

Einfluss funktionsloser Photorezeptoren auf die Anatomie der Retina:

Eine licht- und elektronenmikroskopische Studie

an der

CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus

Dissertation zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ellen Claes

Ellen Claes

geboren in Münster (Westf.)

Würzburg 2003

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Scheer

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Johann Helmut Brandstätter

2. Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Entwicklung des Auges	1
1.2	Aufbau der Retina - Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und Synapsen beim Sehvorgang	2
	Abbildung 1: Vertikalansicht der Säuger-Retina	3
1.3	Ultrastrukturelle Untersuchungen deckten anatomische Unterschiede zwischen Stäbchen und Zapfen auf	5
1.4	Synapsen der Retina: Band- und konventionell-chemische Synapsen	5
1.5	Neurotransmitter-Rezeptoren in der Retina: Klassifizierung und Verteilung	6
	Abbildung 2: Retina-Montage	7
1.6	Die Sehpigmente der Lichtsensoren	8
1.7	Expression und Verteilung der Zapfen-Opsine in der Retina der Maus	9
1.8	Morphologische und funktionelle Beurteilung einer Netzhaut ohne bzw. mit funktionslosen Photorezeptoren	9
1.9	Elektroretinogramme (ERGs) der Doppelmutanten $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ und der Einzelmutanten $CNGA3^{-/-}$ und $Rho^{-/-}$ im Vergleich zur Wildtyp-Maus:	12
	Abbildung 3: Skotopische Elektroretinogramme (ERGs)	13
1.10	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Materialien	14
2.1	Verwendete Lösungen für die Lichtmikroskopie	14
	Tabelle 1: Lösungen für die Lichtmikroskopie	14
2.2	Verwendete Lösungen für die Elektronenmikroskopie	14
	Tabelle 2: Lösungen für die Elektronenmikroskopie	14
2.3	Verwendete Chemikalien und Bezugsfirmen	14
	Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Bezugsfirmen	14
2.4	Verwendete Primär-Antikörper	15
	Tabelle 4: Verwendete Primär-Antikörper mit Angaben zur Spezies, Quelle und Verdünnung	15
2.5	Verwendete Sekundär-Antikörper	18
	Tabelle 5: Fluoreszenzgekoppelte Sekundär-Antikörper	18

2.6	Geräte und sonstige technische Hilfsmittel	19
	Tabelle 6: Geräte und sonstige technische Hilfsmittel	19
2.7	Mausstämme	19
3.	Methoden	20
3.1	Versuchstiere	20
3.2	Präparation des Auges und Markierung der Dorso-Ventralachse der Netzhaut	20
3.3	Fixierungsbedingungen der Netzhaut	21
	Abbildung 4: GlyRα1-Färbung auf Vertikalschnitten der Maus-Retina	22
3.4	Histochemische Methoden	22
3.4.1	Immunhistochemie	22
3.4.1.1	Vorbereitung und Herstellung von Gefrierschnitten für die lichtmikroskopische Untersuchung	22
3.4.1.2	Immunhistochemische Einzel-, Doppel- wie Dreifach-Färbungen für lichtmikroskopische Analysen an vertikalen Gefrierschnitten	23
3.4.1.3	Immunhistochemische Färbungen bei Gesamt-Retina-Aufsichtpräparaten	24
3.4.1.4	Nutzung verschiedener Mikroskope zur anatomischen Analyse-Konfokale Licht-Mikroskopie für die quantitative Analyse	24
3.5	Elektronenmikroskopische Methoden	25
3.5.1	Transmissionselektronenmikroskopie	25
3.5.2	Fixierungsbedingungen und Herstellung von Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopische Untersuchung	25
4.	Ergebnisse	27
	Abbildung 5: Phänotypisierung der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus	28
4.1	Photorezeptordegeneration führt zur Akkumulation des fibrillären Gliaproteins in den Müllerzellen	28
	Abbildung 6: GFAP-Immunoreaktivität	29
4.2	Degenerationsverlauf der Photorezeptoren	29
	Abbildung 7: Photorezeptor-Degenerationsverlauf der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im Vergleich zum wt	30
	Abbildung 8: Schichtung der CNGA3^{-/-} - und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} -Retinae im Vergleich zur Wildtyp-Retina	30

4.3	Arretierte Kernwanderung der Zapfen in der frühen postnatalen Entwicklung und strukturelle Plastizität der Zapfenendfüßchen	31
	Abbildung 9: Photorezeptorkernwanderung in der frühen postnatalen Entwicklung	32
	Abbildung 10: Ausbildung vergrößerter Zapfenendfüße in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} und der CNGA3^{-/-} Maus	33
4.4	Beschleunigter Degenerationsverlauf von Zapfen auf der ventralen gegenüber der dorsalen Retinaseite: Beobachtungen in der Einzelmutante CNGA3 ^{-/-}	33
	Abbildung 11: Degenerationsverlauf der Zapfen über der Dorso-Ventralachse bei der CNGA3^{-/-} Einzelmutante im Alter von Pm5	34
4.5	Auswirkung der Photorezeptordegeneration auf die äußere plexiforme Schicht	34
	Abbildung 12: Qualitative Analyse der äußeren plexiformen Schicht	35
4.5.1	Quantitative Analyse der OPL im Zeitraum Pw4-Pw7	37
	Abbildung 13: Quantitative Analyse	39
4.5.2	Ultrastrukturelle Beobachtungen an den Stäbchen- und Zapfenendigungen in der CNGA3 ^{-/-} Rho ^{-/-} Maus	40
	Abbildung 14: Akkumulation synaptischer Bänder und postsynaptischer Elemente innerhalb einer Stäbchenendigung	41
4.6	Lokalisation von GluR1, GluR5, α 1F und PMCA1 an den Terminalien der Photorezeptoren	41
	Abbildung 16: Detektion des GluR1- und GluR5-Rezeptors an den Zapfen-Photorezeptor-terminalien	42
	Abbildung 17: Expressionsnachweis biochemischer Indikatoren	43
4.7	Morphologische Veränderungen nachgeschalteter Neurone	43
	Abbildung 18: Horizontalzellausläufer in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} und CNGA3^{-/-} Maus	45
	Abbildung 19: Differenzierung von axonalen und dendritischen Ausläufern und Expression von vGluT1 und bassoon in der äußeren nukleären Schicht	46
	Abbildung 20: Untersuchung der Ultrastruktur von Stäbchenendigungen in der ONL	47
4.7.1	Dendriten der Stäbchen-Bipolarzellen erstrecken sich in die ONL	47
	Abbildung 21: Dendriten-Ausläufer von Stäbchen-Bipolarzellen in der äußeren nukleären Schicht (ONL)	48
4.7.2	Stäbchen-Bipolarzellen entwickeln sich in der frühen postnatalen Entwicklung normal	49
	Abbildung 22: Entwicklungsreihe von Stäbchen-Bipolarzellen in immunhistochemischer- und ultrastruktureller Ansicht	50
4.7.3	Untersuchung der AII-Amakrinzelle - Ein Interneuron zwischen Stäbchen-Bipolarzellen und Ganglienzellen	51
	Abbildung 23: Morphologische Analyse der AII	52

4.8	Strukturerhaltung der inneren Retina	53
	Abbildung 24: Stratifizierungsmuster- und synaptische Strukturanalyse der IPL	54
4.8.1	Dichteverteilung synaptischer Bänder an den Axonterminalien der Stäbchen-Bipolarzellen der CNGA3 ^{-/-} Rho ^{-/-} Maus im Alter von Pm9	55
	Abbildung 25: Dichteverteilung der Bandsynapsen	56
4.9	Rezeptorexpression in der IPL	57
4.9.1	Inhibitorische Rezeptoren: Verteilung unterschiedlicher Subtypen von GABA- und Gly-Rezeptoren	59
	Abbildung 26: GABA-Rezeptor-Verteilung in der IPL	60
	Abbildung 27: Gly-Rezeptor-Verteilung in der IPL	60
4.9.2	Exzitatorische Rezeptoren: Glutamat-Rezeptoren in der IPL	60
	Abbildung 28: AMPA-Rezeptoren	61
4.9.3	Zusammenfassende Darstellung der IPL	61
4.10	Remodulierung der inneren Retina	63
	Abbildung 29: Expression von Rezeptoren in der INL	63
4.10.1	Morphologische Darstellung dendritischer und axonaler Fortsätze innerhalb der INL	64
	Abbildung 30: Charakterisierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins in der Wildtyp- und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}-Retina	65
4.10.2	Zusammenwirken aller drei Komponenten: Axone, Dendriten und Rezeptoren innerhalb der nukleären Schicht	66
	Abbildung 31: NK3R-Färbung im Wildtyp im Vergleich zur CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus	66
	Abbildung 32: Axonale und dendritische Ausläufer wachsen bei der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus in die INL	67
	Abbildung 33: Detektion von Dendriten, Axonen und Rezeptoren innerhalb der INL	68
5.	Diskussion	69
5.1	Die CNGA3 ^{-/-} Rho ^{-/-} -Retina zeigt auch mit funktionslosen Photorezeptoren eine normale Entwicklung	69
5.2	Einfluss funktionsloser Photorezeptoren auf die Expression bestimmter Rezeptoren	70
5.3	Zustand der inneren Retina nach langanhaltender Photorezeptordegeneration	70
5.4	Die CNGA3 ^{-/-} Rho ^{-/-} Maus im Vergleich zur rd-Maus	71
5.4.1	Die CNGA3 ^{-/-} Rho ^{-/-} Maus zeigt ein temporär verschobenes Degenerations-Zeitfenster und eine normale Entwicklung der Stäbchen-Bipolarzellen	71
5.5	Zapfen-Photorezeptoren	72
5.5.1	Zapfen-Photorezeptorkerne sind auf der Höhe ihrer Zapfenendfüßchen lokalisiert	72
5.5.2	Beschleunigte Zapfen-Degeneration auf der ventralen Seite	72

5.6	Strukturelle Plastizität in Zapfen-Photorezeptoren und nachgeschalteten Neuronen	73
5.6.1	Zapfen-Fortsätze	73
5.6.2	OFF-Zapfen-Bipolarzellen kontaktieren die Stäbchenendigungen in der Rho ^{-/-} Maus	74
5.6.3	Das Sprouting der Horizontal- und Stäbchen-Bipolarzellen scheint kurzzeitig eine Stagnation im Degenerationsverlauf zu bewirken	74
5.6.4	Remodulierung der inneren Retina – Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen bilden Fortsätze in die innere nukleäre Schicht	75
5.6.5	Welche Rolle übernehmen die Müllerzellen bei der strukturellen Remodulierung ?	75
5.7	Synaptische Plastizität	76
5.7.1	Ektopische Synapsen in der ONL	76
5.7.2	Synaptische Plastizität innerhalb der Stäbchenendigungen der CNGA3 ^{-/-} Rho ^{-/-} Maus	77
5.7.3	OFF-Zapfen-Bipolarzellen entwickeln eine synaptische Plastizität zu noch intakten Stäbchenendigungen aus	77
5.7.4	Synaptische Plastizität innerhalb der IPL	77
5.8	Ausblick	78
5.8.1	Therapeutische Ansätze für die Behandlung degenerativer Netzhauterkrankungen	78
5.8.2	Welche therapeutischen Ansätze ergeben sich aus den Ergebnissen der CNGA3 ^{-/-} Rho ^{-/-} Mutante ?	80
6.	Zusammenfassung	82
	Summary	84
7.	Abkürzungen	86
8.	Literatur	87
9.	Danksagung	101
10.	Lebenslauf	102
11.	Erklärung	103

1. Einleitung

Die visuelle Wahrnehmung eröffnet den Lebewesen das Fenster zur Außenwelt. Diese Wahrnehmung wird über spezifische Areale im Gehirn an das Bewusstsein weitervermittelt. Das Sehen selber leistet das Auge, ein Bestandteil des Gehirns. Durch Ablösung in der frühen Embryonalentwicklung hat es sich zu einem weitgehend eigenständigen Organ entwickelt, welches dauerhaft über den Sehnerv verbunden bleibt. Zahlreiche intrakranielle Erkrankungen, deren Symptomatik sich häufig an den Augen bemerkbar macht, verdeutlichen diese lebenslange Verbindung. Manche Lebewesen müssen die Fähigkeit des Sehens aufgrund einer progressiv fortschreitenden Degeneration aller Photorezeptoren einbüßen, die medizinisch unterschiedliche Ursachen haben kann. Weit verbreitet ist die Erbkrankheit *retinitis pigmentosa*, die in 1/4000 Fällen zur Erblindung führt (Berson, 1993). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem pathologischen Prozess der Photorezeptordegeneration. Darüber hinaus ist der Einfluss der Degeneration auf die innere Retina von großer Bedeutung und kann maßgebend für die Entwicklung eines Therapieansatzes sein.

1.1 Entwicklung des Auges

Die Retina entwickelt sich wie andere Regionen des zentralen Nervensystems vom Neuralrohr aus. Bereits in der sehr frühen Embryonalentwicklung stülpt dieses sich aus und formt zwei optische Vesikel in der Kopfreion des Embryos (Mann *et al.*, 1964). Beim Menschen findet dies am 22. Tag der Embryonalentwicklung statt. Anschließend faltet sich jeder optische Vesikel ein und formt einen Becher. Dabei unterscheidet man die innere Wand, das Neuraepithelium, aus dem sich die Retina entwickelt, und die äußere Wand, die zum Pigmentepithelium wird. Dieses kleidet die Rückseite des Auges aus. Die Photorezeptoren haben ihren Ursprung an der ventrikulären Seite der neuroepithelialen Schichtung. Das hat zur Folge, dass das Licht, welches aus der entgegengesetzten Richtung einfällt, zunächst die gesamte Retina passieren muss, um auf die Lichtsensoren zu treffen (*Inverses Auge*). Diese grenzen dann direkt an das sich entwickelnde Pigmentepithelium. Drosophila-Experimente zeigten, dass das Pax6 Gen der Motor für die Augenentstehung ist (Halder *et al.*, 1995). Wird dieses

nicht exprimiert (Mensch, Maus und Drosophila) werden die Augen nicht angelegt (Jordan *et al.*, 1992; Glaser *et al.*, 1994; Quiring *et al.*, 1994).

1.2 Aufbau der Retina – Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und Synapsen beim

Sehvorgang

Die Tatsache, dass das Auge Teil des Gehirns ist, wurde schon früh erkannt, und zur funktionellen Untersuchung von Nervenzellen und deren Interaktion genutzt. So konnte man die wesentlich komplexere Hirnrinde umgehen und dennoch allgemeine neuronale Mechanismen aufdecken und geltend machen (Dowling 1987). Schon Ende des 19. Jahrhunderts gelang es dem spanischen Neuroanatom *Santiago Ramón y Cajal* eine präzise Handzeichnung zu entwerfen, in der er bereits die Schichtung der Retina mit allen wesentlichen Zelltypen erfasste (Hubel 1989; Abb.1; B). Bei genauer Betrachtung lassen sich zwei morphologisch voneinander abweichende Photorezeptoren erkennen. Die Stäbchen sind gegenüber den plumperen Zapfen in einer schlanken Silhouettenform dargestellt. Zudem sind die Zapfen aufgrund der Ausbildung kürzerer Außensegmente wesentlich kleiner. Ausgehend von den Ganglienzellen sind feine Fasern erkennbar, die sich im Sehnerv bündeln. Dieser gewährleistet den Informationsfluss zum Gehirn.

Die Retinae aller Vertebraten-Spezies weisen ein und dieselbe anatomische Organisation auf, die eine räumliche Trennung von Zellkörpern und neuronalen Fortsätzen zeigt. Drei Zellkörperschichten werden unterschieden: die Photorezeptoren, die die äußere Körnerschicht bilden („*outer nuclear layer*“, ONL), die innere Körnerschicht („*inner nuclear layer*“, INL), die sich aus Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen zusammensetzt und die Ganglienzellschicht (engl. „*ganglion cell layer*“, GCL). Die Gliazellen, auch Müllerzellen genannt, haben stützende und nährnde Funktion. Sie erstrecken sich vertikal über die gesamte Retina. Während die Zellkörper gewöhnlich in der mittleren INL lokalisiert sind, findet man neuronale Ausläufer in der äußeren und inneren plexiformen Schicht („*outer and inner plexiform layer*“, OPL; IPL). Fällt ein Lichtreiz auf die Netzhaut, wird er von den Photorezeptoren in ein elektrisches Signal verwandelt, welches über Bipolarzellen die **Ganglienzellen** erreicht, die die „parallele Bildverarbeitung“ leisten. Während der Signalweg zu den Ganglienzellen

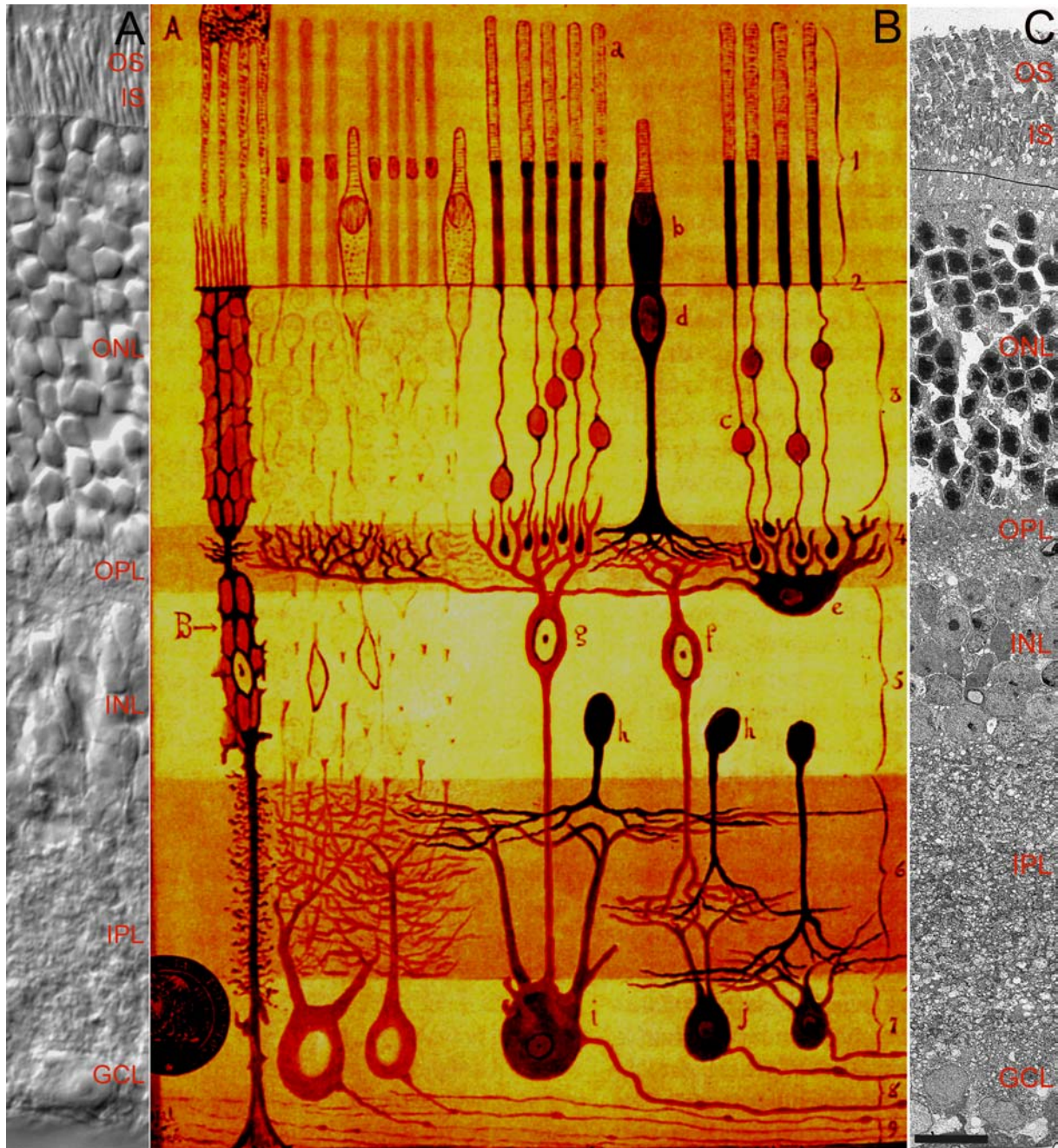


Abb.1: Vertikalansicht der Säuger-Retina nach *Santiago Ramón y Cajal* (1934) als Handskizze (mitte; Bild **B**). Seitlich sind in einer eigens angefertigten Darstellung eine Nomarski-Aufnahme (Bild **A**) und eine elektronenmikroskopische Montage (Bild **C**, Maßstab: 17 μm , für Bild **A** 11 μm) einer Wildtyp-Maus gegenübergestellt. In der Zeichnung sind Beschriftungen eingefügt, bestehend aus Zahlen sowie Groß- und Klein-Buchstaben : 1. Äußere und innere Segmente; 2. Äußere Grenzmembran; 3. Äußere Kernschicht; 4. Äußere plexiforme Schicht; 5. Innere Kernschicht; 6. Innere plexiforme Schicht, 7. Ganglienzellschicht, 8. Nervenfaserschicht, 9. Sehnerv; **A**. Pigmentzellen; **B**. Zellepithel; **a**. Stäbchen; **b**. Zapfen; **c**. Stäbchen-Zellkern; **d**. Zapfen-Zellkern; **e**. große Horizontalzellen; **f**. Zapfen-Bipolarzelle; **g**. Stäbchen-Bipolarzelle; **h**. Amakrinzellen; **i**. riesige Ganglienzelle; **j**. kleine Ganglienzelle. Die Schichtung der Retina in Bild **A** und **C** ist in roter Schrift angegeben: **OS**: äußere Segmente; **IS**: innere Segmente; **ONL**: äußere nukleäre Schicht; **OPL**: äußere plexiforme Schicht; **INL**: innere nukleäre Schicht; **IPL**: innere plexiforme Schicht; **GCL**: Ganglienzellschicht

von Zapfen über **Zapfen-Bipolarzellen** direkt durchlaufen wird, nutzen die Stäbchen die **AII-Amakrinzellen**, die die Erregung dann in die Zapfenbahn einleiten (Famiglietti und Kolb, 1975; Strettoi *et al.*, 1994). In den vergangenen Jahren wurden die unterschiedlichen Typen von Bipolarzellen in der Ratte (Euler und Wässle, 1995) und in der Maus (Haverkamp *et al.*, 2003; Ghosh *et al.*, 2004) untersucht. Hier, sowie in der Primaten-Retina (Boycott und Wässle, 1991) und in anderen Säuger-Retinae, unterscheidet man 10 verschiedene Typen von Zapfen-Bipolarzellen und einen Stäbchen-Bipolarzelltyp (Kaninchen, Katze: Famiglietti, 1981; Katze: Kolb, 1981).

Klassifiziert werden sie durch ein charakteristisches axonales Stratifizierungsmuster in einer genau definierten Ebene der IPL. Aufgrund der unterschiedlich exprimierten Glutamatrezeptoren (Nomura *et al.*, 1994; Masu *et al.*, 1995; Hack *et al.*, 1999, 2001; Brandstätter und Hack, 2001, Brandstätter, 2002), werden **ON-** (axonale Stratifizierung in der inneren Hälfte; depolarisierte Lichtantwort) und **OFF-Bipolarzellen** (axonale Stratifizierung in der äußeren Hälfte, hyperpolarisierte Lichtantwort) unterschieden. Die Signalübertragung von den Photorezeptoren zu den Ganglienzellen wird über laterale inhibitorische Verschaltungen mit Interneuronen, den **Horizontalzellen und Amakrinzellen**, modifiziert (Wässle und Boycott, 1991). Die Morphologie und Physiologie der Horizontalzellen ist eingehend untersucht worden (Dowling, 1966; Fisher & Boycott 1974; Bloomfield & Miller, 1982; Dacheux & Raviola, 1982; Kolb & Normann, 1982; Mills & Massey, 1994). Die meisten Säuger sind mit zwei morphologischen Typen von Horizontalzellen (A-HCs; B-HCs) ausgestattet. Eine Ausnahme stellen die Nagetiere mit nur einem einzigen Typ der B-HCs dar (Peichl und Gonzáles-Soriano, 1994). Der A-Typ hat im Vergleich zum B-Typ kein Axon, aber einen größeren Dendritenbaum. Die Dendritterminalien beider Typen kontaktieren mit den Zapfen. Das Axonterminal des B-Typs zieht nur zu den Stäbchen (Hack und Peichl, 1999). Bipolarzellen, Photorezeptoren und Ganglienzellen verwenden den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat, Horizontalzellen den inhibitorischen Neurotransmitter GABA, während Amakrinzellen entweder GABA oder Glycin nutzen. Von den zuletzt genannten werden 30-40 verschiedene Typen unterschieden (Strettoi und Masland, 1996; Mac Neil *et al.*, 1999). Auch die Ganglienzellen, von denen 10-15 Typen unterschieden werden, unterteilen sich in einen ON- und OFF-Signalweg. Sie wurden in einer Studie in der Maus-Retina morphologisch klassifiziert (Sun *et al.*, 2002).

1.3 Ultrastrukturelle Untersuchungen deckten anatomische Unterschiede zwischen

Stäbchen und Zapfen auf

Bereits 1979 gelang es La Vail mittels der Elektronenmikroskopie Stäbchen von Zapfen zu unterscheiden. Das Auffälligste ist die geringere Größe der Zapfen. Diese stellen über ihre Außensegmente Kontakte mit den Pigmentepithelzellen her. In diesen Außensegmenten sind Disks eingelagert, die kontinuierlich mit der Plasmamembran verlaufen. Die Innensegmente weisen bei den Zapfen einen größeren Durchmesser auf. In diesen Innensegmenten sind die Mitochondrien lokalisiert, die bei den Stäbchen von ungewöhnlich schmaler länglicher Gestalt sind. Das gleiche trifft für das Axon zu, welches bei den Zapfen dicker ist und in einen großen Fuß ausläuft, angereichert mit einer Vielzahl synaptischer Bänder (Hsu *et al.*, 1998; Abb.2; A). Stäbchen weisen in der Regel nur ein einziges synaptisches Band in ihrer kleineren Endigung auf (Abb.2; B). Darüber hinaus hebt sich das Heterochromatin der Zellkerne, welches nur in den Stäbchen kompakt in einem Haufen zusammenliegt, im EM durch dunklere Färbung hervor.

1.4 Synapsen der Retina : Band- und konventionell-chemische Synapse

Konventionelle chemische Synapsen sind ubiquitär im Vertebraten-Nervensystem (Dowling und Boycott, 1966). Ihre Ultrastruktur ist charakteristisch. Nahe der aktiven Zone der Präsynapse akkumulieren synaptische Vesikel. Die Postsynapse bildet ein elektronendichtes Band. Dieser Synapsentyp wird in der Retina von Horizontal- und Amakrinzellen gebildet (Abb.2; H). Photorezeptoren und Bipolarzellen bilden dagegen Bandsynapsen aus (Sjöstrand, 1953). Bei den synaptischen Endigungen der Photorezeptoren unterscheidet man zwischen dem **Zapfenendfüßchen**, welches eine Vielzahl von synaptischen Bändern aufweist (Abb.2; A), und der **Stäbchenendigung** mit nur einem synaptischen Band (Abb.2; B). Im Gegensatz zur konventionell-chemischen Synapse mit nur einem einzigen postsynaptischen Element, bildet die Bandsynapse der Photorezeptoren mit zwei Horizontal- und einem Bipolarzellausläufer drei postsynaptische Elemente, was zum Begriff der **Triade** führte (Missotten, 1962). Die Bandsynapsen in der IPL stellen sich dagegen als **Diaden** dar (Dowling und Boycott, 1966). Sie sind aus zwei postsynaptischen Elementen zusammengesetzt.

Die Synapsen sind mit unterschiedlichen Proteinen ausgestattet, die strukturerhaltende Bausteine der prä- und postsynaptischen Elemente darstellen, und unter anderem die Transmitterfreisetzung steuern. Kinesin ist an den Bandsynapsen der OPL und IPL lokalisiert (Muresan *et al.*, 1999), während bassoon an konventionell-chemischen Synapsen in der IPL und an den Bandsynapsen in der OPL exprimiert wird, aber nicht an den Bandsynapsen in der IPL (Brandstätter *et al.*, 1999).

1.5 Neurotransmitter-Rezeptoren in der Retina: Klassifizierung und Verteilung

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter, während **GABA** und **Glyzin** inhibitorischen Charakters sind. Diese Transmitter binden an Rezeptoren, die sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzen. Ihre spezifische Expression und Anreicherung an Synapsen innerhalb der Retina ist in den vergangenen Jahren eingehend untersucht worden (Brandstätter *et al.*, 1998). Von den **GABA_A**- wie **Gly-Rezeptoren** existieren zahlreiche Untereinheiten (**GABA_A α1,α2,α3**, Greferath 1994, 1995; **GlyR, α1,α2,α3,α4** und β (Betz *et al.*, 1991; Haverkamp *et al.*, 2003, *GlyRα3*), die jeweils eine charakteristische Stratifizierung innerhalb der IPL aufweisen (Wässle *et al.*, 1998). **GABA_A**- und Gly-, sowie der **GABA_C**-Rezeptor gehören den ionotropen Rezeptoren an.

Bei den Glutamatrezeptoren werden ionotrope und metabotrope Rezeptoren unterschieden. Pharmakologisch werden sie allgemein in AMPA- (**GluR1**, GluR2, GluR3, **GluR2/3** und GluR4), Kainat- (**GluR5**, GluR6, GluR7, KA-1 und KA-2) und NMDA- (NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, Delta1, Delta2) Rezeptoren unterteilt. Metabotrope Glutamatrezeptoren dagegen bestehen nur aus einem einzigen Protein, das der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehört. Derzeit sind acht Typen charakterisiert (mGluR1, mGluR2, mGluR3, mGluR4, **mGluR6**, mGluR7 und mGluR8).

Die folgende **Abb.2** fasst in einer Retina-Montage die wesentlichen strukturellen und biochemischen Abläufe vereinfacht zusammen. Eingefügt ist die Lokalisation eines großen Bestandes der Antikörper und synapsenassoziierter Proteine, die in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden. Im Ergebnisteil wird detailliert darauf eingegangen. Zusätzlich integriert sind die Begriffe, die in den Abschnitten 1.2, 1.4 und 1.5 durch fette Schreibweise hervorgehoben wurden.

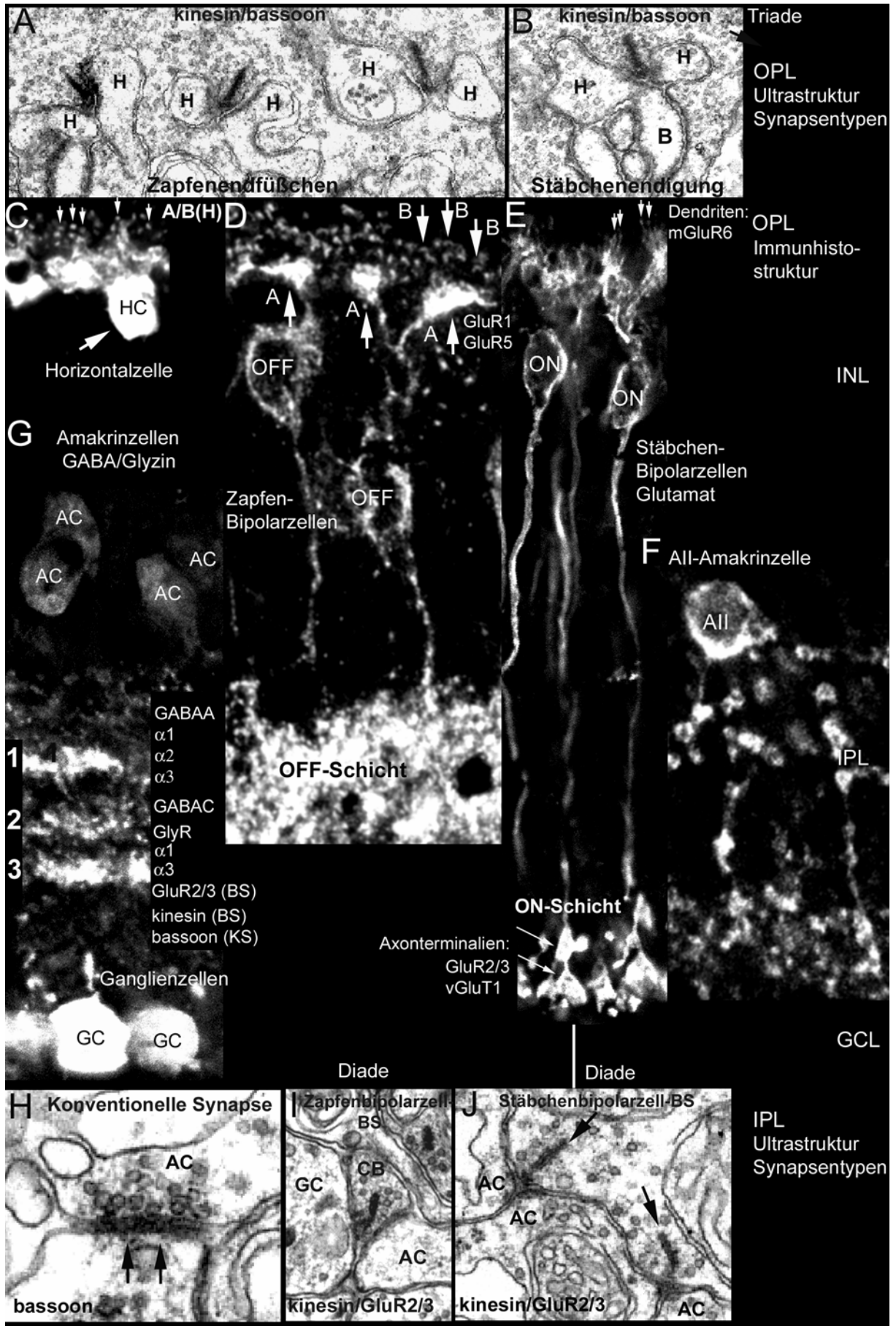


Abb.2: Retina-Montage

- A:** Zapfenendfüßchen mit mehreren Triaden (EM-Aufnahme); kinesin und bassoon markieren die Bandsynapsen;
- B:** Stäbchenendigung mit einer Triade (EM-Aufnahme): (**H**=Horizontalzellfortsatz; **B**=Bipolarzeldendrit; entsprechende immunhistochemische Darstellung in Punkt **C** und **D**);
- C:** Horizontalzell-Färbung (**HC**; Calbindin-Antikörper (CaBP)) mit dendritischen Ausläufern in den Stäbchenendigungen (**Pfeile**);
- D:** Zwei OFF-Zapfen-Bipolarzellen mit drei Zapfenendfüßchen, angefärbt mit dem Neurokinin-Rezeptor 3 (NK3R)-Antikörper (A, Pfeile), darüber 3-4 Reihen von Stäbchenendigungen (B; Pfeile), angefärbt mit bassoon; an den Zapfenendfüßchen wird GluR1 und GluR5 exprimiert;
- E:** Stäbchen-Bipolarzellen (angefärbt mit dem Protein-Kinase C α -Antikörper (PKC α), mit mGluR6 an den Dendriten und GluR2/3 sowie vGluT1 (vesikulärer Glutamattransporter 1) an den Axonterminalien;
- F:** AII-Amakrinzelle (Disabled-1 (Dab1-33)-Antikörper), zu den glyzineren Amakrinzellen gehörend; Interneuron zwischen den **ON**-Stäbchen-Bipolarzellen und den ON- und OFF-Ganglienzellen;
- G:** Amakrinzellen (**AC**) (glyzinerge und gabaerge werden unterschieden); dreifache Bänderung der IPL (Calretinin-Antikörper); Expression bestimmter Rezeptorunterklassen mit charakteristischem Verteilungsmuster innerhalb der IPL (rechtsbündig geschrieben, detaillierte Beschreibung im Ergebnisteil); Ganglienzellen (**GC**) darunterliegend; **H,I,J** zeigen Synapsentypen der IPL in der Ultrastruktur:
- H:** konventionelle Synapse: durch dichtes Lamellenband gekennzeichnet, Anreicherung von Vesikeln auf der Amakrinzellseite; bassoon ist präsynaptisch exprimiert und dient als lichtmikroskopischer Marker;
- I:** Zapfen-Bipolarzell-Bandsynapse (kleines Terminal, nur ein Band); Ganglienzelle (**GC**), Amakrinzelle (**AC**), Zapfen-Bipolarzelle (**CB**);
- J:** Stäbchen-Bipolarzell-Bandsynapse (großes Terminal, Anreicherung von mehreren Bändern). Kinesin markiert die Bandsynapsen in der IPL sowie in der OPL; GluR2/3 sitzt an einem postsynaptischen Element einer Diade in der IPL;
- (**BS**)=Bandsynapse, (**KS**)=Konventionelle Synapse.

1.6 Die Sehpigmente der Lichtsensoren

Die Stäbchen und Zapfen haben Sehpigmente in ihre äußeren Segmente eingelagert, die für die Einleitung der photoelektrischen Transduktion entscheidend sind (Müller und Kaupp, 1998). Die Photorezeptoren der Säuger sind mit verschiedenen Pigmenten (Opsine) ausgestattet: Die Stäbchen enthalten das Rhodopsin, wohingegen bei den Zapfen zwischen dem kurzwelligen (S), mittelwelligen (M), und langwelligen (L) Opsin unterschieden wird. Die Kombination dieser drei Opsine innerhalb der Zapfen ermöglicht das Farbsehen. Dagegen besitzt die Maus nur zwei Opsine (S und M). Sie nimmt ihre Umwelt in schwarz-weiß wahr. Das Pigment der Stäbchen, Rhodopsin, ermöglicht das Sehen bei geringen Lichtintensitäten. Lange Zeit war man der Ansicht, dass nur die Photorezeptoren

mit Opsinen ausgestattet sind, die Lichtreize in elektrische Signale umwandeln. Mittlerweise ist bekannt, dass auch die Ganglienzellen ein Opsin, das Melanopsin, aufweisen (Panda *et al.*, 2003; Berson, 2003).

1.7 Expression und Verteilung der Zapfen-Opsine in der Retina der Maus

Carter-Dawson und La Vail erkannten bereits 1978, dass auch die Maus mit Zapfen und Stäbchen ausgestattet ist. Obwohl die Zapfen nur ungefähr 2% ausmachen, hat man sich in den vergangenen Jahren bemüht, die Lokalisation der Opsine in Zapfen und ihre Verteilung über die Retina zu verstehen. Szél beschrieb zu Beginn der 90er Jahre, dass M-Opsine dorsal und die S-Opsine ventral dominieren. Weitere Studien deckten dann aber überraschenderweise eine Koexpression beider Opsine in einem einzigen Zapfentyp auf (Applebury *et al.*, 2000). Demnach exprimieren alle Zapfen M-Opsin. Es kann alleine vorkommen, zumeist aber in Kombination mit dem S-Opsin. Darüber hinaus reagierten die Mäuse auf kurzwelliges Licht weitaus sensitiver, was durch eine höhere S-Opsin Transkription bestätigt wurde. Das Gradientengefälle der M-Opsine, das von Szél (1993, 1994 *et al.*) festgestellt wurde, konnte von Applebury weitgehend bestätigt werden. Abweichend waren bei Applebury die S-Opsine, die allgemein eine relativ konstante Verteilung zeigten und in der äußersten dorsalen Retina stochastische Expression aufwiesen. Hier liegt somit der Bereich, in dem Zapfen vorkommen, die nur M-Opsine transkribieren. Dies verdeutlicht, dass unterschiedliche Mechanismen parallel verlaufen und die Expression der Opsine steuern. Es muss demnach mindestens zwei Mechanismen geben: Einer reguliert die Einzel- oder Ko-Expression und der zweite entscheidet über die Transkriptionsmenge eines Opsins innerhalb eines Zapfen. Es ist anzunehmen, dass noch weitere bisher unbekannte Mechanismen beteiligt sind, die abhängig vom jeweiligen Lebewesen unterschiedlich reguliert werden.

1.8 Morphologische und funktionelle Beurteilung einer Netzhaut ohne bzw. mit funktionslosen Photorezeptoren

Anfangs wurde bereits erwähnt, dass viele Erblindungen auf Photorezeptordegenerationen zurückzuführen sind. Diese Gruppe von erblichen Augenerkrankungen wird als *retinitis pigmentosa*

(RP) bezeichnet. Die Bezeichnung „retinitis“ suggeriert eine entzündliche Genese der Erkrankung. Tatsächlich jedoch beruht die fortschreitende Zerstörung der retinalen Photorezeptorschicht auf programmierten Zelltod (*Apoptose*). Der Begriff „*pigmentosa*“ beschreibt die bei der Untersuchung des Augenhintergrundes sichtbaren, typischen Pigmentablagerungen in der Netzhaut. Unterschieden werden die dominante RP, die rezessive RP und die geschlechtsgebundene RP, bei der nur Männer erkranken. Der Degenerationsverlauf der RP-Krankheit betrifft zunächst nur die Stäbchen. Mit einer zeitlichen Verzögerung werden auch die Zapfen in Mitleidenschaft gezogen. Die Hauptsymptome der *retinitis pigmentosa* sind Gesichtsfeldausfälle, gestörtes Dämmerungssehen, Nachtblindheit (Stäbchenverlust) und Störungen des Farben- und Kontrastsehens (Zapfenverlust). Die klassische Form der RP beginnt mit einer Einengung des Gesichtsfeldes, dem sogenannte Tunnelblick. Die Patienten haben große Schwierigkeiten sich im Raum zu orientieren, während das Sehen im Zentrum (vermittelt durch Zapfen), also beispielsweise Lesen, ihnen noch keine Probleme bereitet. Weltweit leiden etwa 2-3 Millionen Menschen (in Deutschland etwa 30 000 - 40 000) an einer der verschiedenen Formen der RP. Obwohl diese Krankheit bereits Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieben wurde, ist sie bis heute weder chirurgisch, medikamentös noch durch eine diätische Ernährung therapierbar. Nur bei einigen wenigen Sonderformen der RP, ist es bisher gelungen, mittels geeigneter Behandlungsformen, die fortschreitende Degeneration zum Stillstand zu bringen. Als Schlüsselmodell zur Studie der *retinitis pigmentosa* diente die rd- (retinale Degeneration) Maus (Farber und Lolley, 1974; Lolley und Farber, 1976). Genetisch liegt ein Defekt in der β -Unterheit des Stäbchen cGMP-Phosphodiesterase Gens vor (Bowes *et al.*, 1990, 1993; Pittler und Baehr, 1991). Dieser Defekt setzt einen progressiven Verlust der Stäbchen in Gang, an den sich die Degeneration der Zapfen anschließt (La Vail und Steinberg, 1997). Der genaue Verlauf wurde eingehend dokumentiert (Carter-Dawson *et al.*, 1978). Die Degeneration der Stäbchen beginnt bereits mit 8 Tagen (P8). Im Alter von 4 Wochen (Pw4) hat die Maus alle Photorezeptoren verloren (Jiménez *et al.*, 1996). Die Zapfen der ventralen Retina zeigen einen beschleunigten Degenerationsverlauf gegenüber der Dorsalseite (García-Fernández *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 1996).

Befunde der *retinitis pigmentosa*-Patienten zeigen, dass Amakrin- und Horizontalzellen (Fariss *et al.*, 2000) sowie Stäbchen (Li *et al.*, 1995) Netzwerke von Neuriten-Auswüchsen bilden. Dieses Ergebnis

wurde auch später in der rd-Maus an Horizontalzellen dokumentiert (Strettoi *et al.*, 2002). Desweiteren wurde beschrieben, dass sich die Dendriten der Stäbchen-Bipolarzellen zurückziehen. Zudem beobachtete man eine Entwicklungsstörung der Stäbchen-Bipolarzell-Axonterminalien. Dies zeigte sich lichtmikroskopisch in der Ausbildung kleinerer Axonterminalien und ultrastrukturell in einer Fehlentwicklung der Bandsynapsen (Strettoi *et al.*, 2002).

Die Übertragbarkeit der bisherigen rd-Mausmodelle auf den Menschen wurde aufgrund einer zu früh einsetzenden Degeneration erschwert. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Maussystem CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} ist aufgrund eines temporär verzögerten Zeitverlaufs besser übertragbar. Die Einzelmutanten CNGA3^{-/-} und Rho^{-/-} wurden bereits morphologisch wie physiologisch charakterisiert. Bei der Rho^{-/-} Maus ist das Rhodopsin ausgeschaltet (Humphries *et al.*, 1997). Da dieses auch stabilisierende Funktion ausübt, entwickelt die Retina keine äußeren Segmente. Sie verliert ihre Photorezeptoren, einschließlich der Zapfen innerhalb von drei Monaten. Der Verlust der Zapfen ist ein sekundärer, zeitlich verzögerter Effekt, da er den Stäbchen (primärer Effekt) nachgeschaltet ist. In der frühen postnatalen Entwicklung bis Pw6 bietet dieses Modell ein isoliertes, nur aus Zapfen bestehendes System (Jaissle *et al.*, 2001). Die CNGA3^{-/-} (*cyclic nucleotide-gated cation channel* = zyklisch regulierter Nukleotid-Kationen-Kanal) Maus hingegen stellt ein isoliertes Stäbchensystem dar (Biel *et al.*, 1996, 1999; Gerstner *et al.*, 2000). Normalerweise wird bei der Lichtantwort der Photorezeptoren der CNG-Kanal geschlossen. Dies verursacht eine Hyperpolarisation der Plasmamembran mit einer Abnahme der Glutamatfreisetzung. Fehlt der CNGA3-Kanal führt dies beim Menschen zur Farbenblindheit (Kohl *et al.*, 1998). Bei diesem Modell sind die Stäbchen lebenslänglich unbeeinflusst und somit intakt. Während CNGA3 in den äußeren Zapfensegmenten exprimiert wird (Bönigk *et al.*, 1993), ist CNGA1 in den äußeren Stäbchensegmenten lokalisiert (Kaupp *et al.*, 1989). Neueste Erkenntnisse offenbarten, dass der CNGA3-Kanal auch in ON-Zapfen-Bipolarzellen exprimiert wird und somit auch in diesen Signalweg physiologisch eingebunden ist (Henry *et al.*, 2003).

1.9 Elektretinogramme (ERGs) der Doppelmutante CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} und der Einzelmutanten CNGA3^{-/-} und Rho^{-/-} im Vergleich zur Wildtyp-Maus

Das Elektretinogramm (ERG) hat sich als objektive Methode zur Beurteilung der Sehfunktion erwiesen. Verwendung findet sie in der klinischen Diagnostik sowie in der physiologischen Augenforschung. Sie reflektiert die Aktivität aller Zellen. Die ERG-Antworten werden mit einer Extrazellulär-Elektrode, die auf der Cornea positioniert ist, abgeleitet. Dazu wird die Retina unter dunkel- (skotopisch; Abb.3) und licht- (photopisch) adaptierten Bedingungen mit Lichtblitzen gereizt. Die zuletzt genannte ist graphisch nicht dargestellt. Unter dunkel-adaptierten Bedingungen wie Dämmerungslicht dominiert die Antwort der Stäbchen. Bei Licht und der Verabreichung breiter Stimuli reagieren die Zapfen. Die gemessenen Summenpotentiale werden in einem Kurvendiagramm dargestellt, welches sich aus drei Wellen, a, b und c, zusammensetzt (Dowling, 1987). Diese vertreten verschiedene Zellpopulationen unterschiedlicher Herkunft. Die a-Welle wird von den Photorezeptoren, die b-Welle von nachgeschalteten Neuronen erzeugt (Abb.3). Die c-Welle repräsentiert die nicht-neuronale Aktivität der Gliazellen und des Pigmentepithels (in der Graphik nicht dargestellt). Die Doppelmutante CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} zeigt keine Photorezeptorantwort. Ihre Sehfunktion ist demnach negativ. Dagegen zeigt die Einzelmutante CNGA3^{-/-} unter skotopischen Bedingungen ein ERG, dessen Oszillationsverlauf und Frequenz dem Wildtyp gleicht. Die gemessene Antwort wird von den Stäbchen erzeugt, da diese unbeeinflusst und somit funktionell intakt sind. Die Rho^{-/-} Maus zeigt bei stärkerer Belichtung eine kleine Antwort, die im frühen Alter von Pw(5) von den noch intakten Zapfen ausgeht. Dieser Zeitpunkt bietet sich an, ein isoliertes Zapfensystem zu charakterisieren (Jaissle *et al.*, 2001).

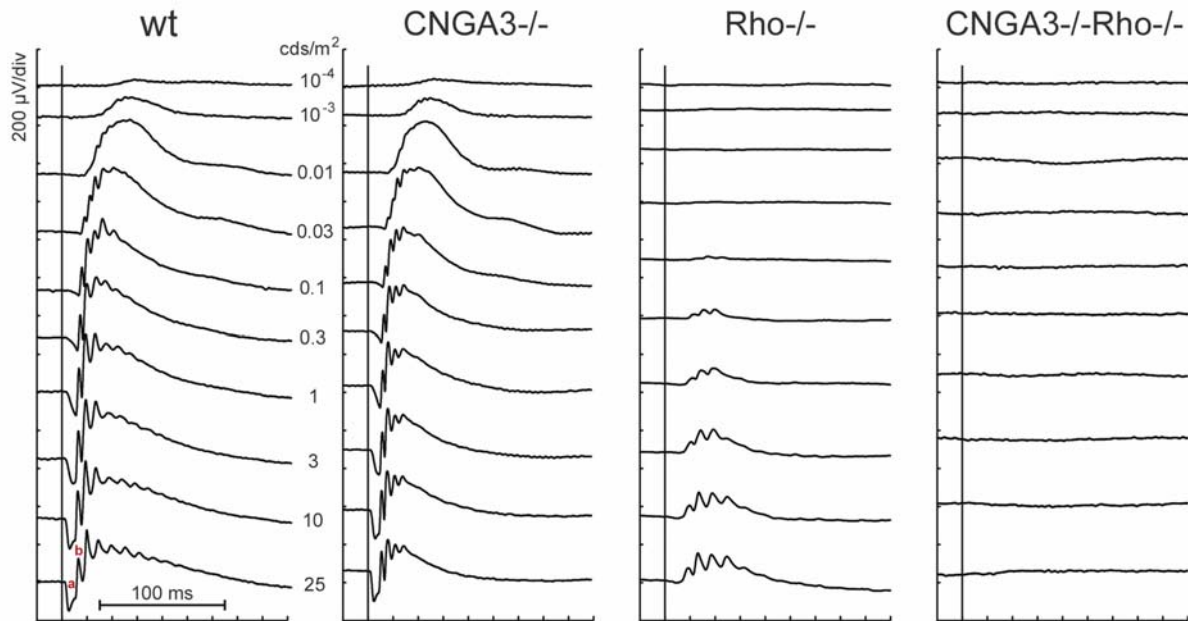


Abb.3 Skotopische Elektoretinogramme (ERGs) von einer Wildtyp-Maus (wt), $CNGA3^{-/-}$, $Rho^{-/-}$, und $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus im Alter von Pw5. Das ERG der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus ist negativ. Zehn Stimuli wurden mit steigender Intensität (von 10^{-4} $cd*s/m^2$ bis $25 cd*s/m^2$) mit einem Interstimulusintervall (ISI) von 5s (für 0.1, 1, 10, 30, 100, 300 $mcd*s/m^2$); 10s (1 & 3 $cd*s/m^2$) oder 20s (für 10 & 25 $cd*s/m^2$) verabreicht (a: a-Welle; b: b-Welle); cd: Candela = Lichtstärke.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das in 1.8 und 1.9 beschriebene $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus-Modell, morphologisch zu untersuchen. Unter Einbeziehung der Einzelmutanten $CNGA3^{-/-}$ und $Rho^{-/-}$ sollte sowohl die Funktion des Rhodopsins als auch des CNGA3-Kanals innerhalb der Retina aufgedeckt werden. Darüber hinaus sollte der Degenerationsverlauf der äußeren Retina und eine Beurteilung über ihre Funktionalität dokumentiert werden. Von besonderem Interesse war es herauszufinden, inwieweit die innere Retina vom Funktionsausfall und vom langfristigen Verlust der Photorezeptoren beeinflusst wird. Diese Erkenntnisse können für die medizinische Therapie von Netzhauterkrankungen von Bedeutung sein.

2. Materialien

2.1 Verwendete Lösungen für die Lichtmikroskopie

Phosphatpuffer (PB): [0,2M, pH 7,4]	10,86 g Na ₂ HPO ₄ 1,31 g NaH ₂ PO ₄ mit Aqua dest auf 250 ml auffüllen
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS): [0,01M, pH 7,4]	50 ml von 0,2M PBS, pH 7,4 8,76 g NaCl 0,2 g KCl mit Aqua dest. auf 1L auffüllen
Saccharose 30%	30g Saccharose mit PBS auf 100g auffüllen
Paraformaldehyd (PFA) 4%	4g Paraformaldehyd mit PB auf 100g auffüllen; unter Rühren bei 65°C lösen, abfiltrieren und vor Verwendung abkühlen
TritonX-100 Stocklösung 5%	5 g TritonX-100 mit PBS auf 100g auffüllen
Inkubationslösung für Primär- und Sekundär- Antikörper	5% Chemiblocker, 0,5% Triton in PBS

Tab.1: Lösungen für die Lichtmikroskopie

2.2 Verwendete Lösungen für die Elektronenmikroskopie

Cacodylat-Puffer (CP) [0,1M, pH 7,4]	2,14g Dimethylarinsäure Natriumsalz in 100 ml Aqua dest.
Glutaraldehyd (GA)	2% GA mit CP in 4% PFA versetzen
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	2% OsO ₄ mit CP versetzen
1,2-Propylenoxid	> 99%
Uranylacetat (UA)	0,5% in 70% Ethanol (Blockkontrastierung)

Tab.2: Lösungen für die Elektronenmikroskopie

2.3 Verwendete Chemikalien und Bezugsfirmen

Chemiblocker	Chemicon International, Inc., Art. Nr. 19100404
Dimethylarinsäure Natriumsalz	Merck, 100g, Art. Nr. 820670
Epon (Epoxy-Einbettmedium)	Fluka, 250 mL Art. Nr. 45359
Epoxy-Härter DDSA	Fluka, 250 mL Art. Nr. 45346
Epoxy-Härter MNA	Fluka, 250 mL, Art Nr. 45347
Glutaraldehyd	Fluka, 5 ml; 25% in Wasser, Art. Nr. 91677/1
Halothan	Eurim Pharm, 250 ml

KCL	Merck, 500 g, Art. Nr. 1.04936
Natriumazid	Merck, 100 g, Art. Nr. 822335
Na ₂ HPO ₄	Merck, 1000 g, Art. Nr. 6574
NaH ₂ PO ₄	Merck, 1000 g, Art. Nr. 6346
NaCl	Merck, 1000 g, Art. Nr. 6404
Osmium (OSO ₄)	SIGMA Chemie GMBH, F 75631
Paraformaldehyd	Merck, 1000 g, Art. Nr. 1.04055
Propylenoxid	Merck, 1L, Art. Nr. 1.12492
Saccharose	Roth, 1000 g, Art. Nr. 4621
TritonX-100	Merck, Art. Nr. 11869
Uranylacetat (UA)	Polysciences, Inc; 98%, Art. Nr. 499425

Tab.3: Verwendete Chemikalien und Bezugsfirmen

2.4 Verwendete Primär-Antikörper

Antigen	Spezies	Quelle	Verwendete Verdünnung
Bassoon	Maus	StressGen Biotechnologies, Victoria, BC, Kanada	1 : 5000
CaB5	Kaninchen	K. Palczewski, Seattle, WA, USA (Haeseleer <i>et al.</i> , 2000)	1 : 500
CaBP Calbindin	Kaninchen	Swant, Bellinzona, Schweiz	1 : 2000; 1 : 4000
Calretinin	Kaninchen	Swant, Bellinzona, Schweiz	1 : 2000
mCNGA3	Kaninchen	A.A. Hirano, Los Angeles, CA (Hirano <i>et al.</i> , 2000)	1 : 200-1:500
Disabled-1 (Dab 1-33)	Kaninchen	Howell, Seattle, WA (Howell <i>et al.</i> , 1997; Rice und Curran, 2000)	1 : 500
GABA	Kaninchen	Sigma	1 : 2000

GABA _A α1	Kaninchen	H. Möhler, Zürich, Schweiz (Benke <i>et al.</i> , 1991)	1 : 10000
GABA _A α2 (1-9)	Meerschwein- chen	H. Möhler, Zürich, Schweiz (Marksitzer <i>et al.</i> , 1993)	1 : 2000
GABA _A α3 (1-15)	Meerschwein- chen	H. Möhler	1 : 5000
GABA _C	Kaninchen	H. Wässle, Frankfurt am Main, Deutschland (Enz <i>et al.</i> , 1996)	1 : 100
GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Kaninchen	Sigma (de Raad <i>et al.</i> , 1996)	1 : 1000
GluR1	Kaninchen	Chemicon International Inc., Temecula, CA	1 : 100
GluR2/3	Kaninchen	Chemicon International Inc., Temecula, CA	1 : 100
GluR5 (N-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	1 : 100
Glycine	Ratte	D. Pow, Brisbane, Australien (Pow <i>et al.</i> , 2000)	1 : 1000
GlyR α1 Klon mAb 2b	Maus	H. Betz, Frankfurt, Deutschland (Schröder <i>et al.</i> ,1991)	1 : 100
GlyR α3	Kaninchen	R.J. Harvey, London, UK (Haverkamp <i>et al.</i> , 2003)	1 : 500; 1 : 1000

blue opsin JH 455 (S)	Kaninchen	Jeremy Nathans, Baltimore, MD (Wang <i>et al.</i> , 1992)	1 : 8000
green opsin JH 492 (M-L)	Kaninchen	Jeremy Nathans, Baltimore, MD (Wang <i>et al.</i> , 1992)	1 : 8000
Kinesin II	Maus	Babco, Richmond, CA (Muresan <i>et al.</i> , 1999)	1 : 50
MAP2 (2a + 2b)	Maus	WAK-Chemie, Steinbach/Ts. Deutschland (Wang <i>et al.</i> , 2000)	1 : 1000
mGluR6	Kaninchen	Neuromics, Minneapolis, MN (Nakajima <i>et al.</i> , 1993)	1 : 1000
NF-H Neurofilament-H	Maus	Sigma (Dräger <i>et al.</i> , 1983)	1 : 500
NK3R Neurokinin- Rezeptor3	Kaninchen	R. Shigemoto, Okazaki, Japan (Ding <i>et al.</i> , 1996)	1 : 200-1 : 500
PKC α (Klon MC5)	Maus	Amersham, Arlington Heights, IL	1 : 100
PMCA1 Plasmamembran- Calcium-ATPase1	Kaninchen	A.G. Filoteo, Rochester, NY (Filoteo <i>et al.</i> , 1997)	1 : 300
Rho4D2	Maus	Molday, Vancouver, CA (Molday <i>et al.</i> ,	1 : 2000

		1998)	
VGAT	Kaninchen	Chemicon International Inc., Temecula, CA	1 : 5000
VgluT1	Kaninchen	R. Jahn, Göttingen, Deutschland (Takamori <i>et al.</i> , 2000)	1 : 1000
α 1F-Ca ²⁺ -Kanal	Schaf	C. Morgans, OHSU, Beaverton, OR (Morgans, 2001)	1 : 1000

Tab.4: Verwendete Primär-Antikörper mit Angaben zur Spezies, Quelle (Literaturanhang) und Verdünnung

2.5 Verwendete Sekundär-Antikörper

Antikörper	Anregung (nm)	Emission (nm)	Quelle	Verdünnung
α ms + α rb ALEXA TM 488	495	519	Molecular Probes	1 : 500
α ms + α rb ALEXA TM 594	590	617	Molecular Probes	1 : 500
α gp ALEXA TM 488	495	519	Molecular Probes	1 : 500
α g ALEXA TM 488	495	519	Molecular Probes	1 : 500
α ratCy TM 3	551	562	Dianova	1 : 500
α sh ALEXA TM 594	590	617	Molecular Probes	1 : 500
α ms ALEXA TM 488	495	519	Molecular Probes	1 : 500
α rbCy TM 3	551	562	Dianova	1 : 500
α rbCY TM 5	650	665	Dianova	1 : 500

Tab.5 Fluoreszenzgekoppelte Sekundär-Antikörper: g: Ziege; ms: Maus; rb: Kaninchen; gp: Meerschweinchen; d: Esel; rat: Ratte; sh: Schaf; α : Anti; TM: Transmission

2.6 Geräte und sonstige technische Hilfsmittel

Gerät / technisches Hilfsmittel	Bezugsquellen
Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems
Aqua-Poly/Mount	Polysciences Inc., Eppelheim, Deutschland
Axiophot Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue freezing medium)	Reichert-Jung, Art. Nr. 0201 08926
Elektronenmikroskop EM10	Zeiss
Elektronenmikroskop Leo 912 AB OMEGA	Zeiss
Gefriermikrotom Kryostat Frigocut 2700	Reichert-Jung
Laser-Scanning-Mikroskop LSM5 Pascal	Zeiss
Leica TCS NT Konfokales Mikroskop	Leica, Wetzlar, Deutschland
Pap-Pen	SCI Science Services GmbH, München, Deutschland
Scanner (Power Look)	Umax Systems GmbH, Willich, Deutschland
Ultramikrotom	Ultracut, Reichert-Jung
Ultrastainer, 2168	LKB Bromma, Carlsberg System
Zentrifugen	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tab.6 Geräte und sonstige technische Hilfsmittel mit den dazugehörigen Bezugsquellen

2.7 Mausstämme

Wildtyp C57 BL/6

hauseigene Zucht (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt) und ELEVAGE JANVIER, Frankreich (Alter PM8,9,12)

CNGA3^{-/-}

M. Biel, München

Rho^{-/-}

P. Humphries, Dublin

CNGA3^{-/-} Rho^{-/-}

M. Seeliger, Tübingen

3. Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Doppelmutante $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ wurde durch die Kreuzung der $CNGA3^{-/-}$ Maus mit der $Rho^{-/-}$ Maus generiert. Sie entstammt der F2 Generation und ist homozygot. Genotypisiert wurde sie mittels PCR (Humphries und Biel). Phänotypisiert wurde sie anhand immunhistochemischer Färbungen (Abb.5). Für die Untersuchung der postnatalen Entwicklung, in der sich der Degenerationsprozess der Photorezeptoren vollzieht, wurden Mäuse im Alter von 4-12 Wochen (Pw4-12) untersucht. Dieser Zeitraum wurde auch zur Analyse der äußeren plexiformen Schicht herangezogen. Der Vergleich der Einzelmutanten $CNGA3^{-/-}$ und $Rho^{-/-}$ mit den Wildtyp-Kontrolltieren entsprechenden Alters unterstützte die Analyse der Doppelmutante $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$. Für die innere plexiforme Schicht wurden zunächst Mäuse im Alter von 2,5-5 Monaten (Pm2,5-5) verwendet, größtenteils aber ältere Tiere im Alter von Pm8-14. Auch diese wurden mit Wildtypen gleichen Alters verglichen, um altersbedingte Degenerationsdefekte ausschließen zu können.

3.2 Präparation des Auges und Markierung der Dorso-Ventralachse der Netzhaut

Für die Augenentnahme wurden die Mäuse zunächst mit Halothan betäubt und dann durch Dekapitierung getötet. Direkt im Anschluß wurden die Augen an der dorsalen und der ventralen Achse mit einem wasserfesten Filzstift markiert. Dies wurde dadurch erleichtert, dass zuvor die Tränenflüssigkeit mit einem Papiertuch entfernt wurde. Dann konnte das Auge durch Durchtrennung des Sehnervs aus der Augenhöhle isoliert werden. Die Markierungspunkte konnten nun durch eine Linie verbunden werden, die über die Außenseite des posterioren Augenbechers verlängert wurde. Daraufhin wurden die Augen mittels eines Skalpells oberhalb der *ora serrata* eingeschnitten. Anschließend wurde mit einer feinen Schere rundum geschnitten, bis sich der anteriore Augenbecher vollständig ablösen lies. Dieser wurde zusammen mit der Linse und dem Glaskörper verworfen. Der posteriore Augenbecher enthielt noch die Netzhaut, die erst nach der Fixierung vorsichtig herausgelöst wurde, um die Strukturhaltung zu gewährleisten. Zur späteren Unterscheidung von dorsaler und

ventraler Achse wurde die Netzhaut vor der Fixierung am dorsalen Achsenschnittpunkt durch einen leichten Einschnitt markiert.

3.3 Fixierungsbedingungen der Netzhaut

Die Fixierung ist abhängig von der Dicke der Netzhaut. Für die Analysen des Degenerationsverlaufs und die daraus resultierenden Veränderungen in der äußeren plexiformen Schicht wurde in 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH7,4) für 10-15 min bei Raumtemperatur fixiert. Diese an Wildtyp-Mäusen etablierte Fixierungszeit stellte sich auch bei den sehr jungen transgenen Mäusen im Alter von Pw4-12 als erfolgreich heraus. Abweichungen ergaben sich bei Rezeptor-Transmitterfärbungen der inneren plexiformen Schicht älterer Tiere, bei denen die Retinadicke um die Hälfte reduziert war. Dabei ist aber zu beachten, dass manche Antikörpergruppen sensitiver auf die Fixierungszeit ansprechen als andere. Beispielsweise zeigten GABA-Rezeptoren auch bei 10 minütiger Fixierung noch qualitativ gute Färbungen, wogegen AMPA- und Gly-Rezeptoren sogar bei nur 7 minütiger Fixierung nur sehr schwach oder negativ gefärbt waren. Durch Verkürzung der Fixierungszeit auf 5, höchstens 5:30 Minuten, waren auch Färbungen dieser sensitiven Antikörpergruppen positiv (Abb.4). Umgekehrt verhält es sich, wenn man Zellkörper anfärben möchte. Hier empfiehlt sich eine längere Fixierzeit. Beispielsweise wurden in der 5 min fixierten Retina mit GABA die Zellkörper der Amakrinzellen angefärbt. Die Dendriten, die bei der $CNGA3^{-/-}$ $Rho^{-/-}$ Maus in die INL hineinwachsen, waren aufgrund des starken Hintergrundes jedoch nicht sichtbar. Diese waren erst mit 7 min fixierter Retina erkennbar (Abb.30). Bei Beachtung dieser Fixierungszeiten können Fehlinterpretationen von Positiv- bzw. Negativ-Expressionen vermieden werden.

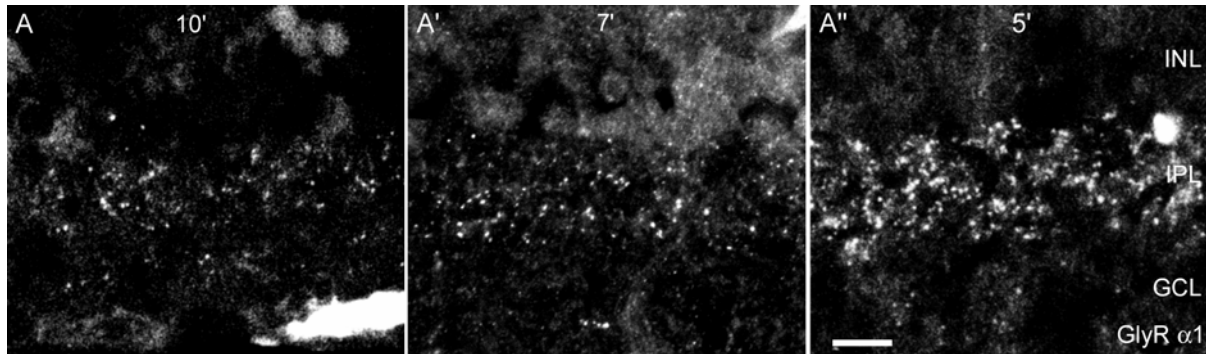


Abb. 4: GlyR α 1-Färbung auf Vertikalschnitten der Maus-Retina, wobei nur die innere Retina mit INL, IPL und GCL zu sehen ist. A: 10 min-Fixierung zeigt eine geringe Punktierungsdichte des GlyR α 1; A': erhöhte Punktierungsdichte gegenüber A bei 7 min-Fixierung; A'': zeigt mit einer Fixierungszeit von 5 min die zu erwartende Expressionsdichte vergleichbar dem Wildtyp (Abb.24 und 25 (kinesin); Abb.27 (GlyR) und Abb.28 (AMPA-R:GluR2/3)); Maßstab: 10 μ m

3.4 Histochemische Methoden

3.4.1 Immunhistochemie

3.4.1.1 Vorbereitung und Herstellung von Gefrierschnitten für die lichtmikroskopische Untersuchung

Nach dem Fixieren wurden die Augenbecher mindestens dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS gewaschen, um überschüssiges PFA zu entfernen. Danach wurde die Netzhaut mit Hilfe von zwei Präzisionspinzetten aus dem Augenbecher herausgelöst und zum Zwecke des Gefrierschutzes einer Saccharose-Verdünnungsreihe unterzogen. Dazu wurde sie für jeweils eine Stunde zunächst in 10%iger, dann in 20%iger und schließlich über Nacht bei 4°C in 30%iger Saccharose aufbewahrt, die zuvor mit 0,01% Natriumazid versetzt wurde (Keimschutz).

Zum Schneiden wurden die Retinae von der 30%igen Saccharose in das Einbettmedium (Kryomatrix) für Gefrierschnitte überführt und bei 4°C mindestens 15-30 Minuten inkubiert. Die Retinae wurden flach eingefroren und bei -15°C vertikal geschnitten. Von den 14 μ m dicken Schnitten wurden je drei auf einen Objektträger überführt. Zur Aufbewahrung wurden sie bei -24°C gelagert. Retinae, die nicht

direkt geschnitten wurden, wurden ebenfalls bei -24°C eingefroren und konnten so für mehrere Monate aufbewahrt werden.

3.4.1.2 Immunhistochemische Einzel-, Doppel- wie Dreifach-Färbungen für

lichtmikroskopische Analysen an vertikalen Gefrierschnitten

Die aufgetauten Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, um ein Abfließen der Antikörper-Inkubationslösung zu verhindern. Anschließend wurden sie für 3 mal 10 min in PBS gewaschen. Die Inkubationslösung setzt sich aus dem gewählten Antikörper, einem Chemiblocker (5%) und Triton (0,5%) in einer PBS-Lösung zusammen. Der Chemiblocker dient dabei der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, während Triton X-100 als Detergenz fungiert und die Lipidmembran permeabilisiert. Auf jeden Objektträger wurde 80 μl des Ansatzes aufgetragen. Dabei war es wichtig, die Schnitte unter feuchten Bedingungen zu inkubieren, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Direkt nach dem Waschen in PBS wurde die Inkubation mit dem Erst-Antikörper durchgeführt. Bei Zwei- oder Dreifach-Färbungen wurden die gewünschten Antikörper in Kombination gleichzeitig aufgetragen und über Nacht inkubiert. Der Sekundär-Antikörper wurde dann nach Abwaschen des Erst-Antikörpers im entsprechenden Verdünnungsverhältnis aufgetragen und aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit für 1h im Dunkeln inkubiert. Auch die Sekundär-Antikörper wurden bei Zwei- und Dreifach-Färbungen kombiniert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Kunstharz (Aqua-Poly/Mount) eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Analyse im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Verwendung von Öl zur mikroskopischen Analyse (Ölimmersionsobjektiv) empfiehlt sich erst nach vollständiger Trocknung des Eindeckmediums (mind. 24h), da ansonsten aufgrund einer Mischung beider Substanzen die Qualität der Präparate beeinträchtigt werden kann. Dank guter Antikörperqualität lassen sich die Präparate teilweise zwei Wochen bis zu mehreren Monaten aufbewahren. Auch hier gibt es große Unterschiede zwischen den einzelnen Antikörpern, beispielsweise weisen die Opsine JH455/492 (2. Material; Tab.4) eine hohe Beständigkeit auf.

3.4.1.3 Immunhistochemische Färbungen bei Gesamt-Retina-Aufsichtpräparaten

Die Gesamt-Retina-Aufsichtpräparate haben den Vorteil, dass sie sofort für Färbungen verwendet werden können. Die Durchführung einer Saccharose-Verdünnungsreihe ist nicht erforderlich, da die Retinae nicht am Gefriermikrotom geschnitten werden. Die Retina sollte gleichmässig geviertelt werden, wobei darauf zu achten ist, dass man den zentralen Bereich der Retina erhält. Wildtyp-Mäuse wurden parallel unter den gleichen Bedingungen verarbeitet. Der Unterschied zu Immunfärbungen bei Vertikalschnitten liegt in einer deutlich längeren Inkubationszeit, da der Antikörper mehr Zeit benötigt, um die gesamte Retina mit einer Dicke von 0,1-0,3 mm zu durchdringen. Eine Ausnahme stellten reine Photorezeptorfärbungen mit Opsinen dar, da diese direkt an der Oberfläche liegen. Die Inkubation fand ebenfalls bei Raumtemperatur statt. Der Erst-Antikörper wurde für 4 Tage inkubiert, der Zweit-Antikörper für 5 Stunden. Der sich anschließende Waschvorgang betrug für den Erst-Antikörper 1-2 Stunden und für den Zweit-Antikörper mindestens 5 Stunden. Vergleichbar den Vertikalschnitten sollte man vor mikroskopischer Ansicht mit Öl das Einbettmedium gut trocknen lassen.

3.4.1.4 Nutzung verschiedener Mikroskope zur anatomischen Analyse-

Konfokale Lichtmikroskopie für die quantitative Analyse

Zur lichtmikroskopischen Analyse wurde ein Zeiss Axiophot Mikroskop verwendet. An diesem konnten mittels einer CCD Kamera Digitalaufnahmen angefertigt werden (Spot 2, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan; Nomarski-Aufnahmen, Abb.7; 8). Desweiteren wurde ein konfokales Laserscanning Mikroskop (LSM5 Pascal, Zeiss) genutzt, welches mit einem Argon und Helium-Neon Laser ausgestattet ist. Dieses zuletzt genannte Mikroskop bot für die quantitative Analyse des Degenerationsvorgangs der Stäbchen- und Zapfenendigungen innerhalb der OPL einen großen Vorteil gegenüber einem gewöhnlichen Fluoreszenzmikroskop (Abb.13), da man genaue Schnittdicken festlegen konnte, wobei mehrere Ebenen über eine definitiv festgelegte Schnittdicke auf ein einzelnes Bild projiziert wurden. Dadurch, dass man weitere Präparate mit der gleichen Schnittdicke aufnimmt, erhält man gleiche Bedingungen. Zusätzlich verwendet man dieselbe Vergrößerung und denselben Zoom-Faktor, um äquivalente Aufnahmebedingungen zu schaffen. Zur

Auswertung der Dreifach-Färbungen wurde das Leica-Mikroskop (Leica TCS NT Konfokales Mikroskop; 2. Material; Tab.6) verwendet. Zur elektronenmikroskopischen Auswertung der Ultradünnschnitte wurde ein Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop (Zeiss) verwendet. Die Aufnahmen entstammen einer digitalen Gatan-Kamera.

Dank einer verfeinerten Kamera am EM Leo 912 AB OMEGA konnte mittels einer geringen Vergrößerung eine herausragende Auflösung erreicht werden. Diese wurde zur Anfertigung der Gesamt-Retina-Vertikal-Montage verwendet (Abb.1; C).

3.5 Elektronenmikroskopische Methoden

3.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Im Gegensatz zum Lichtmikroskop herrscht im Elektronenmikroskop ein Hochvakuum, was mit einer aufwendigeren Präparation verbunden ist. Diese beinhaltet eine Fixierung, eine Trocknung und eine Kontrastierung. Diese erfolgt mit einer Elementverbindung hoher Ordnungszahl, um die biologischen Strukturen in den nur 50-70 nm dicken Schnitten kontrastreicher erscheinen zu lassen.

3.5.2 Fixierungsbedingungen und Herstellung von Ultradünnschnitten für die elektronenmikroskopische Untersuchung

Zunächst wurden sehr kleine Gewebestücke der zentralen Retina von etwa 3x3, höchstens 5x5 mm Größe zurechtgeschnitten. Dies ist entscheidend für ein optimales Durchdringen der Lösungen. Die Gewebe wurden für 2 Stunden in einem Gemisch fixiert, zusammengesetzt aus 2% Glutaraldehyd mit 4% Paraformaldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer (CA) (pH 7,4). Direkt im Anschluss wurde das Gewebe drei mal ausreichend in 0,1M CA gewaschen und für 1-2 Stunden in 2%igem Osmiumtetroxid in 0,1M CA nachfixiert. Bevor das Gewebe in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90% und zweimal 100% für jeweils 15 Minuten) dehydriert wurde, wurde es nochmals dreimal in 0,1M CA vom Osmiumtetroxid freigewaschen. An diese vorausgegangene Aldehyd- und Osmiumsäurefixation wurde eine Blockkontrastierung mit Uranylacetat (2% UAC in 70% Ethanol) angeschlossen.

Hierdurch erhält man zusätzlich zur Kontrastierung eine Nachfixierung, die sich besonders positiv auf die Erhaltung von Membranstrukturen, Zellkontakten, DNA und Proteinen auswirkt. Um sicher zu gehen, dass die Retinastücke vollständig wasserfrei sind, wurden diese nach der Ethanolreihe nochmals für 2 x 5 Minuten in Propylenoxid gegeben. Danach wurde das Gewebe für eine halbe Stunde in ein Propylenoxid/Eponharz-Gemisch im Verhältnis 1:1 getaucht. Die Gefäße blieben geöffnet, so dass das Propylenoxid verdampfen konnte. Daraufhin wurde das Gewebe für zwei Stunden in frisches Eponharz überführt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt, so dass das Gewebe vollständig vom Harz durchdrungen werden konnte. Auch hierfür war die geringe Schnittgröße der Gewebe von Vorteil. Am nächsten Tag wurden sie in Förmchen mit frischem Epon eingebettet und für drei Tage zur Polymerisierung im 60°C Schrank aufbewahrt. Mittels eines Ultramikrotoms wurden Ultradünnschnitte angefertigt, die dann anschließend maschinell kontrastiert wurden.

4. Ergebnisse

Die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus zeigt bereits im Alter von acht Tagen (P8) einen Phänotyp. Äußere Stäbchensegmente werden nicht ausgebildet, da das Rhodopsin ein stabilisierendes Strukturprotein der Disks der äußeren Stäbchensegmente darstellt. Dagegen sind die äußeren Zapfensegmente bis Pw4/5 vorhanden. Der phänotypische Nachweis ist bildlich in Abbildung 5 dargestellt. In den letzten Jahren gelang eine molekulare Analyse integraler Membranproteine durch die Separierung von Diskmembranen und der Plasmamembran der Stäbchen und Zapfen. Dies diente der Aufklärung der Phototransduktion, der Charakterisierung von Strukturproteinen und deren Metabolismus und der Analyse von retinalen Degenerationsdefekten (Farber und Danciger, 1997; Molday, 1998). Für die äußeren Stäbchensegmente wurde der Rho4D2-Antikörper (Molday, 1998; generiert von David Hicks) verwendet. Dieser bindet an ein Epitop nahe dem N-Terminus von Rhodopsin. In der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus ist keine Expression mit Rho4D2 nachweisbar (Abb.5; A'), während in der Wildtyp-Maus die Außensegmente markiert werden (Abb.5; A). Diese sind am achten postnatalen Tag noch sehr kurz. Der zweite Defekt betrifft den CNG3-Kanal der Zapfen. Diese zyklischen Nukleotid-Kanäle (CNGC) sind nicht-selektive Kationen-Kanäle, die eine aus α - und β - Untereinheiten zusammengesetzte tetramere Struktur ausbilden, welche mit einer intrazellulären Liganden-Bindungsdomäne assoziiert ist. Die Kanäle werden von drei Genen kodiert und unterteilen sich in einen CNG1-Kanal (Außensegmente der Stäbchen-Photorezeptoren), einen CNG2-Kanal (Geruchsepithelium) und einen CNG3-Kanal (Außensegmente der Zapfen-Photorezeptoren). Zur Markierung des CNG3-Kanals wurde der mCNG3-Antikörper verwendet (Hirano *et al.*, 2000), der die äußeren Segmente der Zapfen anfärbt (Abb.5; B). In der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus ist keine Expression nachzuweisen (Abb.5; B').

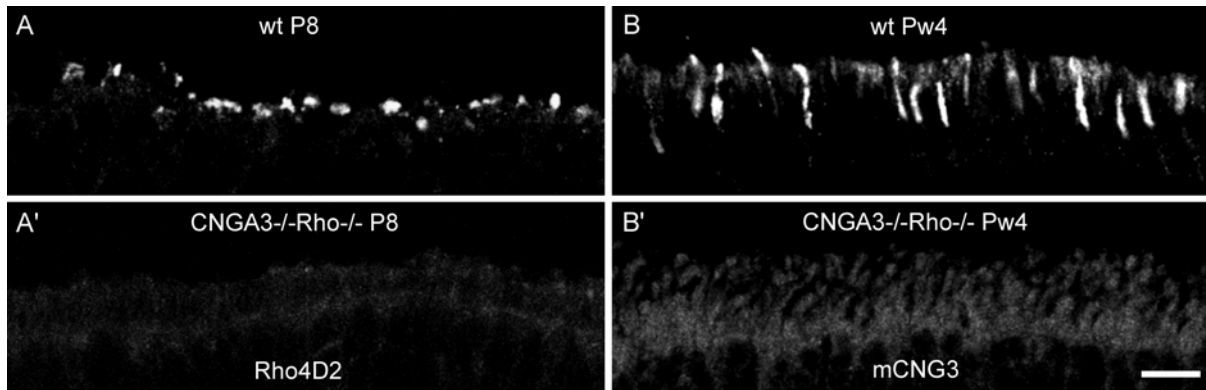


Abb.5: Phänotypisierung der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus

A: Wildtyp (P8); Rho4D2-Färbung; Markierung der äußeren Stäbchensegmente (sehr kurz zum Zeitpunkt P8);
A': CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (P8): negative Färbung mit Rho4D2 (keine Ausbildung äußerer Stäbchensegmente);
B: Wildtyp (Pw4); mCNG3-Färbung; Markierung der äußeren Zapfensegmente; **B':** CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (Pw4): negative Färbung mit mCNG3; Maßstab: 10 µm

4.1 Photorezeptordegeneration führt zur Akkumulation des fibrillären Gliaproteins in den Müllerzellen

In bisherigen Maus-Modellen, die degenerierende Photorezeptoren aufwiesen, wurde eine Akkumulation des fibrillären Glia-Proteins (GFAP= *glial fibrillary acidic protein*) in den Müllerzellen beobachtet. Die GFAP Immunoreaktivität ist proportional zum Grad des Photorezeptordefekts (de Raad *et al.*, 1996). Dieses Protein wird normalerweise in Astrozyten exprimiert. (*Ratten-Retina*; Eisenfeld *et al.*, 1984). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Müllerzellen GFAP Immunoreaktivität zeigen, unabhängig davon, ob die Degeneration der Photorezeptoren genetischen Ursprungs ist oder experimentell induziert wurde. Abbildung 6 verdeutlicht den Unterschied der GFAP-Expression in der Wildtyp-Maus und der Doppelmutante. In der Wildtyp-Maus ist GFAP ausschließlich in den Astrozyten exprimiert (Abb.6; A'), wohingegen bei der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus schon nach wenigen Wochen eine GFAP-Akkumulation in den Müllerzellen zu beobachten war (Abb.6; A).

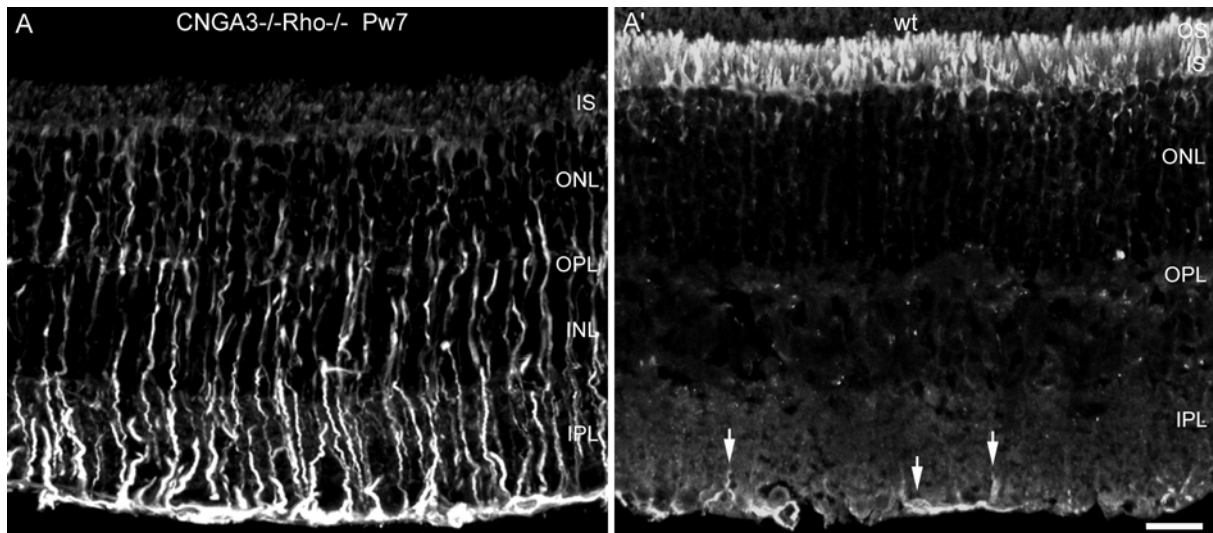


Abb.6: GFAP-Immunoreaktivität

A: CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (Pw7) exprimiert GFAP in den Müllerzellen; **A':** wt zeigt keine Expression von GFAP in den Müllerzellen; Astrozyten sind mit Pfeilen angedeutet; Maßstab: 20 µm

4.2 Degenerationsverlauf der Photorezeptoren

Der Verlust der Photorezeptoren der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus vollzieht sich in den ersten zehn bis zwölf postnatalen Wochen (Abb.7). Bereits mit Pw4 nimmt die Degeneration ihren Verlauf. Die Anzahl der Photorezeptoren hat sich auf 8-10 Reihen reduziert. Der Wildtyp weist entsprechend 10-12 Reihen auf. Der größte Einbruch ist zwischen Pw7 (7 Reihen) und Pw8,4 (2-3 Reihen) zu verzeichnen. Interessanterweise ist in den vorausgegangenen drei Wochen (Pw4-7) eine weitgehende Stagnation zu beobachten, bei der nur eine Reihe schwindet. Dieser Zeitraum ist durch bemerkenswerte morphologische Veränderungen gekennzeichnet, die in Abschnitt 4.7 ausführlich beschrieben werden (Abb.18, 19). Im Entwicklungsstadium Pw10 sind nur noch vereinzelt Kerne nachweisbar (Abb.7). Ebenso sind noch vereinzelt Somata der Zapfen in sehr alten Mäusen (Pm8-12) zu finden. Diese sind aber aufgrund ihrer äußerst geringen Anzahl zu vernachlässigen. Die innere Retina bleibt über einen langen Zeitraum unbeeinflusst. Dies zeigt sich in einer strukturell gut erhaltenen Schichtung in INL, IPL und Ganglienzellen mit 12 Monaten (Pm12; Abb.8; C). Die Einzelmutante Rho^{-/-} ist nicht abgebildet, weist aber einen analogen Degenerationsverlauf und somit eine Morphologie vergleichbar der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus auf. Die Einzelmutante CNGA3^{-/-} zeigt selbst im Alter von 11 Monaten (Pm11) eine dem Wildtyp weitgehend vergleichbare Morphologie (nur die Zapfen degenerieren; Abb.8; B). Dies veranschaulicht, dass ein Rhodopsindefekt, der gezielt nur die Stäbchen trifft,

sekundär auch die Zapfen in Mitleidenschaft zieht ($CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ und $Rho^{-/-}$), umgekehrt aber ein Zapfendefekt, die Stäbchen unberührt lassen kann ($CNGA3^{-/-}$).

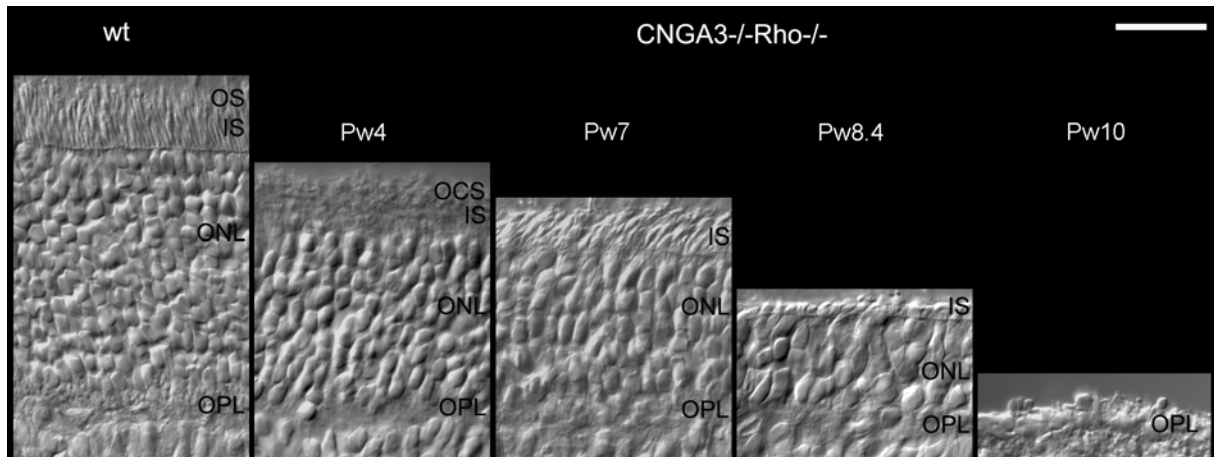


Abb.7: Photorezeptor-Degenerationsverlauf der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus im Vergleich zum wt

Die Abkürzungen bedeuten:

OS: *outer segments* ; äußere Segmente;

OCS: *outer cone segments* ; äußere Zapfen-Segmente;

IS: *inner segments* ; innere Segmente;

ONL: *outer nuclear layer* ; äußere nukleäre Schicht;

OPL: *outer plexiform layer*; äußere plexiforme Schicht.

Die Photorezeptordegeneration hat zum Zeitpunkt Pw4 ihren Verlauf begonnen und kommt bis Pw10-Pw12 (Pw12 nicht dargestellt) zum Erliegen. Maßstab: 25 μ m

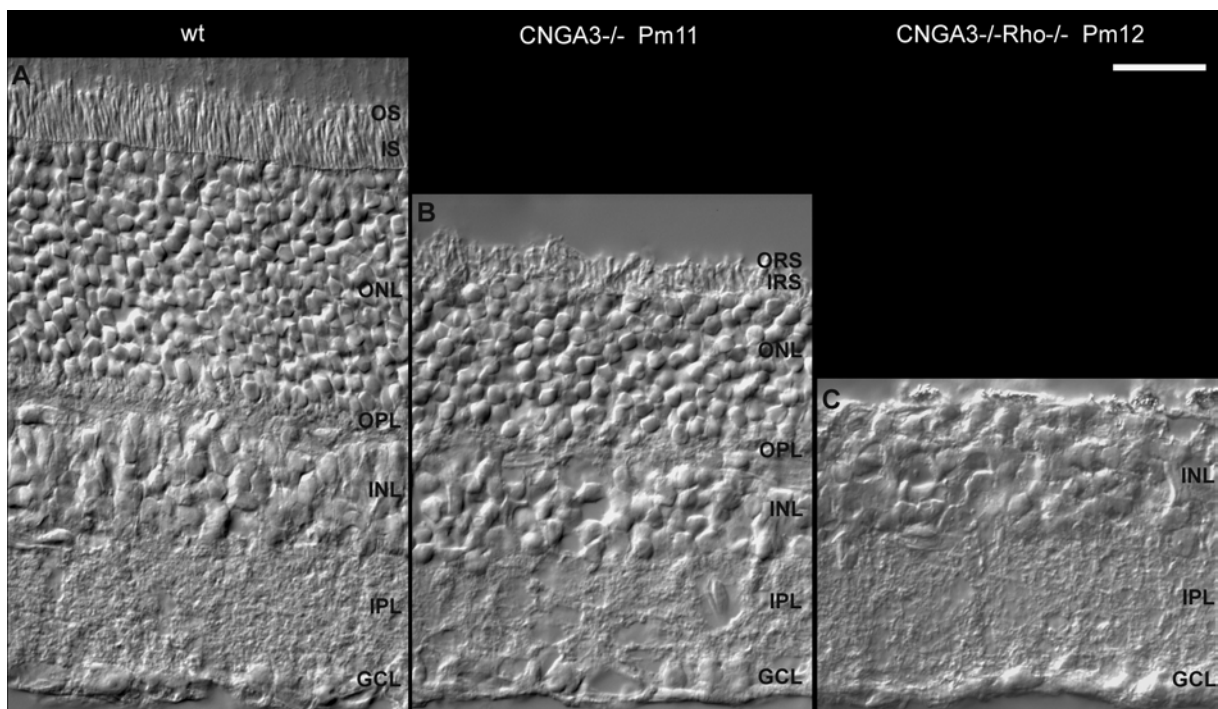


Abb. 8: Schichtung der CNGA3^{-/-} - und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} -Retinae im Vergleich zur Wildtyp-Retina

A: Wildtyp zeigt vollentwickelte Segmente (**ultrastrukturelle Darstellung; Abb.1**); ONL besteht aus 12 Reihen von Photorezeptorkernen; **B:** CNGA3^{-/-} Maus (**Pm11; Pm: postnatal month**) weist nur noch innere und äußere Stäbchensegmente (**IRS: inner rod segments; ORS: outer rod segments**) auf; Zapfen sind degeneriert; ONL besteht aus ungefähr 9 Reihen von Photorezeptorkernen; **C:** CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (**Pm12**) besteht nur noch aus einer inneren Retina, deren strukturelle Schichtung in INL, IPL und GCL jedoch gut erhalten ist; Maßstab: 25 µm

4.3. Arretierte Kernwanderung der Zapfen in der frühen postnatalen Entwicklung und strukturelle Plastizität der Zapfenendfüßchen

In der frühen postnatalen Entwicklung wandern die Photorezeptorkerne der Zapfen vertikal in Richtung Segmentschicht (wt; Abb.9; A und C). Im Wildtyp befinden sich bereits zum Zeitpunkt P8 die Mehrheit aller Kerne in der oberen Hälfte der ONL. Dagegen bleiben bei der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus viele Kerne auf der Höhe der OPL lokalisiert. Nur vereinzelt sind sie in die innere Hälfte der ONL gewandert, ohne aber die äußere Hälfte der ONL zu erreichen (Abb.9; A'). Zum Zeitpunkt Pw7 sind die Kerne der rot-grün-sensitiven (Abb.9; B) und blau-sensitiven Zapfen (Abb.9; B') auf der Höhe ihrer Zapfenendfüßchen lokalisiert. Die CNGA3^{-/-} -Retina zeigt dagegen eine dem Wildtyp vergleichbare Lokalisation aller Zapfenkerne in der äußersten Schicht der ONL (Abb.9; C, C'). Auch in der Rho^{-/-} Maus zeigt die Mehrheit aller Kerne wie der Wildtyp und die CNGA3^{-/-} Maus eine normale Lokalisation der Kerne (Abb.9; C''). Nur vereinzelte Kerne sind fehllokalisiert.

Demnach liegt die Vermutung nahe, dass der Wanderungsprozess der Zapfenkerne gestört ist, wenn sowohl Zapfen als auch Stäbchen einen Defekt tragen. Neben diesem Wanderungsdefekt zeigt die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus weitreichende Fortsätze, sogenannte Filopodien, an ihren Zapfenendfüßchen (Abb.10). Um hiervon eine optimale Darstellung zu erlangen, wurden Gesamt-Retina-Aufsichtpräparate angefertigt (Abb.10; A). In Abbildung 10B ist ein Wildtyp in Vertikalansicht zu sehen, der vergleichend nur sehr kleine Filopodien ausbildet. Rechts daneben zeigt die CNGA3^{-/-} Maus im Alter von Pm5 (Abb.10; C) riesige Zapfenendfüße. Darüber hinaus bildet sie aber auch Zapfenendfüßchen von normaler Größe aus, vergleichbar dem Wildtyp. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Zapfen im Laufe ihres degenerativen Prozesses proportional zur abnehmenden Zapfendichte

größere Endfüsse ausbilden, um die zelluläre Interaktion aufrecht zu erhalten. Diese Erklärung scheint auch für die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus plausibel.

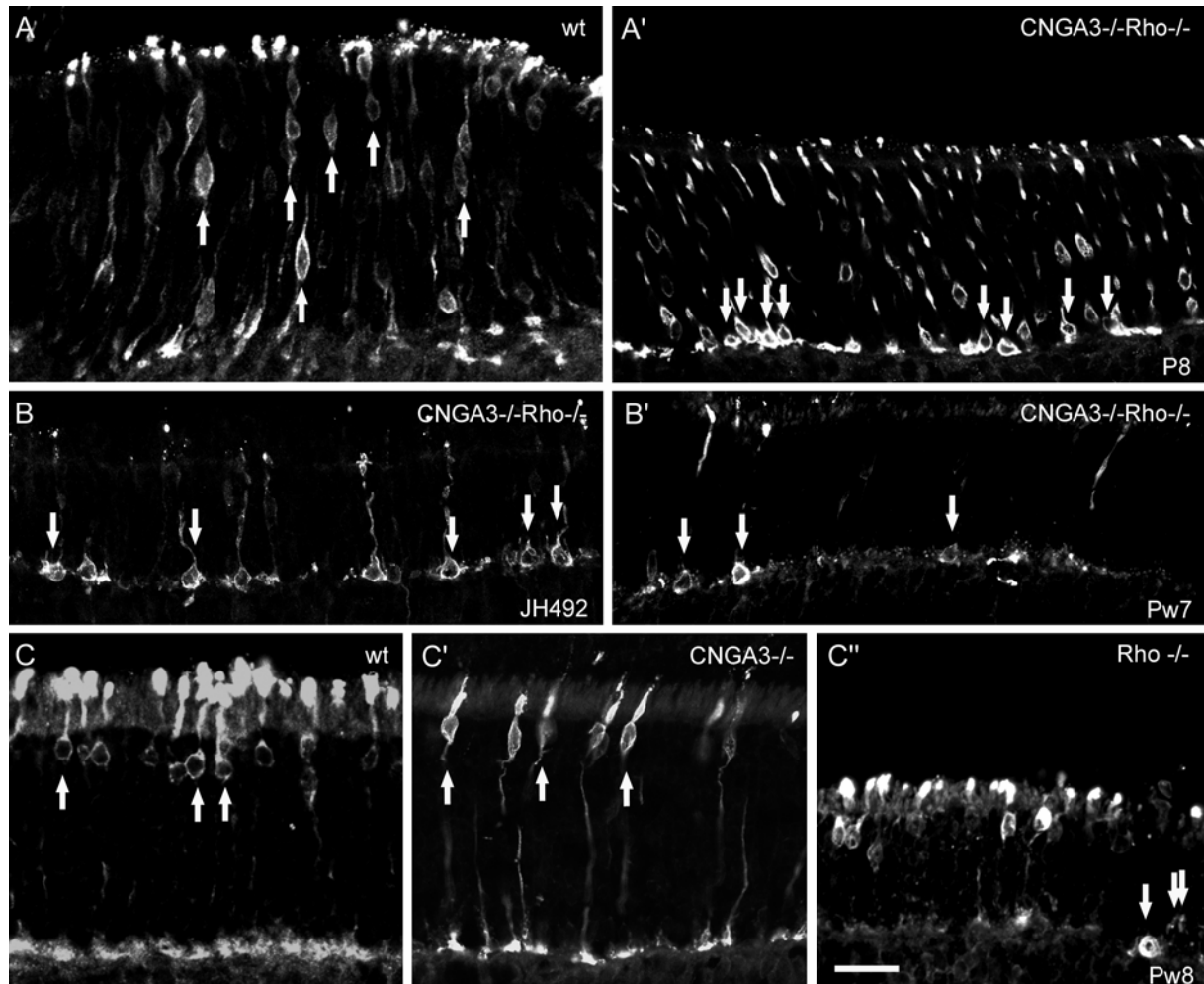


Abb.9: Photorezeptorkernwanderung in der frühen postnatalen Entwicklung.

A und A': Wildtyp (A) und $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus (A') zum Zeitpunkt P8; blauer Zapfenmarker JH455, Kerne haben nur im Wildtyp die obere Hälfte der ONL erreicht; **B und B'**: keine Wanderung der rot-grünen (B) und blauen (B') Zapfen bei der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus zum Zeitpunkt Pw7; **C und C'**: Wildtyp (C) und die Einzelmutante $CNGA3^{-/-}$ (C') zeigen eine normale Lokalisation; **C''**: die $Rho^{-/-}$ Maus zeigt 4 Kerne, die die äußere ONL erreicht haben und einen, der auf der Höhe der OPL liegt (**Pfeil**); die Pfeile rechts daneben deuten auf Netzwerkbildungen hin, die vom Zapfenendfüßchen ausgehen. Alle Färbungen, Ausnahme **B (JH492; M-Opsin)**: rot-grüner Zapfenmarker), wurden mit dem blauen Zapfenmarker (**JH455; S-Opsin**) durchgeführt; der Wanderungsprozess ist aber, wie in **B und B'** beschrieben, in beiden Zapfentypen gestört; Maßstab: 20 μ m

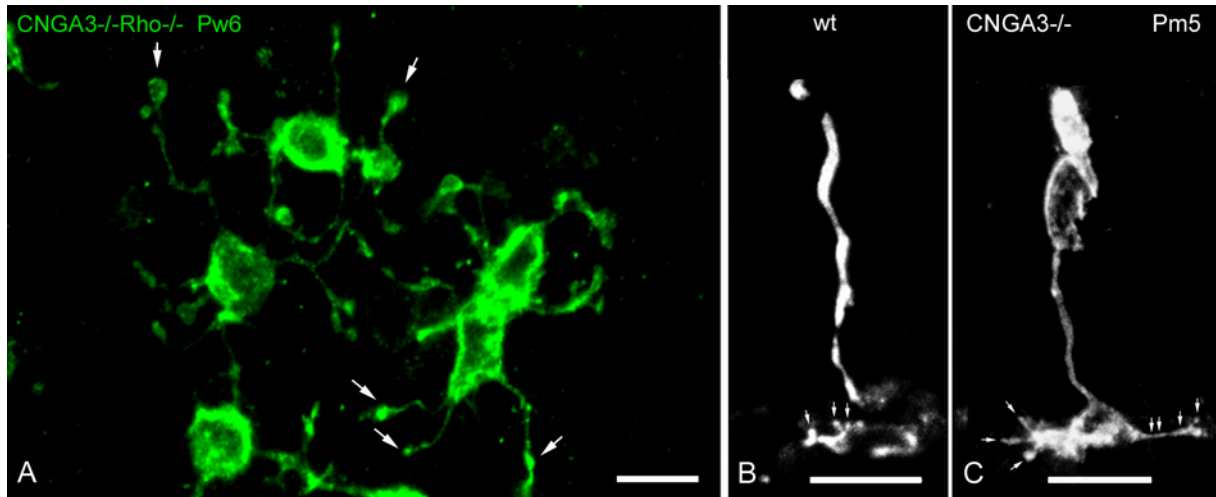


Abb.10: Ausbildung vergrößerter Zapfenendfüße in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ (Pw6) und der $CNGA3^{-/-}$ Maus (Pm5)

Angefärbt sind die blau-sensitiven Zapfen in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus mit dem M-Opsin JH455. Diese bilden weitläufige Filopodien-Ausläufer (A, Aufsichtpräparat). Dies zeigt auch die $CNGA3^{-/-}$ Maus in Vertikalansicht (C). Der Wildtyp hat die gleiche Zapfenendfüßchengröße wie die $CNGA3^{-/-}$ Maus, wirkt aber aufgrund der kurzen Filopodien kleiner (B). Maßstab: 10 μm in A, B und C.

4.4 Beschleunigter Degenerationsverlauf von Zapfen auf der ventralen gegenüber der dorsalen Retinaseite : Beobachtungen in der Einzelmutante $CNGA3^{-/-}$

Einleitend wurde bereits erwähnt, dass Mitte der 90er Jahre bei rd-Mäusen, ein Degenerationsgradientenfälle bezüglich der Zapfen beobachtet wurde. Nachdem auf der ventralen Seite keine oder nur wenige Photorezeptoren nachweisbar waren, war die Populationsdichte dorsal noch relativ stabil. Untersucht und bestätigt wurde dies für die Zapfen in der $CNGA3^{-/-}$ Einzelmutante im Alter Pm5 (Abb.11). Hier sieht man, dass die blau- und rot-grün-sensitiven Zapfen auf der ventralen Retinaseite nur noch vereinzelt detektierbar sind (Abb.11; A', B'), während auf der dorsalen Retinaseite beide noch eine hohe Dichte aufweisen (Abb.11; A, B). Da die Verteilungsdichte der blau-sensitiven Zapfen auf der ventralen gegenüber der dorsalen Seite erhöht ist (Szél *et al.*, 1993), scheinen diese gegenüber den rot-grün-sensitiven Zapfen degenerationsanfälliger zu sein. Diese ungleichmäßige Degenerationsrate über der Dorso-Ventralachse konnte auch bei einigen Formen der humanen *retinitis pigmentosa* gefunden werden (Newsome, 1988), bei denen vergleichbar der $CNGA3^{-/-}$ Maus, die ventrale Hemisphäre zunächst stärker betroffen ist (Massof und Finkelstein, 1981; Stone *et al.*, 1991).

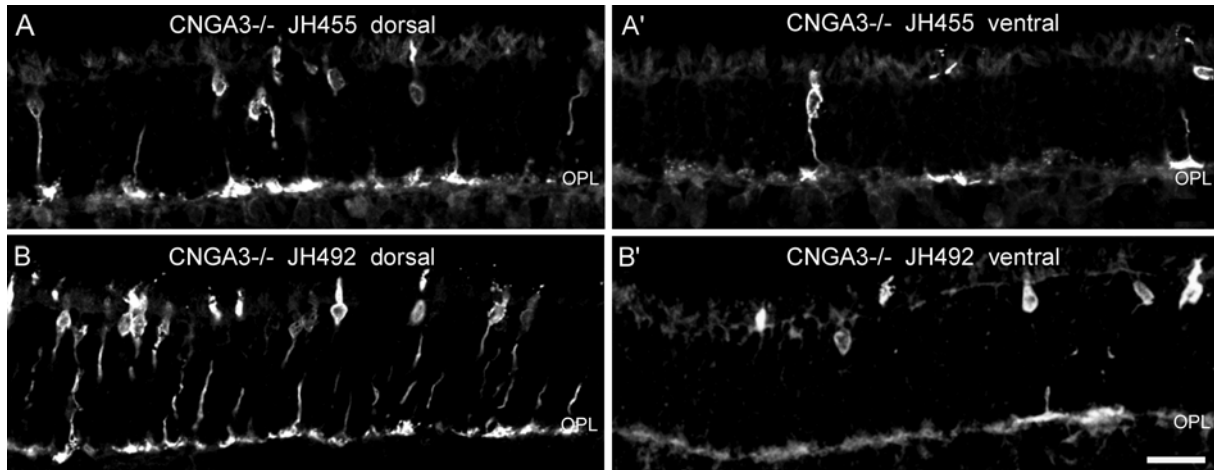


Abb.11: Degenerationsverlauf der Zapfen über der Dorso-Ventralachse bei der CNGA3^{-/-} Einzelmutante im Alter von Pm5

Angefärbt wurden die blauen (JH455 in A; dorsal, A'; ventral) und die rot-grünen Zapfen (JH492 in B; dorsal, B'; ventral). Beide Zapfentypen zeigen eine geringere Dichte auf der ventralen Retinaseite. Maßstab: 20 µm

4.5 Auswirkung der Photorezeptordegeneration auf die äußere plexiforme Schicht

Die Ausbildung synaptischer Kontakte zwischen Photorezeptorterminalien, Horizontalzellausläufern und den Dendriten der Bipolarzellen verläuft in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus zunächst normal. Doppel-Immunfärbungen mit dem Off-Bipolarzellmarker Neurokinin-Rezeptor 3 (NK3R, Haverkamp *et al.*, 2003) und bassoon, einem Antikörper, der den präsynaptischen Bandkomplex in Stäbchen- und Zapfenendigungen färbt (Brandstätter *et al.*, 1999), zeigen sowohl im Wildtyp als auch in der mutanten Maus an Stäbchenendigungen und Zapfenendfüßchen eine Markierung (Abb.12). Mit Pw10 ist kaum noch eine charakteristische basson-Färbung zu finden, da zu diesem Zeitpunkt keine intakten synaptischen Bänder in Stäbchen- und Zapfenendigungen mehr zu finden sind (Abb.12; A5). Die Off-Bipolarzellen ziehen zu diesem Zeitpunkt ihre Dendriten zurück. Bemerkenswert ist die Rho^{-/-} Maus (Abb.12; A7), die verglichen mit der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus, im gleichen Alter von Pw7 (Abb.12; A4) deutliche Unterschiede zeigt. Die Dendriten der OFF-Bipolarzellen kontaktieren die Stäbchenendigungen (vergrößerter Ausschnitt). Es ist sehr wahrscheinlich, dass zusätzliche Synapsen

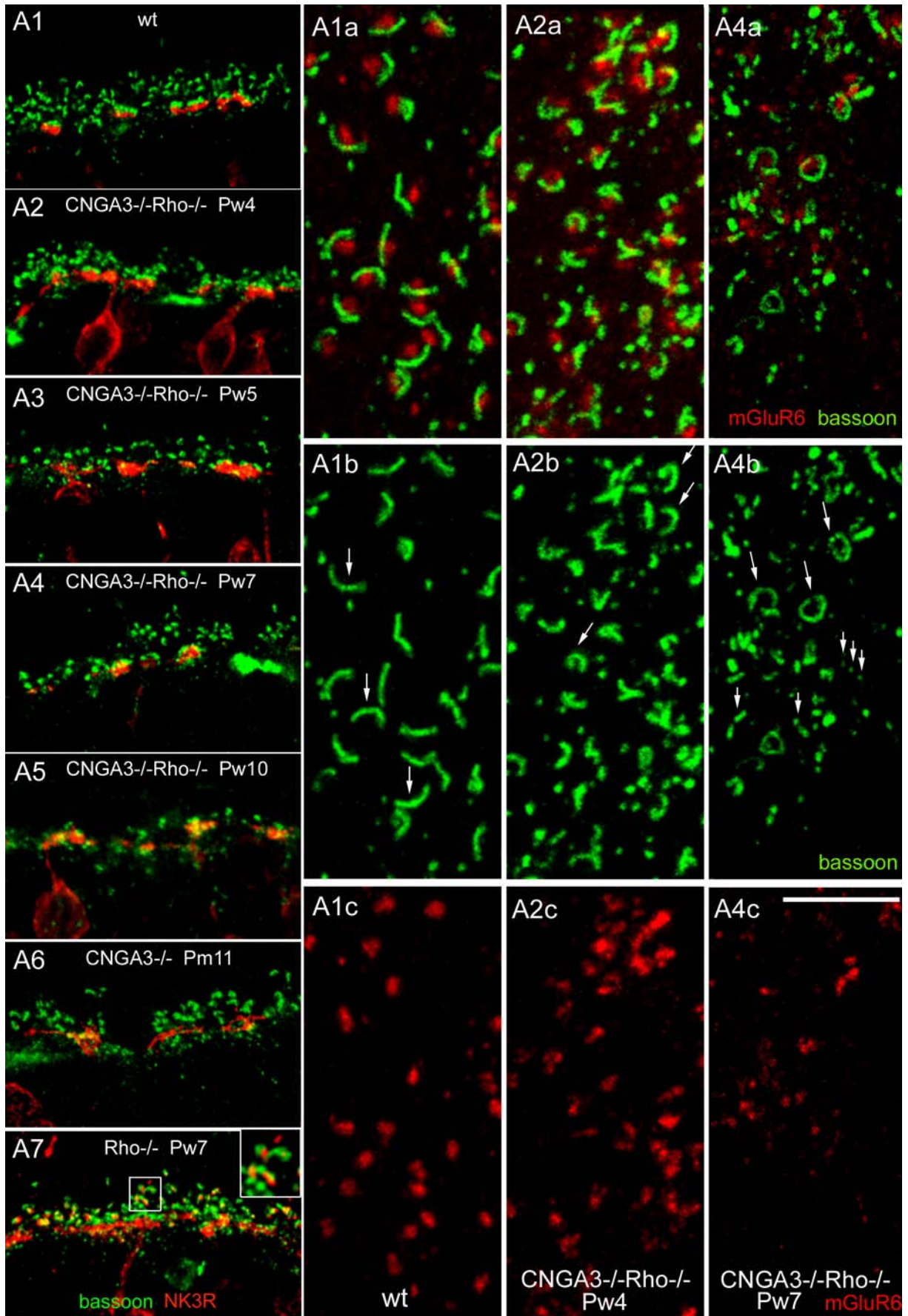


Abb.12: Qualitative Analyse der äußeren plexiformen Schicht

A1-A7: NK3R-bassoon-Doppelfärbung

A1: Wildtyp, gefärbt mit NK3R (OFF-Bipolarzelle) und bassoon (bindet präsynaptisch an Bandsynapsen von Stäbchen- und Zapfenendigungen), zeigt eine charakteristische bassoon-Lokalisation an den Zapfenendigungen sowie 4-6 Reihen an den Stäbchenendigungen; **A2-A5:** CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus; Entwicklungsreihe von Pw4-Pw10; **A2-A4:** CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus zeigt eine bassoon-Färbung an den Zapfenendigungen von Pw4-Pw7; die Dichte der Stäbchenendigungen nimmt mit zunehmendem Alter ab, bereits mit Pw4 (**A2**) sind nur noch 3-4 Reihen von Stäbchenendigungen vorhanden; **A5:** CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im Alter von Pw10 zeigt keine charakteristische bassoon-Struktur mehr; die OPL ist stark degeneriert, ultrastrukturell (nicht dargestellt) sind keine charakteristischen Bandsynapsen mit postsynaptischen Fortsätzen mehr nachweisbar; **A6:** CNGA3^{-/-} Maus mit degenerierten Zapfenendigungen, ohne bassoon-Bindung; Stäbchenendigungen sind hingegen intakt; **A7:** Rho^{-/-} Maus: Off-Bipolarzell-Dendriten kontaktieren Stäbchenendigungen (Ausschnitt: zweifache Vergrößerung). Rechts daneben sind drei der in Vertikalansicht beschriebenen Entwicklungsstadien wieder aufgegriffen und als Gesamt-Retina-Aufsichtpräparate (bassoon (grün): präsynaptisches Element; mGluR6 (rot): postsynaptisches Element) dargestellt: **A1a, A2a und A4a:** Doppelfärbungen; **A1b, A2b und A4b** (Einzelfärbungen mit bassoon) zeigen deutlich die strukturelle Veränderung der bassoon-Struktur; Wildtyp (A1b): offene Ringstruktur (**Pfeile**); CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus Pw4 (A2b): viele Ringstrukturen (**Pfeile**), wenn auch deutlich kleiner als im Wildtyp; CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus Pw7 (A4b): vereinzelt geschlossene Ringstrukturen nachweisbar (**Pfeile**); viele sind aber stark degeneriert und größtenteils nur noch als kurze Stäbchen oder Punkte nachweisbar (**kleinere Pfeile**). **A1c, A2c, A4c** (Einzelfärbungen) mGluR6 degeneriert proportional zum präsynaptischen Element bassoon mit steigendem Entwicklungsalter; Maßstab: Aufsichtpräparate: 5 µm, Vertikalschnitte: 15 µm

ausgebildet werden, was ultrastrukturell noch nachgewiesen werden muss. Abweichungen zeigt die CNGA3^{-/-} Maus, die im Alter von Pm11 keine charakteristischen Zapfenendfüßchen mehr aufweist. Bassoon war nicht mehr an den durch NK3R noch schmal markierten Bändern detektierbar (Abb.12; A6). Dies deutet darauf hin, dass alle synaptischen Bänder der Zapfenendigungen degeneriert sind, die der Stäbchenendigungen aber unbeeinflusst bleiben. Die in Abbildung 12, A1a-A4c dargestellten Aufsichtpräparate zeigen deutlich, wie die charakteristische hufeisenförmige Struktur der durch bassoon markierten Bänder verloren geht (**Pfeile**). Diese sind nach und nach nur noch als Punkte sichtbar, bis sie dann vollständig verschwinden. Zusätzlich wurde für diese Färbungen der metabotrope Glutamat-Rezeptor (mGluR6) verwendet, der im Gegensatz zu bassoon postsynaptisch lokalisiert ist, aber vergleichbar bis Pw7 eine Expression in relativ hoher Dichte zeigt (Abb.21; mGluR6).

4.5.1 Quantitative Analyse der OPL im Zeitraum Pw4-Pw7

Für die quantitative Analyse der Vertikalschnitte wurden die Retinae von Wildtypen im Alter Pw4, Pw5 und Pw8, und von CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Mäusen im Alter Pw4, Pw5 und Pw7 verwendet. Darüber hinaus wurden für Pw5 und Pw7 Aufsichtpräparate angefertigt. Für jedes Altersstadium wurden sowohl für die Vertikal- als auch für die Aufsichtpräparate jeweils 10-15 Areale ausgewertet (Abb.13; A, B). Auszählungen ergaben, dass der Wildtyp erst mit Pw7/8 eine ausgereifte OPL mit einer synaptischen Dichte von 100% zeigt (mit Pw4: 77%). Somit gelten für die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Mäuse unterschiedliche Referenzwerte. Bei den Aufsichtpräparaten (Abb.13) wurden ebenfalls Wildtyp-Mäuse unterschiedlichen Alters ausgezählt. Diesmal wurde ein Mittelwert gebildet und dieser als Bezugswert für die Pw5- und Pw7-Stadien (Pw4 fehlt) der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Mäuse verwendet. Diese entsprechen nahezu den Prozentauswertungen der Vertikalschnitte. Die Abbildung C zeigt eine qualitative Darstellung der synaptischen Bänder, die sich aus A' und B' ergibt. In A' und B' wurden alle Strukturen (charakteristische Hufeisenstrukturen sowie Punkte) mitgezählt. Da aber davon auszugehen ist, dass nur die Strukturen funktionell aktiv sein können, die noch eine Ringstruktur zeigen, was auch mit dem Vorhandensein synaptischer Bänder verbunden ist, wurden diese aus A' und B' nochmals separat gezählt. Als Ergebnis ist festzuhalten, dass im Alter Pw4 25%, im Alter Pw5 18%, und im Alter Pw7 nur 10% eine charakteristische Ringstruktur zeigen.

Es ist noch zu erwähnen, dass das früheste untersuchte Stadium Pw4 der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus meinerseits als „normal“ bezeichnet wird. Der Grund dafür ist, dass intakte Synapsen ausgebildet werden und diese auch bis Pw7/8 in der OPL nachweisbar sind. Diese Entwicklung ist im Vergleich zu bisher beschriebenen rd-Mäusen ungewöhnlich, denn die rd-Maus weist zu diesem Zeitpunkt keine Photorezeptoren mehr auf und damit verbunden auch keine intakten synaptischen Strukturen innerhalb der OPL (Jiménez et al., 1996). Es ist aber festzuhalten, dass die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus niemals, auch nicht zwischen Pw1-4 die Dichte an synaptischen Bändern innerhalb der OPL hervorbringt wie der Wildtyp. Frühere Entwicklungsstadien wurden nicht eingehend untersucht. Da die qualitativen Analysen ergaben, dass selbst die äußere plexiforme Schicht der Wildtyp-Retina erst im Alter Pw7-8 ausgereift, und auch erst dann als adult zu bezeichnen ist, wird deutlich, dass dieser

Zustand bei der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus nicht erreicht wird. Die qualitativen Untersuchungen veranschaulichen dies durch den Vergleich A1b und A2b in Abb.12 im Alter Pw4: In A2b fallen zunächst die relativ deutlichen Ringstrukturen auf. Dies ist Absicht, ein schöner Ausschnitt wurde hier meinerseits ausgewählt. Bei genauerer Betrachtung sieht man danebenliegend Strukturen, die keine Ringe mehr zeigen, sondern sich durch Punkte darstellen. Diese zeigen die bereits dezimierte Dichte der Triaden im Alter Pw4 an. Auch die Nomarski-Abbildung (Abb.7) veranschaulicht dies: Die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus hat im Alter Pw4 bereits drei Reihen an Photorezeptoren verloren. Tatsache ist jedoch, dass die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus ein Photorezeptordegenerationsmodell mit zeitlich verzögerter Degeneration repräsentiert, welches synaptisch intakte Strukturen aufweist. Dies ermöglicht eine genaue Beobachtung der degenerativen Phase und den damit verbundenen morphologischen Veränderungen.

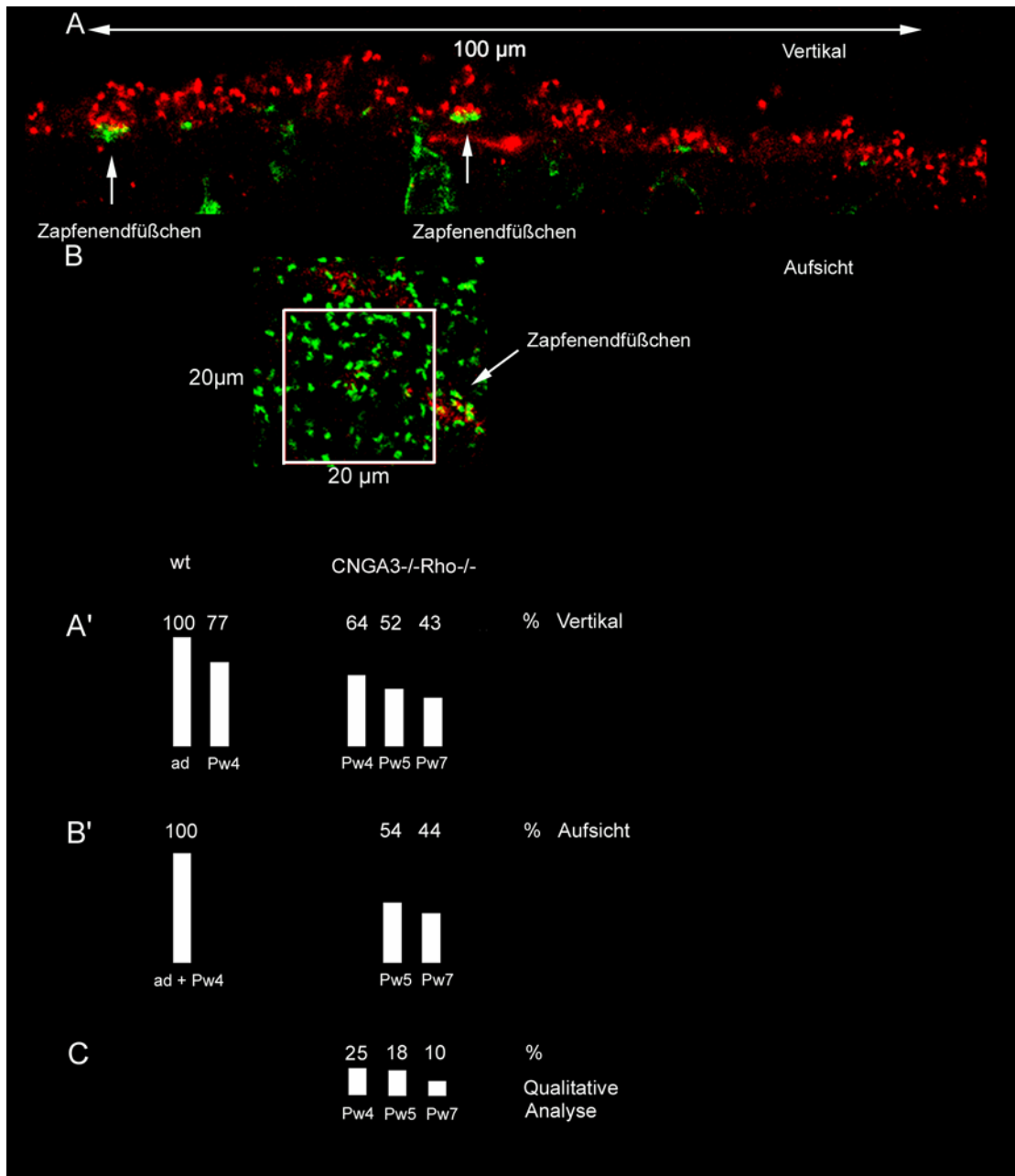


Abb.13: Quantitative Analyse

A: Vertikalschnitt; bassoon (**rot**) färbt die synaptischen Bänder der Stäbchenendigungen und der Zapfenendfüßchen, NK3R (**grün**) markiert zusätzlich die Zapfenendfüßchen; Auszählungen über 100 µm Länge; **B:** Aufsichtpräparate; angefärbt wie in **A**; Auszählungen der synaptischen Bänder über 20 x 20 µm Fläche, Zapfenendfüßchen über 100 x 50 µm Fläche (nicht dargestellt); Die dargestellten Säulendiagramme in **A'**, **B'** und **C** beziehen sich auf die synaptischen Bänder von Stäbchenendigungen und Zapfenendfüßchen, separat wurde die Dichte der Zapfenendfüßchen bestimmt, welche mit NK3R morphologisch erkennbar sind. Da im auserwählten Zeitraum von Pw4-Pw7 noch alle Zapfenendfüßchen mit NK3R nachweisbar sind, ist die Dichte vergleichbar dem Wildtyp noch stabil (keine graphische Darstellung). Dieser noch unbeeinflusste Bestand der Zapfenendfüßchen schließt allerdings nicht aus, dass die Dichte der synaptischen Bänder innerhalb eines Zapfenendfüßchens schon reduziert ist. Letztere Auswertung ist in den Säulendiagrammen inbegriffen. In **A** und **B** ist die NK3R als Doppelfärbung mit bassoon belassen worden, da dies die Markierung der Zapfenendfüßchen zusätzlich stützt; **A'**: Quantitative Auswertung aller synaptischen Bänder innerhalb der OPL in

Vertikalschnitten; **B'**: Quantitative Auswertung aller synaptischen Bänder innerhalb der OPL in Aufsichtpräparaten; **C**: Qualitative Auswertung aller synaptischen Bänder innerhalb der OPL

4.5.2 Ultrastrukturelle Beobachtungen an den Stäbchen- und Zapfenendigungen in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass in der Doppelmutante Stäbchenendigungen mit einer Triade und Zapfenendigungen mit multiplen Triaden, wie sie auch in der normalen Maus ausgebildet werden, vorhanden sind (Abb.14; A, D). Zusätzlich konnte bei einer Vielzahl der noch vorhandenen Stäbchenendigungen eine Zunahme synaptischer Bänder und postsynaptischer Elemente beobachtet werden (Abb.14; B, C). Diese synaptische Plastizität innerhalb der Stäbchenendigungen wurde bereits in der *rds-* (*retinal degeneration slow*) Maus als Folge des reduzierten Lichteingangs der postsynaptischen Elemente beschrieben (Jansen und Sanyal, 1987). Mit zunehmender Degeneration der Stäbchenendigungen grenzen die Zapfenendfüßchen direkt an die Photorezeptorkerne (Abb.14; E).

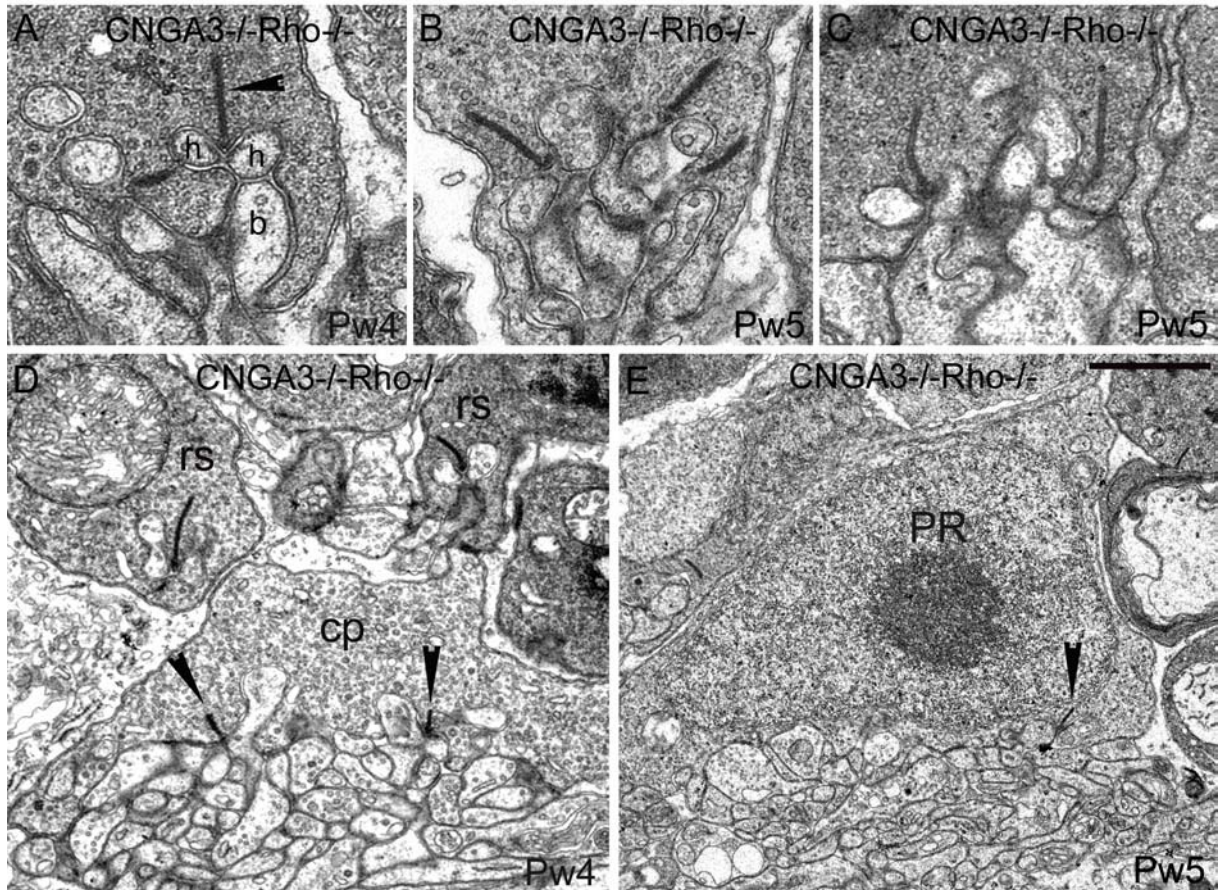


Abb.14: Akkumulation synaptischer Bänder und postsynaptischer Elemente innerhalb einer Stäbchenendigung: Elektronenmikroskopische Darstellung von Vertikalschnitten der Stäbchenendigungen und Zapfenendfüßchen in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus. **A:** Charakteristische Triade (Pw4), bestehend aus einer präsynaptisch lokalisierten Bandsynapse (Pfeil) und drei postsynaptischen Elementen: zwei Horizontalzeldendriten (h) und einem Stäbchenbipolarzeldendrit (b); **B,C:** Akkumulation mehrerer Bandsynapsen und postsynaptischer Elemente innerhalb einer Stäbchenendigung (Pw5); **D,E:** Charakteristisches Zapfenendfüßchen mit zwei Triaden (Pfeile); darüber sind zwei Stäbchenendigungen sichtbar (D); mit zunehmender Degeneration der Stäbchenendigungen grenzen die Zapfenendfüßchen direkt an die Kerne der Photorezeptoren (E); rs: rod spherule = Stäbchenendigung; cp : cone pedicle = Zapfenendfüßchen; PR: photoreceptor nucleus = Photorezeptorkern; Maßstab: Zapfenendfüßchen: 1 µm; Stäbchenendigung: 0,57 µm

4.6 Lokalisation von GluR1, GluR5, $\alpha 1F$ und PMCA1 an den Terminalien der

Photorezeptoren

In der Wildtyp-Retina werden die Glutamatrezeptor-Untereinheiten GluR1 und GluR5 an den dendritischen Endigungen der Off-Bipolarzellen exprimiert. Dort bilden sie flache Kontakte an der Basis der Zapfenendigung aus (Maus-Retina: Hack *et al.*, 1999; Affen-Retina: Haverkamp *et al.*,

2000, 2001). Diese Lokalisation ist in den Aufsichtsaufnahmen (Abb.16, A und B, *Pfeile*) deutlich zu erkennen. Auch die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus exprimiert die GluR1-Untereinheit, allerdings nicht mit Pw4 wie der Wildtyp, sondern erst mit Pw5 (A', A''). Dagegen ist die GluR5-Untereinheit in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus kaum detektierbar (B', B''). Durch den Vergleich der beiden Einzelmutanten $Rho^{-/-}$ (D) und $CNGA3^{-/-}$ (E), konnte dieser Defekt eindeutig auf das Fehlen des $CNGA3$ -Kanals zurückgeführt werden, da die $Rho^{-/-}$ Maus eine dem Wildtyp vergleichbare Expression zeigte.

Die Calcium-Kanal-Untereinheit $\alpha 1F$ (Morgans, 2001) und die Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA1; Krizaj *et al.*, 2002) sind in der Nagetier-Retina an der aktiven Zone des synaptischen Bandkomplexes der Stäbchen- und Zapfenendigungen lokalisiert. Beide werden in der Doppelmutante bis zur vollständigen Degeneration synaptischer Strukturen exprimiert. Die Calcium-Kanal-Untereinheit $\alpha 1F$, die im Wildtyp eine Hufeisenstruktur äquivalent zum bassoon ausbildet, zeigt eine Expression im Alter von Pw4.4 von reduzierter Dichte (Erklärung: Quantitative Analyse, Abb.13). Die PMCA1 weist im Wildtyp eine deutlich kräftigere Färbung auf, was für eine erhöhte Expression spricht. Beide Antikörper (Abb.17) gelten als funktionelle Indikatoren für die Transmitterfreisetzung, die somit aus theoretischer Sicht möglich wäre.

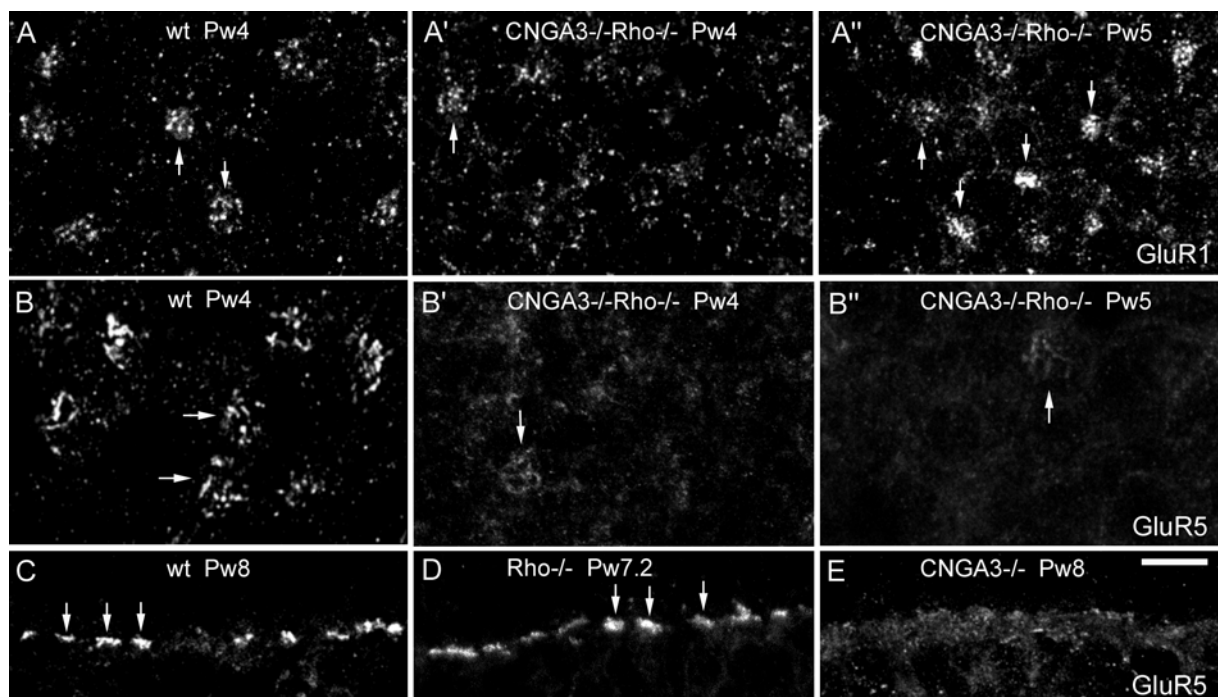


Abb.16: Detektion des GluR1- und GluR5-Rezeptors an den Zapfen-Photorezeptorterminalien des Wildtyps, der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$, der $CNGA3^{-/-}$ und der $Rho^{-/-}$ Maus im Entwicklungszeitraum Pw4-Pw8

A,A',A'': Aufsichtsaufnahmen der GluR1-Expression an den Zapfenendfüßchen (**Pfeile**) des Wildtyps (**A**, Pw4) und der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (**A'** Pw4, **A''** Pw5). GluR1 zeigt eine normale Expression und Lokalisation, nur mit einer Woche Verzögerung. Ab Pw5 (**A''**, **Pfeile**) ist eine deutliche Expression an den Zapfenendfüßchen erkennbar, mit Pw4 ist nur ein Zapfenendfüßchen (**Pfeil**) sichtbar; GluR1 zeigt zu diesem Zeitpunkt eine hohe extrasynaptische Expression; **B,B',B''**: Aufsichtsaufnahmen der GluR5-Expression an den Zapfenendfüßchen (**Pfeile**) in der wt- (**B**, Pw4) und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (**B'** Pw4, **B''** Pw5). In **B'** und **B''** ist keine kräftige Expression von GluR5 nachweisbar; die Pfeile deuten auf eine sehr schwache Expression an den Zapfenendfüßchen hin; **C,D und E**: Vertikalschnitte der GluR5-Expression in der wt- (**C** Pw8), Rho^{-/-}- (**D** Pw7.2) und der CNGA3^{-/-}Maus (**E** Pw8). Diese nahezu fehlende Detektion ist auf das Fehlen des CNGA3-Kanals zurückzuführen; Maßstab: Vertikalschnitte: 10 µm; Ansichtpräparate: 8,7 µm

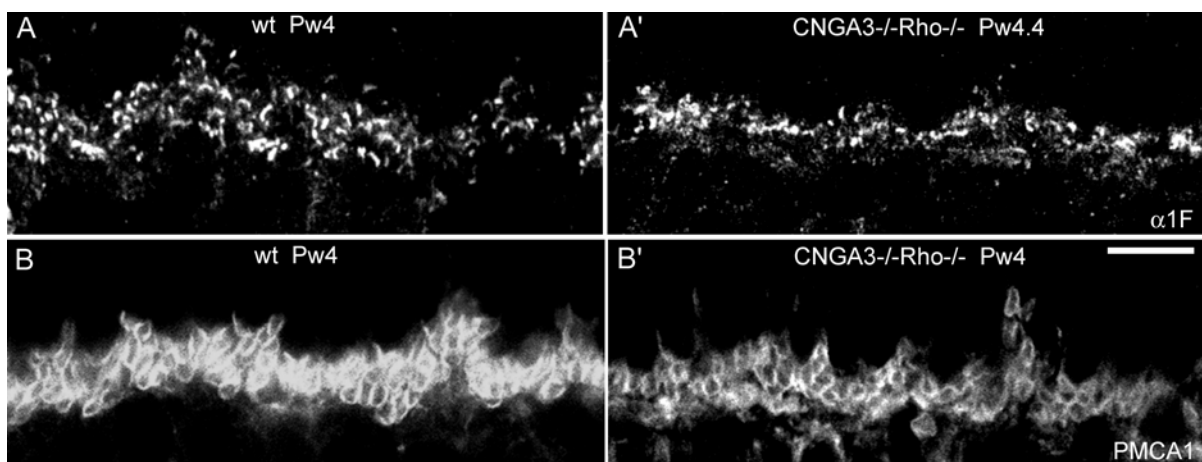


Abb.17: Expressionsnachweis biochemischer Indikatoren

A,A': Vertikalschnitte gefärbt mit $\alpha 1F$ im Wildtyp (**A**) und der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (**A'**); $\alpha 1F$ wird in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus an allen noch vorhandenen Stäbchen- wie Zapfenendigungen exprimiert. **B,B'**: Vertikalschnitte gefärbt mit PMCA1. Der Wildtyp (**B**) zeigt im Vergleich zur CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (**B'**) eine deutlich stärkere Färbung; Maßstab: 5 µm

4.7 Morphologische Veränderungen nachgeschalteter Neurone

Die Horizontalzellen der Retina sind immunoreaktiv für das Calcium-bindende Protein CaBP (28kD). Die Immunfärbung zeigt eine starke Färbung der Zellkörper, Dendriten und Axone (Abb.18; A). In der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (Pw5 bis Pw7) bilden die Horizontalzellen weitläufige Fortsätze in die ONL und in die INL aus (Abb.18; B und B'). Sie erstrecken sich über 2/3 der ONL. Um herauszufinden, ob diese axonalen oder dendritischen Ursprungs sind, wurde ein Neurofilament-Antikörper (NF-H) eingesetzt (Abb.19; Doppelfärbungen mit Calbindin), der nur die Axone anfärbt (Dräger, 1983; Völgyi B. und Bloomfield, ST.A., 2002). Es ist bekannt, dass die Axone der Horizontalzellen Kontakte mit

den Stäbchen ausbilden, wogegen die Dendriten Zapfen kontaktieren (Hack und Peichl, 1999). Die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus zeigt eine Kolokalisation des Calbindin-Antikörpers mit dem Neurofilament-Antikörper innerhalb der ONL (Abb.19; A). Die Fortsätze sind überwiegend Axone, die in die ONL hineinwachsen. Die Doppelmutante verliert ihre Stäbchen und die Horizontalzellen reagieren mit Axonwachstum (Sprouting-Effekt; Abb.19; A, rote Pfeile), um möglicherweise den Kontakt zu den Lichtsensoren aufrecht zu erhalten. Außerdem konnte ein Dendritenwachstum beobachtet werden, das aufgrund der hohen Dichte jedoch kaum sichtbar ist (Abb.19A; grüner Pfeil). Die Rho^{-/-} Maus, die nicht abgebildet ist, zeigt einen der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus vergleichbaren „Sprouting-Effekt“. Die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus bildet nur sehr kurze Dendriten in die ONL aus. Viele erstrecken sich in die INL (Abb.19; A grüner Pfeil), da die Zapfensomata wie in Abbildung 9 (B und B') beschrieben, auf der Höhe ihrer Zapfendfüßchen verbleiben. Neuronale „Sprouting-Effekte“ sind einerseits in retinalen Degenerationsmodellen (Fariss *et al.*, 2000), aber auch als Folge einer experimentell ausgelösten retinalen Schädigung beschrieben worden (Lewis *et al.*, 1998).

Darüber hinaus konnten in Verbindung mit diesen auswachsenden Horizontalzellfortsätzen ektopische Synapsen innerhalb der ONL nachgewiesen werden (Abb.19; C und C'). Detektiert wurden sie lichtmikroskopisch mit bassoon (C). In Abbildung 20 ist ihre Ultrastruktur dargestellt. Eine Voraussetzung für die Funktion der Photorezeptor-Bandsynapse ist der vesikuläre Glutamattransporter (vGluT1; Takamori *et al.*, 2000). Dieser wird von glutamergen Neuronen innerhalb der Retina exprimiert und sichert an glutamergen Synapsen den Transport des Neurotransmitters Glutamat in synaptische Vesikel. Immunfärbungen zeigten, dass vGluT1 bei der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus auch ektopisch an den Fortsätzen der Horizontalzellen exprimiert ist (Abb.19; B und B'), wogegen er in der Wildtyp-Retina ausschließlich innerhalb der OPL lokalisiert ist.

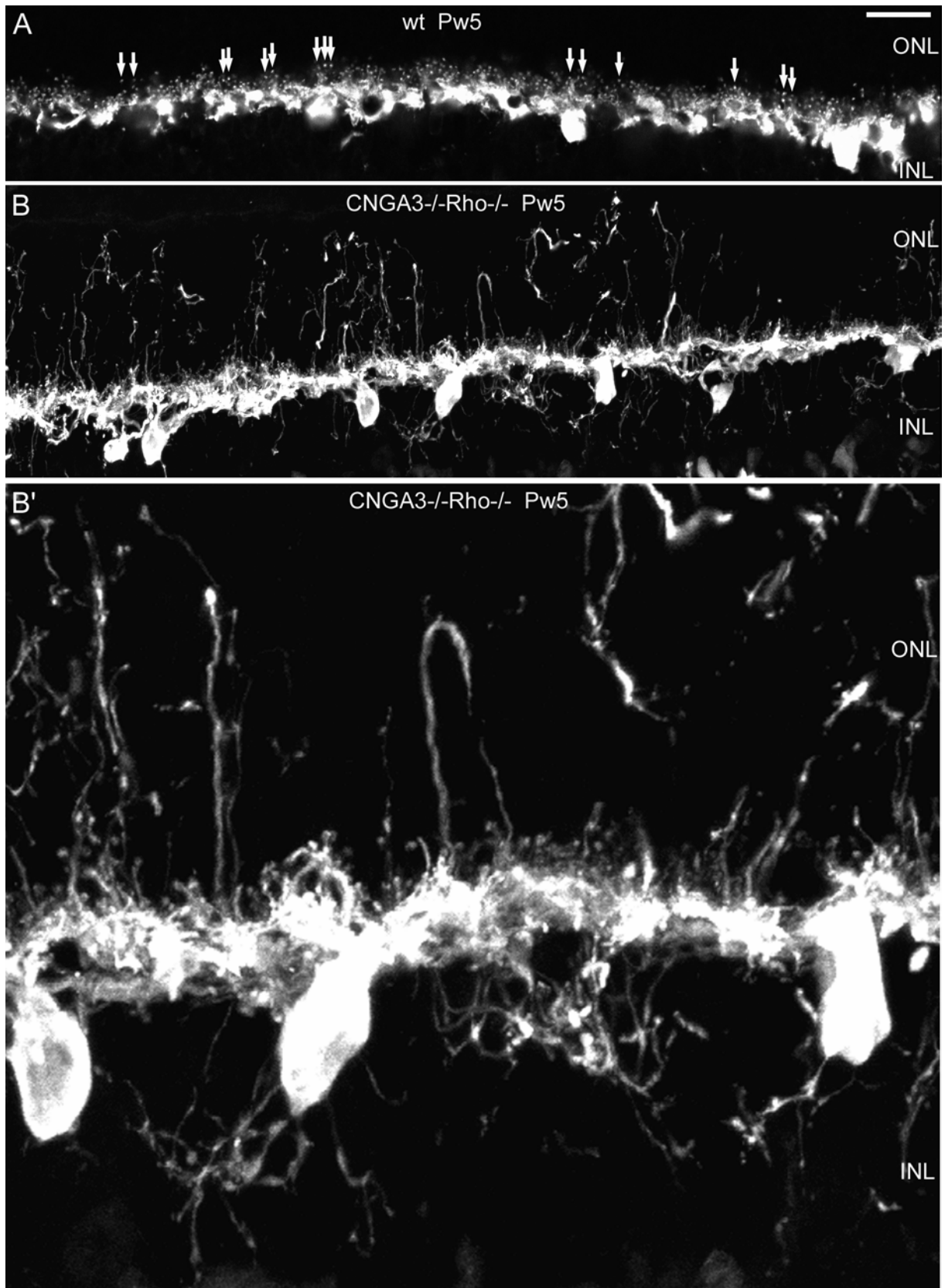


Abb.18: Horizontalzellausläufer in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} - und Wildtyp-Maus

A: CaBP-Färbung markiert die Zellkörper, Dendriten und Axone der Horizontalzellen (**Pfeile**); **B:** CaBP-Färbung zeigt weitläufige Horizontalzellfortsätze in die ONL wie INL; **B':** Ausschnitt aus **B** vergrößert; Maßstab: A und B: 20 μ m; B': 4,7 μ m

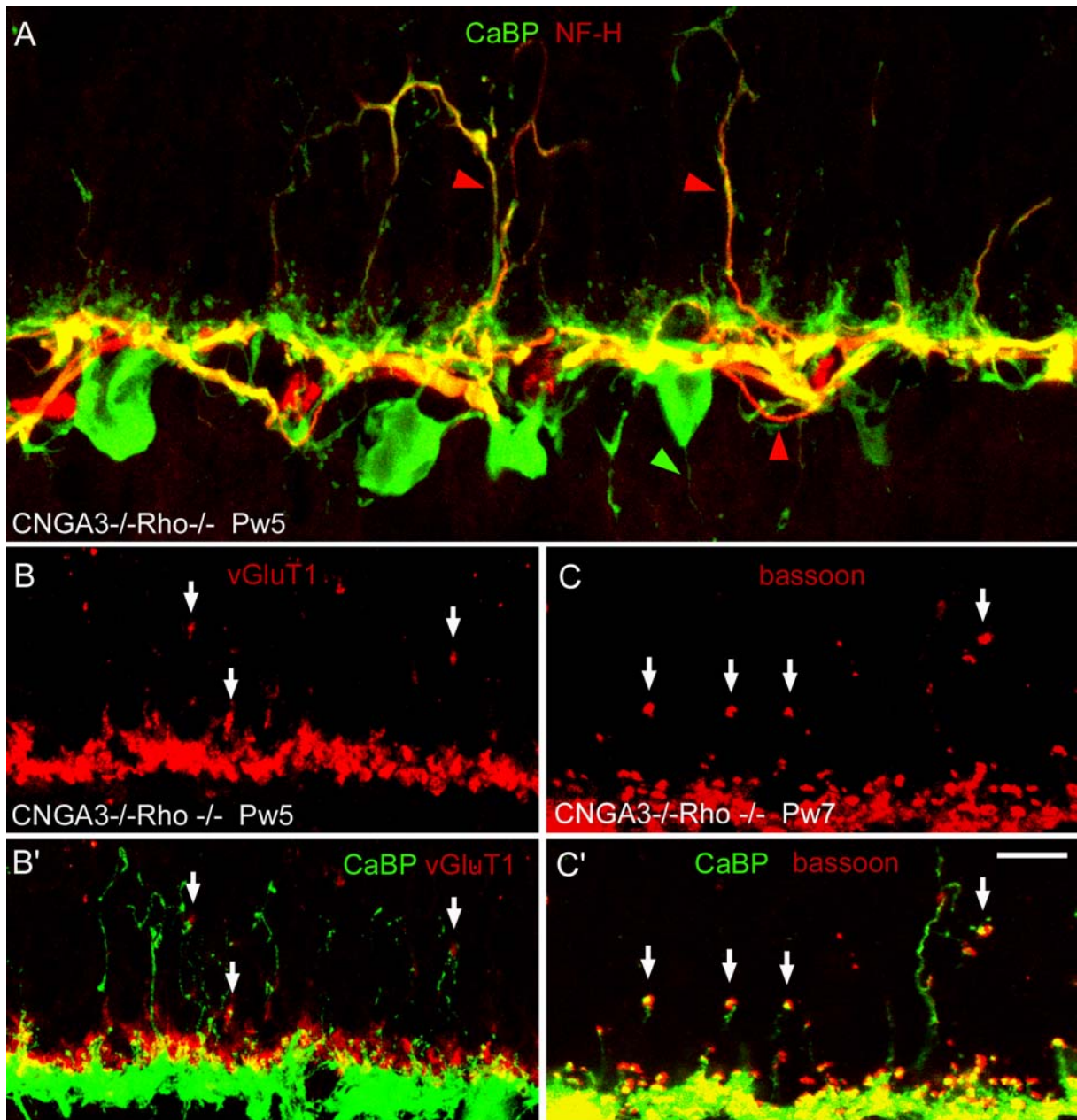


Abb.19: Differenzierung von axonalen und dendritischen Ausläufern und Expression von vGluT1 und bassoon in der äußeren nukleären Schicht

A: Doppelfärbung mit CaBP (**grün**) und NF-H (**rot**): axonale Ausläufer dominieren; **B, B':** vGluT1-Färbung in **rot (B)**: vGluT1 ist in der ONL nachweisbar; Doppelfärbung zusammen mit CaBP in **grün (B')**; **C, C':** bassoon-Färbung in **rot (C)**: Ausbildung mehrerer charakteristischer Hufeisenstrukturen in der ONL; Doppelfärbung zusammen mit CaBP in **grün (C')**; Maßstab: A,B,B': 10 μ m; C,C': 6,7 μ m

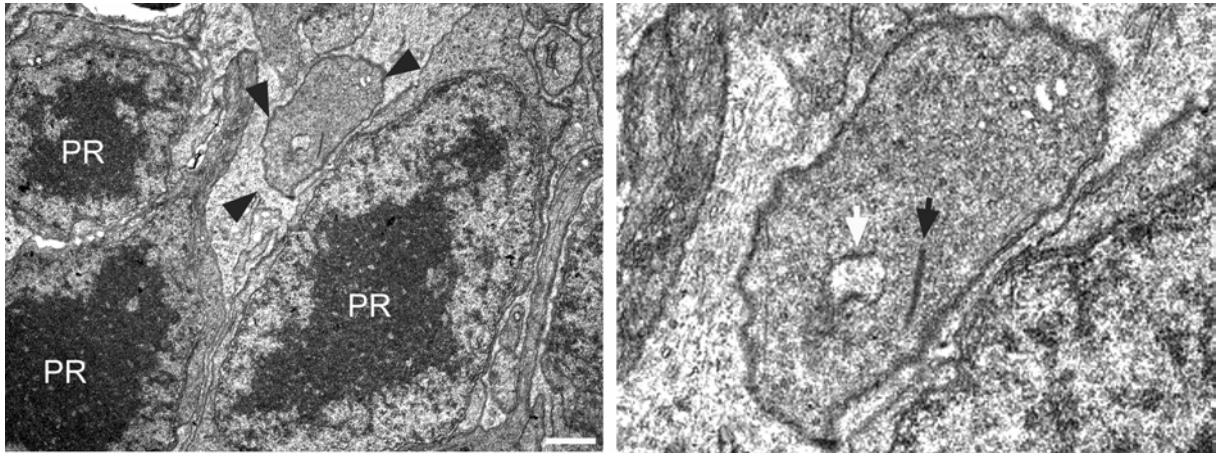


Abb.20: Untersuchung der Ultrastruktur von Stäbchenendigungen in der ONL

Eine Stäbchenendigung (**Pfeile**) ist zwischen drei Photorezeptorkernen (**PR**) angelegt (**Abb. links**; Maßstab: 1 μm). Die **Abb. rechts** zeigt eine vergrößerte Darstellung der Stäbchenendigung mit einem freiliegenden synaptischen Band (**schwarzer Pfeil**) und einem postsynaptischen Element (**weisser Pfeil**).

4.7.1 Dendriten der Stäbchen-Bipolarzellen erstrecken sich in die ONL

Die $\text{CNGA3}^{-/-}\text{Rho}^{-/-}$ Maus zeigt eine normale postnatale Entwicklung der Stäbchen-Bipolarzellen mit intakten Dendriten (Abb.22; B: angefärbt mit $\text{PKC}\alpha$: Protein-Kinase C α). Im Zeitraum Pw7-Pw8.4 wachsen diese in die ONL hinein (Abb.21; B). Interessanterweise konnte dieses Phänomen auch in älteren Wildtyp-Mäusen (Pm9-12) nachgewiesen werden (Abb.21; C), wobei auch hier ektopische Synapsen in der ONL angelegt wurden. Diese wurden mit dem Motorprotein kinesin markiert, dass am strukturellen Aufbau des Bandsynapsen-Komplexes beteiligt ist (Muresan *et al.*, 1999). Nur die Stäbchen-Photorezeptoren kontaktieren die mit $\text{PKC}\alpha$ angefärbten Stäbchen-Bipolarzellen, die dann das Signal über AII-Interneurone auf OFF-Zapfen-Bipolarzellen und ON-Zapfen-Bipolarzellen weiterleiten. In diesem Zusammenhang wurde ein metabotroper Glutamatrezeptor (mGluR6) identifiziert (Nakajima *et al.*, 1993). Dieser gilt als biochemischer Indikator der synaptischen Transmission zwischen Stäbchen-Photorezeptoren und ON-Stäbchen-Bipolarzellen. mGluR6 wird an den Dendriten aller ON-Bipolarzellen exprimiert (Vardi und Morigiwa, 1997; Vardi *et al.*, 2000). Die Doppelfärbung mit $\text{PKC}\alpha$ und mGluR6 zeigt auch in der $\text{CNGA3}^{-/-}\text{Rho}^{-/-}$ Maus eine Expression an den dendritischen Endigungen im Alter von Pw7 (Abb.21; B'; Abb.12). Auffällig sind die Somata der Stäbchen-Bipolarzellen, die zusätzlich mGluR6 exprimieren (Abb.21; B'; *kleinere Pfeile*). Diese

Beobachtung wurde im Zusammenhang mit degenerierenden Photorezeptoren bereits dokumentiert (Nomura *et al.*, 1994).

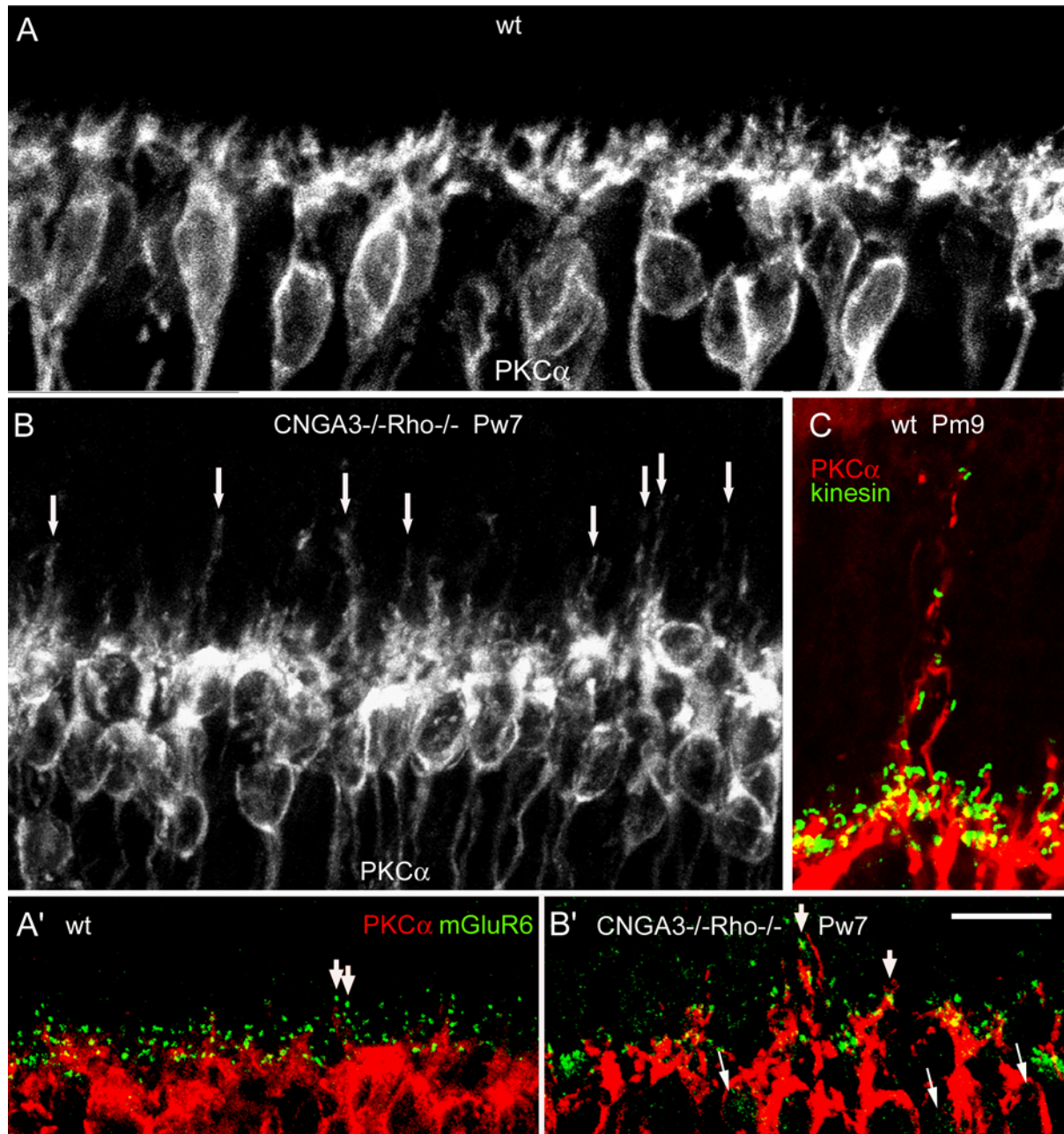


Abb.21: Dendriten-Ausläufer von Stäbchen-Bipolarzellen in der äußeren nukleären Schicht (ONL)

A: PKC α -Färbung markiert Stäbchen-Bipolarzellen mit ihren dendritischen Ausläufern in der Wildtyp-Retina; **B:** PKC α -Färbung zeigt in der CNGA3 $^{-/-}$ Rho $^{-/-}$ Maus auswachsende Dendriten in die ONL-Schicht (**Pfeile**); **C:** Ältere Wildtyp-Retinae weisen ebenfalls Auswüchse dendritischer Ausläufer in die ONL auf (PKC α , **rot**), assoziiert mit ektopischen Synapsen (kinesin, **grün**); **A',B':** Doppelfärbungen mit PKC α und mGluR6 zeigen in der Wildtyp-Retina wie in der CNGA3 $^{-/-}$ Rho $^{-/-}$ Maus eine mGluR6-Expression an den dendritischen Endigungen (**Pfeile**), allerdings mit weitaus geringerer Dichte und starker Expressionsverlagerung in die Somata der Stäbchen-Bipolarzellen der CNGA3 $^{-/-}$ Rho $^{-/-}$ Maus im Alter Pw7 (kleine Pfeile); Maßstab: 10 μ m

4.7.2 Stäbchen-Bipolarzellen entwickeln sich in der frühen postnatalen Entwicklung

normal

In rd-Modellen konnte gezeigt werden, dass eine intakte Entwicklung der Stäbchen-Bipolarzelle, die Präsenz von Photorezeptoren voraussetzt (Strettoi *et al.*, 2002). Ob zusätzlich eine funktionelle Aktivität der Photorezeptoren gegeben sein muss, sollte durch die Untersuchung der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus geklärt werden.

In Abbildung 22 sind die Stäbchen-Bipolarzellen der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im jungen Stadium Pw4 und in einem sehr alten Stadium (Pm9; C) dargestellt. Die Axonterminalien zeigen zum Zeitpunkt (Pw4) eine normale Entwicklung (Abb.22; B). Ultrastrukturell wurden im Zeitraum Pw4 (Abb.22; B') bis Pw10 (nicht dargestellt) intakte Bandsynapsen gefunden (B'). Die Immunfärbung in Abbildung 22C zeigt Zellkörper mit deutlich verkleinerter Gestalt. Die Axonterminalien sind stark eingezogen und sind untereinander fusioniert. Die Ultrastruktur lässt keine synaptischen Bänder mehr erkennen. (Abb.22; C').

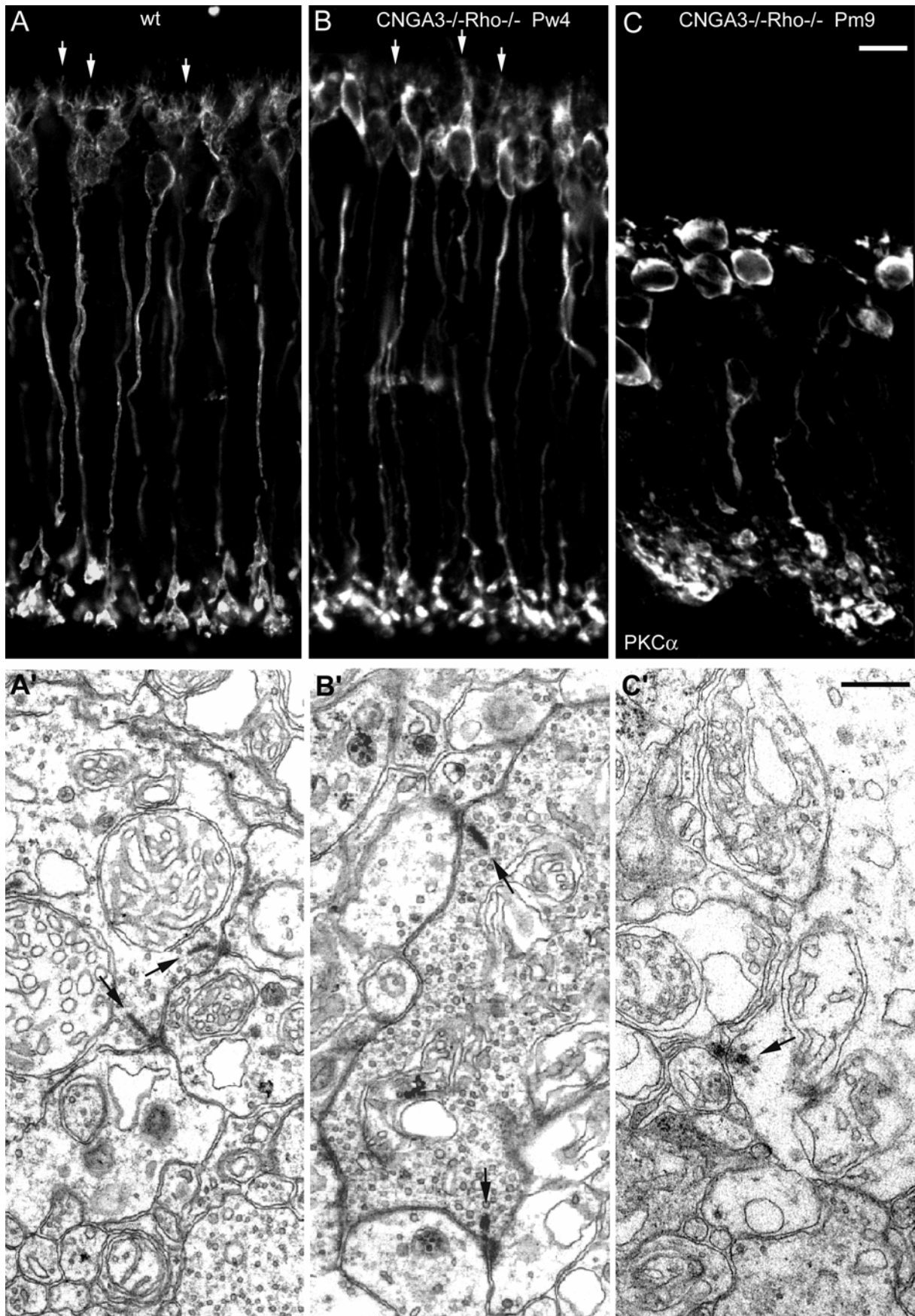


Abb.22: Entwicklungsreihe von Stäbchen-Bipolarzellen in immunhistochemischer und ultrastruktureller Ansicht

A,A': In der Wildtyp-Retina sind mit PKC α gefärbte Stäbchen-Bipolarzellen mit Dendriten (**Pfeile; A**) und Axonterminalien dargestellt; ultrastrukturell sind zwei synaptische Bänder in einem Axonterminal sichtbar (**Pfeile; A'**); **B,B'**: Die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus zeigt im Alter Pw4 intakte Stäbchen-Bipolarzellen (**B**), ultrastrukturell werden große Axonterminalien ausgebildet, die vergleichbar dem Wildtyp, intakte synaptische Bänder enthalten (**B'**); **C,C'**: Die Stäbchen-Bipolarzellen in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus degenerieren mit zunehmendem Alter. Mit Pm9 sind die Axonterminalien fusioniert (**C**); ultrastrukturell sind keine synaptischen Bänder mehr nachweisbar (**C'**); Maßstab: Immunfärbung: 10 μ m; Ultrastruktur: 0,5 μ m

4.7.3 Untersuchung der AII-Amakrinzelle - Ein Interneuron zwischen Stäbchen-

Bipolarzellen und Ganglienzellen

Bereits Kolb und Famiglietti beschrieben, dass Stäbchen-Bipolarzellen ihr Signal nicht direkt auf Ganglienzellen übertragen, sondern zwei unterschiedliche Amakrinzellen, welche postsynaptisch zur Stäbchen-Bipolarzell-Diade lokalisiert sind, nutzen (Kolb und Famiglietti, 1974; Famiglietti und Kolb, 1975). Eine von ihnen (die A17) ist gabaerg (Raviola und Dacheux, 1987), die andere, die AII, hat glyzinerigen Charakter (Pourcho und Goebel, 1987). Die AII-Amakrinzelle kontaktiert OFF-Zapfen-Bipolarzellen über konventionelle chemische Synapsen und ON-Zapfen-Bipolarzellen über gap junctions. Die Stäbchen-Bipolarzelle setzt Glutamat frei, was eine Depolarisation der AII zur Folge hat. Dieses Signal wird entweder mittels einer hemmenden Synapse über OFF-Bipolarzellen zu Off-Ganglienzellen, oder mittels einer erregenden (elektrische) Synapse über ON-Bipolarzellen zu ON-Ganglienzellen, weitergeleitet. Nachdem die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus mit zunehmendem Alter keine intakten Stäbchen-Bipolarzellen mehr aufwies, war es erforderlich, die Morphologie nachgeschalteter Neurone, der AII-Amakrinzellen, zu untersuchen. Diese sind in ihrer Morphologie unbeeinflusst. Auch in sehr alten CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Mäusen (Pm13.19) ziehen Dendriten der Amakrinzellen von der OFF- zur ON-Bipolarzellschicht, in der die Terminalien der Stäbchen-Bipolarzellen endigen. Im Vergleich zum Entwicklungsstadium Pw4 ist kein Unterschied zu verzeichnen (Abb.23; A' und A'').

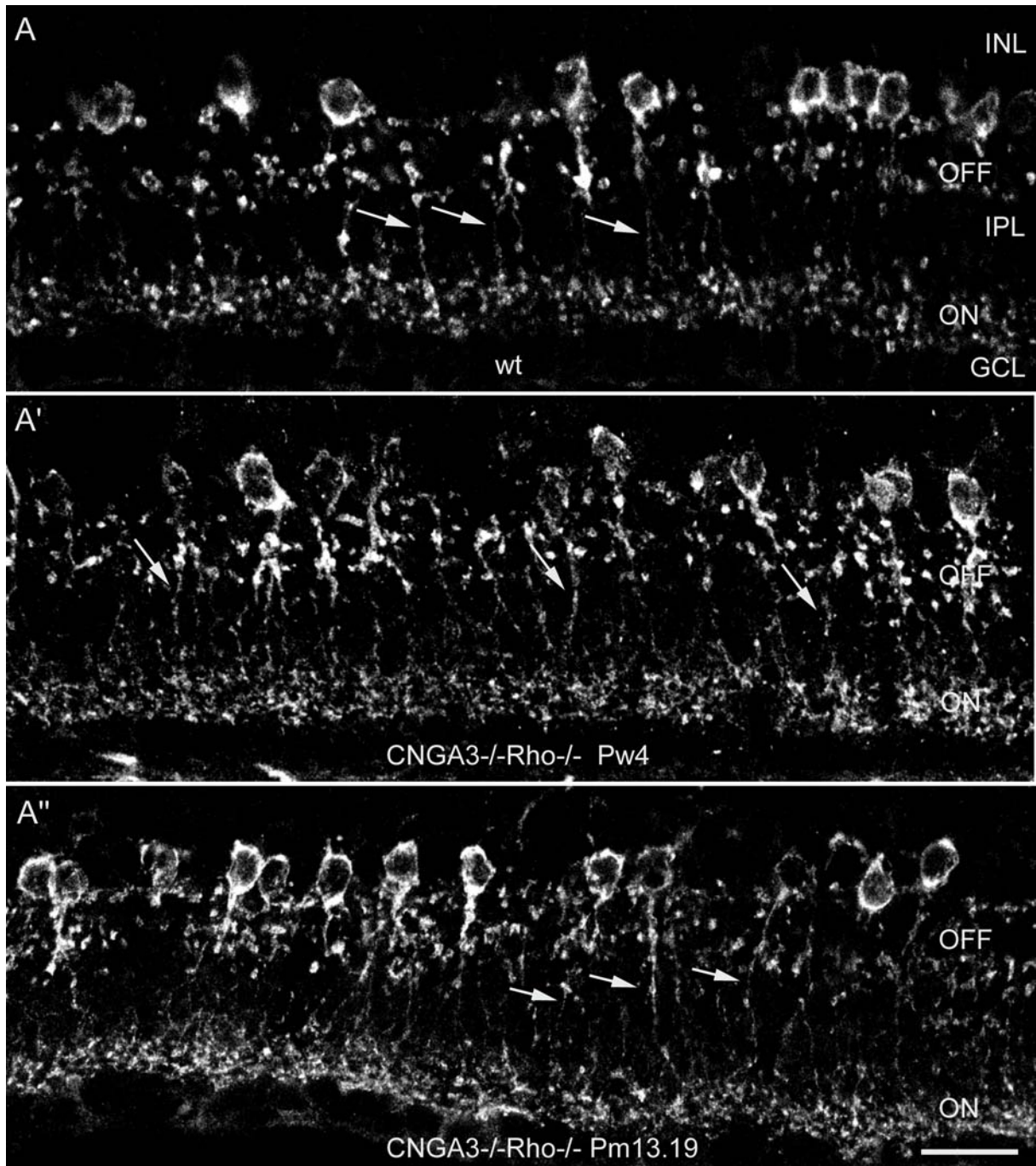


Abb.23: Morphologische Analyse der AII-Amakrinzelle

A: Dab1-33 (Disabled) färbt im Wildtyp die AII, deren Dendriten in die ON-Schicht der IPL hineinreichen (**Pfeile**); zusätzlich ist ein kräftig angefärbtes OFF-Band erkennbar; **A',A'':** CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im Alter Pw4 (**A'**) und Pm13.19 (**A''**) zeigt eine dem Wildtyp vergleichbare Morphologie: Dendriten ziehen in die ON-Schicht der IPL (**Pfeile**); Maßstab: 20 µm

4.8. Strukturhaltung der inneren Retina

Die Struktur der IPL ist nicht signifikant gestört, wenn man zunächst einmal von dem bisher beschriebenen Defekt der Stäbchen-Bipolarzellen absieht. Eine innere nukleäre, eine innere plexiforme und eine Ganglienzellschicht sind vorhanden, wie bereits anhand der Nomarski-Darstellungen in Abb.8. ersichtlich war. Zur Untersuchung des Stratifizierungsmusters wurden zwei Calcium-bindende Proteine, Calretinin und CaB5, verwendet (Abb.24; A, A', B, B'). Calretinin wird in den Somata vieler Amakrin- und Ganglienzellen exprimiert. Zusätzlich färbt es in der IPL drei Stratifizierungsbänder. Die *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus bildet wie die Retina der Wildtyp-Maus dieses charakteristische Muster aus (Abb.24; A'). Auffällig sind die Somata der Amakrin- und der Ganglienzellen, die in der Doppelmutante deutlich stärker gefärbt sind, da sie dort verstärkt exprimiert werden. Ebenso erscheint der Raum zwischen dem unteren (ON-) Band und der Ganglienzellschicht, wo die Axonterminalien der Stäbchen-Bipolarzellen liegen, deutlich reduziert zu sein. Das Calcium-bindende Protein CaB5 markiert ebenfalls drei Bänder, die drei unterschiedliche Bipolarzelltypen darstellen (Abb.24; B). Diese unterscheiden sich neben der strukturellen Beschaffenheit auch in der Reichweite ihrer Axonterminalien: OFF-Zapfen-Bipolarzellen entsprechen dem ersten Band; ON-Zapfen-Bipolarzellen dem zweiten Band und die Stäbchen-Bipolarzellen dem dritten Band, welches direkt an die Ganglienzellen angrenzt. Das Stäbchen-Bipolarzellband der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus zeigt eine ausgedünnte Struktur, während die Axonterminalien der ON- und OFF-Zapfen-Bipolarzellen eine unveränderte Anatomie aufweisen (Abb.24; B'). Zur Analyse ihrer Bandsynapsen wurde wie für die OPL der kinesin-Antikörper verwendet, welcher vergleichbar dem Wildtyp eine punktierte Färbung in der IPL zeigt (Abb.24; C und C'). Dieses Ergebnis wurde durch ultrastrukturelle Untersuchungen gestützt: diese zeigten intakte Bandsynapsen in den Axonterminalien der ON- und OFF- Zapfen-Bipolarzellen (Abb.24; D). Parallel konnten in der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus immunhistochemisch (Abb.24; E') wie ultrastrukturell (Abb.24; F) intakte konventionelle Synapsen nachgewiesen werden. Immunhistochemisch wurden sie mit dem vesikulären GABA/Glycin-Transporter markiert (VGAT: Vesicular γ -Aminobutyric Acid Transporter; Cueva *et al.*, 2002).

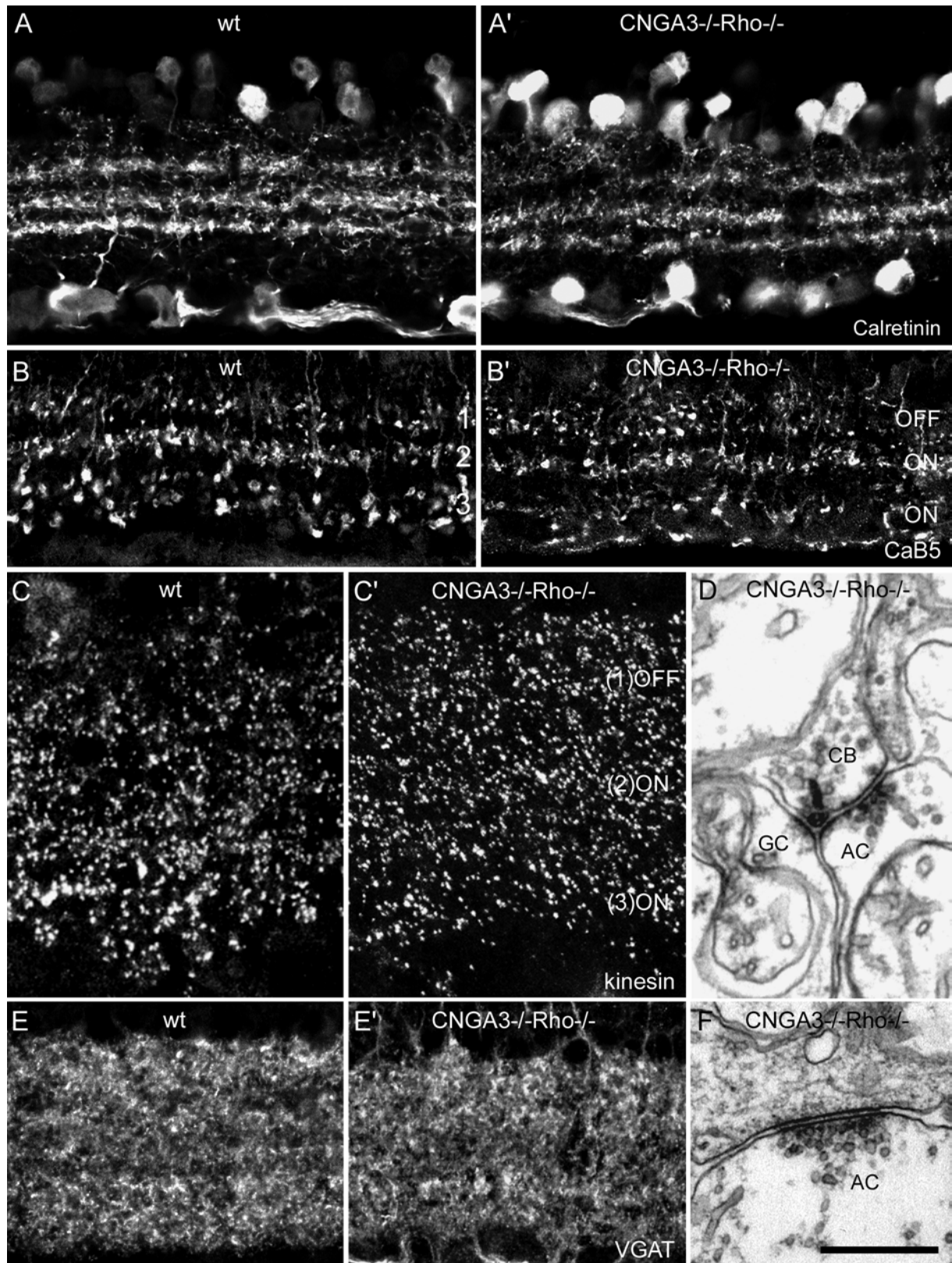


Abb.24: Stratifizierungsmuster- und synaptische Strukturanalyse der IPL der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ im Vergleich zur Wildtyp-Maus (wt: Pm12, $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$: Pm12)

A,A': Konfokale Aufnahmen in Vertikalansicht, angefärbt mit Calretinin: 3 Stratifizierungsbänder sind in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus wie im Wildtyp nachweisbar; Somata der Amakrin- wie Ganglienzellen sind in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus deutlich stärker gefärbt; **B,B'**: Die dreifache Bänderung, angefärbt mit CaB5, repräsentiert

drei Bipolarzell-Typen; OFF- (**Band1**) und ON- (**Band2**) Zapfen-Bipolarzellen zeigen morphologisch keine Abweichungen zum Wildtyp, Stäbchen-Bipolarzellen der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus (**Band3**, grenzt an die Ganglienzellschicht) sind in ihrer Dichte reduziert, die Terminalien sind stark ausgedünnt und erscheinen somit kleiner; **C,C'**: Bandsynapsen sind mit kinesin angefärbt; die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus zeigt eine punktierte Färbung, die in der ON- und OFF-Schicht der Zapfen-Bipolarzellen, eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Dichte aufweist (Diskussion 5.7.4); ON-Schicht der Stäbchen-Bipolarzellen zeigt eine geringe Punktierungsdichte; **D**: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer klassischen Zapfen-Bipolarzellbandsynapse in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus (**CB**, *cone bipolar cell*) angrenzend an zwei postsynaptische Elemente, eine Amakrinzelle (**AC**, *amacrine cell*) und eine Ganglienzelle (**GC**, *ganglion cell*); **E,E'**: VGAT (vesikulärer GABA/Glyzin-Transporter) markiert alle Amakrinzellendendriten; in der IPL sind keine Unterschiede zwischen Wildtyp und $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus zu erkennen; **F**: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer klassischen konventionellen Synapse zwischen einer Amakrinzelle (**AC**) und einem postsynaptischen Element in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus; Maßstab: A,B: 33 μm ; C: 12 μm , E: 22 μm , D,F: 0,5 μm

4.8.1 Dichteverteilung synaptischer Bänder an den Axonterminalien der Stäbchen-

Bipolarzellen der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus im Alter von Pm9

Die morphologischen Veränderungen der Axonterminalien von Stäbchen-Bipolarzellen wurden bereits eingehend beschrieben. Um die Verteilungsdichte der synaptischen Bänder genau zu analysieren, wurden Doppelfärbungen mit $PKC\alpha$ und kinesin angefertigt (Abb.25). Die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus zeigt eine ungleichmäßige Verteilung von kinesin an den Axonterminalien. An vielen Terminalien ist keine Detektion nachweisbar (Abb.25; **C'**, *Pfeile*). Dies konnte auch ultrastrukturell bestätigt werden (nicht dargestellt): An den Terminalien, die noch annähernd an die Ganglienzellschicht angrenzen, sind vereinzelt noch rudimentär zurückgebildete Synapsen, wie in Abb.22C' dokumentiert, zu beobachten, die meistens jedoch ganz fehlen. Manche Terminalien ziehen sich zurück und bringen vergleichbar dem Wildtyp eine hohe Dichte von 5-10 Punkten hervor (Abb.25; C1, C'1). Ultrastrukturell ist dies kaum nachweisbar, da die Stäbchenendigungen nicht nur auf der Höhe der Zapfen-Bipolarzellen zu finden sind, sondern auch aufgrund ihrer stark geschrumpften Terminalien nicht mehr von Zapfen-Bipolarzellen zu unterscheiden sind. Dies veranschaulicht, dass die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus selbst im hohen Alter durchaus noch intakte Bandsynapsen in den Stäbchen-Bipolarzellaxonterminalien hat. Es ist aber davon auszugehen, dass diese nur einen geringen Anteil ausmachen.

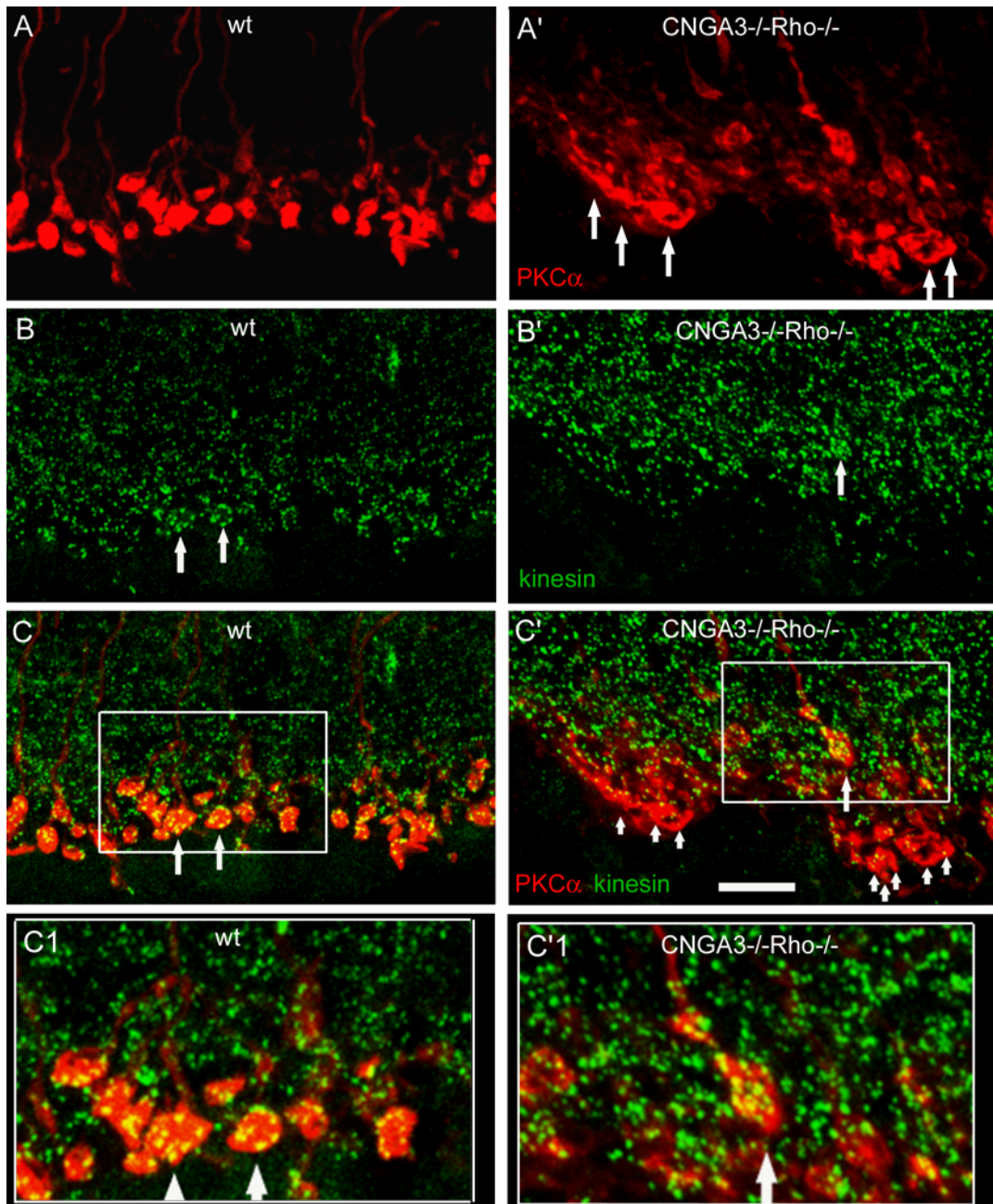


Abb.25: Dichteverteilung der Bandsynapsen an den Axonterminalien der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus im Vergleich zum Wildtyp

A: Stäbchen-Bipolarzellaxonterminalien in der Wildtyp-Maus, angefärbt mit PKC α (**rot**); **A'**: Axonterminalien der Stäbchen-Bipolarzellen sind in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus vergrößert, da sie untereinander fusionieren; gleicher Ausschnitt wie bereits in Abb.22C gezeigt, hier in **rot** dargestellt; **B:** Bandsynapsen, markiert mit kinesin (**grün**), zeigen im Wildtyp die Axonterminalien der Stäbchen-Bipolarzellen durch ein ringförmiges Punktierungsmuster an (Pfeile); **B'**: $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus zeigt nur noch an einer Stelle eine ringförmige Punktierungsstruktur (Pfeil); **C,C'**: PKC α und kinesin als Doppelfärbung in der Wildtyp (**C**) und in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus (**C'**); **C1,C'1**: doppelte Vergrößerung des ausgewählten Ausschnittes aus **C** und **C'**; Maßstab für **A,A'**; **B,B'** und **C,C'**: 10 μ m; **C1,C'1**: 5 μ m

4.9 Rezeptorexpression in der IPL

Es ist bekannt, dass die Aggregation von Transmitterrezeptoren ein dynamischer, aktivitätsabhängiger Prozess ist (Mammen *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde nun anatomisch untersucht, inwieweit der fehlende Lichteinfluss und der Verlust der äußeren Retina die Expression und Verteilung unterschiedlicher Rezeptoren innerhalb der inneren plexiformen Schicht beeinflussen. Dabei wurden inhibitorische (4.9.1) und exzitatorische Rezeptoren (4.9.2) berücksichtigt.

4.9.1 Inhibitorische Rezeptoren: Verteilung unterschiedlicher Subtypen von GABA- und Gly-Rezeptoren

Die Stäbchen-Bipolarzellaxonterminalien exprimieren unterschiedliche Typen ionotroper GABA-Rezeptoren innerhalb der IPL (Fletcher *et al.*, 1998). GABA_A-Rezeptoren sind Rezeptoren, welche aus fünf Untereinheiten zusammengesetzt sind und einen Chloridkanal bilden. GABA_C-Rezeptoren setzen sich aus ρ -Untereinheiten zusammen, formen ebenfalls wie die A-Untereinheit einen Chlorid-Kanal, und sind an den Terminalien der Stäbchen-Bipolarzellen detektierbar. Die Subtypen der Rezeptoren zeigen ein charakteristisches Punktierungsmuster innerhalb der IPL. Manche von ihnen bilden auch eine Stratifizierungsbänderung aus, wie beispielsweise der GABA_A α 1-Rezeptor, bei dem die obere Hälfte der IPL eine kräftigere Punktierung gegenüber der unteren Hälfte zeigt (Abb.26; A). In der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (Abb.26; A') ist die Expression vergleichbar der Wildtyp-Retina, wobei die Somata der Bipolarzellen auffallen, die diese Untereinheit verstärkt exprimieren. In der Wildtyp-Retina sind zusätzlich die Zapfenendfüßchen angefärbt (Abb.26; A, Pfeile), die in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im Alter Pm8.20 degeneriert und somit nicht mehr nachweisbar sind. Der GABA_A α 2-Rezeptor markiert in der Wildtyp- wie CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus zwei dichtpunktierte Bänder. Ganglien- und Amakrinzellkörper sind dabei in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus weniger stark gefärbt als in der Wildtyp-Maus. Die GABA_C-Rezeptor-Färbung erscheint in drei Bändern, die die gesamte IPL durchspannen. Diese sind auch in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus erkennbar. Vergleichbar der α 1-Untereinheit sind im Wildtyp auch die Zapfenendfüßchen erkennbar.

Die Glyzin-Rezeptoren (GlyR) zeigen wie die GABA-Rezeptoren ein charakteristisches Verteilungs- und Bänderungsmuster innerhalb der IPL. Die postsynaptisch lokalisierten GlyR sind aus Liganden-

bindenden α - und β -Untereinheiten zusammengesetzte Chlorid-Kanäle, die mit dem Bindungsprotein Gephyrin assoziiert sind. Gephyrin wurde auch in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus nachgewiesen und zeigte ein normales Expressionsmuster innerhalb der IPL (bildlich nicht dargestellt). Die Lokalisation von GlyR und Gephyrin wurde bereits in der Nagetier-Retina eingehend untersucht (Sassoè-Pognetto *et al.*, 1994). Die $\alpha 1$ -Untereinheit der Glyzin-Rezeptoren bindet an Synapsen zwischen AII-Amakrinzellen und OFF-Zapfen-Bipolarzellen sowie an Dendriten der alpha-Ganglienzellen (Koulen *et al.*, 1996). Von der $\alpha 3$ -Untereinheit ist bekannt, dass diese von annähernd der Hälfte aller glyzinergen Synapsen exprimiert wird (Haverkamp *et al.*, 2003). Das immunhistochemische Punktierungsmuster in der IPL formiert vier Bänder mit hoher Punktierungsdichte, von denen die oberen beiden kräftiger erscheinen (Abb.27; B). In der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus sind keine Abweichungen vom Wildtyp zu verzeichnen (Abb.27; B, B'). Auch die $\alpha 1$ -Untereinheit zeigt in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus ein charakteristisches Punktierungsmuster, mit hoher Dichte in der OFF-Schicht und geringer Dichte in der ON-Schicht (Abb.27; A, A'). Abschließend ist festzuhalten, dass die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus im Alter von Pm9-13.20 alle Subtypen von GABA- und Gly-Rezeptoren in normaler, dem Wildtyp vergleichbarer Dichte, exprimiert.

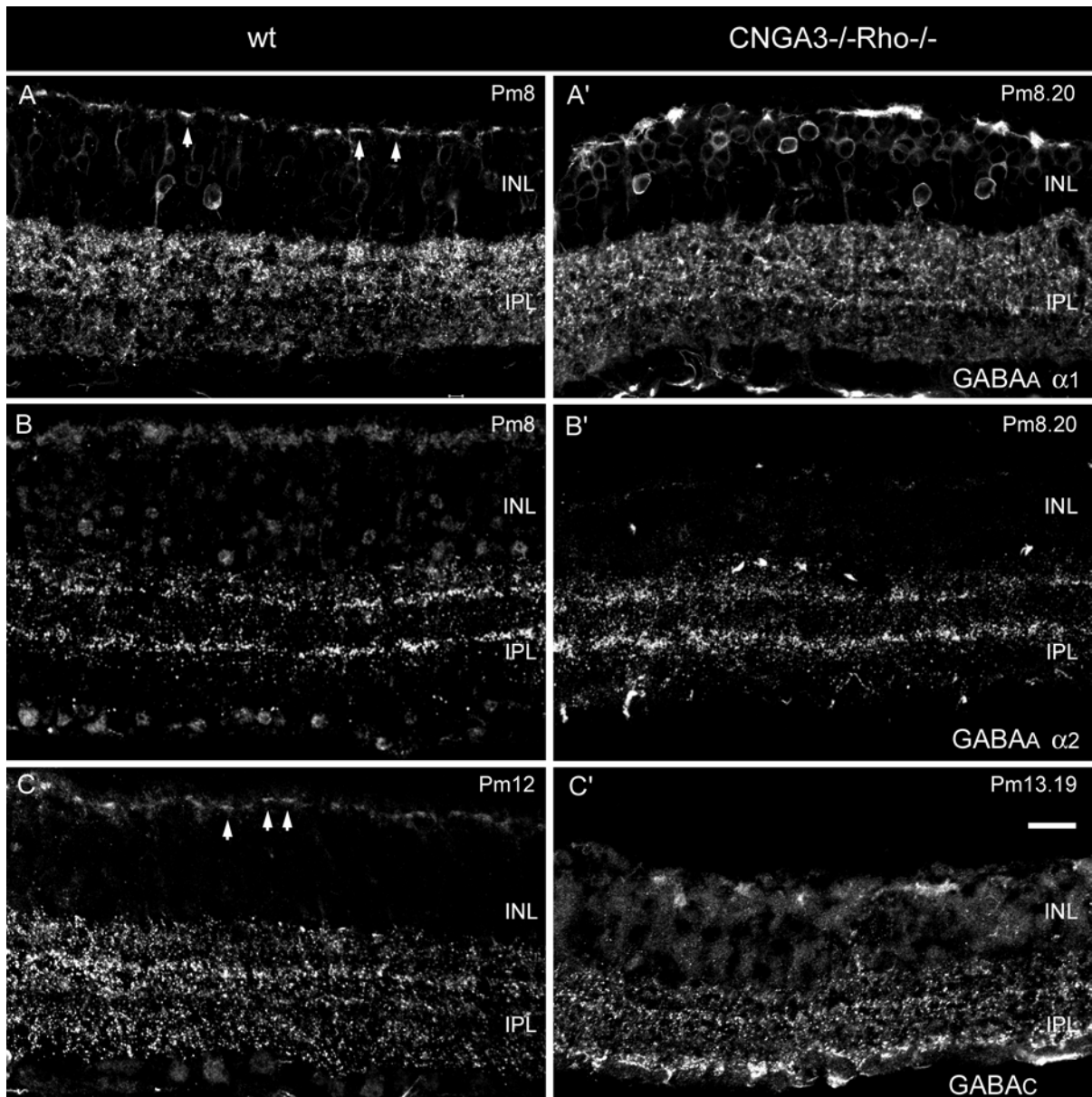


Abb.26: GABA-Rezeptor-Verteilung in der IPL

A,A': GABA_Aα1-Expression in der Wildtyp-Retina (**A**) und der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im Alter Pm8.20 (**A'**); beide zeigen eine erhöhte Expression in der oberen Hälfte der IPL; Bipolarzellen sind in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus verstärkt gefärbt, Zapfenendfüßchen existieren nur in der Wildtyp-Retina; **B,B'**: GABA_Aα2-Expression in der Wildtyp-Retina (**B**) und der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im Alter Pm8.20 (**B'**); beide zeigen zwei stark gefärbte Bänder, im Wildtyp sind zusätzlich Amakrin- und Ganglienzellen immunopositiv; **C,C'**: GABA_C-Expression in der Wildtyp-Retina (**C**) und der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im Alter Pm13.19 (**C'**), beide zeigen eine Unterteilung der IPL in drei Bänder; Maßstab: 10µm

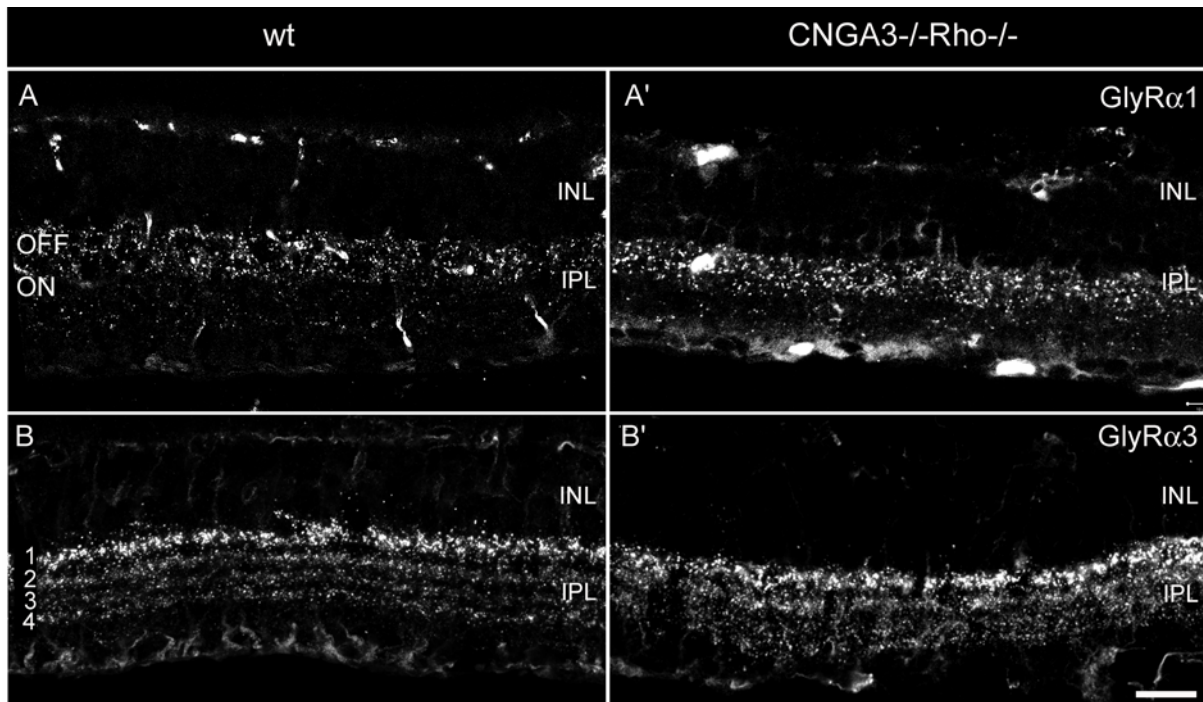


Abb.27: Gly-Rezeptor-Verteilung in der IPL

A,A': GlyR α 1-Verteilung in der Wildtyp- (A) und der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} (A') -Retina im Alter Pm12, beide zeigen ein dichtes Punktierungsmuster in der OFF-Schicht, wobei die ON-Schicht nur schwach punktiert ist; **B,B'**:GlyR α 3-Verteilung in der Wildtyp (C) und in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (C'); beide zeigen eine charakteristische Bänderung in 4 Schichten, wobei die oberen beiden stärker gefärbt sind; Maßstab: 10 μ m

4.9.2 Exzitatorische Rezeptoren: Glutamat-Rezeptoren in der IPL

In der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus wurde die Lokalisation und Verteilung von zwei AMPA-Rezeptoren untersucht: GluR2/3 und GluR4. Nur der erstgenannte ist in Abb.28 dargestellt. Beide zeigten eine hohe Verteilungsdichte über die gesamte IPL. Möglicherweise werden sie an jeder Diade, allerdings meist nur in einem postsynaptischem Fortsatz, exprimiert. Die GluR2/3 Expression wurde eingehend in der Primaten-Retina untersucht (Ghosh *et al.*, 2001) und weist im Wildtyp wie in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus eine vergleichbare Dichte auf. Auffällig ist die ON-Schicht, in der im Wildtyp die Stäbchen-Bipolarzellaxonterminalien, wie durch den bereits beschriebenen Bandsynapsenmarker kinesin (Abb.25), als Ringstrukturen sichtbar werden (Abb.28, Pfeile). Innerhalb der OPL sind in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (Pm12) an einigen Stellen Anhäufungen von GluR2/3-Nestern zu finden (Abb.28; rechts, Pfeile OPL), die im EM als freie Bandsynapsen und rudimentäre Zellsprosse erscheinen (nicht figuriert). In der OPL der Wildtyp-Retina wird GluR2/3 auf den lateralen Elementen

der Horizontalzellen von Stäbchenendigungen und Zapfenendfüßchen exprimiert (Abb.28; links, Pfeile OPL).

Die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor-Untereinheiten NR2B und NR1C2⁴, bildlich in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt, zeigen in der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus eine dem Wildtyp vergleichbare Expression.

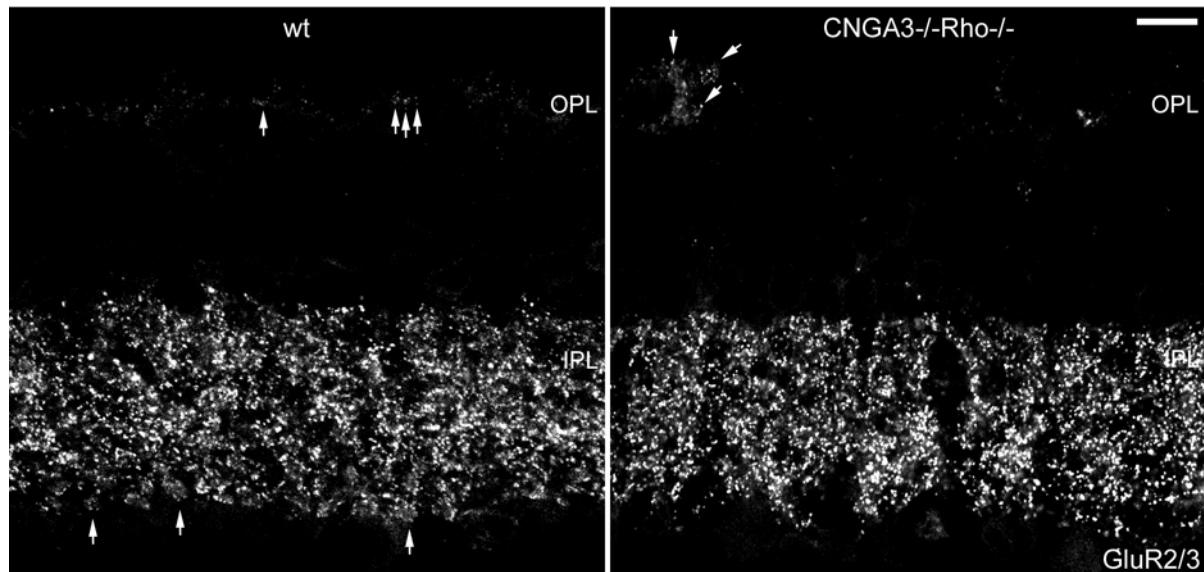


Abb.28: AMPA-Rezeptoren

GluR2/3-Färbung in der Wildtyp-Retina zeigt eine dichte Punktierung in der IPL (**links**) vergleichbar der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus (**rechts**) im Alter Pm12; Ausnahme ist die ON-Schicht in der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus, in der keine runden Stäbchen-Bipolarzell-Axonterminalien mehr zu erkennen sind (**Pfeile beim Wildtyp**); die OPL zeigt noch an vereinzelt Stellen GluR2/3 Anhäufungen (**Pfeile**); Maßstab: 10 μ m

4.9.3 Zusammenfassende Darstellung der IPL

Die innere Retina der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus im Alter Pm9-12 ist strukturell gut erhalten. Gestützt wird dies durch das Vorhandensein unterschiedlicher Zelltypen innerhalb der INL und durch die Präsenz einer dreifachen Stratifizierungsbänderung innerhalb der IPL. Eine Ausnahme ist die Stäbchen-Bipolarzelle, die sowohl morphologisch als auch funktionell in Mitleidenschaft gezogen wird. Dagegen sind die ON- und OFF-Zapfen-Bipolarzellen strukturell gut erhalten. Bestätigt wurde dies durch den ultrastrukturellen Nachweis von Bandsynapsen, die der Morphologie des Wildtyps gleichen. Auch konventionelle Synapsen scheinen normal angelegt zu sein und bleiben auch nach der Degeneration aller Photorezeptoren unbeeinflusst. Die Expressions- und Verteilungsanalyse

verschiedener inhibitorischer und exzitatorischer Rezeptoren innerhalb der inneren plexiformen Schicht zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine Abweichungen. Darüber hinaus konnten an vereinzelten Stellen „Sprouting-Effekte“ von der inneren plexiformen Schicht in die innere nukleäre Schicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen werden in Abschnitt 4.10 eingehend beschrieben und bildlich dargestellt.

4.10 Remodulierung der inneren Retina

Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie an verschiedenen Degenerationsmodellen zeigte, dass sich die innere Retina innerhalb einer Zeitspanne von 1-3 Jahren noch erheblichen morphologischen Veränderungen unterziehen kann (Marc *et al.*, 2003). Dabei konnten sowohl gabaerge als auch glyzinerge Fortsätze in Assoziation mit synaptischen Kontakten innerhalb der INL nachgewiesen werden. Vergleichbare Remodulierungen waren auch in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus zu beobachten: Abbildung 29 zeigt die Expression des vesikulären Glutamattransporters 1 (vGluT1), des $GABA_A\alpha3$ - und des $Gly\alpha3$ -Rezeptors in der Wildtyp- und der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ -Retina. Alle Bipolarzellen exprimieren den vGluT1 und akkumulieren ihn in den Axonterminalien. Dies ist in der Wildtyp-Retina erkennbar (Abb.29; A). Die ON-Schicht der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ -Retina zeigt hingegen, dass nur noch ganz vereinzelt Stäbchen-Bipolarzellaxonterminalien vGluT1 anreichern (Abb.29; A'). Auffällig ist die Anreicherung des vGluT1 innerhalb der inneren nukleären Schicht in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus. Auch die beiden erwähnten Rezeptor-Untereinheiten zeigen eine zusätzliche Expression innerhalb der INL (Abb.29; B', C'). Die in Abbildung 29 gezeigte Lokalisation von Rezeptoren innerhalb der INL wurde für alle untersuchten Untereinheiten der AMPA-, KAINAT-, NMDA-, Gly- und GABA-Rezeptoren beobachtet. Dies lässt vermuten, dass auch dendritische und axonale Fortsätze in die INL hineinwachsen.

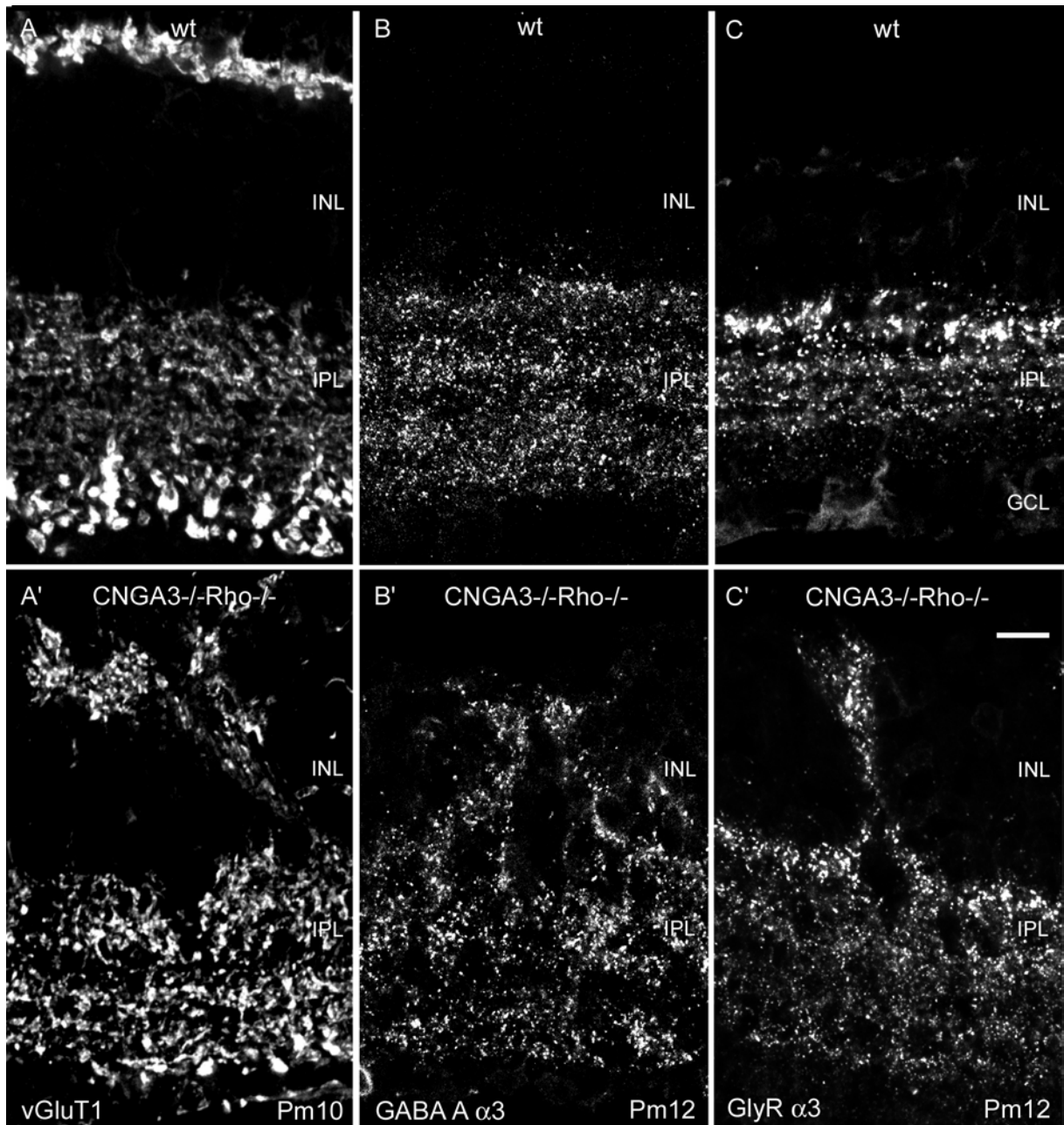


Abb.29: Expression von Rezeptoren in der INL

A,A': Wildtyp- (A) und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}-Retina (A') gefärbt mit vGluT1; der Wildtyp zeigt eine starke Färbung in den Axonterminalien der Stäbchen-Bipolarzelle; bei der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus ist die starke Expression innerhalb der INL auffällig (A'); **B,B'**: Wildtyp- (B) und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}-Retina (B') gefärbt mit der GABA_A-Rezeptoruntereinheit α3; die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus zeigt neben der Punktierung in der IPL auch eine Punktierung in der INL. **C,C'**: Wildtyp-Retina (A) und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}-Retina (A') gefärbt mit GlyRα3; auch hier zeigt die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus, vergleichbar dem Wildtyp, eine normale Punktierung über der IPL. Zusätzlich erstreckt sich ein feines Punktierungsband über die gesamte Höhe der INL; Maßstab: 10 μm

4.10.1 Morphologische Darstellung dendritischer und axonaler Fortsätze innerhalb der INL

Eine Nervenzelle repräsentiert eine fundamentale Polarisierung durch das Vorhandensein dendritischer und axonaler Strukturen. Dabei spielt das Mikrotubuli-Cytoskelett eine entscheidende Rolle. Die Mikrotubuli sind essentielle Bausteine der Dendriten und Axone und werden durch das TAU1-Protein und über Interaktionen Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (MAPs) reguliert. Das TAU1-Protein ist in den Axonterminalien von Nervenzellen lokalisiert (Mandell und Banker, 1995). In der Retina wird es in den Axonen von Ganglienzellen exprimiert (Wang *et al.*, 2000). In der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus kolokalisiert es zusätzlich mit den axonalen Ausläufern der OFF-Zapfen-Bipolarzellen, die mit NK3R angefärbt werden. Da die NK3R-Färbung aufgrund der zusätzlichen Markierung der Zellkörper anschaulicher ist, wurde auf die bildliche Darstellung der Immunfärbung von TAU1 verzichtet. Aus der Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten-Proteine wurde der MAP2-Antikörper verwendet, der selektiv nur Dendriten erkennt (Matus *et al.*, 1981). Andere MAPs wie MAP1A, MAP1B und MAP3 weisen keine polarisierende Verteilung in Neuronen auf, spielen aber bei der neuronalen Morphogenese eine entscheidende Rolle (Mandell und Banker, 1995). Der MAP2-Antikörper wurde in der Retina als Ganglienzellendritenmarker beschrieben (Wang *et al.*, 2000).

Abbildung 30 zeigt eine MAP2-Färbung in der Wildtyp- und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}-Retina, wobei in der Mutante dendritische Fortsätze in die INL auswachsen (Abb.30; A, B). Eine Doppelfärbung mit GABA zeigte, dass MAP2 zusätzlich ganz schwach einige Zellkörper der gabaergen Amakrinzellen anfärbt und teilweise mit deren dendritischen Ausläufern kolokalisiert (Abb.30; A''). Dies verdeutlicht, dass es sich bei dem verwendeten MAP2-Antikörper nicht um einen reinen Ganglienzellendritenmarker handelt. Glyzinerge Amakrinzellendriten werden von MAP2 nicht erkannt (Abb.30; A'). Dennoch wachsen bei der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus Fortsätze der glyzinerger AII-Amakrinzelle in die INL (Abb.30; B'1) hinein. Die Doppelfärbung MAP2 mit GABA zeigt, dass in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus zudem gabaerge Amakrinzellendriten und Ganglienzellendriten in die INL hineinwachsen (Abb.30; B'').

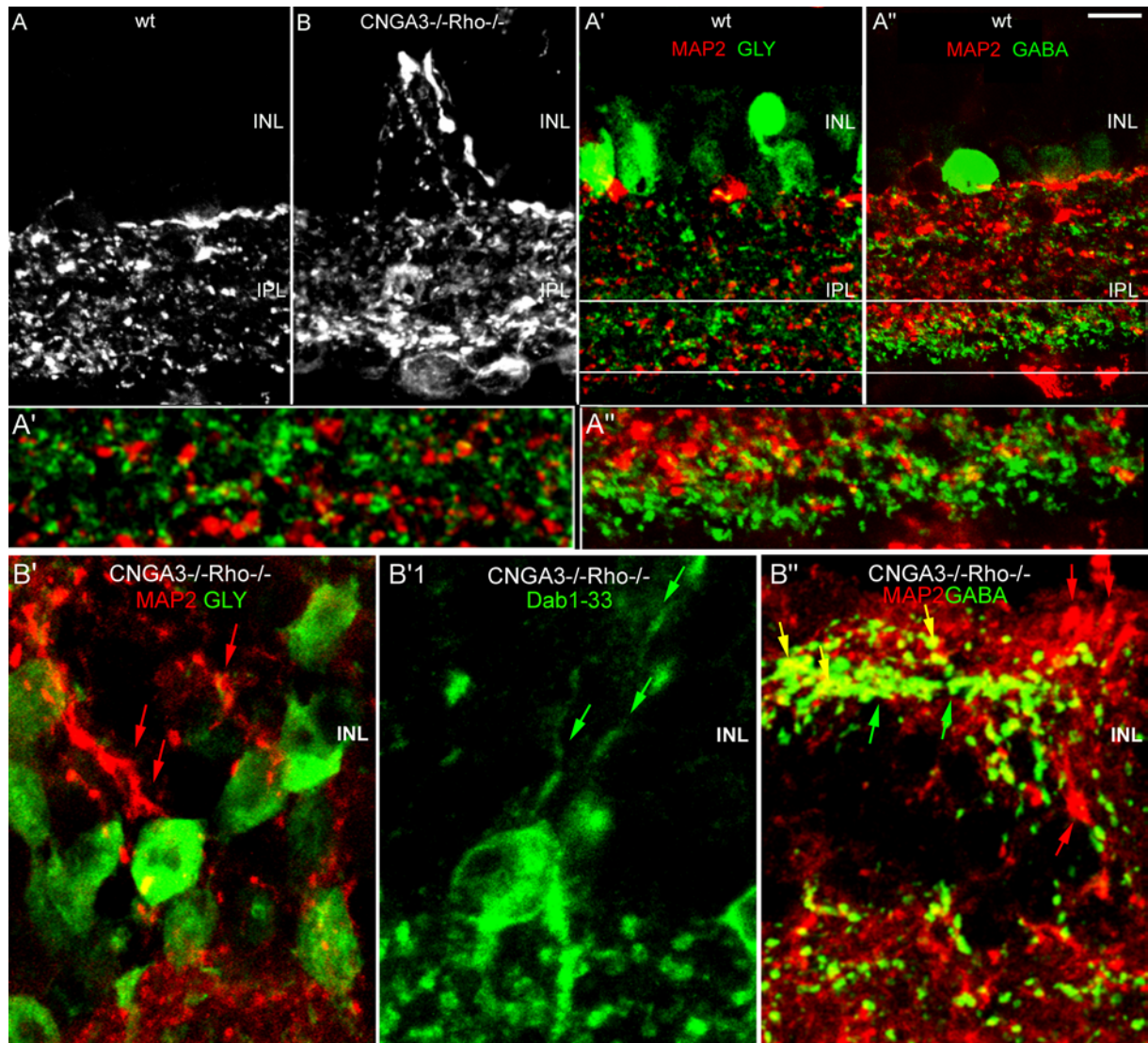


Abb.30: Charakterisierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP2 in der Wildtyp- und $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ -Retina

A,B: MAP2-Färbung in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ -Retina zeigt Dendriten in die INL hineineinwachsen (**B**), im Wildtyp sind sie auf die IPL reduziert (**A**); **A',A''**: Doppelfärbungen mit MAP2 und Gly (**A'**) und mit MAP2 und GABA (**A''**) im Wildtyp, darunter die doppelte Vergrößerung des jeweilig ausgewählten Ausschnittes; keine Kolokalisation von MAP2 mit Gly, nur mit einigen gabaergen Amakrinzellkörpern **A''**: Dendriten kolokalisieren an vereinzelt Stellen; **B'B'1**: Keine Kolokalisation von MAP2 mit Gly in der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ -Retina; dennoch konnten Netzwerkbildungen glyzinerger Amakrinzellen (AII, hier mit dem Disabled-Antikörper Dab1-33 gefärbt) im Zeitraum Pm9-12 beobachtet werden; **B''**: Vereinzelt Kolokalisation von GABA mit MAP2 (**gelbe Pfeile**), zusätzliche Auswüchse gabaerger Amakrinzellen, die von MAP2 nicht erkannt werden (**grüne Pfeile**); MAP2-Punktierungen, die nicht mit GABA kolokalisieren, sind Dendriten der Ganglienzellen (**rote Pfeile**); Maßstab für A, B, A', A'': 10 μ m, vergrößerte Darstellung A' und A'', B', B'1 und B'': 5 μ m

4.10.2 Zusammenwirken aller drei Komponenten: Axone, Dendriten und Rezeptoren innerhalb der nukleären Schicht

In Abbildung 31 sind OFF-Zapfen-Bipolarzellen der Wildtyp- und *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}*-Retina dargestellt. Diese sind immunoreaktiv für den Neurokinin-Rezeptor 3 (NK3R). Dieser wurde bereits für die Charakterisierung der äußeren plexiformen Schicht zur Markierung von Zapfenendfüßchen herangezogen (Abb.12). Während die *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus im Alter Pw5 Zapfenendfüßchen vergleichbar dem Wildtyp zeigt (Abb.31; A, A'; Pfeile), sind diese im Alter Pm10 nicht mehr nachweisbar (Abb.31; A''). Auffällig sind Axonterminalien, die aus der IPL in die INL hineinziehen (Pfeile). Die Abbildung 32 zeigt eine Doppelfärbung von NK3R mit dem Dendritenmarker MAP2 (Abb.32; A'). Die Doppelfärbung in der Mutante zeigt deutlich, wie sich dendritische Fortsätze in axonale Bipolarzellendigungen innerhalb der inneren nukleären Schicht einfügen (Abb.32; A''). Die abschließend dargestellte Dreifachfärbung (NK3R in blau, MAP2 in rot und GABA_Aα3, eine Rezeptoruntereinheit, in grün) veranschaulicht das beschriebene Zusammenspiel axonaler und dendritischer Fortsätze in Assoziation mit Rezeptoren innerhalb der inneren nukleären Schicht als funktionelle Einheit (Abb.33; A'). Dieses Zusammenspiel beschränkt sich in der Wildtyp-Retina auf die innere plexiforme Schicht (Abb.33; A).

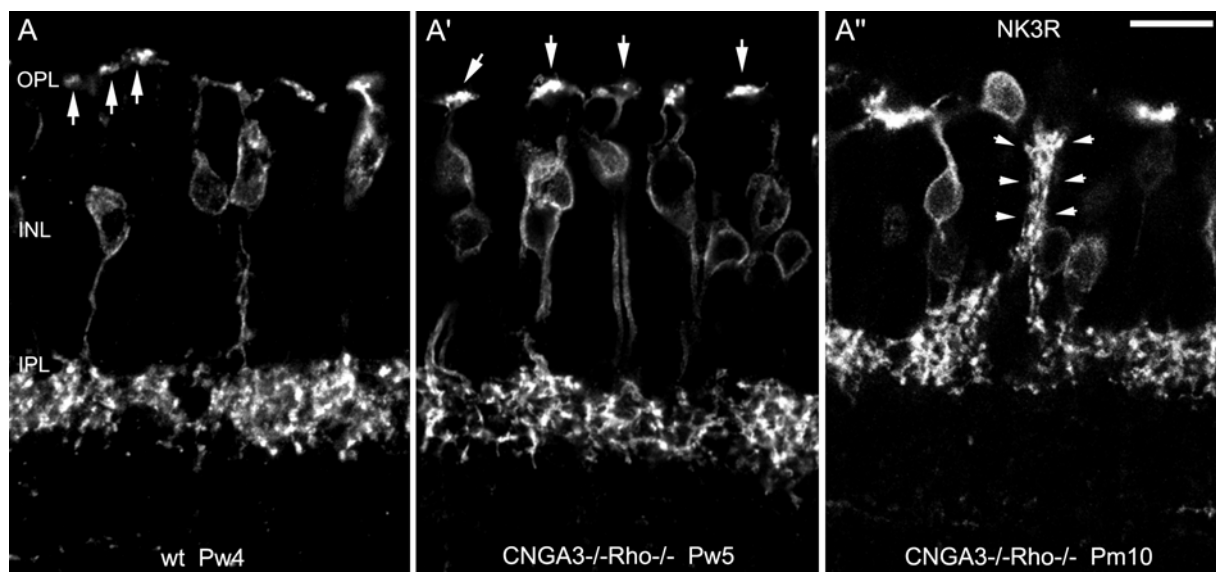


Abb.31: NK3R-Färbung im Wildtyp im Vergleich zur *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus

A, A', A'': NK3R-Färbung zeigt in der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus im Alter Pw5 intakte OFF-Zapfen-Bipolarzellen mit vorhandenen Zapfenendfüßchen (A'; Pfeile), vergleichbar dem Wildtyp im Alter Pw4 (A; Pfeile); mit Pm10 ziehen Axonterminalien in die INL hinein (A''; Pfeile); Maßstab: 10 µm

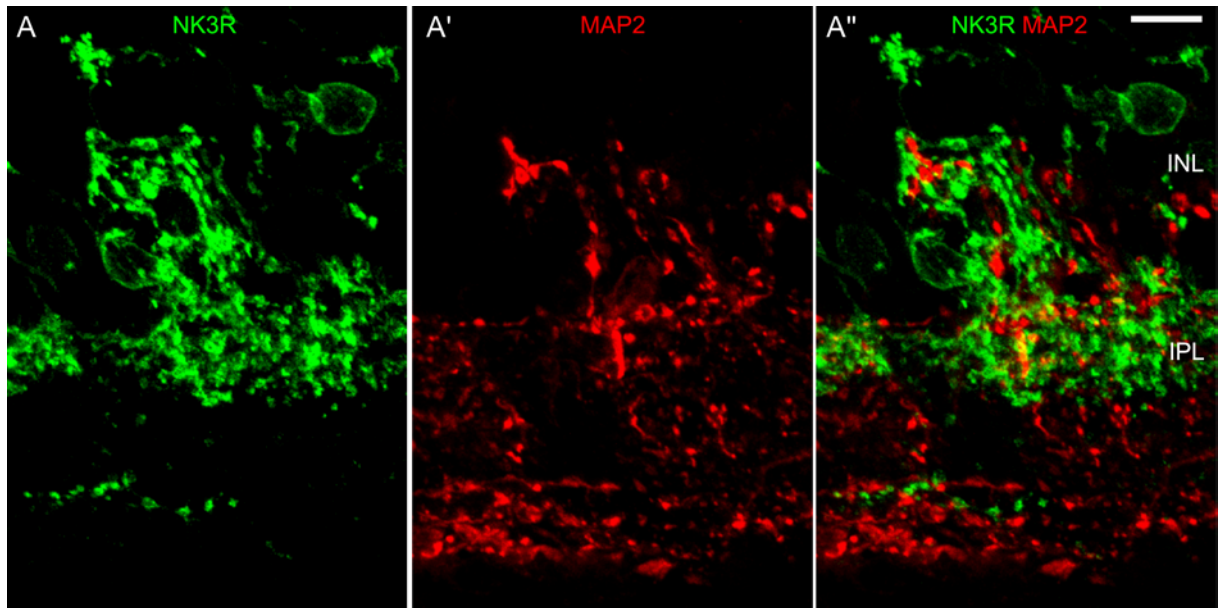


Abb.32: Axonale und dendritische Ausläufer wachsen bei der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus in die INL hinein

A: NK3R-Einzelfärbung zeigt axonale Bipolarzellendigungen in die INL hineinwachsen; **A':** MAP2 zeigt Dendriten, die sich direkt in diese axonale Struktur einfügen. **A'':** Doppelfärbung mit MAP2 und NK3R; Maßstab: 10 μm

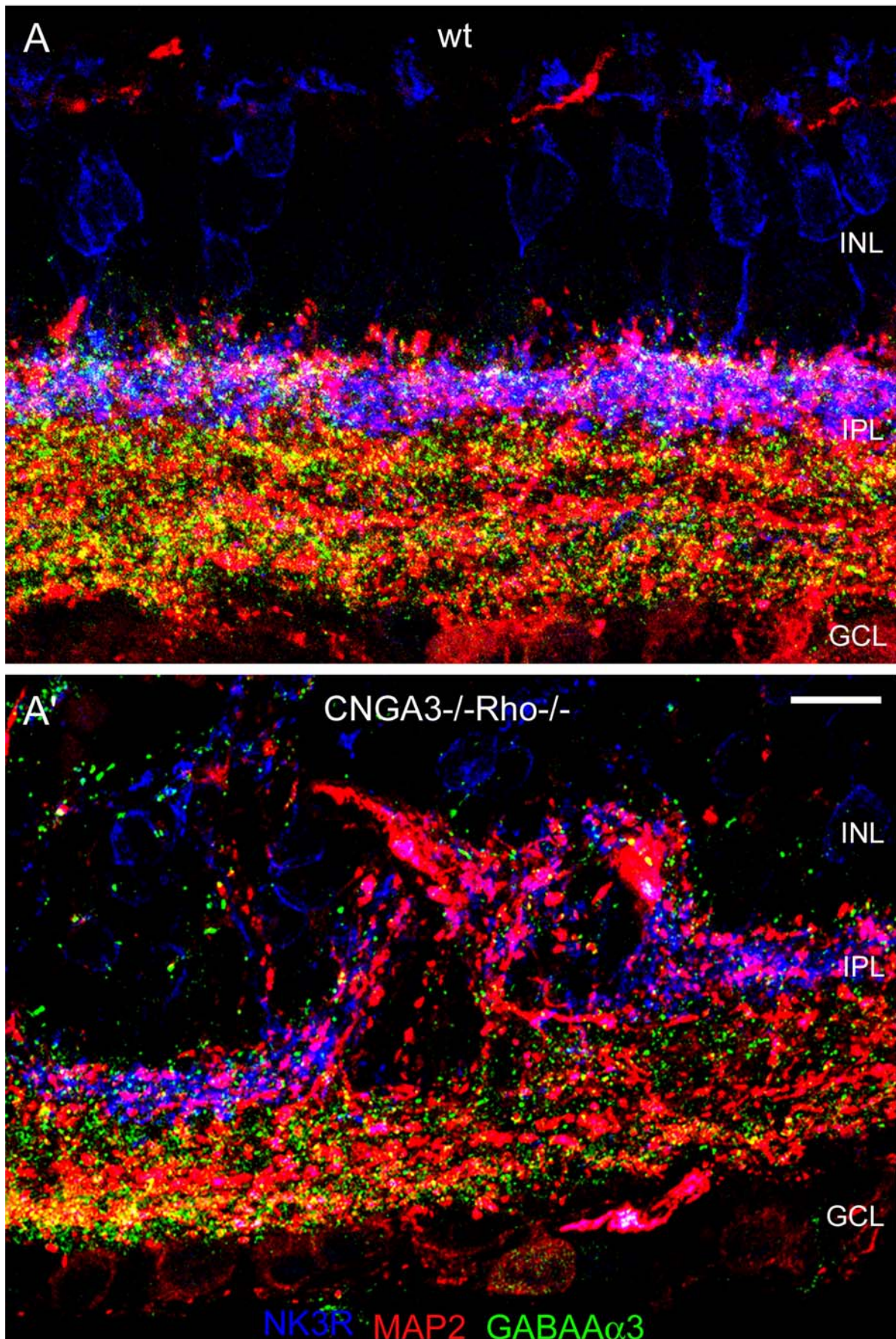


Abb.33: Detektion von Dendriten, Axonen und Rezeptoren innerhalb der INL: A,A': NK3R in blau, MAP2 in rot und GABA α 3 in grün in der wt- (A) und CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}-Retina (A') im Alter Pm12; Maßstab: 10 μ m

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus, ein Modellsystem mit funktionell inaktiven Photorezeptoren, morphologisch untersucht. Der Einfluss aktiver Photorezeptoren auf die postnatale Entwicklung und die langfristigen Auswirkungen der Photorezeptordegeneration auf die innere Retina sollten herausgestellt werden.

5.1 Die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Retina zeigt auch mit funktionslosen Photorezeptoren eine normale Entwicklung

Die Doppelmutante $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ zeigt in der vierten postnatalen Woche (Pw4) eine Retina mit einer weitgehend intakten Morphologie, einer kompakten ONL mit 8-10 Photorezeptorreihen und einer intakten Synaptogenese. Dies war auch der Grund, warum auf die Untersuchung noch jüngerer Mäuse verzichtet wurde. Auch die Elektroretinogramme entstammen Mäusen im Alter der fünften postnatalen Woche (Pw5). Die Ausbildung einer Triadenkonfiguration beginnt mit P10 und wird zum Zeitpunkt P14 vollendet (Blanks *et al.*, 1974). Diese frühe postnatale Triaden-Entwicklung ist unbeeinflusst, denn $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Mäuse weisen im Alter Pw4 sowohl klassische Stäbchenendigungen wie Zapfenendfüßchen auf. Demnach erfüllt die Retina zu diesem Zeitpunkt alle morphologischen Voraussetzungen, um funktionieren zu können.

Dagegen nimmt bereits mit Pw5 die Anzahl der klassischen Stäbchenendigungen ab, während die Anzahl der synaptischen Bänder und der postsynaptischen Elemente in den verbleibenden Stäbchenendigungen zunimmt. Eine Hauptfunktion des Proteins bassoon ist die Verankerung des synaptischen Bandes an der aktiven Zone der Präsynapse. Dies konnte in einem Maus-Modell, indem das bassoon-Protein ausgeschaltet war, gezeigt werden (*Bsn-Maus*, Dick *et al.*, 2003).

Die Triaden der Zapfenendfüßchen sind im Vergleich zu denen der Stäbchenendigungen ungefähr zwei Wochen später, also ab Pw6, von der Degeneration betroffen. Die quantitativen Analysen ergaben, dass eine Maus im Alter Pw4 25% an „funktionell intakten Bandsynapsen“ hervorbringt. Diese Auswertung bezieht sich nur auf intakte Ringstrukturen, die mit einer bassoon-Färbung sichtbar gemacht werden konnten. Es ist davon auszugehen, dass nur diese fest verankert sind.

5.2 Einfluss funktionsloser Photorezeptoren auf die Expression bestimmter Rezeptoren

Innerhalb der OPL werden in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus präsynaptische Marker und postsynaptische Glutamatrezeptoren normal exprimiert. Eine Ausnahme zeigte sich in der Expression der Glutamat-Untereinheit GluR5. Diese ist postsynaptisch auf OFF-Bipolarzellendriten exprimiert, aber auch präsynaptisch in den Zapfenendfüßchen lokalisiert (Haverkamp *et al.*, 2001; Primaten-Retina). In der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}-Retina ist GluR5 an den Zapfenendfüßchen kaum detektierbar. Eine nahezu fehlende Expression zeigte auch die CNGA3^{-/-} Maus. Da die Rho^{-/-} Maus eine charakteristische GluR5-Färbung vergleichbar dem Wildtyp hervorbrachte, konnte die Negativ-Expression eindeutig auf das Fehlen des CNGA3-Kanals zurückgeführt werden. Da derzeit die Funktion der GluR5-Untereinheit im Zapfenendfüßchen noch unbekannt ist, sind die resultierenden Folgen einer fehlenden Expression noch nicht absehbar.

5.3 Zustand der inneren Retina nach langanhaltender Photorezeptordegeneration

Die innere Retina zeigt in der Doppelmutante eine normale Stratifizierung von Zapfen-Bipolarzellen und Amakrinzellen. Auch das Verteilungsmuster unterschiedlicher Rezeptoren ist dem Wildtyp vergleichbar. Die Stäbchen-Bipolarzelle ist der einzige Zelltyp, der in seiner Morphologie, aber auch in der Stratifizierung seiner Axonterminalien, in Mitleidenschaft gezogen wird. Dennoch scheint für die gesamte Retina, besonders für die innere, der Einfluss intakter Photorezeptoren unerwartet gering zu sein. Da gezeigt wurde, dass die Aggregation von Transmitterrezeptoren aktivitätsabhängig ist (Mammen *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 1997), muss von einer intrinsischen Aktivität ausgegangen werden. Dieses Ergebnis einer funktionell weitgehend unbeeinflussten IPL eröffnet neue Behandlungsmöglichkeiten (5.8.2).

5.4 Die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus im Vergleich zur rd-Maus

5.4.1 Die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus zeigt ein temporär verschobenes Degenerations-Zeitfenster und eine normale Entwicklung der Stäbchen-Bipolarzellen

Bei der rd-Maus setzt die Degeneration bereits am achten postnatalen Tag (P8) ein. Mit P20 sind nur noch vereinzelt Kerne nachweisbar und mit Pw4 ist die Degeneration vollendet (Jiménez *et al.*, 1996). Im Vergleich zur rd-Maus zeigt die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus einen Degenerationsverlauf, der um zwei Monate verzögert ist. Das bedeutet, dass das Stadium einer vollständig degenerierten äußeren Retina in der rd-Maus im Alter von Pm1, in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus aber erst mit Pm3 erreicht wird. Diese temporäre Verschiebung erklärt die strukturell gut erhaltene Morphologie der inneren Retina, einschließlich der Stäbchen-Bipolarzelle, die im Alter Pw4 vom Wildtyp kaum zu unterscheiden ist. Die Ultrastruktur der Stäbchen-Bipolarzelle zeigt ihre Axonterminalien als große Terminalien mit mehreren Bandsynapsen. Diese sind bis Pw8,5-Pw10 nachweisbar. Dagegen zeigte die rd-Maus im Alter von Pw4 eindeutig kleinere Axonterminalien. Ultrastrukturelle Studien bestätigten dies: Diese waren rudimentär klein, vergleichbar mit denen von Zapfen-Bipolarzellen. Dies korreliert mit einer unvollständigen Synaptogenese, bei der keine synaptischen Bänder mehr ausgebildet werden können (Strettoi *et al.*, 2002). Die Analysen der rd-Maus ergaben, dass „morphologisch intakte“ Photorezeptoren vorhanden sein müssen, damit die Entwicklung nachgeschalteter Neurone, wie beispielsweise der Stäbchen-Bipolarzelle, sichergestellt werden kann (Peng, 2000; Strettoi und Pignatelli, 2000). Da sich der pathologische Prozess in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus erst nach der Synaptogenese bemerkbar macht, ist die Stäbchen-Bipolarzelle zunächst unbeeinflusst und kann sich wie im Wildtyp normal entwickeln.

5.5 Zapfen-Photorezeptoren

5.5.1 Zapfen-Photorezeptorkerne sind auf der Höhe ihrer Zapfenendfüßchen lokalisiert

Die Zapfen-Photorezeptorkerne grenzen in der Wildtyp-Retina an die äußerste ONL. In der CNGA3^{-/-} Rho^{-/-} Maus sind diese bereits zum Zeitpunkt P8 auf der Höhe ihrer Zapfenendfüßchen lokalisiert. Diese Beobachtung ist zuvor weder in der rd-Maus noch bei *retinitis pigmentosa*-Patienten beschrieben worden. Welche Ursachen dem zugrunde liegen ist unklar. Auch der Faktor Licht scheint hierfür nicht entscheidend zu sein, denn die Augen der Maus werden erst ab P12-14 geöffnet.

5.5.2 Beschleunigte Zapfen-Degeneration auf der ventralen Seite

In der CNGA3^{-/-} Maus konnte über der gesamten Retina eine hemisphärische Asymmetrie in der Anzahl der überlebenden blauen Zapfen beobachtet werden. Zusätzlich wurden Anfärbungen mit PNA (*peanut agglutinin*) angefertigt. Dieser Marker, der alle Zapfentypen anfärbt, deckte ein Gefälle nicht nur für die blauen, sondern auch für die rot-grünen Zapfen auf. Auf der dorsalen Seite waren noch sehr viele Zapfen zu finden, während sie auf der ventralen Seite kaum noch nachweisbar waren. Da das PNA nur äußere Segmente markiert, das blaue Opsin aber den gesamten Zapfen einschließlich des Fußes anfärbt und somit anschaulicher ist, wurde auf die Darstellung der PNA-Färbung verzichtet. Genau genommen ist die Unterteilung in blaue und rot-grüne Zapfen eigentlich überholt, da neueste Erkenntnisse eine Koexpression beider Opsine innerhalb eines Zapfens aufdeckten (Applebury *et al.*, 2000). Demnach wird ein blauer Zapfen sehr wahrscheinlich nur angefärbt, wenn das blaue Opsin entsprechend hoch transkribiert wird. Dies gilt auch für die rot-grünen Zapfen. Abschließend kann man also davon ausgehen, dass das blaue Opsin, welches ventral dominiert, degenerationsanfälliger zu sein scheint, als das rot-grüne Opsin.

5.6 Strukturelle Plastizität in Zapfen-Photorezeptoren und nachgeschalteten Neuronen

Unterschiedliche Retinae-Modelle, humane wie Tier-Modelle, wurden zur Analyse der *retinitis pigmentosa* herangezogen. Obwohl Photorezeptorzellen, wie Stäbchen und Zapfen, sich funktionell sehr ähnlich sind, reagieren sie unterschiedlich auf retinale Verletzungen oder degenerative Netzhauterkrankungen. Allgemein veranschaulichten die verschiedenen Modelle, dass die Axonterminalien der Stäbchen eine dramatische Plastizität zeigen, während die Axonterminalien der Zapfen zumeist nicht reagieren (Zhang und Townes-Anderson, 2002). Beispielsweise zeigte ein Katzen-Modell mit retinaler Verletzung, dass sich die Axone der Stäbchen in Richtung ihrer Zellkörper zurückzogen, während die Zapfen keine Antwort zeigten (Erickson *et al.*, 1983; Lewis *et al.*, 1998). Auch für die autosomal-dominante RP ist diese Plastizität nur bei den Stäbchen beobachtet worden. Aber auch Zapfen bilden neuritische Fortsätze aus, wenn auch in geringerem Ausmaß als die Stäbchen (Mandell *et al.*, 1993). Dieser „Sprouting-Effekt“ wurde in der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus ebenfalls sichtbar (5.5.1). Hierfür sind möglicherweise unterschiedliche Calcium-Kanäle verantwortlich. In den Zapfen wird der Calcium-Einstrom über cGMP-Kanäle reguliert (Rieke und Schwartz, 1994). Dagegen wird die Plastizität in Stäbchen über Calcium-Kanäle vom L-Typ gesteuert. Eine Studie an Salamander-Retinae demonstrierte dies: Durch die Zugabe des Calcium-Kanal-Antagonisten Nicardipin wurde der Calcium-Einstrom blockiert, was verhinderte, dass sich die Stäbchenaxone der Photorezeptoren zurückzogen (Nachman-Clewner und Townes-Anderson, 1999).

5.6.1 Zapfen-Fortsätze

Immunfärbungen mit dem blauen Opsin-Marker JH455 zeigten, dass die Zapfen der Doppelmutanten bereits zum Zeitpunkt P8 Ausläufer ausbilden. Auf die bildliche Darstellung wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet, da die stärkste Ausprägung im Alter Pw6 stattfindet. Anders verhält es sich bei *retinitis pigmentosa*-Patienten. Bei ihnen sind es die Stäbchen-Photorezeptoren, die dieses Phänomen zeigten (Li *et al.*, 1995). Gleiches wurde auch für Katzen, die eine Stäbchen/Zapfen-Dysplasie aufweisen, beschrieben (Chong *et al.*, 1999; Rdy-Katzen). Dagegen zeigten Mäuse, die von der retinalen Degeneration (*rd*; retinal degeneration mutation) betroffen sind, ähnlich der *CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}* Maus, ein „Sprouting“, das nur die Zapfen betrifft (Fei, 2002). Welche Mechanismen diese

plastischen Reaktionen im Einzelnen auslösen, ist noch nicht geklärt. Es ist aber davon auszugehen, dass die Ausbildung vergrößerter Zapfenendfüße möglicherweise den interzellulären Kontakt sicherstellt, der mit zunehmendem Zapfenverlust schwindet.

5.6.2 OFF-Zapfen-Bipolarzellen kontaktieren die Stäbchenendigungen in der $Rho^{-/-}$

Maus

In der $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus wachsen im Zeitraum Pw5-Pw7 Horizontalzellfortsätze und im Zeitraum Pw7-Pw8,4 Stäbchen-Bipolarzell-Dendriten in die ONL hinein. Welche Mechanismen dies auslösen ist unbekannt. Es scheint aber so zu sein, dass nicht alle Zellen diese Fähigkeit besitzen. Die Zapfen-Bipolarzellen der Doppelmutante zeigen dieses Phänomen in dieser Form nicht. Eine Ausnahme stellt die $Rho^{-/-}$ Maus dar, bei der die Dendriten der OFF-Zapfen-Bipolarzellen im Alter Pw7 Kontakte zu den Stäbchenendigungen ausbilden. In der $Rho^{-/-}$ Maus sind im Gegensatz zur Doppelmutante die Zapfen nur sekundär von der Photorezeptordegeneration betroffen. Sie sind primär intakt, was durch ERG-Messungen bestätigt werden konnte (Jaissle *et al.*, 2001). Somit erhalten auch die Zapfen-Bipolarzellen in den ersten Wochen synaptischen Eingang. Möglicherweise reagieren die OFF-Zapfen-Bipolarzellen auf die sekundär ausgelöste Zapfendegeneration und bilden daraufhin dendritische Kontakte zu noch vorhandenen Stäbchenendigungen aus (Abb.12; A7 und 5.7.3). Dieses Phänomen wurde umgekehrt bereits bei transgenen Schweinen beschrieben, bei denen nach Verlust der Stäbchen-Photorezeptoren die Dendriten der Stäbchen-Bipolarzellen auswuchsen und ektopische Synapsen mit überlebenden Zapfen-Terminalien ausbildeten (Peng *et al.*, 2000).

5.6.3 Das Sprouting der Horizontal- und Stäbchen-Bipolarzellen scheint kurzzeitig eine Stagnation im Degenerationsverlauf zu bewirken

Die $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Maus zeigt zwischen Pw4-Pw7 einen sehr langsamen Degenerationsverlauf. Nur eine Reihe von Photorezeptoren in der mehrschichtigen ONL degeneriert. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Degeneration in ihrem Fortschreiten arretiert ist, während die Horizontalzellen und die Stäbchen-Bipolarzellen Kontakt zu den noch intakten, in die ONL zurückgezogenen Stäbchen, halten. Das Auswachsen neuritischer Fortsätze von Stäbchen-Bipolarzellen (Li *et al.*, 1995), Horizontalzellen

und Amakrinzellen (Fariss *et al.*, 2000) wurde auch in der humanen Retina, bei *retinitis pigmentosa* Patienten beschrieben.

5.6.4 Remodulierungen der inneren Retina - Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen

bilden Fortsätze in die innere nukleäre Schicht

Glyzinerge AII-Amakrinzellen bilden, wie auch gabaerge Amakrinzellen und Ganglienzellen in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus, aber auch in beiden Einzelmutanten (nicht dargestellt), Dendriten in die innere nukleäre Schicht aus. Somit zeigen alle Zelltypen die Fähigkeit zur Plastizität. Dieses Durchspannen der inneren nukleären Schicht, ausgehend von Fortsätzen unterschiedlicher Neurone, wurde in einer aktuellen Studie als „*Mikroneuroma*“ bezeichnet (Jones *et al.*, 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Retina nach vorausgegangener Photorezeptordegeneration auch noch im sehr hohen Alter (P200-600) moduliert wird. In der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus waren die ersten *Mikroneuroma* im Alter von Pm9-12 zu beobachten. Mit zunehmendem Alter ist davon auszugehen, dass die Retina sich noch weiteren Modulierungen unterzieht. Welche molekularen Mechanismen diesen „Sprouting-Effekt“ erst nach neun Monaten auslösen, obwohl die Degeneration aller Photorezeptoren bereits sechs Monate zurückliegt, ist ungewiss. Interessante Aufschlüsse erbrachte eine Studie, bei der dieser beschriebene „Sprouting-Effekt“ bei Horizontalzellen experimentell ausgelöst wurde (Lewis *et al.*, 1998). Diese Fähigkeit zur Plastizität nachgeschalteter Neurone ist aus medizinischer Sicht, beispielsweise zur Kontaktierung transplanteder Photorezeptoren, von großer Bedeutung (Lewis *et al.*, 1998).

5.6.5 Welche Rolle übernehmen die Müllerzellen bei der strukturellen Remodulierung?

In allen bisher beschriebenen Photorezeptor-Degenerationsmodellen wurde eine vermehrte Gliabildung beobachtet, die sich durch eine erhöhte Expression des GFAP bemerkbar macht. Es ist bekannt, dass die Oberflächen der Müllerzellen mit Stäbchen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und Zapfen-Bipolarzellen assoziiert sind (Jones *et al.*, 2003). Somit ist es naheliegend, dass die Gliabildung eine Voraussetzung für die Ausbildung der Neuritenfortsätze innerhalb der ONL und INL in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus ist. Schon aus der Embryonalentwicklung ist bekannt, dass Zellwanderungen an einen bestimmten Ort, sogenannte Leitstrukturen wie Gliazellen benötigen. Man

spricht in diesem Zusammenhang auch von „Kontaktführung“. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Gliabildung auf vereinzelte Zelltypen innerhalb der Retina auch schützende Funktion hat: Bei Amakrinzellen vermögen sie regenerierende Auswirkungen auf das Dendriten- und bei Zapfen-Bipolarzellen zusätzlich auf das Axonterminaliensystem auszuüben (Fariss *et al.*, 2000). Auch für die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}-Retina könnte dies zutreffen, da auch in dieser die Morphologie der Amakrinzellen und der Zapfen-Bipolarzellen erhalten bleibt. Auch die Expression spezifischer Wachstumsfaktoren in diesen beiden Zelltypen scheint die Strukturhaltung zu begünstigen. Hierauf wird in 5.8.1 näher eingegangen.

5.7 Synaptische Plastizität

5.7.1 Ektopische Synapsen in der ONL

Die strukturelle Plastizität wird von der Ausbildung ektopischer Synapsen begleitet, die von den Stäbchen-Photorezeptoren ausgeht. Ektopische Synapsen wurden auch schon in der Bsn-Maus beschrieben (Dick *et al.*, 2003). Ob auch Zapfen-Photorezeptoren zur Ausbildung ektopischer Synapsen fähig sind, ist noch nicht geklärt. Die Einzelmutante CNGA3^{-/-} könnte in weiteren Analysen Aufschluss darüber geben. Diese fehllokalisierten Bandsynapsen bilden teilweise, wie im Wildtyp, Ringstrukturen aus und könnten demnach aktiv sein. Die Ultrastruktur zeigte jedoch nicht bei allen eine intakte Morphologie (rudimentäre postsynaptische Elemente und frei im Cytoplasma liegende Bandsynapsen). Auch ältere Wildtyp-Mäuse entwickelten eine vergleichbare Plastizität. An den ektopischen Synapsen wird ebenso wie in der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus (Abb.19) der vesikuläre Glutamatttransporter vGluT1 exprimiert. Auch die kinesin-Färbung in der Wildtyp-Maus zeigte eine intakte Hufeisenstruktur. Demnach kann diese Plastizitätsentwicklung, die den Sehvorgang möglicherweise unterstützt bzw. aufrecht erhält, auch als Reaktion auf eine altersabhängige Degeneration betrachtet werden.

5.7.2 Synaptische Plastizität innerhalb der Stäbchenendigungen der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}

Maus

In 5.1 wurde eine Akkumulation in der Anzahl von Bandsynapsen und postsynaptischen Elementen beschrieben. Diese synaptische Plastizität konnte sowohl in der rds- (retinal degeneration slow; Jansen und Sanyal, 1984) als auch in lichtgeschädigten Albino-Mäusen (Jansen und Sanyal, 1987) beobachtet werden. Die plastische Reaktion erklärt man sich mit der Reduktion des afferenten Eingangs auf die postsynaptischen Elemente.

5.7.3 OFF-Zapfen-Bipolarzellen entwickeln eine synaptische Plastizität zu noch intakten

Stäbchenendigungen aus

Doppelfärbungen mit dem NK3R-Antikörper, der die OFF-Zapfen-Bipolarzellen anfärbt und bassoon, das die Stäbchenendigungen markiert, zeigten, dass alle noch vorhandenen Stäbchenendigungen nicht nur für bassoon, sondern zusätzlich auch für NK3R immunopositiv waren. Demnach ist davon auszugehen, dass die OFF-Zapfen-Bipolarzellen auf den sekundär eingetretenen Zapfenverlust reagieren, indem sie Stäbchenendigungen kontaktieren. Noch ausstehende ultrastrukturelle Analysen sollten zeigen, ob die OFF-Zapfen-Bipolarzellen zusätzlich synaptischen Kontakt in oder an den Stäbchenendigungen ausbilden.

5.7.4 Synaptische Plastizität innerhalb der IPL

Bei der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus stützen immunhistochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen die Vermutung, dass sowohl konventionelle Synapsen als auch Bandsynapsen in der IPL in erhöhter Dichte angelegt werden. In Abb.24 C und C' zeigt die kinesin-Färbung in der Doppelmutante eine erhöhte Punktierungsdichte innerhalb der IPL, was für eine erhöhte Anzahl von Bandsynapsen spricht. Es wäre aufschlussreich, dies quantitativ in der CNGA3^{-/-} Einzelmutante zu untersuchen, da diese aufgrund einer vorhandenen äußeren Retina, unter den gleichen Bedingungen wie der Wildtyp fixiert werden kann. So könnten Fixierungsartefakte vermieden werden. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass bereits Ende der 70er Jahre eine quantitative Studie zeigte, dass Mäuse, die im Dunkeln gehalten wurden, im Vergleich zu Mäusen, die unter normalen Licht-Einfluss standen,

innerhalb der zentralen Retina eine erhöhte Dichte konventioneller Synapsen aufwiesen (Fisher *et al.*, 1979). Wesentlich interessanter wäre allerdings zu überlegen, inwieweit eine erhöhte Synaptogenese therapeutisch, beispielsweise durch elektrische Stimulation, genutzt werden könnte.

5.8 Ausblick

5.8.1 Therapeutische Ansätze für die Behandlung degenerativer Netzhauterkrankungen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist *retinitis pigmentosa* die Bezeichnung für eine Gruppe von erblichen Augenerkrankungen, die eine Zerstörung der Retina zur Folge haben. Ebenso führt auch die weitverbreitete altersbedingte Makula-Degeneration (ArMD = age related macula degeneration) zu einem Absterben aller Photorezeptoren. Dieser Zelltod ist die Folge eines genetisch programmierten Zelltodes. In den letzten Jahren gelang es mit Hilfe molekularer Analysen unterschiedliche Gene zu identifizieren, die diesen degenerativen Prozess auslösen und für eine mögliche später eintretende Erblindung verantwortlich sind (Farber und Danciger, 1997).

Auch die genetischen Ursachen der Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA) zeigen deutliche Überschneidungen mit der RP. Als LCA wird der Funktionsverlust von Zapfen und Stäbchen innerhalb der ersten Lebensjahre bzw. häufig schon zum Zeitpunkt der Geburt bezeichnet (Inzidenz von 2-3 : 100 000; betrifft 10-18% angeborener Blindheit). Eine ursächliche Mutation kann das RPE65-Protein betreffen, welches mit dem retinalen Pigmentepithelium (RPE) assoziiert ist (Redmond *et al.*, 1998). In einem RPE^{-/-}-Hund konnte mittels einer gezielten Gentherapie die Sehfunktion erhalten werden (Acland *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist bekannt, dass dieses Protein im Vitamin-A Metabolismus fungiert. In diesem Zusammenhang konnte an Patienten über die Verabreichung von Vitamin-A in einem Zeitraum von 4-6 Jahren eine vorteilhafte hemmende Wirkung auf den apoptotischen Prozess erzielt werden (Berson *et al.*, 1993).

Allgemein können diese entschlüsselten Gene zur Gentherapie genutzt werden. Als Modellsystem dienen beispielsweise rd-Mäuse (Bennett *et al.*, 2000). Auch genetisch modifizierte humane RPE-Zellen wurden zur therapeutischen Transplantation in dystrophischen Ratten (RCS) genutzt (Lund *et al.*, 2001). Der primäre Defekt liegt auch hier in den RPE-Zellen. Auch Transplantationsexperimente

in rd-Mäusen haben zu ersten Erfolgen geführt (Gouras und Tanabe, 2003): Man transplantierte neonatale Mikroaggregate. Die Photorezeptoren, die sich dabei entwickelten, überlebten ungefähr 8 Monate. Essentiell bedeutend bei diesen Transplantationsexperimenten ist die Integration der transplantierten Retina in die Wirtsretina. Dies setzt voraus, dass zwischen Implantat und Wirtsorgan synaptische Kontakte ausgebildet werden. Diese konnten Gouras und Tanabe jedoch kaum nachweisen.

Neben gentherapeutischen und Transplantations-Maßnahmen fanden pharmakologisch wirksame Stoffe immer größere Bedeutung. Dies erforderte genaue Kenntnisse über die ablaufenden Stoffwechselprozesse. Beispielsweise konnte die Bedeutung der RPE-Zellen im Vitamin-A-Stoffwechsel aufgedeckt werden. RPE65^{-/-} Mutanten zeigten keine Akkumulation von 11-cis-retinalen Estern, wogegen die trans-retinalen Ester überakkumuliert waren. Verantwortlich dafür zeichnete sich eine Blockierung des Isomerisierungs-Prozesses (Redmond *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnten Calcium-Kanal-Blocker, die an lichtsensitiven cGMP-Kanäle wirken, Photorezeptoren und damit das visuelle Augenlicht erhalten (Frasson *et al.*, 1999). Ein weiterer Calcium-Antagonist Nilvadipin erhöhte in RCS-Ratten die Produktion von neurotrophen Faktoren wie bFGF (basic fibroblast growth factor) und Arc (activity-regulated cytoskeleton associated protein). Diese Wachstumsfaktoren (growth-factors) scheinen einen schützenden Effekt auf die Degeneration von Photorezeptoren auszuüben (Sato *et al.*, 2003). Sie werden auch als Überlebensfaktoren (survival-factors) bezeichnet und übernehmen, indem sie den degenerativen Prozess im fortschreitenden Verlauf aufhalten, eine funktionelle Aufgabe. Darüber hinaus fördern sie die vom Pigmentepithelium ausgehende Retina-Regeneration und verbessern die Transplantationsbedingungen für neue Zellen, indem sie das *in vitro* Wachstum von Photorezeptor-Populationen verbessern (Reh *et al.*, 1996). Die Wachstumsfaktoren werden über subretinale Injektion eines Adeno-assoziierten Viren-Vektors übertragen (Cayouette und Gravel, 1997; Green *et al.*, 2001). Neben CNTF (ciliary neurotrophic factor; Liang *et al.*, 2001) ist wohl der bFGF der weit verbreitetste Faktor. Eine interessante Studie zeigte, dass dieser keiner uniformen Verteilung über die gesamte Retina, sondern einem Gradientengefälle unterliegt (Li *et al.*, 1997). bFGF war nicht in Zapfen, dafür aber in Stäbchen, Zapfen-Bipolarzellen, Amakrinzellen,

Müllergliazellen und Astrozyten zu finden. Im Bereich der Makula betrug der Anteil der bFGF-reaktiven Stäbchen nur etwa 0,5%, in der äußeren retinalen Peripherie dagegen 88%.

Diese Ergebnisse lieferten, sowohl für die altersbedingte Makula-Degeneration, als auch für die sekundäre Degeneration von Zapfen, die in allen bisher untersuchten Degenerationsmodellen gemacht wurden, eine plausible Erklärung. Sie tragen primär keinen Defekt, scheinen aber aufgrund des Fehlens von bFGF eine höhere Verletzlichkeit aufzuweisen, als beispielsweise andere Zelltypen, wie die Zapfen-Bipolarzellen und Amakrinzellen.

5.8.2 Welche therapeutischen Ansätze ergeben sich aus den Ergebnissen der CNGA3^{-/-}

Rho^{-/-} Mutante ?

Die zeitliche Verzögerung des Degenerationsprozesses um 2 Monate macht das verwendete Maussystem zu einem vorteilhaften Modell. Einerseits ist es wesentlich leichter auf das menschliche System übertragbar, bei dem die Degeneration häufig erst im zweiten Lebensabschnitt einsetzt. Andererseits kann eine genaue Beobachtung und Analyse der degenerativen Phase dazu beitragen, einen Therapieansatz zu entwickeln, der den Verlust des Augenlichtes durch Retinopathien verhindern könnte. Verschiedene Möglichkeiten werden hier aufgezeigt:

1. Die intakte Morphologie und das Vorhandensein aller erforderlichen Rezeptoren macht die Transplantation einer kompletten, neuen Retina nicht zwingend erforderlich. Die innere Retina könnte demnach erhalten bleiben. Die Problematik besteht dann allerdings darin, eine Integrierung und Akzeptanz zwischen Transplantat und Wirtsorgan herzustellen.
2. Die enorme strukturelle und synaptische Plastizität kann man sich für die Anbindung an ein Transplantat zunutze machen. Dies erfordert allerdings für das humane System, dass man den Zeitraum dieses „plastischen Zeitfensters“ berücksichtigen muss, um eine Kontaktierung an das Präparat zu ermöglichen. In der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus setzt die Plastizität zu Beginn der degenerierenden Phase ein. Diese ist zu diesem Zeitpunkt verlangsamt. Es ist wahrscheinlich, dass sich der Verlauf im humanen System ähnlich darstellt und demnach eine Frühdiagnose erforderlich macht.

3. Die Injektion von Wachstumsfaktoren scheint gerade für Zelltypen, die diese nicht exprimieren und somit bevorzugt dem apoptotischen Prozess unterliegen, effektiv zu sein. Beispielsweise wurde bisher in allen retinalen Degenerations-Modellen ein verzögerter, den Stäbchen nachgeschalteter, Zapfen-Verlust beschrieben, obwohl sie primär intakt waren. Die Zapfen scheinen aufgrund der fehlenden Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Expression benachteiligt zu sein. Eine subretinale Injektion könnte das Sehen bei Tageslicht und das Erkennen und Differenzieren von Farben erhalten. Eine Voraussetzung dafür ist allerdings, die derzeit noch während der Behandlung auftretenden starken Nebenwirkungen zu reduzieren.

4. Bei Kenntnis der spezifischen Gene, die die Degeneration der Retina bewirken, ist eine gezielte Gentherapie in Betracht zu ziehen.

6. Zusammenfassung

Netzhauterkrankungen, wie *retinitis pigmentosa*, sind in der Bevölkerung weit verbreitet (1,5 Millionen weltweit). Gewöhnlich berichten die Betroffenen über Nachtblindheit und periphere Gesichtsfeldausfälle. Häufig führt diese Erkrankung, die durch eine fortschreitende Degeneration von Photorezeptoren verursacht wird, zur vollständigen Erblindung. Bisher beschrieb man den pathologischen Prozess vor allem an rd-Mäusen. Allerdings setzt bei diesen die Degeneration sehr früh ein. Somit ist die Übertragbarkeit auf den Menschen erschwert, da abgesehen von wenigen Ausnahmen, der Verlust von Photorezeptoren hier erst im zweiten Lebensabschnitt beginnt. Deshalb war es interessant, im Rahmen dieser Arbeit anhand der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus ein Modell zu untersuchen, das ähnlich dem menschlichen System, zunächst eine intakte Morphologie zeigt. Dadurch war es möglich eine genaue zeitliche Abfolge der Degeneration zu dokumentieren. Dies kann medizinisch zur Entwicklung eines Therapieansatzes genutzt werden, der bereits zu Beginn der Degeneration greift, und damit den fortlaufenden Prozess zum Stillstand bringen kann.

Die CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus repräsentiert ein System funktionsloser Photorezeptoren, bei dem der zyklische Nukleotid-Kanal (CNGA3) der Zapfenaußensegmente und das Rhodopsin (Rho) der Stäbchenaußensegmente ausgeschaltet wurde. Bestätigt wurde dies durch ein Elektretinogramm mit einer negativen Photoantwort bezüglich Zapfen und Stäbchen. Die Degeneration beginnt in der vierten postnatalen Woche (Pw4) und führt zu einem vollständigen Verlust aller Photorezeptoren nach drei Monaten (Pm3). Zum Zeitpunkt Pw4 konnte, vergleichbar dem Wildtyp eine intakte äußere Retina nachgewiesen werden, bei der lediglich die äußeren Stäbchensegmente fehlten. Die synaptischen Kontakte zwischen den Terminalien der Photorezeptoren, der Horizontalzellen und Bipolarzellendriten waren normal entwickelt und Stäbchenendigungen als auch Zapfenendfüßchen bildeten funktionelle Triaden aus. Bei den Stäbchenendigungen konnte mit zunehmender Degeneration (Pw5, Pw6) eine Akkumulation synaptischer Bänder und postsynaptischer Elemente beobachtet werden. Im Zeitraum Pw4-Pw7 zeigten sowohl die Zapfen, als auch die Horizontalzellen und Stäbchen-Bipolarzellen, eine bemerkenswerte strukturelle Plastizität. Obwohl durch die Photorezeptoren kein Lichtsignal vermittelt wurde, konnten präsynaptische Marker (bassoon) und

postsynaptische Glutamatrezeptoren (GluR1, mGluR6) an den Photorezeptorterminalien nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine Transmitterfreisetzung theoretisch möglich wäre. Darüber hinaus konnte im Zeitraum von 12 Monaten keine nennenswerte Auswirkung auf die IPL beobachtet werden: Amakrin- und Zapfen-Bipolarzellen waren normal stratifiziert und die Expression der Transmitter-Rezeptoren zeigte ein charakteristisches Verteilungsmuster. Außerdem war die Ultrastruktur von konventionellen- und Bandsynapsen der des Wildtyps vergleichbar. Darüber hinaus bildeten sowohl Amakrinzellen, als auch Bipolar- und Ganglienzellen, Fortsätze in die INL hinein. Welche molekularen Mechanismen das „Sprouting“ auslösten, ist derzeit unbekannt. Sicher ist jedoch, dass man sich die Plastizität der Zellen, wie die der Zapfen, Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen, bei der Anbindung an ein Retina-Implantat zunutze machen kann (Lewis *et al.*, 1998). Allgemein zeigt die immunohistochemisch und ultrastrukturell untersuchte CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus, dass weder funktionell aktive Photorezeptoren noch Licht eine stimulierende Wirkung auf die Ausbildung synaptischer Strukturen und die Expression verschiedener Rezeptoren haben.

Summary

Retinopathies such as *retinitis pigmentosa* affect about 1,5 million people worldwide. Patients usually suffer from night blindness and loss of mid-peripheral visual field caused by a continual degeneration of photoreceptors often leading to a complete loss of sight. Up to now the pathology process of this disease has been described in retinal degeneration (rd) mice. However this degeneration starts at an early time point. It makes a comparison to the human system difficult, because with a few exceptions, photoreceptor degeneration starts in the second half of human life span. For this reason, the $CNGA3^{-/-}$ $Rho^{-/-}$ mouse system was chosen for this study. It shows an intact photoreceptor morphology in the first life span, comparable to humans. Thus it was possible to document the exact time course of the photoreceptor degeneration. This result can be useful for development of a medical therapy which can be applied at an early stage of degeneration and thus may stop the ongoing process in time. The $CNGA3^{-/-}$ $Rho^{-/-}$ represents a mouse system without functional photoreceptors (cyclic nucleotide-gated channel in cones [CNGA3] and the rhodopsin [Rho] in rods are knocked out). The lack of these functions was proven by electroretinography. Photoreceptor degeneration starts at postnatal week 4 (Pw4) progressing to an almost complete loss after 3 months (Pm3). In the early postnatal development at Pw4 the outer retina of the $CNGA3^{-/-}$ $Rho^{-/-}$ mouse shows an intact multi-layer ONL comparable to the wildtype, with the outer rod segments missing. In the $CNGA3^{-/-}$ $Rho^{-/-}$ retina the development of the synaptic contacts between photoreceptor terminals, horizontal cell processes, and bipolar cell dendrites appears normal until Pw4. Electron microscopy demonstrates rod spherules with one triad synapse and cone pedicles with multiple triad synapses comparable to the wildtype retina. At the age of Pw5 and Pw6 some of the surviving rod spherules show an increased number of synaptic ribbons and postsynaptic elements. In addition, second-order neurons such as cones, horizontal cells and rod bipolar cells demonstrate dramatic morphological modifications by sprouting at the age of Pw4-Pw7. Although there is no light input by photoreceptors, presynaptic markers and postsynaptic glutamate receptors are well expressed in the outer plexiform layer (OPL), suggesting that neurotransmission might take place. Moreover, the inner plexiform layer (IPL) seems not significantly affected at the age of twelve months (Pm12): Both cone bipolar cells and amacrine cells are stratified

normal and transmitter receptors show normal distribution; only rod bipolar cell axon terminals show alterations. The ultrastructure of conventional and ribbon synapses is comparable to the wildtype. In addition, amacrine, bipolar and ganglion cells sprout into the inner nuclear layer (INL). Nothing is known about the mediating molecular mechanisms forming these networks yet. However, this plasticity constitutes a useful result with respect to connecting to a photoreceptor implant (Lewis *et al.*, 1998). In general, the immunocytochemical and ultrastructural analysis of the CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} mouse indicates that neither functional photoreceptors nor light input have a stimulating effect on the expression of receptors and synaptic contacts.

7. Abkürzungen

AC	<i>amacrine cell</i> ; Amakrinzelle
BS	<i>ribbon synapse</i> ; Bandsynapse
CB	<i>cone bipolar cell</i> ; Zapfen-Bipolarzelle
cd	<i>Candela</i> ; Lichtstärke
CGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i> ; zyklisches Guanosin-Monophosphat
CNGA3	<i>cyclic nucleotide-gated channel A3</i> ; zyklischer Nukleotid-gesteuerter Kanal A3
cp	<i>cone pedicle</i> ; Zapfenendfüßchen
ERG	<i>electroretinogram</i> ; Elektretinogramm
GC	<i>ganglion cell</i> ; Ganglienzelle
GCL	<i>ganglion cell layer</i> ; Ganglienzellschicht
HC	<i>horizontal cell</i> ; Horizontalzelle
ICS	<i>inner cone segments</i> ; innere Zapfensegmente
INL	<i>inner nuclear layer</i> ; innere nukleäre Schicht
IPL	<i>inner plexiform layer</i> ; innere plexiforme Schicht
IS	<i>inner segments</i> ; innere Segmente
Ks	<i>conventional synapse</i> ; konventionelle Synapse
MAP	<i>microtubuli associated protein</i> ; Mikrotubuli assoziiertes Protein
OCS	<i>outer cone segments</i> ; äußere Zapfensegmente
ONL	<i>outer nuclear layer</i> ; äußere nukleäre Schicht
OPL	<i>outer plexiform layer</i> ; äußere plexiforme Schicht
ORS	<i>outer rod segments</i> ; äußere Stäbchensegmente
OS	<i>outer segments</i> ; äußere Segmente
P	<i>postnatal day</i> ; postnataler Tag
Pm	<i>postnatal month</i> ; postnataler Monat
Pw	<i>postnatal week</i> ; postnatale Woche
rd	<i>retinal degeneration</i> ; retinale Degeneration
Rho	<i>rhodopsin</i> ; Rhodopsin (Sehpigment)
rs	<i>rod spherule</i> ; Stäbchenendigung
wt	<i>wildtype</i> ; Wildtyp

8. Literatur

Acland, GM., Aguirre, GD., Ray, J., Zhang, O., Aleman, TS., Cideciyan, AV., Pearce-Kelling, SE., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, AM., Jacobson, SG., Hauswirth, WW., Bennett, J. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.* 28(1), 92-95.

Applebury, ML., Antoch, MP., Baxter, LC., Chun, LLY., Falk, JD., Farhangfar, F., Kage, K., Krzystolik, MG., Lyass, LA., Robbins, JT. (2000). The Murine Cone Photoreceptor: A Single Cone Type Expresses Both S and M Opsins with Retinal Spatial Patterning. *Neuron* 27, 513-523.

Benke, D., Cicin-Sain, A., Mertens, S. Möhler, H. (1991). Immunochemical identification of the alpha1- and alpha3- subunits of the GABAA-receptor in rat brain. *J. Recept. Res.* 11(1-4), 407-424.

Bennett et al., (2000). Gene therapy for retinitis pigmentosa. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2(4), 420-425.

Berson, EL. (1993). Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *IOVS* 34, 1659-1676.

Berson, EL., Rosner, B., Sandberg, MA., Hayes, KC., Nicholson, BW., Weigel-DiFranco, C. Willett, W. (1993). A randomized trial vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 111 (6), 761-772.

Berson, DM. (2003). Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci.* 26(6), 314-320.

Betz, H., Langosch, D., Hoch, W., Prior, P., Pribilla, I., Kuhse, J., Schmieden, V., Malosio, ML., Matzenbach, B., Holzinger, F. (1991). Structure and expression of inhibitory glycine receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 287, 421-429.

Biel, M., Seeliger, M., Pfeifer, A., Kohler, K., Gerstner, A., Ludwig, A., Jaissle, G., Fauser, S., Zrenner, E., Hofmann, F. (1999). Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 7553-7557.

Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A., Hofmann, F. (1996). Molecular Cloning and Expression of a Modulatory Subunit of the Cyclic Nucleotide Cation Channel. *J. Biol. Chem.* 271(11), 6349-6355.

Blanks, JC., Adinolfi, AM., Lolley, RN. (1974). Synaptogenesis in the Photoreceptor Terminal of the Mouse Retina. *J.Comp.Neurol.* 156, 81-94.

Blanks, JC., Adinolfi, AM., Lolley, RN. (1974). Photoreceptor Degeneration and Synaptogenesis in Retinal-degenerative (rd) Mice. *J.Comp.Neurol.* 156, 95-106.

Bloomfield, SA., Miller, RF. (1982). A physiological and morphological study of the horizontal cell types of the rabbit retina. *J.Comp.Neurol.* 208(3), 288-303.

Bowes, C., Li, T., Danciger, M., Baxter, LC., Applebury, ML., Farber DB. (1990). Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the β subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347, 677-680.

Bowes, C., Li, T., Frankel, WN., Danciger, M., Coffin, JM., Applebury, ML., Farber, DB. (1993). Localisation of a retroviral element within the rd gene coding the beta subunit of cGMP phosphodiesterase. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 90(7), 2955-2959.

Boycott, BB., Wässle, H. (1991). Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur J. Neurosci.* 3(11), 1069-1088.

Boycott, BB., Wässle, H. (1999). Parallel Processing in the Mammalian retina. The Proctor Lecture. *IOVS* 40(7), 1313-1327.

Brandstätter, JH., Koulen, P., Wässle, H. (1998). Diversity of Glutamate receptors in the mammalian retina. *Vis.Res.* 38(10), 1385-1397.

Brandstätter, JH., Wässle, H. (1999). Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.* 11(10), 3683-3693.

Brandstätter, JH., Hack, I. (2001). Localisation of glutamate receptors at a complex synapse – The mammalian photoreceptor synapse. *Cell Tissue Res.* 303(1), 1-14

Brandstätter, JH. (2002). Glutamate receptors in the retina: the molecular substrate for visual signal processing. *Cur.Eye Res.* 25(6), 327-331.

Bönigk, W., Altenhofen, W., Muller, F., Dose, A., Illing, M., Molday, RS., Kaupp, UB. (1993). Rod

and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron* 10(5), 865-877.

Carter-Dawson, LD., La Vail, MM., Sidman, RL. (1978). Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *IOVS* 17, 489-498.

Carter-Dawson, LD., La Vail, MM. (1997). Rods and Cones in the Mouse Retina.

Structural Analysis using Light and Electron Microscopy. *J. Comp. Neurol.* 188, 245-262.

Cayouette, M., Gravel, C. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum. Gene Ther.* 8(4), 423-430.

Chong, NH., Alexander, RA., Barnett, KC., Bird, AC., Luthert, PJ. (1999). An immunohistochemical study of an autosomal dominant feline rod/cone dysplasia (Rdy cats). *Exp. Eye Res.* 68, 51-57.

Cueva, J.G., Haverkamp, S., Reimer, R., Edwards, R., Wässle, H., Brecha, N.C. (2002). Vesicular γ -Aminobutyric Acid Transporter Expression in Amacrine and Horizontal Cells. *J. Comp. Neurol.* 445, 227-237.

Dacheux, RF., Raviola, E. (1982). Horizontal cells in the retina of the rabbit. *J. Neurosci.* 2(10), 1486-1493.

De Raad, S., Szczesny, PJ., Munz, K., Reme, CE. (1996). Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Muller cells in correlation with photoreceptor damage. *Ophthalm. Res.* 28(2), 99-107.

Dick, O., tom Dieck, S., Altmann, WD., Ammermüller, J., Weiler, R., Garner, CC., Gundelfinger, ED.

Brandstätter, JH. (2003). The Presynaptic Active Zone Protein Bassoon Is Essential for Photoreceptor Ribbon Synapse Formation in the Retina. *Neuron* 37, 775-786.

Ding, YQ., Shigemoto, R., Takada, M., Ohishi, H., Nakanishi, S., Mizuno, N. (1996). Localisation of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. *J. Comp Neurol.* 364(2), 290-310.

Dowling, John E. (1987). The Retina, An Approachable Part Of The Brain. Cambridge, MA: The Belknap Press of Harvard University Press.

- Dowling, JE., Boycott, BB. (1966). Organisation of the primate retina: electron microscopy. *Proc.R.Soc.Lond. (Biol.)* 166, 80-111.
- Dräger, UC. (1983). Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina. *Nature* 303, 169-172.
- Eisenfeld, AJ., Bunt-Milam, AH., Sarthy, PV. (1984). Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *IOVS*, 25(11), 1321-1328.
- Enz, R., Brandstätter, JH., Wässle, H., Bormann, J. (1996). Immunocytochemical Localization of the GABA_C Receptor ρ Subunits in the Mammalian Retina. *J. Neurosci* 16(14), 4479-4490.
- Erickson, PA., Fisher, SK., Anderson, DH., Stern, WH., Borgula, GA. (1983). Retinal detachment in the cat: the outer nuclear and outer plexiform layers. *IOVS*, 24, 927-942.
- Euler, T., Wässle, H. (1995). Immunocytochemical Identification of Cone Bipolar Cells in the Rat Retina. *J. Comp. Neurol.* 361, 461-478.
- Famiglietti, EV., Kolb, H. (1975). A bistratified amacrine cell and synaptic circuitry in the inner plexiform layer of the retina. *Brain Res.* 84, 293-300.
- Famiglietti, EV. (1981). Functional architecture of cone bipolar cells in mammalian retina. *Vis.Res.* 21, 1559-1563.
- Farber, DB., Lolley, RN. (1974). Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science* 186, 449-451.
- Farber, DB., Danciger, M. (1997). Identification of genes causing photoreceptor degenerations leading to blindness. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 666-673.
- Fariss, RN., Li, ZY., Milam, AH. (2000). Abnormalities in Rod Photoreceptors, Amacrine Cells, and Horizontal Cells in Human Retinas with Retinitis Pigmentosa. *Elsevier Sci.* 129, 215-223.
- Fei, Y. (2002). Cone neurite sprouting: An early onset abnormality of the cone photoreceptors in the retinal degeneration mouse. *Mol. Vis.* 8, 306-314.

Filoteo, AG., Elwess, NL., Enyedi, A., Caride, A., Aung, HH., Penniston, JT. (1997). Plasma membrane

Ca²⁺ pump in rat brain. Patterns of alternative splices seen by isoform-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 272(38), 23741-23747.

Fisher, LJ. (1979). Development of retinal synaptic arrays in the inner plexiform layer of dark-reared mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 54, 219-227.

Fisher, SK., Boycott, BB. (1974). Synaptic connections made by horizontal cells within the outer plexiform layer of the retina of the cat and the rabbit. *Proc. R.Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 186(1085), 317-331.

Fletcher, EL., Koulen, P., Wässle, H. (1998). GABA_A und GABA_C receptors on mammalian rod bipolar cells. *J. Comp. Neurol.* 396, 351-365.

Frasson, M., Sahel, JA., Fabre, M., Simonutti, M., Dreyfus, H., Picaud, S. (1999). Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nature Med.* 5(10), 1183-1187.

García-Fernández, JM., Jimenez, AJ., Foster, RG. (1995). The persistence of cone photoreceptors within the dorsal retina of aged retinally degenerate mice (rd/rd): implications for circadian organization. *Elsevier Sci. Ireland, Neurosci. Letters* 187, 33-36.

Gerstner, A., Zong, X., Hofmann, Biel, M. (2000). Molecular Cloning and Functional Characterization of a New Modulatory Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit from Mouse Retina. *J. Neurosci.* 20(4), 1324-1332.

Ghosh, KK., Haverkamp, S., Wässle, H. (2001). Glutamate Receptors in the Rod Pathway of the Mammalian Retina. *J. Neurosci.* 21(21), 8636-8647.

Ghosh, K., Bujan, S., Haverkamp, S., Feigenspan, A., Wässle, H. (2004). Morphological Types of Bipolar Cells in the Mouse Retina. *J. Comp. Neurol. in press*

Gilbert, Scott F. (1997). *Developmental Biology*, Fifth edition.

Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, JG., Young, SR., Favor, J., Maas, RL. (1994). PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system

defects. *Nat. Genet.* 7(4), 463-471.

Gouras, P., Tanabe, T. (2003). Survival and integration of neural retinal transplants in rd mice.

Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 241(5), 403-409.

Green, ES., Rendahl, KG., Zhou, S., Ladner, M., Coyne, M., Srivastava, R., Manning, WC., Flannery, JG. (2001). Two animal models of retinal degeneration are rescued by recombinant adeno-associated virus-mediated production of FGF-5 and FGF-18. *Mol. Ther.* 3(4), 507-515.

Greferath, U., Grünert, U., Fritschy, JM., Stephenson, A., Mohler, H., Wässle, H. (1995). GABA_A receptor subunits have differential distributions in the rat retina: in situ hybridization and immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 353(4), 553-571.

Greferath, U., Grünert, U., Müller, F., Wässle, H. (1994). Localisation of GABA_A receptors in the rabbit retina. *Cell Tissue Res.* 276(2), 295-307.

Hack, I., Peichl, L., Brandstätter, JH. (1999). An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: Rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(24), 14130-14135.

Hack, I., Peichl, L. (1999). Horizontal cells of the rabbit retina are non-selectively connected to the cones. *Europ. J. Neurosci.* 11(7) 2261

Hack, I., Frech, M., Dick, O., Peichl, L., Brandstätter, JH. (2001). Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina. *Europ. J. Neurosci.* 13, 1- 15.

Haeseleer, F., Sokal, I., Verlinde, CL., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Pronin, AN, Benovic, JL, Fariss, RN, Palczewski, K. (2000). Five members of a novel Ca(2+)-binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin. *J. Biol. Chem.* 275(2), 1247-1260.

Halder, G., Callaerts, P., Gehring, WJ. (1995). New perspectives on eye evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5(5), 602-609.

Haverkamp, S., Grünert, U., Wässle, H. (2001). Localization of Kainate Receptors at the Cone Pedicles of the Primate Retina. *J. Comp. Neurol.* 436, 471-486.

- Haverkamp, S., Grünert, U., Wässle, H. (2000). The Cone Pedicle, a Complex synapse in the Retina. *Neuron* 27, 85-95.
- Haverkamp, S., Grünert, U., Wässle, H. (2001). The Synaptic Architecture of AMPA Receptors at the Cone Pedicle of the Primate Retina. *J. Neurosci.* 21(7), 2488-2500.
- Haverkamp, S., Müller, U., Harvey, K., Harvey, R.J., Betz, H., Wässle, H. (2003). Diversity of Glycine receptors in the Mouse Retina: Localization of the $\alpha 3$ Subunit. *J. Comp. Neurol.* 465(4), 524-539.
- Haverkamp, S., Ghosh, K.K., Hirano, A.A., Wässle, H. (2003). Immunocytochemical Description of Five Bipolar Cell Types of the Mouse Retina. *J. Comp. Neurol.* 455, 463-476.
- Henry, D., Burke, St., Shishido, E., Matthews, G. (2003). Retinal Bipolar Neurons Express the Cyclic Nucleotide Gated Channel of Cone Photoreceptors. *J. Neurophysiol.* 89, 754-761.
- Hirano, A.A., Hack, I., Wässle, H., Duvoisin, R. (2000). Cloning and Immunocytochemical Localisation of a Cyclic Nucleotide-Gated Channel α -Subunit to All Cone Photoreceptors in the Mouse Retina. *J. Comp. Neurol.* 421, 80-94.
- Howell, B.W., Gertler, F.B., Cooper, J.A. (1997). Mouse disabled (mDab1): a Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J.* 16(1), 121-132.
- Hsu, A., Tsukamoto, Y., Smith, R.G., Sterling, P. (1998). Functional architecture of primate cone and rod axons. *Vis.Res.* 38(17), 2539-2549.
- Hubel, David H. (1989). Auge und Gehirn, Neurobiologie des Sehens. *Cajal Handskizze Einleitung.*
- Humphries, M.M., Rancourt, D., Farrar, G.J., Kenna, P., Hazel, M., Bush, R.A., Sieving, P.A., Sheils, D.M., McNally, N., Creighton, P., Erven, A., Boros, A., Gilya, K., Capecchi, M.R., Humphries, P. (1997). Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat.Genet.* 15(2), 216-219.
- Jaissle, G.B., May, C.A., Reinhard, J., Kohler, K., Fauser, S., Lütjen-Drecoll, E., Zrenner, E., Seeliger, M.W. (2001). Evaluation of the Rhodopsin Knockout Mouse as a Model of Pure Cone Function. *IOVS* 42, 506-513.
- Jansen, H.G., Sanyal, S. (1984). Development and degeneration of retina in rds mutant mice: electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 224, 71-84.

- Jansen, H.G., Sanyal S. (1987). Synaptic changes in the terminals of rod photoreceptors of albino mice after partial visual cell loss induced by brief exposure to constant light. *Cell Tissue Res.* 250, 43-52.
- Jiménez, A., García Fernández, JM., González, B., Foster, RG. (1996). The spatio-temporal pattern of photoreceptor degeneration in the aged rd/rd mouse retina. *Cell Tissue Res.* 284, 193-202.
- Jones, BW., Watt, C.B., Frederick, J.M., Baehr, W., Chen, Ch.K., Levine, E.M., Milam, A.H., LaVail, M., Marc, R.E. (2003). Retinal remodeling triggered by photoreceptor degeneration. *J. Comp. Neurol.* 464, 1-16.
- Jordan, T. et al., (1992). The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat. Genet.* 1, 328-332.
- Kaupp, UB., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bonigk, W., Stuhmer, W., Cook, NJ., Kangawa, K., Matsuo, T. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* 14; 342(6251), 762-766.
- Kohl, S., Marx, T., Giddings, I., Jagle, H., Jacobson, SG., Apfelstedt, SE., Zrenner, E., Sharpe, LT, Wissinger, B. (1998). Total colour blindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat. Genet.* 19, 257-259.
- Kolb, H., Famiglietti, EV. (1974). Rod and cone bipolar pathways in the inner plexiform layer of the cat retina. *Science* 186, 47-49.
- Kolb, H., Famiglietti, EV. (1981). Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina. *Vis.Res.* 21, 1081-1114.
- Kolb, H., Normann, RA. (1982). A-type horizontal cells of the superior edge of the linear visual streak of the rabbit retina have oriented, elongated dendritic trees. *Vis.Res.* 22(8), 905-916.
- Koulen, P. Sassoé-Pognetto, M., Grünert, U., Wässle, H. (1996). Selective clustering of GABA_A and glycine receptors in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 16, 2127-2140.
- Krizaj, D., Demarco, S.J., Johnson, J., Strehler, E.E., Copenhagen, D.R. (2002). Cell-specific

- expression of plasma membrane calcium ATPase isoforms in retinal neurons. *J. Comp. Neurol.* 451, 1-21.
- La Vail, MM., Steinberg, RH. (1997). Variability in rate of cone degeneration in the retinal degeneration (rd/rd) mouse. *Exp. Eye Res.* 65, 45-50.
- Lewis, GP., Linberg, KA., Fisher, S. (1998). Neurite Outgrowth from Bipolar and Horizontal Cells after Experimental Retinal Detachment. *IOVS* 39(2), 424-434.
- Li, ZY., Kljavin, IJ., Milam, AH. (1995). Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. *J. Neurosci* 15(8), 5429-5438.
- Li, ZY., Chang, JH., Milam, AH. (1997). A gradient of basic fibroblast growth factor in rod photoreceptors in the normal human retina. *Vis. Neurosci.* 14(4), 671-679.
- Liang, FO., Dejneka, NS., Cohen, DR., Krasnoperova, NV., Lem, J., Maguire, AM., Dudus, L., Fisher, KJ., Bennett, J. (2001). AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol. Ther.* 3(2), 241-248.
- Lolley, RN., Farber, DB. (1976). Abnormal Guanosine 3', 5'-Monophosphate During Photoreceptor Degeneration in the Inherited Retinal Disorder of C3H/HEJ Mice. *Ann. Ophthalmol.* 8, 469-473.
- Lund, RD., Adamson, P., Sauv e, Y., Keegan, DJ., Girman, SV., Wang, S., Winton, H., Kanuga, N., Kwan, ASL., Beauch ene, L., Zerbib, A., Hetherington, L., Couraud, PO., Coffey, P., Greenwood, J. (2001). Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. *PNAS* 17, 9942-9947.
- Mac Neil, MA., Heussy, JK., Dacheux, RF., Raviola, E., Masland, RH. (1999). The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species. *J. Comp. Neurol.* 413(2), 305-326.
- Mammen, AL., Haganir, RL., O'Brien, RJ. (1997). Redistribution and stabilization of cell surface glutamate receptors during synapse formation. *J. Neurosci.* 17, 7351-7358.
- Mandell, JW., MacLeish, PR., Townes-Anderson, E. (1993). Process outgrowth and synaptic varicosity formation by adult photoreceptors *in vitro*. *J. Neurosci.* 13, 3533-3548.

- Mandell, J., Banker, G.A. (1995). The Microtubule Cytoskeleton and the Development of Neuronal Polarity. *Neurobiol. Aging* 16(3), 229-238.
- Mann, I. (1964). The development of the Human Eye. *Grune and Stratton, New York.*
- Marc, RE.; Jones, BW., Watt, CB. Strettoi, E. (2003). Neural remodeling in retinal degenerations. *Prog. Retin Eye Res.* 22(5), 607-655.
- Marksitzer, R., Benke, D., Fritschy, JM., Trzeciak, A., Bannwarth, W., Möhler, H. (1993). GABAA-receptors: drug binding profile and distribution of receptors containing the alpha2-subunit in situ. *J. Recept. Res.* 13(1-4), 467-477.
- Massof, RW., Finkelstein, D. (1981). Two forms of autosomal dominant primary retinitis pigmentosa. *Doc. Ophthalmol.* 51, 289-346.
- Masu, M., Iwakabe, H. Tagawa, Y, miyoshi, T, Yamashita, M., Fukuda, Y, Sasaki, H., Hiroi, K.; Nakamura, Y.; Shigemoto, R., Takada, M.; Nakamura, K.; Nakao, K.; Katsuki, M.; Nakanishi. S. (1995). Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80, 757-765.
- Matus, A., Bernhardt, R., Hugh, J.T. (1981). High molecular weight microtubule-associated proteins are preferentially associated with dendritic microtubules in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3010-3014.
- Mills, SL., Massey, SC. (1994). Distribution and coverage of A- and B-type horizontal cells stained with Neurobiotin in the rabbit retina. *Vis. Neurosci.* 11(3), 549-560.
- Missotten, L. (1962). L'ultrastructure des cones de la rétine humaine. *Bull. Soc. Belge ophthm.* 130, 472-502.
- Möhler, H., Benke, D., Mertens, S., Fritschy, JM. (1992). GABAA-receptor subtypes differing in alpha-subunit composition display unique pharmacological properties. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 47, 41-53.
- Molday, R.S. (1998). Photoreceptor Membrane Proteins, Phototransduction, and Retinal Degenerative Diseases. *IOVS* 39(13), 2491-2513.
- Morgans, C.W. (2001). Localization of the α_{1F} Calcium Channel Subunit in the Rat Retina.

IOVS 42(10), 2414-2418.

Müller, F., Kaupp, B. (1998). Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften, Springer Verlag* 85, 49-61.

Muresan, V., Lyass, A., Schnapp, B.J. (1999). The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate photoreceptors. *J. Neurosci.* 19(3), 1027-1037.

Nachman-Clewner, M., Townes-Anderson, E. (1999). L-type calcium channels in the photoreceptor ribbon synapse: localization and role in plasticity. *J.Comp. Neurol.* 415, 1-16.

Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akazawa, C., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* 268, 11868-11873.

Newsome, D.A. (1988). Retinitis pigmentosa, Usher's syndrome, and other pigmentary retinopathies. In: Newsome DA (ed) *Retinal dystrophies and degenerations. Raven, New York*, pp 161-194.

Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., Mizuno, N., Nakanishi, S. (1994). Developmentally regulated postsynaptic localisation of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77, 361-369.

O'Brien, R.J., Mammen, A.L., Blackshaw, S., Ehlers, M.D., Rothstein, J.D., Huganir, R.L. (1997). The development of excitatory synapses in cultured spinal neurons. *J. Neurosci.* 17, 7339-7350.

Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay, S.A., Van Gelder, R.N., Hogenesch, J.B. (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301(5632), 525-527.

Peichl, L., González-Soriano, J. (1994). Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: A comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis. Neurosci.* 11, 501-517.

Peng, Y.W., Hao, Y., Petters, R.M., Wong, F. (2000). Ectopic synaptogenesis in the mammalian retina caused by rod photoreceptor-specific mutations. *Nat. Neurosci.* 3 (11), 1121-1127.

Pittler, S.J., Baehr, W. (1991). Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase β -subunit gene of the rd mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8322-8326.

- Pourcho, RG., Goebel, DJ. (1987). Visualization of endogenous glycine in cat retina: An immunocytochemical study with Fab fragments. *J. Neurosci.* 7, 1189-1197.
- Pow, DV., Hendrickson, AE. (2000). Expression of glycine and the glycine transporter glyt-1 in the developing rat retina. *Vis. Neurosci.* 17(1), 1-9.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., Gehring, WJ. (1994). Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265(5173), 785-789.
- Raviola, E., Dacheux, RF. (1987). Excitatory dyad synapse in rabbit retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(29), 7324-7328.
- Redmond, TM., Yu, Sh., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, JX., Crouch, RK, Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat. Genet.* 20(4), 344-351.
- Reh, TA., Mc Cabe, K., Kelley, MW. Und bermingham-McDonogh, O. (1996). Growth factors in the treatment of degenerative retinal disorders. *Ciba Found Symp.* 196, 120-131.
- Rice, DS., Curran, T. (2000). Disabled-1 is expressed in type AII amacrine cells in the mouse retina. *J. Com. Neurol.* 424(2), 327-338.
- Rieke, F., Schwartz, EA. (1994). A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses. *Neuron* 13, 863-873.
- Sassoè-Pognetto, M., Wässle, H., Grünert, U. (1994). Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the alpha1 subunit of the glycine receptor. *J. Neurosci.*, 14(8), 5131-5146.
- Sato, M., Ohguro, H., Ohguro, I., Mamiya, K., Takano, Y., Yamazaki, H., Metoki, T., Miyagawa, Y., Ishikawa, F., Nakazawa, M. (2003). Study of pharmacological effects of nilvadipine on RCS rat retinal degeneration by microarray analysis. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 306, 826-831.
- Schröder, S., Hoch, W., Becker, CM., Grenningloh, G., Betz, H. (1991). Mapping of antigenic epitopes on the alpha1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *Biochem.* 30(1), 42-47.
- Sjöstrand, S.F. (1953). The ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye. *J. Applied*

Physics 24, 1422.

Stone, EM., Kimura, AE, Nichols, BE., Khadivi, P., Fishmann, GA., Sheffield, VC. (1991).

Regional distribution of retinal degeneration in patients with the proline to histidine mutation in codon 23 of the rhodopsin gene. *Ophthalmol.* 98, 1806-1813.

Strettoi, E., Raviola, E., Dacheux, RF (1992). Synaptic connections of the narrow-field, bistratified rod amacrine cell (AII) in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 325(2), 152-168.

Strettoi, E., Dacheux, RF., Raviola, E. (1994). Cone bipolar cells as interneurons in the rod pathway of the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 347(1), 139-49.

Strettoi, E., Masland, H. (1996). The number of unidentified amacrine cells in the mammalian retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 14906-14911.

Strettoi, E., Pignatelli, V. (2000). Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 97(20), 11020-11025.

Strettoi, E., Porciatti, V., Falsini, B., Pignatelli, V., Rossi, C. (2002). Morphological and Functional Abnormalities in the Inner retina of the rd/rd Mouse. *J. Neurosci.* 22(13), 5492-5504.

Sun, W., Li, N., He, Sh. (2002). Large-Scale Morphological Survey of Mouse Retinal Ganglion Cells. *J. Comp. Neurol.* 451, 115-126.

Szél, Á., Röhlich, P., Mieziowska, K., Aguirre, G., van Veen, T. (1993). Spatial and Temporal Differences Between the Expression of Short- and Middle-Wave Sensitive Cone Pigments in the Mouse retina. A Developmental Study. *J. Comp. Neurol.* 331, 564-577.

Szél, Á., Röhlich, P., Caffé, R., van Veen, T. (1994). Distribution of cone photoreceptors in the mammalian retina. *Microscopy Res. Technique* 35(6), 445-462.

Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C., Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, 407 (6801), 189-194.

Vardi, N., Duvoisin, R., Wu, G., Sterling, P. (2000). Localisation of mGluR6 to Dendrites of On Bipolar Cells in Primate Retina. *J. Comp. Neurol.* 423, 402-412.

Vardi, N., Morigiwa, K. (1997). ON cone bipolar cells in rat express the metabotropic receptor mGluR6. *Vis. Neurosci.* 14, 789-794.

Völgyi, B., Bloomfield, St.A. (2002). Axonal Neurofilament-H Immunolabeling in the Rabbit Retina. *J. Comp. Neurol.* 453, 269-279.

Wang, S.W., Gan, L., Martin, S.E., Klein, W.H. (2000). Abnormal Polarization and Axonal Outgrowth in Retinal Ganglion Cells Lacking the Pou-Domain Transcription Factor Brn-3b. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 141-156.

Wang, Y., Macke, J.P., Merbs, S.L., Zack, D.J., Klaumberg, B., Bennett, J., Gearhart, J., Nathans, J. (1992). A locus control region adjacent to the human red and green visual pigment genes. *Neuron* 9(3), 429-440.

Wässle, H., Boycott, B.B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* 71(2), 447-480.

Wässle, H., Koulen, P., Brandstätter, J.H., Fletcher, E.L., Becker, C.M. (1998). Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vis. Res.* 38, 1411-1430.

Zhang, N., Townes-Anderson, E. (2002). Regulation of Structural Plasticity by Different Channel Types in Rod and Cone Photoreceptors. *J. Neurosci.* 22(16), 7065-7079.

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Neuroanatomischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Hirnforschung (Direktor: Herr Prof. Dr. H. Wässle) in der Zeit von Juni 2001-Dezember 2003 angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Silke Haverkamp, die mich in allen Phasen meiner Arbeit tatkräftig unterstützt hat.

Herrn Priv. Doz. Dr. Johann Helmut Brandstätter danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens, Herrn Prof. Dr. Erich Buchner der Universität Würzburg für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Großer Dank gilt Martina Dumbsky, die mich in die Methodik eingewiesen hat. Vielen Dank für die schöne gemeinsame Laborarbeit.

Herrn Dr. med. Dipl. Ing. Mathias Seeliger danke ich für die Überlassung der CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} Maus.

Herrn Driss Benzaid möchte ich für die vielen Tricks der Bildbearbeitung danken.

Vielen Dank Herr Walter Hofer für Ihre stetige Hilfe am neuen Elektronenmikroskop. Das Arbeiten mit Ihnen hat riesigen Spaß gemacht.

Frau Gong-Sun Nam danke ich für die Anfertigung exzellenter Ultradünnschnitte.

Vielen Dank an Frau Brigitte Marshallsay für das Korrekturlesen meiner Summary.

Herrn Prof. Dr. Wässle möchte ich für die Leihgabe des Arbeitscomputers danken.

Olivia Dumitrescu, Anja Staab, Monika Altwein, Susanne tom Dieck und Nina Pfau danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an Frau Irmgard Odenthal und Frau Felizitas Boij für ihre zuverlässige Hilfsbereitschaft.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ellen Claes
 Geburt: geboren am 4.Mai 1973 in Münster (Westf.)
 Eltern: Karl-Heinz und Christa Claes
 Geschwister: Mona (Zwillingschwester) und Esther

Schulbildung:

1980-1984 Marien-Grundschule Senden
 1994 Abitur am Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium,
 Städt.Gymnasium Münster

Studium:

1994-99 Biologiestudium am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften
 Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

März 99 Diplomprüfung

April 99-April 2000 Diplomarbeit in der Zell- und Entwicklungsbiologie (Würzburg):

„Verlauf der Spermatogenese bei Mäusen, die homozygot für eine Deletion
 des Lamin A-Gens sind“

2000-2001 Wissenschaftliche Angestellte in der molekularen Pflanzenbiochemie
 an der Universität Freiburg i.Brsg.

Promotion:

Juni 2001-Dezember 2003 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in
 Frankfurt/M., Abteilung Neuroanatomie

11. Erklärung:

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst wurde. Alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen sind angegeben. Die vorliegende Dissertation hat weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Zuvor habe ich noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Würzburg, den.....

.....

Ellen Claes