

Abteilung Neuroanatomie
Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie
Medizinische Fakultät
Universität des Saarlandes, Homburg Saar

Immunhistochemische Untersuchung des Expressionsmusters einer Myosin-IX-Variante in der Retina

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2022*

vorgelegt von:

Olga Reichold
geb. am 23.02.1997
in Poltawa, Ukraine

Tag der Promotion: 18. Dezember 2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Schmitz

Prof. Dr. Berthold Seitz

Inhalt

1 Zusammenfassung	1
1 Summary	2
2 Einleitung	3
2.1 Auge.....	3
2.1.1 Einführung und Funktion	3
2.1.2 Makroskopische Anatomie	3
2.2 Retina.....	5
2.2.1 Schichten der Retina	5
2.2.2 Nervenzellen der Retina.....	7
2.3 Phototransduktion.....	13
2.4. Synapsen.....	18
2.4.1 Elektrische Synapsen	18
2.4.2 Chemische Synapsen.....	18
2.4.3 Ribbon-Synapsen	19
2.5 Myosine	23
2.5.1 Myosine: allgemeiner Hintergrund	23
2.5.2 Myosin-IX.....	25
3. Material und Methoden	28
3.1. Untersuchungsmaterial und Gewebe	28
3.1.1 Versuchstiere und Präparation	28
3.1.2 Einbettung der Präparate für die Semidünnschnittmethode und Herstellung der Semidünnschnitte	28
3.2 Immunfluoreszenzfärbung.....	29
3.2.1 Grundlagen der Immunfluoreszenzfärbung	29
3.2.2 verwendete Antikörper.....	30
3.2.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung	32
3.3. Analyse der Immunfluoreszenzfärbung.....	32
3.4. Western Blot.....	33
3.4.1 Gewinnung der Retina-Präparate	33
3.4.2 Vorbereitungen für den Western Blot.....	33
3.4.3 Durchführung des Western Blots	34
3.5. verwendete Materialien	35
3.5.1 Verwendete Lösungen und Chemikalien	35
3.4.2 verwendete Materialien und Geräte	36
4. Ergebnisse	38

4.1 Lokalisation mittels Epifluoreszenzmikroskopie	38
4.1.1 Lokalisationsergebnisse mit dem Myosin-IX-Antikörper (Klon 2C6)	39
4.1.2 Lokalisationsergebnisse mit dem Myosin-IX-Antikörper (Klon 7C2)	46
4.1.3 Lokalisationsergebnisse mit dem Myosin-IX-Antikörper (Klon 15H12)	52
4.1.4 Lokalisationsergebnisse mit dem Myosin-IX-Antikörper (Klon 16B1)	58
4.2 Western Blot	66
5 Diskussion	67
6 Literatur	69
7 Abbildungsverzeichnis	72
8 Danksagung	75
9 Lebenslauf	76

1 Zusammenfassung

Die Ribbonsynapse ist eine spezialisierte chemische Synapse, die im menschlichen Körper sowohl in der Retina, als auch der Cochlea und der Epiphyse zu finden ist. Der grundsätzliche Aufbau der Ribbonsynapse ist zwar dem der konventionellen chemischen Synapse ähnlich. Jedoch weist die Ribbonsynapse auch wichtige strukturelle und funktionelle Unterschiede auf. Das auffälligste strukturelle Unterscheidungsmerkmal der Ribbonsynapse ist der Synaptic Ribbon (dt.: synaptisches Band). Diese Struktur ermöglicht der Ribbonsynapse eine schnelle und ausdauernde (tonische) Transmitterfreisetzung. Dabei fungiert der Synaptic Ribbon, der im Elektronenmikroskop als eine elektronendichte Struktur imponiert und die mit vielen synaptischen Vesikeln assoziiert ist, als eine Art Förderband für die synaptischen Vesikel, welche den Neurotransmitter enthalten. Hauptbestandteil der Synaptic Ribbons ist das Protein RIBEYE.

Immunpräzipitationen der Synaptic Ribbons mit Antikörpern gegen RIBEYE (Dembla et al., 2018) legten die Anwesenheit von Myosin-IX Varianten in retinalen Synapsen nahe. Dieser Arbeitshypothese bin ich in vorliegender Dissertationsarbeit nachgegangen. Unter Verwendung von 4 verschiedenen, unabhängigen monoklonalen Mausantikörpern gegen eine Myosin-IX Variante, die mir von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden, konnte ich durch Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigen, dass Myosin-IX tatsächlich in retinalen Synapsen, insbesondere Photorezeptorsynapsen angereichert ist. Dies habe ich durch verschiedene Doppelimmunfluoreszenzen mit den Antikörpern gegen Myosin-IX und verschiedenen Referenzantikörpern (z.B. Antikörper gegen RIBEYE, PSD95) gezeigt. Die Expression von Myosin-IX konnte auch im Western Blot verifiziert werden. Myosin-IX könnte eine Rolle für den Transport synaptischer Vesikel spielen. Dies ist besonders für die tonisch aktive Ribbonsynapse von großer Bedeutung, da in diese permanent aktive Synapse von einem effizienten, geordneten Vesikeltransport abhängig ist.

1 Summary

The ribbon synapse is a highly specialised chemical synapse which can be found in the cochlea, the epiphysis and retina in the human body. The molecular composition of ribbon synapses is similar to the conventional chemical synapse. But the ribbon synapse shows some important structural and functional specialization and function. The most conspicuous structural specialization that defines eponymous ribbon synapses is the synaptic ribbon. The synaptic ribbon is associated with the active zone, binds large numbers of synaptic vesicles and enables continuous and fast neurotransmitter release.

The synaptic ribbon appears to work as a conveyor for synaptic vesicles and delivers them to the active zone. How the transport is accomplished is not fully understood. Motor proteins could be involved in this process. Immunoprecipitations of the synaptic ribbon with antibodies against RIBEYE (Dembla et al., 2018) suggest the existence on Myosin-IX variants in the retinal synapse. I followed this working hypothesis in this dissertation. By using 4 different, independent monoclonal mouse-antibodies, I could show through immunofluorescence that Myosin-IX indeed exists in the retinal synapses, especially in the photoreceptor synapses. I demonstrated this by using double-immunofluorescence microscopy analyses with antibodies against Myosin-IX and other antibodies for reference (for example antibodies against RIBEYE, PSD 95). The expression of Myosin-IX could also be verified by a western blot. I could show that Myosin-IX is enriched in ribbon synapses and thus could play a role in transport of synaptic vesicles.

This finding is particularly important for the tonic active ribbon synapse because this permanently active synapse is dependent on an efficient and organized transport of vesicles.

2 Einleitung

2.1 Auge

2.1.1 Einführung und Funktion

Einer der wichtigsten Sinne des Menschen ist das Sehen. Es erlaubt dem Individuum, seine visuelle Umwelt wahrzunehmen. Kaum ein anderer menschlicher Sinn ist so komplex und abhängig von der Funktion und Zusammenarbeit vieler verschiedener Zellen und biochemischer Prozesse. Das Auge bündelt dabei Licht, welches in Form von elektromagnetischen Wellen ins Auge fällt, von der Linse auf die Retina. Die menschliche Retina kann elektromagnetische Wellen der Frequenzen zwischen 380 nm (ultraviolett) und 780 nm (infrarot) wahrnehmen. Die dort ansässigen 120 Millionen Stäbchenzellen und 6 Millionen Zapfenzellen wandeln diese elektromagnetischen Impulse in photochemische Signale um und leiten sie über den Sehnerv in den visuellen Cortex im zentralen Nervensystem weiter. Während dieses Prozesses finden auf mehreren Ebenen Verarbeitungen und Filterung von Informationen statt.

2.1.2 Makroskopische Anatomie

Das menschliche Auge hat in etwa die Form einer Kugel von circa 24 mm Durchmesser und kann in die Bestandteile Auglinse, Augenkammern und Glaskörper sowie von außen nach innen in die drei im Folgenden erläuterten Schichten und unterteilt werden.

Tunica fibrosa bulbi

Sie ist die äußerste Schicht des Auges und verleiht dem Auge seine Stabilität. Der anteriore Teil der Tunica fibrosa bulbi wird als Cornea bezeichnet und ist gefäßfrei, da sie durch Diffusion ernährt wird. Dadurch ist sie lichtdurchlässig trägt 43 Dioptrien der insgesamt 60 Dioptrien Brechkraft des gesamten Auges bei. Der übrige Teil der Tunica fibrosa bulbi heißt Sclera und besteht zum größten Teil aus kollagenem Bindegewebe. Aus diesem Grund ist sie zum einen lichtundurchlässig und schützt den Bulbus oculi und verleiht ihm seine Gestalt.

Tunica vasculosa bulbi (Uvea)

Die mittlere Schicht besteht ebenfalls aus einem vorderen und hinteren Abschnitt. Der hintere wird aus der Iris und dem Ciliarkörper gebildet. Die Iris reguliert durch ihre Muskulatur die Pupillenweite und somit den Lichteinfall. Der Ciliarkörper kontrolliert über die Zonulafasern die Brechkraft der Linse und produziert und sezerniert Kammerwasser. Das hintere Kompartiment der Tunica vasculosa bulbi ist die Choroidea, welche die am stärksten durchbluteste Schicht des Auges darstellt und es mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Die drei Anteile Ciliarkörper, Iris und Choroidea werden in ihrer Gesamtheit als Uvea bezeichnet.

Tunica interna bulbi (Retina)

Die Tunica interna bulbi oder Retina stellt die innerste Schicht des Bulbus oculi dar und besteht in ihrem vorderen Teil aus der Pars ceaca retinae, welche lichtunempfindlich ist und aus einem Pigmentepithel besteht, welches den Ciliarkörper sowie die Iris überzieht. Der hintere Teil der Retina ist die Pars optica retinae und ist als lichtempfindlicher Teil für die visuelle Wahrnehmung verantwortlich. Sie besteht aus Pigmentepithel sowie den ersten drei Neuronen der Sehbahn.

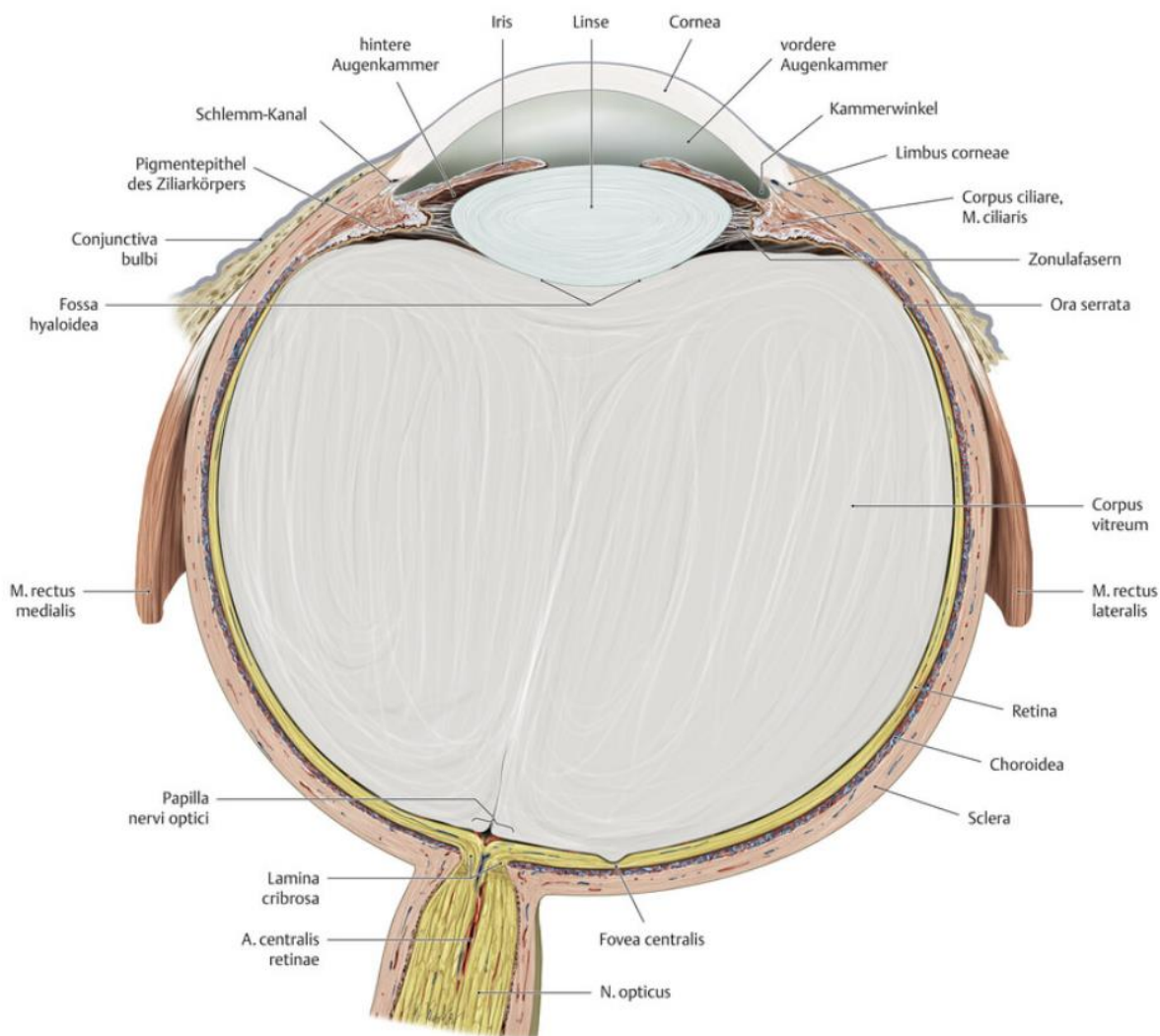


Abbildung 1 : makroskopische Anatomie des Bulbus oculi
(Abbildung aus Prometheus: Kopf, Hals und Neuroanatomie 2015; 4. Auflage, Thieme Verlag)

2.2 Retina

2.2.1 Schichten der Retina

Die Retina lässt sich mikroskopisch in zehn unterschiedliche Schichten unterteilen, die im Folgenden von außen nach innen erläutert werden. Die erste Schicht wird auch als äußeres Retinablatt, die Schichten 2 bis 9 als inneres Retinablatt oder Stratum nervosum bezeichnet. Das Licht durchdringt die Schichten 2 bis 9 von innen nach außen, der Fluss und die Verarbeitung von Informationen jedoch läuft in die entgegengesetzte Richtung.

1. Stratum pigmentosum (Pigmentepithel)

Das Stratum pigmentosum liegt der Bruch-Membran direkt auf und besteht aus einer einschichtigen, kubischen Pigmentepithelschicht. Diese Zellen phagozytieren die äußeren Enden der Außensegmente von Stäbchen- und Zapfenzellen, welche durch die Membranerneuerung abgestoßen werden. Sie sind reich an endoplasmatischem Reticulum und Lysosomen.

2. Stratum neuroepitheliale (Schicht der Stäbchen und Zapfen)

Das Stratum neuroepitheliale beinhaltet den äußeren und innere Teil der Stäbchen- und Zapfenzellen, in welchen die Photorezeption vonstattengeht.

3. Membrana limitans externa (äußere Gliagrenzmembran)

Diese Grenzmembran stellt Zellverbindungen in Form von Adhärens-Junctionen zwischen den Photorezeptorzellen und den Müller-Zellen dar, welche durch das gesamte innere Retinablatt ziehen.

4. Stratum nucleare externum (äußere Körnerschicht)

Diese Schicht beinhaltet die Perikarya und Zellkerne der Stäbchen und Zapfen und somit das erste Neuron der Sehbahn.

5. Stratum plexiforme externum (äußere plexiforme Schicht)

Beim Stratum plexiforme externum handelt es sich um eine zellarme Synapsenzone. In dieser Schicht bilden die Axonfortsätze des ersten Neurons, also die der Stäbchen und Zapfen, Synapsen mit den Fortsätzen der Bipolarzellen, also dem 2. Neuron der Sehbahn. Die Synapsenmembranen der Stäbchen und Zapfen enthalten Invaginationen, in die die Fortsätze der Bipolarzellen ragen. In diesen Invaginationen finden sich auch die Ribbon-Synapsen, welche eine schnelle Überleitung des Aktionspotenzials erlauben. Des Weiteren bilden die Fortsätze der Zapfen und Stäbchen Synapsen mit den Horizontalzellen aus.

6. Stratum nucleare internum (innere Körnerschicht)

Das Stratum nucleare internum ist eine sehr zellreiche Schicht, in der sich die Perikarya der Bipolarzellen, amakrinen Zellen, Müller-Zellen, Horizontalzellen sowie die Kapillaren der Retinagefäße zu finden sind.

7. Stratum plexiforme internum (innere plexiforme Schicht)

Im Stratum plexiforme internum bilden die Axonfortsätze der Bipolarzellen, also dem 2. Neuron der Sehbahn, Synapsen mit denen der Ganglienzellen, also dem 3. Neuron. Auch hier finden sich Ribbon-Synapsen. Außerdem bilden die amakrinen Zellen Synapsen mit amakrinen Zellen.

8. Stratum ganglionare fasciculi optici (Ganglienzellschicht)

In dieser Retinaschicht befinden sich die Perikarya der Ganglienzellen und somit des 3. Neurons der Sehbahn.

9. Stratum neurofibrarum (Optikus-Nervenfaserschicht)

Hier verlaufen die Axone der Ganglienzellen, welche die visuellen Informationen über den Sehnerv weiterleiten.

10. Membrana limitans interna (innere Gliagrenzmembran)

Die innerste Schicht besteht aus der Basalmembran der Müllerzellen und Astroglia.

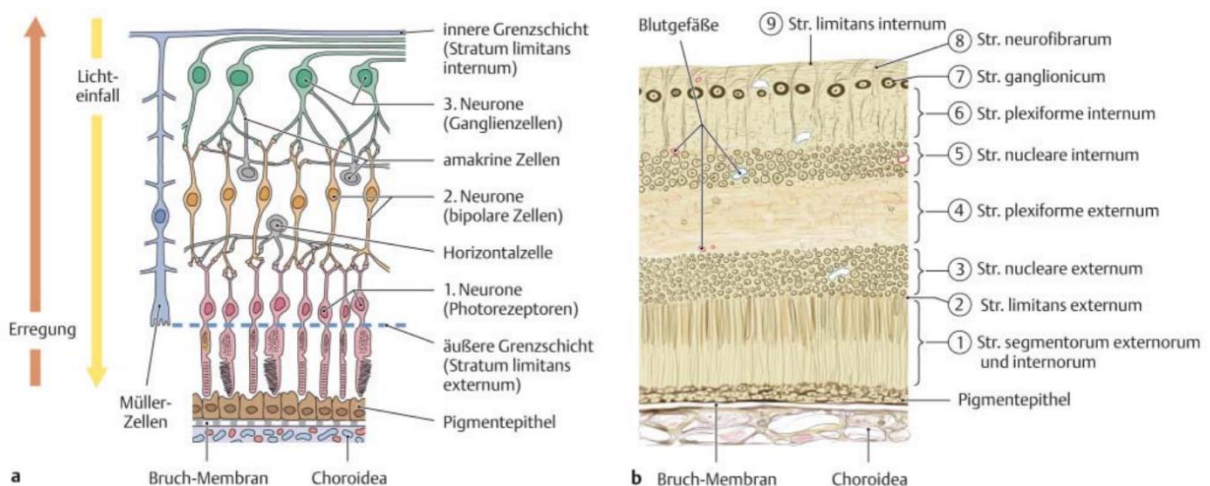


Abbildung 2: Aufbau der Retina

a) die ersten drei Neurone der Sehbahn schematisch dargestellt samt ihrer synaptischen Verschaltungen

b) die zehn Retinaschichten

(Abbildung aus Prometheus: Kopf, Hals und Neuroanatomie, 2015; 4. Auflage, Thieme Verlag)

2.2.2 Nervenzellen der Retina

Die Retina von Säugetieren enthält etwa 136 verschiedene Arten von Neuronen (Yamagata et al., 2021). Diese lassen sich grob in sieben verschiedene Gruppen einteilen, die jeweils verschiedene Funktionen und Morphologien aufweisen.

Photorezeptorzellen

Die retinalen Photorezeptorzellen sind Nervenzellen, die sich im Laufe der evolutionären Entwicklung hochspezialisiert haben und entsprechen dem ersten Neuron der Sehbahn. Sie kommen in zwei verschiedenen Typen vor: den Stäbchen, welche die Hell-Dunkel-Wahrnehmung, und den Zapfen, die das Farbsehen ermöglichen. Obwohl diese sich in ihrer Morphologie und Physiologie unterscheiden, haben beide Zellarten einen ähnlichen Aufbau. Mit ihren Synapsen sind die Photorezeptorzellen mit den Bipolarzellen im Stratum plexiforme externum verbunden. Die Perikaryen der Photorezeptorzellen sind im Stratum nucleare externum zu finden. Der Zellbereich ist zwischen dem Perikaryon und dem darauffolgenden Innensegment verengt, da die Müller-Stützzellen zwischen den Photorezeptorzellen Zonulae adherentes ausbilden, welche ihr histologisches Korrelat in der Membrana limitans externa haben. Das Innensegment wiederum kann in einen inneren Teil, dem Myoid, welches den Golgi-Apparat und granuläres endoplasmatisches Reticulum enthält und einen äußeren Teil, das Ellipsoid unterteilt werden. Letzteres beherbergt viele Mitochondrien und geht an einem schmalen Zilienstück in das Außensegment der Photorezeptorzelle über. Im Außensegment finden sich schließlich die Sehpigmente, die in der Membran gleichmäßig eingelagert sind. Molekularbiologisch sind sie der Ort, in dem der Sehvorgang abläuft. Die Membran ist hundert- bis tausendfach in kleinen Scheiben („Disci“) aufgeworfen und wird, wenn sie bis zur Spitze hinausgewachsen ist, stückchenweise abgeworfen und dem unmittelbar darunter liegenden Pigmentepithel phagozytiert.

Zapfenphotorezeptorzellen

Die Zapfenzellen gab es evolutionär vor den Stäbchen (Morshedian and Fain, 2017). Ihre Außensegmente sind ca. 20 μm lang und sind plumper und dicker als die der Stäbchen. Es besteht außerdem aus vielen Membraneinfaltungen, die geldrollenartig aufeinander liegen. In dieser Membran ist das Sehpigment der Zapfen, das Jodopsin, enthalten. Beim Menschen gibt es drei verschiedene Jodopsin-Arten, welche ihr Absorptionsmaximum jeweils bei 420 nm (blau), 535 nm (grün) und 565 nm (rot) haben. Die Zapfenzellen erreichen ihre höchste Dichte in der Fovea centralis. Dort liegen keine Stäbchen vor und sie ist der Bereich des schärfsten Sehens.

Stäbchenphotorezeptorzellen

Die Stäbchenzelle entwickelte sich evolutionär vor ca. 500 Mio Jahren aus der Zapfenzelle heraus (Morshedian and Fain, 2017). Ihr Bau ist schmaler und etwas länger als die des Zapfens, aber auch dieses ist an seiner Membran im Außensegment wie eine Geldrolle ca. 800-900fach aufgestapelt. Das Farbpigment, das in dieser Membran eingelagert ist, besteht aus dem Glykoprotein Opsin und dem Vitamin-A-Abkömmling 11-cis-Retinal. In dieser Verbindung heißt es Rhodopsin und hat seine zwei Absorptionsmaxima bei 350 nm (ultraviolett) und bei 500 nm (türkis). Die Photopigmente der Stäbchen sind etwa 70 Mal sensitiver auf Lichtreize (Asteriti et al., 2015) und sie zerfallen und regenerieren sich schneller als das Pigment der Zapfen (Morshedian and Fain, 2017). Schon ein einzelnes Photon reicht aus, um die biochemische Kaskade in einem Stäbchen auszulösen, die man Photorezeption nennt (Morshedian and Fain, 2015). Die Konzentration der Stäbchen ist im parafovealen Bereich am höchsten, was bedeutet, dass das Hell-Dunkel-Sehen in diesem Bereich am besten funktioniert.

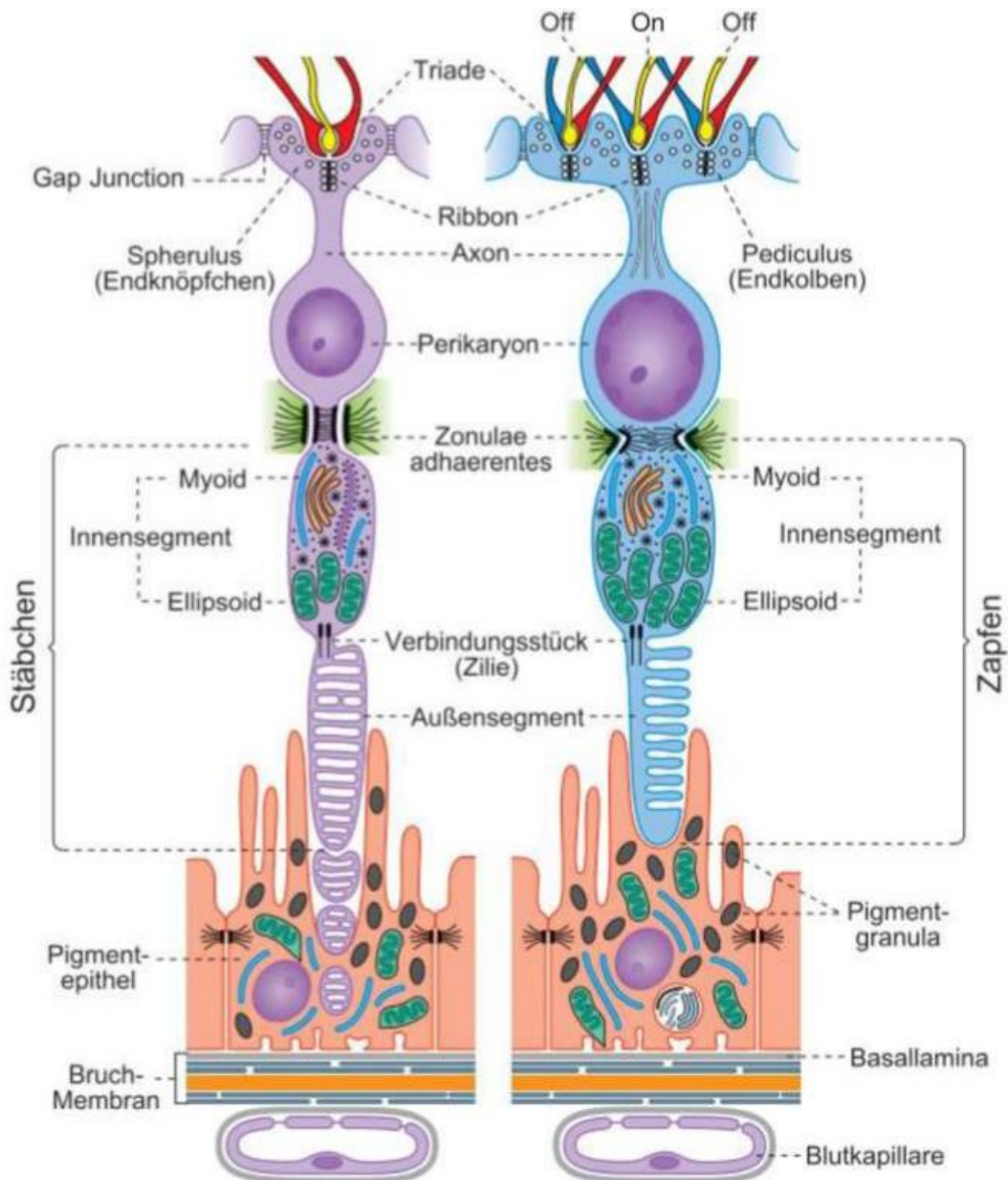


Abbildung 3: schematische Darstellung der Photorezeptorzellen Stäbchenzelle (links) und Zapfenzelle (rechts) mit Pigmentepithel, welches die abgestoßenen Fortsatzpartikel phagozytiert
(Abbildung aus Welsch Lehrbuch Histologie 2006; 2. Auflage, Elsevier Verlag)

Bipolarzellen

Die bipolare Nervenzelle ist mit den Zapfen und Stäbchen über Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht miteinander verbunden und bildet das 2. Neuron der Sehbahn. Grundsätzlich kann man bipolare Nervenzellen nach ihrem Kanalverhalten oder nach dem 1. Neuron der Sehbahn, dessen Signale sie weiterleiten, unterscheiden.

Unterscheidung nach Kanalverhalten

Bipolarzellen besitzen bestimmte Kanäle für Neurotransmitter und Calcium-bindende Proteine. ON-Bipolarzellen haben einen ON-Kanal, welcher die Zelle depolarisiert, wenn Glutamat einen invaginierenden Glutamatrezeptor (GluR6-Rezeptoren) aktiviert und somit einen Kationenkanal öffnet. OFF-Bipolare weisen einen ionotropen Glutamatrezeptor auf, der die Zellmembran hyperpolarisieren lässt, wenn Glutamat in die Zelle gelangt (Nawy and Jahr, 1990). Es gibt insgesamt 15 Bipolarzellsubtypen (Shekhar et al., 2016) mit jeweils unterschiedlichen Reizschwellen. Man geht davon aus, dass diese Spezialisierung dazu dient, eigene Kanäle für hochfrequente und niederfrequente Informationen zu schaffen (Masland, 2001a).

Unterscheidung nach dem vorgeschalteten 1. Neuron

Unterscheidet man die Bipolaren nach dem Neuron, dessen Information sie erhalten, so ergeben sich drei verschiedene Typen: ON-Zapfenbipolarzellen, OFF-Zapfenbipolarzellen und Stäbchenbipolarzellen. Man könnte noch einen vierten Typ abgrenzen, da die Zapfenzellen, die ihr Absorptionsmaximum im blauen, kurzwelligen Spektrum haben, ihren ganz eigenen Bipolarzelltyp haben (Dacey and Lee, 1994) (Kouyama and Marshak, 1992).

Horizontalzellen

Horizontalzellen machen rund 2 % der Zellpopulation der inneren Körnerschicht aus (Strettoi and Masland, 1995) (Jeon et al., 1998a). Sie stellen Interneurone dar und ermöglichen eine laterale/horizontale Verarbeitung und Feedback des Informationsflusses auf die Photorezeptorzellen und/oder Bipolarzellen. Es gibt zwei verschiedene Arten von Horizontalzellen, eine für Zapfen- und eine für Stäbchenzellen. Horizontalzellen, die mit Stäbchen verbunden sind, sind an ihren Endläufern zu einer viel feineren Netzstruktur aufgeteilt als welche, die mit Zäpfen verbunden sind. Dies könnte möglicherweise darin begründet liegen, dass Stäbchen sich evolutionär erst nach den Zapfen entwickelten, sodass eine feinere Prozessierungsstufe zu den vorhandenen Strukturen addiert wurde (Masland, 2001b).

Amakrine Zellen

Amakrine Zellen sind, genauso wie die Horizontalzellen, Interneurone. Sie sind den Bipolar- und Ganglionzellen zwischengeschaltet und machen etwa 1/3 der Gesamtzellpopulation der inneren Körnerschicht aus (Strettoi and Masland, 1995). Es gibt 29 verschiedene Arten von Amakrinzelltypen (Masland, 2001b) und sie haben eine regulierende und prozessierende Funktion für die Reize, die an die Ganglionzellen weitergeleitet werden. Ihre Bedeutung für die Reizweiterleitung und -verarbeitung wird daran deutlich, dass nur 5% aller Synapsen, die zu Ganglionzellen laufen, direkte Verbindungen zwischen Bipolaren und Ganglionzellen sind. Den Rest machen Synapsen zwischen amakrinen Zellen und Ganglionzellen aus (Masland, 2001a). Amakrine Zellen wirken i.d.R. über einen GABAergen negativen Feedbackmechanismus hemmend (Masland, 2001b).

Ganglionzellen

Die Ganglionzellen entsprechen dem 3. Neuron der Sehbahn und umfassen etwa 46 verschiedene Subtypen (Tran et al., 2019), die sich in drei Gruppen aufteilen lassen: M-Zellen, P-Zellen und K-Zellen. M-Zellen sind Ganglionzellen, die große rezeptive Felder und eine sehr gute zeitliche Auflösung besitzen, dafür nur schlecht Kontraste wahrnehmen können. P-Zellen haben eine gute räumliche, dafür eine schlechtere zeitliche Auflösung. Die K-Zellen verarbeiten Reize, die von Zapfen mit Absorptionsmaximum im blauen Bereich haben. Darüber hinaus können diese drei Arten von Ganglionzellen jeweils weiter in ON- und OFF-Ganglionzelltypen unterschieden werden. In ihrer Gesamtheit bilden die Axone der Ganglionzellen den Nervus opticus.

Müller-Stützzellen

Die Müller-Stützzellen sind dünne und lange Gliazellen, welche sich über alle Schichten des inneren Retinablattes erstrecken. Sie bilden laterale Fortsätze aus und erfüllen viele unterschiedliche Funktionen. Sie stützen die Retina, sind für ihren Energie- und Kaliumhaushalt verantwortlich und sie recyceln die Botenstoffe GABA und Glutamat. (Jeon et al., 1998b)

2.3 Phototransduktion

Die Phototransduktion bezeichnet die biochemischen Vorgänge, die dafür sorgen, dass ein ein Photon, welches auf die Retina trifft, im zentralen Nervensystem einen physiologischen Reiz auslöst. In diesem Kapitel wird dieser Prozess in die Aufnahme und die Weiterverarbeitung des Photosignals aufgeteilt und erläutert.

2.3.1 Aufnahme des Lichtsignals

Fällt ein Photon auf die Retina, so wird es vom Sehfärbstoff Rhodopsin, bzw. Jodopsin in der Membran der Disci absorbiert. Dadurch erhält das Opsin eine höhere Energiestufe und schwingt stärker, wodurch das 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal isomerisiert. Dies wiederum führt über eine G-Protein gekoppelte Kaskade, in der cGMP als Second Messenger fungiert, zu einer Schließung der Na-Ca-Kanäle in der Photorezeptormembran. Diese Membran bildet eine Ausnahme zu denen der übrigen Sinneszellen. Die meisten primären Sinneszellen depolarisieren, wenn sie einen adäquaten Reiz erhalten. Die Membran der Stäbchen und Zapfen hyperpolarisiert jedoch, wenn sie gereizt wird. Das liegt daran, dass cGMP den o.g. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Kanal im Dunklen offen hält („Dunkelstrom“), wodurch es in Ruhe zu einer Dauerdepolarisation kommt und die Photorezeptorzellen dauerhaft Glutamat ausschütten. Wird Rhodopsin oder Jodopsin aktiviert, sodass über viele Zwischenschritte die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geschlossen werden und die Zelle damit hyperpolarisiert, kommt es zu einer geringeren Glutamatausschüttung aus den präsynaptischen Vesikeln.

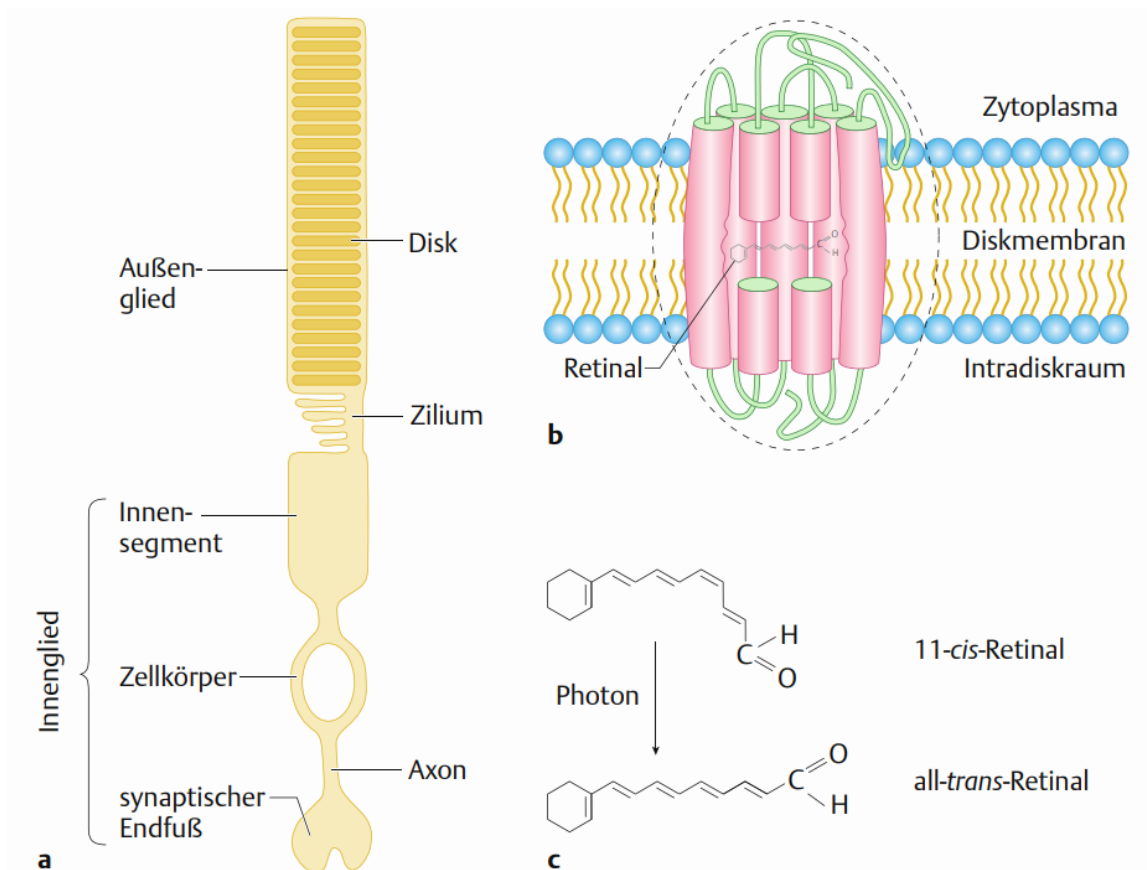


Abbildung 4: Aufbau der Stäbchenzelle

a) die Membran des Außenglieds ist 800-900-fach aufgeworfen, sodass „Disci“ entstehen

b) Rhodopsin durchspannt die Lipiddoppelmembran siebenmal

c) 11-cis-Retinal wird bei Lichtabsorption zu all-trans-Retinal isomerisiert
(Abbildung aus Duale Reihe, Physiologie 2010; 1. Auflage, Thieme Verlag)

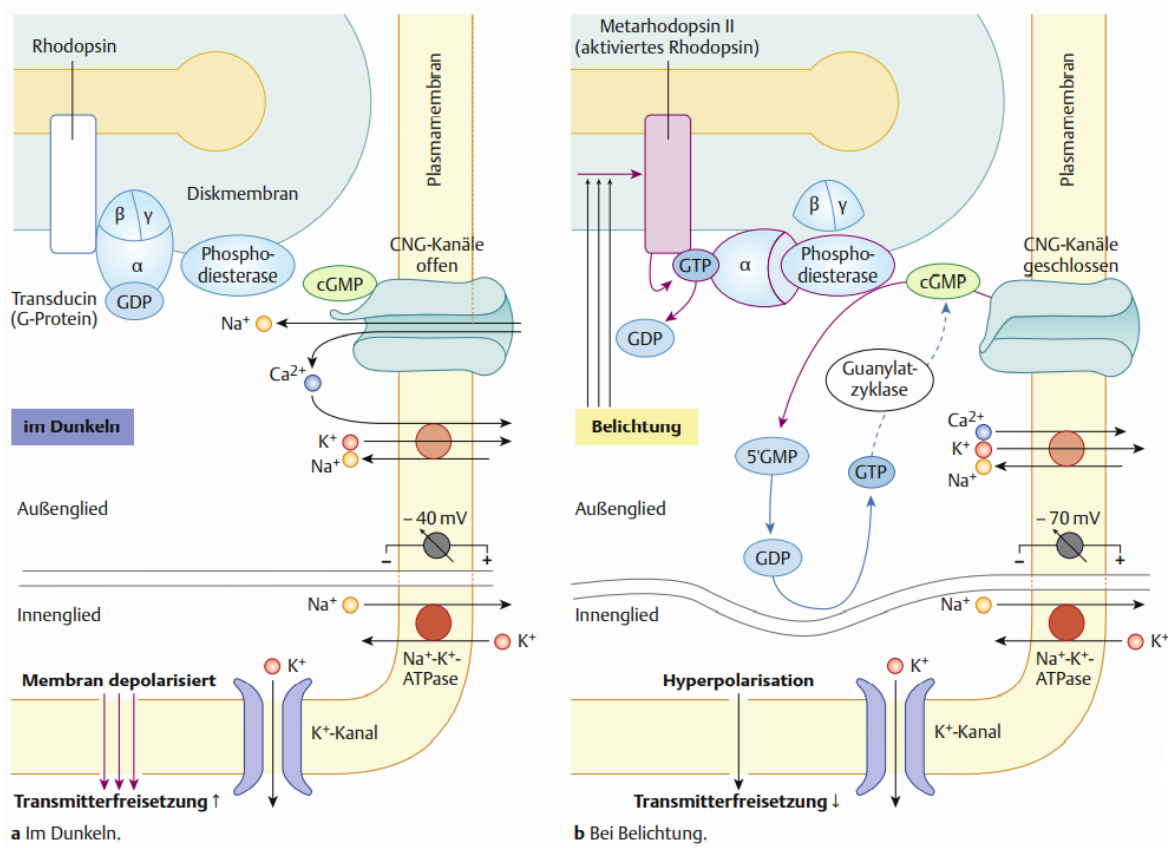


Abbildung 5: Phototransduktion

Signaltransduktion mithilfe des zyklischen Guanosinphosphats (cGMP) am Na^+ - Ca^{2+} -Kanal am Außensegment einer Stäbchen-Fotorezeptorzelle im Dunkeln (A) und bei Lichteinfall (B). In der Membran des Außensegments ist ein Na^+ - Ca^{2+} -Antiporter enthalten, in der Innensegmentmembran eine Na^+ - K^+ -ATPase. 5'GMP = 5'-Guanosintriphosphat, GTP = Guanosintriphosphat, GC = Guanylylcyclase (Abbildung aus Duale Reihe Physiologie, 2010; 1. Auflage, Thieme Verlag)

2.3.2 Erregungsleitung in der Retina

Grundsätzlich kann man in der Retina zwei verschiedene Arten von Erregungsleitung unterscheiden: einen direkten (Photorezeptorzelle – bipolare Zelle – Ganglienzelle) und einen indirekten Weg (Photorezeptorzelle – Horizontalzelle – bipolare Zelle – amakrine Zelle – Ganglienzelle). Insbesondere spielen die amakrinen Zellen durch ihre zahlenmäßige Überlegenheit und ihrer Dominanz als Synapsenbildner mit den Ganglienzellen in der inneren Körnerschicht (Strettoi and Masland, 1995) bei der Signalverarbeitung eine sehr große Rolle. Die Tatsache, dass es sich bei Photorezeptorzellen, Bipolarzellen, Horizontalzellen, Ganglienzellen und amakrinen Zellen um hochspezialisierte Nervenzellen handelt, mag suggerieren, dass für die Erregungsleitung in der Retina Aktionspotenziale verantwortlich sind. Tatsächlich ist dies aber nicht so, denn das eigentliche Aktionspotenzial entsteht erst in den Ganglienzellen. Die Informationen von den Photorezeptoren bis zu den Ganglienzellen werden über fein adjustierte Membranpotenzialänderungen, synaptische Weiterleitung und

postsynaptische Potenziale generiert. Dabei sollte erklärt werden, dass die Retina aus sogenannten rezeptiven Feldern besteht. Ein rezeptives Feld ist jener Bereich in der Netzhaut, von dem aus die erregende oder hemmende Aktivität dieser Nervenzelle beeinflusst werden kann. In der Retina sind sie meist in ein Zentrum und eine sich diametral dazu verhaltende Peripherie organisiert. Das bedeutet, trifft ein heller Reiz, zum Beispiel ein Lichtstrahl auf dunklem Hintergrund ins Zentrum eines rezeptiven Feldes, so wird in dessen Zentrum eine Erregung, aber in dessen Peripherie eine Hemmung generiert. Molekularbiologisch geschieht dies dadurch, dass die Photorezeptorzelle hyperpolarisiert und der bei Dunkelheit stetige Glutamatstrom („Dunkelstrom“) abnimmt. Dadurch nimmt die Hemmung auf die entsprechende ON-Bipolarzelle ab und sie depolarisiert. Dies wird als Erregung an die ON-Zentrum-Ganglienzelle weitergegeben.

2.3.3 Adaption

Dunkeladaption

Verringert sich zunehmend die Helligkeit um ein Individuum herum, zum Beispiel im späten Tagesverlauf, so passt sich das Auge den sinkenden Lichtverhältnissen an. Diese sogenannte Dunkeladaption verläuft im Vergleich zur Helladaption sehr langsam und es besteht ein Zusammenhang zwischen Sensitivität der Retina und Adaptionszeit (siehe Abb. 6). Nach etwa 8 bis 10 Minuten geht am Kohlrauschknick das photopische in das skotopische Sehen über, da die Empfindlichkeit der Zapfen ihr Maximum erreicht hat und eine weitere Adaption an die dunkleren Verhältnisse nur noch durch die Stäbchen erreicht werden kann. Nach etwa einer Stunde Aufenthalt in absoluter Dunkelheit ist die höchste Empfindlichkeit des Sehsystems erreicht. Dies geschieht auf Kosten der Sehschärfe, da viele Stäbchenzellen auf wenige Ganglienzellen konvergieren, aber die Zapfenzellen in der Fovea 1:1 verschaltet sind. Das bedeutet, dass ein von einem Stäbchen detektierter Lichtreiz, der von einer Ganglienzelle wahrgenommen wird, von jedem Punkt seines rezeptiven Feldes kommen könnte. Dadurch kann die retinale Informationsverarbeitung nur einen ungefähren Ort des Reizes detektieren und in der Folge ist die Sehschärfe geringer als unter photopischen Bedingungen. Beim skotopischen Sehen ist der Retinabereich des schärfsten Sehens der parafoveale Bereich, da dort die Stäbchendichte am höchsten ist.

Helladaption

Diese verläuft mit einer Dauer von einigen Sekunden signifikant schneller als die Dunkeladaption und geht eventuell mit einer vorübergehenden Blendung einher. Die Pupille verengt sich dabei und reduziert den Lichteinfluss auf die Retina. Das Stäbchensehen ist dabei nicht aktiv, sondern die Informationsaufnahme erfolgt über das Zapfensehen.

2.4. Synapsen

Als Synapsen werden spezialisierte Kontaktstellen der Nervenzellen bezeichnet, wodurch Erregungen übertragen werden können. Somit wird die Kommunikation zwischen zwei Nervenzellen oder zwischen einer Nervenzelle und Zielzelle ermöglicht.

Grundsätzlich werden zwischen elektrischen und chemischen Synapsen unterschieden.

2.4.1 Elektrische Synapsen

Elektrische Synapsen sind direkte Kontaktstellen zwischen Zellen, die im menschlichen Körper relativ selten zu finden sind. Ihr histologisches Korrelat sind Gap Junctions, durch die Ionen in beide Richtungen hindurchpassen, wodurch sie bidirektional Signale übertragen können. Dies geschieht fast ohne zeitliche Verzögerung, wodurch die zwei Nervenzellen funktionell eng aneinander gekoppelt sind. Sie sind dort zu finden, wo eine schnelle Signalübertragung notwendig ist. In der Retina kommen elektrische Synapsen in der inneren plexiformen Schicht (IPL) vor, wo sie amakrine Zellen untereinander und amakrine Zellen mit Stäbchen-ON-Bipolarzellen (Hartveit and Veruki, 2012) und in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) die Stäbchenzellen untereinander verbinden (Boycott and Wässle, 1991).

2.4.2 Chemische Synapsen

Die chemische Synapse ist der mit Abstand am häufigsten vorkommende Synapsentypus im menschlichen Körper. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass das elektrische Signal, über einen Neurotransmitter, von der Präsynapse über den synaptischen Spalt auf die Postsynapse übertragen wird. Das Signal wird dabei also indirekt von Zelle zu Zelle vermittelt.

Chemische Synapsen bestehen typischerweise aus einer präsynaptischen Membran, einem synaptischen Spalt (Weite ca. 20-30 nm) und einer postsynaptischen Membran.

Neurotransmitter sind chemische Stoffe und Moleküle, die sich im Endkolben der präsynaptischen Nervenzelle in Vesikeln befinden. Trifft dort ein Aktionspotenzial ein, öffnen sich in der präsynaptischen Membran spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, sodass Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmt. Dieses Ca^{2+} bindet nun an Synaptotagmin, ein Protein, welches an der Vesikelmembran sitzt, als Ca^{2+} -Sensor fungiert und essentiell ist für viele Membranfusionsprozesse in eukaryontischen Zellen (DeBello et al., 1993). Dieses mit Ca^{2+} aktivierte Synaptotagmin wiederum aktiviert den sog. SNARE-Komplex. SNAREs oder SNAP-Rezeptoren (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) sind

Proteine, welche in Zell- oder Vesikelmembranen vorhanden sind und in der Synapse die Vesikelfusionierung mit der Zellmembran vermitteln (Söllner et al., 1993). Dies geschieht, indem es im SNARE-Komplex nach seiner Aktivierung durch Regulatoren wie etwa Synaptotagmin, zu einer Konformationsänderung kommt. Nun kann er als Katalysator für die Zellmembranfusionierung dienen, da die fadenartigen Verankerungen in den beiden gegenüberliegenden Membranen verkürzt werden und diese somit aneinandergesogen werden, bis sie fusionieren (Yoon and Munson, 2018). Dadurch werden die in den Vesikeln enthaltenen Neurotransmitter freigesetzt und diffundieren über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran, wo sie an einen entsprechenden Rezeptor binden und dort ein entweder hemmendes oder erregendes Signal auslösen. Diese Rezeptoren lassen sich nach unterschiedlichen Kriterien klassifizieren, wie etwa nach ihrem Transmitter, durch den sie aktiviert werden oder nach ihrer Wirkungsweise. So gibt es entweder ionotrope Rezeptoren, welche ihr Membranpotenzial ändern durch einen Ionenstrom ändern, der nach Aktivierung induziert wird oder aber metabotrope Rezeptoren, die eine Second-Messenger-Kaskade auslösen können. Nachdem der Neurotransmitter seinen spezifischen Rezeptor in der postsynaptischen Membran aktiviert hat, wird er relativ schnell abgebaut, recycelt und von der präsynaptischen Membran wieder aufgenommen, sodass er für die nächste Transmitterübertragung wieder zur Verfügung steht. Die Signalübertragung in der chemischen Synapse erfolgt unidirektional.

2.4.3 Ribbon-Synapsen

Eine spezialisierte Unterform der chemischen Synapse stellt die sogenannte Ribbon-Synapse oder Band-Synapse dar. Sie kommt im menschlichen Körper in der Retina, in den Haarzellen der Cochlea und in den Melatonin-sezierenden Zellen der Epiphyse vor.

In der Retina wurde sie relativ früh mithilfe der Elektronenrastermikroskopie in der IPL entdeckt, wo sie die Endterminalen der Bipolarzellen darstellen und in der OPL die Ausläufer der Photorezeptorzellen (SJOSTRAND, 1958).

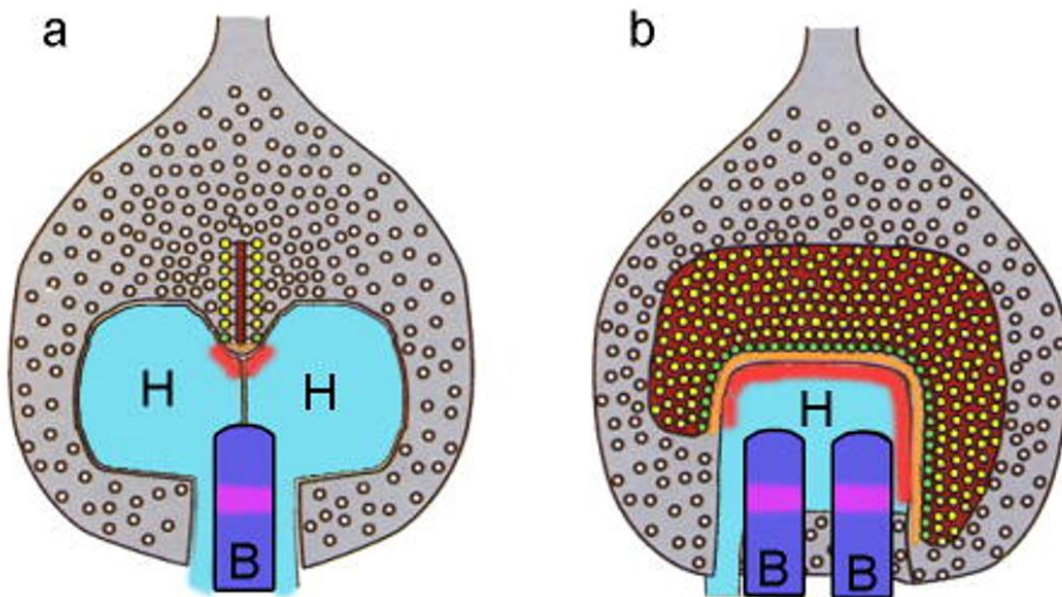


Abbildung 6: schematische Darstellung einer Ribbonsynapse. Ansicht von transversal (a) und axial (b). Das synaptische Ribbon (dunkelrot) hält viele Vesikel (gelb). Somit werden die Informationen sehr schnell und effektiv von der Photorezeptorzelle (grau) zur Horizontalzelle (H) übertragen; B: Bipolarzelle; aus (Matthews and Fuchs, 2010)

Der Aufbau der Ribbon-Synapse ist grundsätzlich ähnlich wie der einer konventionellen chemischen Synapse, weist allerdings einige elementare Unterschiede auf. Die meisten Proteine entsprechen denen der chemischen Synapse und die Transmitterausschüttung wird auch in der Ribbonsynapse durch Ca^{2+} getriggert, aber so ist beispielsweise das für die Vesikelfusion wichtige Protein Syntaxin 1 durch Syntaxin 3 ersetzt und manche Spezies enthalten in ihrer Ribbonsynapse kein Rabphilin und Synapsin.

Ein weiterer Unterschied ist das Vorhandensein von L-Typ- Ca^{2+} -Ionenkanälen (Heidelberger and Matthews, 1992), die sonst in Muskelzellen zu finden sind und T-Typ- Ca^{2+} -Kanäle in retinalen Bipolarzellsynapsen.

Das wichtigste anatomische Charakteristikum der Ribbon-Synapse ist das namensgebende Ribbon (auch Band, synaptischer Körper oder dichter Körper genannt), einer blätterartigen Organelle mit einer lamellenförmigen Aufteilung, das sehr elektronendicht und typischerweise von einem Halo aus vielen synaptischen Vesikeln umgeben ist (Sjöstrand, 1958; Sterling and Matthews, 2005). Es ist in der präsynaptischen Membran verankert und ragt aufrecht ins Zytoplasma des präsynaptischen Neurons hinein. Dabei ist das Ribbon nicht direkt in der präsynaptischen Membran verankert, sondern indirekt über eine bogenförmige, dichte Struktur. Diese Struktur wiederum ist einer für diese Synapsen typischen Invagination lokalisiert, welche ihr die charakteristische, hufeisenförmige Erscheinung gibt.

Das Stäbchenzellribbon ist ca. 35 nm dick, erstreckt sich mehrere μm lang parallel zur präsynaptischen Membran und ragt mehrere 100nm hoch in das Zytoplasma. Das Ribbon

besteht aus drei Lamellen, die zusammengerechnet eine für diese Größenordnung eine relativ große Oberfläche haben.

Wichtigster und größter Hauptbestandteil der synaptischen Ribbons ist das RIBEYE-Protein, welches im Jahr 2000 von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schmitz entdeckt wurde (Schmitz et al., 2000). Das RIBEYE-Protein besteht aus zwei Domänen: einer N-Terminalen A-Domäne und einer C-terminalen B-Domäne. Die A-Domäne war bereits als Bestandteil der Retina bekannt und die B-Domäne ist bis auf 20 AS-Sequenzen identisch zum nukleären Protein CtBP2, welches in den meisten Geweben ubiquitär vorhanden ist.

Analysiert man diese Kombination näher, ergibt sich daraus die Schlussfolgerung, dass das Gen für RIBEYE ein Hybridprotein ist: CtBP2 ist ein Enzym aus der Gruppe der NAD^+ -abhängigen 2-Hydroxysäure-Dehydrogenasen und sogar noch im RIBEYE-Protein ist diese enzymatische Aktivität noch nachweisbar (Schmitz et al., 2000). Die A-Domäne von RIBEYE hingegen ist ein Protein, welches nur in der Retina vorkommt. Diese ungewöhnliche Kombination deutet darauf hin, dass das RIBEYE zufällig durch Anheftung dieser beiden Gene aneinander entstanden ist und dessen Trägern aufgrund der besseren Funktionen einen selektiven Vorteil bot.

Der wichtigste funktionelle Unterschied zur konventionellen Synapse und das bedeutendste Charakteristikum der Ribbonsynapse ist die ungewöhnlich hohe und sehr effiziente Transmitterausschüttung. Während konventionelle Synapsen maximal 20 Vesikel pro Sekunde ausschütten können, schaffen Ribbonsynapsen eine Maximalrate von 500 Vesikeln pro Sekunde. Daher verwundert es auch nicht, dass die Ribbonsynapse auch dort zu finden ist, wo eine hohe Freisetzung an Transmittern notwendig ist. Um diese hohe Rate bewerkstelligen zu können, hält der Ribbon einerseits die Vesikel unmittelbar neben der präsynaptischen Membran fest und speichert diese. Andererseits zieht der synaptische Ribbon auch Vesikel aus einem Vesikelpool aus dem Zytoplasma an sich, um diese wiederum für die Exozytose zwischenzuspeichern. Nachdem der Ribbon Vesikel aus dem Vesikelpool an sich gebunden hat, sind diese mit dünnen, stängelartigen Filamenten noch unbekannter Zusammensetzung mit dem Ribbon verbunden (Sterling and Matthews, 2005) und wandern in distale Richtung am synaptischen Band entlang in Richtung aktive Zone. Dies ist die Stelle der Ribbonsynapse, an der der Ribbon indirekt mit der präsynaptischen Membran verankert ist und von der aus die Exozytose der Vesikel erfolgt.

Neben diesen funktionellen Charakteristika des synaptischen Bands kann eine schnelle Transmitterfreisetzung nach einem Ca^{2+} -Einstrom generiert werden, da die indirekte Verankerung der synaptischen Ribbons in der präsynaptischen Membran sich in unmittelbarer

Nähe zu den L-Typ- Ca^{2+} -Ionenkanälen befindet, sodass eine schnelle Antwort (Exozytose) auf den Ca^{2+} -Einstrom erfolgen kann (Schmitz, 2009). Physiologischerweise erfolgt die Exozytose der Neurotransmitter kontinuierlich und tonisch (Dowling, 1987). Auf diese Weise kann der kontinuierliche „Dunkelstrom“ in den Photorezeptorzellen bewerkstelligt werden, den eine konventionelle Synapse nicht sicherstellen könnte.

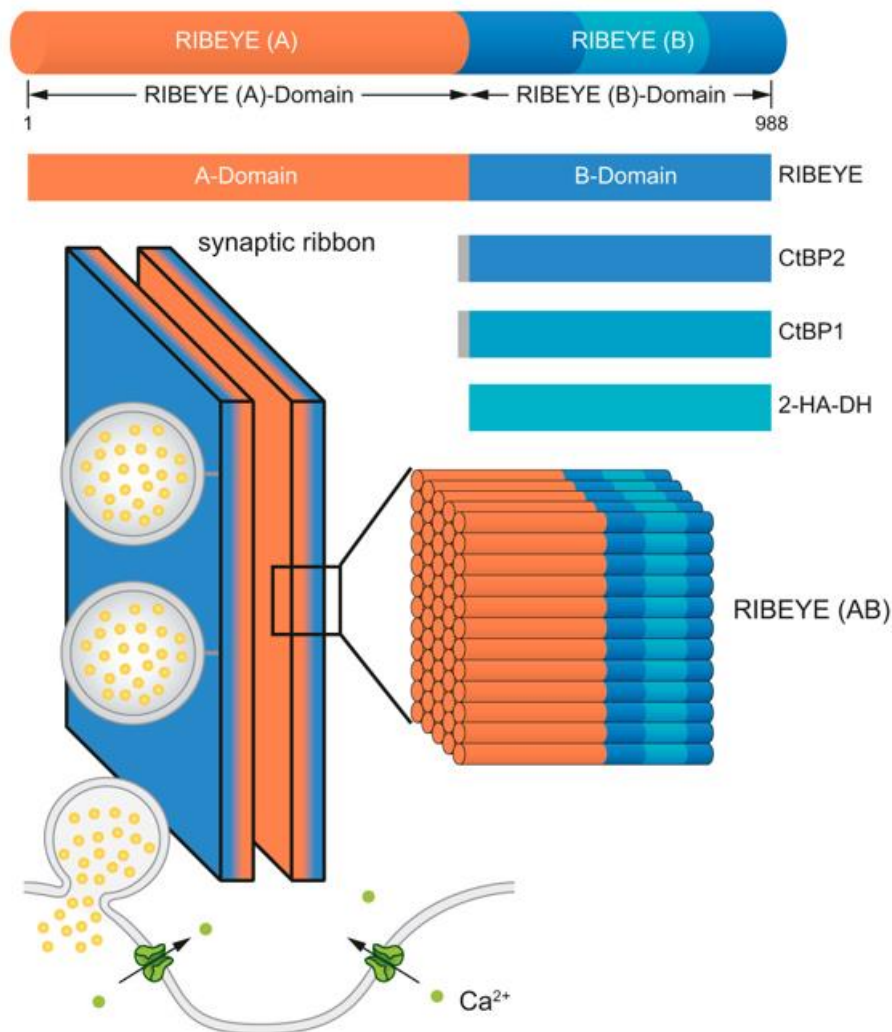


Abbildung 7: schematische Darstellung des RIBEYE-Proteins; aus (Moser et al., 2020)

2.5 Myosine

2.5.1 Myosine: allgemeiner Hintergrund

Myosine sind Proteine, welche grob in zwei Klassen unterschieden werden können: Muskelprotein- oder konventionelle Myosine, welche in Myozyten von Eukaryonten zu finden sind und nicht-Muskelproteinmyosine, sogenannte unkonventionelle Myosine, welche im Körper ubiquitär vorkommen und verschiedene Aufgaben des Zytoskeletts erfüllen.

Das menschliche Genom hat in etwa 40 Gene für Myosinproteine, aus denen sich 12 Myosinklassen ergeben (Krendel and Mooseker, 2005) und bei Eukaryonten gibt es insgesamt 79 verschiedene Myosine (Kollmar and Mühlhausen, 2017). Erst nach der letzten Eiszeit entwickelten menschliche Vorfahren sieben dieser 12 Myosingruppen, darunter Myosin-IX (Kollmar and Mühlhausen, 2017), um welches es in dieser Arbeit geht.

Myosine sind Signal- und Motorproteine, deren Aufbau immer gleich ist: Sie enthalten eine N-terminale Motor- oder Kopfdomäne, die verantwortlich ist für die Aktinbindung und die ATP-Hydrolyse, eine Halsregion, die leichte Ketten, die IQ Motive enthält, wie etwa Calmodulin und eine C-terminale Schwanzdomäne, die Fracht zum Transport bindet (Foth et al., 2006) (Krendel and Mooseker, 2005).

Myosine erfüllen im Körper zahlreiche Aufgaben. So sind sie zwar in erster Linie molekulare Motoren, das heißt, sie nutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse, um sich entlang der Zytoskelettfilamente Aktin entlangzubewegen und dadurch Muskelkontraktionen auslösen oder Fracht wie etwa Zellorganellen mitzutransportieren, aber auch Zellmigration und -adhäsion, Signaltransduktion und sogar die Tumorsuppression gehören zu ihrem Aufgabenfeld (Ulrich Welsch, 2018) (Krendel and Mooseker, 2005). Das heißt, dieselbe Kraft, die mithilfe von Myosin Muskelkraft generiert, ist auch für die Zellmigration und Kontrolle der Zellform verantwortlich. Im Nervensystem sind Myosine zu einem großen Teil für die Zellmigration zuständig (Brown and Bridgman, 2004).

Der Prozess, mit dem Myosin aus der Hydrolyse von ATP eine Bewegung im Muskel oder einen Transportprozess innerhalb der Zelle generiert, bezeichnet man als Kontraktionszyklus und er besteht aus vier Schritten.

Im entspannten Zustand liegt die Myosin-Kopfdomäne dem Aktinfilament ungebunden vor, da ATP an das Myosinköpfchen bindet. Erhöht sich durch den Reiz einer Nervenzelle die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol der Zelle, bindet dieses Ca^{2+} an Calmodulin, den Calciumsensor des Myosinproteins und der nächste Schritt im Zyklus wird eingeleitet. Das Myosinköpfchen hydrolysiert durch seine ATPase-Aktivität das ATP, wodurch es aktiviert wird. Jetzt kann die

Kopfdomäne des Myosins im folgenden Schritt an das Aktinfilament binden, sodass es zur Molekularbrücke zwischen den beiden Filamenten kommt. Wenn sich nun das ATP vom Myosinköpfchen löst, kippt dieses um etwa 40° und das Myosinfilament gleitet am Aktinfilament vorbei. Diese Querbrücke zwischen diesen beiden Filamenten ist äußerst stabil und löst sich erst, wenn ein neues ATP-Molekül an den Myosinkopf bindet, sodass der Zyklus von vorne beginnen kann.

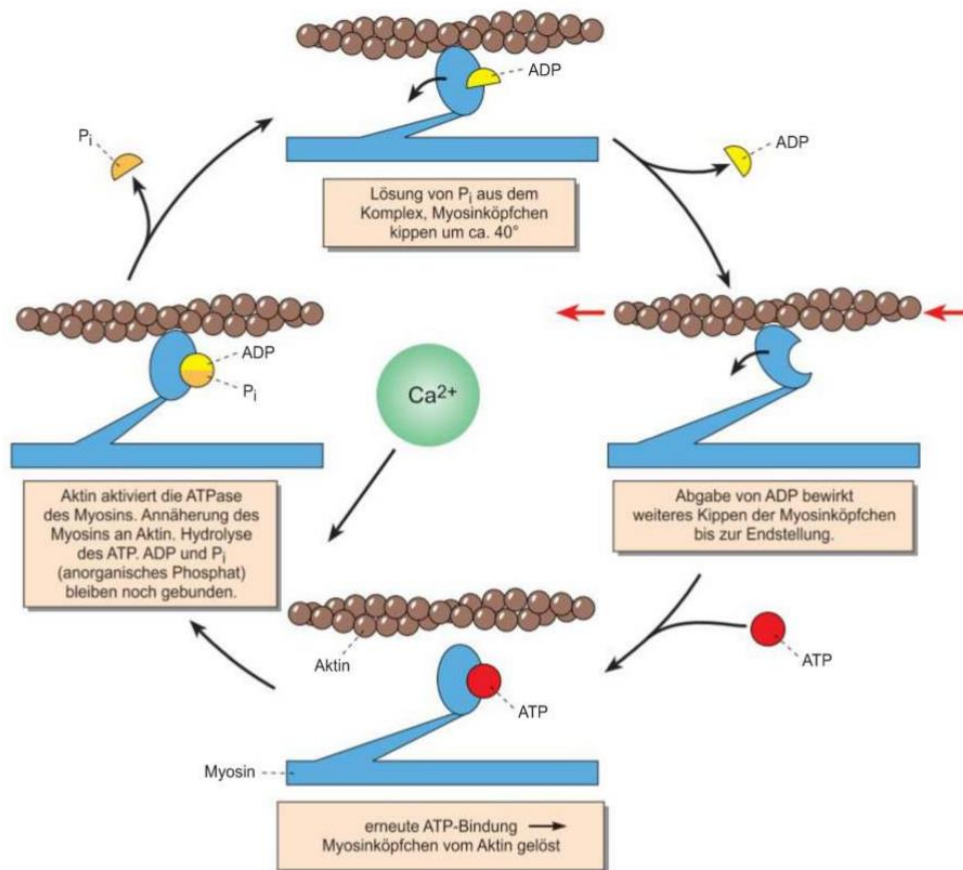


Abbildung 8: schematische Darstellung des molekularen Kontraktionszyklus (Abbildung aus *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie, 2018; V. Auflage, Elsevier Verlag*)

Myosine kommen, je nach Klasse, entweder als Monomer oder Dimer vor.

Myosin I ist ein unkonventionelles, monomeres Motorprotein, welches ubiquitär in einer Vielzahl an Geweben in vielen eukaryontischen Organismen vorkommt. Es ist zwischen 110 und 140 kDa groß und wird seinerseits in acht Unterklassen unterteilt: Myosin Ia, b, c, d, g, und h, welches eine kurze Schwanzdomäne und Myosin Ie und f, welche eine lange Schwanzdomäne besitzen.

Alle dieser Myosin I Subgruppen haben eine membranbindende Domäne, welche maßgeblich an der Formerhaltung der Zelloberfläche beteiligt ist (Welsch, 2018) (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019). Durch diese membranbindende Domäne sind Myosine I außerdem eine dynamische Verbindung zwischen Zytoskelett und Plasmamembran oder Zellorganellen. Im

menschlichen Körper kommt Myosin I beispielsweise in den Enterozyten vor und verbindet dort die Aktinfilamentbündel mit der Plasmamembran der Mikrovilli.

Myosin II ist ein konventionelles, als Dimer vorliegendes Myosin und gilt als das am besten erforschte Myosin. Es besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten und liegt somit als Hexamer vor. Myosin II ist klassischerweise das Muskelmyosin, generiert aber auch Bewegungen in anderen Körperzellen. So kann es in vier Gruppen aufgeteilt werden:

Skelettmuskelmyosin (Myosin II1, 2, 3, 4, 8, 13, 15), Herzmuskelmyosin (Myosin II6, 7, 7b), glattes Muskelzellmyosin (Myosin II11) und nicht-Muskelmyosin (Myosin II9, 10, 14).

Myosin V ist ebenfalls ein dimeres, unkonventionelles Myosin mit einer membranbindenden Domäne. Wie alle Myosine, ist es ein ATP-abhängiger molekularer Motor und gleitet an den Aktinfilamenten mit einer Geschwindigkeit von 300nm/s vom Minus- zum Pluspol entlang und spielt eine maßgebliche Rolle im Melanosomentransport (Masters et al., 2017).

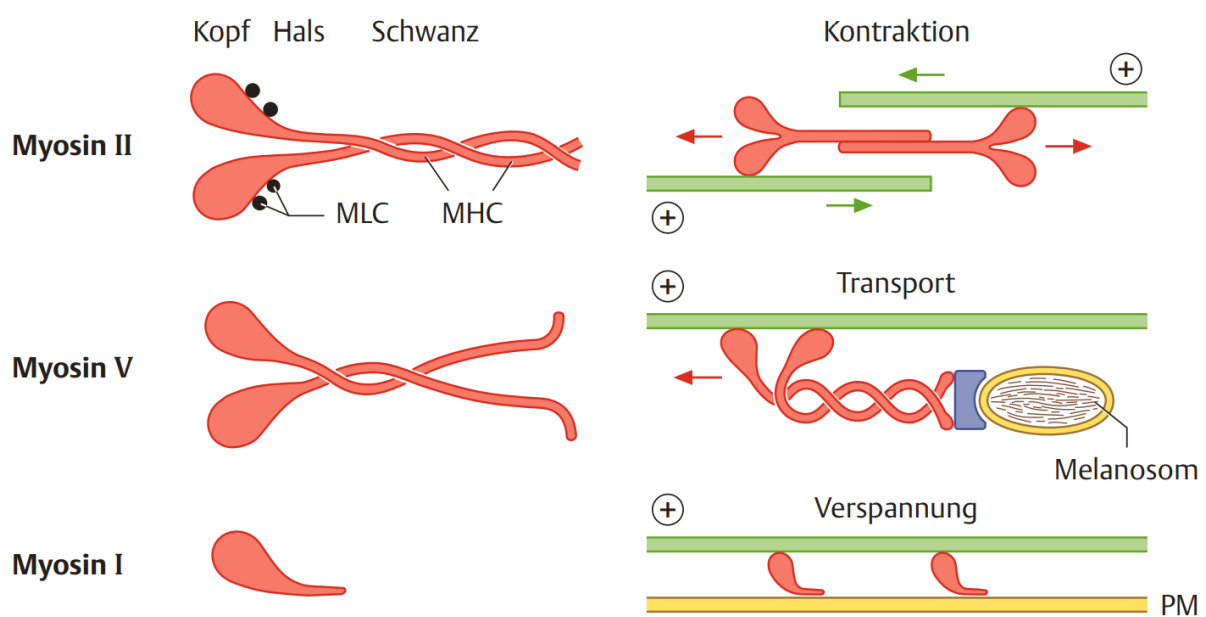


Abbildung 9: Myosine I, II und V (Abbildung aus *Histologie, 2018; VIII. Auflage, Thieme Verlag*)
PM: Plasmamembran, MLC: Myosin-Leichtkette, MHC: Myosin-Schwerkette

2.5.2 Myosin-IX

Myosin-IX-Proteine sind Motor- und gleichzeitig Signalproteine. Sie haben in ihrer Motorregion eine lange Insertion mit einer Calmodulin- und einer F-Aktin-Bindungsstelle, außerdem sind sie, wie alle anderen Myosine auch, an der ATP-Hydrolyse beteiligt. Außerdem haben sie in ihrem C-Terminus eine Rho-GTPase-Domäne, die die GTP-Hydrolyse katalysiert.

Knochenfische haben die vier Myosine IX, IXB, IXC und IXD. Bei allen anderen Wirbeltieren lässt sich Myosin-IX in zwei Gruppen einteilen: Myosin-IX und Myosin-IXB (Hanley et al., 2020). Gegenstand dieser Arbeit ist eine Myosin-IX-Variante aus der Myosinfamilie.

Ebenso wie andere Myosine auch ist Myosin-IX wesentlich an der Ausbildung eines adäquat funktionierenden Zytoskeletts beteiligt. Neben der regulierenden Funktion auf die Zellmorphologie beeinflusst Myosin-IX die Zellmigration, Zellkommunikation sowie die Ausbildung von Zell-Zell-Junctions. Darüber hinaus beeinflusst es die embryologische Entwicklung, die Homöostase ausgewachsener Organe und die Immunantwort.

Die Bedeutung von Myosin-IX für alle diese Aufgaben wird klar, wenn man die Folgen der Myosin-IX-Abwesenheit in Knockout-Mäusen analysiert. Experimente, bei denen solche Mäuse generiert wurden, zeigten Tiere mit einem kongenitalen Hydrozephalus und Stenosen des ventralen Teil des 3. Ventrikels. Die Ependymzellen im 3. Ventrikel zeigten Veränderungen in ihrer Zellmorphologie, in ihren Adhärens Junctionen und in der Zelldifferenzierung. Ähnliche Effekte zeigten sich auch bei einer Herunterregulierung von Myosin-IX (Abouhamed et al., 2009). Daraus lässt sich schließen, dass Myosin-IX wichtig ist für die Ependymzellendifferenzierung. Des Weiteren ist Myosin-IX unerlässlich für die Ausbildung adäquat funktionierender Zelljunctionen, da die Abwesenheit von Myosin-IX in instabilen Junctionen und Zellzerstreuung resultiert (Omelchenko and Hall, 2012).

Bei der Maus ist das Nicht-Vorhandensein von Myosin-IX des Weiteren assoziiert mit kongenitalem myasthenischem Syndrom und einer beidseitigen Nierenerkrankung mit Dilatation des proximalen Tubulus, einem ausgedünnten Parenchym mit Fibrose, Polyurie und niedrigmolekularer Proteinurie.

Doch auch beim Menschen werden Mutationen von Myosin-IX ebenfalls in zahlreichen schwerwiegenden Pathologien deutlich. So löst eine Nonsense-Mutation ebenfalls einen kongenitalen Hydrozephalus und Akinesie aus (Hanley et al., 2020).

Weitere Pathologien, für die Mutationen von Myosin-IX verantwortlich sind, sind die kongenitale Myasthenie und das Bardet-Biedl-Syndrom. Bei der kongenitalen Myasthenie oder dem kongenitalen myasthenem Syndrom handelt es sich um eine Erkrankung, die sich durch Muskelschwäche durch eine fehlerhafte Reizübertragung zwischen Nerv und Muskel auszeichnet. Ein auslösender Faktor für diese Erkrankung ist eine Mutation im Gen für Myosin-IX. Eine der wesentlichen Pathologien dahinter ist zum einen, dass Myosin-IX essentiell ist für die neuronale Verzweigung von Neuronen. So zeigten Knock-out-Zebrafische eine pathologisch veränderte neuronale Verzweigungen und abnormale Motoneuronen, welches in

abgeschwächten oder pathologischen Schwimmbewegungen der Tiere resultierte (O'Connor et al., 2018) (O'Connor et al., 2016).

Beim Bardet-Biedl-Syndrom handelt es sich um eine seltene Erkrankung mit einer Zilienstörung, die viele Organsysteme betrifft, unter anderem löst das Bardet-Biedl-Syndrom eine Retinopathie aus und kann ebenfalls durch eine Mutation im Gen für Myosin-IX verursacht werden (Gorman et al., 1999).

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial und Gewebe

3.1.1 Versuchstiere und Präparation

Beim dem zu untersuchenden Gewebe handelte es sich um Retinagewebe von Mäusen der Zuchtlinie C57BL/6J. Die Mäuse wurden im Institut für Experimentelle Chirurgie gemäß der Richtlinie der Ethikkommission der Universität des Saarlandes gezüchtet und in den Laborräumen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie getötet. Die fachgerechte Tötung der Mäuse sowie die anschließende Entnahme des Retinagewebes erfolgte durch das Laborpersonal.

3.1.2 Einbettung der Präparate für die Semidünnschnittmethode und Herstellung der Semidünnschnitte

Die Herstellung der Semidünnschnitte erfolgte durch eine Methode, die durch die AG Prof. Dr. Schmitz weiterentwickelt wurde (Wahl et al., 2013) und auf der Methode nach Franz und Drenckhahn basiert (Drenckhahn and Franz, 1986). Nachdem das Retinagewebe entnommen wurde, wurde es in Isopentan, das von flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, schockgefroren. Als nächstes erfolgt die Gefriertrocknung der Retina in flüssigem Stickstoff. Dabei generiert eine spezielle Pumpe, die Turbomolekularpumpe TCP270, ein Vakuum von etwa 10^{-7} mbar (10^{-5} Pa). Dadurch wird das Gewebe bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs gefriergetrocknet. Die Gefriertrocknung des Retinagewebes wurde für 48 h durchgeführt. Dann erfolgte die Infiltration des Gewebes mit Epon.

Epon ist ein Epoxyharz, welches aus 49% (w/w) aus Epon, 20% (w/w) DDSA (Dodeceny succinic anhydride), 30% (w/w) MNA (Methyl-5-Norbornene-2,3-Dicarboxylic Anhydride) und 0.1% aus Epoxyhärter DMP30 (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol) zusammengemischt wird. Das gefriergetrocknete Gewebe wird auf Raumtemperatur equilibriert und mit dem Epoxyharz infiltiert. Die Infiltration mit Epon erfolgt zunächst für etwa 24h bei 28°C, um die Infiltration des Gewebes mit dem Harz zu erleichtern und dann für weitere 24h bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit werden die Retinaprobe sanft auf einem Drehrad rotiert, um die Infiltration mit Harz weiter zu erleichtern. Die Polymerisation der mit Harz infiltierten Proben erfolgt für 48 h bei 60°C.

Die ausgehärtene Epoxyharzblöcke werden anschließend durch ein Ultramikrotom (Fa. Reichert) mit Diamantmesser in 0,5 µm dicke Schnitte geschnitten, auf ein Deckglas übertragen und bei 80°C auf einer Heizplatte getrocknet. Die Herstellung der Semidünnschnitte erfolgte durch das Laborpersonal (Gabriele Kiefer).

3.2 Immunfluoreszenzfärbung

3.2.1 Grundlagen der Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine Methode der Immunhistochemie, die es ermöglicht, Proteine mithilfe spezifischer Antikörper nachzuweisen und mikroskopisch visualisierbar zu machen. Somit kann nicht nur beurteilt werden, ob das jeweilige Protein in dem zu untersuchenden Gewebe exprimiert wird, sondern auch in welchem genauen Gewebekompartiment es lokalisiert ist.

Das Prinzip dieser Methode funktioniert auf der Basis einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierbei bindet der Antikörper an das Epitop eines Antigens, welches beispielsweise in einem Gewebeprotein enthalten ist. Der Antikörper, der direkt an das Antigen bindet, wird als Primärantikörper bezeichnet.

In der Immunfluoreszenzhistologie wird zwischen direkter und indirekter Immunfluoreszenzfärbung unterschieden. Bei der direkten Methode ist an dem Primärantikörper ein fluoreszierender Farbstoff gebunden, sodass der gebundene Primärantikörper selber samt dem gebundenen Protein im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Bei der indirekten Methode ist der Primärantikörper unmarkiert und enthält keinen fluoreszierenden Farbstoff als Marker. Stattdessen bindet an den Primärantikörper ein kommerziell erhältlicher Zweit- oder Sekundärantikörper, der den Primärantikörper erkennt und mit einem detektierbaren fluoreszierenden Farbstoff konjugiert ist. Typischerweise ist der Sekundärantikörper gegen den Fc-Anteil des Primärantikörpers gerichtet.

Bei den Experimenten wurde ausschließlich die indirekte Immunfluoreszenzmethode verwendet.

Die Methode der Doppelimmunfluoreszenz ist bei der Lokalisation noch wenig erforschter Proteine besonders hilfreich. Hierbei werden zwei verschiedene Proteine mit jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern markiert. Die beiden verschiedenen Primärantikörper wurden dabei

in verschiedenen Tierspezies generiert (z.B. Maus und Kaninchen). Da die markierten Sekundärantikörper auf demselben Präparat in unterschiedlichen Kanälen Signale geben, ist es somit möglich, die Lokalisation weniger erforschten Proteins im Vergleich zum Referenzprotein zu bewerten. Bei meinen Untersuchungen wurde als Referenzantikörper jeweils ein Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Die Myosin-IX Antikörper, die ich für meine Untersuchungen verwendet habe, waren monoklonale Antikörper, die in der Maus generiert wurden. Somit konnten die Myosin-IX-Signale z.B. mit einem Chicken anti-mouse Alexa488 nachgewiesen werden (Emission im Grünkanal) und der Referenzantikörper mit Donkey anti-rabbit Alexa568 (Emission im Rotkanal). Anhand der topografischen Nähe der jeweiligen Signale ist es möglich, zu bewerten, in welcher Retinaschicht sich das zu untersuchende Protein befindet.

3.2.2 verwendete Antikörper

Primärantikörper

Anti-Myosin (2C6, 7C2, 15H12, 16B1)

Diese vier monoklonalen Maus-Antikörper (alle IgM) wurden gegen eine Peptidsequenz QLEEAEAAAQRANASRRKLQRELEDATETADAMNR (Sequenz von amino- nach carboxyterminal) im Carboxyterminus von Myosin-IX (Datenbankeintrag NP_0718552) hergestellt. Sie wurden vom Laborpersonal in Mäusen generiert und wurden im Verhältnis 1:50 für die Immunfluoreszenz verdünnt.

Anti-RIBEYE (U2656)

Dieser polyklonale Kaninchen-Antikörper wurde in einem Kaninchen generiert und richtet sich gegen das RIBEYE-Protein in der Retina (Schmitz et al., 2000). Er wurde im Verhältnis 1:500 verdünnt.

Anti-Synaptotagmin (V216)

Dieser polyklonale Kaninchen-Antikörper wurde ebenfalls in einem Kaninchen generiert und reichert sich am Protein Synaptotagmin in der Retina an. Sein Verdünnungsverhältnis beträgt 1:500.

Anti-saures Gliafaserprotein (GFAP)

Dieser polyklonale Antikörper wurde in einem Kaninchen generiert und richtet sich gegen das saure Gliafaserprotein, welches in Gliazellen im zentralen Nervensystem vorkommt. Er stammt vom US-amerikanischen Hersteller SIGMA-ALDRICH (G9269) und wurde 1:500 verdünnt.

Anti-Postsynaptic Density Protein 95 (PSD95)

Dieser polyklonale Kaninchen-Antikörper (L667) wurde uns von Prof. Thomas Südhof zur Verfügung gestellt (Irie et al., 1997). Er richtet sich gegen das postsynaptische Dichteprotein 95 in der Retina und wird im Verhältnis 1:500 verdünnt.

RIBEYE (2D9)

Dieser monoklonale Antikörper gegen RIBEYE B-Domäne wurde in der Maus hergestellt (Dembla et al., 2018) und wurde für die Western Blot Untersuchungen in einer Verdünnung von 1:5000 als Positivkontrolle eingesetzt.

Sekundärantikörper

Huhn-anti-Maus / Chicken-anti-Mouse Alexa 488

Dieser monoklonale Sekundärantikörper wurde in einem Huhn generiert und richtet sich gegen Mausimmunglobuline der Subtypen IgG, IgA und IgM. An den Antikörper ist der fluoreszierende Farbstoff Alexa 488 konjugiert, der nach Anregung mit der Wellenlänge 488 nm grün leuchtet.

Esel-anti-Kaninchen / Donkey-anti-Rabbit Alexa 568

Dieser polyklonale Antikörper stammt aus einem Esel und richtet sich gegen Immunglobuline vom Kaninchen. Er ist mit dem Farbstoff Alexa 568 konjugiert leuchtet nach Anregung mit der Wellenlänge 568 nm rot.

Beide Sekundärantikörper wurden von Thermo Fischer Scientific/Invitrogen, gekauft und haben ein optimales Verdünnungsverhältnis 1:1000.

3.2.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Zuerst muss das Epoxyharz aus den Semidünnschnitten vom Retinagewebe entfernt werden, in dem es noch eingebettet liegt. Hierfür werden die Schnitte in einen Glaskubus gestellt und dieser mit Natriummethylat befüllt und 10 Minuten in diesem inkubiert. Anschließend folgen eine 10-minütige Inkubation mit Xylol-Methanol und zwei Mal hintereinander eine jeweils 10-minütige Inkubation mit Aceton. Die letzten Epoxyharzreste wurden mit Leitungswasser und PBS vorsichtig ausgespült.

Anschließend wurden die Semidünnschnitte aus dem Glaskubus entnommen, auf der Unterseite und am Rand vorsichtig mit einem Kosmetiktuch abgewischt und auf die Lagerungsschienen der feuchten Kammer abgelegt. Die Präparate werden mit Ausnahme der späteren Negativkontrolle, welche mit PBS benetzt wird, mit ihren entsprechenden Erstantikörpern in den entsprechenden Verdünnungen in einer feuchten Kammer inkubiert (4°C, 12 Stunden).

Nach dieser Inkubationszeit werden die Erstantikörper von den Präparaten 5 x 5 min mit PBS gespült und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Zweitantikörpern inkubiert. Danach werden die Präparate erneut 5 x 5 min mit PBS gespült und an ihrer Unterseite und den Rändern vorsichtig mit einem Kosmetiktuch abgetrocknet.

Auf einen Objektträger werden 15 µl NPG als Ausbleichungsprophylaxe appliziert und die Semidünnschnitte mit dem Gewebe nach unten mithilfe einer Kanüle vorsichtig auf den Tropfen NPG gelegt. Zur Fixierung und Vorbeugung von Austrocknung werden die Ränder der Deckgläser mit Nagellack versiegelt.

3.3. Analyse der Immunfluoreszenzfärbung

Die angefertigten Immunfluoreszenzpräparate wurden am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 und der Mikroskop-Kamera MRm des Herstellers Zeiss mikroskopiert und dokumentiert. Die Kamera wurde mit der Axiovision Software (Zeiss) gesteuert. Die für die Mikroskopie notwendige Beleuchtung stammt von der Lichtquelle TILL Polychrom des Herstellers TILL Photonics.

Zunächst wurden die Präparate in einer 20-fachen Vergrößerung zur Orientierung im Gewebe begutachtet. Anschließend wurden die Semidünnschnitte in einer 40-fachen Vergrößerung

analysiert, wofür ein Tropfen Immersionsöl verwendet werden musste, um durch den Brechungsindex von Öl eine optimale Auflösung zu erreichen.

Mithilfe der Lichtquelle wurden die Präparate mit Licht entsprechende Wellenlänge angeregt und in ihren jeweiligen Kanälen untersucht und mit den entsprechenden Belichtungszeiten dokumentiert.

3.4. Western Blot

3.4.1 Gewinnung der Retina-Präparate

Für den Western Blot wurden Retinapräparate des Hausrindes verwendet. Hierfür wurde das Anatomische Institut des Universitätsklinikums des Saarlandes von einem lokalen Schlachtbetrieb mit Rinderaugen beliefert, von denen die Retinae durch das Laborpersonal unter dem Mikroskop in einer Petrischale entfernt wurden. Daraufhin wurden sie in ein 1ml Eppendorf-Gefäß gelegt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.2 Vorbereitungen für den Western Blot

Die Rinderretina wurde für den Western Blot aus der Tiefkühltruhe bei -80°C geholt, mit einem Mörser zerkleinert und in 1ml SDS Laemmli Probenpuffer durch multiples Pipettieren aufgenommen. Das Retinalysat wurde in danach in einem Heizblock für 10 min Minuten bei 96°C gekocht.

Als nächstes erfolgt die Vorbereitung des achtprozentigen Trenngels (siehe Tab. 3.5.1).

Für den Elektrophorese-Blot wurde ein System nach Hoefer verwendet, wofür das Trenngel zwischen zwei auslaufdichten und sauberen Glasflächen zu $4/5$ mit Trenngel befüllt worden ist. Die restlichen $1/5$ des Volumens wurden mit Ethanol pipettiert, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern und eine glatte, obere Grenzfläche des Trenngels zu gewährleisten.

Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, erfolgte die Herstellung des Sammelgels (siehe Tab. 3.5.1), welches nach Auskippen des Ethanols und kurzem Auswaschen mit Aqua destillatus auf das polymerisierte Trenngel pipettiert wurde. In dieses noch flüssige Trenngel wurde dann ein Kamm eingelegt, um nach Polymerisation des Gels die Einfülllücken für das spätere Auftragen der Proben zu generieren.

Nach ca. 45 Minuten war das Sammelgel auspolymerisiert und der Kamm konnte vorsichtig entfernt werden, woraufhin in die entstandenen Lücken ein Proteinmarker für Molekulargewichtsstandard und Rindretinapoben (siehe 3.4.1) aufgefüllt werden.

Als letzter Schritt werden die beiden Glasplatten samt zwischenbefindlichem Inhalt in die Elektrophoresekammer mit SDS-Elektrophoresepuffer gestellt und die Proteine wurden nach ihren molekularen Größen für eine Stunde bei 80 Volt (Proben im Sammelgel) und danach für drei Stunden bei 100 Volt (Proben im Trenngel) aufgetrennt.

3.4.3 Durchführung des Western Blots

Nachdem die im SDS-PAGE-Gel enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, müssen sie auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dies erfolgt für eine Dauer von zehn Stunden bei einer Spannung von 45 Volt in Transferpuffer bei 4°C.

Die Membran wird nach diesem Vorgang sehr vorsichtig mithilfe einer Pinzette aus der Vorrichtung entnommen und mit Ponceau S gefärbt, um den Erfolg des Elektrotransfers abschätzen zu können.

Da diese Färbung nur zur ersten Abschätzung dient und rückgängig zu machen ist, wird die Nitrozellulosemembran nach der ersten Fotodokumentation durch Chemi Doc XRS wieder mit Aqua destillata vorsichtig entfärbt.

Im nächsten Schritt wird die Membran entsprechend ihrer aufgeladenen Proteinbahnen in Streifen geschnitten und bei Raumtemperatur in fünfprozentige Magermilchpulverlösung blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Anschließend folgt die Inkubation mit den Primärantikörpern 2C6, 7C2, 15H12, 16B1 sowie Anti-RIBEYE 2D9. Dabei wurden jeweils 30µl Erstantikörper auf 3ml fünfprozentiger Magermilchpulverlösung verdünnt. Die Membranstreifen wurden hierfür zusammen mit den verdünnten Antikörpern in kleine Plastiktüten eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelbank inkubiert.

Danach wurden überschüssige Primärantikörper fünf mal je fünf Minuten mit PBS gespült, sodass die Sekundärantikörper inkubiert werden können. Die Sekundärantikörper GαM POX IgG sowie GαM POX IgM wurden jeweils in einem Verhältnis von 1 µl Antikörper und 3ml Magermilchpulverlösung verdünnt. Anschließend wurden die Streifen mit den Myosin-Antikörpern mit GαM POX IgM und der Streifen mit Anti-RIBEYE 2D9 mit GαM POX IgG für eine Stunde inkubiert.

Nachdem die Streifen analog zur Inkubation mit dem Primärantikörper fünf Mal fünf Minuten zur Entfernung von ungebundenen Sekundärantikörpern mit PBS gespült wurden, wurden die auf den Streifen befindlichen Banden mithilfe von ECL (Enhanced Chemoluminescence) visualisiert. Hierfür wurden jeweils 3 ml von ECL-1 und ECL-2 gemischt und sehr zeitnah auf die Streifen benetzt, um die Signale mithilfe von Chemi Doc XRS (Firma Biorad) zu fotodokumentieren.

3.5. verwendete Materialien

3.5.1 Verwendete Lösungen und Chemikalien

verwendetes Material	Hersteller	sonstige Anmerkungen
Natriummethylat	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn	30%ige Lösung in Methanol
Methanol	Zentrales Chemikalienlager, Universität des Saarlandes, Saarbrücken	98%
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	≥99%
Aceton	Fischer Scientific, Loughborough, Vereinigtes Königreich	≥99,8%
Nagellack	diverse Hersteller	Kauf aus dem Drogeriemarkt durch das Laborpersonal
PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	Merck, KGaA, Marke Sigma-Aldrich, Darmstadt	
NPG (N-Propyl-Gallat)	Sigma	
Dodecenylsuccinic anhydride	Merck, KGaA, Marke Sigma-Aldrich, Darmstadt	
Methyl-5-Norbornene-2,3-Dicarboxylic Anhydride	Merck, KGaA, Marke Sigma-Aldrich, Darmstadt	

Trenngel, 8%	Herstellung unmittelbar kurz vor Versuchsbeginn	1,96 ml Aqua destillata 1,9ml M Tris pH 8,8 1,995ml 30% Acrylamid 75 µl 10% SDS 1,5ml 50% Glycerol 5 µl TEMED 38 µl 10% APS
Sammelgel	Herstellung unmittelbar kurz vor Versuchsbeginn	2,4ml Aqua destillata 940 µl 1 M Tris pH 6,8 500 µl 30% Acrylamid 50 µl 10% SDS 10 µl TEMED 50 µl 10% APS
SDS-Elektrophoresepuffer		3,03g Tris 14,4g Glycin 1,0g SDS
Transferpuffer		15,125g Tris 72,05g Glycin 1l Methanol Mit Aqua destillatus bis zu einem Gesamtvolumen von 5l aufgefüllt

3.4.2 verwendete Materialien und Geräte

Ultramikroton Ultracut S	Reichert und Jung	
Diamantmesser	DIATOME	
Glaskubus für Semidünsschnitte	Diverse Hersteller	

Feuchte Kammer für Kryostat- und Semidünnschnitte		
Kosmetiktücher	Diverse Hersteller	Drogeriemarkt
Kanüle	Diverse Hersteller	Universitätsklinik

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Signale der Myosinantikörper mithilfe der Immunfluoreszenz in der Retina lokalisiert. Als Referenz verwendete ich in eigenen Versuchsreihen jeweils vier unterschiedliche Antikörper, von denen insbesondere Anti-RIBEYE-U2656 als polyklonaler Referenzantikörper („Goldstandard“) aus dem Kaninchen verwendet wird. Der polyklonale Antikörper gegen RIBEYE U2656 markiert die Synaptic Ribbons (Schmitz et al., 2000). Somit kann im Rahmen der Doppelfluoreszenz die Lage der zu untersuchenden Myosinsignale in Bezug zu den RIBEYE Signalen gesetzt werden. Die exakte Lokalisation des RIBEYE Proteins an den Ribbons sind die innere und äußere plexiforme Schicht (Schmitz et al., 2000). Als Referenzantikörper wurden neben dem polyklonalen RIBEYE Kaninchen-Antikörper U2656 auch folgende polyklonale Kaninchenantikörper eingesetzt: Anti-PSD-95, welches das postsynaptische Dichteprotein 95 markiert und Anti-Synaptotagmin-V216, was Synaptotagmin-1 in der Präsynapse markiert. Beide Marker zeigen die Synapsenschichten innere und äußere plexiforme Schicht an. Des Weiteren wurde Anti-GFAP verwendet, welches an das saure Gliafaserprotein in den Müllerzellen bindet. Der Übersicht halber werden die einzelnen Myosinantikörper jeweils mit ihren vier Referenzantikörpern in der Doppelfluoreszenz und anschließend der Western Blot vorgestellt.

4.1 Lokalisation mittels Epifluoreszenzmikroskopie

Die einzelnen Myosinantikörper wurden mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie im Semidünnschnittpräparat nachgewiesen und lokalisiert. Hierfür wurden Mausretina-Präparate nach der Semidünnschnittmethode verwendet. Für jede Versuchsreihe wurden außerdem Negativ- und Positivkontrollfärbungen angelegt. Bei der Positivkontrolle wurde der jeweilige Referenzantikörper als Einzelfluoreszenz ohne Myosin auf das Präparat inkubiert und bei den jeweiligen Negativkontrollen anstatt die Primärkörper PBS zugegeben.

4.1.1 Lokalisationsergebnisse mit dem Myosin-IX-Antikörper (Klon 2C6)

Einzel- und Doppelfluoreszenz

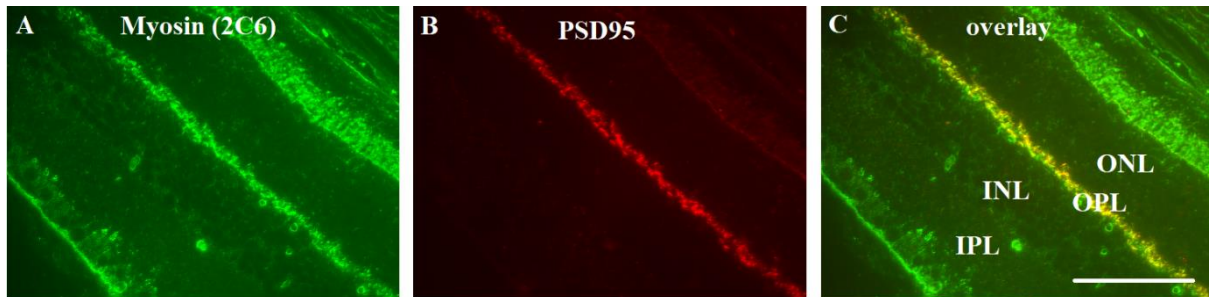


Abbildung 10: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-2C6 und Anti-postsynaptic-density(PSD)-95

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-2C6

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-PSD-95

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

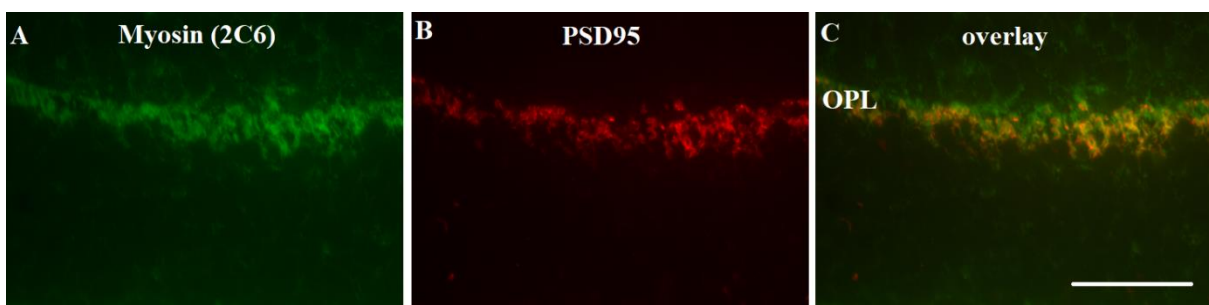


Abbildung 11: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-2C6 und Anti-postsynaptic-density(PSD)-95

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-2C6

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-PSD-95

C: Overlay

Maßstab: 10 µm

OPL: outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht)

In der Übersichtsaufnahme ist eine deutliche Anreicherung von Myosin-2C6 insbesondere in der äußeren plexiformen Schicht zu erkennen. Die Synapsenschichten können durch die Doppelimmunfluoreszenzmarkierungen mit PSD95 eindeutig identifiziert werden. Das postsynaptische Dichteprotein-95 (PSD95), welches sich in den Photorezeptorzellen der Retina die präsynaptische Terminale markiert (Koulen et al., 1998). Gerade in der Vergrößerungsaufnahme lässt sich diese ähnliche Lokalisation gut erkennen.

Negativkontrolle

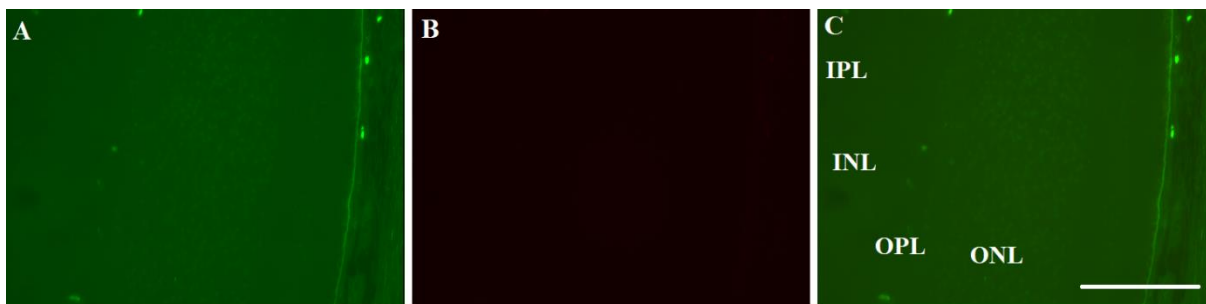


Abbildung 12: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
 A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 2000 ms
 B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 7000 ms
 C: Overlay
 Maßstab: 50 µm
 IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer



Abbildung 13: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
 A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 12000 ms
 B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 12000 ms
 C: Overlay
 Maßstab: 50 µm
 IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen Negativkontrollen, die lediglich mit den Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586 inkubiert worden sind. Die Negativkontrollen weisen so gut wie keinen Hintergrund auf, sodass davon auszugehen ist, dass die in den Abbildungen 10 und 11 gezeigten Signale in den Synapsenschichten keine Autofluoreszenz sind, sondern auf der Bindung des Primärantikörpers beruhen.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

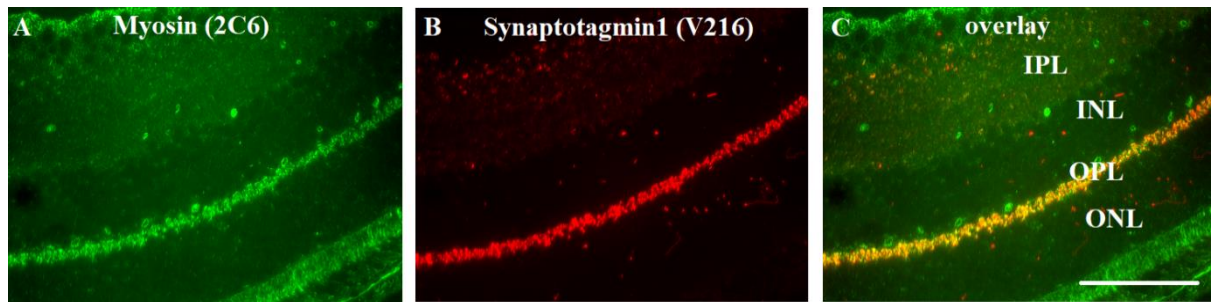


Abbildung 14 : Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Myosin-2C6 und Anti-Synaptotagmin-V216

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-2C6

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-Synaptotagmin-V216

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

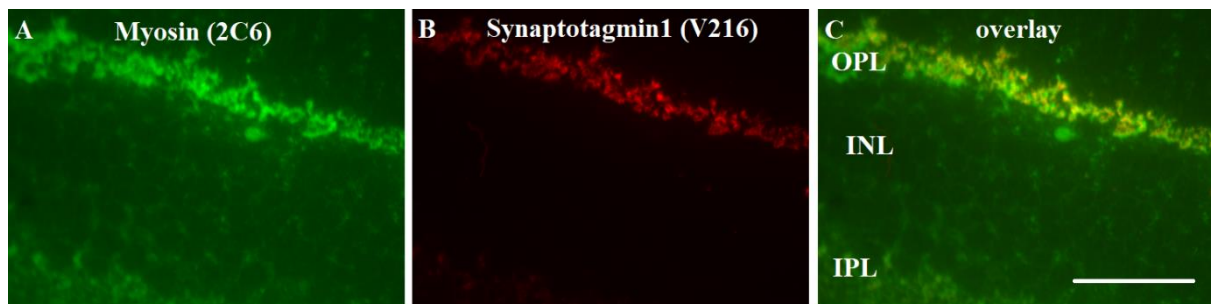


Abbildung 15: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-2C6 und Anti-Synaptotagmin-V216

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-2C6

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-Synaptotagmin-V216

C: Overlay

Maßstab: 10 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer

Auch in dieser Fluoreszenzfärbung lässt Myosin-2C6 ein Signal in der inneren plexiformen Schicht (IPL), aber vor allem in der äußeren plexiformen Schicht (OPL), in der die Photorezeptorsynapsen gelegen sind, zu erkennen. Die Zuordnung zu diesen Schichten erfolgte mithilfe des Antikörpers Anti-Synaptotagmin1-V216, welcher als Marker für Membranproteine der synaptischen Vesikel typischerweise Synapsen anfärbt. Da die Signale von Anti-Myosin-2C6 und Anti-Synaptotagmin1-V216 eindeutig kolokalisieren, ist davon auszugehen, dass Myosin-2C6 in den Synapsenzellschichten OPL und IPL zu finden ist.

Negativkontrolle

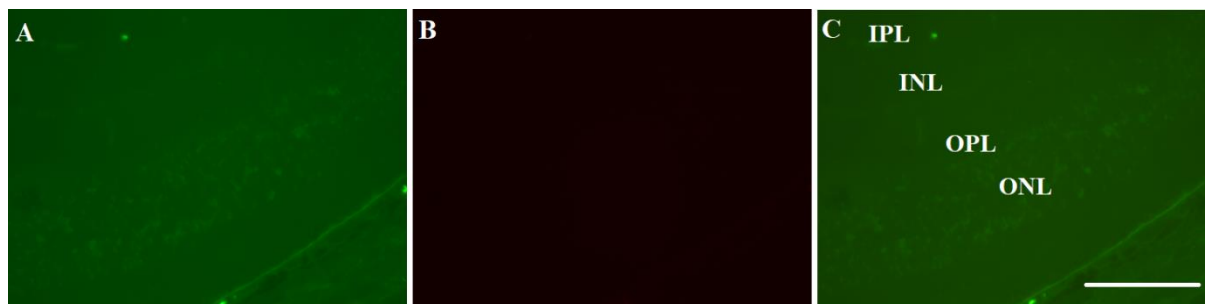


Abbildung 16: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 3000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 6000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer



Abbildung 17: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

In beiden Belichtungszeiten sind keine Signale erkennbar, die über die Autofluoreszenz des Gewebes hinausgehen. Somit handelt es sich bei den Doppel- und Einzelfluoreszenzen in Abbildung 14 und 15 um Signale, die typisch sind für die Bindung des Primärantikörpers und nicht etwa um Autofluoreszenz des Retinagewebes.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

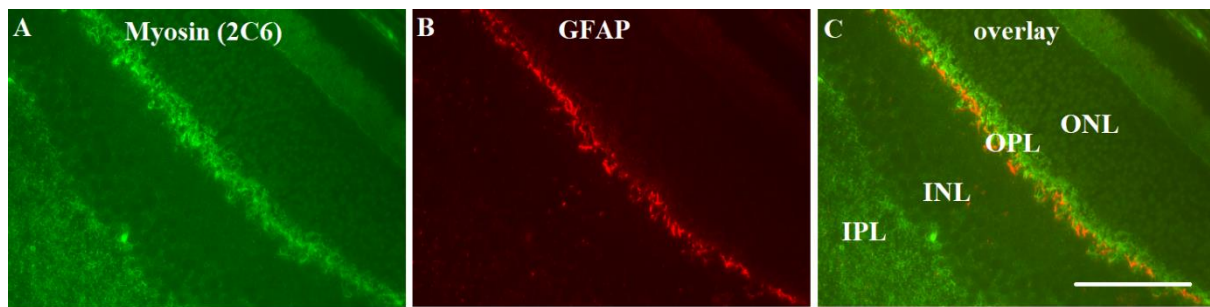


Abbildung 18: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-2C6 und Anti-Saures Gliafaserprotein (GFAP)

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-2C6

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-GFAP

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Es lässt sich eine klare Anreicherung von Anti-Myosin-2C6 in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und der inneren plexiformen Schicht (IPL) erkennen. Als Marker dient anti-saures Gliafaserprotein, welches sich als Marker der Müllerzellen klassischerweise an der Grenze zwischen OPL und INL finden lässt. Da die Signale von Anti-Myosin-2C6 und anti-saures Gliafaserprotein nicht kolokalisieren, kann davon ausgegangen werden, dass Myosin 2C6 kein Bestandteil der retinalen Glia ist.

Negativkontrolle



Abbildung 19: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 8000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 6000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

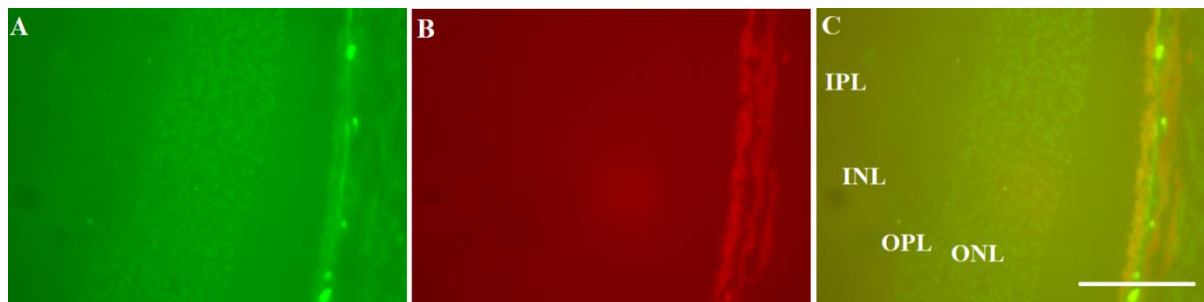


Abbildung 20: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 20000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 20000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die Abbildungen 19 und 20 sind Negativkontrollen, die mit PBS und den Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit 568 inkubiert worden sind und somit ohne Primärantikörper. Dies wurde durchgeführt, um unspezifische Hintergrundsignale zu erkennen. Die Negativkontrollen zeigen de facto keinen Hintergrund, sodass die Signale in Abbildung 18 auf die spezifische Bindung des Primärantikörpers Anti-Myosin-2C6 zurückzuführen sind.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

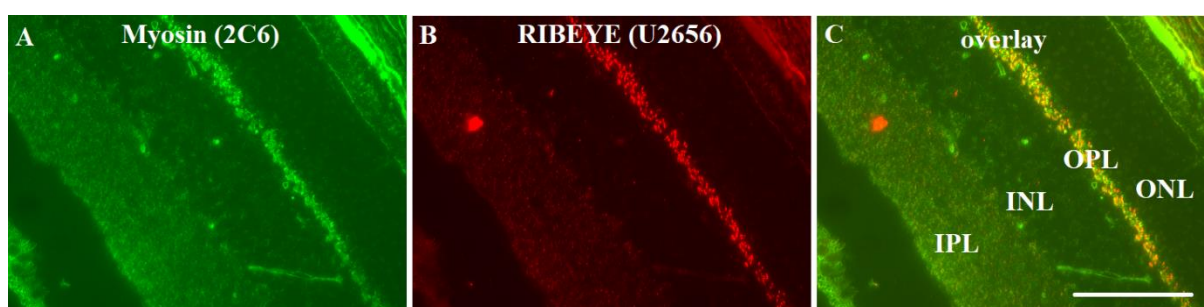


Abbildung 21: Semidünnschnitte Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti- Myosin-2C6 und Anti-RIBEYE-U2656
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-2C6
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-RIBEYE-U2656
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

In der Immunfluoreszenz ist eine deutliche Anreicherung des Myosin-2C6 in der äußeren plexiformen Schicht (OPL), in der die Photorezeptorsynapsen lokalisiert sind, und eine schwächere Anreicherung in der inneren plexiformen Schicht (IPL) zu erkennen. Als Marker wurde Anti-RIBEYE-U2656 verwendet, welcher sehr deutlich die typischen, hufeisenförmigen Ribbons in der OPL sowie Signale in der IPL markiert. Da die Signale überlappen, lässt sich daraus schließen, dass sich die Myosinproteine der Variante IX in denselben Synapsenschichten finden lassen können wie RIBEYE-Proteine.

Negativkontrolle



Abbildung 22: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
 A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 5000 ms
 B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 2000 ms
 C: Overlay
 Maßstab: 50 µm
 IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

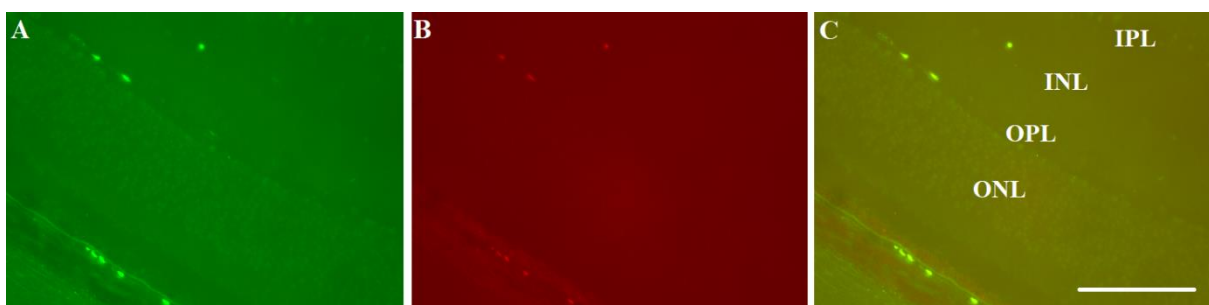


Abbildung 23: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
 A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
 B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
 C: Overlay
 Maßstab: 50 µm
 IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die Negativkontrollen in Abbildung 22 und 23 zeigen Inkubationen mit PBS und den Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit 568, allerdings ohne Primärantikörper, um unspezifische Signale zu detektieren. Da die beiden Negativkontrollen praktisch keinen Hintergrund zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass die in Abbildung 21 beobachteten Signale in den Synapsenzellschichten keine Autofluoreszenz sind, sondern auf der spezifischen Bindung des Primärantikörpers Anti-Myosin-2C6 zurückzuführen sind.

4.1.2 Lokalisationsergebnisse mit dem Myosin-IX-Antikörper (Klon 7C2)

Einzel- und Doppelfluoreszenz

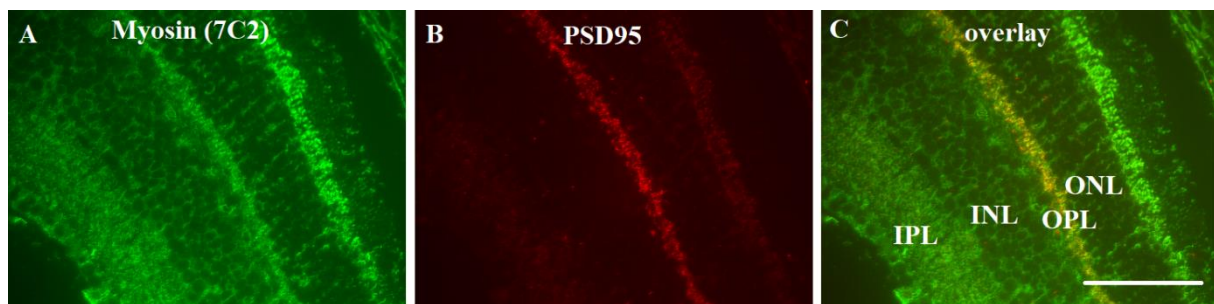


Abbildung 24: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-7C2 und Anti-postsynaptic-density(PSD)-95

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-7C2

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-PSD-95

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Es lässt sich eine Anreicherung an Myosinsignalen in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und inneren plexiformen Schicht (IPL) deutlich erkennen. Die Zuordnung zu den Synapsenschichten erfolgt über den Referenzantikörper Anti-PSD-95, welcher das PSD95 markiert. Dieses findet sich in der Präsynapse und da der Antikörper mit den Signalen des Antikörpers Anti-Myosin-7C2 kolokalisiert, ist davon auszugehen, dass sich Myosin-7C2 in den Synapsenschichten OPL und IPL finden lässt.

Negativkontrolle

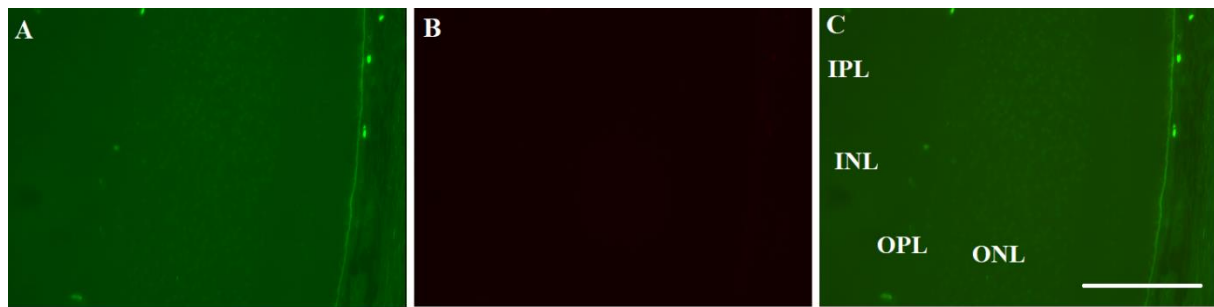


Abbildung 25: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 2000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 7000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

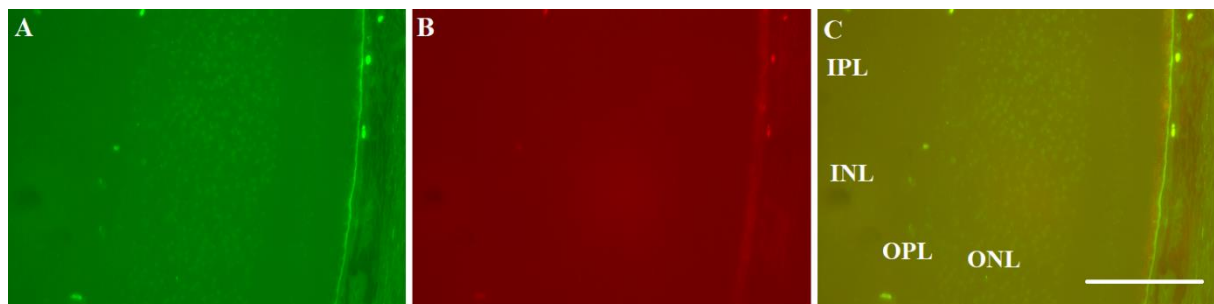


Abbildung 26: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 12000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 12000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen Negativkontrollen, die ohne Primärantikörper, nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurde, um unspezifische Hintergrundsignale zu erkennen. Die Negativkontrollen zeigen praktisch keinen Hintergrund, so dass die in Abbildung 24 beobachteten starken Signale in den Synapsenzellschichten keine Autofluoreszenz sind, sondern auf die Bindung des Primärantikörpers zurückzuführen sind.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

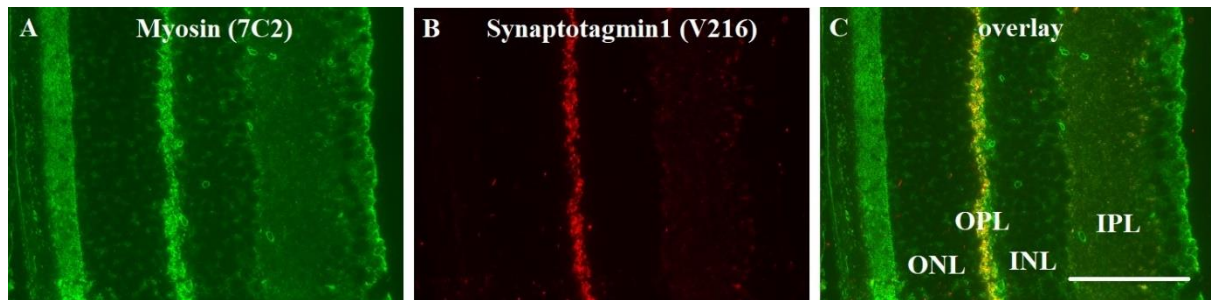


Abbildung 27: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-7C2 und Anti-Synaptotagmin-V216

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-7C2

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-Synaptotagmin-V216

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiforme layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, ONL: outer nuclear layer

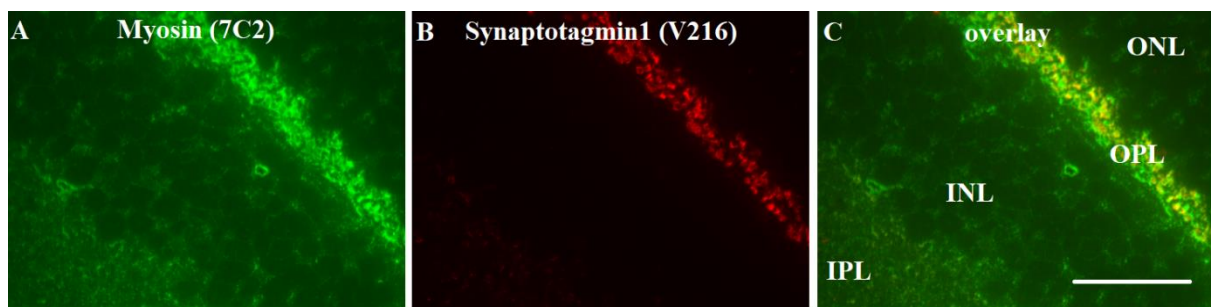


Abbildung 28 Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-7C2 und Anti-Synaptotagmin-V216

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-7C2

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-Synaptotagmin-V216

C: Overlay

Maßstab: 10 µm

IPL: inner plexiforme layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, ONL: outer nuclear layer

In der Doppel- und Einzelfluoreszenz zeigt Myosin-7C2 ein deutliches Expressionsmuster in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und inneren plexiformen Schicht (IPL). Die lokale Zuordnung gelang über den Referenzantikörper Anti-Synaptotagmin1-V216. Synaptotagmin1 ist ein präsynaptisches Vesikelprotein und markiert somit die präsynaptische Terminale. Da die Signale von Anti-Synaptotagmin1 und Anti-Myosin-7C2 eindeutig überlappen, lässt sich darauf schließen, dass Myosin-7C2 in den Synapsenzellschichten finden lässt. Diese Kolo-kalisation lässt sich in der Vergrößerungsaufnahme der OPL besonders gut erkennen.

Negativkontrolle

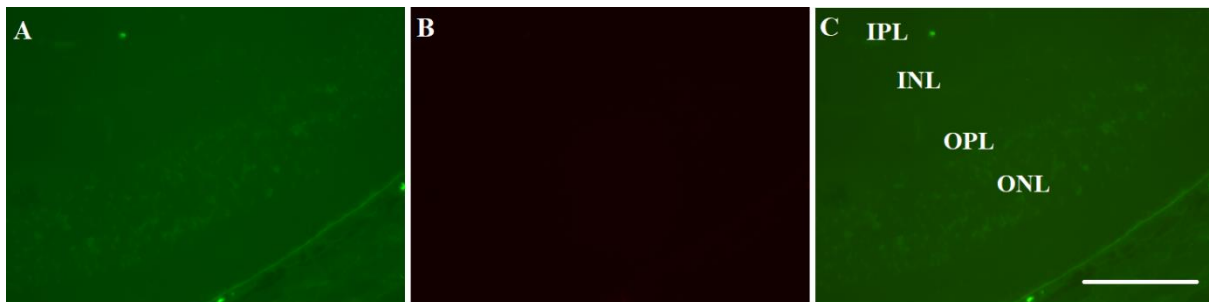


Abbildung 29: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 3000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 6000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer



Abbildung 30: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Bei den Abbildungen 29 und 30 handelt es sich um Negativkontrollen mit unterschiedlichen Belichtungszeiten. Um unspezifische Signale zu detektieren, wurden die Semidünnschnitte mit PBS und den Sekundärantikörpern, also ohne die Primärantikörper inkubiert. Wie erwartet, erkennt man in beiden Abbildungen lediglich unspezifische, schwache Signale, die auf die Autofluoreszenz des Gewebes zurückzuführen ist. Somit kann angenommen werden, dass die Signale in den Abbildungen 27 und 28 spezifisch für die Erstantikörper sind.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

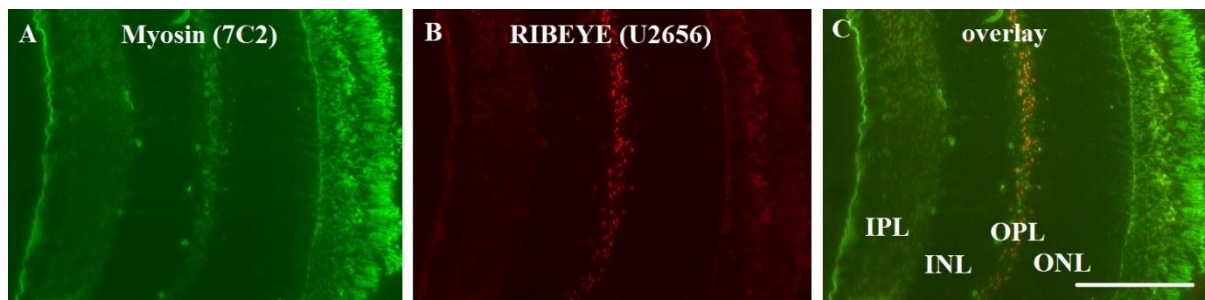


Abbildung 31: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-7C2 und Anti-RIBEYE-U2656

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-7C2

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-RIBEYE-U2656

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiforme layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, ONL: outer nuclear layer

In der Einzel- sowie Doppelfluoreszenz lässt sich ein im Vergleich zu den anderen Versuchen mit Myosinantikörpern ein leicht abgeschwächtes, aber noch deutliches Signal in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und der inneren plexiformen Schicht (OPL) detektieren. Als Referenz wurde RIBEYE, welches in der IPL und OPL vorkommt und mit den Myosinsignalen überlappt, mit dem Antikörper Anti-RIBEYE-U2656 verwendet. Da diese beiden Signale kolokalisieren, kann davon ausgegangen werden, dass Myosin den in Synapsenzellschichten OPL und IPL vorkommt.

Negativkontrolle



Abbildung 32: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 5000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 2000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 μ m
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

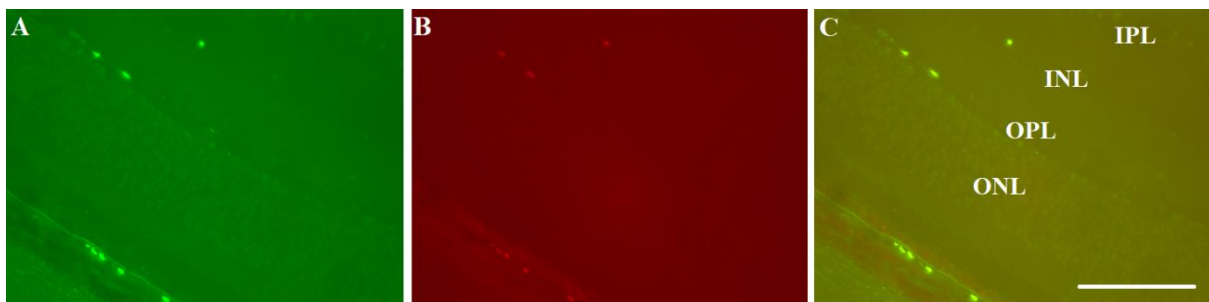


Abbildung 33: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 μ m
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

In diesen beiden Negativkontrollen (Abb. 32 und 33) wurden die Semidünnschnitte mit PBS und den Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586 inkubiert. Da auch in der Negativkontrolle mit der maximalen Belichtungszeit von 10 Sekunden nur geringe, unspezifische Signale zu erkennen sind, ist davon auszugehen, dass es sich bei o.g. Signalen um Anti-Myosin-2C6 und nicht etwa Autofluoreszenz des Gewebes handelt.

4.1.3 Lokalisationsergebnisse mit dem Myosin-IX-Antikörper (Klon 15H12)

Einzel- und Doppelfluoreszenz

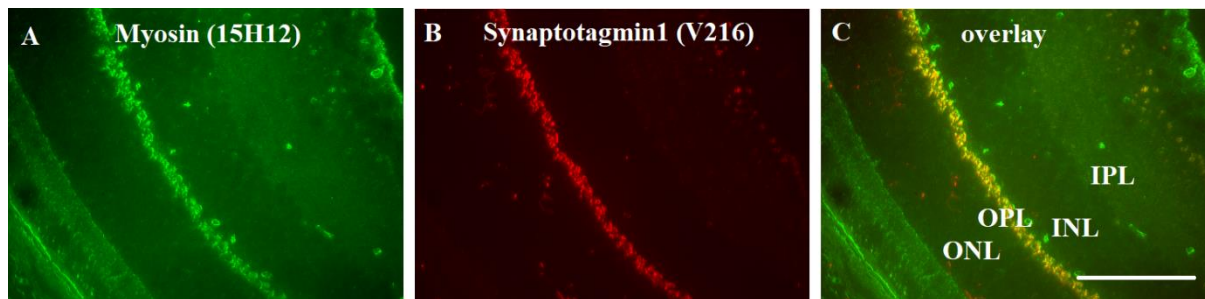


Abbildung 34: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-15H12 und Anti-Synaptotagmin-V216

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-15H12

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-Synaptotagmin-V216

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiforme layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, ONL: outer nuclear layer

Auf den Fluoreszenzbildern wird eine Anreicherung von Anti-Myosin-15H12 in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und inneren plexiformen Schicht (IPL) deutlich. Die lokale Zuordnung erfolgte über Anti-Synaptotagmin1, welches als Marker für Vesikelproteine in den Synapsen ist die präsynaptische Terminale in der Retina markiert. Diese Kolokalisation spricht dafür, dass die beiden zugehörigen Proteine sich in denselben Schichten, also den Synapsenzellschichten, finden lassen.

Negativkontrolle

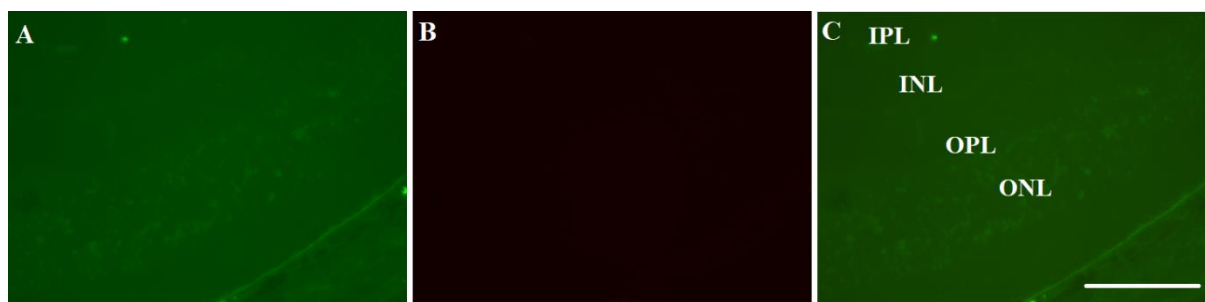


Abbildung 35: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 3000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 6000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer



Abbildung 36: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 μ m
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen Negativkontrollen, die mit den Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 568 sowie anschließend mit PBS benetzt und inkubiert worden sind, um unspezifische Hintergrundsignale zu erkennen. Die beiden Negativkontrollen zeigen praktisch keinen Hintergrund, sodass die in Abbildung 34 erkennbaren Signale in den Synapsenzellschichten nicht auf Autofluoreszenz beruhen, sondern auf der Bindung des Primärantikörpers.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

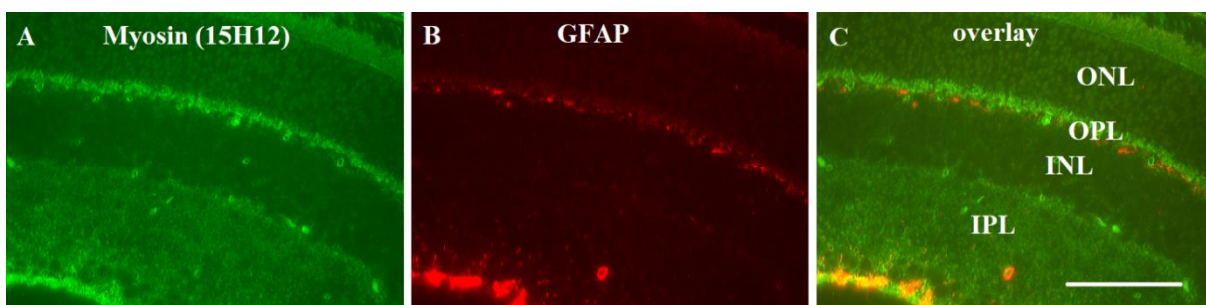


Abbildung 37: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-15H12 und Anti-saures Gliafaserprotein (GFAP)
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-15H12
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-GFAP
C: Overlay
Maßstab: 50 μ m
IPL: inner plexiforme layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, ONL: outer nuclear layer

Saures Gliafaserprotein, welches die Müller-Stützzellen, die Gliazellen der Retina, markiert, reichert sich an der Grenze zwischen der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und inneren plexiformen Schicht (INL) an. Da die Signale von Myosin-15H12 nicht mit den Signalen von anti-saures Gliafaserprotein (GFAP) kolokalisieren, ist davon auszugehen, dass Myosin-15H12 kein Bestandteil der retinalen Glia ist.

Negativkontrolle



Abbildung 38: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 8000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 6000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

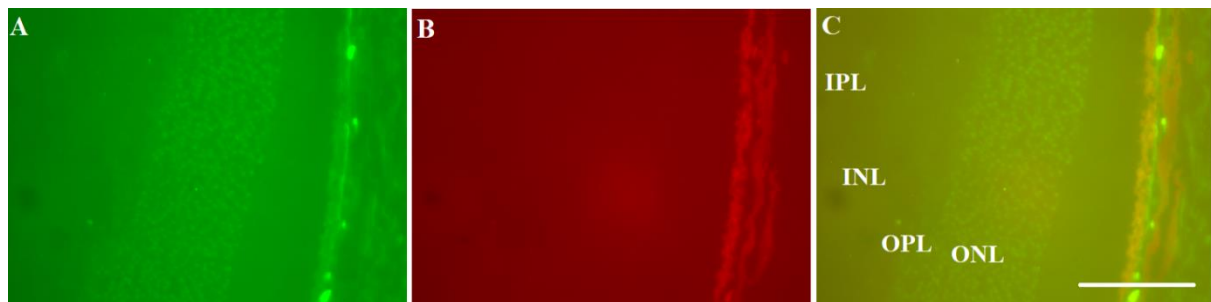


Abbildung 39: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 20000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 20000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die Abbildungen 38 und 39 zeigen Negativkontrollen mit Semidünnschnitten, die lediglich mit den Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit sowie PBS, aber ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Da keine Signale erkennbar sind, die über die

Autofluoreszenz des Retinagewebes hinausgehen, können wir davon ausgehen, dass die in Abbildung 37 gezeigten Signale auf der Bindung des Primärantikörpers beruhen und nicht etwa auf Autofluoreszenz.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

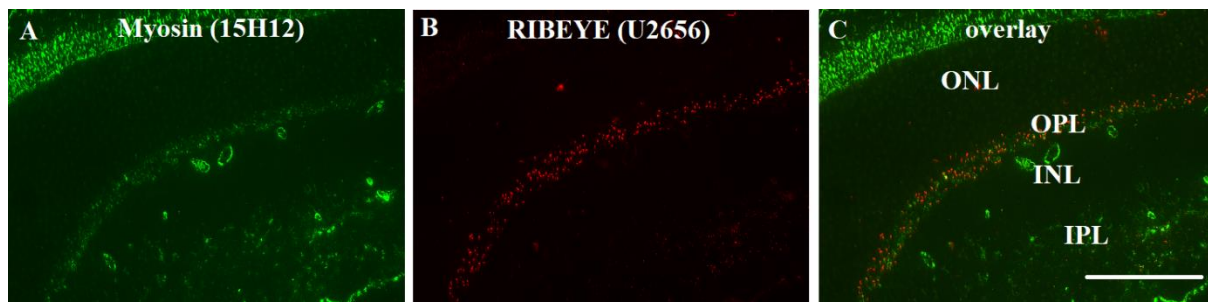


Abbildung 40: Semidünnschnitte Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-15H12 und Anti-RIBEYE-U2656

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-15H12

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-RIBEYE-U2656

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiforme layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, ONL: outer nuclear layer

Auf Abbildung 40 erkennt man das für anti-RIBEYE-U2656 typische Expressionsmuster in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und in der inneren plexiformen Schicht (IPL). Da diese Signale mit denen von anti-Myosin-15H12 kolokalisieren, ist davon auszugehen, dass sich Myosin-15H12 in den beiden Synapsenzellschichten befindet.

Negativkontrolle



Abbildung 41: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 5000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 2000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

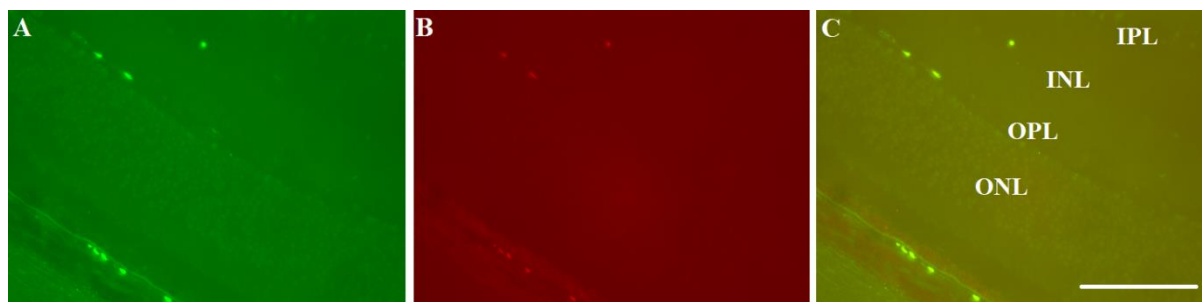


Abbildung 42: Negativkontrolle Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 μ m

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die beiden Negativkontrollen in Abbildung 41 und 42 zeigen geringe und unspezifische Signale, welche für die Autofluoreszenz des Retinagewebes typisch sind. Daher ist davon auszugehen, dass die in Abbildung 40 erkennbaren Signale nicht auf Autofluoreszenz des Gewebes basieren, sondern auf der spezifischen Bindung der Primärantikörper.

4.1.4 Lokalisationsergebnisse mit dem Myosin-IX-Antikörper (Klon 16B1)

Einzel- und Doppelfluoreszenz

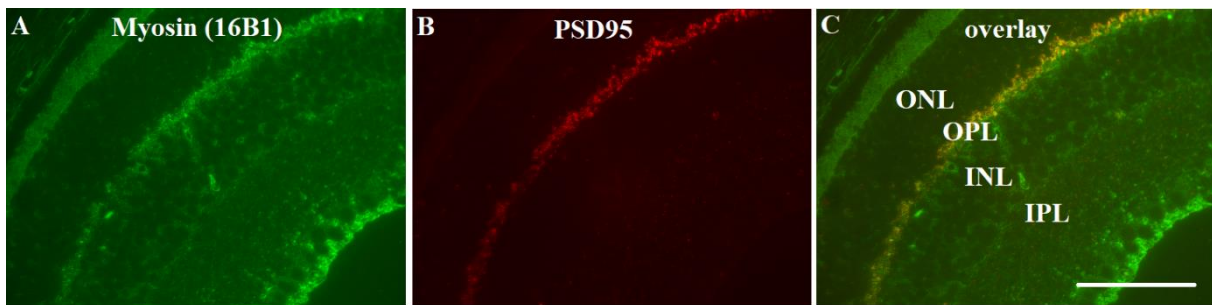


Abbildung 43: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-postsynaptic-density(PSD)-95

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-16B1

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-PSD-95

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

In der Einzel- und Doppelfluoreszenz zeigt sich eine Anreicherung der Signale von anti-Myosin-16B1 in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) sowie der inneren plexiformen Schicht (IPL). Diese Lokalisation zeigt sich relativ einfach im Vergleich mit dem Expressionsmuster vom Postsynaptischen Dichteprotein 95, welches die Präsynapse in den Synapsenzellschichten OPL und IPL markiert. Dies deutet auf eine präsynaptische Lokalisation von Myosin-16B1 hin.

Negativkontrolle

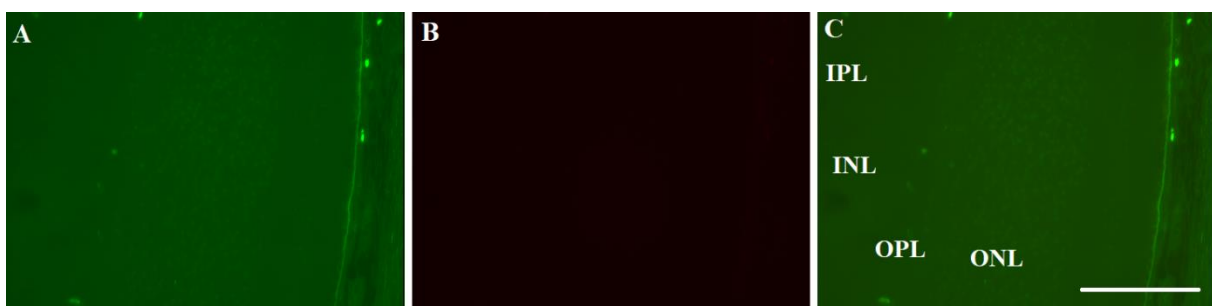


Abbildung 44: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation

und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 2000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 7000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer



Abbildung 45: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 12000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 12000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die Abbildungen 44 und 45 zeigen Negativkontrollen, die nur mit den Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse Alexa 488 beziehungsweise Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, aber dafür ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Dadurch lassen sich unspezifische Hintergrundsignale erkennen. Die beiden Negativkontrollen zeigen praktisch keinen Hintergrund, sodass die in Abbildung 43 erkennbaren Signale in den Synapsenzellschichten keine Autofluoreszenz zeigen, sondern auf der Bindung des Primärantikörpers beruhen.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

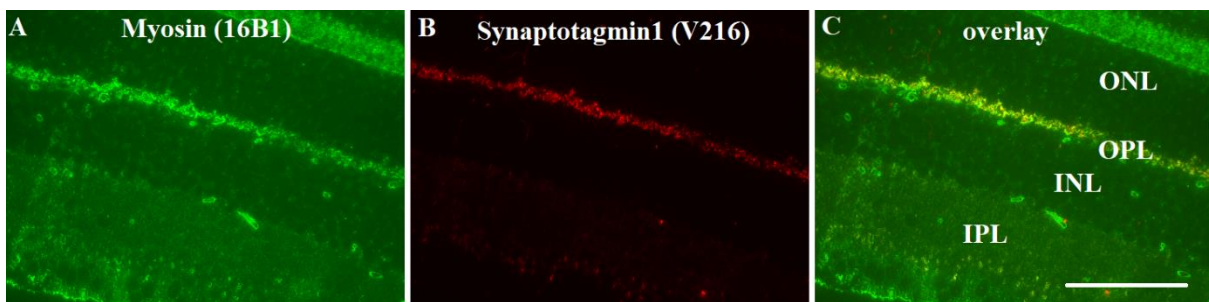


Abbildung 46: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-Synaptotagmin-V216
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-16B1
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, Anti-Synaptotagmin-V216
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiforme layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, ONL: outer nuclear layer

Die Signale von anti-Myosin-16B1 zeigt eine deutliche Anreicherung in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und der inneren plexiformen Schicht (IPL), welche im Overlay mit

den Signalen von anti-Synaptotagmin1-V216 kolokalisiert. Dieses stellt einen präsynaptischen Marker für Membranproteine der synaptischen Vesikel dar, wodurch ebenfalls eine präsynaptische Lokalisation von Myosin-16B1 suggeriert wird.

Negativkontrolle

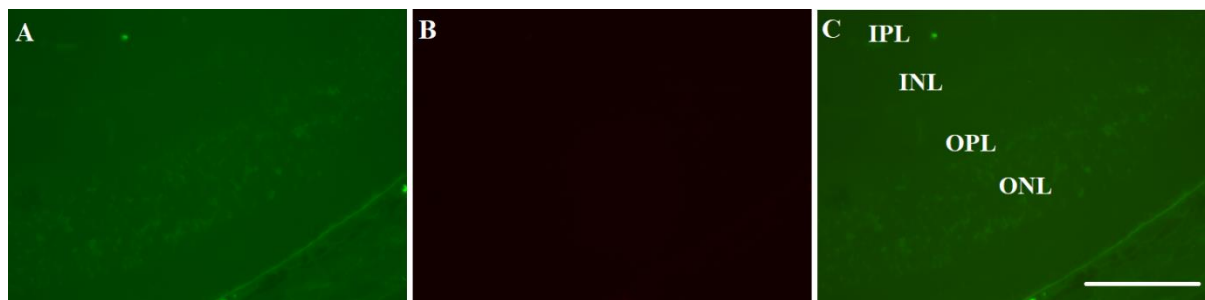


Abbildung 47: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 3000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 6000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer



Abbildung 48: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 586, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm
IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die beiden Negativkontrollen in Abbildung 47 und 48 zeigen Semidünnschnitte, die anstatt mit Primärantikörper mit PBS und anschließend mit den beiden Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586 inkubiert worden sind. Zu erkennen ist praktisch kein Hintergrund, sondern nur Signale, die gut mit der Autofluoreszenz des Retinagewebes vereinbar sind. Somit ist davon auszugehen, dass die Signale, die in Abbildung 46 zu sehen sind, keine Autofluoreszenz zeigen, sondern die spezifische Bindung des

Primärantikörpers mit dem gegen ihn gerichteten Peptid in der Schwanzregion des Proteins Myosin-16B1.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

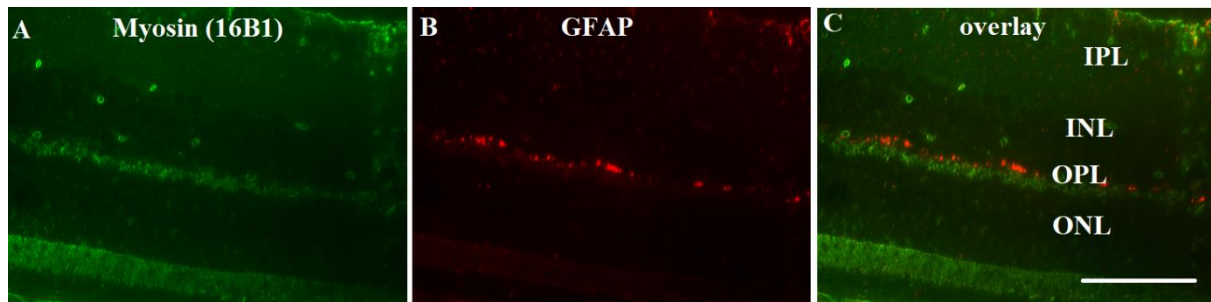


Abbildung 49: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-saures Gliafaserprotein (GFAP)

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-16B1

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-GFAP

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Der Marker saures Gliafaserprotein markiert die Müller-Stützzellen in der Retina, welche sich zwischen der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und inneren Körnerschicht (INL) aufhalten. Auf der Abbildung 46 ist im Overlay eindeutig zu erkennen, dass die Signale von anti-Myosin-16B1 und anti-saures Gliafaserprotein nicht kolokalisieren. Somit können wir davon ausgehen, dass Myosin-16B1 kein Bestandteil der retinalen Glia ist.

Negativkontrolle



Abbildung 49: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 8000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 6000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

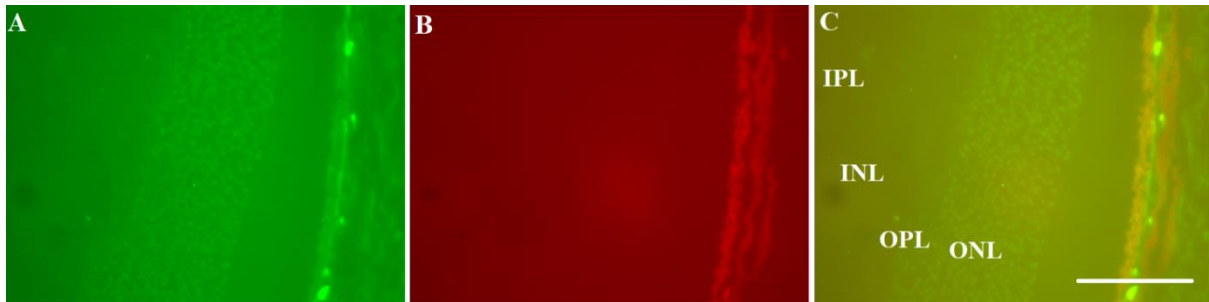


Abbildung 51: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 20000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 20000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

Die beiden Abbildungen 50 und 51 zeigen Negativkontrollen, die mit PBS und Sekundärantikörper, also ohne Primärantikörper inkubiert worden sind, um Hintergrundsignale zu detektieren. Die Negativkontrollen zeigen de facto keinen Hintergrund, sodass die in Abbildung 49 beobachteten Signale in den beiden Synapsenschichten nicht als Autofluoreszenz zu bewerten sind, sondern auf der Bindung des Primärantikörpers beruhen.

Einzel- und Doppelfluoreszenz

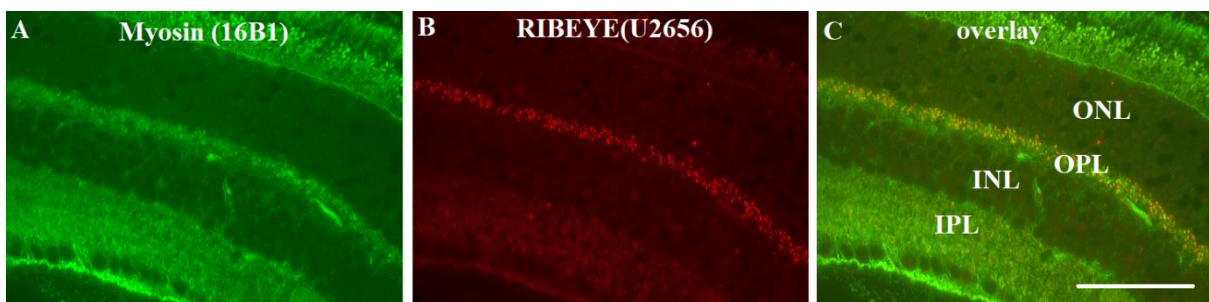


Abbildung 50: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-RIBEYE-U2656

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-16B1

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-RIBEYE-U2656

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

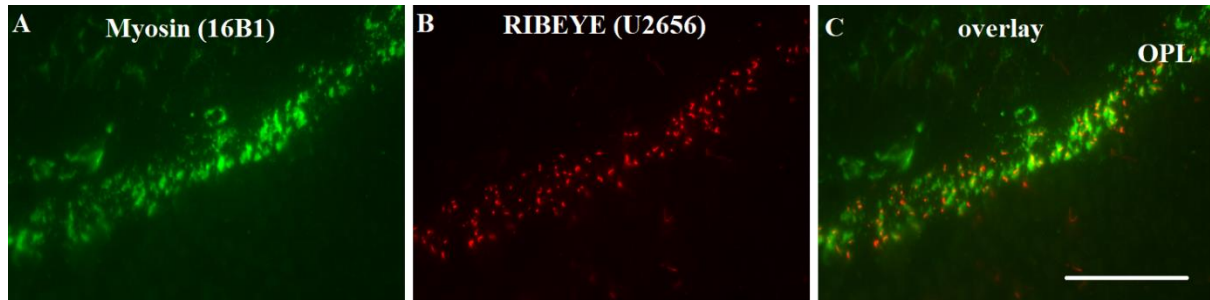


Abbildung 53: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-RIBEYE-U2656

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, Anti-Myosin-16B1

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, Anti-RIBEYE-U2656

C: Overlay

Maßstab: 10 µm

OPL: outer plexiforme layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiforme layer, ONL: outer nuclear layer

Anti-RIBEYE markiert charakteristischerweise die Ribbons in den Synapsenzellschichten. Die Signale des gegen ein Peptid aus der Schwanzregion von Myosin-IX gerichteten Antikörpers anti-Myosin-16B1 zeigt ein Expressionsmuster, dass sich ebenfalls in der inneren plexiformen Schicht (IPL) und der äußeren plexiformen Schicht (OPL) anreichert. Wie auf Abbildung 52 gut zu erkennen ist, kolokalisieren diese beiden Signale. Diese Anreicherung zeigt sich ebenfalls in der Vergrößerungsaufnahme in Abbildung 53 sehr gut.

Negativkontrolle



Abbildung 51: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit-Alexa 586

A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 5000 ms

B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 2000 ms

C: Overlay

Maßstab: 50 µm

IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer

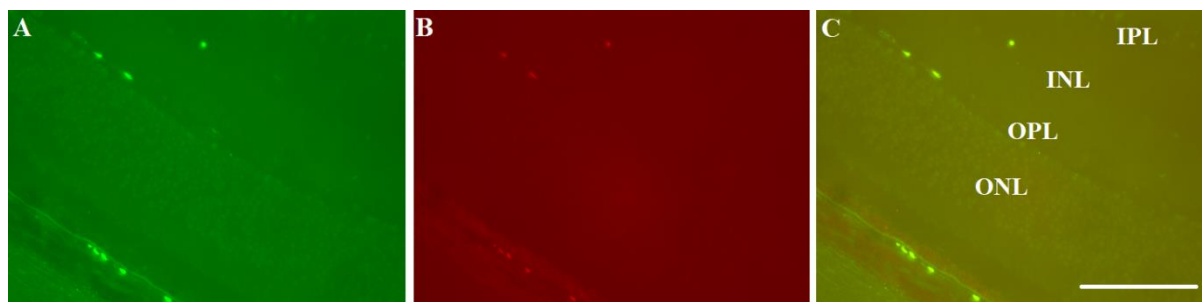


Abbildung 52: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586
A: Chicken-anti-Mouse Alexa 488, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
B: Donkey-anti-Rabbit Alexa 568, PBS, Belichtungszeit: 10000 ms
C: Overlay
Maßstab: 50 µm

In den beiden Abbildungen 54 und 55 sind Semidünnschnitte zu sehen, bei denen Retinagewebe mit PBS und den Sekundärantikörpern Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 568 inkubiert wurden. Die Negativkontrollen zeigen praktisch nur geringe, unspezifische Hintergrundsignale, die der für die Retinagewebe typische Autofluoreszenz entspricht. Somit ist davon auszugehen, dass die auf Abbildung 52 und 53 detektierten Signale auf der Bindung des Primärantikörpers beruhen und nicht etwa auf Autofluoreszenz.

4.2 Western Blot

Wie bereits im Kapitel 3. Material und Methoden beschrieben, ist es mithilfe des Western Blots möglich, Proteine sowohl nachzuweisen als auch ihr Molekulargewicht zu bestimmen. Um dies an den Myosinproteinen durchzuführen, wurde eine Rinderretina präpariert, in Laemmli-SDS-Probenpuffer aufgenommen und für Western Blot Untersuchungen aufgearbeitet. Als Referenzprotein wurde das in der AG Schmitz als Standard etablierte Protein Anti-RIBEYE (2D9) verwendet, um so zum einen zu überprüfen, ob der Versuch fachgerecht durchgeführt wurde und zum anderen, um eine Orientierung anhand der Proteingrößen zur Verfügung zu haben.

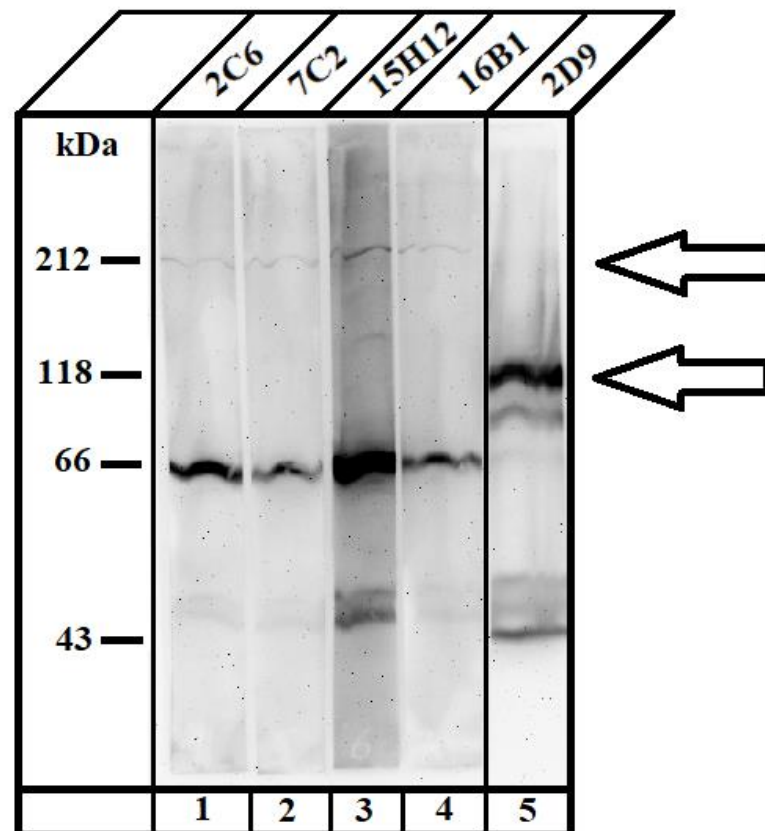


Abbildung 53: Western Blot Retina Rind mit den vier Myosinsubtypen und Anti-RIBEYE (2D9)

- 1) Sichtbare Banden bei 212 und 66 kDa bei Anti-Myosin (2C6): full-length Myosin-IX Bande
- 2) Sichtbare Banden bei 212 und 66 kDa bei Anti-Myosin (7C2): full-length Myosin-IX Bande
- 3) Sichtbare Banden bei 212 und 66 kDa bei Anti-Myosin (15H12): full-length Myosin-IX Bande
- 4) Sichtbare Banden bei 212 und 66 kDa bei Anti-Myosin (16B1): full-length Myosin-IX Bande
- 5) Sichtbare Banden bei 118 und 43 kDa bei Anti-RIBEYE (2D9)

5 Diskussion

Mithilfe der Immunfluoreszenz konnte ich mit Hilfe verschiedener Antikörper (nämlich durch die unabhängigen Klone 2C6, 7C2, 15H12 und 16B1) übereinstimmend nachweisen, dass Myosin-IX in den Synapsenzellschichten der Retina, insbesondere in den Photorezeptorsynapsen der äußeren plexiformen Schicht, angereichert ist. Aber auch in den Synapsen der inneren plexiformen Schicht ist Myosin-IX vorhanden, wie meine Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten. Die Bestimmung der genauen Lokalisation von Myosin-IX in der Retina erfolgte durch Doppelimmunfluoreszenzen. Dabei wurden Antikörper gegen RIBEYE (U2656), Anti-saures Gliafaserprotein, Anti-Postsynaptisches-Dichteprotein-95 und Anti-Synaptotagmin1 (V216) eingesetzt, deren Lokalisation bereits vorher sehr gut bekannt waren. Dabei imponierten die Signale von RIBEYE als charakteristische, hufeisenförmige Signale in der OPL und etwas rarefizierter in der IPL, zu deren unmittelbarer Nähe sich die Myosinsignale lokalisieren lassen konnten.

In den Doppelfluoreszenzaufnahmen mit den Antikörpern Anti-RIBEYE (U2656), Anti-Postsynaptisches-Dichteprotein-95 und Anti-Synaptotagmin1 (V216) war eine deutliche Überlappung der jeweiligen Signale mit den Myosin-Subtypen zu erkennen. Somit erfolgt die Bestätigung, dass sich die Myosine IX tatsächlich in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und inneren plexiformen Schicht (IPL) lokalisieren lassen. Diese Befunde wurden übereinstimmend mit allen verschiedenen Myosin-IX Antikörpern erhoben, nämlich 2C6, 7C2, 15H12 und 16B1. Da alle 4 verschiedenen monoklonale Antikörper gegen Myosin-IX sehr ähnliche Verteilungsmuster in der Retina zeigen, sind die Befunde sehr sicher und valide.

Mit dem Western Blot konnte ich nachweisen, dass sich die Myosin-IX-Subtypen in der Tat in der Retina vorkommen. Es konnte das Voll-Längenprotein Myosin-IX sowie einige Bruchstücke des Proteins nachgewiesen werden. Außerdem konnte ich etwaige Kreuzreaktionen mit dem Protein RIBEYE ausschließen. Die Banden bei 212 und 66 kDa lassen darauf schließen, dass Myosin-IX-2C6, -7C2, -15H12 und -16B1 sehr große Proteine sind, die während des Aufarbeitungsprozesses vermutlich partiell degradiert werden.

Wie bereits im Kapitel „Myosin-IX“ beschrieben, handelt es bei Myosin-IX um ein unkonventionelles Myosin, da es im Gegensatz zu Myosin II keine Muskelkontraktion generiert, sondern für intrazelluläre Bewegungen sorgt. Die Synapsen, in denen Myosin-IX angereichert ist, sind vorzugsweise Ribbonsynapsen, die durch einen besonders intensiven

Membrantransport charakterisiert sind, da diese Synapsen kontinuierlich aktiv sind (Moser et al., 2020). Ribbonsynapsen besitzen eine besonders hohe Aktivität in exozytotischen und endozytotischen Membranprozessen.

Um die intensiven Membrantransportprozesse aufrecht erhalten zu können, könnten Motorproteine wie Myosin-IX eine wichtige Rolle spielen. Dafür könnte insbesondere auch die Ca^{2+} /Calmodulin-Bindungsstelle von Myosin-IX von Bedeutung sein, da viele Prozesse in der Synapse durch intrazelluläres Ca^{2+} gesteuert werden. Dazu gehören neben der Exozytose und Endozytose auch die Rekrutierung von synaptischen Vesikeln zu den Freisetzungstellen. In diesem Zusammenhang könnte auch die RhoGAP-Domäne eine wichtige Rolle spielen, da sie eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts unterstützt, die für die Exozytose synaptischer Vesikel förderlich ist (Luo, 2002; Omelchenko, 2012). Für die weitere Analyse der Funktion von Myosin-IX in der Ribbonsynapse wäre die ultrastrukturelle Lokalisationsanalyse mittels Immunelektronenmikroskopie von Nutzen. Die immunelektronenmikroskopische Analyse könnte mit den Antikörpern durchgeführt werden, die in vorliegender Dissertationsarbeit für die dargestellten lichtmikroskopische Immunlokalisationstechniken eingesetzt wurden.

6 Literatur

- Abouhamed, M., Grobe, K., San, I.V.L.C., Thelen, S., Honnert, U., Balda, M.S., Matter, K., Bähler, M., 2009. Myosin-IXa regulates epithelial differentiation and its deficiency results in hydrocephalus. *Mol Biol Cell* 20, 5074–5085. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0291>
- Asteriti, S., Grillner, S., Cangiano, L., 2015. A Cambrian origin for vertebrate rods. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07166>
- Boycott, B.B., Wässle, H., 1991. Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur J Neurosci* 3, 1069–1088. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00043.x>
- Brown, M.E., Bridgman, P.C., 2004. Myosin function in nervous and sensory systems. *J Neurobiol* 58, 118–130. <https://doi.org/10.1002/neu.10285>
- Dacey, D.M., Lee, B.B., 1994. The “blue-on” opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature* 367, 731–735. <https://doi.org/10.1038/367731a0>
- DeBello, W.M., Betz, H., Augustine, G.J., 1993. Synaptotagmin and neurotransmitter release. *Cell* 74, 947–950. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90716-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90716-4)
- Dembla, M., Kesharwani, A., Natarajan, S., Fecher-Trost, C., Fairless, R., Williams, S.K., Flockerzi, V., Diem, R., Schwarz, K., Schmitz, F., 2018. Early auto-immune targeting of photoreceptor ribbon synapses in mouse models of multiple sclerosis. *EMBO Mol Med* 10. <https://doi.org/10.15252/emmm.201808926>
- Dowling, 1987. *The Retina*.
- Drenckhahn, D., Franz, H., 1986. Identification of actin-, alpha-actinin-, and vinculin-containing plaques at the lateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 102, 1843–1852. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.5.1843>
- Foth, B.J., Goedecke, M.C., Soldati, D., 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3681–3686. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506307103>
- Gorman, S.W., Haider, N.B., Grieshammer, U., Swiderski, R.E., Kim, E., Welch, J.W., Searby, C., Leng, S., Carmi, R., Sheffield, V.C., Duhl, D.M., 1999. The cloning and developmental expression of unconventional Myosin-IXA (MYO9A) a gene in the Bardet-Biedl syndrome (BBS4) region at chromosome 15q22-q23. *Genomics* 59, 150–160. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5867>
- Hanley, P.J., Vollmer, V., Bähler, M., 2020. Class IX Myosins: Motorized RhoGAP Signaling Molecules. *Adv Exp Med Biol* 1239, 381–389. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38062-5_16
- Hartveit, E., Veruki, M.L., 2012. Electrical synapses between AII amacrine cells in the retina: Function and modulation. *Brain Res* 1487, 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.05.060>
- Heidelberger, R., Matthews, G., 1992. Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J Physiol* 447, 235–256. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019000>
- Jeon, C.J., Strettoi, E., Masland, R.H., 1998a. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18, 8936–8946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08936.1998>
- Jeon, C.J., Strettoi, E., Masland, R.H., 1998b. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18, 8936–8946. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08936.1998>
- Kollmar, M., Mühlhausen, S., 2017. Myosin repertoire expansion coincides with eukaryotic diversification in the Mesoproterozoic era. *BMC Evol Biol* 17, 211. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1056-2>

- Koulen, P., Fletcher, E.L., Craven, S.E., Brecht, D.S., Wässle, H., 1998. Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. *J Neurosci* 18, 10136–10149. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-23-10136.1998>
- Kouyama, N., Marshak, D.W., 1992. Bipolar cells specific for blue cones in the macaque retina. *J Neurosci* 12, 1233–1252. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-04-01233.1992>
- Krendel, M., Mooseker, M.S., 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* 20, 239–251. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2005>
- Luo, L., 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 601–635. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.18.031802.150501>
- Masland, R.H., 2001a. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4, 877–886. <https://doi.org/10.1038/nn0901-877>
- Masland, R.H., 2001b. Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 11, 431–436. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00230-0](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00230-0)
- Masters, T.A., Kendrick-Jones, J., Buss, F., 2017. Myosins: Domain Organisation, Motor Properties, Physiological Roles and Cellular Functions. *Handb Exp Pharmacol* 235, 77–122. https://doi.org/10.1007/164_2016_29
- Matthews, G., Fuchs, P., 2010. The diverse roles of ribbon synapses in sensory neurotransmission. *Nat Rev Neurosci* 11, 812–822. <https://doi.org/10.1038/nrn2924>
- Morshedian, A., Fain, G.L., 2017. The evolution of rod photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0074>
- Morshedian, A., Fain, G.L., 2015. Single-photon sensitivity of lamprey rods with cone-like outer segments. *Curr Biol* 25, 484–487. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.031>
- Moser, T., Grabner, C.P., Schmitz, F., 2020. Sensory Processing at Ribbon Synapses in the Retina and the Cochlea. *Physiol Rev* 100, 103–144. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2018>
- Nawy, S., Jahr, C.E., 1990. Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature* 346, 269–271. <https://doi.org/10.1038/346269a0>
- O'Connor, E., Phan, V., Cordts, I., Cairns, G., Hettwer, S., Cox, D., Lochmüller, H., Roos, A., 2018. MYO9A deficiency in motor neurons is associated with reduced neuromuscular agrin secretion. *Hum Mol Genet* 27, 1434–1446. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy054>
- O'Connor, E., Töpf, A., Müller, J.S., Cox, D., Evangelista, T., Colomer, J., Abicht, A., Senderek, J., Hasselmann, O., Yaramis, A., Laval, S.H., Lochmüller, H., 2016. Identification of mutations in the MYO9A gene in patients with congenital myasthenic syndrome. *Brain* 139, 2143–2153. <https://doi.org/10.1093/brain/aww130>
- Omelchenko, T., 2012. Regulation of collective cell migration by RhoGAP Myosin-IXA. *Small GTPases* 3, 213–218. <https://doi.org/10.4161/sgtp.20495>
- Omelchenko, T., Hall, A., 2012. Myosin-IXA regulates collective epithelial cell migration by targeting RhoGAP activity to cell-cell junctions. *Curr Biol* 22, 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.014>
- Renate Lüllmann-Rauch; Esther Asan, 2019. *Histologie*, 8th ed. Thieme Verlag.
- Schmitz, F., 2009. The making of synaptic ribbons: how they are built and what they do. *Neuroscientist* 15, 611–624. <https://doi.org/10.1177/1073858409340253>
- 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* 28, 857–872. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00159-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00159-8)
- Shekhar, K., Lapan, S.W., Whitney, I.E., Tran, N.M., Macosko, E.Z., Kowalczyk, M., Adiconis, X., Levin, J.Z., Nemesh, J., Goldman, M., McCarroll, S.A., Cepko, C.L., Regev, A., Sanes, J.R., 2016. Comprehensive Classification of Retinal Bipolar

- Neurons by Single-Cell Transcriptomics. *Cell* 166, 1308-1323.e30.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.054>
- SJOSTRAND, 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. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(58\)90050-9](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(58)90050-9)
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E., 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318–324. <https://doi.org/10.1038/362318a0>
- Sterling, P., Matthews, G., 2005. Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci* 28, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.009>
- Strettoi, E., Masland, R.H., 1995. The organization of the inner nuclear layer of the rabbit retina. *J Neurosci* 15, 875–888. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00875.1995>
- Tran, N.M., Shekhar, K., Whitney, I.E., Jacobi, A., Benhar, I., Hong, G., Yan, W., Adiconis, X., Arnold, M.E., Lee, J.M., Levin, J.Z., Lin, D., Wang, C., Lieber, C.M., Regev, A., He, Z., Sanes, J.R., 2019. Single-Cell Profiles of Retinal Ganglion Cells Differing in Resilience to Injury Reveal Neuroprotective Genes. *Neuron* 104, 1039-1055.e12.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.006>
- Ulrich Welsch, 2018. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie*, 5th ed. Elsevier, München.
- Wahl, S., Katiyar, R., Schmitz, F., 2013. A local, periactive zone endocytic machinery at photoreceptor synapses in close vicinity to synaptic ribbons. *J Neurosci* 33, 10278–10300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5048-12.2013>
- Yamagata, M., Yan, W., Sanes, J.R., 2021. A cell atlas of the chick retina based on single-cell transcriptomics. *Elife* 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.63907>
- Yoon, T.-Y., Munson, M., 2018. SNARE complex assembly and disassembly. *Curr Biol* 28, R397–R401. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.005>

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : makroskopische Anatomie des Bulbus oculi	5
Abbildung 2: Aufbau der Retina	7
Abbildung 3: schematische Darstellung der Photorezeptorzellen.....	10
Abbildung 4: Aufbau der Stäbchenzelle	14
Abbildung 5: Phototransduktion	15
Abbildung 6: schematische Darstellung einer Ribbonsynapse. Ansicht von transversal (a) und seitlich (b). Das synaptische Ribbon (dunkelrot) hält viele Vesikel (gelb). Somit werden die Informationen sehr schnell und effektiv von der Photorezeptorzelle (grau) zur Horizontalzelle (H) übertragen; B: Bipolarzelle;.....	20
Abbildung 7: schematische Darstellung des RIBEYE-Proteins; aus (Moser et al., 2020)	22
Abbildung 8: schematische Darstellung des molekularen Kontraktionszyklus	24
Abbildung 9: Myosine I, II und V (Abbildung aus Histologie, 2018; <i>VIII. Auflage, Thieme Verlag</i>).....	25
Abbildung 10: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-2C6 und Antipostsynaptic-density(PSD)-95.....	39
Abbildung 11: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-2C6 und Antipostsynaptic-density(PSD)-95.....	39
Abbildung 12: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	40
Abbildung 13: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	40
Abbildung 14 : Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Myosin-2C6 und Anti-Synaptotagmin-V216	41
Abbildung 15: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-2C6 und Anti-Synaptotagmin-V216	41
Abbildung 16: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	42
Abbildung 17: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	42
Abbildung 18: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-2C6 und Anti-Saures Gliafaserprotein (GFAP)	43
Abbildung 19: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	43
Abbildung 20: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	44
Abbildung 21: Semidünnschnitte Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti- Myosin-2C6 und Anti-RIBEYE-U2656.....	44

Abbildung 22: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	45
Abbildung 23: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	45
Abbildung 24: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-7C2 und Antipostsynaptic-density(PSD)-95.....	46
Abbildung 25: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	47
Abbildung 26: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	47
Abbildung 27: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-7C2 und Anti-Synaptotagmin-V216	48
Abbildung 28 Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-7C2 und Anti-Synaptotagmin-V216	48
Abbildung 29: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	49
Abbildung 30: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	49
Abbildung 31: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-7C2 und Anti-RIBEYE-U2656	50
Abbildung 32: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	51
Abbildung 33: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	51
Abbildung 34: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-15H12 und Anti-Synaptotagmin-V216.....	52
Abbildung 35: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	52
Abbildung 36: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	53
Abbildung 37: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-15H12 und Anti-saures Gliafaserprotein (GFAP).....	53
Abbildung 38: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Alexa 586	54
Abbildung 39: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	54

Abbildung 40: Semidünnschnitte Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-15H12 und Anti-RIBEYE-U2656.....	56
Abbildung 41: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	56
Abbildung 42: Negativkontrolle Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	57
Abbildung 43: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-postsynaptic-density(PSD)-95	58
Abbildung 44: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	58
Abbildung 45: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	59
Abbildung 46: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-Synaptotagmin-V216.....	59
Abbildung 47: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	60
Abbildung 48: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	60
Abbildung 49: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-saures Gliafaserprotein (GFAP).....	61
Abbildung 50: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	61
Abbildung 51: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	62
Abbildung 52: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-RIBEYE-U2656.....	62
Abbildung 53: Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz Anti-Myosin-16B1 und Anti-RIBEYE-U2656.....	63
Abbildung 54: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit-Alexa 586	63
Abbildung 55: Negativkontrolle. Semidünnschnitt Retina Maus; Doppelfluoreszenz mit PBS-Inkubation und anschließender Inkubation mit Chicken-anti-Mouse Alexa 488 und Donkey-anti-Rabbit Alexa 586	65
Abbildung 56: Western Blot Retina Rind mit den vier Myosinsubtypen und Anti-RIBEYE (2D9)	66

8 Danksagung

Ich möchte mich am meisten bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Frank Schmitz für die Möglichkeit einer Promotion und die exzellente Betreuung danken. Zu jeder Zeit unterstützte er mich sowohl im Labor als auch in fachlichen Fragen und dadurch fiel es mir viel leichter, meinen Zugang in das wissenschaftliche Arbeiten hineinzufinden.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Karin Schwarz, Frau Dr. rer. nat. Ekta Dembla und Herrn Dr. rer. nat. Mayur Dembla für die kompetente und freundliche Betreuung im Labor. Durch ihr unglaublich umfangreiches fachliches Wissen konnten sie mir in meiner Arbeit viel weiterhelfen, was ich sehr zu schätzen weiß.

Des Weiteren möchte ich meinen Dank aussprechen an Dr. rer. nat. Ajay Kesharwani, der mir bei der komplexen Handhabung des Mikroskops geholfen hat.

Auch möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Amrita Mukherjee, Dr. rer. nat. Shweta Suiwal, Swarnali Kundu und Shankwar, Dr. Soni Shankwar für die freundliche und fachlich kompetente Einweisung in handwerkliche Labortätigkeiten bedanken. Ohne ihre Einweisungen wäre es mir sehr schwergefallen, die einzelnen Schritte fachgerecht durchzuführen.

Zusätzlich gilt mein Dank Gabriele Kiefer und Sabine Schmidt, die die Präparate für die Experimente anfertigten und mir in laborbezogenen Fragen stets zu Seite standen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Lerngruppe Arne Felbel, Tabea Reckner und Philipp Preukschas, die mich stets moralisch unterstützen und motivierten.

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

