYE U2656“ als Primär- und GAR-Cy3 als Sekundärantikörper eingefärbt.

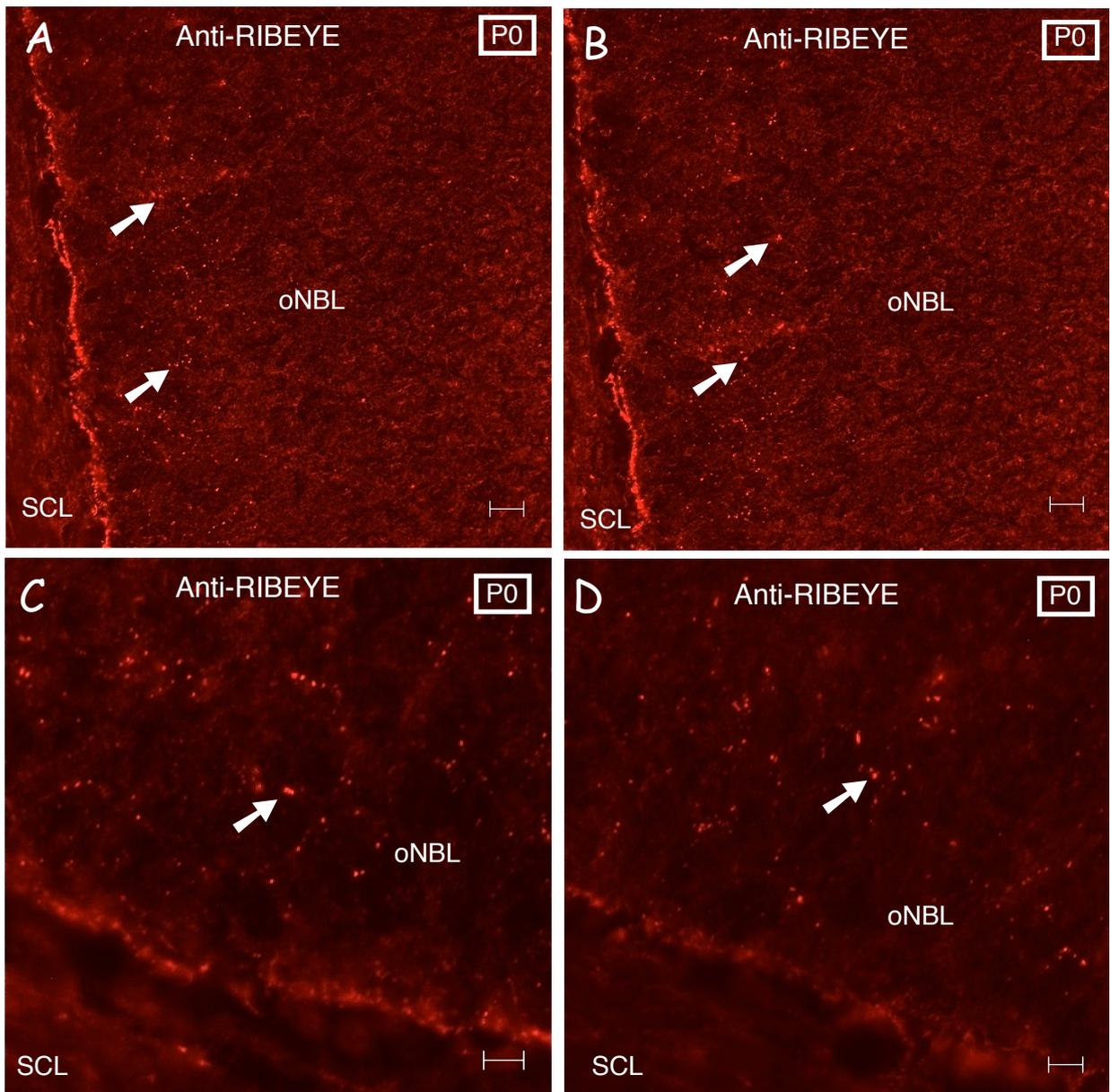


Abbildung 6: Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P0

A & B: Übersichtsaufnahme einer mit „anti-RIBEYE U2656“ gefärbten wildtypischen Mäuseretina im Entwicklungsstadium P0. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm . Die Expositionszeit beträgt 500 ms.

C & D: Ausschnittsvergrößerung der Retina im skleranahen Bereich. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 μm . Die Expositionszeit beträgt 1200 ms.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“, SCL: Sklera, oNBL : äußere Neuroblastenschicht

Im Rahmen dieser Färbung zeigten sich bereits in den Übersichtsaufnahmen schwache punktförmige Signale, welche sich im skleranahen Bereich der äußeren Neuroblastenschicht ansiedelten (Abb. 2A und 2B). In höheren Vergrößerungen und mit längerer Exposition der Schnittpräparate wurden die Signale intensiver und konnten deutlich von der noch undifferenzierten und breiten äußeren Neuroblastenschicht abgegrenzt werden (Abb. 6C und 2D). Die Einzelsignale zeigten eine diffuse Verteilung und ließen noch kein klares Muster erkennen.

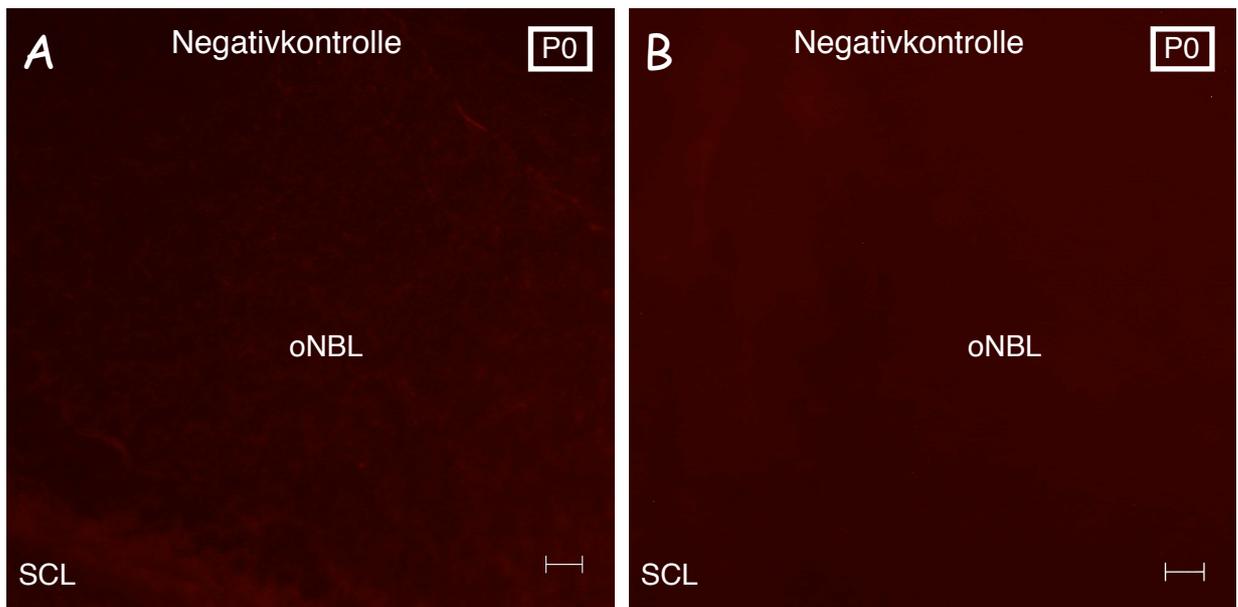


Abbildung 7: Negativkontrolle zu den mit „anti-RIBEYE U2656“ gefärbten Netzhäuten im Entwicklungsstadium P0

A: Übersichtsaufnahme der Negativkontrolle. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 µm. Die Expositionszeit beträgt 500 ms.

B: Ausschnittsvergrößerung des skleranahen Bereiches der Negativkontrolle. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 µm. Die Expositionszeit beträgt 1600 ms.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“, SCL: Sklera, oNBL: äußere Neuroblastenschicht

Trotz einer längeren Exposition der Negativkontrolle mit 1600 ms konnte selbst in der Ausschnittsvergrößerung im skleranahen Bereich der äußeren Neuroblastenschicht, kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 7B), welches in der Positivkontrolle bereits bei einer kürzeren Expositionszeit von 1200 ms der Fall war (Abb. 6C und 6D). Ein weiterer Beweis für die frühe Expression von RIBEYE bereits ab dem Tag der Geburt (P0) konnte somit erbracht werden.

10.2.2 Stadium P1 (erster Tag nach der Geburt)

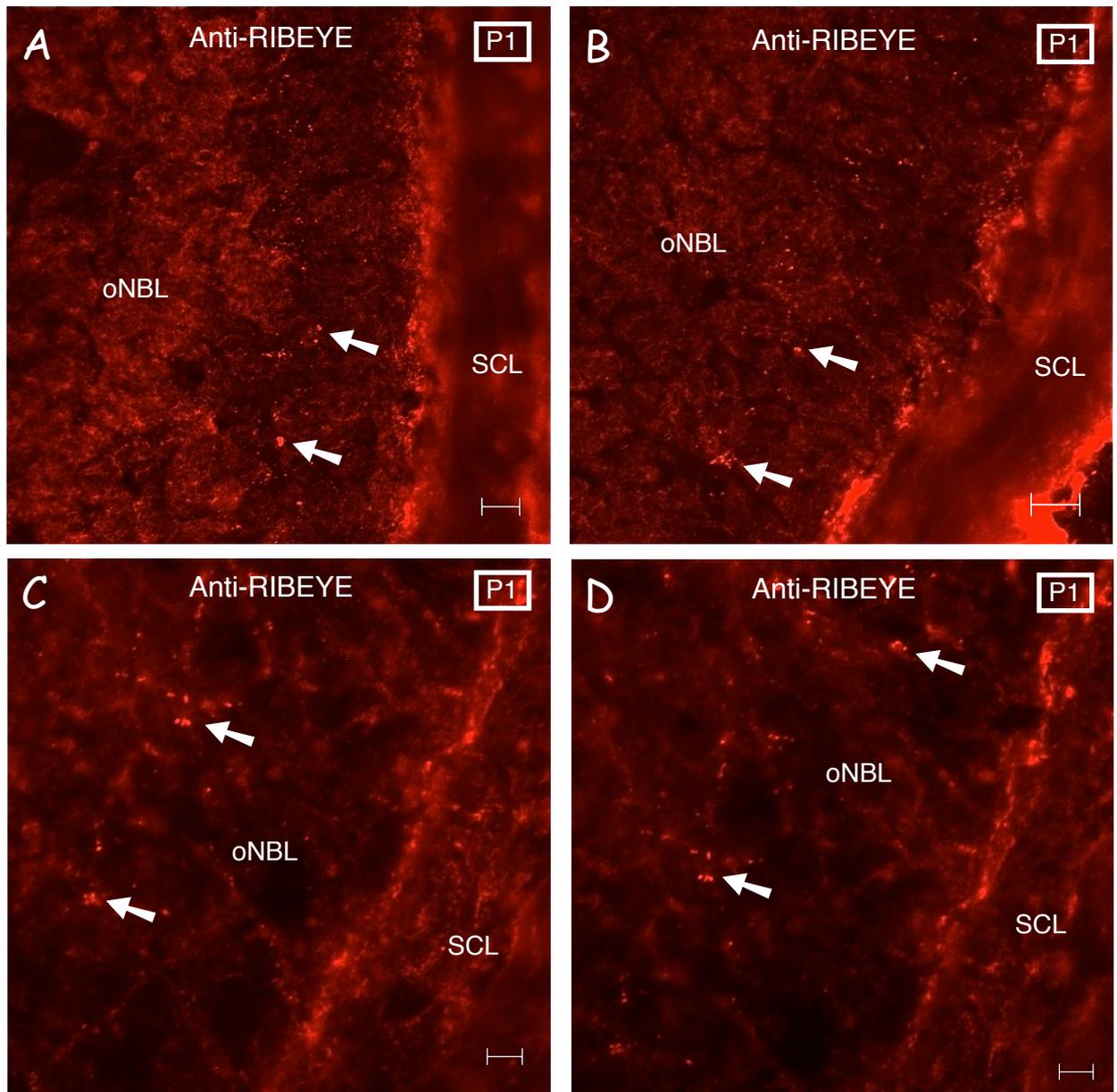


Abbildung 8: Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P1

A & B: Übersichtsaufnahme einer mit „anti-RIBEYE U2656“ gefärbten wildtypischen Mäuseretina im Entwicklungsstadium P1. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm . Die Expositionszeit beträgt 50 ms.

C & D: Ausschnittsvergrößerung der Retina im skleranahen Bereich. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 μm . Die Expositionszeit beträgt 150 ms.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“; SCL: Sklera; oNBL: äußere Neuroblastenschicht

Die Signale für RIBEYE befinden sich im skleranahen Drittel der äußeren Neuroblastenschicht und zeigen kein erkennbares Verteilungsmuster. Bei genauerer Betrachtung der Ausschnittsvergrößerung scheint jedoch erstmalig der Eindruck zu entstehen, dass der Abstand zwischen den „RIBEYE-Signalen“ und der Sklera größer wird und dass sich die punktförmigen „RIBEYE-Signale“ im Stadium „P1“ stellenweise (Abb. 8C und 8D), im Vergleich zu denen im Stadium „P0“ (Abb. 6C und 6D), von der Sklera weg in Richtung der sich im späteren Verlauf noch entwickelnden äußeren plexiformen Schicht zu bewegen scheinen.

Um die Ergebnisse für die im Entwicklungsstadium P0 (Abb. 6) und P1 (Abb. 8) nachgewiesenen Signale für RIBEYE durch eine zusätzliche Untersuchung zu kontrollieren und um den Befund zu sichern, wurden weitere Schnittpräparate von Augen im Stadium P1 hergestellt. Diese wurden mit „anti-CtBP2“, einem monoklonalen Antikörper gegen das Protein „CtBP2“ eingefärbt.

Der Name „CtBP“ leitet sich aus dem Englischen ab und steht für: C-terminal binding protein for the adenovirus E1A-protein. Ursprünglich wurden CtBP₂ und CtBP₁ als eine Familie Transkriptionsrepressoren beschrieben (Schaeper et al., 1995; Katsanis and Fisher, 1998; Poortings et al., 1998; Turner and Crossley, 1998; Zhang and Levine, 1990). Neuere Erkenntnisse konnten jedoch aufzeigen, dass CtBP₁ ebenfalls eine Rolle im Golgi-Trafficking spielt, was u.a. für die Aufnahme von extrazellulären Makromolekülen und Nährstoffen notwendig ist (Yuki Hang et al., 2009). Der Genort für CtBP₂ liegt bei der Maus auf Chromosom 7 und beim Menschen auf Chromosom 10. Das Genprodukt liefert zwei Proteine. Zum einen CtBP₂ und zum anderen RIBEYE.

CtBP₂ selbst ist ein funktioneller Bestandteil des synaptischen Proteins „RIBEYE“ und, nach Analyse von Gendatenbanken, bis auf die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren in der kompletten Sequenz der B-Domäne von „RIBEYE“ enthalten. Wegen dieser Integrität und somit seiner Koexistenz in RIBEYE, stellt „CtBP2“ ein ausgezeichnetes Epitop für die kontrollführende Immunfluoreszenz dar.

Durch Voruntersuchungen mit Netzhäuten von „adulten“ Tieren hatte sich die Sensitivität des Antikörpers „anti-CtBP2“ für „RIBEYE“ bereits bestätigt. Dieser Antikörper ist spezifisch für CtBP2 und erkennt CtBP1 nicht an, obwohl beide eine hohe Homologie zueinander aufweisen.

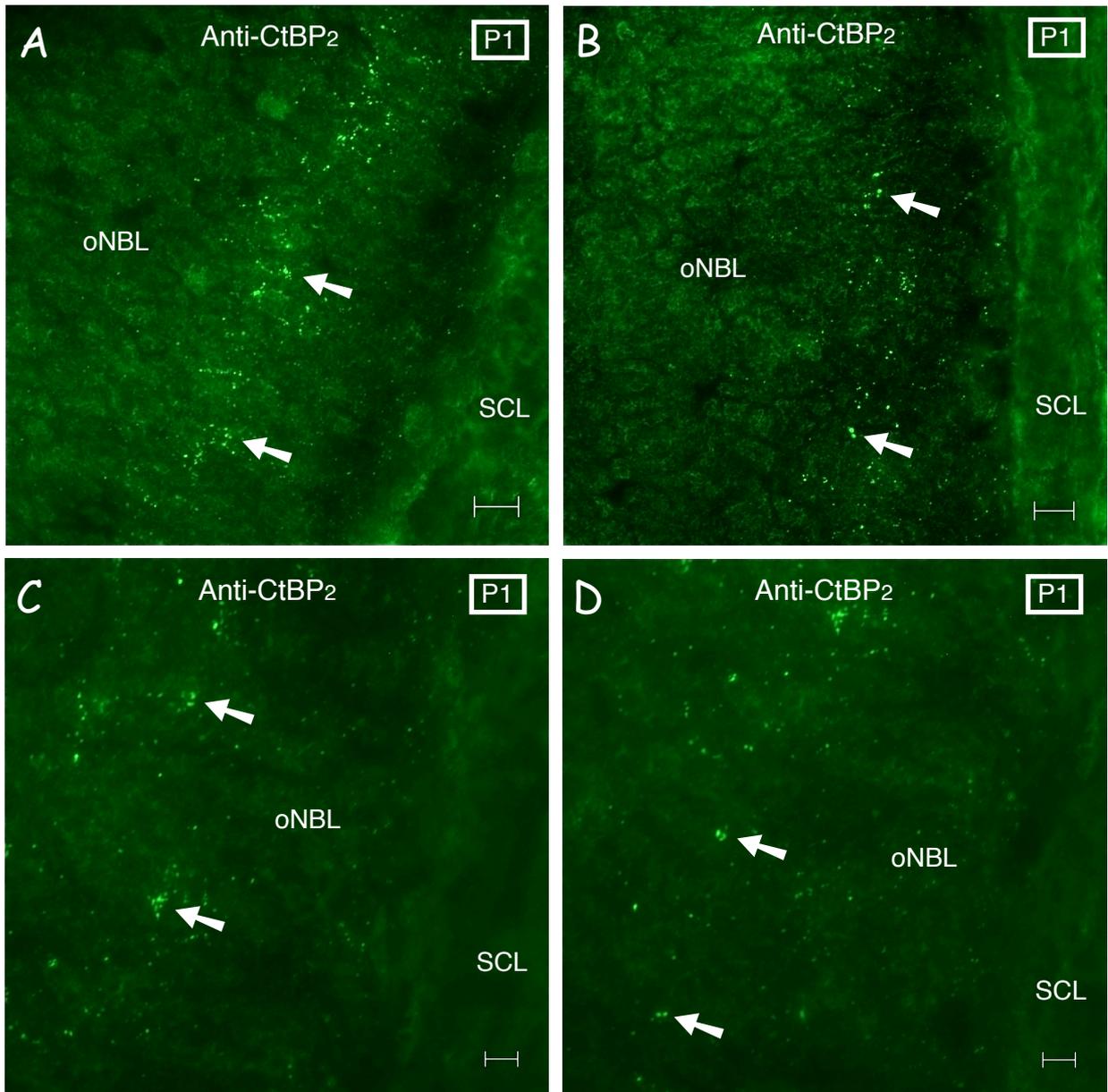


Abbildung 9: Expressionsmuster von CtBP2 im Entwicklungsstadium P1

A & B: Übersichtsaufnahme einer mit „anti-CtBP2“ gefärbten wildtypischen Mäuseretina im Entwicklungsstadium P1. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm. Die Expositionszeit beträgt 850 ms.

C & D: Ausschnittsvergrößerung der Retina im skleranahen Bereich. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 μm. Die Expositionszeit beträgt 2800 ms.

Grüner Farbkanal: „anti-CtBP2“; SCL: Sklera; oNBL: äußere Neuroblastenschicht

Im Rahmen dieser kontrollführenden Untersuchung zeichnete sich das gleiche Verteilungsmuster für RIBEYE ab (Abb. 9), welches bereits im Versuch mit dem anti-RIBEYE-Antikörper (Abb. 8) im selben Entwicklungsstadium nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich um eine Ansammlung von punktförmigen Einzelsignalen im skleranahen Bereich der äußeren Neuroblastenschicht.

Desweiteren ließ sich in der Negativkontrolle, sowohl in den Übersichtsaufnahmen, als auch in höheren Vergrößerungsstufen, trotz längerer Expositionszeiten, kein spezifisches Signal nachweisen (Abb. 10). Ein identisches Ergebnis erhielt man ebenfalls unter Verwendung des Anti-RIBEYE Antikörpers „U2656“ (Daten nicht gezeigt).

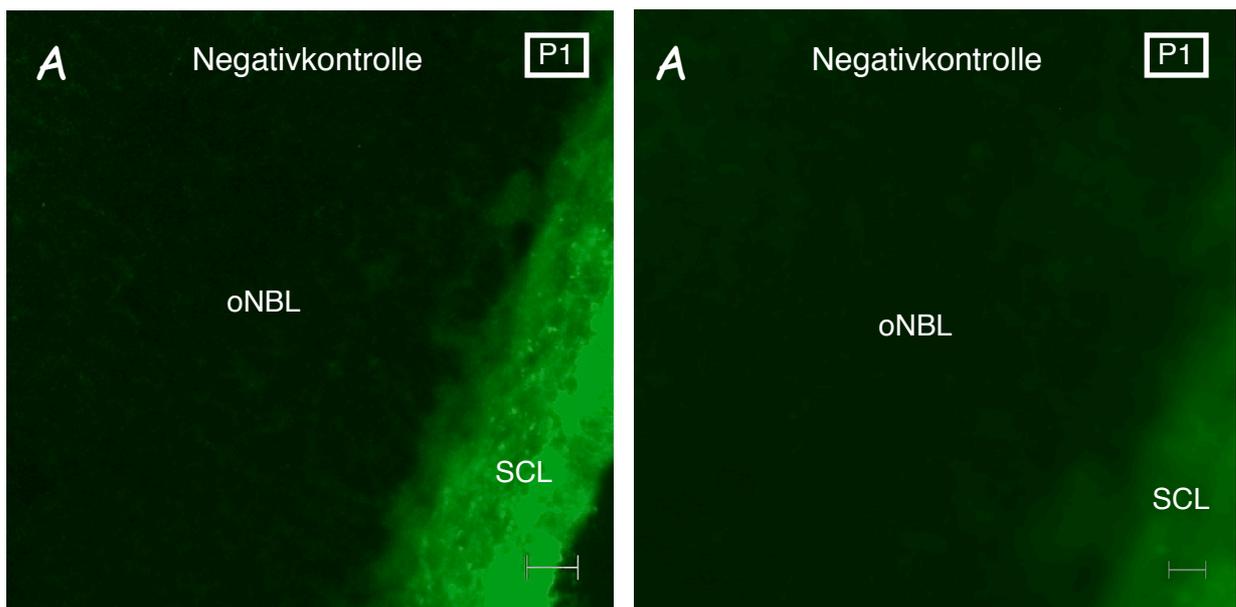


Abbildung 10: Negativkontrolle zu den mit „anti-CtBP2“ gefärbten Netzhäute im Entwicklungsstadium P1
A: Übersichtsaufnahme der Negativkontrolle. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm . Die Expositionszeit beträgt 1000 ms.

B: Ausschnittsvergrößerung des skleranahen Bereiches der Negativkontrolle. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 μm . Die Expositionszeit beträgt 3200 ms.

Grüner Farbkanal: „anti-CtBP2“; SCL: Sklera; oNBL: äußere Neuroblastenschicht

Stellt man diese neu erhobenen Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit den anfänglich durchgeführten Western-Blot Untersuchungen gegenüber, zeichnet sich deutlich ab, dass im gleichen Entwicklungsstadium („P1“) ebenfalls eine spezifische Bande für „RIBEYE“ zu erkennen ist (Abb. 5).

Zusammenfassend lassen sich bereits drei Beweise für die frühe Expression von „RIBEYE“ aufführen.

Erstens haben zwei unterschiedliche Verfahren unabhängig voneinander bestätigen können, dass das synaptische Protein „RIBEYE“ bereits in frühen postnatalen Entwicklungsstadium „P1“ in der Retina exprimiert wird (Abb. 5 und Abb. 6). Zweitens konnte das mit dem polyklonalen Antikörper „anti-RIBEYE U2656“ nachgewiesene Verteilungsmuster für „RIBEYE“ (Abb. 8), mit dem monoklonalen Antikörper „anti-CtBP2“ im selben Reifestadium reproduziert werden (Abb. 9). Da beide Antikörper unterschiedliche Angriffspunkte für das gleiche Protein besitzen und ebenfalls mittels unterschiedlichen Sekundär-Antikörpern detektiert werden, kann eine Interaktion mit unspezifischen Bindungsstellen ausgeschlossen werden. Die frühe Expression von „RIBEYE“ ist somit zweifach bewiesen. Desweiteren konnten sowohl die Expression von „RIBEYE“, als auch von „CtBP2“ im Western-Blot bestätigt werden (Abb. 5). Drittens ist anzuführen, dass in den Negativkontrollen der immunhistochemischen Netzhautpräparate, trotz längerer Belichtungszeiten, weder Signale für „anti-RIBEYE U2656“ (Abb. 7), noch für „anti-CtBP2“ (Abb. 10) nachweisbar waren, was wiederum für eine spezifische Antikörperbindung und somit für eine Zuverlässigkeit der oben genannten Ergebnisse spricht. Ein spezifischer Nachweis von „RIBEYE“ am Tag der Geburt (Abb. 6) gilt somit ebenfalls als bewiesen.

Ergebnisse

In Anbetracht der bisher gewonnenen Ergebnisse einer frühen postnatalen Expression zu einem Zeitpunkt, an dem die Augen der Mäuse noch geschlossen sind (Abb. 6), geknüpft mit den Beobachtungen einer „Wanderung“ / Distanzierung von der Sklera weg in Richtung späteren OPL im Stadium „P1“ (Abb. 8, Abb. 9), liess sich ein kontinuierlicher Wachstumsprozess vermuten, dem im weiteren Verlauf nachgegangen wurde.

10.2.3 Entwicklungsstadium P2

Am Tag zwei der postnatalen Entwicklung (P2) zeigten sich keine nennenswerten Veränderungen im Verteilungsmuster von RIBEYE. Strukturell unterscheidet sich die entwickelnde Retina nicht vom Stadium P1.

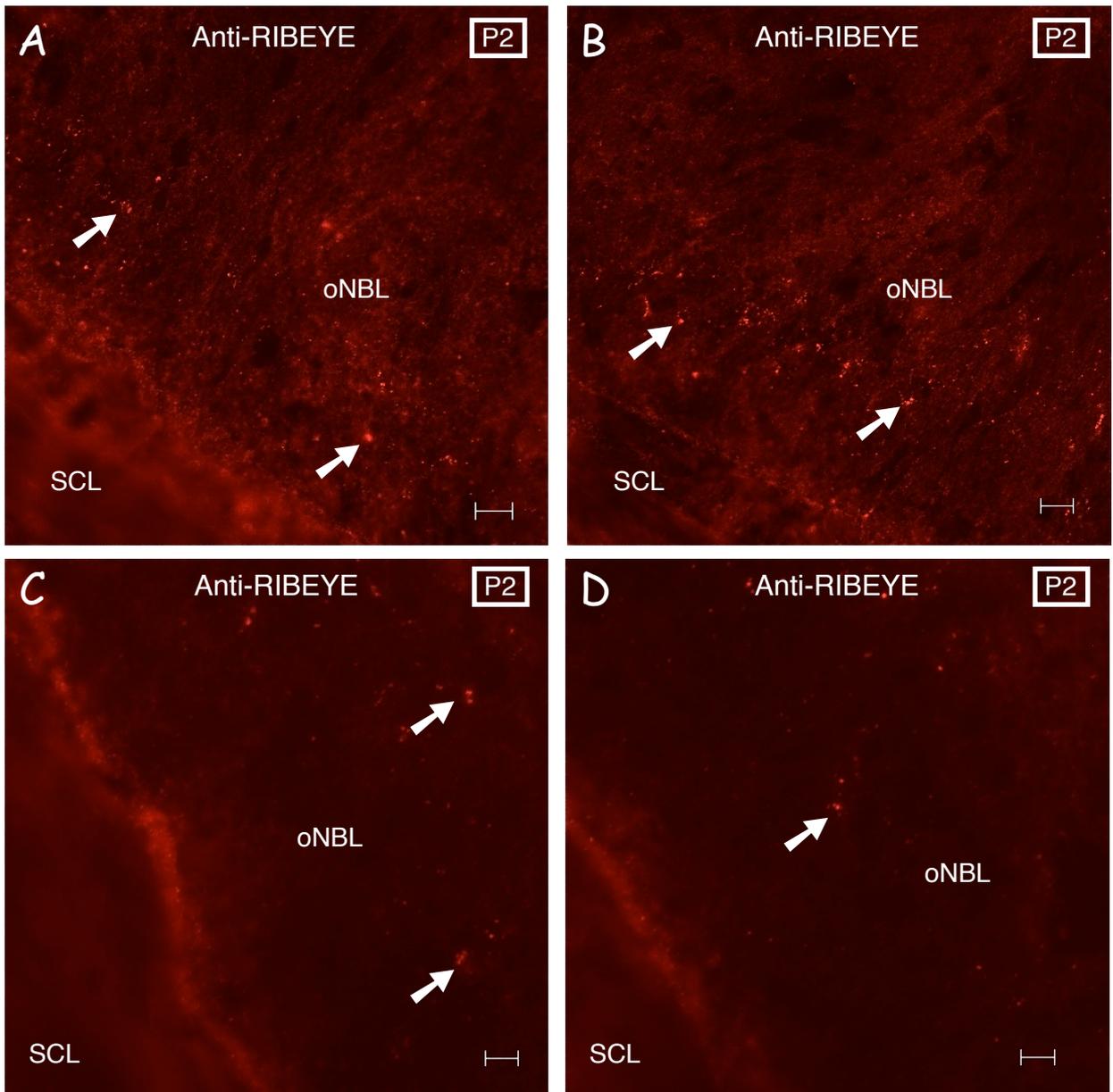


Abbildung 11: Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P2

A & B: Übersichtsaufnahme einer mit „anti-RIBEYE U2656“ gefärbten wildtypischen Mäuseretina im Entwicklungsstadium P2. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 µm. Die Expositionszeit beträgt 70 ms.

C & D: Ausschnittsvergrößerung der Retina im skleranahen Bereich. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 µm. Die Expositionszeit beträgt 200 ms. Die Negativkontrolle zu A wurde 100 ms, die Negativkontrollen zu B wurde 200 ms exponiert.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“

SCL: Sklera, oNBL : äußere Neuroblastenschicht

10.2.4 Dritter Tag nach der Geburt

Erst mit dem Einsetzen des dritten postnatalen Tages ist ein deutlicher Entwicklungssprung in der Immunfluoreszenz mit „anti-RIBEYE U2656“ zu beobachten.

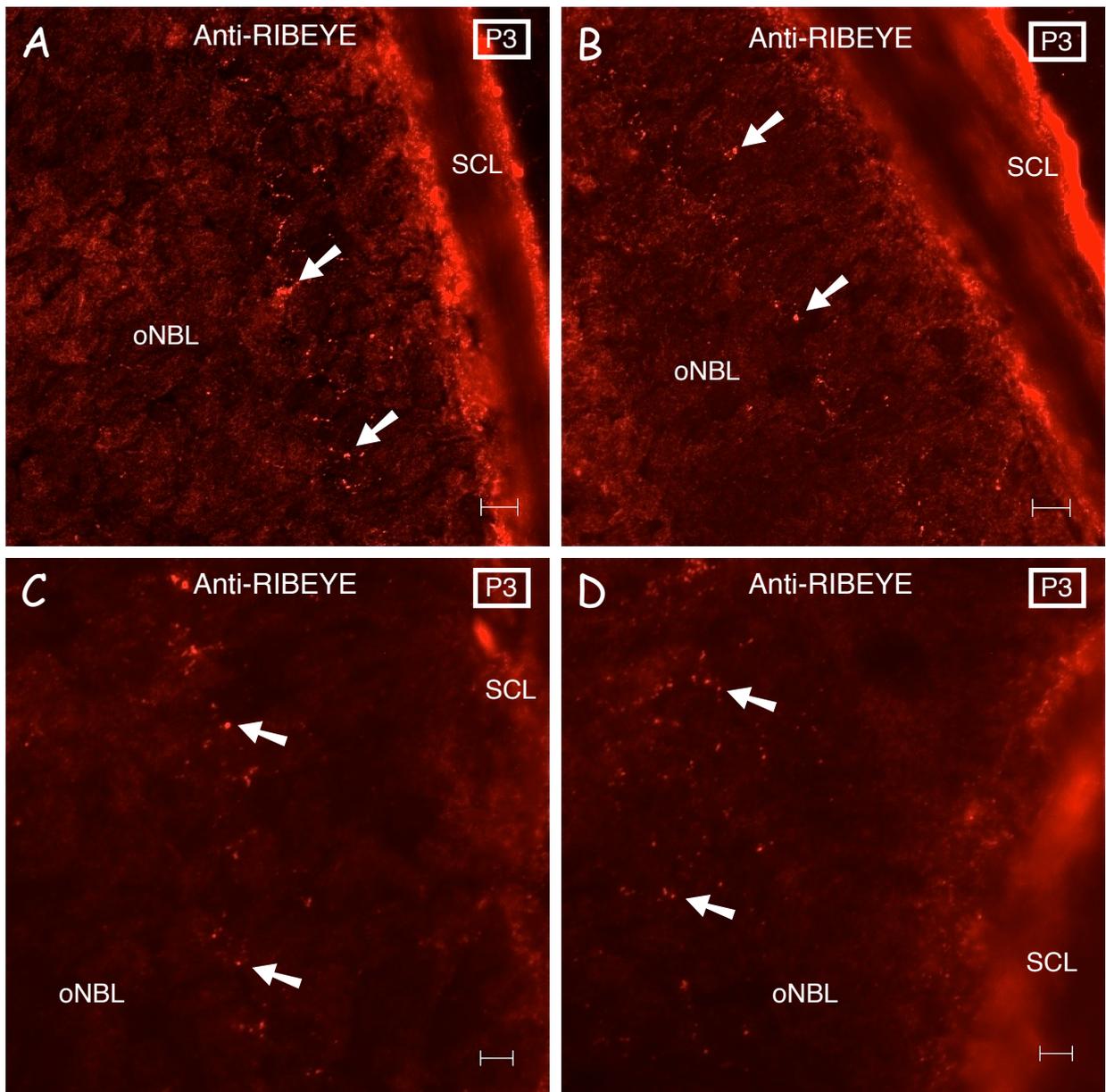


Abbildung 12: Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P3

A & B: Übersichtsaufnahme einer mit „anti-RIBEYE U2656“ gefärbten wildtypischen Mäuseretina im Entwicklungsstadium P1. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 10 μm . Die Expositionszeit beträgt 70 ms.
C & D: Ausschnittsvergrößerung der Retina im skleranahen Bereich. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 4 μm . Die Expositionszeit beträgt 250 ms.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“; SCL: Sklera; oNBL: äußere Neuroblastenschicht
Die Pfeilmarkierung zeigt die sich formierenden „RIBEYE-Signale“ im Bereich der sich entwickelnden äußeren plexiformen Schicht (OPL).

Das bisherige unstrukturierte Verteilungsmuster von RIBEYE verschwindet zugunsten einer sich formierenden linearen Anordnung im mittleren Bereich der äußeren Neuroblastenschicht (oNBL). Es ist zu erkennen, dass die vielen Einzelsignale ihre räumliche Distanz untereinander verringern und sich an immer mehr Netzhautbereichen in einer gemeinsamen Front anzusiedeln beginnen (Abb. 12).

10.2.5 Vierter postnataler Tag

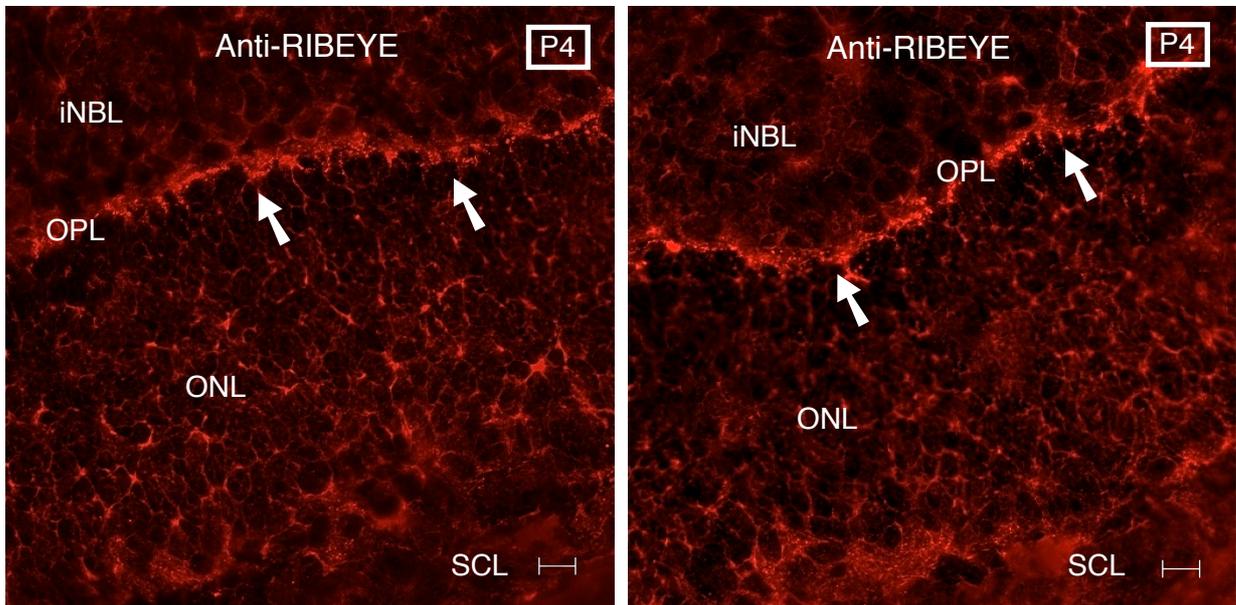


Abbildung 13: Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters von „RIBEYE“ im Entwicklungsstadium P4
Die Übersichtsaufnahme zeigt die mit Pfeilen markierte Ansiedelung der „Ribbons“ im Bereich der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm . Die Expositionszeit beträgt 100 ms.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“; SCL: Sklera; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; iNBL: innere Neuroblastenschicht

Entwicklungsmorphologisch ist mit dem Eintreten des vierten postnatalen Entwicklungstages die Differenzierung der äußeren Neuroblastenschicht weitgehend abgeschlossen und die äußere Körnerschicht (ONL) hat sich mittlerweile vollständig aus der Neuroblastenschicht (oNBL / iNBL) herausdifferenziert. Im Vergleich zum Vortag hat die äußere Körnerschicht nochmals an Volumen zugenommen.

In den immunhistochemischen Schnittpräparaten ist mit dem vierten postnatalen Entwicklungstag bereits zu beobachten, dass sich alle „Ribbons“ in einer einheitlichen Front über die gesamte Retina verteilt haben und im Bereich der äußeren plexiformen Schicht kondensieren (Abb. 13).

Die im Stadium "P1,, anfänglich noch kleinen punktförmigen Signale für „RIBEYE“ haben ebenfalls an Volumen und Signalintensität zugenommen, was besonders in den Ausschnittsvergrößerungen deutlich sichtbar ist (Abb. 14). Bei genauerer Betrachtung der Signalfont lassen sich bereits ab dem vierten postnatalen Entwicklungstag vereinzelt hufeisenförmige, reife synaptische Ribbons in den Terminalen der Photorezeptoren ausmachen (Abb. 14).

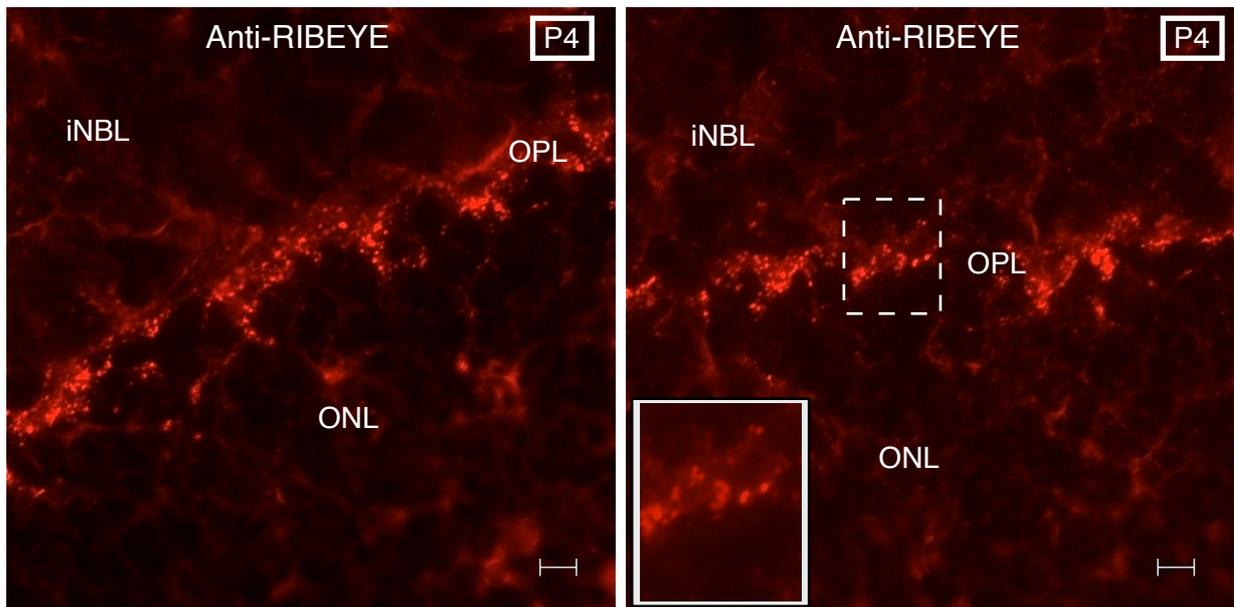


Abbildung 14: Ausschnittsvergrößerung des Expressionsmusters von „RIBEYE“ im Entwicklungsstadium P4
Die Vergrößerung zeigt die Ansiedelung der „Ribbons“ im Bereich der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm . Die Expositionszeit beträgt 300 ms.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; iNBL: innere Neuroblastenschicht

Mit der Ausbildung der äußeren plexiformen Schicht am dritten, bzw. vierten postnatalen Entwicklungstag (Abb. 12 und Abb. 13) haben die synaptischen „Ribbons“ ihre bis zum „adulten“ Stadium hin endgültige Lokalisation erreicht. Ein bis dahin dokumentierter „Wanderungsprozess“ ist spätestens ab dem vierten postnatalen Entwicklungstag abgeschlossen.

Alle zu diesem Zeitpunkt der retinalen Entwicklung detektierbaren Signale für „RIBEYE“ befinden sich im unmittelbaren Bereich der sich entwickelnden äußeren plexiformen Schicht (OPL) und rücken nicht weiter nach vitread vor. Ab dem Entwicklungstag P4 hat sich die Retina soweit entwickelt, dass alle Synapsenschichten ausgebildet sind. Nach dem Tag P4 erfolgt keine neue Schichtung mehr, sondern es finden lediglich Reifungsprozesse statt.

In Vorarbeiten wurden bereits synaptische Ribbons in Bipolarzellen in der IPL ab dem siebten postnatalen Tag entdeckt (Kerschensteiner et al., 2009). Da dies nicht im Fokus meiner Arbeit stand, wird hieraus nicht weiter eingegangen.

10.2.6 Fünfter bis siebter Tag nach der Geburt

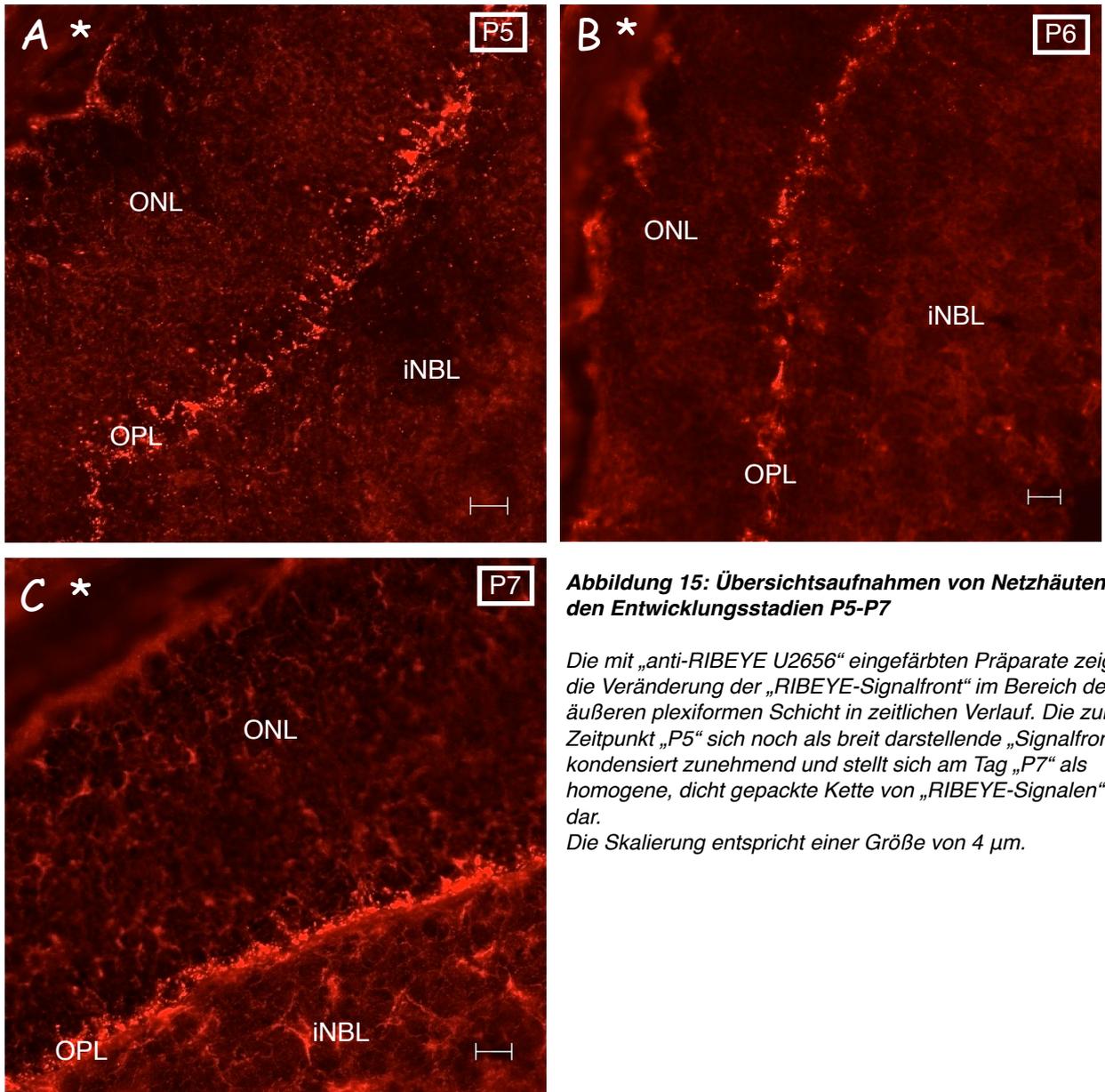


Abbildung 15: Übersichtsaufnahmen von Netzhäuten in den Entwicklungsstadien P5-P7

Die mit „anti-RIBEYE U2656“ eingefärbten Präparate zeigen die Veränderung der „RIBEYE-Signalfrent“ im Bereich der äußeren plexiformen Schicht in zeitlichen Verlauf. Die zum Zeitpunkt „P5“ sich noch als breit darstellende „Signalfrent“ kondensiert zunehmend und stellt sich am Tag „P7“ als homogene, dicht gepackte Kette von „RIBEYE-Signalen“ dar.

Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 μm .

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“; *: Sklera; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; iNBL: innere Neuroblastenschicht

Durch die sich entwickelnde und stets an Breite zunehmende äußere plexiforme Schicht, findet auch in der Darstellung der „Ribbon-Signalfont“ ein Umwandlungsprozess statt. Die sich am Vortag (P4) noch als recht einheitliche und dicht gepackt erscheinende homogene Signalkette (Abb. 13 und Abb. 14) wird, wie ab dem fünften postnatalen Entwicklungstag sichtbar ist, zunehmend aufgelockert. Es erfolgt eine zunehmende Reifung der synaptischen Ribbons. Immer mehr der punktförmigen Ribbons der früheren Stadien werden durch hufeisenförmige Ribbons ersetzt. Durch den ständigen Umbau treten die einzelnen Ribbons mal weiter auseinander oder enger zusammen. Insgesamt finden sich nur wenige Ribbons ausserhalb der OPL.

Besonders anschaulich kommt dieser Prozess in den Ausschnittsvergrößerungen der äußeren plexiformen Schicht (Abb. 16 A - 16 C) zum Vorschein.

Im Vergleich zu den Aufnahmen des vierten postnatalen Entwicklungstages (Abb. 13 und Abb. 14) hat die „RIBEYE-Signalfont“ am siebten Entwicklungstag in ihrer vertikalen Ausdehnung an Volumen zugenommen. Sich in früheren Stadien noch aufgezeigte Lücken innerhalb der Signalfont sind bei Gesamtbetrachtung der Retina nahezu nicht mehr vorhanden.

Äquivalent zur Entwicklung der „Ribbons“ innerhalb der äußeren plexiformen Schicht, nimmt auch die äußere Körnerschicht (ONL) in ihrer Gesamtausdehnung an Volumen zu. Die Retina zeigt sich mit Erreichen des siebten postnatalen Entwicklungstages lichtmikroskopisch mittlerweile nahezu voll ausdifferenziert, wie man es von der „adulten“, Netzhaut her kennt.

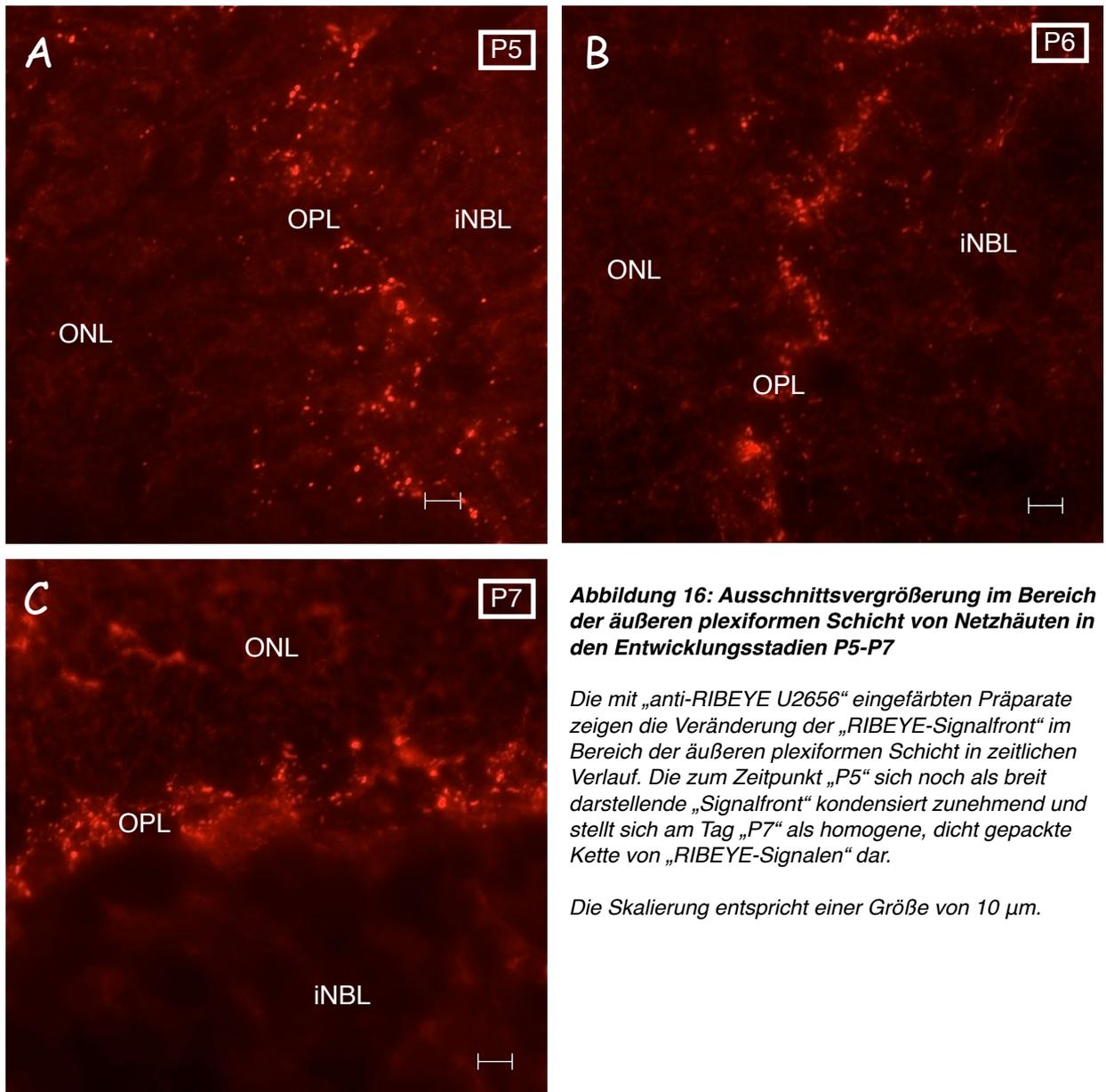


Abbildung 16: Ausschnittsvergrößerung im Bereich der äußeren plexiformen Schicht von Netzhäuten in den Entwicklungsstadien P5-P7

Die mit „anti-RIBEYE U2656“ eingefärbten Präparate zeigen die Veränderung der „RIBEYE-Signalfont“ im Bereich der äußeren plexiformen Schicht in zeitlichen Verlauf. Die zum Zeitpunkt „P5“ sich noch als breit darstellende „Signalfont“ kondensiert zunehmend und stellt sich am Tag „P7“ als homogene, dicht gepackte Kette von „RIBEYE-Signalen“ dar.

Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μ m.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; iNBL: innere Neuroblastenschicht

10.2.7 Tag acht bis zehn nach der Geburt

Rein morphologisch ist kein Unterschied mehr zu einer voll ausdifferenzierten Netzhaut von „adulten“ Tieren zu erkennen. Alle Schichten stellen sich in ihrer charakteristischen Ausbreitung dar.

Die innere Körnerschicht (INL) differenziert sich am achten postnatalen Entwicklungstag aus der inneren Neuroblastenschicht heraus und nimmt an Volumen zu (Abb. 17 A und Abb. 17 B). Nach vitread grenzt diese an die ebenfalls an Volumen zunehmende innere plexiforme Schicht (IPL) an. Mit dem neunten postnatalen Entwicklungstag machen die Retinaschichten einen zunehmend kompakteren und homogeneren Eindruck, wobei sie im Querschnittsdurchmesser weiter an Ausdehnung zunehmen (Abb. 18 A und Abb. 18 B).

Die OPL nimmt bis zu diesem Entwicklungspunkt weiter im Querdurchmesser an Ausdehnung zu und kann bis zum zehnten postnatalen Entwicklungstag deutlich von den anderen Zellschichten abgegrenzt werden. In der Verlaufsübersicht von P8 bis P10 (Abb. 17 - Abb. 19) wird deutlich, dass im Bezug auf die synaptischen Ribbons keine nennenswerten Entwicklungen innerhalb der äußeren plexiformen Schicht mehr zu verzeichnen sind.

Mit dem Erreichen des zehnten postnatalen Entwicklungstages ist die Bildung der retinalen Zellschichten in soweit abgeschlossen, dass lichtmikroskopisch kein Unterschied mehr zu einem voll ausgewachsenen „adulten“ Tier sichtbar ist. Aufgrund dessen und weil keine deutlichen Entwicklungsschritte der „RIBEYE-Signale“ in der äußeren plexiformen Schicht mehr zu erkennen sind, wurde auf die Fortführung einer kontinuierlichen Untersuchung verzichtet.

Übersichtsaufnahmen der Entwicklungsstadien P8 bis P10

Abb. 17

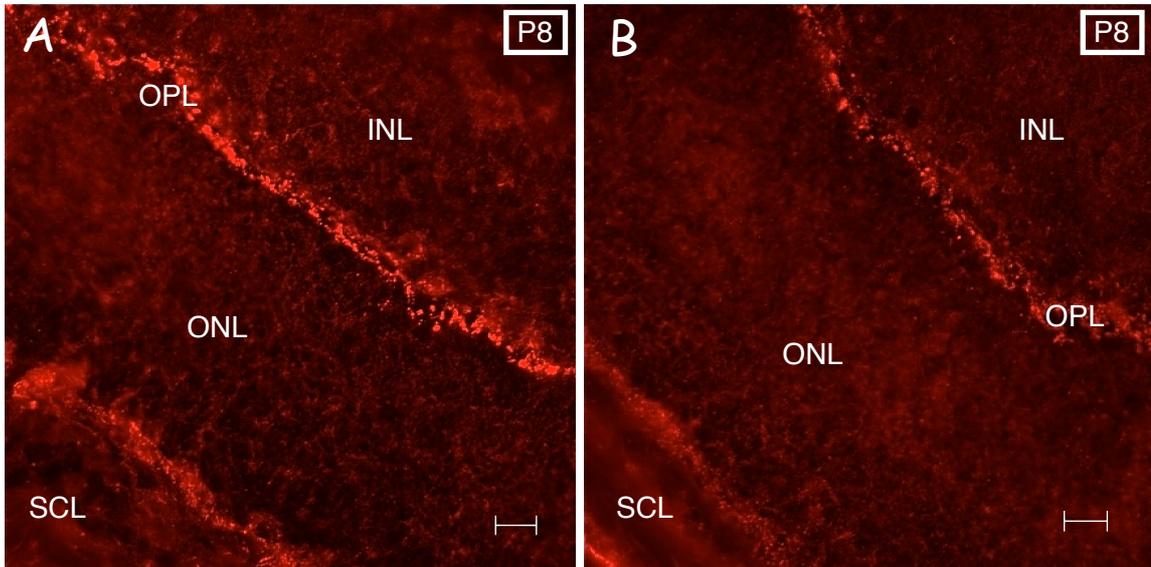


Abb. 18

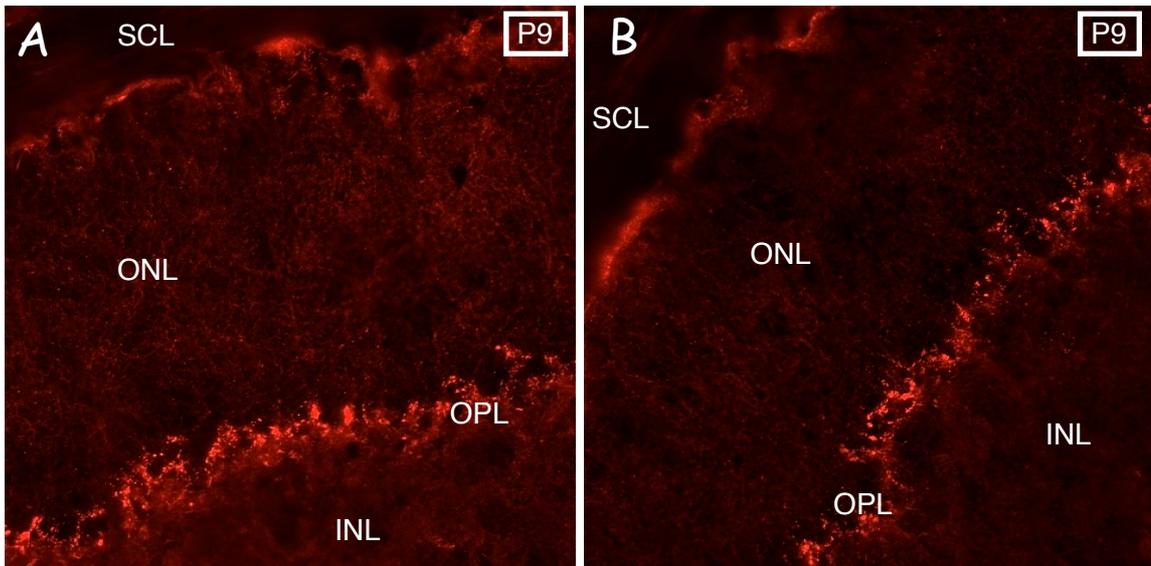
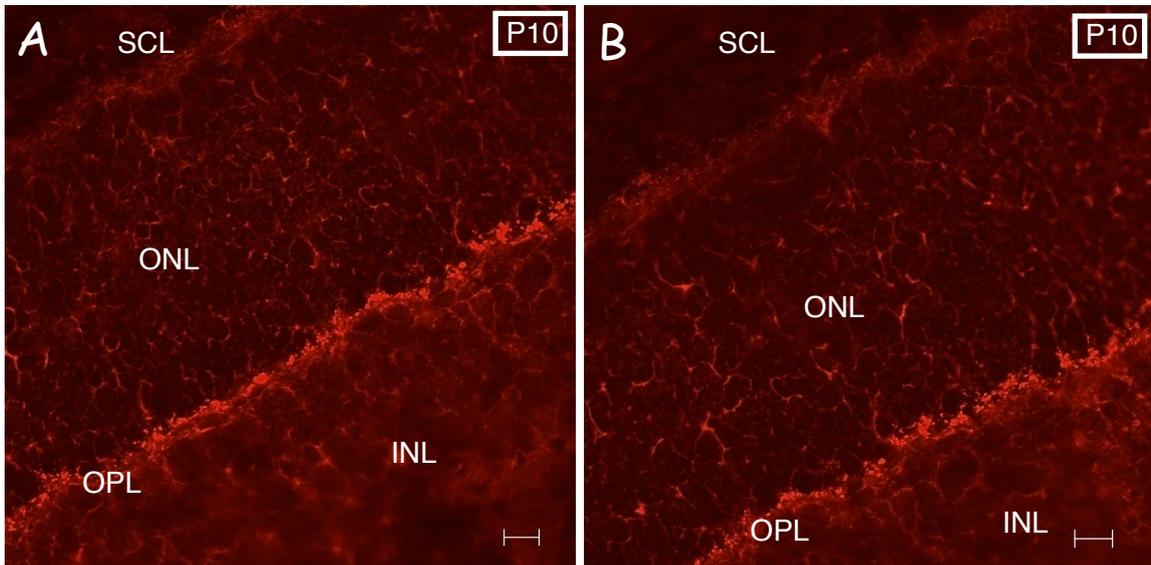


Abb. 19



Abbildungslegende siehe übernächste Seite

Ausschnittsvergrößerung der äußeren plexiformen Schicht in den Entwicklungsstadien P8 bis P10

Abb. 20

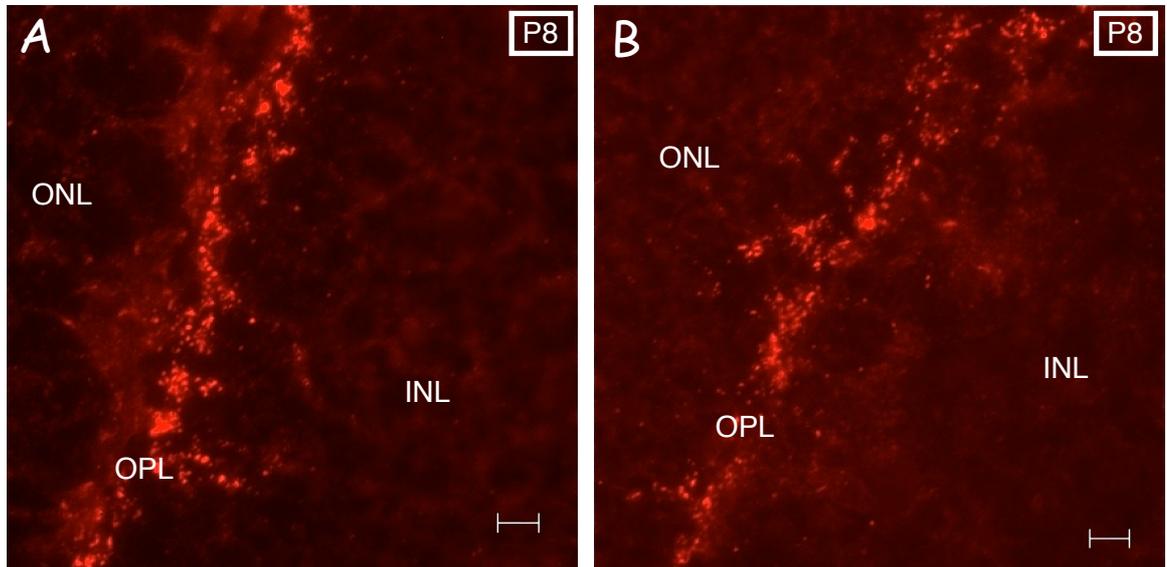


Abb. 21

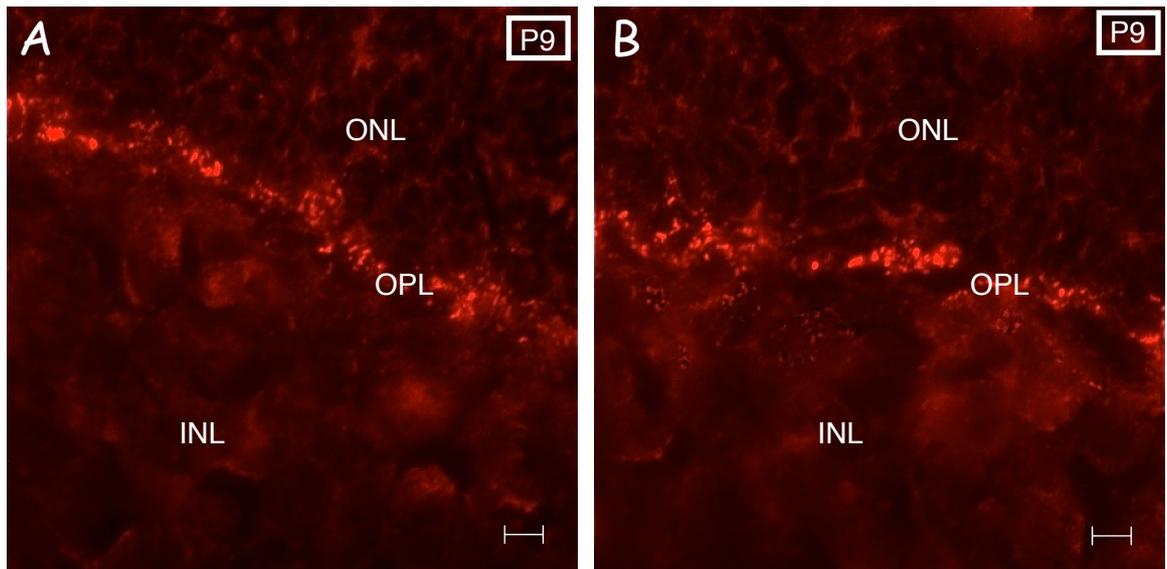
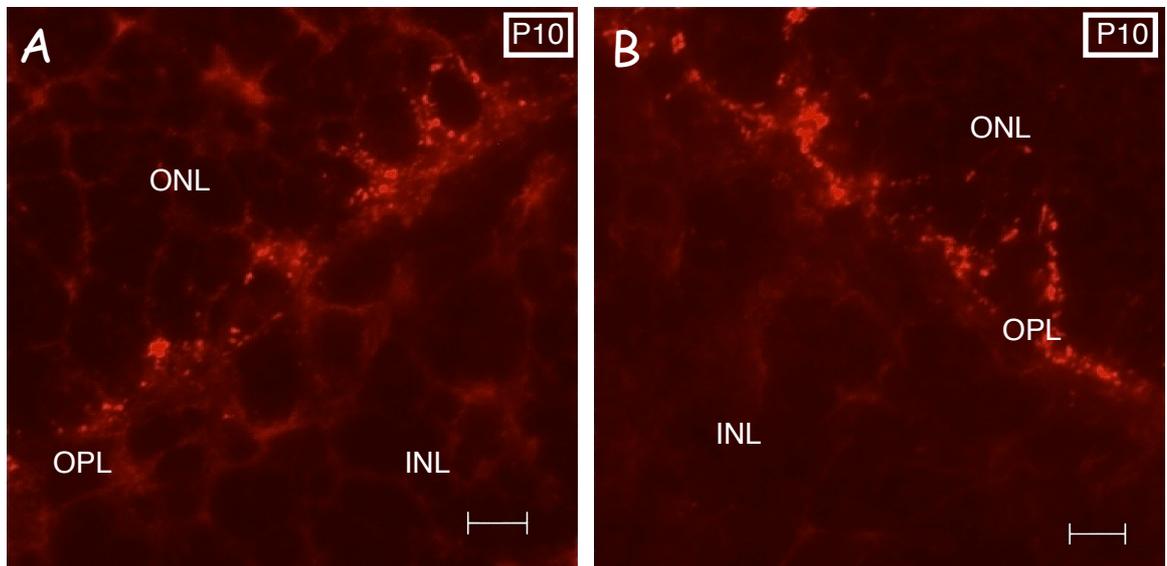


Abb. 22



Abbildungslegende zu Abb. 17 bis Abb. 19

Abb. 17: Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters von „RIBEYE“ am 8. postnatalen Tag

Eine deutlich zu erkennende homogene Signalfont von „Ribbons“ zeichnet sich in der äußeren plexiformen Schicht ab. Die innere Körnerschicht hat sich aus der inneren Neuroblastenschicht herausdifferenziert und an Volumen zugenommen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 10 µm.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“, SCL: Sklera,

ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht;

INL: innere Körnerschicht

Abb. 18: Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters von „RIBEYE“ am 9. postnatalen Tag

Die „Ribeye“ Signalfont stellt sich unverändert in der äußeren plexiformen Schicht dar. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 10 µm.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“, SCL: Sklera,

ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht;

INL: innere Körnerschicht

Abb. 19: Übersichtsaufnahme des Expressionsmusters von „RIBEYE“ am 10. postnatalen Tag

Die Retina macht einen zunehmend kompakteren und beständigeren Eindruck als am Vortag. Anhand der Ausdifferenzierung der einzelnen Schichten ist kein Unterschied zum „adulten“ Tier zu erkennen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 10 µm.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“, SCL: Sklera,

ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht;

INL: innere Körnerschicht

Abb. 20: Ausschnittsvergrößerung des Expressionsmusters von „RIBEYE“
im Bereich der äußeren plexiformen Schicht am 8. postnatalen Tag

Zu erkennen ist eine mit „Ribbons“ dicht besiedelte äußere plexiforme Schicht. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 4 μm .

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“,

ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht;

INL: innere Körnerschicht

Abb. 21: Ausschnittsvergrößerung des Expressionsmusters von „RIBEYE“
im Bereich der äußeren plexiformen Schicht am 9. postnatalen Tag

Keine Änderung zum Vortag zu verzeichnen. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 4 μm .

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“,

ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht;

INL: innere Körnerschicht

Abb. 22: Ausschnittsvergrößerung des Expressionsmusters von „RIBEYE“
im Bereich der äußeren plexiformen Schicht am 10. postnatalen Tag

Die äußere und die innere Körnerschicht machen einen dicht gepackten Eindruck und stellen eine scharfe Begrenzung zur äußeren plexiformen Schicht dar. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) sind die „Ribbons“ im roten Farbkanal eindeutig zu identifizieren. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 4 μm .

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“,

ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht;

INL: innere Körnerschicht

10.2.8 Dreizehnter und siebzehnter Tag nach der Geburt

Stichpunktartige Untersuchungen mit Netzhäuten vom 13. und vom 17. postnatalen Entwicklungstag zeigten nur noch geringfügige Änderungen in der Ausreifung der Netzhaut.

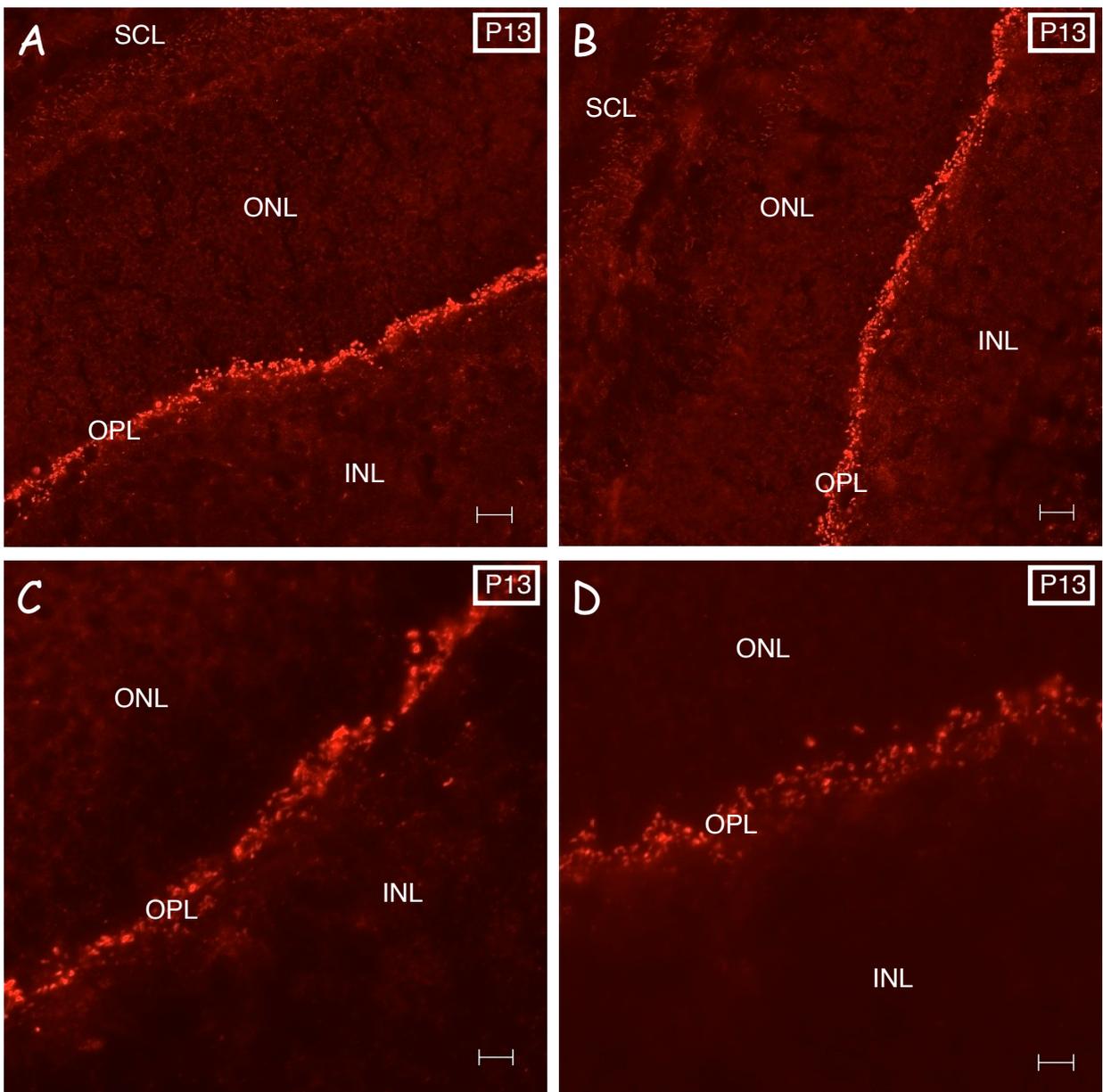


Abbildung 23: Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P13

A & B: Übersichtsaufnahme einer mit „anti-RIBEYE U2656“ gefärbten wildtypischen Mäuseretina im Entwicklungsstadium P13. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm . Die Expositionszeit beträgt 60 ms.

C & D: Ausschnittsvergrößerung der Retina im skleranahen Bereich. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 μm . Die Expositionszeit beträgt 150 ms.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“, SCL: Sklera, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht

Am 13. postnatalen Entwicklungstag haben die synaptischen „Ribbons“ im Vergleich zum 10. postnatalen Entwicklungstag nochmals an Größe zugenommen. Die gesamte Sinnsfront stellt sich als homogen und sehr dicht gepackt in der äußeren plexiformen Schicht dar.

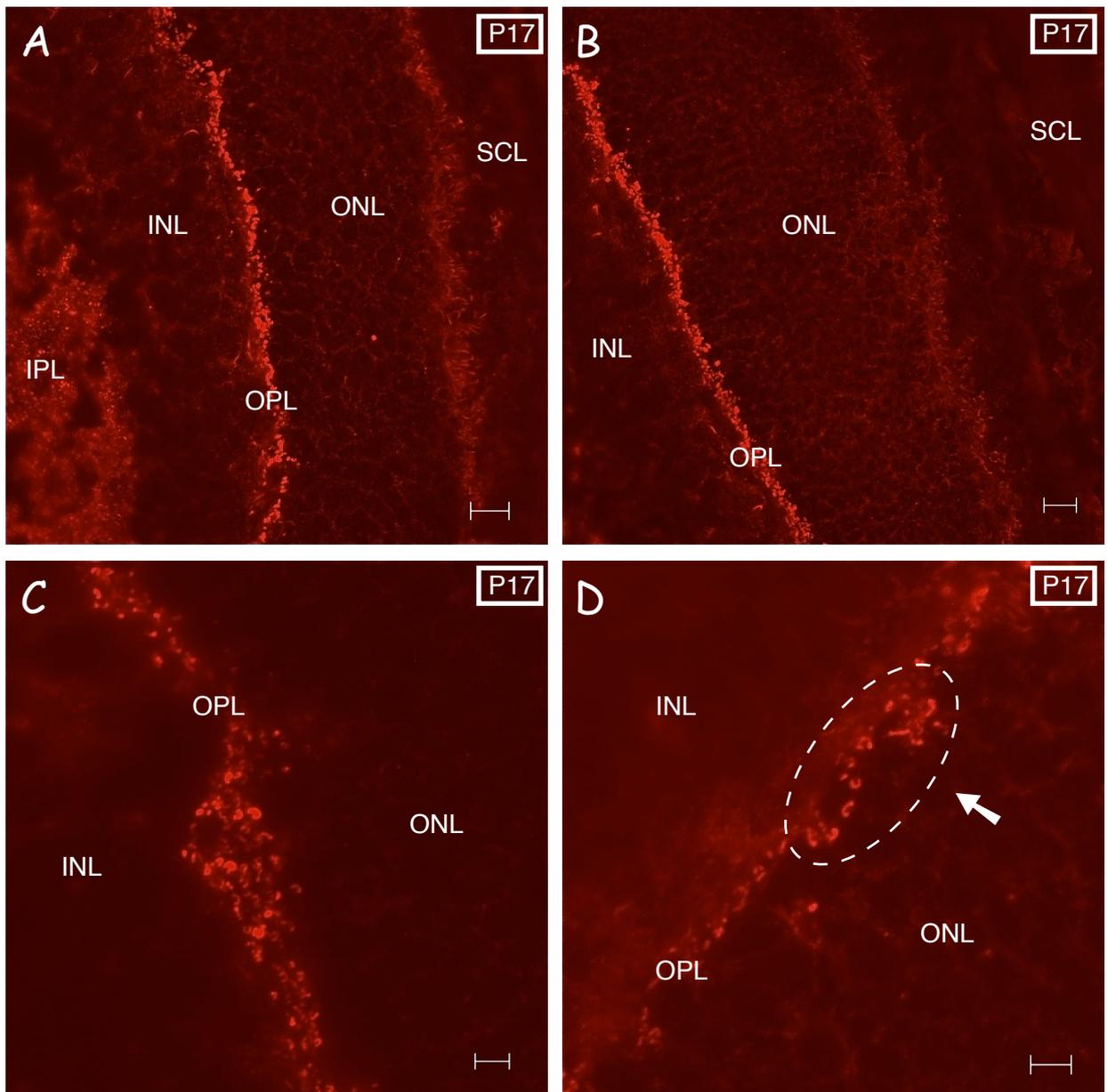


Abbildung 24: Expressionsmuster von RIBEYE im Entwicklungsstadium P17

A & B: Übersichtsaufnahme einer mit „anti-RIBEYE U2656“ gefärbten wildtypischen Mäuseretina im Entwicklungsstadium P17. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm . Die Expositionszeit beträgt 130 ms.
C & D: Ausschnittsvergrößerung der Retina im skleranahen Bereich. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 μm . Die Expositionszeit beträgt 220 ms. Die Pfeilmarkierung zeigt die synaptischen Ribbons in ihrer charakteristischen Hufeisenform.

Roter Farbkanal: „anti-RIBEYE U2656“, SCL: Sklera, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; IPL: innere plexiforme Schicht

In den Ausschnittsvergrößerungen der äußeren plexiformen Schicht sind die „Ribbons“ am 17. postnatalen Tag nun flächendeckend deutlich in ihrer charakteristischen Hufeisenform zu erkennen (Abb. 24).

Mit zunehmender Ausdifferenzierung der Netzhaut und damit verbundenen Größenzunahme der inneren plexiformen Schicht (IPL) fällt ebenfalls eine zunehmende Signalanreicherung für „anti-RIBEYE U2656“ im Bereich der inneren plexiformen Schicht auf (Abb. 24 A). Aus diesem späteren Auftreten deutlicher RIBEYE Signale in der IPL lässt sich schliessen, dass sich die Ribbons in der IPL, im Vergleich zur OPL, später herauskristallisieren. Ein Vergleich der Ribbonform deutet darauf hin, dass die Ribbons in der IPL kleiner sind, als in der OPL.

10.3 Differenzierung der synaptischen Zuordnung von „RIBEYE“

In Anbetracht der Immunfluoreszenzen, vor allem der Stadien nach beginnender Ausreifung der äußeren plexiformen Schicht (P7 - „adult“) ist zu beobachten, dass sich die Synaptischen „Ribbons“ streng in der äußeren plexiformen Schicht befinden. Um genauer differenzieren zu können, ob es sich innerhalb dieser Schicht eher um eine prä- oder postsynaptische Lokalisation handelt, sollten Doppelimmunfluoreszenzen die beweisführenden Ergebnisse bringen. Hierfür beschränkte ich mich auf ein frühes Expressionsstadium, auf Tiere des ersten postnatalen Tages und als Kontrollgruppe auf Tiere im „adulten“ Entwicklungsstadium.

Als präsynaptischer Marker diente das Protein „Synaptophysin“, welches ein ca. 38 kDa schweres aus vier transmembranen Domänen bestehendes integrales Glykoprotein ist und hoch spezifisch für synaptische Vesikel ist. Man findet es in so gut wie allen neuroendokrinen Zellen vor, an denen eine synaptische Übertragung stattfindet. Vorzugsweise natürlich im Gehirn, Rückenmark und in der Retina. In den Synapsen selber geht Synaptophysin zusammen mit Synaptobrevin einen Komplex ein, welcher in der Lage ist, die synaptische Aktivität zu moduliert. Synaptophysin ein hoch spezifisches Protein für synaptische Vesikel / Vesikeltransport, was es im Rahmen der folgenden immunhistochemische Untersuchungen zu einem idealen Marker für die synaptischen Übertragungen / Vesikeltransport macht.

Die Detektion von „Synaptophysin“ erfolgte durch den monoklonalen Antikörper „Anti-Synaptophysin“, welcher sich wie „anti-RIBEYE U2656“ auch, bereits in Vorversuchen der Arbeitsgruppe Prof. Schmitz als äußerst selektiv und zuverlässig erwiesen hat.

Als postsynaptischer Marker fokussierten wir uns auf NCAM. Der Begriff NCAM leitet sich auch dem Englischen ab und beschreibt eine Gruppe von Proteinen, die die sog. Zell-Zell-Adhäsion im tierischen Gewebe vermitteln (engl. nerve-cell-adhesion molecule). Hierbei handelt es sich um integrale Membranproteine, welche auf der Zelloberfläche exprimiert werden und

deren grundlegende Funktion es ist, den Zusammenhalt von Gewebe zu ermöglichen und die Kommunikation der Zellen untereinander zu gewährleisten. Die Art der Befestigung an der Zellmembran und die Länge der intrazellulären Domäne sind strukturelle Faktoren und haben einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionsweise dieser Moleküle (Fields & Itoh, 1996), worauf in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden soll. Durch alternative Spleißvorgänge entstehen die drei Hauptformen NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 (Cunningham et al., 1987), wobei durch seltenere Spleißvorgänge in der intrazellulären Domäne wiederum weitere 18 Isoformen entstehen können (Santoni et al., 1987), welche sich in der Art der Membranassoziation sowie im Vorhandensein von bestimmten extrazellulär Mikroexons unterscheiden (Goodman, 1996).

NCAM stellt ein typisches Beispiel für ein neuronales Erkennungsmolekül dar, da es sowohl im sich entwickelnden, als auch im ausgereiften Nervensystem stark exprimiert wird. Aufgrund seiner ausgeprägten Exprimierung und der ebenfalls hohen Spezifität für neuronales Gewebe, eignet sich NCAM hervorragend für Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz im sich noch entwickelnden Nervengewebe. Die Detektion der NCAM Moleküle erfolgte über HNK-1, welches ein Kohlenhydrat-Epitop von NCAM ist (Schachner und Martinin, 1995).

10.3.1 Westernblot Untersuchung zum Nachweis von „Synaptophysin“ und „NCAM“

Wie bei der anfänglichen postnatalen Detektion von „RIBEYE“, wurde auch für den Nachweis von „Synaptophysin“ und „NCAM“ eine Westernblot-Untersuchung durchgeführt. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können wurden hierfür ebenfalls Netzhäute von wildtypischen Mäusen des ersten postnatalen Entwicklungstages (P1) und von „adulten“ Tieren verwendet.

Abbildung 25: Westernblot Untersuchung zum Nachweis von Synaptophysin

Sowohl im Stadium P1, als auch beim „adulten“ Tier lässt sich das Protein „Synaptophysin“ in seiner typischen Lokalisation von 38 kDa nachweisen.

Primär Antikörper: „Anti-Synaptophysin“
Sekundär Antikörper: „GAM Pox IgG“

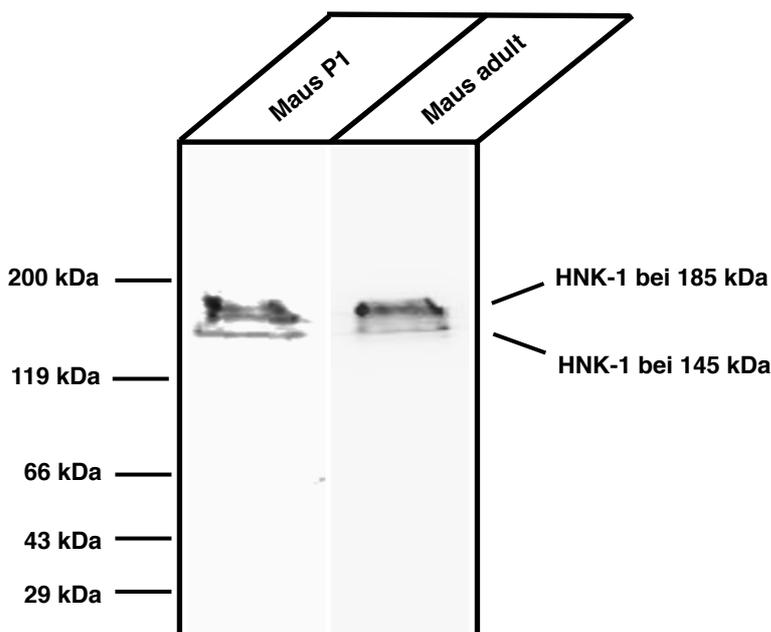
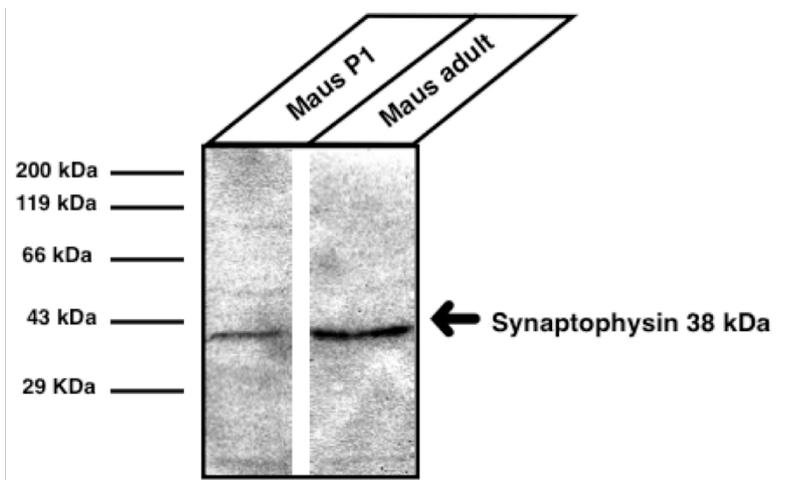


Abbildung 26: Westernblot Untersuchung zum Nachweis von NCAM

Sowohl im Stadium P1, als auch beim „adulten“ Tier lassen sich die beiden, für diesen Antikörper typische zu detektierenden Banden in der Höhe von 184 kDa und 145 kDa nachweisen.

Primär Antikörper: „Anti-HNK-1“
Sekundär Antikörper: „GAM Pox IgM“

**Übersichtsaufnahmen beim „adulten“ Tier
Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“**

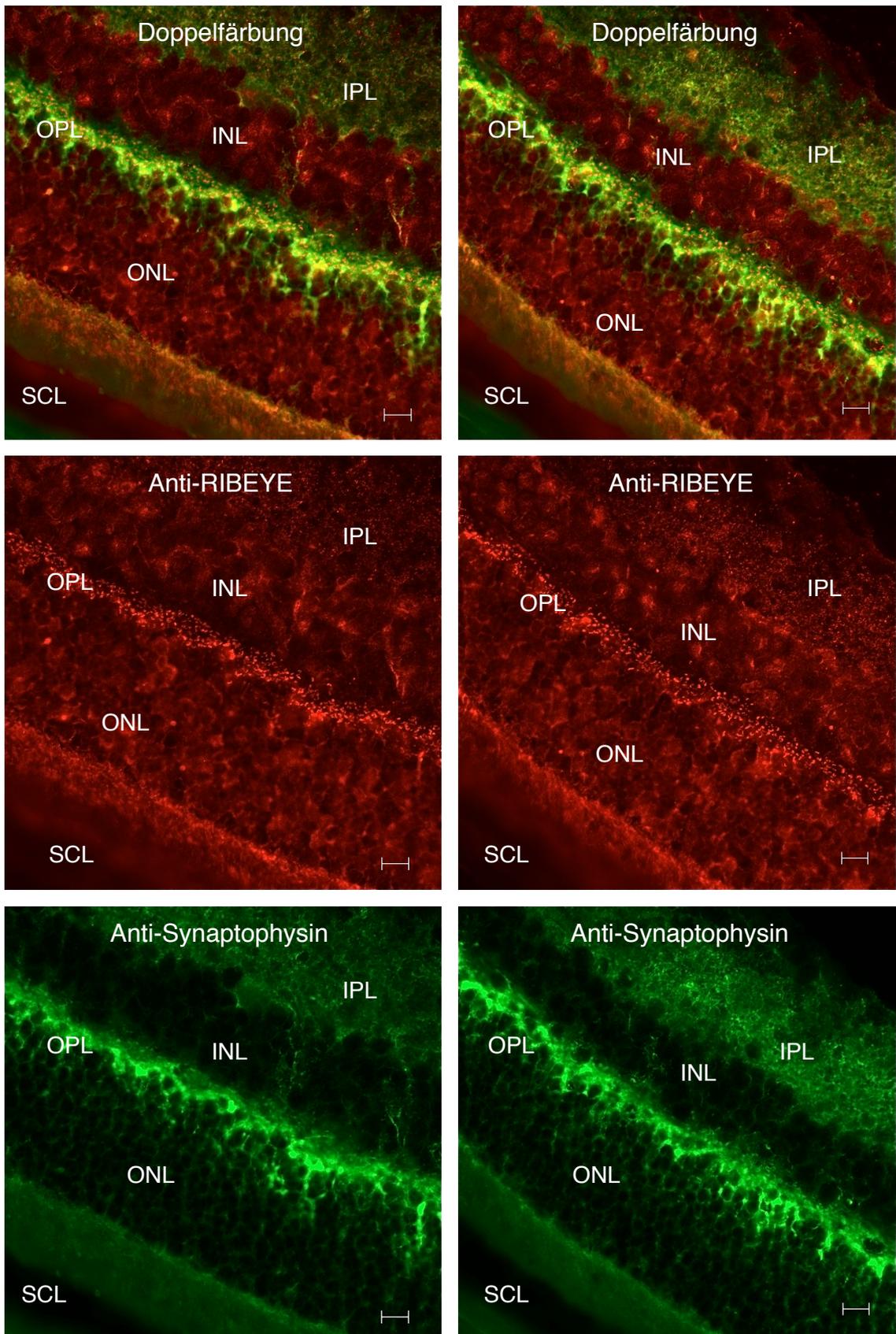


Abbildung 27: Abbildungslegende siehe übernächste Seite

Ausschnittsvergrößerung beim „adulten“ Tier

Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“

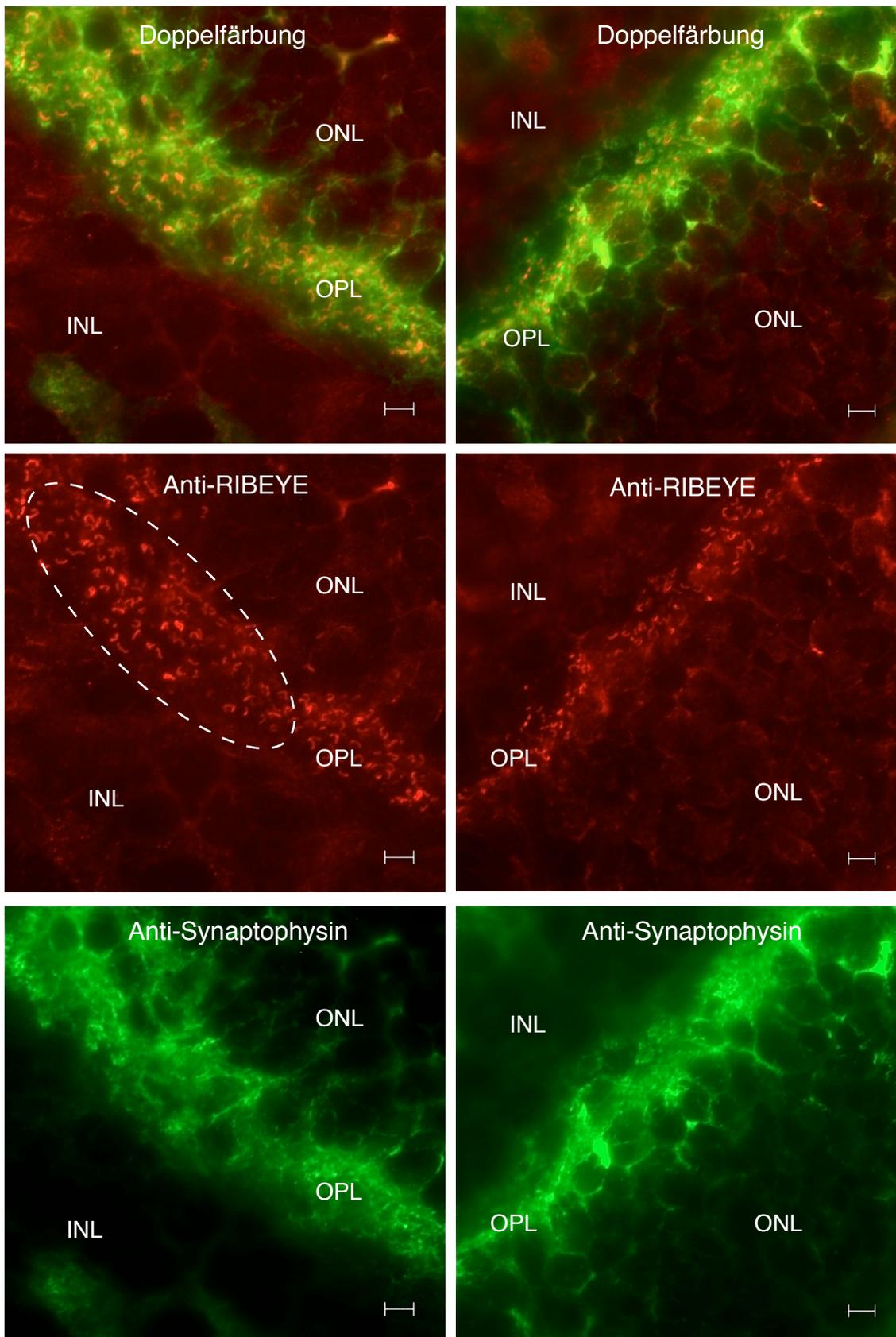


Abbildung 28: Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abb. 27 und Abb. 28

Abb. 27: Übersichtsaufnahmen beim „adulten“ Tier

Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“

In der Doppelfärbung ist durch den Vesikelmarker Synaptophysin eine klare Abgrenzung der einzelnen Retinaschichten zu erkennen. Der Antikörper gegen Synaptophysin (grüner Farbkanal) reichert sich wie erwartet im Bereich der OPL und der IPL an.

Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 µm.

SCL: Sklera; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; IPL: innere plexiforme Schicht.

Abb. 28: Ausschnittsvergrößerung beim „adulten“ Tier

Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“

Die Antikörper gegen RIBEYE (roter Farbkanal) und gegen Synaptophysin (grüner Farbkanal) zeigen eine deutliche Kolo-kalisation im Bereich der äußeren plexiformen Schicht.

Der markierte Bereich zeigt die synaptischen „Ribbons“ in ihrer charakteristischen Hufeisenform, wie sie in der adulten Netzhaut anzutreffen sind.

ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht;

INL: innere Körnerschicht; IPL: innere plexiforme Schicht. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 µm.

Übersichtsaufnahmen beim „adulten“ Tier

Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“

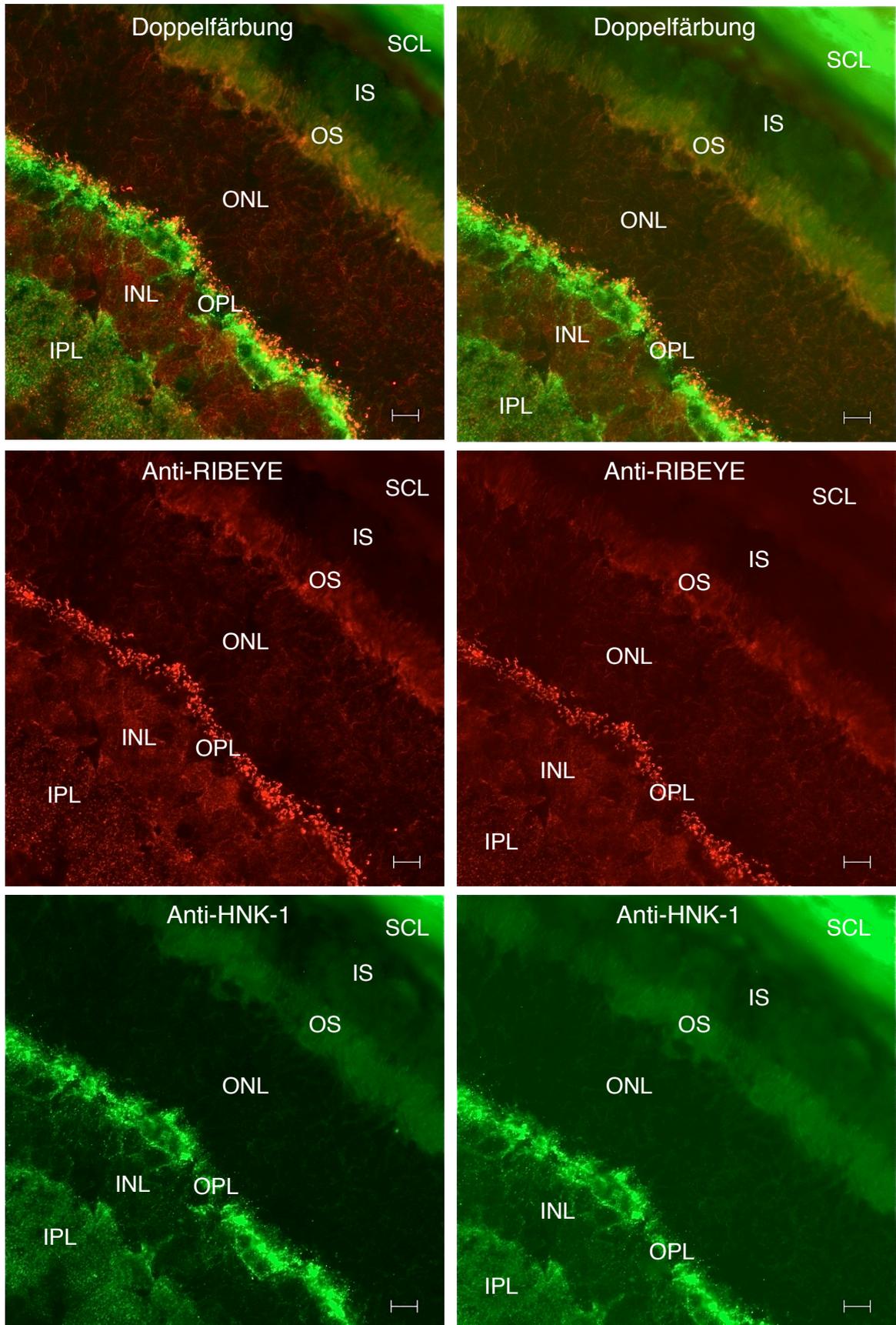


Abbildung 29: *Abbildungslegende siehe übernächste Seite*

Ausschnittsvergrößerung beim „adulten“ Tier

Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“

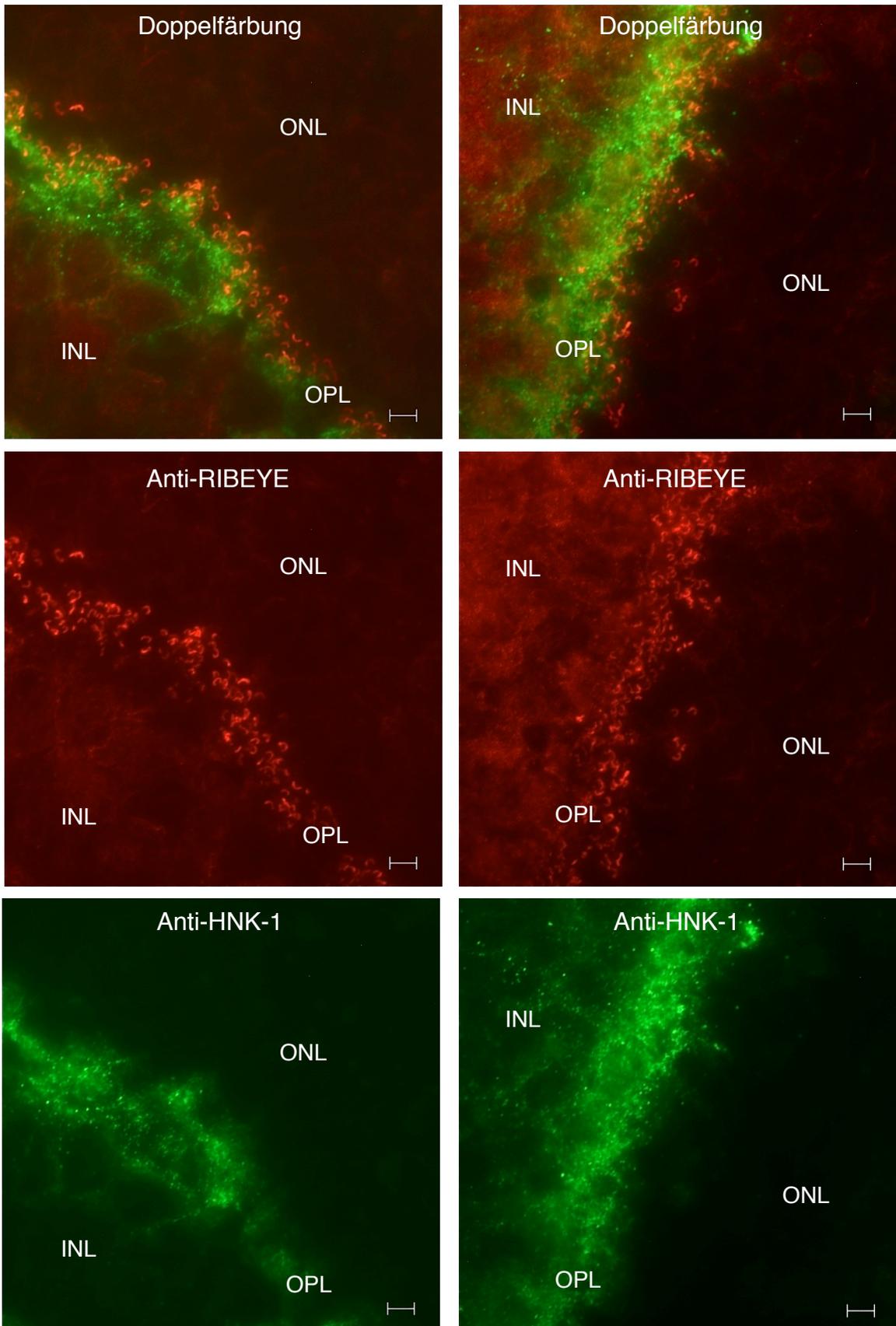


Abbildung 30: *Abbildungslegende siehe nächste Seite*

Abbildungslegende zu Abb. 29 und Abb. 30

Abb. 29: Übersichtsaufnahmen beim „adulten“ Tier Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“

Die Antikörper gegen RIBEYE (roter Farbkanal) und gegen HNK-1 (grüner Farbkanal) lagern sich beide im Bereich der äußeren plexiformen Schicht an. Es ist jedoch keine eindeutige Kolo-kalisation zu erkennen, wie es bei Synaptophysin der Fall war.

Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 µm.

SCL: Sklera; IS: innere Segment der Photorezeptoren; OS: äußere Segment der Photorezeptoren; ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; IPL: innere plexiforme Schicht.

Abb. 30: Ausschnittsvergrößerung beim „adulten“ Tier Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK1“

In der Ausschnittsvergrößerung im Bereich der äußeren plexiformen Schicht kann man beobachten, dass sich der Antikörper gegen HNK-1 (grüner Farbkanal) eher im Bereich der inneren Körnerschicht (postsynaptisch) und der Antikörper gegen RIBEYE eher im Bereich der äußeren Körnerschicht (präsynaptisch) ansiedelt. Es ist keine eindeutige Kolo-kalisation beider Signale zu erkennen.

ONL: äußere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht;

INL: innere Körnerschicht. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 µm.

10.3.2 Lokalisation von „Synaptophysin“ und „NCAM“ innerhalb der Retina

Das Auftreten beider Proteine konnte sowohl im Entwicklungsstadium P1, als auch beim adulten Tier in zwei zueinander unabhängigen Untersuchungen nachgewiesen werden. Im Westernblot zeigten sich die jeweiligen Banden in der für das Protein zu erwartenden Höhe (Abb. 25 und Abb. 26). Um die genaue Lokalisation der einzelnen Proteine innerhalb der Netzhaut zu ermitteln, wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit Kryoschnitten beim „adulten“ Tier durchgeführt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die synaptischen „Ribbons“ ausschließlich im präsynaptischen Bereich der äußeren plexiformen Schicht zu finden sind. Die Signalansammlung für „Anti-Synaptophysin“ zeigte eine deutliche Kolo-kalisation zu den „Ribbons“ sowohl in der inneren plexiformen Schicht, als auch in der äußeren plexiformen Schicht (Abb. 27) und füllt diesen Bereich nahezu komplett aus. Eine Überlagerung der beiden Farbsignale kommt hierbei besonders deutlich in den Ausschnittsvergrößerungen der äußeren plexiformen Schicht zur Geltung (Abb. 28).

Auf eine Kontrollfärbung mit „Anti-CtBP2“ wurde im „adulten“ Stadium verzichtet, da sich die „Ribbons“ bereits in ihrer charakteristischen Hufeisenform in der äußeren plexiformen Schicht darstellten (Markierung Abb. 28).

Vergleichbar deutliche Ergebnisse liessen sich in den Doppelimmunfluoreszenzen mit „Anti-HNK-1“, dem Antikörper gegen das postsynaptische Protein „NCAM“, ablesen. Bereits in den Übersichtsaufnahmen der Netzhäute war keine Kolo-kalisation zwischen „RIBEYE“ und „HNK-1“ innerhalb der äußeren plexiformen Schicht zu erkennen. Die Signale für „HNK-1“ waren zwar ebenfalls innerhalb der äußeren plexiformen Schicht lokalisiert, lagerten sich jedoch nahe der inneren Körnerschicht, also vitread von den „Ribbons“ in einer separaten Signalfrent an (Abb. 29).

In den Ausschnittsvergrößerungen der äußeren plexiformen Schicht ließ sich dieses Verteilungsmuster nochmals deutlich darstellen (Abb. 30).

Eine direkte Signalüberlagerung, wie es bei „Anti-Synaptophysin“ der Fall ist, konnte nicht dokumentiert werden und verdeutlichte somit die eindeutig postsynaptische Lokalisation von HNK-1 / NCAM.

Um zu ermitteln, ob die Signalkolokalisation zwischen „RIBEYE“ und „Synaptophysin“ bereits seit der Geburt bestehen oder ob sich diese erst im Verlauf entwickeln, wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit Netzhäuten des Entwicklungsstadiums „P1“ durchgeführt. Eine bereits bei der Geburt bestehende Kolokalisation von Synaptophysin und RIBEYE würde darauf hindeuten, dass die sich entwickelnden Ribbons bereits im unreifen Zustand von synaptischen Vesikeln umgeben sind. In den Übersichtsaufnahmen ist bereits zu erkennen, dass das Signal für „Anti-Synaptophysin“ stets auf den skleranahen Bereich der äußeren Neuroblastenschicht beschränkt ist, in welchem sich die „Ribbons“ entwickelten (Abb. 27).

In den Ausschnittsvergrößerungen des skleranahen Bereichs ist zu erkennen, dass „RIBEYE“ mit Vesikeln assoziiert ist (Abb. 28) und dass eine eindeutige Signalüberlagerung zwischen „RIBEYE“ und „Synaptophysin“ besteht. Diese Ergebnisse bekräftigen die Beobachtungen beim „adulten“ Tier (Abb. 23 und Abb. 24) und zeigen, dass „RIBEYE“ bereits ab dem ersten postnatalen Entwicklungstag eindeutig präsynaptisch lokalisiert ist.

Das Verteilungsmuster für „HNK-1“ wies sowohl in den Übersichtsaufnahmen (Abb. 29), als auch in den Ausschnittsvergrößerungen (Abb. 30), keinerlei Kolokalisation zu „RIBEYE“ auf. Die zu detektierenden „HNK-1 Signale“ waren diffus über die gesamte äußere Neuroblastenschicht verteilt und zeigten, wie bereits im „adulten“ Stadium gesehen, dass „RIBEYE“ eindeutig präsynaptisch lokalisiert ist.

Übersichtsaufnahmen im Entwicklungsstadium P1

Doppelimmunfluoreszenz mit „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“

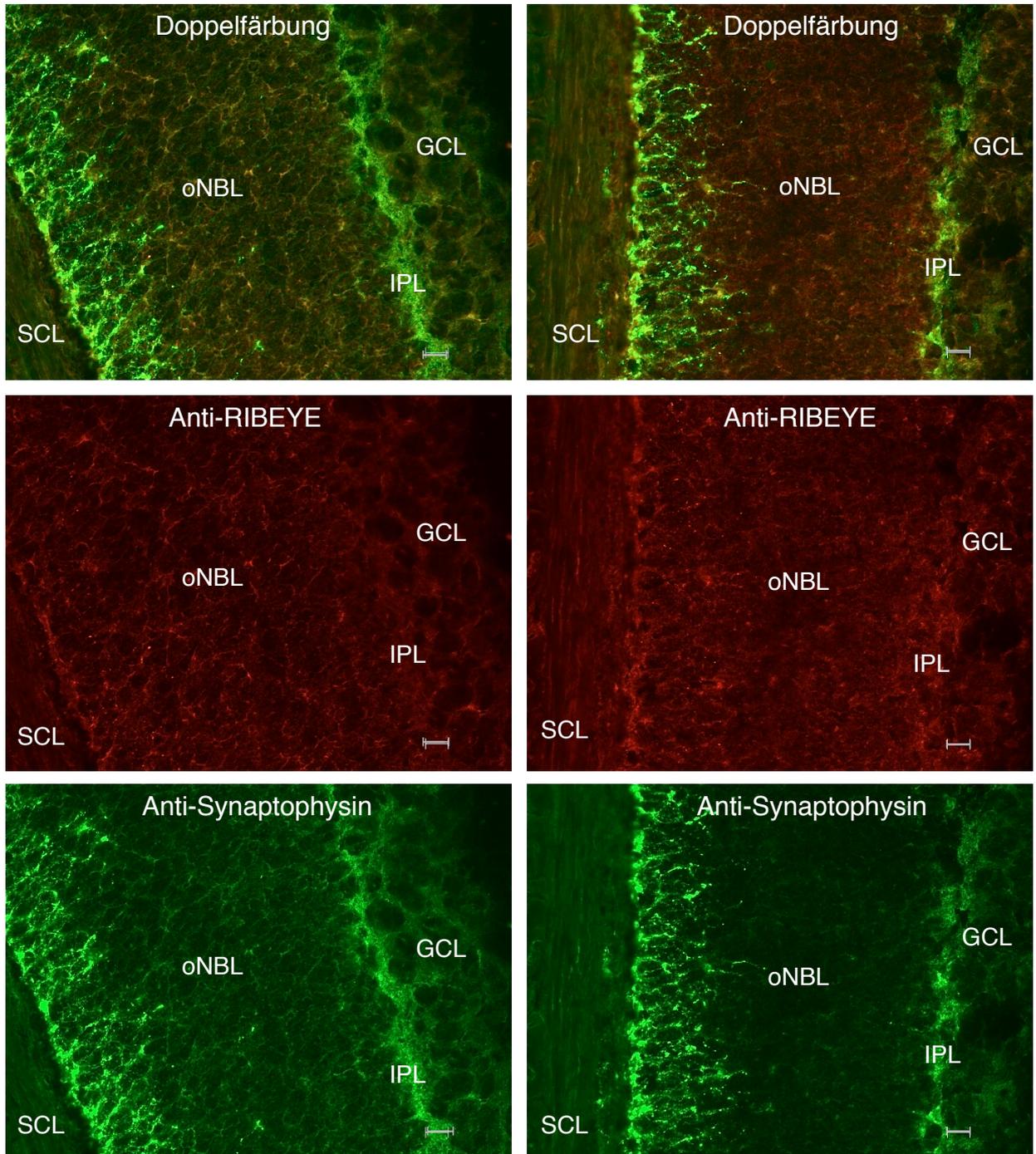


Abbildung 31: Expressionsmuster von RIBEYE und Synaptophysin im Entwicklungsstadium P1

Die Signalansammlung für „Synaptophysin“ beschränkt sich deutlich sichtbar auf den Sklera (SCL) nahen Bereich der äußeren Neuroblastenschicht (oNBL). Eine schwach ausgebildete innere plexiforme Schicht (IPL) und die Ganglienzellschicht (GCL) sind bereits sichtbar. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 µm.

**Ausschnittsvergrößerung im Entwicklungsstadium P1
Doppelimmunfluoreszenz „Anti-RIBEYE“ / „Anti-Synaptophysin“**

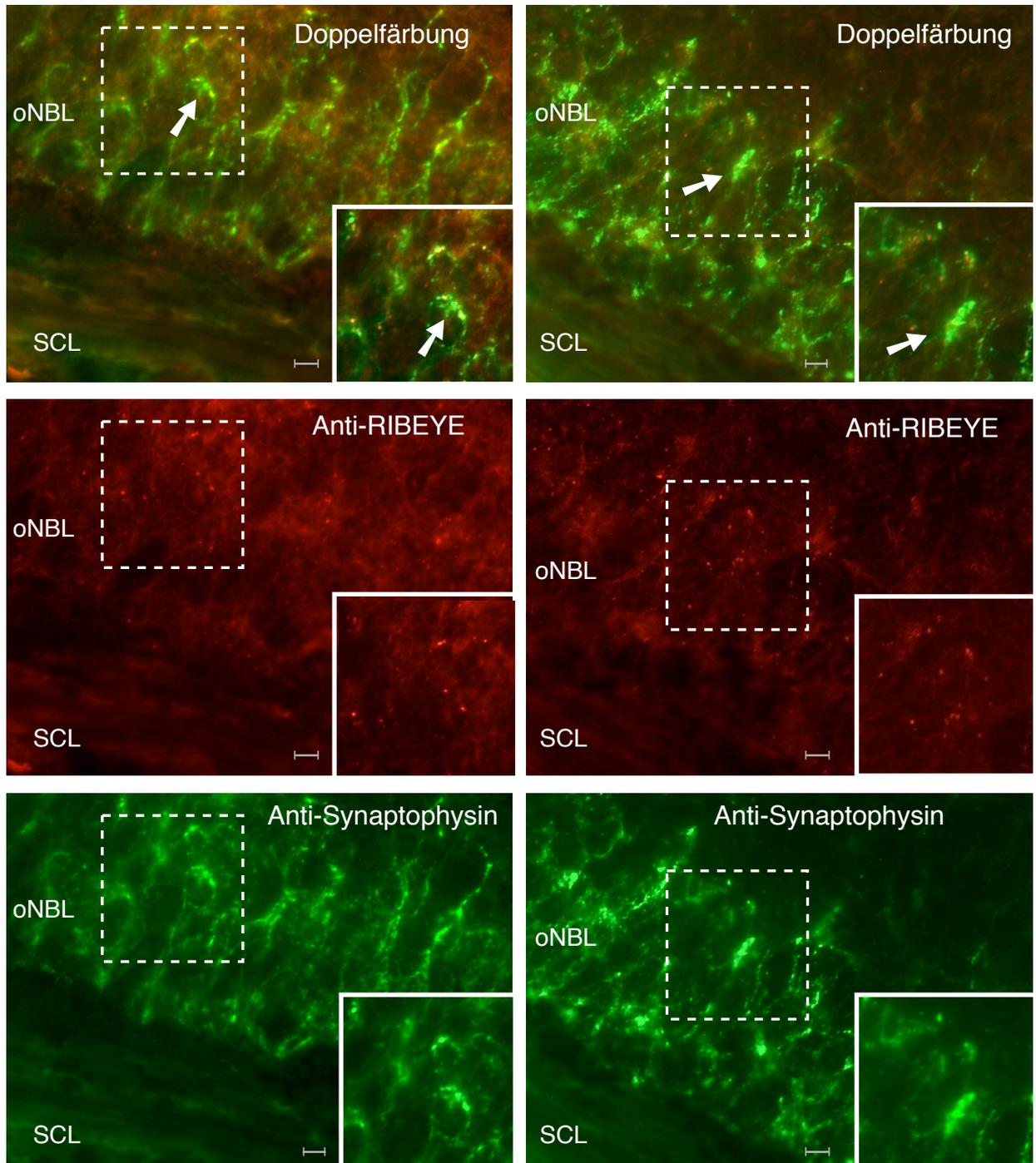


Abbildung 32: Expressionsmuster von RIBEYE und Synaptophysin im Entwicklungsstadium P1
Die noch schwach sichtbaren, punktförmigen „RIBEYE-Signale“ im Sklera (SCL) nahen Bereich der äußeren Neuroblastenschicht (oNBL) zeigen eine deutliche Kolokalisation zu den Signalanhäufungen von „anti-Synaptophysin“. Die Skalierung entspricht einer Größe von 4 μm .

Übersichtsaufnahmen im Entwicklungsstadium P1
Doppelimmunfluoreszenz „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“

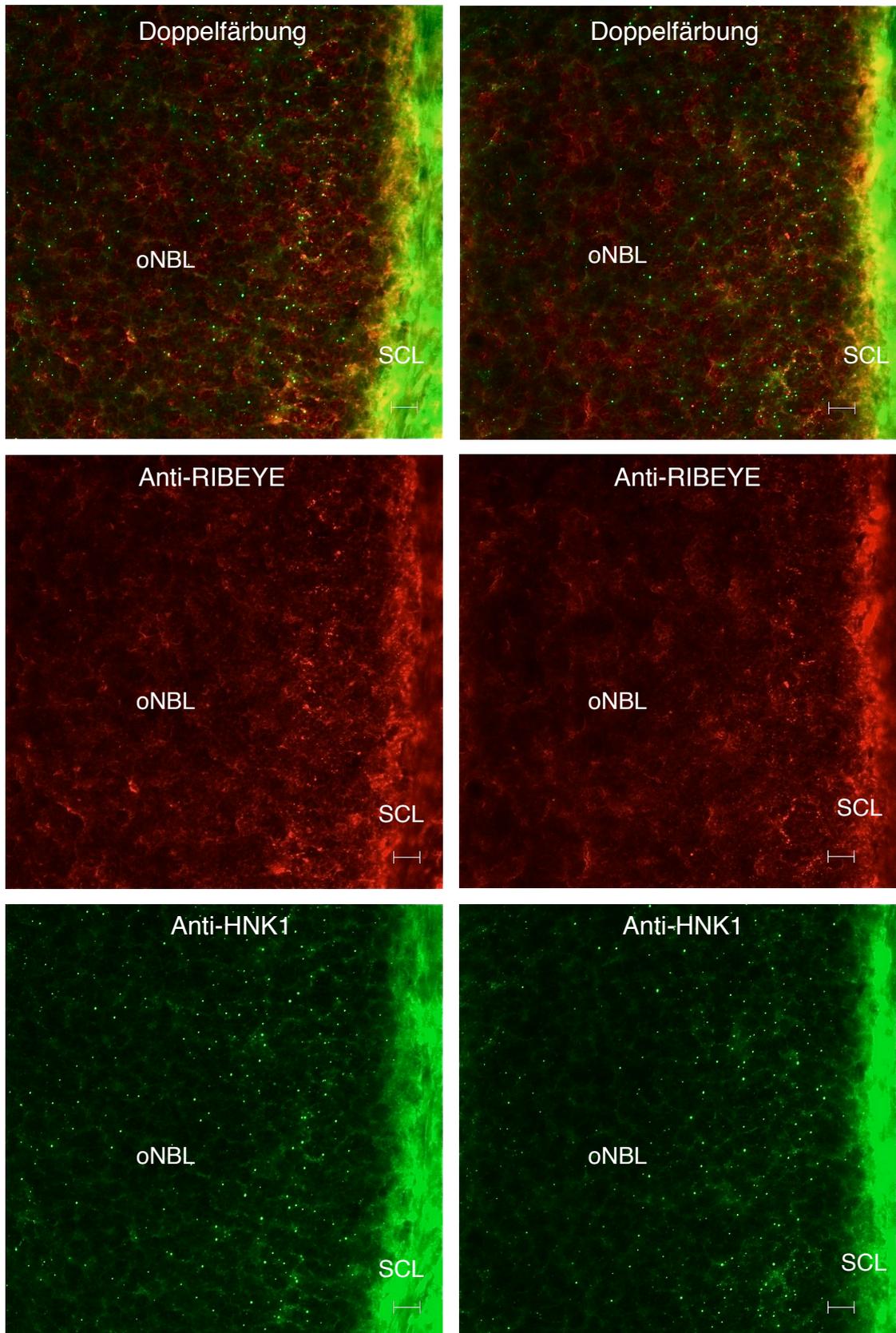


Abb. 33: Zwischen „RIBEYE“ und „HNK-1 / NCAM“ ist keine Kolo­kalisierung zu erkennen. „HNK-1“ verteilt sich diffus in der äußeren Neuroblastenschicht (oNBL), „RIBEYE“ siedelt sich im Sklera (SCL) nahen Bereich an. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 µm.

Übersichtsaufnahmen im Entwicklungsstadium P1

Doppelimmunfluoreszenz „Anti-RIBEYE“ / „Anti-HNK-1“

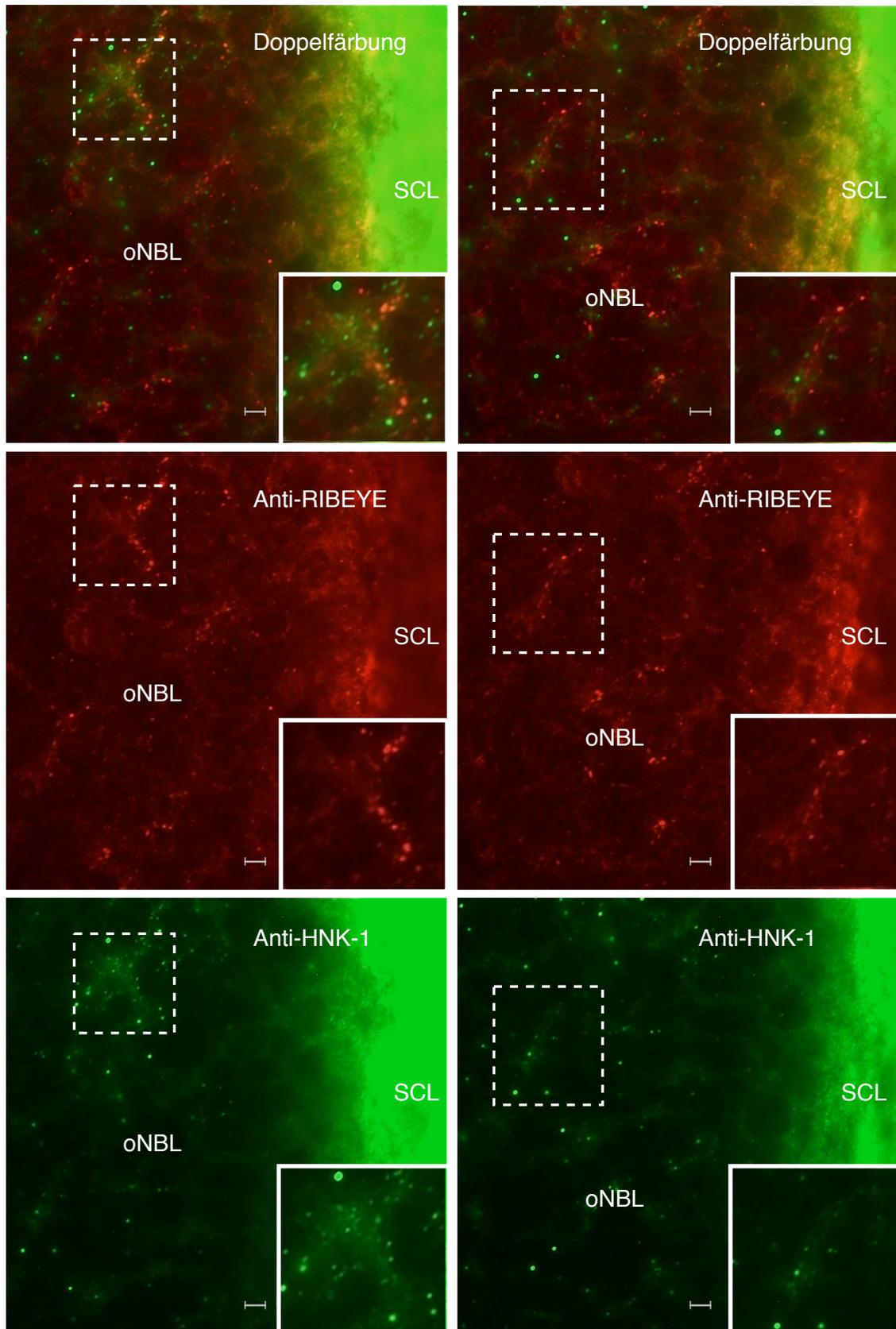


Abb. 34: Zwischen „RIBEYE“ und „HNK-1 / NCAM“ ist keine Kolokalisation zu erkennen. „HNK-1“ verteilt sich diffus in der äußeren Neuroblastenschicht (oNBL), „RIBEYE“ siedelt sich im Sklera (SCL) nahen Bereich an. Die Skalierung entspricht einer Größe von 10 μm .

11. Diskussion

Die Umwandlung von elektrischen auf chemische Signale findet bei Nervenzellen an speziellen Kontaktstellen, den sog. Synapsen statt. Diese Synapsen bestehen aus einer präsynaptischen Seite, dem synaptischen Spalt und der postsynaptischen Seite. Die präsynaptische Seite enthält die weiter zu leitende Information in Form von elektrischen Reizen. Diese in der Synapse angekommenen elektrischen Reize induzieren in der Präsynapse die Fusion von Neurotransmitter haltigen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran. Der freigesetzte Neurotransmitter diffundiert durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Seite, wo er mit den entsprechenden Rezeptoren interagiert. Diese wiederum sorgen für eine Umwandlung des chemischen Signals in ein elektrisches Rezeptorpotential. Durch die Menge des freigesetzten Neurotransmitters sind die Synapsen also befähigt, das Rezeptorpotential zu beeinflussen und somit die Informationsweiterleitung zu regulieren. Gerade im Bereich der Sinnesorgane ist eine graduelle Reizweiterleitung erforderlich, um selbst kleine Unterschiede der Sinneseindrücke zuverlässig weiterleiten zu können. Zu diesem Zweck haben sich in der Retina und im Innenohr ganz besondere Synapsentypen entwickelt, die sogenannten Ribbonsynapsen. Bei den Ribbonsynapsen oder Bandsynapsen handelt es sich um hochspezialisierte chemische Synapsen.

Die bandsynapsen zeichnen sich durch ihre schnelle und tonsche Ausschüttung des Transmitters Glutamat aus und sind somit befähigt, sich feinsten Graduierungen der Reizintensität anzupassen. Besonders in solchen neuronalen Geweben, in denen ein hohes Maß an Diskrimination für die Signalübertragung gefordert ist, wie z.B. in retinalen Photorezeptoren und in Bipolarzellen oder den Haarzellen der Cochlea im Innenohr, sowie in Melatonin sezernierenden Zellen in der Epiphyse (Smith and Sjöstrand, 1961; Dowling, 1987) sind diese Synapsen anzutreffen. Hier stellen sie eine essenzielle Komponente des sensorischen Systems dar.

Die hier vorliegende Dissertation untersucht die Entwicklung der retinalen Bandsynapsen in wildtypischen Mäusen des Aufzuchtstammes Black-6-N. Insbesondere wurde untersucht, wann die ersten Ribbonsynapsen in der Retina auftreten und damit eine kontinuierliche Wachstumsanalyse vom Tag der Geburt bis zur vollständigen Ausdifferenzierung aller retinalen Schichten zu liefern. Desweiteren wurde der Frage nachgegangen, ob das synaptische Protein „RIBEYE“, welches die Hauptkomponente der synaptischen Ribbons darstellt, alleine oder mit Vesikeln assoziiert in die sich entwickelnde OPL (äußere plexiforme Schicht) gelangt.

Die Entwicklung der Mäuseretina beginnt bereits vor der Geburt und vollzieht sich über eine relativ lange postnatale Zeitspanne. Die sich entwickelnde Retina zeigt somit eine relativ hohe zeitliche Rasterung (Grün 1980; Olney 1968), wobei sich nicht alle Areale in gleicher Geschwindigkeit entwickeln. Bereits in Vorarbeiten konnte beobachtet werden, dass eine deutliche centroperiphere Reifungsverzögerung in den Retinae von Ratten und auch Katzen auftritt (Kirchhoff et al., 2007), die sich insbesondere auch auf die Synaptogenese in der OPL bezieht.

Die Ausdifferenzierung der Retina als Ganzes ist gekennzeichnet durch eine vitreosclerale Entwicklungsrichtung, bezogen auf den Bulbus oculi (Grün, 1980). Die Entwicklung der synaptischen Verschaltung beginnt dabei zunächst in horizontaler Richtung auf Photorezeptorebene über die Vernetzung der Zapfen und Stäbchen durch die Horizontalzellen, bevor später in der Entwicklung (etwa um P12 herum) mit Hilfe der Bipolarzellen der vertikale Informationsfluss bewerkstelligt wird (Maslim und Stone, 1986).

Aufgrund meiner Untersuchungen ist festzustellen, dass die Entwicklung der Ribbon-Synapse einen kontinuierlicher Prozess darstellt, der bereits mit dem Tag der Geburt (P0) nachweisbar ist. Zu diesem Zeitpunkt weist die Retina noch ihre für dieses Stadium typische Dreischichtung mit einer relativ breiten oNBL (äußeren Neuroblastenschicht) auf. Eine innere plexiforme Schicht (IPL) und die Ganglienzellschicht (GCL) lassen sich erkennen. Eine äußere plexiforme Schicht (OPL) hat sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht aus der oNBL herausdifferenziert.

Das synaptische Protein RIBEYE, welches den Hauptbestandteil der synaptischen Ribbons darstellt, eine Struktur, die für die von mir untersuchten Ribbonsynapsen charakteristisch ist (Schmitz et al., 2000), konnte jedoch bereits direkt nach der Geburt, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die OPL noch nicht erkennbar ist, mit drei von einander unabhängigen Methoden von mir nachgewiesen werden.

Mit Hilfe immunhistochemischer Markierung von Netzhautpräparaten gegen das Protein RIBEYE konnte ich bereits ab dem Tag P0 eine diffuse Verteilung der „RIBEYE“ positiven Signale im skleranahen Bereich der oNBL nachweisen. Dieses eher diffuse Verteilungsmuster lässt sich bis zum Tag P2 in mehr oder weniger unveränderter Form nachweisen. Da RIBEYE die Hauptkomponente der synaptischen Ribbons darstellt und Magupalli et al. (2008) nachweisen konnte, dass RIBEYE durch multiple Selbstinteraktionen in der Lage ist das Grundgerüst der synaptischen Ribbons aufzubauen, ist davon auszugehen, dass bereits zu diesem frühen Entwicklungsstadium zumindest unreife Ribbonvorläufer in der Retina vorhanden sind.

Meine Beobachtungen decken sich mit denen von Hanna Regus-Leidig, welche Untersuchungen zur Entwicklung, Struktur und Funktion von komplexen chemischen Synapsen an wildtypischer Mäuseretina durchführte und zeigen konnte, dass alle wichtigen synaptischen Proteine bereits ab dem Tag der Geburt vorhanden sind. Demnach stehen bereits zum Zeitpunkt der Geburt alle Proteinkomponenten zur Verfügung, um funktionelle Ribbonsynapsen auszubilden.

Mit dem Einsetzen der Ausdifferenzierung einer OPL aus der oNBL löste sich das diffuse Verteilungsmuster langsam auf und man konnte allmählich eine Kondensation der „RIBEYE“-Signale im mittleren Bereich der oNBL beobachten, in welchem sich zwischen dem Tag P4 und P5 die OPL entwickelt (Kriegstein et al., 2003; Olney 1968; Grün 1982). Die Zeitspanne von P4-P5 indiziert einen wichtigen Schritt in der Entwicklung der Ribbonsynapse. Zwar lassen sich ab dem Tag P4 schon vereinzelt synaptische Ribbons mit ihrer charakteristischen Hufeisenform in der OPL erkennen, jedoch ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht von einer vollen Funktionalität aller Photorezeptorsynapsen der äußeren plexiformen Schicht auszugehen.

Ihre letztendliche ultrastrukturelle Form mit der an der präsynaptischen Membran angehafteten Ribbons entwickelt die Ribbon-Synapse zwischen dem Tag P7 und P12 (Olney 1968), einem Zeitpunkt zu dem alle notwendigen Komponenten in den Endigungen der Photorezeptorterminale angekommen sind. Alle synaptischen Membranproteine, welche für eine schnelle und regulatorische Exozytose von Vesikeln an der Ribbon-Synapse notwendig sind, finden sich nach dem Tag P4-P5 in den Terminalen der OPL ein. Es ist also theoretisch davon auszugehen, dass die Ribbon-Synapse ab dem Tag P4-P5 als eine konventionelle Synapse arbeiten kann und bis zu ihrer vollen Ausreifung befähigt ist, grundlegende synaptische Aufgaben zu übernehmen (Kriegstein et al., 2003). Stützen würde dieses ebenfalls die Anwesenheit von vesikulären Glutamattransportern (VGLUTs) an Photorezeptor- und Bipolarzellendigungen in der Mäuseretina, ab dem Tag P2 (Sherry D. M., Wang M. W., Bates J., Fishman L. J., 2003). Interessanterweise reifen die Ribbonsynapsen der Photorezeptoren früher als die der Bipolarzellen. In den Photorezeptorterminalen kann man erstmalig ab P4 hufeisenförmige Ribbons detektieren und auch die Anordnung der Synapsen in der OPL wirkt zu diesem Zeitpunkt bereits sehr strukturiert. Möglicherweise benötigen die Bipolarzellen den synaptischen Input der Photorezeptoren, um ihrerseits Ribbons in den synaptischen Endigungen zu assemblieren und zu verankern.

Eine generelle Aggregation des synaptischen Proteins „RIBEYE“, ist jedoch bis kurz vor dem Zeitpunkt der Augenöffnung (bei Mäusen ca. 10.-12. Tag) nicht zu verzeichnen. Die OPL ist zwischen P4-P10 noch relativ breit und wenig kondensiert, das heißt es werden laufend neue Synapsen geformt, bzw. synaptische Ribbons in die Terminalen transportiert.

Kürzlich wurde durch ultrastrukturelle Untersuchungen herausgefunden, dass „RIBEYE“ selber das Potential besitzt, Synaptic Ribbons aufzubauen. RIBEYE ist in der Lage durch spezifische Bindungsstellen sowohl an der A-Domäne, als auch an der B-Domäne zu interagieren.

Eine Zusammenlagerung kann dabei sowohl als homo- als auch als heterotypisch (RIBEYE(A) - RIBEYE(B)) erfolgen. Diese Interaktionsstellen geben eine mögliche Erklärung, wie das grundlegende dreidimensionale Gerüst der synaptischen Ribbons gebildet werden kann. Weitere Faktoren

werden jedoch benötigt, um die synaptischen Ribbons aufzubauen (Schmitz et al., 2000; Wan et al., 2005) und um die charakteristische hufeisenartige Plattenstruktur der komplett ausgereiften Ribbons zu formen (Magupalli et al., 2008). Hierbei spielt auch die Verankerung der synaptischen Ribbons an der präsynaptischen Membran eine grosse Rolle. Ribbons von akut dissoziierten Bipolarzellen z.B. zeigen die Tendenz sich von der präsynaptischen Membran zu lösen und dabei zu dissoziieren.

Eine zeitgleiche Expression aller für den Aufbau der synaptischen Ribbons benötigten Proteine konnte jedoch nicht verzeichnet werden (Kriegstein et al., 2003). Erste elektronenmikroskopisch nachweisbare Proteinaggregationen für das synaptische Protein „Bassoon“, welches u.a. verantwortlich ist für die Verankerung der synaptischen Ribbons (Magupalli et al., 2008) konnte frühestens zum Tag P4 in der sich ausbildenden OPL detektiert werden (Regus-Leidig et al., 2008). Dies deckt sich mit meinen Beobachtungen, dass die ersten synaptischen Ribbons mit ihrer charakteristischen „Hufeisenform“ bereits zu diesem Zeitpunkt vereinzelt nachweisbar waren.

Ab dem Tag P4 ist an der Intensität der RIBEYE-Signalen in der OPL keine signifikante Änderung mehr zu beobachten. Durch die vertikale Ausweitung der OPL bleibt das Signalmuster der Proteinaggregationen von RIBEYE-Signalen erhalten, welche lichtmikroskopisch von der Morphologie her lediglich an Größe zunehmen und je nach Schnittrichtung eine hufeisenförmige Erscheinung aufweisen. Die Zeitspanne bis zur letztendlichen Ausdifferenzierung aller Retinaschichten kann als allgemeiner „Reifungsprozess“ der Netzhaut angesehen werden.

Als mögliche Erklärung dafür, dass RIBEYE zwar bereits ab dem Tag der Geburt zu sehen ist, elektronenmikroskopisch jedoch noch keine Aggregationen nachweisbar sind (Magupalli et al., 2008) könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass RIBEYE bis zur endgültigen Ausbildung aller retinalen Schichten durch einen noch unbekanntem Faktor in Lösung gehalten wird (Magupalli et al., 2008). Es stellt sich die Frage, ob eine frühe Aggregation der Proteine und damit die Aufgabe ihrer Löslichkeit, im Zuge des Ausreifungsprozesses der Retina und der synaptischen Ribbons

überhaupt von Vorteil wäre, denn dies würde zum Einen den Transport von RIBEYE in die synaptischen Terminale erschweren, andererseits könnten ektopische Ribbons in den Somata entstehen, welche die Funktionalität der Photorezeptoren massiv einschränken würde.

Schon vor der Augenöffnung ist bei Mäusen eine synaptische Aktivität der Retina nachweisbar. Die synaptische Aktivität kann anhand von spontanen exzitatorischen und inhibitorischen Aktivität ab dem Tag P7 an den retinalen Ganglienzellen nachgewiesen werden (Johnson, Tian, Caywood, Reimer, Edwards and Copenhagen et al., 2003). Sollten die an der Ganglienzellen eingehenden Signale tatsächlich von den Photorezeptoren stammen, so ist von parallel zu den Bipolarzellen verlaufenden Signalwegen zu diesem Zeitpunkt auszugehen, da die Bipolarzellen-Ganglienzellen-Synapsen zu diesem Zeitpunkt noch nicht aktiv sind. Welche Signale auch immer die Ganglienzellen erhalten, die zu übertragende Signalrate ist nicht so ausgeprägt, dass eine voll funktionsfähige Ribbonsynapse von Nöten wäre. Vermutlich dienen die frühen synaptischen Aktivitäten in der Ganglienzellschicht der möglichen Wegfindung von Neuronen in den visuellen Kortex oder dazu, den Schichtaufbau der Retina durch retrograden Informationsfluss zu stimulieren. Auch die minimale synaptische Aktivität der Photorezeptoren zu Zeiten in denen eine gezielte optische Wahrnehmung noch nicht möglich ist (geschlossene Lieder lassen nur Lichtreflexe erkennen), scheint wichtig für die Strukturelle Integrität der sich entwickelnden Retina zu sein.

Ein gehäuftes Auftreten von präsynaptischen Bändern wurde in Vorarbeiten (Regus-Leidig et al., 2008) erst zum Zeitpunkt P10 entdeckt und nahm dann im zeitlichen Verlauf mit dem Grad der Ausreifung der Retina ebenfalls prozentual zu. Die rein morphologische Ausdifferenzierung der Retina in alle Schichten ist mit dem Entwicklungsstadium P8 weitgehend abgeschlossen. Bis zum Tag P10 ist kein Unterschied mehr zur adulten Netzhaut erkennbar gewesen.

Die hufeisenförmige Markierung, welche für die präsynaptischen Bänder der adulten Photorezeptor-Terminale charakteristisch ist, ist jedoch auch am Tag P13 noch selten zu erkennen. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Synaptogenese mit diesem Tag noch nicht vollständig abge-

geschlossen ist (Dick et al., 2003). Die Bildung und Reifung der Bandsynapsen setzt sich noch bis zur fünften postnatalen Woche fort (Regus-Leidig et al., 2008).

Morphologische Untersuchungen zur Entwicklung von Ribbonsynapsen in der äußeren plexiformen Schicht der Rattenretina haben ebenfalls gezeigt, dass sich die Bildung der synaptischen Ribbons in den präsynaptischen Terminalen der Photorezeptoren kontinuierlich fortsetzt, bis sie kurz vor der Augenöffnung P12 in der OPL ihren quantitativen Höhepunkt erreicht; Augenöffnung bei Ratten ca. 13.-14. Tag. Übereinstimmend ist dies mit den von mir durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen mit Tieren im Entwicklungsstadium P17, bei denen im Vergleich zum Stadium P13 ein deutlicher Entwicklungssprung zu verzeichnen war. Die im Stadium P13 noch dicht gepackten RIBEYE-Signale in der OPL präsentierten sich im Stadium P17 bereits in den Übersichtsaufnahmen als voll ausgereift Ribbonsynapsen mit ihrem charakteristischen hufeisenförmigen Ribbon. Quantitative Messungen in Vorarbeiten belegten ebenfalls eine signifikante Größenzunahme der synaptischen Bänder nach ihrer Verankerung an die Membran (Regus-Leidig et al., 2008).

Durch Doppelimmunfluoreszenzen mit sowohl einem präsynaptischen Marker (Synaptophysin), als auch einem postsynaptischen Marker (NCAM) konnten beim adulten Tier das synaptische Protein „RIBEYE“ in den typischen Lokalisation nachgewiesen werden. Sowohl „RIBEYE“, als auch Synaptophysin waren streng auf die plexiformen Schichten begrenzt (IPL und OPL) und wiesen eine deutlich Kolokalisation auf.

Beim postsynaptischen Marker „NCAM“ ergaben sich ähnlich deutlich Ergebnisse für die Lokalisation von „RIBEYE“.

Bereits in den Übersichtsaufnahmen war zu erkennen, dass sich die Signalfront für „HNK-1 / NCAM“ auf der vitreaten Seite der OPL und somit parallel zur präsynaptischen „RIBEYE“-Seite anlagerte. Die präsynaptische Lokalisation von „RIBEYE“ ist deutlich zu erkennen.

Untersuchungen mit den gleichen Markern zu einem Zeitpunkt, an dem die OPL noch nicht ausgebildet ist (erster Tag nach der Geburt) zeigte ebenfalls deutliche Kollokalisierungen zwischen „RIBEYE“ und „Synaptophysin“.

Dabei kann jedoch nicht unterschieden werden, ob „RIBEYE“ durch einen vesikulären Transport in den Bereich der sich später erst entwickelnden OPL transportiert wird oder, ob es sich bei der demonstrierten Kollokalisierung um eine Assoziation von synaptischen Vesikeln rund um den sich bildenden unreifen Ribbon handelt. Letzteres würde nahe legen, dass die synaptischen Ribbons in kleineren Vorläuferkomplexen assemblieren, die sich nach ihrer Entstehung mit synaptischen Vesikeln umgeben. Dies könnte auch die dramatischen morphologischen Veränderungen zwischen P2 und P4 bei einigen synaptischen Ribbons erklären. Wenn die Ribbons aus kleinen „fertig zusammengebauten“ Einheiten entstehen würden, dann ist es nicht verwunderlich, dass in relativ kurzer Zeit ein nahezu ausgereifter Ribbon entstehen kann. Bei dieser Hypothese würde quasi eine einzelne komplette kleine Baueinheit wie ein Kristallisationskeim wirken, der die Anlagerung weiterer Baueinheiten katalysiert, bis eine kritische Größe erreicht ist. Diese Hypothese deckt sich auch mit Beobachtungen, dass synaptische Ribbons dynamische Ribbonstrukturen sind, die je nach Lichtintensität durch die Abspaltung oder Anlagerung kleiner Baueinheiten verkürzt oder verlängert werden können (Grün et al., 1980). Magupalli et al. (2008) konnte zeigen, dass in heterologen Zellkultursystemen überexprimiertes RIBEYE in der Lage ist, elektronendichte Strukturen zu bilden und dass diese zumindest teilweise von Vesikeln umgeben sind. Bei diesen Strukturen könnte es sich um Äquivalente zu den beim Verkürzen der Ribbons entstehenden Baueinheiten handeln.

12. Literaturverzeichnis

Ahnelt P. K., Keri, C., Kolb, H. (1990) Identification of pedicles of putative blue sensitive cones in human and primate retina. *J. Comp. Neurol.* 293, 39-53

Altwein M. (2003) Lokalisierung und Funktion von synaptischen Proteinen in der Netzhaut von Säugetieren, Naturwissenschaftliche Dissertation. Technische Universität Darmstadt

Becher A., Drenckhahan A., Hähnlein I., Magittai M., Jahn R., Ahnert-Hilger G. (1999): The synaptophysin/synaptobrevin complex - a hallmark of synaptic vesicle maturation. *J. Neurosci.* 19: 1922-1931

Behrens U. D., Kasten P., Wagner H. J. (1998) Adaption-dependent plasticity of rod bipolar cell axon terminal morphology in the rat. *Cell Tissue Res* 294:243-251

Bernreuther C. (2001) Funktionelle Analysen der humanen neuronalen Zellerkennungsmoleküle L1 und CHL1, Naturwissenschaftliche Dissertation. Universität Hamburg

Brandstätter J. H., Lörke S., Morgans C. W., Wässle H. (1996) Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in the mammalian retina. *J. Comp Neurol.* 370:1-10

Brandstätter J. H., Koulen P., Wässle H. (1998) Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Research* 38, 1385-1397.

Cunningham B. A., Hemperly J. J., Murray B. A., Prediger E. A., Brackenbury R., Edelman G. M. (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing. *Science* 236:799-806

DeVries S. H., Baylor D. A. (1993) Synaptic circuitry of the retina and olfactory bulb. *Cell* 72 Suppl, 139-149

Dick O., Dieck T. S., Altmann W. D., Ammermüller J., Weiler R., Garner C.C., Gundelfinger E. D., Brandstätter J. H. (2003) The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37:775-786

Dowling J. E. (1987) *The Retina: An Approachable Part of the Brain*, Cambridge, MA: Harvard University Press

Fields R. D., Itoh K. (1996) Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *TINS* 19: 473-480

Fröhlich K. (2008) Ein morphologischer Interaktionsassay zur Charakterisierung der Bindung von CtIP an das synaptische Ribbonprotein RIBEYE, Naturwissenschaftliche Dissertation. Universität des Saarlandes

Geppert M., Ullrich B., Green D. G., Takei K., Daniels L., De Camilli P., Südhof T. C., Hammer R. E. (1994) Synaptic targeting domains of synapsin I revealed by transgenic expression in photoreceptor cells. *EMBO J.* 13, 3720–3727

- Goodman C. S.** (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 19:341-377
- Gray E. G., Pease H.L.** (1971) On understanding the organization of the retinal receptor synapses. *Brain Res.* 35:1–15
- Grün G.** (1980) Developmental Dynamic in Synaptic Ribbons of Retinal Receptor Cells (Tilapia, Xenopus), *Cell Tissue Res.* 207, 331-339
- Gustavus D. B., Jastrow H., Bastelberger A., Menzler S., Kolios G., Vollrath L.** (2001) Morphologie der Arciform Density in Ribbonsynapsen der Mäuseretina, Wissenschaftlicher Artikel, Anatomisches Institut, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Haffner A.** (2008) Etablierung eines Zellkultursystems zur Untersuchung von Exozytose in Ribbon-Synapsen, Naturwissenschaftliche Dissertation. Universität des Saarlandes
- Hamm-Baarke A.** (2003) Analyse der Informationsverarbeitung in CHL1-defizienten Mäusen mittels metabolischer Markierung, Expressionsstudien der Immediate-Early-Gene c-fos und arg3.1/arc sowie verhaltensbiologischer Tests, Naturwissenschaftliche Dissertation. OvGU Magdeburg
- Heidelberger R., Matthews G.** (1992) Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 447, 235–256
- Hermes B., Reuss S., Vollrath L.** (1992) Synaptic Ribbons, Spheres and Intermediate structures in the developing rat retina, *Int. J. Dev. Neurosci.* 10:215-23
- Hinz B., Becher A., Mitter D., Schulze K., Heinemann U., Draguhn A., Ahnert-Hilger G.** (2001) Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur. J. Cell Biol.* 80: 615-619
- Hopsu V. K., Arstila A. U.** (1964) An apparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of the rat. *Exp. Cell Res.* 37, 484–487
- Horstkorte R., Schachner M., Magyar J. P., Vorherr T., Schmitz B.** (1993) The Fourth Immunoglobulin-like Domain of NCAM Contains a Carbohydrate Recognition Domain of Oligomannosidic Glycans Implicated in Association with L1 and Neurite Outgrowth. *J. Cell Biol.* 121:1409-21
- Jastrow H., Mach M. A., Vollrath L.** (1997) The shape of synaptic ribbons in the rat pineal gland. *Cell Tissue Res.* 287, 55–261
- Johnson J., Tian N., Caywood M. S., Reimer R. J., Edwards R. H., Copenhagen D. R.** (2003) Vesicular Neurotransmitter Transporter Expression in Developing Postnatal Rodent Retina: GABA and Glycine Precede Glutamate, *The Journal of Neuroscience*, 23:518 –529
- Kandal E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M.** (2000) Principles of neural science. 4nd ed., Mcgraw-Hill Publ. Comp.
- Katsanis N., Fisher E. M.** (1998) A novel C-terminal binding protein (CTBP2) is closely related to CTBP1, and adenovirus E1A binding protein, and maps to human chromosome 21q21.2. *Genomics* 47, 294–299

- Kerschensteiner D.**, Josh L. Morgan, Edward D. Parker, Renate M. Lewis, Rachel O. Wong (2009) Neurotransmission selectively regulates synapse formation in parallel circuits in vivo, *Nature*, 20; 460(7258): 1016–1020
- Kirchhoff M.** (2007) Morphologische Untersuchungen zur Entwicklung von Ribbonsynapsen in der äußeren plexiformen Schicht der Rattenretina, *Naturwissenschaftliche Dissertation*. Universität des Saarlandes
- Kriegstein K.**, Schmitz F. (2003) The expression pattern and assembly profile of synaptic membrane proteins in ribbon synapses of the developing mouse retina, *Cell Tissue Res* 311:159–173
- Wan L.**, Almers W., Chen W. (2005) Two ribeye Genes in Teleosts: The Role of Ribeye in Ribbon Formation and Bipolar Cell Development, *The Journal of Neuroscience*, 25:941–949
- Lenzi D.**, Runyeon J. W., Crum J., Ellisman M. H., Roberts W. M. (1999) Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J. Neurosci.* 19, 119–132
- Magupalli V. G.**, Schwarz K., Alpadi K., Natarajan S., Seigel G. M., Schmitz F. (2008) Multiple RIBEYE–RIBEYE Interactions Create a Dynamic Scaffold for the Formation of Synaptic Ribbons, *The Journal of Neuroscience*, 28:7954–7967
- Mandell J. W.**, Townes-Anderson E., Czernik A. J., Cameron R., Greengard P., De Camilli P. (1990) Synapsins in the vertebrate retina: absence from ribbon synapses and heterogeneous distribution among conventional synapses. *Neuron* 5, 19–33
- Maslim J.**, Stone, J. (1986) Synaptogenesis in the retina of the cat. *Brain Research*, 373, 35-48.
- McCartney M. D.**, Dickson D. H. (1985) Photoreceptor synaptic ribbons: three-dimensional shape, orientation and diurnal (non) variation. *Exp Eye Res* 41:313–321
- Morgans C. W.**, Brandstätter J. H., Kellerman J., Betz H., Wässle H. (1996) A snare complex containing syntaxin 3 is present in ribbon synapses of the retina. *J. Neurosci.* 16, 6713–6721
- Muresan J.**, Lyass A., Schnapp B. J. (1999) The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate Photoreceptors, *The Journal of Neuroscience*, 19:1027–1037
- Nachman-Clewner M.**, St. Jules R., Townes-Anderson E. (1999) L-type calcium channels in the photoreceptor ribbon synapse: localization and role in plasticity. *J. Comp. Neurol.* 415, 1–16
- Navone F.**, Jahn R., Di Gioia G., Stukenbrok H., Greengard P., De Camilli P. (1986) Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J. Cell Biol.* 103, 2511–2527
- Olney J. W.** (1968) An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina, *Invest Ophthalmol.* 7:250-68

- Peichl L.** (1992) Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina der Säugetiere. *Biologie in unserer Zeit* 22, 45-53
- Poortinga G.**, Watanbe M., Parkhurst S. M. (1998) *Drosophila* CtBP: a hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* 17, 2067–2078.
- Rao-Mirotnik R.**, Harkins A. B., Buchsbaum G., Sterling P. (1995) Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14:561–569
- Regus-Leidig H.** (2008) The mammalian photoreceptor ribbon synapse: A study of the development, structure and function of a complex chemical synapse, *Naturwissenschaftliche Dissertation*. Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
- Rieke F.**, Schwartz E. A. (1996) Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse. *J. Physiol. (Lond.)* 493, 1–8.
- Santoni M. J.**, Barthels D., Barbas J. A., Hirsch M. R., Steinmetz M., Goridis C., Wille W. (1987) Analysis of cDNA clones that code for the transmembrane form of the mouse neural cell adhesion molecule (N-CAM) and are generated by alternative RNA splicing. *Nucl. Acids Res.*, 15: 8621-8641
- Schaeffer S. F.**, Raviola E., Heuser J. E. (1982) Membrane specializations in the outer plexiform layer of the turtle retina. *J. Comp. Neurol.* 204:253–267
- Schaeper U.**, Boyd J. M., Sulekha V., Uhlmann E., Subramanian T., Chinnadurai G. (1995) Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10467–10471
- Schmitz F.**, Bechmann M., Drenckhahn D. (1996) Purification of synaptic ribbons, structural components of the photoreceptor active zone complex. *J. Neurosci.* 16, 7109-7116
- Schmitz F.**, Drenckhahn D. (1993) Distribution of actin in cone photoreceptor synapses. *Histochemistry* 100, 35–40
- Schmitz F.**, Königstorfer A., Südhof T. C. (2000) RIBEYE, a Component of Synaptic Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight into Synaptic Ribbon Function, *Neuron*, Vol. 28, 857–872
- Schlüter O. M.**, Schnell E., Verhage M., Tzonopoulos T., Nicoll R. A., Janz R., Malenka R. C., Geppert M., Südhof T. C. (1999) Rabphilin Knock-Out Mice Reveal That Rabphilin Is Not Required for Rab3 Function in Regulating Neurotransmitter Release, *The Journal of Neuroscience* 19, 5834–5846
- Sherry D. M.**, Wang M., Bates J., Fishman L. J. (2003) Expression of Vesicular Glutamate Transporter 1 in the Mouse Retina Reveals Temporal Ordering in Development of Rod vs. Cone and ON vs. OFF Circuits, *The Journal of comparative neurology* 465:480 – 498
- Sjöstrand F. S.** (1958) Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *J. Ultrastruct Res.* 2:122–170

- Smith C. A.**, Sjöstrand F. S. (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *J. Ultrastruct. Res.* 5, 523–556
- Sparado A.**, De Simonis I., Puzzulo D. (1978) Ultrastructural data and chronobiological patterns of the synaptic ribbons in the outer plexiform layer in the retina of albino rats. *Acta Anatomica*, 102, 365-373
- Steinhausen K.** (2003) Best'sche Vitelliforme Makuladegeneration. Wissenschaftlicher Artikel der Augenklinik, Uniklinik Hamburg-Eppendorf
- Sterling P.**, Jonathan B. Demb (2004) *The synaptic organization of the brain*, G.M. Shepherd, ed. Oxford University Press
- Stevens C. F.**, Tsujimoto T. (1995) Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 846–849
- Turner J.**, Crossley M. (1998) Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Krüppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *EMBO J.* 17, 5129–5140
- Veruki M. L.**, Hartveit E. (2002) All (Rod) amacrine cells form a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina. *Neuron* 33, 935-946
- Von Gersdorff H.**, Vardi E., Matthews G., Sterling P. (1996) Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16:1221–7
- Von Kriegstein K.**, Schmitz F., Link E., Südhof T. C. (1999) Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1335–1348
- Von Kriegstein K.**, Schmitz F. (2003) The expression pattern and assembly profile of synaptic membrane proteins in ribbon synapses of the developing mouse retina. *Cell Tissue Research* 311: 159-73
- Wan L.**, Almers W., Chen W. (2005) Two ribeye genes in teleosts: the role of Ribeye in ribbon formation and bipolar cell development. *J. Neurosci.* 25:941–949
- Wang Y.**, Okamoto M., Schmitz F., Hofmann K., Südhof T. C. (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388, 593–598
- Wässle H.**, Boycott B. B. (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews* 71, 447-480
- Zhang H.**, Levine M. (1999) Groucho and dCtBP mediate separate pathways of transcriptional repression in the Drosophila embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 535–540

13. Danksagung

Mit Fertigstellung der Dissertation ist es an der Zeit denjenigen zu danken, die mich während der langen Zeit im Labor begleitet, unterstützt und motiviert haben.

Mein erster Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Frank Schmitz, welcher mich in seine Forschungsgruppe aufgenommen hat und den Fortgang meiner Dissertation durch sowohl kritische als auch motivierende Beiträge angetrieben hat.

Ganz besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Karin Schwarz.

Sie stand mir bei meiner Dissertation zu jeder Tag- und Nachtzeit zur Seite und ist auch in ihrem Urlaub noch ans Telefon gegangen, wenn ich neue Ergebnisse zu besprechen hatte.

Danke Cheffin !!! :-)

Nicht weniger dankbar bin ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen im Labor, vorallem Frau Sylvia Brundaler und Frau Gerlinde Kühnreich. Ohne Eure Unterstützung wäre so einiges schief gegangen.

Danke vielmals !

Besonders danken möchte ich zum Schluss auch meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden. Ihr habt die ganze Zeit an mich geglaubt, mich gestützt und habt wesentlich dazu beigetragen, dass ich heute an diesem Punkt stehe.

14. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andreas Michael Jungbauer
Geburtsdatum	30.05.1983
Geburtsort	Hoechst
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Beruflicher Werdegang

August 2010	Assistenzarzt, Klinikum Sindelfingen Abteilung Innere Medizin
-------------	------------------------------------------------------------------

Hochschulausbildung

April 2003 - Juni 2010	Studium der Humanmedizin, Uniklinikum Homburg
Mai 2010	Staatsexamen
Februar 2009 - Januar 2010	Praktisches Jahr
April 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten

Mai 2003 - Oktober 2003	Freiwillig soziale Tätigkeit: Malteser Rettungsdienst in Altenstadt
Juli 2002 - April 2003	Zivildienst: Die Johanniter in Bad Nauheim

Schulbildung

September 1993 - Juni 2002	Ernst-Ludwig-Gymnasium, Bad Nauheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
September 1989 - Juli 1993	Grundschule in Niddatal / Assenheim