

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen
Abteilung: Zelluläre Neurobiologie
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H.-J. Wagner

**Adaptations- und aktivitätsabhängige Plastizität
prä- und postsynaptischer Strukturen der
Cyprinidennetzhaut**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Martin Uhl

aus Leutkirch im Allgäu

2002

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-J. Wagner

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Thier

"Die Welt, soweit wir sie erkennen können, ist unsere eigene Nerven-thätigkeit, nicht mehr."

Nietzsche F., Aphorismus Nr. 5755; KSA 9, 436

Inhaltsverzeichnis

1.0. Einleitung	1
1.1. Synaptische Plastizität im Hippokampus	2
1.2. Plastizität in der Goldfischnetzhaut	4
1.3. Plastizität der Präsynapse	5
1.4. Plastizität der Postsynapse	6
1.5. Spinules	7
1.6. Fragestellung und Versuchsplanung	8
2.0. Material und Methoden	9
2.1. Verwendete Materialien	9
2.2. Netzhautpräparation und histologische Aufarbeitung für die lichtmikroskopische Immunhistochemie	10
2.3. Immunhistochemie der Gephyrin-PKC Doppelmarkierungen	11
2.4. GABA _C -Rezeptor Immunhistochemie	11
2.5. GABA Immunhistochemie am Semidünnschnitt	12
2.6. SNAP-25 Immunhistochemie	13
2.7. Lichtmikroskopische CLSM-Photodokumentation	13
2.8. Elektronenmikroskopie: preembedding Gephyrin-Markierungen in der IPL	14
2.9. Elektronenmikroskopie: preembedding PKC-Markierung von Mb-BTs	15
2.10. Elektronenmikroskopie: preembedding SNAP-25 Darstellung in der OPL	16
3.0. Ergebnisse	17
3.1. Morphologie und Plastizität der PKC-IR Mb-Bipolarzellen in der Goldfischnetzhaut	17
3.2. Verteilung von inhibitorischen postsynaptischen Orten in der IPL und an Mb-Bipolar-Axonterminalen in der Goldfischnetzhaut	21
3.2.1. Fluoreszenzmikroskopische Verteilung von Gephyrin in der IPL	21
3.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Gephyrin-IR an den Mb-Terminalen	24
3.2.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Gephyrin-IR an Mb-BTs des Goldfisches	28

3.2.4. Licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der Gephyrin-IR in der ONL der Goldfischnetzhaut.....	34
3.2.5. GABA _C -Rezeptoren in der IPL und an Mb-BC der Goldfischnetzhaut .	36
3.2.6. Ist Gephyrin an der Verankerung von GABA _C -Rezeptoren beteiligt? ...	38
3.3. Immunhistochemische Darstellung des präsynaptischen Markers SNAP-25	39
3.3.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der adaptionsabhängigen Plastizität von SNAP-25 in der IPL und OPL	39
3.3.2. Elektronenmikroskopie der SNAP-25-IR in der OPL der Goldfischnetzhaut	42
4.0. Diskussion	43
4.1. Diskussion der Methoden	44
4.2. Morphologie der Mb-Bipolarzellen der Goldfischnetzhaut	45
4.3. Morphologische Plastizität und Mb-Bipolarzellen.....	47
4.4. Inhibitorische Neurotransmitter und funktionelle Verankerung von Rezeptoren .	49
4.5. Gephyrin-IR in Photorezeptoren der Netzhaut.....	56
4.6. GABA _C -Rezeptoren in der Goldfischnetzhaut.....	58
4.7. Räumliche Segregation der inhibitorischen Eingänge auf die Mb-BTs.....	61
4.8. Funktionelle Bedeutung von GABA _C -Rezeptoren und PKC für Mb-Terminalen	63
4.9. Adaptionsabhängige Unterschiede in der Verteilung von SNAP-25-IR in der Goldfischnetzhaut.....	66
4.10. Die „Quantal-size“ korreliert mit der Größe der postsynaptischen Region	70
5.0. Zusammenfassung	72
6.0. Literaturverzeichnis.....	74
6.0. Anhang mit Abbildungs-, Abkürzungsverzeichnis, Publikationen, Danksagung und Lebenslauf	91

1.0. Einleitung

„*Wer Wissen hat, verläuft sich nirgends*“ sagt ein altes jiddisches Sprichwort. Es drückt aus, daß wir ohne die Verfügbarkeit und Abrufbarkeit von zuvor erlerntem Verhalten und Wissen völlig hilflos wären. Menschen mit schweren Gedächtnisstörungen, z.B. Patienten, die an der Alzheimer Erkrankung leiden, verlieren im Verlaufe der Krankheit jede persönliche, zeitliche und örtliche Orientierung.

Lernen, Gedächtnis und Erinnerung, also die Aufnahme, Speicherung und Abgabe von Informationen durch neuronale Netzwerke, sind die biologische Grundlage der Anpassung unseres individuellen Verhaltens an die Umwelt. Ohne diese Vorgänge wäre weder das Überleben des einzelnen noch das der Art möglich, denn es könnten weder Erfolge planvoll wiederholt noch Mißerfolge gezielt vermieden werden.

Alle Lernprozesse sind Ausdruck der Plastizität des Nervensystems, aber nicht jeder plastische Prozeß bedeutet Lernen. Unter Lernen verstehen wir den Erwerb eines neuen Verhaltens, das bisher nicht im Verhaltensrepertoire des Organismus vorkam. Damit wird Lernen von Reifung unterschieden, bei der genetisch programmierte Wachstumsprozesse zu Veränderungen des zentralen Nervensystems führen, die als Voraussetzungen für Lernen fungieren. Der Übergang zwischen plastischen Veränderungen, die der Reifung, und plastischen Veränderungen, die dem Lernen zugrunde liegen, ist allerdings fließend (Schmidt und Thews 1995).

Die Untersuchung plastischer Veränderungen war und ist ein begehrtes Ziel vieler Neurowissenschaftler. Im Laufe der Zeit paßten die Überlegungen sich dabei dem derzeitigen Stand der Wissenschaft an (Finger 1994). So war bereits Aristoteles der Auffassung, daß die Grundlage von Lernen und Gedächtnis wesentlich in der Assoziation von Ideen zu suchen ist (Barnes 1984). Die Untersuchungen von Pawlow lieferten die Voraussetzungen für die klassische Konditionierung, und 1949 formulierte Donald O. Hebb die nach ihm benannte Regel, welche zu einem fundamentalen Prinzip neuronaler Plastizität werden sollte.

Diese Regel besagt, daß „Hebb’sche Synapsen“ bei wiederholter simultaner Erregung ihre Verbindungen verstärken. Darüber hinaus wird nicht nur die „Effizienz“ der kooperierenden Synapsen erhöht, sondern gleichzeitig die der inaktiven benachbarten Synapsen abgeschwächt (Hebb 1949). Der Abbruch alter, nicht benötigter Verbindungen durch Absterben oder Funktionslosigkeit nicht benützter Zellen ist für die Entwicklung neuer Verhaltensweisen

mindestens genau so wichtig wie der Aufbau neuer neuronaler Verbindungen (Braitenberg und Schüz 1991; Carlson 1991; Kandel et al. 2000).

Die Fortschritte der neurobiologischen Methoden erlaubten es, sich nun den molekularen Mechanismen von Lernen und Gedächtnis zuzuwenden (Weiler et al. 1995; Lodish et al. 2000). Dabei leisteten die Untersuchungen zur Lang-Zeit-Potenzierung (LTP) im Hippokampus einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis neuronaler Plastizität (Abeles 1991; Black 1991; Squire und Zola-Morgan 1991; Akissar et al. 1992; Zola-Morgan und Squire 1993; Shuman und Madison 1994). Es finden sich eine Vielzahl von Beispielen von neuronaler Plastizität in unterschiedlichsten Gebieten des Nervensystems. In dieser Arbeit werden mit immunhistochemischen Methoden prä- und postsynaptische Proteine untersucht, von denen man annehmen kann, daß sie an molekularen Mechanismen neuronaler Plastizität in der Netzhaut des Goldfischs beteiligt sein könnten. Die folgenden Abschnitte der Einleitung dienen dazu, allgemeine Mechanismen der Plastizität, z.B. Lernen und Gedächtnis im Hippokampus, darzustellen und das Modell der Goldfischnetzhaut einzuführen. Darüber hinaus werden die Spinules als verbindendes Element der prä- und postsynaptischen Veränderungen vorgestellt. Am Ende hoffen wir, daß uns in Anlehnung an Trickfilmfiguren, denen immer, wenn sie etwas gelernt haben, eine Glühbirne über dem Kopf aufleuchtet, ebenfalls das „molekulare Licht“ aufgeht (Tully 1998).

1.1. Synaptische Plastizität im Hippokampus

Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften des zentralen Nervensystems besteht darin, enorme Mengen von Informationen zu verarbeiten und zu speichern. Folglich herrscht ein reges Interesse daran, die zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen von Lernen und Gedächtnis verstehen (Kandel 1997; Dubnau und Tully 1998) und die Verbindungen von synaptischer Plastizität zum Gedächtnis darstellen zu können (Collingridge und Bliss 1995; Stevens 1998).

Obwohl sehr viele Arbeiten die Morphologie von exzitatorischen Synapsen des zentralen Nervensystems zum Gegenstand hatten, ist erstaunlich wenig über die Dynamik und den „turnover“ von einzelnen synaptischen Strukturen bekannt (Burns und Augustine 1995). Lange Zeit ging man davon aus, daß Synapsen nach ihrer Entwicklung wenig verändert bestehen bleiben. Allerdings wurden bestimmte Formen synaptischer Plastizität, wie die späte Phase der Lang-Zeit-Potenzierung, mit einem „re-arrangement“ der synaptischen Strukturen über einen Zeitrahmen von Stunden bis Tagen in Verbindung gebracht (Geinisman et al.

1991; Hosokawa et al. 1995; Buchs und Muller 1996; Geinisman et al. 1996; Bolshakov et al. 1997; Okabe et al. 1998). Untersuchungen von mit GFP (green fluorescent protein) gekoppeltem Aktin zeigten eine ausgesprochen schnelle Motilität von dendritischen Spines (Minuten) im Hippokampus (Fischer et al. 1998). Änderungen der Morphologie der Dendriten ließen ebenfalls auf einen Zusammenhang mit synaptischer Plastizität schließen (Maletic-Savatic et al. 1999; Engert und Bonhoeffer 1999). Danach wurde es möglich, synaptische Plastizität im Hippokampus nicht nur mit morphologischen Veränderungen zu assoziieren (Calverley und Jones 1987; Buchs und Muller 1996; Rusakov et al. 1996; Toni et al. 1999), sondern auch mit physiologischen Verhaltensweisen, wie assoziativem Lernen, Gedächtnis und Konditionierungsvorgängen (Engert und Bonhoeffer 1999; Holscher 1999; Moser 1999; Nakamura et al. 1999; Rao et al. 1999).

Gedächtnis wird in der Regel in zwei Konstrukte unterteilt, die sich zeitlich und funktionell unterscheiden: Kurzzeitgedächtnis, das nicht länger als einige Stunden anhält, und Langzeitgedächtnis, das über Tage und länger bestehen bleibt (Barondes und Cohen 1968; Goelet et al. 1986). Die Synthese von neuen Proteinen und mRNA ist dabei ein wesentlicher Bestandteil für die Bildung bzw. Konsolidierung von Langzeitgedächtnis (Davis und Squire 1984; Tully et al. 1994). Dieses Modell zeigt, daß Lernen „die Expression von Proteinen steigert“, die dann u.a. zu „langzeit-assoziierten“ strukturellen Veränderungen in neuronalen Netzen, welche das Gedächtnis repräsentieren, führen. Ein Anstieg von Ca^{2+} und cAMP wird dabei sowohl in Säugern als auch Nichtsäugern gefunden (Hauser et al. 1998; Silva et al. 1992; Wu et al. 1995). Tatsächlich ist die Aktivierung des cAMP/PKA Signaltransduktionsweges oft ein notwendiger Bestandteil für die Bildung von neuronaler Plastizität, Gedächtnis (Frey et al. 1993; Abel et al. 1997) und Genexpression im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität (Impey et al. 1996).

Obwohl das Wissen über die Funktionen einzelner Transduktionskaskaden bei Lern- und Gedächtnisvorgängen im Detail weiterhin lückenhaft ist, ist in der letzten Zeit der „cAMP response element (CRE) Transduktionsweg“ in den Vordergrund des Interesses gerückt. Eine synergistische Koaktivierung von Ca^{2+} und cAMP erhöht die CRE gesteuerte Genexpression in Neuronen (Sheng et al. 1990; Impey et al. 1999). Darüber hinaus findet man im Anschluß an „long-lasting long-term potentiation“ (L-LTP), einer transduktionsabhängigen Form der neuronalen Plastizität, die im besonderen mit Langzeitgedächtnis in Verbindung gebracht wird (Nguyen und Kandel 1996), ebenfalls eine gesteigerte Aktivität der CRE abhängigen Transduktion (Impey et al. 1996). In jüngster Vergangenheit war es nun sogar möglich,

mittels CREB-(cAMP responsive element binding protein) Darstellung konditioniertes Lernen in der CA1 und CA3 Region des Hippokampus nachzuweisen (Impey et al. 1998).

Im folgenden soll die synaptische Plastizität der Prä- und Postsynapse besprochen werden. Dabei werden zuerst einführend das Modell der Goldfischnetzhaut und die Besonderheiten der Bipolaraxonterminale bezüglich morphologisch plastischer Veränderungen diskutiert.

1.2. Plastizität in der Goldfischnetzhaut

„The Retina. An Approachable part of the Brain“, so lautet der Titel eines bekannten Buches von J.E. Dowling (Dowling 1987). Danach ist die Netzhaut einerseits ein leicht zu erreichender Teil des Gehirns, andererseits lassen sich auf Grund der gut untersuchten Verschaltung der einzelnen Neurone und des quantifizierbaren sensorischen „Eingangs“ kontrollierte Versuchsbedingungen herstellen, anhand derer allgemeingültige Prinzipien über neuronale Plastizität aufgestellt werden können (DeVries und Baylor 1993).

So ist die Retina ein gut untersuchtes Modell für Plastizität durch „Neuromodulatoren“ (DeVries und Baylor 1993). Man war lange Zeit der Meinung, die Netzhaut reagiere nur „passiv“ auf die unterschiedlichen Beleuchtungsstärken. Heute weiß man, daß z.B. die Retinomotorik der Stäbchen und Zapfen in der Fischnetzhaut ein aktiver Vorgang ist, bei der die Netzhaut sich auf wechselnde Lichtverhältnisse einstellt. Licht und endogene Uhren stimulieren die Ausschüttung von Dopamin, das sich weitgehend durch Diffusion in der Netzhaut verteilt und eine Umstellung der „Verschaltung“ auf die Anforderungen des Tageslichts bewirkt (Witkovsky und Deary 1992). Im folgenden sollen drei Effekte von Dopamin exemplarisch für die Plastizität der Netzhaut dargestellt werden (siehe auch Djamgoz und Wagner 1992).

Bei einigen Tieren (so auch bei Cypriniden und Cichliden) verursacht Dopamin eine aktive Bewegung von Photorezeptoren, welche die Zapfen zum bevorzugten Reaktionspartner des einfallenden Lichts macht (Deary et al. 1990). Diese Zapfenbewegung nach zentral (zentripetal) wird durch Dopamin D₂ Rezeptoren vermittelt und bewirkt zusammen mit der Migration der Melaningranula des Pigmentepithels (über D₁ Rezeptoren) eine „optische Isolierung“ der Zapfen, welche mit einer verbesserten „Auflösung“ visueller Information einhergeht (Ali 1975; Besharse et al. 1988; Deary et al. 1990; Wagner 1990).

Ein zweiter Effekt von Dopamin besteht darin, die Größe und das Gleichgewicht der Signale auf Bipolarzellen einzeln für Stäbchen und Zapfen zu modulieren. In Horizontalzellen der Amphibiennetzhaut, die von Stäbchen und Zapfen synaptische Eingänge

erhalten, schwächt Dopamin den Stäbcheneingang ab, wohingegen die „Zapfen-Information“ verstärkt wird (Witkovsky et al. 1988). Diese Veränderung des „synaptischen Kontrasts“ wird möglicherweise sowohl durch prä- als auch postsynaptische Effekte verursacht. Ein gut dokumentierter postsynaptischer Effekt ist dabei, daß über cAMP-abhängige Mechanismen der Glutamat-induzierte Strom in Horizontalzellen durch Dopamin verstärkt wird (Knapp und Dowling 1987).

Drittens bewirkt Dopamin eine Entkopplung von gap junctions, was zu einer funktionellen Änderung der Verschaltung führt. Diese Entkopplung der gap junctions von Horizontalzellen (Teranishi et al. 1983; Piccolino et al. 1984; Lasater und Dowling 1985; DeVries und Schwartz 1989) wird über einen cAMP/cAMP-abhängige Kinase Transduktionsweg bewirkt (van Buskirk und Dowling 1981; Lasater 1987; DeVries und Schwartz 1989, 1992). Die Aktivierung der Protein Kinase A bewirkt dann die „Schließung“ der gap junctions und verkleinert somit die elektrische Ausbreitung des lateralen Inhibitionssignals im „Horizontalzell-Syncytium“. Dadurch werden die Rezeptiven Felder von Ganglien- und Bipolarzellen kleiner und die neuronale Verarbeitung des Bildes kontrastreicher (Dong und McReynolds 1991).

Diese Effekte von Dopamin auf die Organisation der Netzhaut wird von einer Population von Zellen bewirkt, deren Fortsätze sich sowohl in der Inneren (IPL) als auch der Äußeren Körnerschicht (OPL) befinden und deshalb Interplexiforme Zellen genannt werden (Djamgoz und Wagner 1992; Witkovsky und Dearth 1992).

1.3. Plastizität der Präsynapse

Für die Untersuchung neuronaler Plastizität eignet sich die große Axonterminale einer Subpopulation von Goldfisch-Bipolarzellen, die gemischte Stäbchen-Zapfen-Eingänge in der OPL erhalten und deren Axonendigung in der Sublamina b der IPL liegen (Ishida et al. 1980; Sherry und Yazulla 1993). Durch ihre besondere Größe (10 – 15 µm im Durchmesser) lassen sich präsynaptische Mechanismen der Transmitter-Exozytose und ihrer Steuerung ausgezeichnet untersuchen (Kaneko und Tachibana 1985; Heidelberger und Matthews 1992; Matthews 1999). Ein Kalzium-Einstrom über L-Typ Kalziumkanäle steuert dabei die Vesikelexozytose, welche durch Kapazitätsmessungen der Plasmamembran dargestellt werden kann (Tachibana und Okada 1991; Heidelberger und Matthews 1992).

Die Exozytose der synaptischen Vesikel unterscheidet sich dabei von der sonst quantitativ vorherrschenden Synapsenform des zentralen Nervensystems. Der synaptische Ausgang der

Bipolarzellen verläuft über sog. Ribbon-Synapsen. Diese spezielle Art der chemischen Synapse findet man auch in den Terminalen von Photorezeptoren in der Netzhaut, in Haarsinneszellen im Innenohr und in Zellen des Seitenlinien-Organs bei Fischen (Wagner 1997). Ribbon-Synapsen stellen eine besondere Form der chemischen Synapse dar, die auf Ausschüttung von besonders viel Transmitter in kurzer Zeit spezialisiert sind (Wagner 1997; Matthews 1999). Die bemerkenswert hohe Rate an Vesikelverschmelzungen läßt sich darauf zurückführen, daß die Informationsübertragung der Bipolarzellen auf die Ganglienzellen nicht über Aktionspotentiale, sondern über graduierte Membrandepolarisationen erfolgt (Juusola et al. 1996).

Die Axonterminalen der Bipolarzellen besitzen viele „reziproke feedback Synapsen“ von den sie umgebenden Amakrinzellen (Witkovsky und Dowling 1969; Marc et al. 1978; Yazulla et al. 1987). Diese Synapsen modulieren den synaptischen Ausgang der Bipolarzellen. Die komplizierten Mechanismen der Modulation vollziehen sich dabei über die Neurotransmitter GABA und Glyzin (Matthews 1999). Dadurch lassen sich an den Bipolarterminalen auf engstem Raum prä- und postsynaptische Phänomene der Signalübertragung beobachten.

Des weiteren gibt es in der jüngsten Vergangenheit Hinweise darauf, daß die Proteine, welche am Prozeß des „vesikeldocking und -fusion“ beteiligt sind, selbst Angriffspunkt neuronaler Plastizität sind. Diese Beobachtungen wurden während plastischer Veränderungen bei LTP im Hippokampus für SNAP-25 gemacht (Roberts et al. 1998; Genoud et al. 1999).

1.4. Plastizität der Postsynapse

Die Fähigkeit von Nervenzellen, mehrere tausend synaptische Eingänge von anderen Neuronen zu erhalten, stellt die anatomische Grundlage für die Informationsverarbeitung im Säugergehirn dar. Die Bildung von funktionellen Zonen (Synapsen) ist dabei an die Möglichkeit der lokalen Aggregation von Rezeptoren in der postsynaptischen Membran gebunden. Rezeptorassoziierte Proteine wie Gephyrin spielen dabei eine entscheidende Rolle (Betz 1998; Kneusel und Betz 2000).

Darüber hinaus stellt die Postsynapse nicht nur eine statische Struktur dar, sondern unterliegt auch morphologischen Veränderungen, die von der Aktivität der Synapse abhängen (Okabe et al. 1998). So variiert die Größe der postsynaptischen Zone in Abhängigkeit von der Entfernung der Synapse auf dem Dendritenbaum zum Zellsoma und zeigt auch aktivitätsabhängige Veränderungen (Thriller et al. 1990; Nusser et al. 1998; Lim et al. 1999). Eine Besonderheit der Postsynapse besteht darin, daß diese Größenzunahme von einer

Perforation der postsynaptischen Verdichtung begleitet sein kann (Calverley und Jones 1987; Sorra et al. 1998). Dabei invaginieren z. T. fingerartige Ausstülpungen der postsynaptischen Membran (Spinules) in die Präsynapse und unterteilen die Synapse in verschiedene funktionelle Zonen (Mikrodomänen) (Edwards 1995a, b; Sorra et al. 1998). Spinules wurden in unterschiedlichen Abschnitten des Säugergehirns und der Netzhaut (Edwards 1995a, b; Wagner und Djamgoz 1993) gefunden und haben wegen ihrer Dynamik das Interesse vieler Arbeitsgruppen geweckt (Weiler 1994; Edwards 1995a, b; Sorra et al. 1998).

1.5. Spinules

In der Netzhaut des Goldfisches sind zwei verschiedene Arten von Spinules beschrieben worden: Spinules von Zapfenhorizontalzellen (Wagner 1980) und Spinules von Ma- und Mb-Bipolarzellen (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996). Die Horizontalzell-(HC)-Spinules sind im Hellen vorhanden und werden im Dunkeln zurückgebildet. Das Auftreten von HC-Spinules wird einerseits exogen durch „Hell-Dunkel“ gesteuert, andererseits endogen durch zirkadiane Rhythmen beeinflusst, wobei Dopamin hier eine zentrale Rolle spielt (Douglas und Wagner 1983; Wagner et al. 1992). Die Bildung der Spinules wird über Dopamin D₁ Rezeptoren in Gang gesetzt und intrazellulär durch cAMP bzw. auch durch PKC-abhängige „second messenger-Mechanismen“ beeinflusst (Kirsch et al. 1991; Weiler et al. 1991). Die Rückbildung steht unter dem Einfluß von Glutamat (Weiler und Schultz 1993).

Die Funktion der HC-Spinules wird mit dem „Feedback-Verhalten“ chromatischer Horizontalzellen auf die Photorezeptoren in Verbindung gebracht (Raynauld et al. 1979; Weiler und Wagner 1984; Kirsch et al. 1990; Wagner und Djamgoz 1993).

Die HC-Spinules lassen sich morphologisch nur schwer in ein gängiges Bild einer chemischen Synapse einordnen. An den Spitzen der HC-Spinules findet man z.B. keine synaptischen Vesikel bzw. Vesikelakkumulationen. Horizontalzellen schütten ihren Transmitter, vermutlich GABA, wohl über Transporter („Carrierer“) aus (Schwartz 1982, 1987).

Die Spinules der Mb-Bipolaraxonterminalen -Bipolaraxonterminalen werden im folgenden nur als Terminalen bezeichnet- haben z.T. Vesikelakkumulationen an den Spitzen auf der Seite der Amakrinen. Die Funktion dieser Bipolar- (BC)-Spinules ist bisher wenig verstanden. BC-Spinules treten unter Bedingungen auf, in denen die Terminale hyperpolarisiert ist, unter

Bedingungen reduzierter inhibitorischer (GABAerger / glyzinerger) Aktivität (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996). Strukturen, die als Spinules bezeichnet werden, wurden u.a. auch im Säugergehirn beschrieben, wobei sie z.B. im Hippokampus unter Bedingungen allgemein gesteigerter erregender glutamaterger Aktivität gebildet werden (Schuster et al. 1990; Lisman und Harris 1993; Sorra et al. 1998).

Im Verlaufe der plastischen Veränderungen während LTP kommt es oft zu einer Perforierung von exzitatorischen Synapsen durch einen Spinule (Edwards 1995a, b). Diese Perforierung wird als Diffusionsbarriere aufgefaßt und soll die Synapse in zwei funktionelle Kompartimente separieren (Edwards 1995a, b). Das von Edwards vorgeschlagene Modell verbindet prä- und postsynaptische Phänomene von LTP; allgemein akzeptiert ist es aber nicht (Sorra et al. 1998).

1.6. Fragestellung und Versuchsplanung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob Hell- und Dunkeladaptation zu morphologisch faßbaren Veränderungen der Prä- und Postsynapse führt. Hierzu sollen Antikörper gegen prä- und postsynaptische Marker verwendet und auf adaptationsabhängige Veränderungen in der Verteilung und Expression dieser Marker in der Goldfischnetzhaute untersucht werden.

Im einzelnen werden immunhistochemische Anfärbungen mit Antikörpern vorgenommen, die gerichtet sind gegen (1) Gephyrin, ein 93kDa Molekül, das an der Verankerung von inhibitorischen Rezeptoren wie GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren beteiligt ist, gegen (2) die ρ_1 -Untereinheit des GABA_C-Rezeptors und gegen (3) SNAP-25, ein Protein, das am molekularen Prozeß des „docking und fusion“ von Vesikeln mit der Plasmamembran teilnimmt. Mb-Bipolarzellen und ihre Axonterminalen werden mit Antikörper gegen (4) Protein Kinase C (β_1 -Isoform) angefärbt.

2.0 Material und Methoden

Zur Darstellung adaptionsabhängiger Veränderungen prä- und postsynaptischer Strukturen der Mb-Bipolarterminalen wurden immunhistochemische Mehrfachmarkierungen durchgeführt. Dazu wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper verwendet:

2.1. Verwendete Materialien

Anti-„Glyzinrezeptor“ (Ratte), clone MAb 7a aus der Maus, monoklonal (Boehringer Mannheim) (im folgenden Anti-Gephyrin genannt);

Anti- β_1 -Isoform PKC (aus dem Kaninchen) (Santa Cruz, Heidelberg);

Anti- α -Isoform PKC (aus der Maus, monoklonal) (Amersham, Heidelberg);

Anti-GABA-IgG (aus dem Kaninchen) (Chemicon, Hofheim);

Anti-GABA_C-Rezeptor-IgG (ρ (Rho)-Untereinheit) (aus dem Kaninchen); dieser Antikörper wurde von Herrn Prof. Dr. H. Wässle (Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt) zur Verfügung gestellt;

Anti-SNAP-25 (aus der Maus, monoklonal) (Affinity, Grünberg);

Anti-Kaninchen-IgG (aus der Ziege) (Sigma, Deideshofen);

Anti-Maus-IgG (aus der Ziege) (Sigma, Deideshofen);

Anti-Maus Cy²gekoppelt (aus der Ziege) (Dianova, Hamburg);

Anti-Maus Cy⁵ gekoppelt (aus der Ziege) (Dianova, Hamburg);

Anti-Kaninchen Cy²gekoppelt (aus der Ziege) (Biotrend, Köln);

Anti-Kaninchen FITCgekoppelt (aus der Ziege) (Sigma, Deideshofen);

Maus Peroxidase-Anti-Peroxidase (Maus-PAP) (Dianova, Hamburg);

Kaninchen Peroxidase-Anti-Peroxidase (Kaninchen-PAP) (Dianova, Hamburg);

Die Antikörper wurden mit einer Antikörperverdünner-Lösung aufgenommen. Diese Lösung bestand aus einer proteinhaltigen PBS-Lösung (2% NGS, 0.5% BSA in PBS und 0.25% Triton-X-100).

2.2. Netzhautpräparation und histologische Aufarbeitung für die lichtmikroskopische Immunhistochemie

Es wurden Goldfische (*Carassius carassius auratus*) verwendet (Standardlänge: 10 bis 12 cm), die von einem lokalen Händler bezogen wurden. Die Fische wurden bis zu ihrer Verwendung bei regelmäßiger Hell/Dunkel Beleuchtung (8 Uhr Licht an, 20 Uhr Licht aus) in einem Aquarium im Keller des Instituts gehalten. Hell- und dunkeladaptierte Fische wurden durch Dekapitierung getötet. Die Augen wurden schnell entnommen und mit einer Rasierklinge halbiert. Danach wurde die Retina vorsichtig aus dem hinteren Augenbecher isoliert und mit 4% Paraformaldehyd in 0.06 M Phosphatpuffer (pH 7.4) und 3% Sukrose immersionsfixiert. Die Dauer der Aldehydfixierung hing dabei von den verwendeten Primärantikörpern ab:

Primärantikörper	Dauer der Fixierung
Anti-PKC (α und β_1 Untereinheit)	1 bis 2 Stunden bei 4°C
Anti-Gephyrin	15 bis 30 Minuten bei 4°C
Anti-GABA _C	keine Aldehydfixierung, nur Ethanol-Aceton-Behandlung (-20°C)
Anti-SNAP-25	1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur

Die Netzhäute wurden danach jeweils 3 mal 15 Minuten in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Sukrosereihe (10, 20 und 30% Sukrose in PBS) infiltriert (Dauer: 30 Minuten, 60 Minuten und „über Nacht“) und mehrmals in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um so das Eindringen der Antikörper zu erleichtern (Eldred et al. 1983). Die Retinastücke wurden danach in Kryomatrix (TissueTek, Miles) umgebettet und eingefroren. Mit einem Gefriermikrotom (Slee) wurden 16µm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Sie wurden mit Chrom/Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen, getrocknet und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Nachfolgend wird die immunhistochemische Aufarbeitung exemplarisch für die PKC-Gephyrin Doppelmarkierung beschrieben.

2.3. Immunhistochemie der Gephyrin-PKC Doppelmarkierungen

Die Gefrierschnitte wurden aufgetaut und bei 37°C für 30 Minuten getrocknet. Danach wurde die Kryomatrix mit PBS abgewaschen und die Schnitte für 30 Minuten mit einer „Präinkubationslösung“ (4% NGS, 1% BSA in PBS und 0.25% Triton-X-100) inkubiert, um einerseits unspezifische Bindungen zu minimieren und um andererseits die Penetration der Antikörper zu erleichtern (Larsson 1988). Danach wurden die Schnitte 30 Minuten mit PBS gewaschen und sodann das Primärantikörpergemisch (Anti-PKC und Anti-Gephyrin jeweils 1:100 in Präinkubationslösung verdünnt) entweder für 4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf die mit einem Fettstift umrandeten Schnitte gegeben. Das Sekundärantikörpergemisch (Anti-Maus-Cy⁵ und Anti-Kaninchen-Cy², jeweils 1:100 Endverdünnung) wurde nach nochmaligem Waschen mit PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Nach abschließendem 30minütigem Waschen mit PBS wurden die Objektträger in Fluorosave[®] (Calbiochem) eingeschlossen und bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Um die Spezifität der Antikörpermarkierung zu testen, wurde eine methodische Kontrolle vorgenommen, bei der die primären Antikörper weggelassen und statt dessen Präinkubationslösung auf den Schnitten belassen wurde (Larsson 1988). Hierdurch konnte nur nachgeprüft werden, ob und in welcher Weise die verwendeten Sekundärantikörper selber Antigene im Gewebe erkennen. Die so durchgeführten Kontrollen zeigten keine Markierung in den Präparaten.

2.4. GABA_C-Rezeptor Immunhistochemie

Für die Lokalisation der ρ -Untereinheit des GABA_C-Rezeptors mußte die Fixierung des Gewebes verändert werden, da sich der Antikörper als sehr fixierungsempfindlich herausstellte. Dazu wurden die isolierten Netzhautstücke in unfixiertem Zustand sehr schnell mit flüssigem Stickstoff in TissueTek eingefroren, mit einem Kryostat geschnitten, auf beschichteten Objektträgern aufgefangen und dann mit gekühltem Ethanol (70%) und Aceton (70%) bei -20 °C jeweils für ca. 2 Minuten fixiert.

Die anschließende GABA_C-PKC Immunhistochemie erfolgte mit dem von Herrn Wässle zur Verfügung gestellten Antikörper gegen die Rho-Untereinheit des GABA_C-Rezeptors (1:100 verdünnt). Als „Gegenmarkierung“ wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch die α -Isoform von PKC erkennt (Santa Cruz, Heidelberg, Verdünnung 1:100). Die

Zweitantikörper waren ein Ziege-Anti-Kaninchen-FITC und ein Ziege-Anti-Maus-Cy⁵ IgG; jeweils 1:100 verdünnt.

Die GABA_C-Gephyrin Doppelmarkierung erfolgte mit einem Gemisch der Primäantikörper, bestehend aus dem Maus-Anti-Gephyrin-IgG (1:100) und dem Antikörper gegen die Rho-Untereinheit des GABA_C-Rezeptors (1:100). Das Zweitantikörpergemisch bestand aus dem Ziege-Anti-Kaninchen-FITC (1:100) und dem Ziege-Anti-Maus Cy⁵ gekoppelten IgG (1:100).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden unter Verwendung der gleichen Filterkombination vorgenommen, wie sie für die PKC-Gephyrin-Doppelmarkierungen mit dem CLSM 401 benutzt und beschrieben werden (s. 2.7. Lichtmikroskopische CLSM-Photodokumentation).

2.5. GABA Immunhistochemie am Semidünnschnitt

Die Darstellung inhibitorischer Synapsen in der inneren Goldfischnetzhaut wurde ergänzt durch eine immunhistochemische Markierung von GABA. Die GABA-Markierungen wurden nicht an Gefrierschnitten durchgeführt, sondern an Semidünnschnitten von in Plastik eingebetteten Präparaten (zur Methode siehe: Chun und Wässle 1989; Wässle und Chun 1989; Wulle et al. 1990).

Zu Beginn wurden die entnommenen Augenbecher für 1 Stunde in 2.5% Glutaraldehyd, 1% Paraformaldehyd in 0.06M Phosphatpuffer (pH 7.4) und 3% Sukrose fixiert und danach in PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100%) für die Dauer von jeweils 30 Minuten entwässert und zum Schluß in Aceton (ebenfalls für 30 Minuten) überführt.

Nach der Entwässerung erfolgte die Infiltration mit Aceton-Epon-Mischungen (Intermedien):

- a) 2 Teile Aceton - 1 Teil Epon (Dauer: 40 Minuten);
- b) 1 Teil Aceton - 1 Teil Epon (Dauer: 60 Minuten);
- c) 1 Teil Aceton - 2 Teile Epon (Dauer: 120 – 180 Minuten).

Die Herstellung der Epon-Mischung wurde nach Angaben aus der Literatur vorgenommen (Glauert 1975; Hayat 1989). Zum Schluß wurden die Präparate in Epon über Nacht im Exsikkator entgast, am darauffolgenden Tag in Förmchen überführt und für zwei Tage bei 56°C im Ofen polymerisiert.

Von den ausgehärteten Proben wurden Semidünnschnitte (1 μ m) erstellt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und auf der Wärmeplatte getrocknet. Um die GABA-Markierung durchführen zu können, mußte das Epon mit einer gesättigten Natriumethanolat-Lösung herausgelöst werden (Romeis 1989). Danach wurden die Objektträger nacheinander kurz mit Ethanol, A. dest. und PBS gewaschen.

Die anschließende GABA-Immunhistochemie erfolgte mit einem Kaninchen-Anti-GABA-IgG (Chemicon, Hofheim), welches in einer Verdünnung von 1:250 über Nacht auf die Schnitte gegeben wurde. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen und mit einem Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (1:50) inkubiert (Dauer: 1 Stunde). Zum Schluß erfolgte die Inkubation mit dem Kaninchen Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (Kaninchen-PAP; 1:200; Dauer: 1 Stunde).

Nach dem Waschen mit 0.2 M TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) erfolgte die DAB-Reaktion, welche im Kapitel 2.8 „Elektronenmikroskopische preembedding Immunhistochemie“ genauer beschrieben wird. Zum Abschluß wurden die Objektträger mit Depex (Serva) eingeschlossen. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte mit einem konventionellen Mikroskop (Axiophot, Zeiss), das mit Plan-Neofluar-Objektiven ausgestattet war. Aufnahmen GABA-IR Schnitte wurden mit einer Sony-CCD-Color-Video-Kamera gemacht und mit dem Programm Scion-Image (NIH, Bethesda, Maryland) digitalisiert und gespeichert.

2.6. SNAP-25 Immunhistochemie

Die PKC-SNAP-25 Doppelmarkierungen wurden bis auf wenige Ausnahmen wie die Gephyrin-PKC Markierungen durchgeführt. Die Netzhautstücke konnten bei diesem Antikörper bis zu zwei Stunden aldehydfixiert werden. Das Primärantikörpermischung bestand aus dem monoklonalen Anti-SNAP-25 IgG (aus der Maus; 1:1000) und dem polyklonalen Anti- β_1 IgG (Kaninchen; 1:100). Die Zweitantikörper-Mischung bestand aus einem Cy⁵-gekoppelten Anti-Maus-IgG (Endverdünnung 1:100) und einem Cy²-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper (Endverdünnung 1:100).

2.7. Lichtmikroskopische CLSM-Photodokumentation

Sowohl die PKC-Gephyrin Doppelimmunfluoreszenz als auch die PKC-SNAP-25- bzw. die Gephyrin-GABA_C Doppelmarkierungen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM 410) der Firma Zeiss beobachtet und dokumentiert. Dabei wurden FITC- und Cy²-Fluorochrome mit einem externen Argonlaser (Wellenlänge: 488nm) angeregt und die Emission mit einem Bandpassfilter von 515 bis 565nm bzw. einem Langpass-Filter >515nm beobachtet. Das Cy⁵-Fluorochrom wurde mit einem internen HeNe-Laser (Wellenlänge: 633nm) angeregt und mit einem Bereichsfilter 665nm („range-pass“) beobachtet. Bei den Doppelmarkierungen wurde das eingescannte Fluoreszenzsignal für jedes Fluorochrom in einem eigenen Kanal hinsichtlich Helligkeit und Kontrast getrennt digital optimiert.

Zur Beurteilung der Kolo-kalisation der verschiedenen Antikörper verwendeten wir eine Funktion des CLSM-Rechners, bei der durch die Bildstapel von Terminalen orthogonale Schnitte gelegt wurden. Hierdurch war es möglich, den gesamten Informationsgehalt des Bildstapels in einer Rekonstruktion darzustellen und somit zu beurteilen, ob die Gephyrin-IR Flecken zur Oberfläche einzelner PKC-IR Terminalen gehören (siehe Abb. 3.6).

Zur besseren Darstellung der Gephyrin-IR in der IPL wurden die eingescannten optischen Schnitte eines Bildstapels mit Hilfe der Projektionsfunktion der CLSM-Software übereinanderprojiziert und unter verschiedenen Winkeln betrachtet. Danach wurde mit der „threshold“-Funktion des CLSM-Programmes das Hintergrundsignal (definierter Grauwert des Zellkerns einer Amakrinen oder Horizontalzelle) von dem eingescannten Image digital subtrahiert (siehe Abb. 3.4).

2.8. Elektronenmikroskopie: preembedding Gephyrin-Markierungen in der IPL

Die hell- und dunkeladaptierten Netzhautstücke wurden nach der in Abschnitt 2.2. „Netzhautpräparation und histologische Aufarbeitung“ beschriebenen Methode präpariert. Die isolierte Netzhaut wurde für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd, 0.06 M Phosphatpuffer (pH 7.4) und 3% Sukrose fixiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 bis 150 µm dicke Streifen mit einem „Tissue-Sectioner“ von Sorvall hergestellt und 6 Stunden in Präinkubationslösung (4% NGS, 1% BSA in PBS ohne Triton) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Streifen zwei Tage bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Maus-Anti-Gephyrin-IgG 1:50), einen Tag mit dem Anti-Maus-Brückenantikörper (Dianova 1:100 bei

Raumtemperatur) und einen Tag mit dem Maus-Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex (Maus-PAP Dianova 1:100, bei Raumtemperatur) inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit der Antikörperverdünner-Lösung (2% NGS, 0.5% BSA in PBS). Nach 3 mal 10minütigem Waschen mit 0.2 M TRIS-Puffer (pH 7.4) wurden die Streifen 10 bis 15 Minuten in einer DAB-Lösung ohne Wasserstoffperoxid vorinkubiert. Die DAB-Lösung wurde durch Auflösen einer Fertigtablette Diaminobenzidin (Sigma) in 1 ml A. dest. hergestellt. Danach wurde die Inkubation in neuer DAB-Lösung in der Gegenwart von 0.05% Wasserstoffperoxid unter visueller Kontrolle (Binokular) fortgesetzt; nach ca. 20 - 30 Minuten wurde die Reaktion durch Waschen mit TRIS-HCl-Puffer beendet. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Streifen über Nacht in 2.5% Glutaraldehyd, 1% Paraformaldehyd, 0.06 M Phosphatpuffer, 3% Sukrose (pH 7.4) fixiert. Die Osmium-Nachfixierung erfolgte danach mit 1% Osmiumtetroxid (OsO_4) und 0.5% Kaliumhexacyanoferrat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) in 0.06 M Phosphatpuffer und 3% Sukrose für eine Stunde. Anschließend wurden die Netzhautstreifen mit einer 2% Uranylacetat-Lösung in A. dest. Block-kontrastiert (Dauer: 1 Stunde, 4°C). Es folgte danach die Entwässerung mit einer „aufsteigenden“ Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% Ethanol und 100% Aceton) und anschließend die Infiltration mit Epon/Acetonmischungen (1:2, 1:1 und 2:1) sowie mit Epon. Nach der Entgasung im Exsikkator wurden die Netzhautstreifen für zwei Tage bei 58°C polymerisiert.

Nach Aushärtung der Proben wurden Semidünnschnitte angefertigt und diejenigen Schnitte ausgewählt, die sowohl eine gute Gewebsqualität hatten als auch gut markiert waren. Von diesen Proben wurden Ultradünnschnitte von 100 nm Dicke mit einem Leika-Ultra-Cut-Mikrotom hergestellt. Die Ultra-Dünnschnitte wurden mit einem LEO912 Elektronenmikroskop bei 80 keV untersucht und mit Hilfe einer HSSCCD-Kamera digitalisiert und dem VarioVision-Software-Programm (Soft Imaging System, Münster) dokumentiert.

2.9. Elektronenmikroskopie: preembedding PKC-Markierung von Mb-BTs

Die elektronenmikroskopische Darstellung von PKC-IR Mb-Bipolarterminalen in der Goldfischnetzhaute erfolgte bis auf wenige Ausnahmen wie in Kap. 2.8. beschrieben (siehe auch Chun et al. 1993; Behrens und Wagner 1996). Als Primärantikörper wurde der polyklonale Anti- β_1 -Antikörper aus dem Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg) verwendet

(Endverdünnung: 1:50). Nach einer Inkubationsdauer von 36 Stunden wurden die Streifen für einen Tag mit einem Brückenantikörper Ziege Anti-Kaninchen (Sigma, Deideshofen) in einer Verdünnung von 1:100 behandelt. Danach erfolgte über 2 Tage die Inkubation mit dem Kaninchen Peroxidase-Anti-Peroxidase IgG (Kaninchen PAP, Dianova, Hamburg). Die anschließende DAB-Reaktion und weitere Immunhistochemie unterschieden sich nicht von der bereits in Kap. 2.8. beschriebenen Methodik.

2.10. Elektronenmikroskopie: preembedding SNAP-25 Darstellung in der OPL

Die elektronenmikroskopische Untersuchung von SNAP-25-IR in der OPL der Goldfischnetzhaute erfolgte ebenfalls bis auf wenige Ausnahmen wie in Kap. 2.8. beschrieben. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Anti-SNAP-25 Antikörper aus der Maus verwendet (Endverdünnung: 1:500). Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wurden die Streifen für einen Tag mit einem Brückenantikörper Ziege Anti-Maus (Sigma, Deideshofen) in einer Verdünnung von 1:100 behandelt. Danach erfolgte über 2 Tage die Inkubation mit dem Maus Peroxidase-Anti-Peroxidase IgG (Maus PAP, Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100. Die folgende DAB-Reaktion und Immunhistochemie wurden bereits in Kap. 2.8. beschrieben.

3.0. Ergebnisse

Um einen Eindruck von den PKC-IR Mb-Bipolarzellen zu erhalten, wird zuerst die Morphologie der Mb-Axonterminalen angeführt, um danach die adaptionsabhängigen morphologischen Veränderungen dieser Terminalen vorzustellen (zu Details siehe Yazulla und Studholm 1992; Behrens und Wagner 1996). Danach soll anhand von verschiedenen immunhistochemischen Mehrfach-Markierungen die Lokalisation von prä- und postsynaptischen Proteinen in der inneren Netzhaut auf adaptionsabhängige Veränderungen untersucht werden. Dabei wurde sowohl in der IPL als auch in der OPL auf Änderungen der Anzahl und Morphologie der Immunreaktivitäten geachtet.

3.1. Morphologie und Plastizität der PKC-IR Mb-Bipolarzellen in der Goldfischnetzhaut

Mit Hilfe von Antikörpern gegen die β_1 -Isoform der PKC lassen sich in der Goldfischnetzhaut zwei Populationen von Bipolarzellen immunhistochemisch anfärben. Die Abbildung 3.1 zeigt immunhistochemisch markierte Gefrierschnitte von hell- und dunkeladaptierten Goldfischnetzhäuten. Der PKC-Antikörper markiert eine Bipolarzellpopulation, deren großer Zellkörper in der Mitte der INL liegt (Pfeil in Abb. 3.1a). Vom Zellkörper geht ein kräftiger Dendrit in Richtung der äußeren Faserschicht (OPL). Diese Bipolarzellen besitzen große Axonterminalen (Pfeilköpfe), die in der Sublamina b der IPL in der Nähe der Ganglienzellen liegen. Aufgrund der charakteristischen Morphologie der Zellen und der Lage ihrer Axonterminalen in der Sublamina b der IPL handelt es sich bei diesen Zellen um gemischte Stäbchen-Zapfen Bipolarzellen (Mb-BCs) (Kaneko 1970, Ishida et al. 1980; Saito et al. 1983 und 1985; Sherry und Yazulla 1993).

Bei den anderen Bipolarzellen, deren rundlicher Zellkörper kleiner ist und weiter proximal in der INL liegt, handelt es sich um eine Subpopulation der Zapfenbipolarzellen (siehe auch: Suzuki und Kaneko 1990); diese Zapfenbipolarzellen sind in Abb. 3.1 a und b leider nicht zu erkennen, da deren PKC-Immunfluoreszenz deutlich schwächer ist.

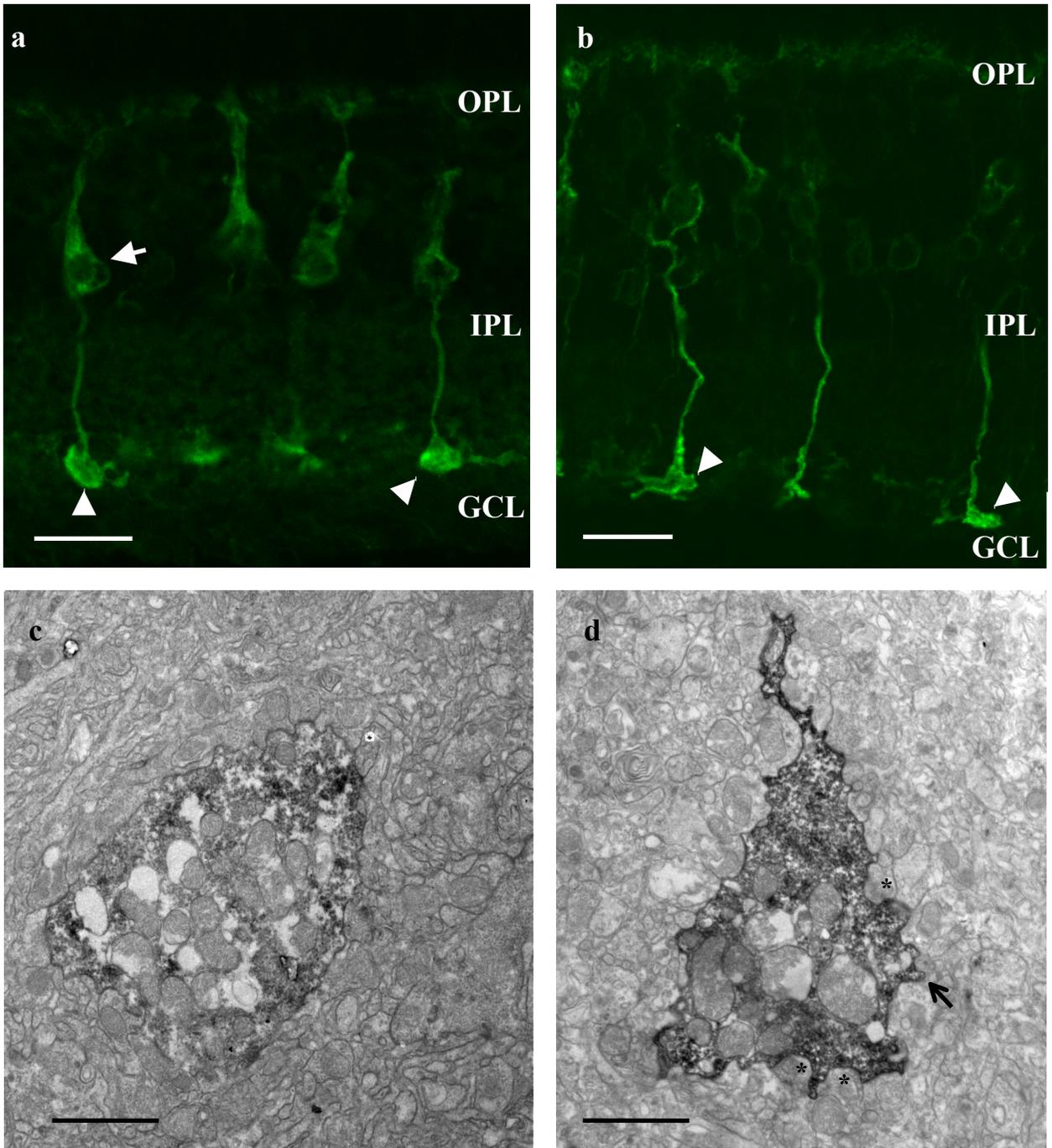


Abb. 3.1

Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von PKC-Immunoreaktiven hell- (a und c) und dunkeladaptierten (b und d) Mb-BCs der Goldfischnetzhaute. Der Pfeil in (a) markiert den Zellkörper einer Mb-BC in der INL. Die Pfeilköpfe in (a und b) zeigen auf Axonterminalen der Mb-BCs in der IPL. (c) und (d) zeigen Axonterminalen in der IPL. Die Sterne in (d) liegen in konkaven „Einziehungen“, der Pfeil in (d) weist auf einen Fortsatz der Terminale, welcher sich zwischen AC-Profilen „drängt“, hin. Balken: (a)+(b): 20 μm ; (c)+(d): 3 μm .

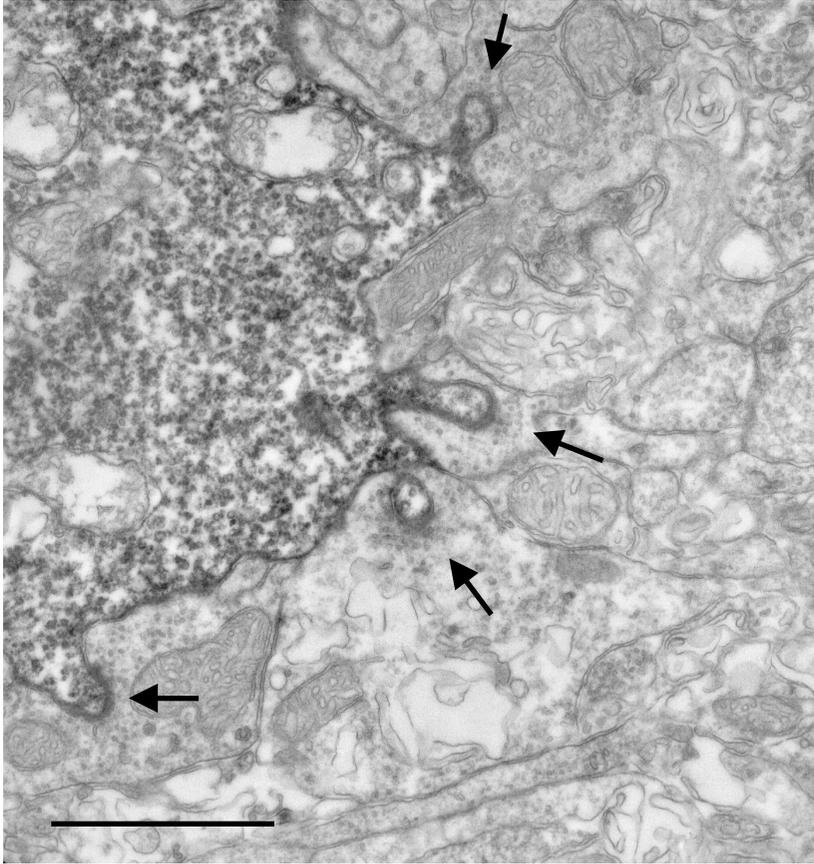


Abb. 3.2
Ausschnitt einer PKC-IR dunkeladaptierten Mb-BT. Die Pfeile markieren Spinules mit Vesikelakkumulationen. Balken: 2 μ m.

Die Übersichtsaufnahmen der PKC-markierten hell- und dunkeladaptierten Fischnetzhäute zeigen adaptionsabhängige Unterschiede in der Morphologie der Axonterminalen der Mb-Bipolarzellen. Die Terminalen der helladaptierten Mb-Bipolarzellen sind eher rundlich; die Oberfläche der Terminalen ist eher „glatt“, und ihre Kontur ist konvex. Das Fluoreszenzsignal für PKC ist in der helladaptierten Terminale eher diffus verteilt und füllt sie, bis auf „schwarze Löcher“, die von Mitochondrien stammen, annähernd gleichmäßig aus. Die Axonterminalen der dunkeladaptierten Mb-Bipolarzellen zeigen eine andere Morphologie: Die Terminalen sehen „kantiger“ und „zerklüfteter“ aus, ihre Oberflächenkontur ist konkav. Die PKC-IR ist in der dunkeladaptierten Terminale deutlich „randständiger“ lokalisiert (Abb. 3.1b).

Auf den Gefrierschnitten der radiär angeschnittenen Netzhäute kann man an den Terminalen der Mb-Bipolarzellen vereinzelt einige Fortsätze erkennen, die aus dem basalen Abschnitt der Terminale bzw. vom zentralen Element der Terminale abgehen und in der Schicht S5 der IPL (Cajal 1894) verbleiben.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von hell- und dunkeladaptierten Mb-Bipolarterminalen zeigen diese Veränderung der Morphologie der Axonterminalen auf ultrastruktureller Ebene (Abb. 3.1c und d). Die helladaptierte Mb-Terminale ist rundlicher und besitzt eine konvexe Oberflächenkontur (Abb. 3.1c), wohingegen die dunkeladaptierte Mb-Terminale eine „kantigere“ Gestalt aufweist und konkave Einziehungen besitzt (Sternchen in Abb. 3.1d). Zwischen diesen Einziehungen sieht man fingerartige cytoplasmatische Plasmamembranausstülpungen, die sich zwischen die anliegenden Amakrinzellfortsätze schieben (Pfeil in Abb. 3.1d).

Dunkeladaptierte Mb-Terminalen besitzen fingerartige Ausstülpungen (Spinules), die in Amakrinzellprofile invaginieren (Abb. 3.2). Diese Spinules sind in helladaptierten Netzhäuten zahlenmäßig deutlich zurückgebildet. Die BC-Spinules besitzen auf der Amakrinzellseite fokal begrenzte präsynaptische Vesikelakkumulationen (Pfeile in Abb. 3.2).

3.2. Verteilung von inhibitorischen postsynaptischen Orten in der IPL und an Mb-Bipolar-Axonterminalen in der Goldfischnetzhaut

BC-Spinules werden als Orte inhibitorischer Signalübertragung von den Amakrinzellen auf die Bipolarzellen angesehen (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996). Da Spinules transiente Strukturen der Mb-Terminale sind, stellte sich die Frage, ob sich inhibitorische Rezeptoren in ihnen nachweisen lassen und sich die Dynamik der Spinules auch auf der Rezeptorebene verfolgen läßt.

Zum einen wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch Gephyrin, ein 93 kD großes Membranprotein, erkennt. Gephyrin ist an der Verankerung und lokalen Aggregation („clustering“) von inhibitorischen Rezeptoren, wie z.B. GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren, an synaptischen Zonen der postsynaptischen Membran mit Zytoskelettproteinen (β -Tubulin) beteiligt (Kirsch und Betz 1993; Sassoè-Pognetto et al. 1995; Craig et al. 1996; Betz 1998). Erste immunhistochemische Befunde von Yazulla et al. (1991) zeigten, daß Mb-Spinules Gephyrin-IR sein können.

Andererseits wurde ein Antikörper eingesetzt, der spezifisch die Rho-Untereinheit des GABA_C-Rezeptors erkennt.

3.2.1. Fluoreszenzmikroskopische Verteilung von Gephyrin in der IPL

Die Übersichtsaufnahmen von Gefrierschnitten von hell- und dunkeladaptierten Goldfischnetzhäuten nach einer Gephyrin-PKC Doppelmarkierung zeigen ein fleckiges Gephyrin-Signal in der IPL (Abb. 3.3). Die fleckige Gephyrin-IR weist eine Laminierung auf, wobei vier Schichten mit erhöhter Immunoreaktivität besonders deutlich erkennbar sind (Pfeile in Abb. 3.3b).

Um zu zeigen, daß es sich bei diesen laminären Anhäufungen von Gephyrin-IR Flecken um Schichten und nicht um Projektionsartefakte handelt, und um weiterhin diese Schichten in ihrer relativen Lage in der IPL genauer beschreiben zu können, wurden Bildstapel, bestehend aus 8 bis 12 optischen Schnitten, in einem Abstand von 1.5 μ m in z-Richtung eingescannt und übereinander projiziert (Abb. 3.4). Durch Rotation des Bildstapels um die x-Achse ließ sich der Blickwinkel soweit verändern, daß der projizierte Bildstapel direkt „orthogonal“ betrachtet werden konnte.

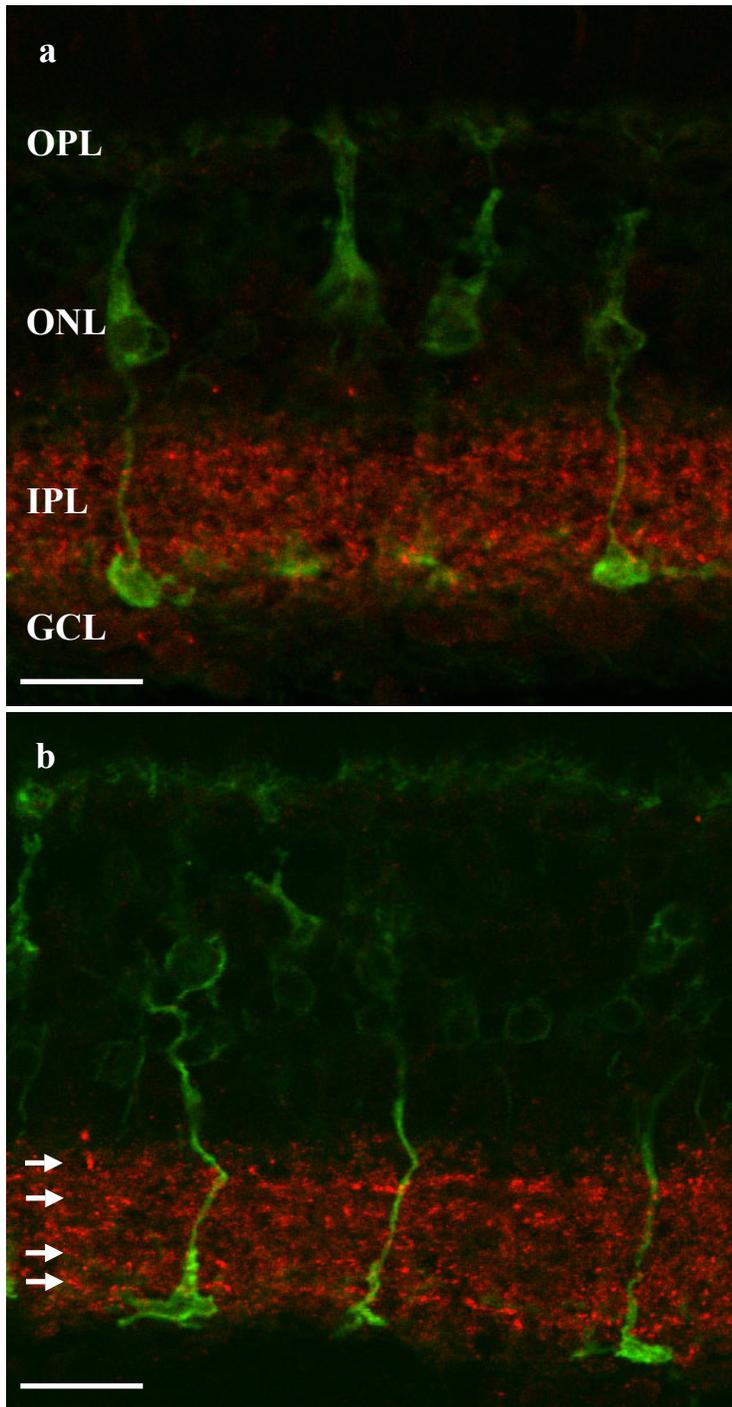


Abb. 3.3

Gefrierschnitte von hell- (a) und dunkeladaptierten (b) PKC-Gephyrin doppelmarkierten Goldfischnetzhäuten. Gephyrin: rot; PKC: grün. Die Pfeile in (b) weisen auf die horizontalen Laminierungen der Gephyrin-IR in der IPL hin. Balken: 20µm.

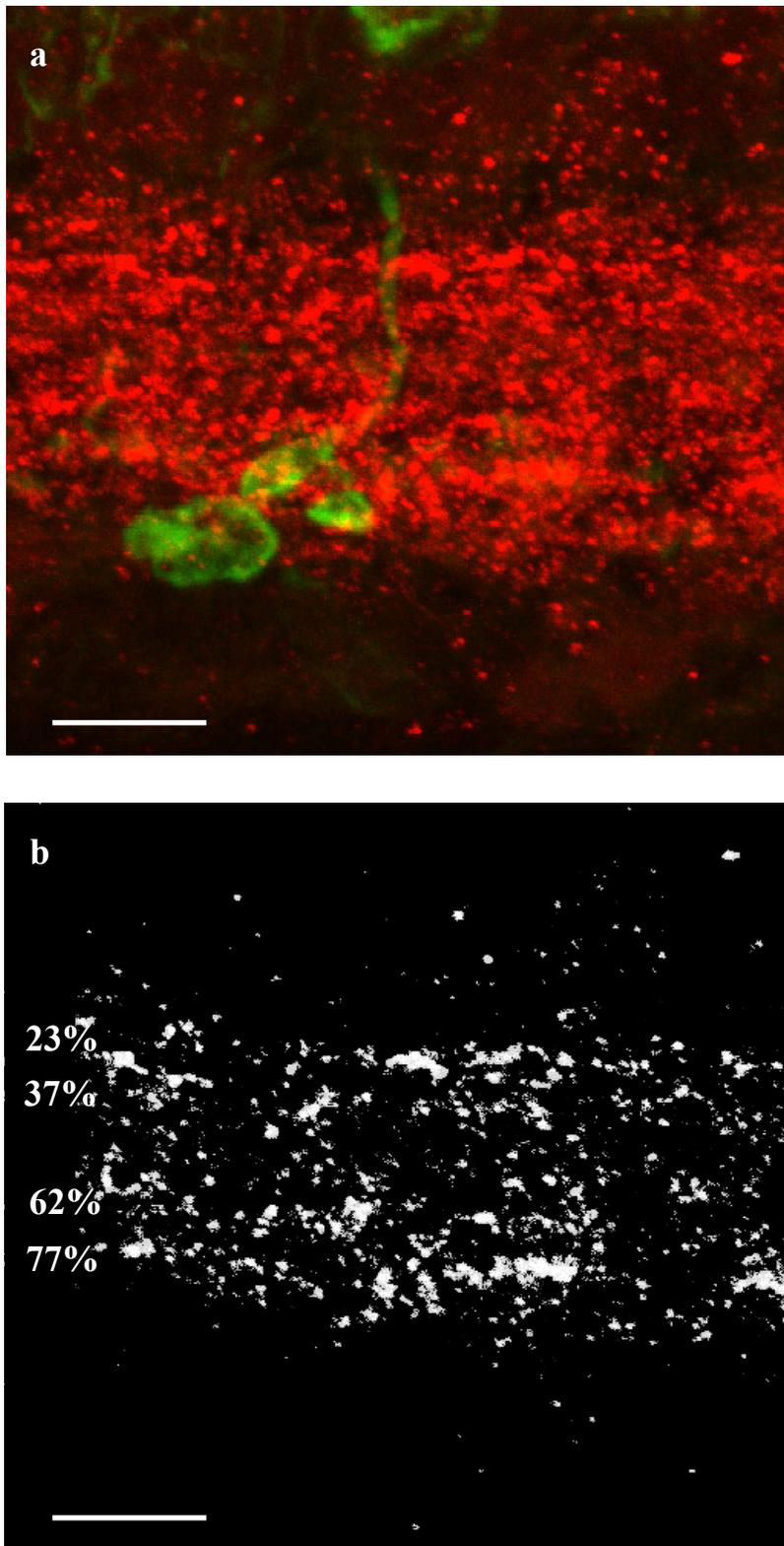


Abb. 3.4

Projektion von 12 „optischen Schnitten“ durch die IPL eines PKC-Gephyrin doppelmarkierten Gefrierschnittes (a); (b) zeigt die Gephyrin-Immunoreaktivität nach digitaler „threshold-Subtraktion“. Die Prozentangaben beziehen sich auf die relative Lage in der IPL. Balken: 10 μ m.

Hierbei tritt dann die Schichtung der Gephyrin-IR besonders deutlich hervor, ohne durch Verzerrungen einer leicht tangentialen Schnittführung überlagert zu werden. Abb. 3.4 zeigt das Ergebnis dieser digitalen Aufarbeitung, wobei Abb. 3.4b nur das Gephyrin-Signal nach digitaler threshold-Überarbeitung zeigt. Die Prozentangaben beziehen sich dabei auf die relative Lage der Gephyrin-Laminierung in der IPL. Die Grenze von INL zur IPL wird dabei als 0% definiert und die Grenze der IPL zur Ganglienzellschicht (GCL) sodann als 100% angegeben.

Die so unabhängig von der Dicke der Netzhaut vergleichbaren Gephyrin-IR Streifen liegen bei 23, 37, 62 und 77 Prozent in der IPL. Die IPL zwischen den vier Streifen erhöhter Gephyrin-IR ist nicht „immunonegativ“, sondern enthält nur weniger Gephyrin-IR Flecken.

Gephyrin-Markierungen hell- und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute weisen keine auffälligen Unterschiede in der Menge bzw. der Markierungsintensität von Gephyrin-Flecken auf (Abb. 3.3a und b). Weitergehende quantitative Auszählungen und Grauwertbestimmungen der Gephyrin-Flecken wurden nicht vorgenommen.

3.2.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Gephyrin-IR an den Mb-Terminalen

Die PKC-Gephyrin doppelmarkierten Gefrierschnitte weisen auf der Oberfläche der PKC-IR Axonterminalen Gephyrin-IR Flecken auf (Abb. 3.5). Um zu zeigen, daß diese „Gephyrin-IR Spots“ mit der Oberfläche der Terminale assoziiert sind und sich nicht etwa nur in ihrer Nähe befinden, bzw. es sich nicht um Projektionsfehler handelt, wurden orthogonale Schnitte durch Bildstapel eingescannter Terminalen gelegt (Abb. 3.6).

Die Auswertung orthogonaler Schnitte durch die Mb-Terminalen ergab, daß einzelne Gephyrin-IR Flecken tatsächlich auf der Oberfläche der Terminale verteilt sind (Abb. 3.6).

Bei der Auswertung der Doppelmarkierungen zeigte sich, daß die Gephyrin-IR Flecken an bevorzugten Orten der Mb-Terminalen vorkommen (Abb. 3.5 und 3.7): a) am Übergang des Axons in das zentrale Element der Mb-Terminalen; b) randständig um die Terminale verteilt, wobei eine deutliche Häufung in der distalen (photorezeptorwärts gewandten) Hälfte der Terminale festzustellen ist, und c) vereinzelt an den Fortsätzen der Terminalen.

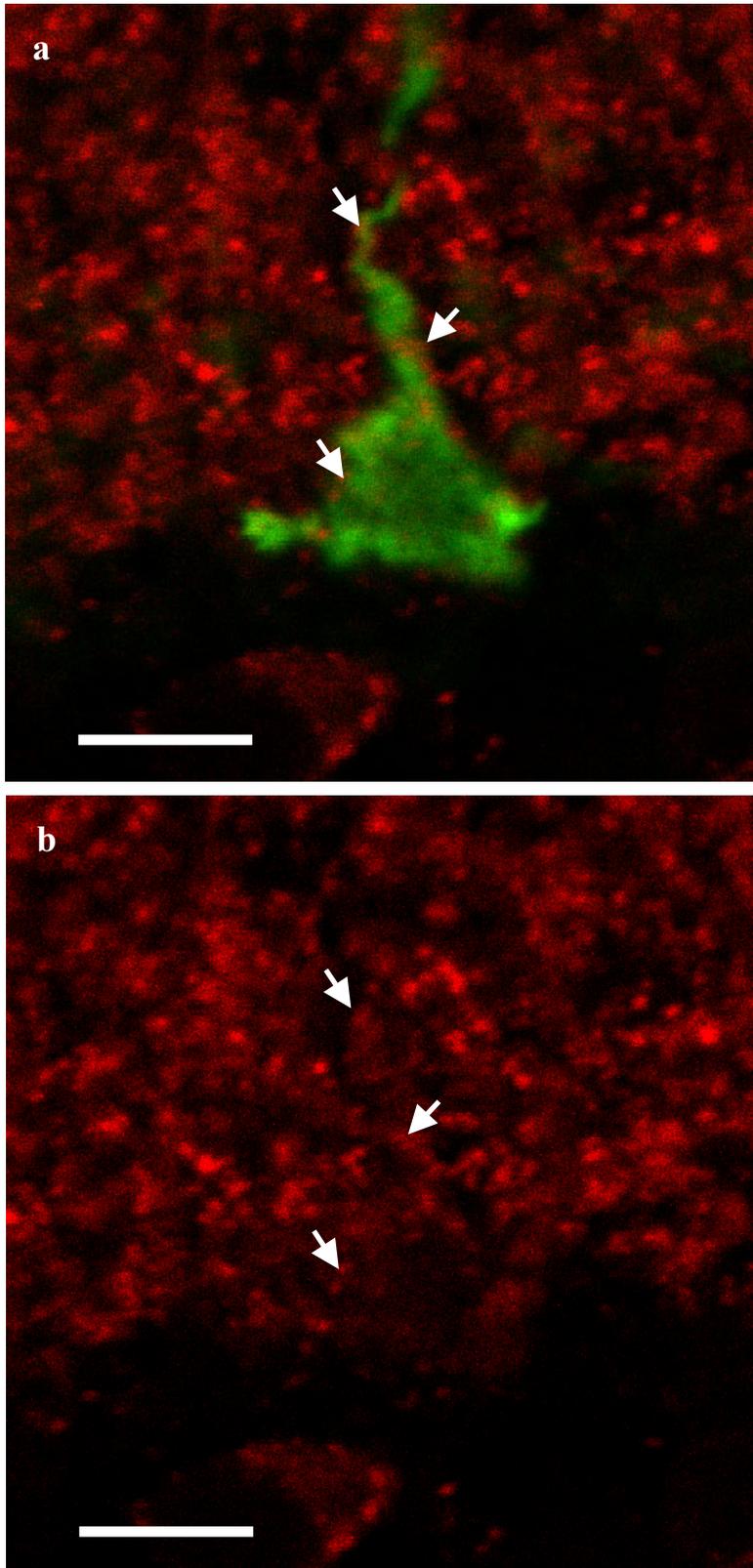


Abb. 3.5
Gephyrin-PKC doppelmarkierter Gefrierschnitt einer dunkeladaptierten Goldfischnetzhaut (a). Gephyrin: rot; PKC: grün. In (b) wird nur die Gephyrin-IR gezeigt. Die Pfeile weisen auf Gephyrin-IR Flecken auf der Oberfläche der Terminalen hin. Balken 10 μ m.

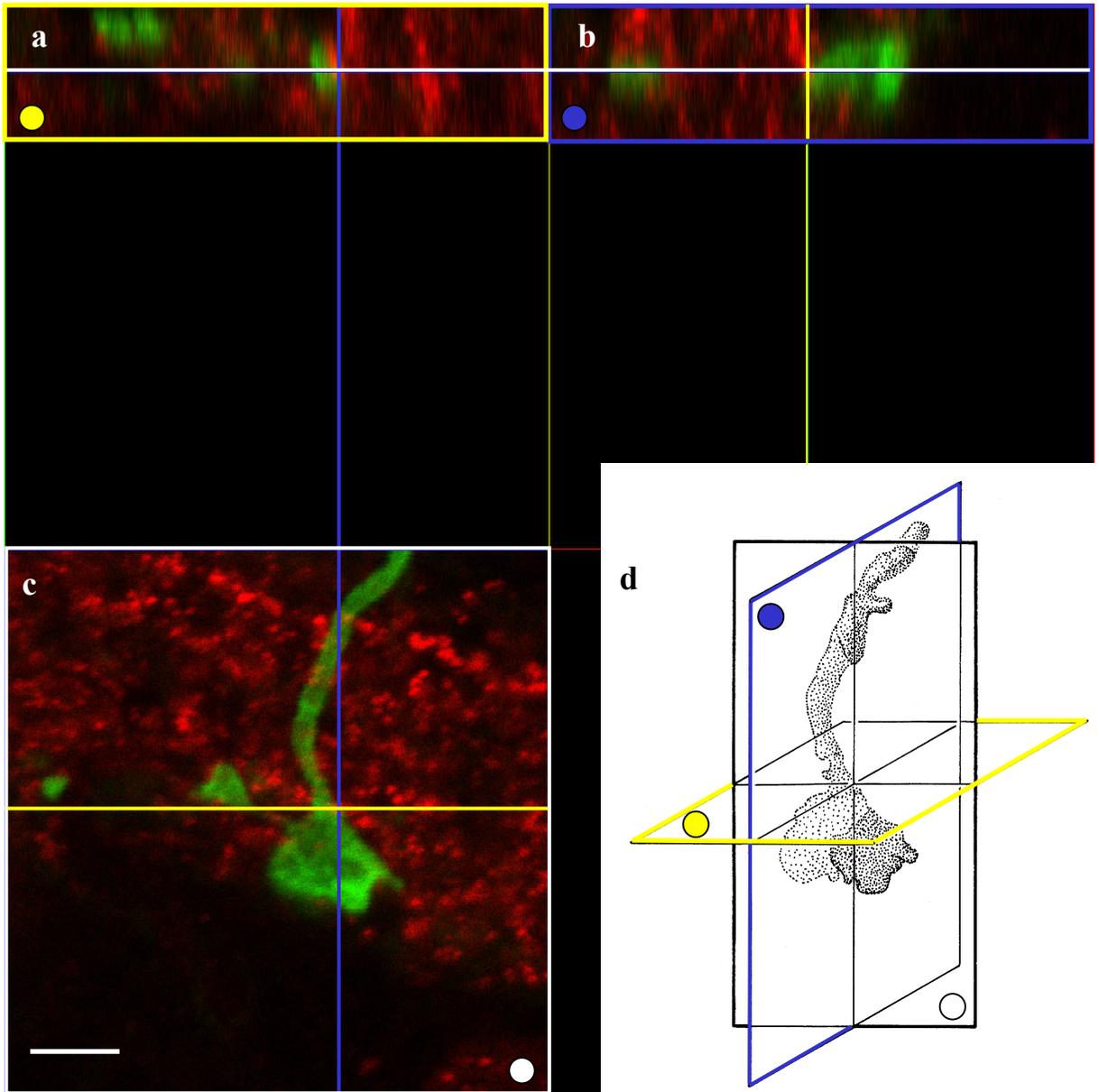


Abb. 3.6

Orthogonale Schnitte durch eine dreidimensional rekonstruierte Mb-BT. Dazu wurden Serien von 10 bis 12 Bildern in einem Abstand von $0,2 \mu\text{m}$ in z-Ebene mit dem CLSM-Softwareprogramm in ein dreidimensionales Bild umgerechnet. PKC grüner Kanal; Gephyrin roter Kanal. (a) zeigt den Blick von oben durch die gelbe Ebene in (c). (b) zeigt den Blick von rechts auf die blaue Ebene. Der gelbe Strich in (b) entspricht wieder der gelben Ebene in (c). (d) zeigt eine schematische Darstellung der Schnittführung. Die farbigen Punkte in (d) entsprechen denen in (a) bis (c). Die punktförmige Gephyrin-IR im Schnittpunkt der Ebenen befindet sich unter allen drei möglichen Blickwinkeln auf der Oberfläche der Axonterminale. Balken: $10\mu\text{m}$.

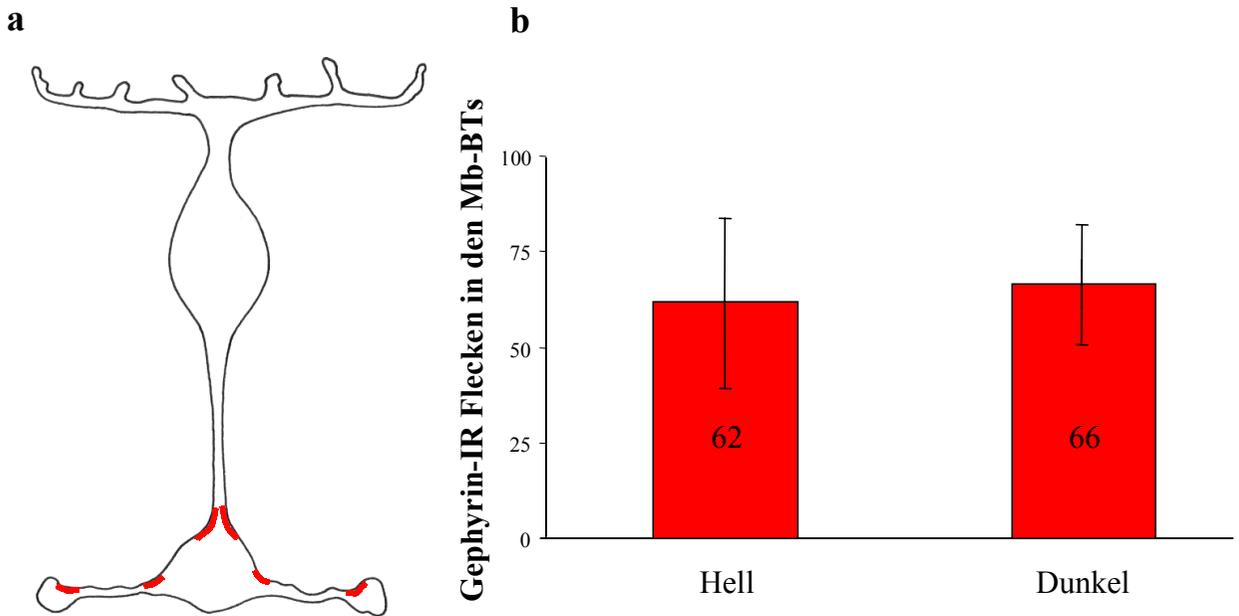


Abb. 3.7

Die Graphik zeigt eine schematisierte Mb-BC (a). Eine semi-quantitative Auswertung (mittels Serienschnitten) von jeweils 15 hell- und dunkeladaptierten Terminalen (insgesamt 6 Netzhäute) ergab eine Häufung der Gephyrin-IR Flecken im Bereich der rot markierten Zonen (a). Das Diagramm zeigt die quantitative Auszählung der Gephyrin-IR an der Axonterminale (Mittelwert \pm Standardabweichung). Der Übergang Axon in Axonterminale wurde anhand des doppelten Axondurchmessers definiert.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Spinules der Mb-Terminalen Gephyrin-IR sein können (Yazulla und Studholme 1991, 1992). Da diese Spinules im Dunkeln vorhanden sind und im Hellen verschwinden, sollte man erwarten, daß es im Dunkeln mehr Gephyrin-IR an den Mb-Terminalen gibt, unter der Voraussetzung, daß Gephyrin ein geeigneter Marker für BC-Spinules ist.

Nachfolgend wurden deshalb jeweils 15 hell- und dunkeladaptierte Mb-Terminalen aus insgesamt 6 Netzhäuten quantitativ auf Gephyrin-IR-Flecken untersucht. Diese Auswertung der Gephyrin-IR ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Es wurden alle Gephyrinflecken an der Terminale gezählt (große und kleine). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl von Gephyrin-IR-Flecken in hell- und dunkeladaptierten Mb-Terminalen gefunden werden.

3.2.3. Elektronenmikroskopische Untersuchung der Gephyrin-IR an Mb-BTs des Goldfisches

Um die gewonnenen Befunde zu präzisieren, wurde im Anschluß an die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen die Lokalisation von Gephyrin-IR an preembedding Material auf ultrastruktureller Ebene elektronenmikroskopisch untersucht.

Abb. 3.8 zeigt eine Montage von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der IPL, auf der sowohl die Innere Körnerschicht als auch die Ganglienzellen mit ihren Axonen zu erkennen sind. Gephyrin-IR ist in dieser Abbildung als fleckiges, dunkles DAB-Reaktionsprodukt in der IPL zu erkennen (Pfeile in Abb. 3.8). Die Übersichtsaufnahme läßt eine Laminierung der Gephyrin-IR-Flecken eher schwer erkennen, bestätigt aber im wesentlichen die fleckige Verteilung der Gephyrin-IR, wie sie in den lichtmikroskopischen Präparaten beobachtet wurde (siehe Abb. 3.3).

Nachfolgend sollen einige Beispiele für Gephyrin-IR in der IPL angeführt werden. Abb. 3.9 zeigt Gephyrin-IR Synapsen. In Abb. 3.9a ist das DAB-Reaktionsprodukt auf der Seite der Postsynapse fokal begrenzt (Pfeil). Eine präsynaptische Vesikelakkumulation ist nur undeutlich zu erkennen (Stern in Abb. 3.9a). Abb. 3.9b zeigt zwei Gephyrin-IR Postsynapsen, die durch eine fingerartige Ausstülpung der Präsynapse voneinander getrennt sind.

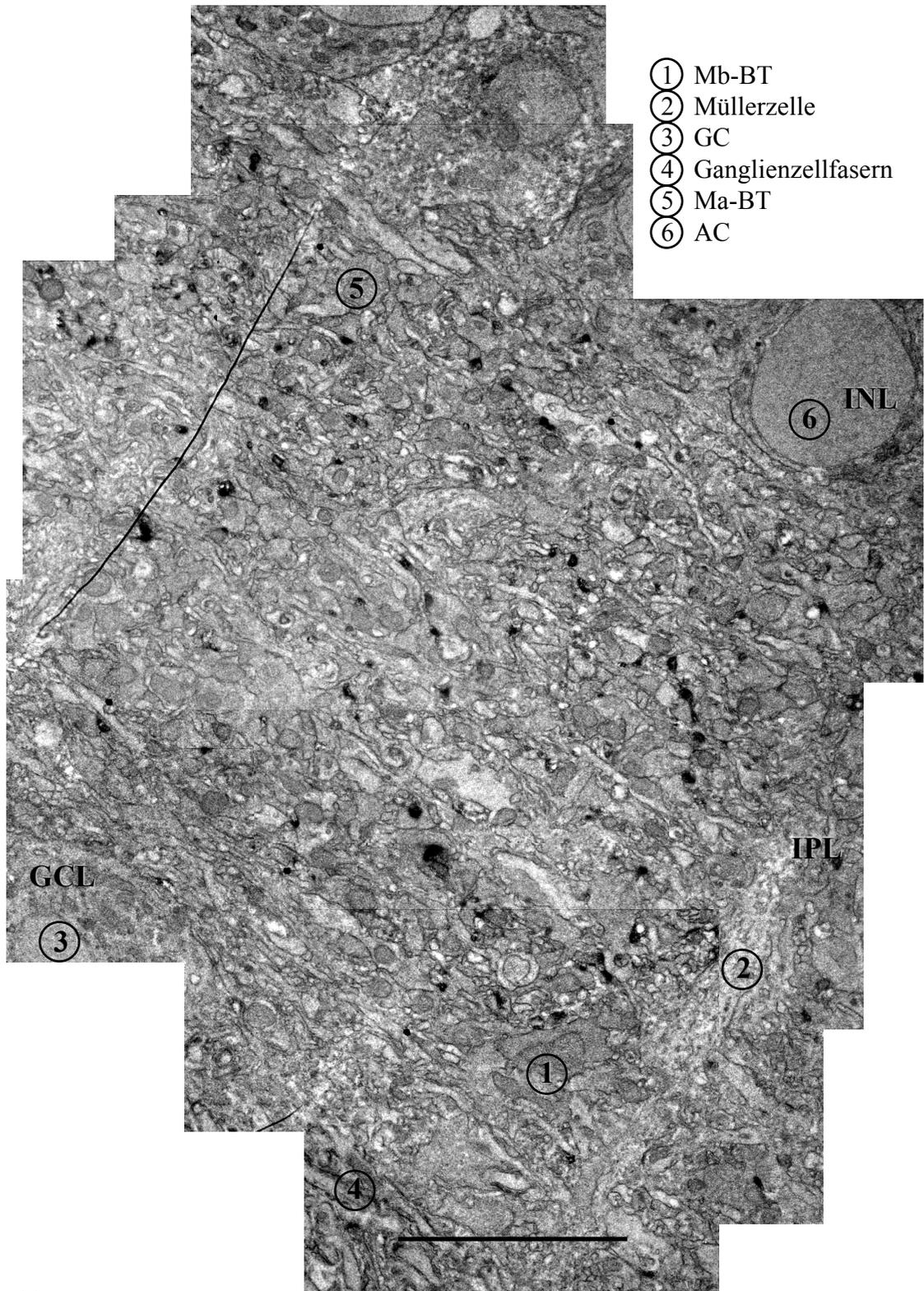


Abb. 3.8

Gephyrin-preembedding-Immunhistochemie. Die Montage von elektronenmikroskopischen Einzelbildern der Goldfisch-IPL zeigt ein fleckiges DAB-Reaktionsprodukt. Die Nummern in der Abbildung weisen auf identifizierte Strukturen hin. Balken: 10µm.

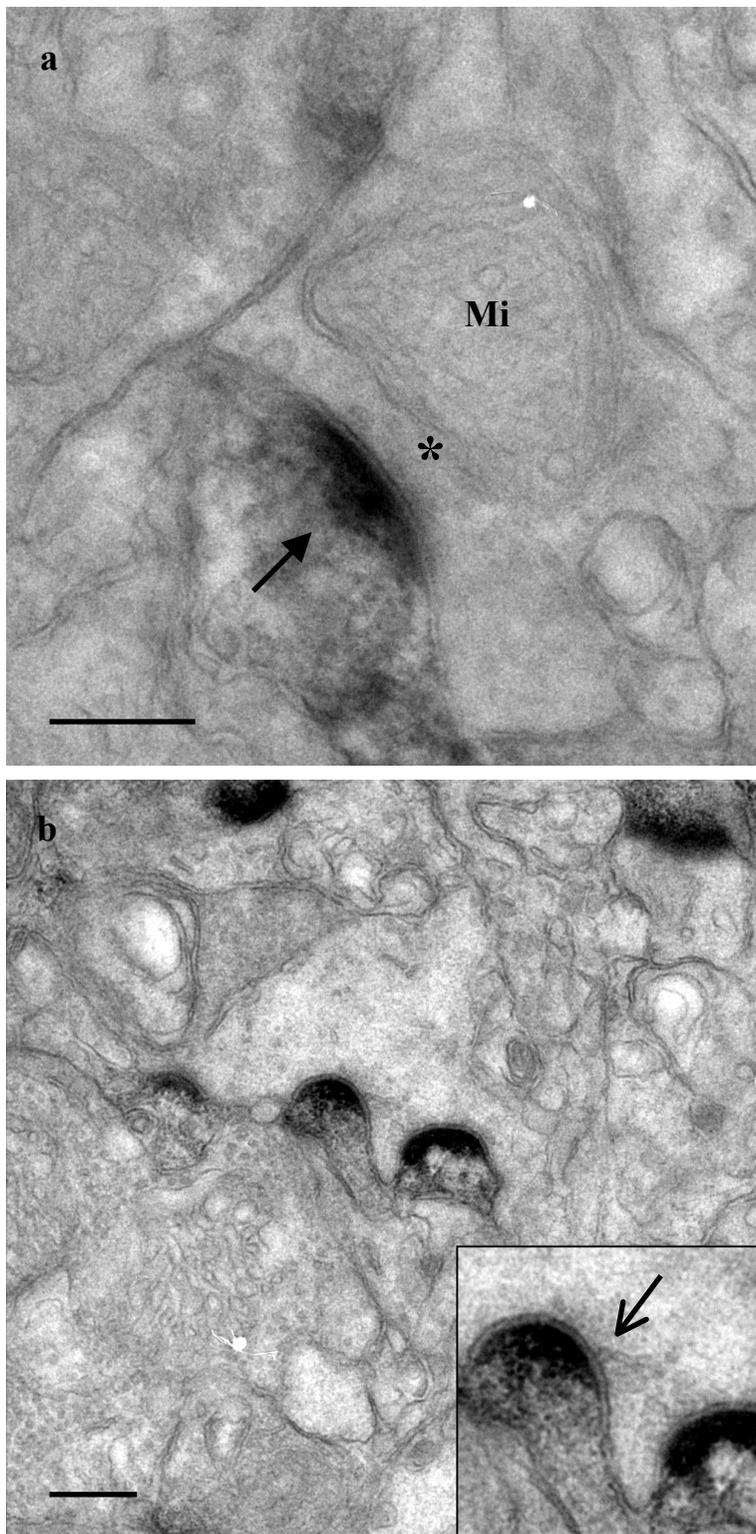


Abb. 3.9

(a) und (b) zeigen Gephyrin-IR Postsynapsen, visualisiert durch DAB-Reaktion (Pfeil in a). Die Synapse in (b) ist dabei durch eine fingerartige Ausstülpung (Spinule) durchbohrt. Man beachte auch die longitudinalen Strukturen innerhalb des Spinules und die Omegastruktur (Pfeil in b).

Die Identität der prä- und postsynaptischen Partner ist unklar. Mi = Mitochondrium.
Balken: 0.5 μ m.

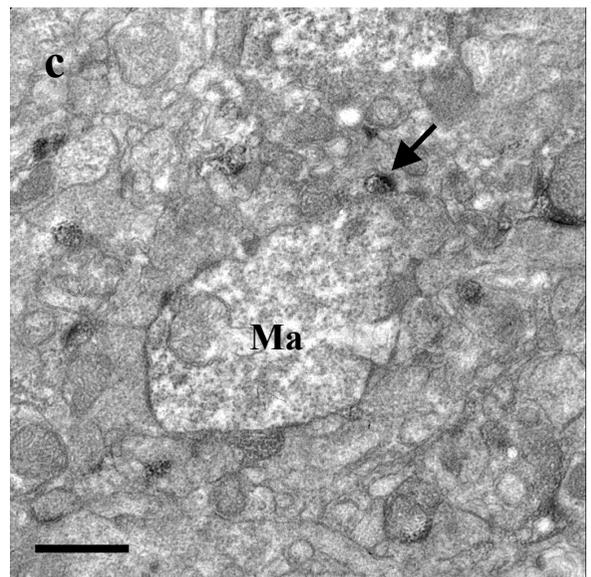
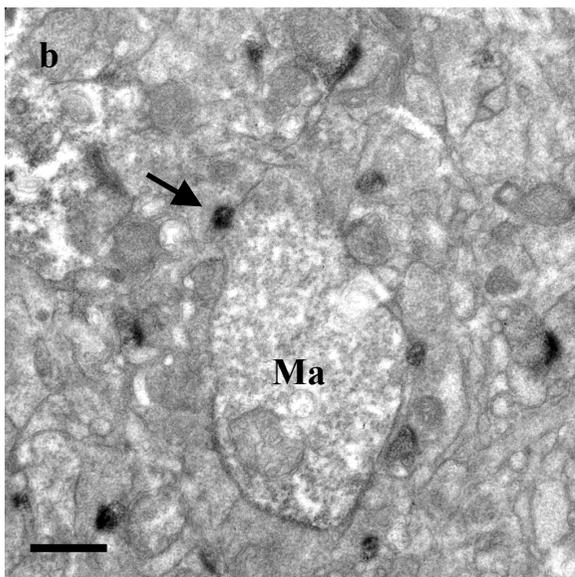
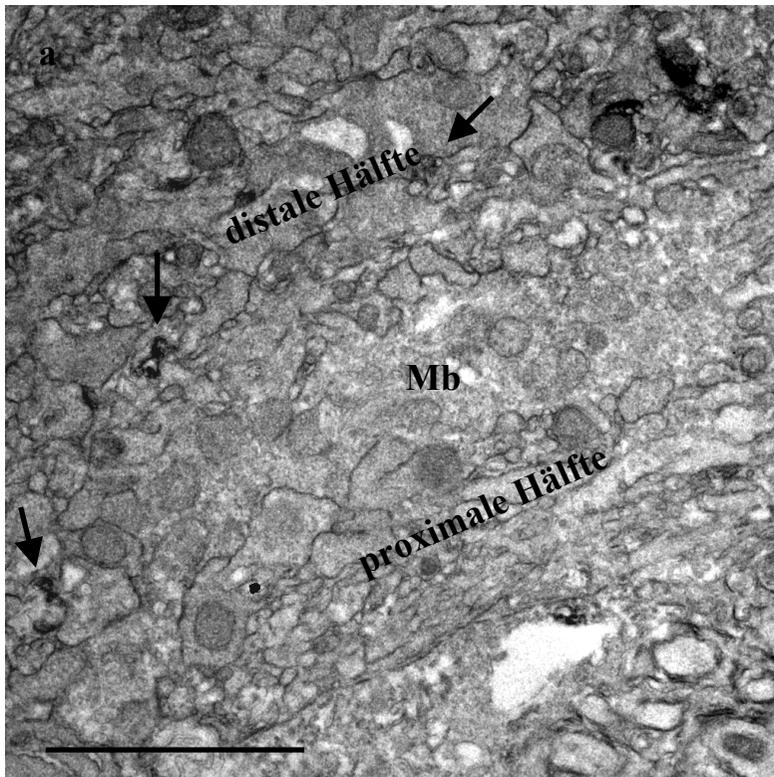


Abb. 3.10

Gephyrin-IR preembedding Elektronenmikroskopie. (a) Anschnitt einer Gephyrin-IR Mb-BT. Die Gephyrin-IR (Pfeile) findet sich ausschließlich auf der distalen Seite der Terminale. (b) und (c) Ma-BTs mit Gephyrin-IR Spinules (Pfeile). Balken (a): 5 μ m; in (b) und (c) 1 μ m.

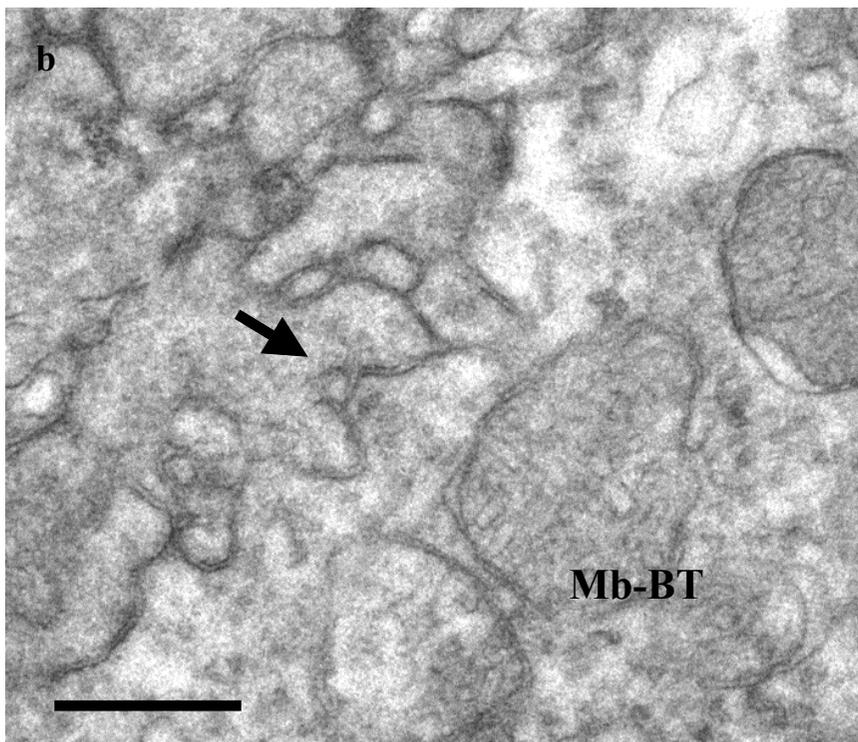
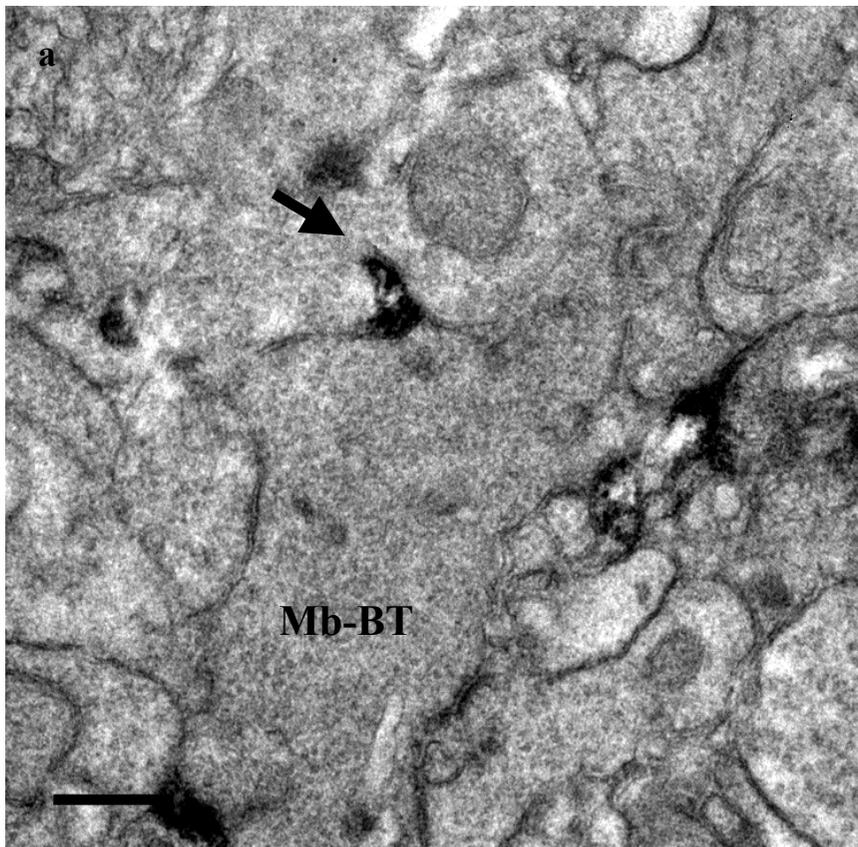


Abb. 3.11
(a) und (b) zeigen Anschnitte von Mb-BTs. Die Pfeile weisen auf Spinules hin. Nur der Spinule in (a) ist Gephyrin-IR. Balken: 1 μ m.

Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man wenige Vesikel auf der präsynaptischen Seite (Pfeil in 3.9b). Gephyrin-markiert sind in beiden Fällen nicht Bipolarterminalen, sondern Amakrin-Zellfortsätze, die durch eine Anhäufung von synaptischen Vesikeln und Mitochondrien charakterisiert sind.

Gephyrin-IR ist auch an Mb-Terminalen zu finden. Abb. 3.10a zeigt eine Mb-Terminalen mit DAB-Reaktionsprodukt. Auf Grund der schwachen Fixierung und der langen Inkubationsdauer ist die Gewebserhaltung nicht sehr gut. DAB-Reaktionsprodukt ist am oberen Rand (der photorezeptorwärts gerichteten Seite) der Terminalen zu erkennen (Pfeile in Abb. 3.10a). Die Untersuchung von 45 Gephyrin-markierten Mb-Terminalen zeigte, daß das DAB-Reaktionsprodukt immer am distalen Umfang der Terminalen lokalisiert ist, während am proximalen Umfang der Terminalen (der den Ganglienzellen zugekehrten Seite) niemals Gephyrin-IR DAB-Produkt beobachtet wurde.

Neben den Mb-Terminalen waren auch Ma-Terminalen Gephyrin-IR. Abb. 3.10 zeigt zwei Ma-Axonterminalen in der IPL. Die Gephyrin-IR befindet sich in Spinules (Pfeile in Abb. 3.10b und c), welche bei Ma-Terminalen bevorzugt im Hellen zu finden sind. Eine genauere, quantifizierbare Bestimmung der Anzahl und Verteilung der Gephyrin-IR Spinules der Ma-Bipolarterminalen steht noch aus.

Spinules von Mb-Terminalen enthalten z.T. auch Gephyrin-IR. In Abb. 3.11a ist ein Beispiel eines Gephyrin-IR-Spinules aufgeführt. Das Reaktionsprodukt ist nur auf den Spinule beschränkt und grenzt sich deutlich vom restlichen Zytoplasma der Terminalen ab. Neben Gephyrin-markierten Spinules waren in den Präparaten auch immer gleichzeitig nicht-markierte Spinules auszumachen (Abb. 3.11b). Um sicher zu sein, daß es sich hierbei nicht um falsch-negative Beobachtungen handelt, die sich auf Grund von Penetrationsproblemen der Antikörper ergeben haben könnten (Larsson 1988), wurden nur Netzhautstreifen verwendet, bei denen das Reaktionsprodukt, wie in Übersichtsabbildung 3.8 gezeigt, in der gesamten IPL verteilt vorkam.

Die Untersuchung von einzelnen Ultradünnschnitten von 45 Mb-Terminalen aus 8 verschiedenen dunkeladaptierten Netzhäuten ergab, daß zum einen nur ein Teil der Spinules (ca. 30%) Gephyrin-IR ist (siehe Abb. 3.12). Der weitaus größere Teil (70%) zeigt keine

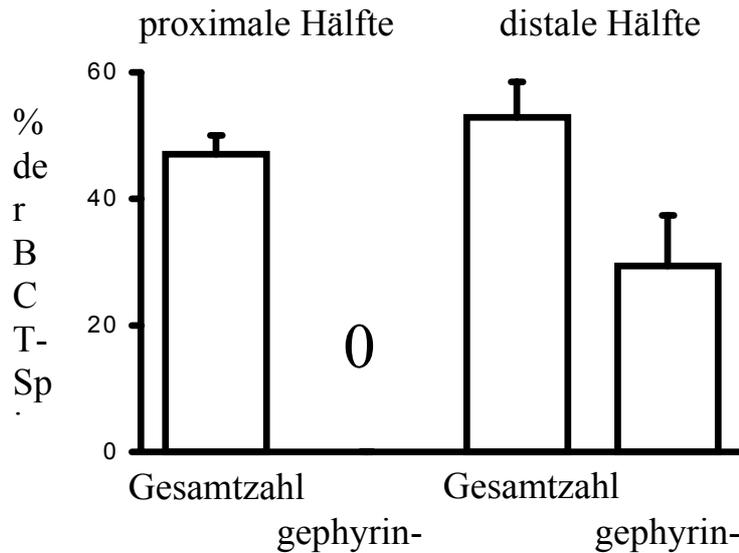


Abb. 3.12

Tabelle der elektronenmikroskopischen Auswertung der Gephyrin-IR-Spinules. Nur Spinules in der distalen Hälfte waren immunoreaktiv.

Gephyrin-IR in den Spinules (siehe auch Yazulla et al. 1992). Zum anderen sind die Gephyrin-IR Spinules immer auf der distalen Hälfte der Terminalen lokalisiert. Statistisch signifikante Unterschiede in der Anzahl von Spinules zwischen der proximalen und der distalen Hälfte der Terminalen wurden nicht beobachtet.

3.2.4. Licht- und elektronenmikroskopische Darstellung der Gephyrin-IR in der ONL der Goldfischnetzhaut

Bei der Durchmusterung der fleckigen Gephyrin-IR in der IPL fand sich darüber hinaus ein zusätzlich radiäres, streifenartiges Signal von Gephyrin-IR in der ONL (Abb. 3.13a). Um zu klären, welche Strukturen hierbei in der ONL markiert werden, wurden einige elektronenmikroskopische Aufnahmen der ONL bei geringer Vergrößerung zu einer Montage zusammengefügt (Abb. 3.13b). DAB-Reaktionsprodukt ist im Zytoplasma von zwei Zapfen zu erkennen (Pfeile in Abb. 3.13b). Die Zapfenfüße sind nur sehr schwach markiert, während das Reaktionsprodukt knapp unterhalb des Zellkerns stärker akkumuliert. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man granuläres DAB-Reaktionsprodukt zwischen filamentartigen Strukturen im Zytoplasma (Abb. 3.14).

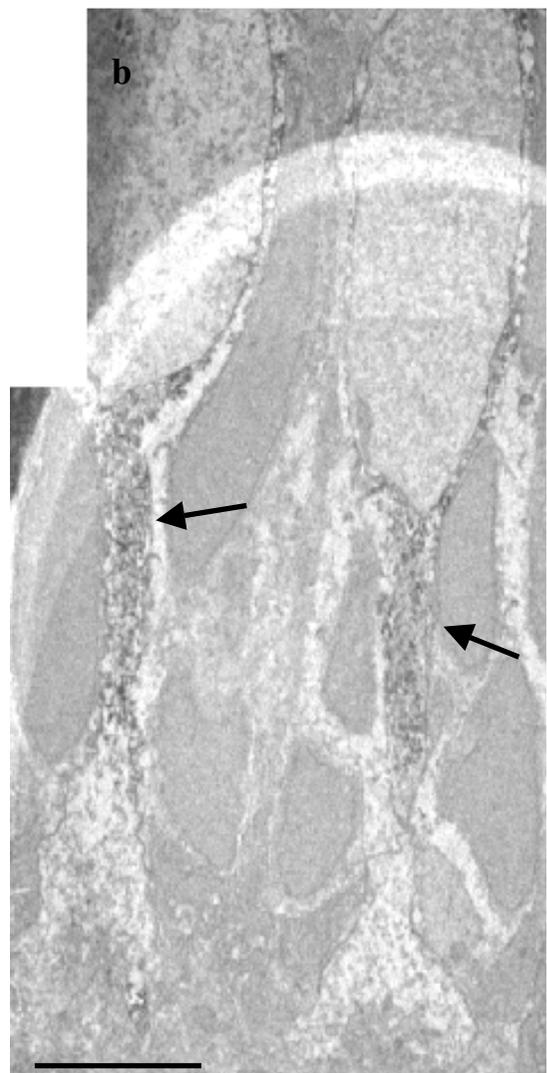
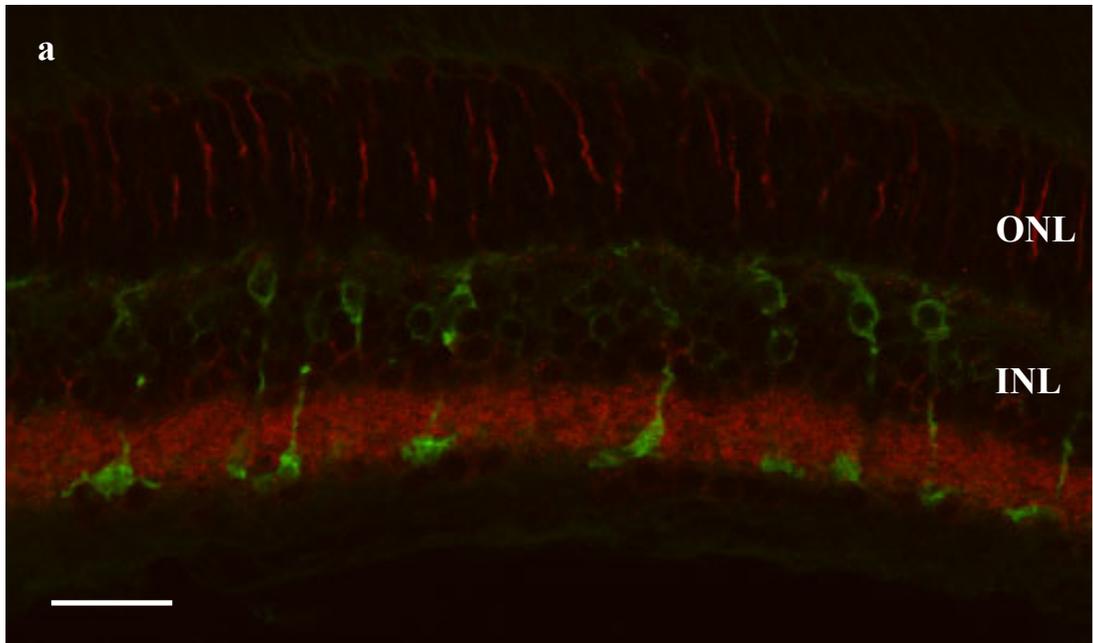


Abb. 3.13
 Gephyrin-IR in der äußeren Goldfischnetzhaut. In (a) Gephyrin-PKC-Doppelmarkierung. Die Gephyrin-IR in der ONL reicht bis an die Äußere Grenzmembran heran. (b) zeigt eine Montage von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der äußeren Netzhaut. Die Pfeile weisen auf die Gephyrin-IR hin. Balken in (a) 25 μ m; in (b) 5 μ m.

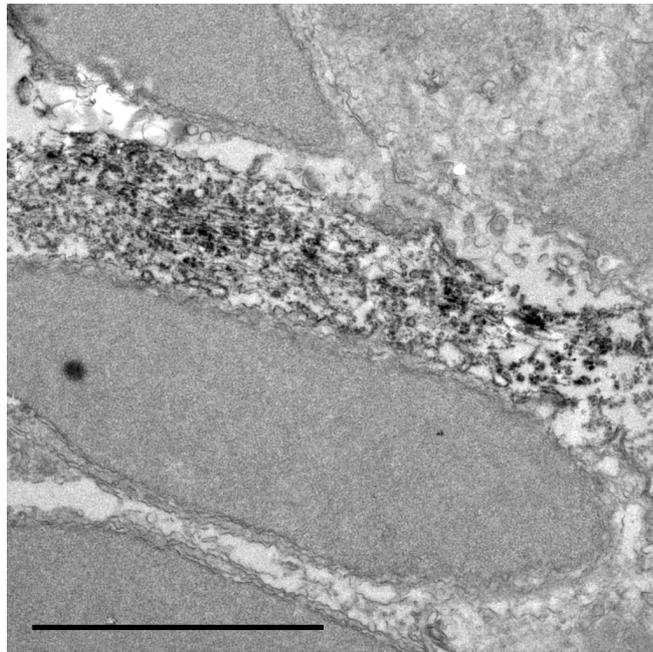


Abb. 3.14

Gephyrin-IR in der ONL der Goldfischnetzhaue. Das zytoplasmatische DAB-Reaktionsprodukt findet sich zwischen filamentartigen Strukturen. Balken: 5µm.

3.2.5. GABA_C-Rezeptoren in der IPL und an Mb-BC der Goldfischnetzhaue

Um die Verteilung inhibitorischer Rezeptoren in der Goldfischnetzhaue genauer darzustellen, wurde als Vertreter der langsamen feinmodulierenden Rezeptorklasse ein Antikörper, der gegen die Rho-Untereinheit des GABA_C-Rezeptors gerichtet ist, verwendet (Enz et al. 1996; Koulen et al. 1997 und 1998). Auf der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme eines 15µm dicken Gefrierschnittes erkennt man punktförmige Immunofluoreszenz in der IPL (Abb. 3.15a). Die GABA_C-IR Flecken zeigen eine Laminierung (15, 38, 70 und 93% IPL).

Die proximale Hälfte der IPL weist mehr GABA_C-IR Flecken auf als die distale Hälfte. Im proximalen Bereich der IPL erkennt man eine „glocken-“ und „korbförmige“ Ansammlung von GABA_C-IR Flecken (Pfeile in Abb. 3.15a und b). Daß diese GABA_C-IR Flecken die Oberfläche von Mb-Terminals umgeben, zeigt die immunhistochemische Doppelmarkierung mit PKC (Abb. 3.15b). Die mit Pfeilen markierten Axonterminalen weisen eine Häufung der GABA_C-Rezeptoren auf der den Ganglienzellen zugewandten Hälfte der Terminalen auf. Die GABA_C-IR Flecken sind auch an den lateral von den zentralen Elementen der Terminalen abgehenden Fortsätzen vorhanden (Pfeilkopf in Abb. 3.15b).

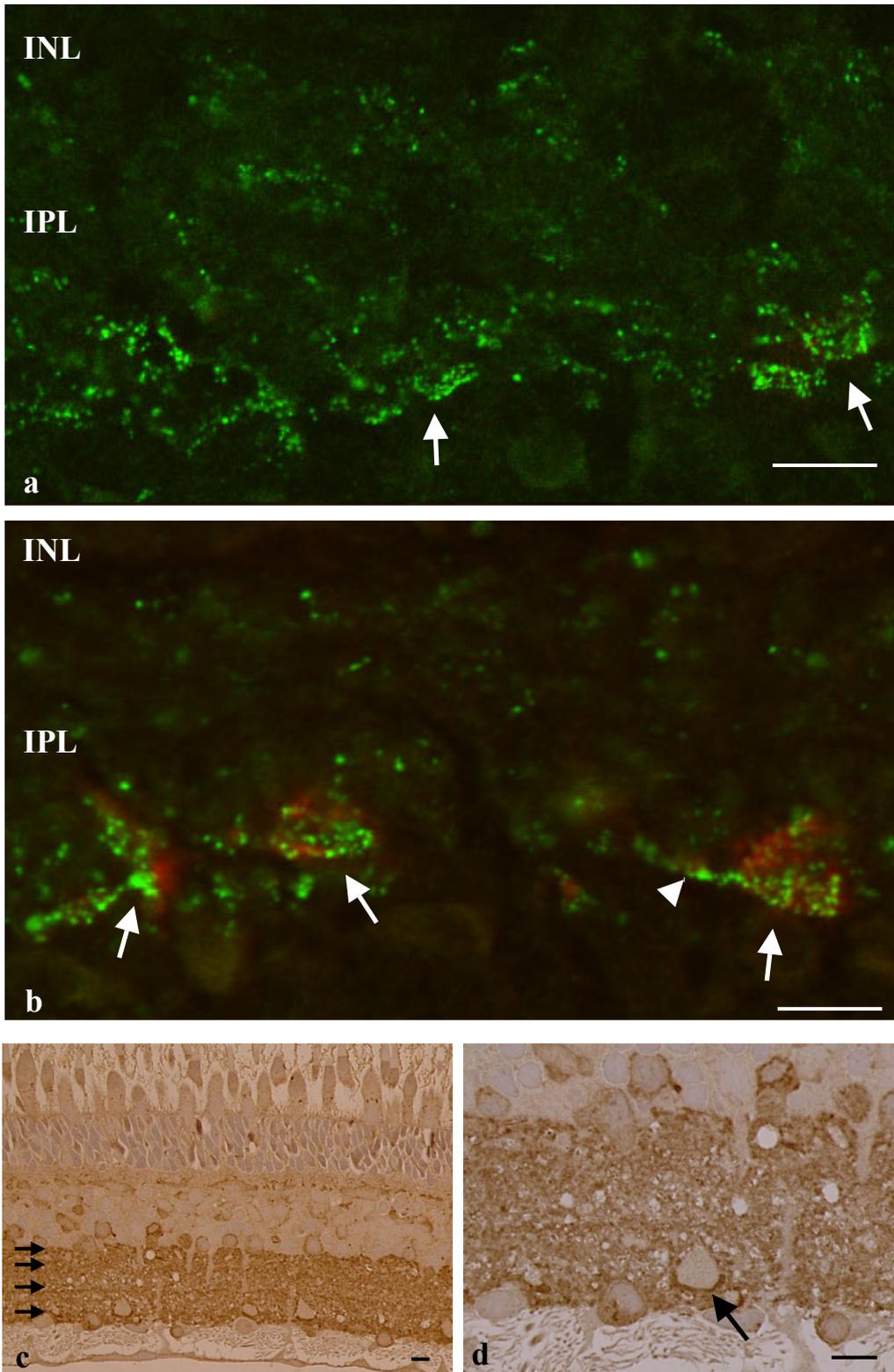


Abb. 3.15

(a) zeigt eine immunhistochemische Darstellung der GABA_C-Rezeptoren in der IPL der Goldfischnetzhaue. (b) zeigt eine PKC-GABA_C-Doppelmarkierung. GABA_C: grün; PKC: rot. (c) und (d) zeigen den endogenen Liganden GABA immunhistochemisch dargestellt am Semidünnschnitt. Die Pfeile in (c) weisen auf eine Laminierung der GABA-IR, der Pfeil in (d) auf eine Mb-BT mit GABA-IR Boutons hin. Balken: 10µm.

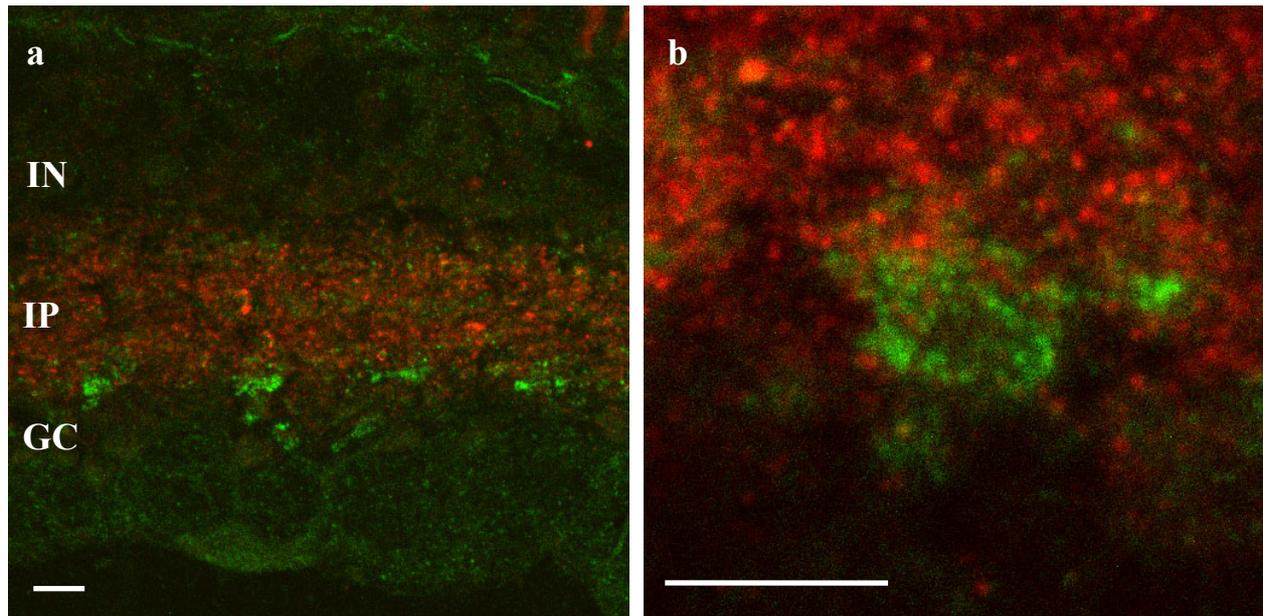


Abb. 3.16

Immunhistochemische Doppelmarkierung von GABA_C-Rezeptoren und Gephyrin. GABA_C-IR: grün; Gephyrin-IR: rot. Der Balken entspricht 10µm.

Der besseren Anschauung wegen wurde auch eine immunhistochemische GABA-Markierung am Semidünnschnitt mit aufgenommen (Abb. 3.15c und d). Die GABA-IR in der IPL zeigt –schwach sichtbar- eine Laminierung (Pfeile Abb. 3.15c). GABA-IR Boutons sind besonders deutlich an der proximalen, den Ganglienzellen zugewandten Seite der Terminalen zu erkennen (Pfeil in Abb. 3.15d).¹

3.2.6 Ist Gephyrin an der Verankerung von GABA_C-Rezeptoren beteiligt?

Da bekannt ist, daß Glyzin- und GABA_A-Rezeptoren durch Gephyrin auf der postsynaptischen Seite aggregiert und zusammengehalten werden (Kirsch und Betz 1993; Meyer et al. 1995; Sassoè-Pognetto et al. 1995; Craig et al. 1996; Betz 1998), wurde die Hypothese untersucht, ob Gephyrin auch an der Verankerung von GABA_C-Rezeptoren beteiligt ist. Hierzu wurden fluoreszenzmikroskopische Doppelmarkierungen durchgeführt.

¹ Zur GABA-Immunhistochemie in Fischnetzhäuten s.a. Marc et al. 1978; Yazulla 1986; Wagner 1990

Abb. 3.16 zeigt eine Übersichtsaufnahme und eine Detailaufnahme nach Doppelmarkierung. Eine Kolokalisation von Gephyrin-IR und GABA_C-IR wurde nicht beobachtet.

3.3. Immunhistochemische Darstellung des präsynaptischen Markers SNAP-25

SNAP-25 ist ein Protein, das am molekularen „Docking- und Fusionprozeß“ synaptischer Vesikel in der Präsynapse beteiligt ist (Kandel et al. 2000). Im folgenden soll der Frage nachgegangen werden, ob Hell- und Dunkeladaptation einen Einfluß auf die SNAP-25-IR hat. Dazu werden zuerst die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse in der IPL und OPL der Goldfischnetzhaute dargestellt. Danach sollen die elektronenmikroskopische Befunde in der OPL vorgestellt werden.

3.3.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der adaptionsabhängigen Plastizität von SNAP-25 in der IPL und OPL

Die fluoreszenzmikroskopischen Übersichtsaufnahmen von Gefrierschnitten einer Doppelmarkierung von SNAP-25 und PKC (Abb. 3.17) zeigen SNAP-25-IR in der IPL und in der OPL. Die SNAP-25-IR findet sich dabei annähernd gleichmäßig in der gesamten IPL. Unterschiede hinsichtlich der Verteilung und Fluoreszenzintensität der SNAP-25-IR in den beiden Sublaminae (a bzw. b) der IPL sind nicht zu beobachten.

Der Gefrierschnitt einer helladaptierten Netzhaut zeigt ein eher „fleckiges“ bzw. „aggregiertes“ SNAP-25-IR-Signal in der IPL, während das SNAP-25-IR-Signal in der dunkeladaptierten Netzhaut eher „streifig“ bzw. „verschmiert“ aussieht.

Die Pfeile in Abb. 3.17a und b weisen auf einen Streifen geringerer SNAP-25-IR zwischen der Sublamina „a“ und „b“ der IPL von dunkeladaptierten Netzhäuten hin. Dieser Streifen ist in den Präparaten helladaptierter Netzhäute weniger deutlich ausgeprägt.

In den Terminalen der Mb-Bipolarzellen findet sich ebenfalls SNAP-25-IR. Die Übersichtsaufnahmen hell- und dunkeladaptierter Netzhäute zeigen eine Kolokalisation von SNAP-25-IR (rot) und PKC-IR (grün), welche durch gelbe Immunofluoreszenz dargestellt wird (offene Pfeile in Abb. 3.17a und b). In Gefrierschnitten dunkeladaptierter Netzhäute sind diese subplasmatischen Zonen überlappender Fluoreszenzsignale deutlicher ausgeprägt (Abb. 3.17b) und zeigen sich als „gelbe patches“.

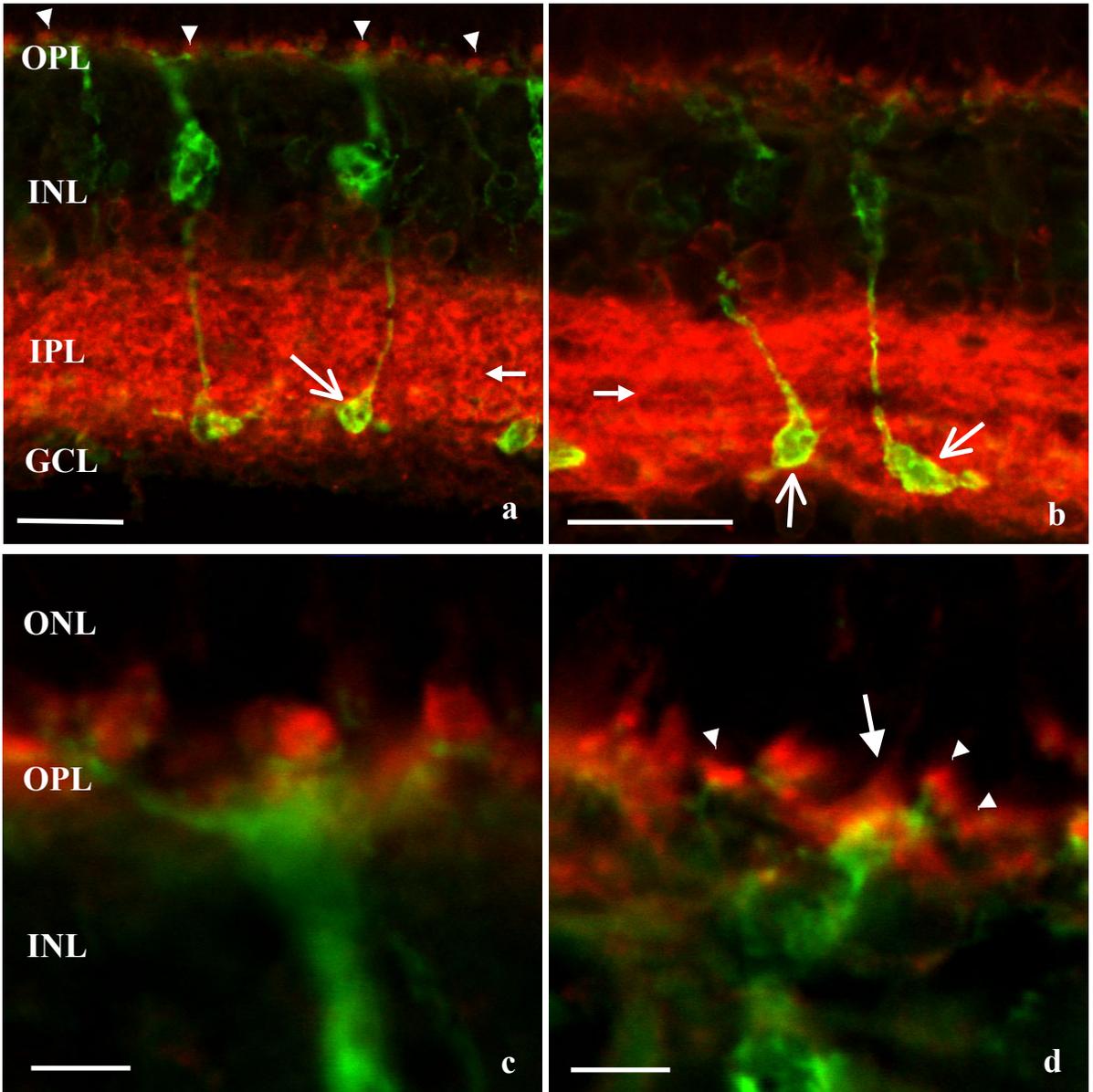


Abb. 3.17

(a) und (c) hell adaptierte SNAP-25-PKC doppelmarkierte Gefrierschnitte. (b) und (d) dunkel adaptiert. PKC-IR: grün; SNAP-25-IR: rot. (c) und (d) Ausschnittsvergrößerungen der OPL von (a) und (b). Die horizontalen Pfeile in (a) und (b) weisen auf die Zone geringerer Immunoreaktivität zwischen den beiden Sublaminae hin. Die Pfeilköpfe in (a) markieren aggregierte SNAP-25-IR in Photorezeptorterminalen. Die offenen Pfeile in (a) und (b) zeigen die Zonen übereinstimmender Immunoreaktivität („gelbe patches“) von SNAP-25 und PKC. Der Pfeil in (d) ist auf eine „Zapfen-Terminale“ gerichtet, die Pfeilköpfe auf „Stäbchen-Terminale“.

Der Balken entspricht in (a) und (b) 30 μ m; in (c) und (d) 5 μ m.

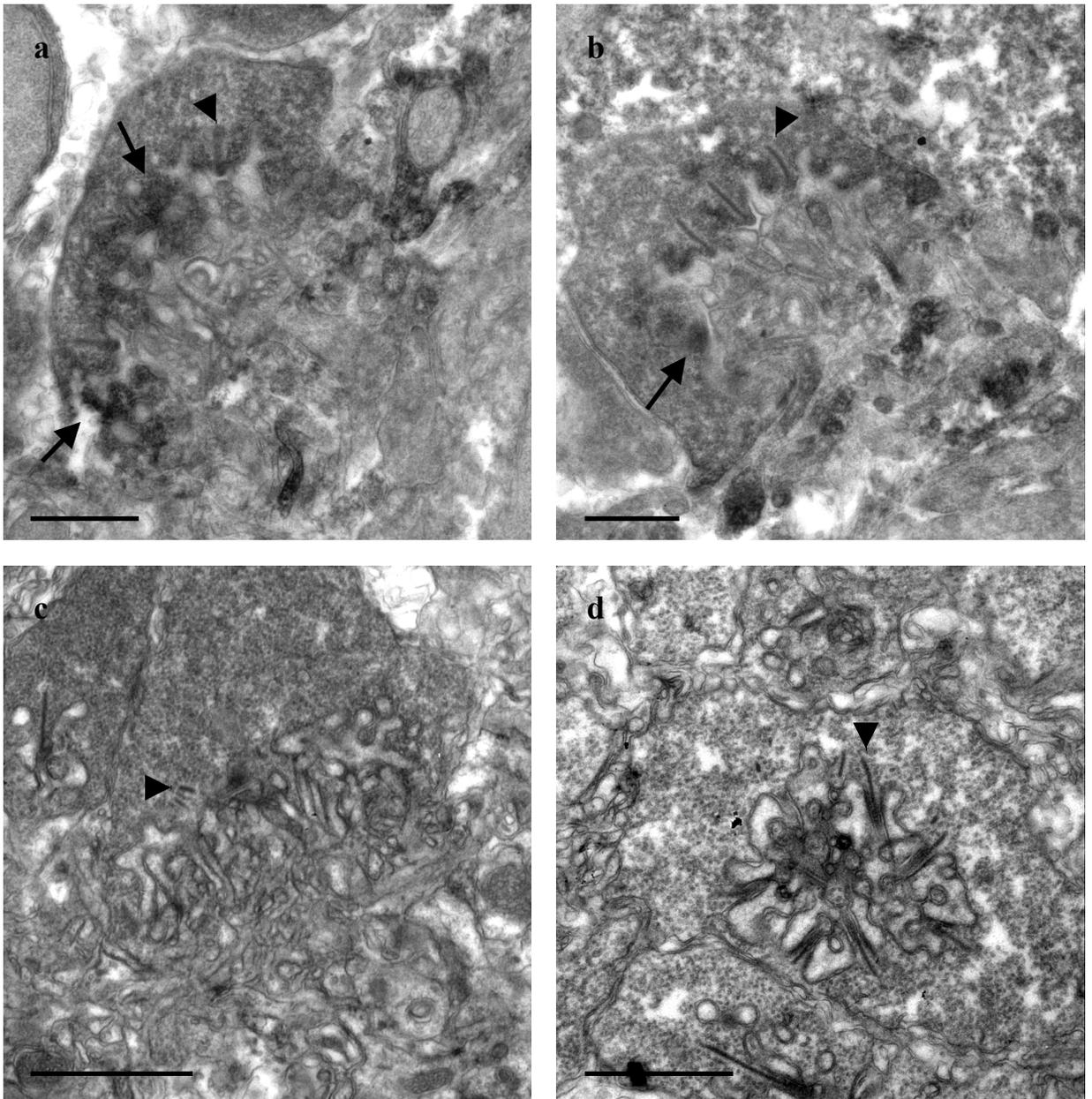


Abb. 3.18

Elektronenmikroskopische Darstellung der SNAP-25-Immunoreaktivität in der OPL der Goldfischnetzhaat. (a) und (b) zeigen helladaptierte Zapfenterminalen mit einer Aggregation des DAB-Reaktionsprodukts (Pfeile) im Bereich der Ribbons (Pfeilköpfe). Die dunkeladaptierten Zapfenterminalen in (c) und (d) zeigen diese Aggregation nicht. Balken 1 μ m.

SNAP-25-IR ist auch in der OPL vorhanden. In Gefrierschnitten dunkeladaptierter Netzhäute ist SNAP-25-IR in „glockenförmigen“ Strukturen „diffus“ in der OPL vorhanden (Abb. 3.17d, Pfeil). Dendriten von PKC-IR Mb-Bipolarzellen ziehen in größere und kleinere SNAP-25-IR Strukturen in der OPL (Abb. 3.17d, Pfeil, Pfeilköpfe). Bei den größeren „glockenförmigen“ Strukturen handelt es sich um Zapfenfüße, während SNAP-25-IR Stäbchenterminalen (Pfeilköpfe) etwas distal hierzu versetzt liegen.

In Gefrierschnitten helladaptierter Netzhäute unterscheidet sich die SNAP-25-IR in der OPL von der dunkeladaptierter Netzhäute. Das Fluoreszenzsignal für SNAP-25 sieht eher „kugelförmig“ und „aggregiert“ aus (Abb. 3.17a und c, Pfeilköpfe). In diese SNAP-25-IR „Kugeln“ ziehen ebenfalls Dendriten von PKC-IR Mb-Bipolarzellen (Abb. 3.17c).

3.3.2. Elektronenmikroskopie der SNAP-25-IR in der OPL der Goldfischnetzhaut

Um die Befunde in der OPL zu verifizieren, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von hell- und dunkeladaptierten Netzhäuten gemacht. Abb. 3.18 zeigt jeweils zwei hell- und dunkeladaptierte SNAP-25-IR Zapfenterminalen in der Goldfischnetzhaut.

Man kann sowohl in den Stäbchen- als auch in den Zapfenterminalen SNAP-25-IR DAB-Reaktionsprodukt erkennen. Abb. 3.18c zeigt dies exemplarisch an einer dunkeladaptierten Netzhaut (helladaptierte Stäbchen waren ebenfalls SNAP-25-IR / Daten nicht gezeigt).

Die helladaptierten Zapfenterminalen (Abb. 3.18a und b) zeigen eine „Aggregation“ der SNAP-25-IR (Pfeile) im Bereich der Ribbon-Synapsen (Pfeilköpfe), welche sich bereits fluoreszenzmikroskopisch erkennen ließ (siehe oben). Die Immunreaktivität in den beiden dunkeladaptierten Zapfenterminalen (Abb. 3.18c und d) erscheint dagegen gleichmäßig verteilt, ohne daß man einen Unterschied in der Menge, „Schwärze“, der DAB-Immunreaktivität zwischen „Ribbon-nahen“ und „Ribbon-fernen“ Abschnitten erkennen kann.

4.0. Diskussion

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen durchgeführt, um prä- und postsynaptische Proteine an Mb-Terminalen in der Goldfischnetzhaut darzustellen und ihr Vorkommen sowie ihre Verteilung mit adaptionsabhängigen strukturellen Veränderungen dieser Axonterminalen in Verbindung zu bringen.

Die strukturellen Veränderungen der Mb-Terminalen sind Beispiele für synaptische Plastizität in der inneren Fischnetzhaut (Yazulla und Studholme 1992; Wagner und Djamgoz 1993; Behrens und Wagner 1996). An dieser Stelle soll noch einmal erwähnt werden, daß der Begriff „synaptische Plastizität“ die zugrunde liegenden Vorgänge nicht unmißverständlich beschreibt. In seiner allgemeinen Bedeutung meint der Begriff der „synaptischen Plastizität“, daß die Verbindungen zwischen Nervenzellen (Synapsen) morphologisch, physiologisch und biochemisch nicht starr und fix sind, sondern Veränderungen unterliegen, die 1) im adulten Nervensystem, 2) während der Entwicklung und 3) nach Regeneration auf Grund einer Schädigung zu beobachten sind (Kandel et al. 2000).

Die Untersuchung von „synaptischer Plastizität“ an konkreten Modellen macht es notwendig, prä- und postsynaptische Komponenten der beobachteten Plastizität zu unterscheiden und nach den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu fragen. Aus der Literatur entnommene Beispiele für Plastizität der Präsynapse sind: Veränderungen in der Anzahl und Dynamik der synaptischen Vesikel (Minami et al. 1998; Stevens und Sullivan 1998; Heidelberger und Matthews 1991; Greengard et al. 1993; Heidelberger und Matthews 1994; Hanson et al. 1997; Gomis et al. 1999). Beispiele der Plastizität der Postsynapse sind u.a.: Gestalt und Größe der postsynaptischen Zone (Walmsley et al. 1998; Lim et al. 1999), Spezialisierungen der Postsynapse (Spinule) (Edwards 1995; Sorra et al. 1998), die Anzahl und Zusammensetzung der postsynaptischen Neurotransmitterrezeptoren (Edwards et al. 1995; Triller et al. 1990; Nusser et al. 1998; Lim et al. 1999) und die Proteinzusammensetzung und Aktivität von Enzymen der „postsynaptischen Verdichtung“ (PSD) asymmetrischer chemischer Synapsen vom Gray Typ I (Ziff 1997).

Plastizität umfaßt auch „second messenger Systeme“ wie cAMP, PKA, PKC und Kalzium (Siegel 1999). Die „retrograden messenger“, wie NO und Arachidonsäure, werden auch als „third messenger“ bezeichnet (Siegel 1999).

Die Terminalen der Mb-Bipolarzellen unterscheiden sich morphologisch, physiologisch und biochemisch von konventionellen chemischen Synapsen. Sie werden mit den Photorezeptoren der Retina, den Haarsinneszellen des Innenohres und den Zellen des Seitenlinienorgans der Fische als Nervenzellen zusammengefaßt, die gradierte Potentiale aufbauen (graded potential neurons) und „kontinuierlich“, in Abhängigkeit vom Membranpotential, vesikulär gespeicherte Neurotransmitter freisetzen. Ihnen werden Nervenzellen gegenübergestellt, die Aktionspotentiale bilden und phasisch synaptische Vesikel ausschütten (Juusola et al. 1996).

4.1. Diskussion der Methoden

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind bereits von anderen Arbeitsgruppen verwendet und hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft worden.² Daher wurden hier lediglich methodische Kontrollen vorgenommen, bei denen der Primärantikörper zugunsten einer Präinkubationslösung weggelassen wurde. Alle so durchgeführten Kontrollen zeigten durchgehend keine Immunreaktivität. Daraus kann geschlossen werden, daß die verwendeten Primärantikörper spezifisch ihre „Antigene“ im Gefrierschnitt bzw. im slice-Präparat erkennen. Die verwendeten Zweitantikörper zeigten jeweils keine störenden Anfärbungen.

In Vorversuchen wurde die Fixierungsempfindlichkeit der Primärantikörper ermittelt. So waren sowohl der Anti-Gephyrin- (MAb 7a) als auch der Anti-GABA_C-Antikörper (ρ -Untereinheit) fixierungsempfindlich. Dies bedeutete im Falle des Gephyrin-Antikörpers, daß, um ein spezifisches Signal zu erhalten, die Fixierungsdauer verkürzt werden mußte. Durch die verkürzte Fixierung war die Gewebequalität allerdings schlechter als in den länger fixierten Gewebeproben. Im Falle des GABA_C-Rezeptor-Antikörpers mußte auf eine Aldehydfixierung ganz verzichtet werden, da auch eine kurze Aldehydfixierung das spezifische Signal verhinderte.

Um eine Gleichbehandlung von Gefrierschnitten hell- und dunkeladaptierter Netzhäute zu gewährleisten, wurden die Netzhäute zusammen in TissueTek eingefroren, geschnitten und gemeinsam auf den Objektträgern inkubiert (Sandwichtchnik).

² Gephyrin-Antikörper: Houser et al. 1983; Pfeiffer et al. 1984; Triller et al. 1985; Becker et al. 1986

GABA_C-Antikörper: Koulen et al. 1997, 1998

PKC-Antikörper: Vaquero et al. 1996a; Chang et al. 1997; Das et al. 1997; Haverstick et al. 1997; Yuko et al. 2000

SNAP-25-Antikörper: Kang et al. 1995; Hess et al. 1996; Mehta et al. 1996; Genoud et al. 1999

Ein Problem der „preembedding“ Immunhistochemie ist die Penetration der Antikörper in die Netzhautstreifen (Eldred et al. 1983). Die Netzhautstücke wurden daher mehrmals in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um so die Penetration der Antikörper zu erleichtern.

Bei den optischen Serienschnitten von doppelmarkierten Präparaten muß man u.a. berücksichtigen, daß die Tiefenschärfe für unterschiedliche Fluochrome in der Z-Achse nicht 100%ig identisch ist, sondern minimal abweicht (Pawley 1997, 2000). Dieser „Abbildungsfehler“ ist für die meisten Doppelmarkierungen nicht relevant. Die sichere Beurteilung des fokalen Vorkommens von Gephyrin-IR auf der Oberfläche der Mb-Terminalen wird hierdurch aber nicht beeinträchtigt, da die elektronenmikroskopische Untersuchung der preembedding Markierung klar die subplasmalemmale Lage der Gephyrin-IR in den Mb-Terminalen zeigt.

4.2. Morphologie der Mb-Bipolarzellen der Goldfischnetzhaut

Bipolarzellen in der Cyprinidennetzhaut lassen sich danach einteilen, von welchen Photorezeptoren sie Eingänge erhalten; man unterscheidet reine Zapfenbipolare von den gemischten Stäbchen- und Zapfen-Bipolarzellen, deren große Axonendigungen (bis zu 10 µm und mehr) in der Sublamina a (Ma-Bipolarzellen) oder der Sublamina b (Mb-Bipolarzellen) liegen (Stell et al. 1977; Ishida et al. 1980; Sherry und Yazulla 1993). Die glutamatergen Mb-Bipolarzellen lassen sich selektiv mit PKC-Antikörpern anfärben (Negishi et al. 1988; Susuki und Kaneko 1990).

Die Mb-Terminale ist sowohl Prä- als auch Postsynapse. Die synaptischen Ribbons sind das charakteristische Merkmal der Präsynapse (Witkovsky und Dowling 1969). Bis zu 65 Ribbons sind bisher in einer Mb-Terminale gefunden worden (von Gersdorff et al. 1996).

Neben den Ribbonsynapsen finden sich Ribbon-assoziierte chemische Feedback-Synapsen vom Gray Typ II (von Amakrinen→Bipolarterminalen) und nicht-Ribbon-assoziierte chemische Synapsen, ebenso vom Gray Typ II, an den Mb-Terminalen, dort erfolgt ebenfalls der Informationsfluß von Amakrinen auf Bipolarterminalen (Witkovsky und Dowling 1969; Dowling 1987). Eine Sonderform dieser nicht-Ribbon-assoziierten Gray Typ II Synapsen sind die Spinules (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996). Dabei handelt es sich um sozusagen „gestielte“ chemische Synapsen, bei denen sich die synaptischen Vesikel dicht an der präsynaptischen Membran auf der Seite der Amakrinzelle befinden.

Im Falle der Ribbon-assoziierten und der nicht-Ribbon-assoziierten chemischen Synapsen ist die Mb-Terminale selbst die Postsynapse.

Die synaptischen Eingänge der Amakrinen der Retina verwenden bis zu 80% inhibitorische Transmitter wie GABA (30-40%) und Glyzin (30-40%) (Marc et al. 1978; Marc und Lam 1981; Muller und Marc 1990; Yazulla et al. 1987; Yazulla 1989). Viele dieser inhibitorischen Synapsen von Amakrinzelle auf Bipolarzelle sind dabei sog. „feedback“ Synapsen (Witkovsky und Dowling 1969). Die Funktion dieser „feedback“ Synapsen besteht darin, den synaptischen Ausgang der Bipolarzellen inhibierend zu modulieren.

GABA wirkt auf drei unterschiedliche GABA-Rezeptoren in der Retina. Zum einen aktiviert GABA eine Population von GABA-Rezeptoren, die zu einer erhöhten Cl⁻-Leitfähigkeit führen (GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren) (Tachibana und Kaneko 1987; Heidelberger und Matthews 1991; Matthews et al. 1994). Zum anderen gibt es an den Bipolarterminalen eine GTP-abhängige Inhibition des Ca²⁺-Stroms über GABA_B-Rezeptoren (Heidelberger und Matthews 1991; Matthews et al. 1994). Diese GABA_B-Rezeptoren sind weiterhin indirekt mit K⁺-Kanälen gekoppelt, welche eine erhöhte „Offen-Wahrscheinlichkeit“ bei Bindung von GABA an den Rezeptor besitzen (Siegel 1999; Yamada et al. 1999). GABA bewirkt also auf verschiedene Arten eine Hyperpolarisation der Bipolarterminalen und verschiebt so den aktivierbaren Bereich des Ca²⁺-Stroms zu positiveren Membranpotentialen. Sämtliche Möglichkeiten der GABAergen Inhibition in der Retina werden dabei hauptsächlich von Rezeptoren vermittelt, deren Pharmakologie und Physiologie sich von der anderer GABA-Rezeptoren des ZNS unterscheidet (Feigenspan et al. 1993; Qian und Dowling 1993). Es sei nur am Rande bemerkt, daß man auch davon ausgeht, daß die molekulare Zusammensetzung von GABA-Rezeptoren in der inneren Netzhaut anders ist als im Gehirn, da die große Zahl verfügbarer Antikörper gegen GABA-Rezeptoruntereinheiten gar keine oder eine sehr ungenügende Markierung in der Netzhaut von Fischen ergibt.

Nachdem in den bisherigen Ausführungen die Bipolarterminalen zum einen als Präsynapse (Stichwort: „Vesikelumsatz“) und zum anderen als Postsynapse (Stichwort: chemische Synapsen von Amakrinzellen auf die Bipolarzelle) charakterisiert wurde, soll nun die Plastizität der Bipolaren genauer beleuchtet werden. Dabei bietet es sich an dieser Stelle an, die Begriffe „aktivitäts-“ und „adaptationsabhängig“ in bezug auf die Retina des Fisches voneinander abzugrenzen. Unter aktivitätsabhängigen Veränderungen versteht man schnelle Änderungen (Mikro-, Millisekunden-Bereich), wie z.B. bei der Vesikeldynamik.

Adaptationsabhängige Veränderungen sind dagegen langsame (Minuten bis Stunden) Prozesse, wie z.B. die Spinuledynamik von Horizontalzellen (30-45 min) und Bipolarzellen (60-90 min) und die Retinomotorik der Stäbchen bzw. Zapfen, bei denen es sich um langsame und globale Anpassungen an veränderte Lichtbedingungen handelt (Dowling 1987; Wagner und Djamgoz 1993). Bei Adaptationsvorgängen stehen im Grunde genommen nicht die Zeitfenster biologischer Vorgänge im Vordergrund. Eine allgemeine Strategie, die allen Adaptationsvorgängen zugrunde liegt, besteht darin, reaktionsfähig auf „äußere“ Signale zu bleiben und dabei besonders Änderungen von Eingangssignalen zu registrieren. Adaptationsvorgänge sind nicht nur auf Sinneszellen (z.B. Photorezeptoren) beschränkt, sondern u.a. auch bei Interneuronen und z.B. bewegungssensitiven Neuronen im visuellen System von Wirbeltieren und Insekten beschrieben (Laughlin 1987, 1994).

4.3. Morphologische Plastizität und Mb-Bipolarzellen

Yazulla und Studholm (1991, 1992) berichteten, daß die Mb-Terminalen fingerartige Fortsätze (Spinules) bilden, die sich in die sie umgebenden Amakrinzellen bohren. Spinules sind nicht häufig. Yazulla und seine Mitarbeiter zeigten, daß in ca. 5% der synaptischen Profile, die an die Mb-Terminalen gehen, Spinules invaginieren (Yazulla und Studholme 1992). Quantitative Untersuchungen über die verschiedenen Synapsen-Populationen an den Mb-Terminalen liegen bisher nicht vor.

Neben den Spinules von Ma- und Mb-Terminalen (Behrens und Wagner 1996) sind in der Goldfischnetzhaute auch Horizontalzell-Spinules beschrieben; es handelt sich hierbei um Zapfen-Horizontalzell-Spinules, deren Dendriten in den Zapfen-Fuß invaginieren; die HC-Spinules sind dabei seitlich der synaptischen Ribbons angeordnet (Raynauld et al. 1979; Wagner 1980; Wagner und Djamgoz 1993). HC-Spinules werden mit „feedback-Mechanismen“ und dem Farbantwortverhalten von Zapfen-Horizontalzellen in der Fischnetzhaute in Verbindung gebracht (Wagner und Djamgoz 1993). Die Spinules der Mb-Bipolarzellen und auch der Ma-Bipolarzellen sind dann vorhanden, wenn die Terminalen hyperpolarisiert sind (Behrens und Wagner 1996). Dies ist bei den Mb-Bipolarzellen im Dunkeln der Fall (Murakami et al. 1975). Die Spinules der HC sind ebenfalls dann vorhanden, wenn die Zelle hyperpolarisiert ist, also im Hellen. Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, daß es sich bei den Spinules der Fischnetzhaute um spezielle synaptische Strukturen für „verstärkte inhibitorische synaptische Übertragung“ unter Bedingungen der Hyperpolarisation handelt (Yazulla und Studholme 1992).

Yazulla und Studholme (1992) beschrieben noch weitere Hell-Dunkel Unterschiede in der Morphologie der Mb-Terminale. So war die Oberfläche der Terminalen im Hellen runder und konvex, wohingegen sie im Dunkeln einen „eckigen“ und „amöboiden“ Eindruck erweckte (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996). Diese Beobachtung wurde mit einer Änderung der Krümmung in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität in Verbindung gebracht (Dyson und Jones 1984; Desmond und Levy 1988a, b; Calvery und Jones 1990). Krümmungsänderungen wurden von Yazulla und Studholme (1992) und Behrens und Wagner (1996) vor dem Hintergrund des Membran-Recyclings und der unterschiedlichen „kinetischen“ Komponenten der Exozytose und Endozytose (von Gersdorff et al. 1994, 1997; Matthews 2000) in Abhängigkeit von der Aktivität der Zellen diskutiert. Tatsächlich kommt es zu einem „Membranstau“ der Axonterminale unter experimentellen Bedingungen (Heidelberger und Matthews 1994; Mennerick und Matthews 1996; Matthews 1999). Inwieweit diese experimentellen Befunde für die Erklärung der Formveränderung der Terminalen verantwortlich sind, ist bisher nicht bekannt.

In der neueren Literatur findet man immer mehr Hinweise auf eine direkte Korrelation von der Größe einer Postsynapse und ihrer Übertragungsstärke (Walmsley et al. 1998; Lim et al. 1999). Eine Verbindung von aktivitätsabhängiger Größenänderung und Krümmungshypothese ist aber bisher nicht gezeigt worden.

Die Änderungen der Morphologie der Mb-Terminale und die Spindeldynamik werfen die Frage auf, wie diese Änderungen durch intrazelluläre Mechanismen und das Zytoskelett vermittelt werden könnten. Diese Zusammenhänge sollen im folgenden genauer erläutert werden. ON-Bipolarzellen reagieren mit einer kontinuierlichen Depolarisation auf eine konstante Belichtung der Netzhaut (Dowling 1987). Diese Depolarisation ist mit einer Retraktion der Spindeln, einer „Rundung“ der Axonterminale (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996) und einem „Wachstum“ von Aktin-Filamenten in der Terminalen verbunden (Job und Lagnado 1998). Die Bildung des subplasmalem Aktin-Netzwerks benötigt einen durch Depolarisation ausgelösten Ca^{2+} -Einstrom und die Aktivierung von PKC (Job und Lagnado 1998).

Diese Aktivierung von PKC wird mit einer Translokation des membranständigen Enzyms in das zytosolische Kompartiment der Axonterminale in Verbindung gebracht (Osborne et al. 1992). In dem vorliegenden Bildmaterial finden sich Beispiele dafür, daß die PKC-Immunfluoreszenz in den Terminalen im Hellen diffuser (zytoplasmatischer) verteilt ist als im Dunkeln, wo eher eine membranständige PKC-Immunfluoreszenz zu beobachten ist (siehe auch Behrens et al. 1998). Dieses Verteilungsmuster von PKC-IR kann mit den

Befunden, welche eine Potenzierung der Transmitterausschüttung durch PKC nach Phorbolsterstimulation zeigten (Minami et al. 1998), in Verbindung gebracht werden. Die verstärkte Vesikelexozytose der Mb-Terminale findet man im Hellen, wo auch die „aktivierte Verteilung“ (diffuse zytoplasmatische Verteilung) von PKC zu beobachten ist (Minami et al. 1998; Stevens und Sullivan 1998). Andererseits zeigten Job und Lagnado (1998), daß die Aktivierung von PKC alleine durch Phorbolster keinen Einfluß auf die Bildung von f-Aktin hat. Nur die Aktivierung in Anwesenheit von Ca^{2+} führt zu einer Bildung von f-Aktin. Die Autoren schließen daraus, daß es sich bei der Isoform von PKC um eine Ca^{2+} -abhängige, wie die α -Isoform, handeln muß. Diese Isoform findet sich dabei auch tatsächlich bevorzugt in der Axonterminale (Suzuki und Kaneko 1991; Usada et al. 1991; Osborne et al. 1992).³

Man kann somit sagen, daß PKC ein interessanter Marker zur Untersuchung von Bipolarzellen ist. Zuerst wurden die PKC-Antikörper nur dazu verwendet, um selektiv Bipolarzellen in der Netzhaut darzustellen (Suzuki und Kaneko 1991). Später erkannte man die weit größere Bedeutung von PKC und wendet sich nun verstärkt den regulatorischen Funktionen von PKC in der Terminale zu. Dabei übernimmt PKC vielfältige Aufgaben, deren Zusammenspiel man erst jetzt zu verstehen beginnt. So ist PKC, wie bereits erwähnt, an der Regulation des Zytoskeletts von Mb-Bipolarzellen (Job und Lagnado 1998; Minami et al. 1998), der Potenzierung der Transmitterausschüttung (Minami et al. 1998; Stevens und Sullivan 1998) und der Modulation von GABA_C-Rezeptoren beteiligt (Feigenspan und Bormann 1994a; Matthews 1999).

Nachdem nun die Plastizität der Bipolarzellen als Hintergrundinformation einführend besprochen wurde, sollen im folgenden die Befunde zu den postsynaptischen Markern Gephyrin (als Marker für die inhibitorischen GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren) und GABA_C und später die Befunde mit dem präsynaptischen Marker SNAP-25 diskutiert werden.

4.4. Inhibitorische Neurotransmitter und funktionelle Verankerung von Rezeptoren

Die synaptische Inhibition im ZNS und in der Netzhaut erfolgt im wesentlichen durch die Aminosäuren γ -Amino-Buttersäure (GABA) und durch Glyzin. Binden diese endogenen Liganden an ihre entsprechenden postsynaptischen Rezeptoren, so kommt es zu einem Einstrom von Cl^- in die Zelle (Ausnahme: GABA_B-Rezeptoren) und somit zu einer

³ S.a. Abb. 3.13b GABA_C-PKC Doppelmarkierung mit dem α -Isoform-spezifischen Antikörper

Hyperpolarisation der Membran. Sowohl der GABA_A- (GABA_AR) als auch der Glyzin-Rezeptor (GlyR) sind in der Retina lokalisiert (Enz und Bormann 1995; Sassoè-Pognetto et al. 1995; Koulen et al. 1996; Sassoè-Pognetto und Wässle 1997; Zucker 1998). Infolge ihrer strukturellen und funktionellen Homologie werden sie zu einer einheitlichen Gruppe von ligandengesteuerten Ionenkanälen zusammengefaßt. Diese Gruppe beinhaltet auch den Azetylcholin- und den Serotonin Typ₃-Rezeptor.⁴

Die Untersuchung der molekularen Grundlagen der lokalen Aggregation dieser Rezeptoren machte in der jüngeren Vergangenheit große Fortschritte. Dabei zeigte sich, daß viele der für die Aggregation des GlyR gültigen Mechanismen auch für den GABA_AR anwendbar sind. So stellte sich heraus, daß die entscheidende Funktion des peripheren Membranmoleküls Gephyrin auch für die Verankerung einer bestimmten Untergruppe von GABA_AR mit dem subsynaptischen Zytoskelett von Bedeutung ist (Sassoè-Pognetto et al. 1995; Craig et al 1996; Betz 1998; Essrich et al. 1998). Im folgenden sollen Funktion und Bedeutung von Gephyrin anhand des besser verstandenen GlyR dargestellt werden.

Der GlyR besteht aus einem Pentamer, zusammengesetzt aus 3 α - und 2 β -Untereinheiten, die zusammen einen funktionellen Ionenkanal bilden (Kuhse et al. 1993). Zusätzlich zu den Rezeptor-Untereinheiten findet man ein drittes Polypeptid mit der molekularen Masse von 93kDa, das als „peripheres Membranprotein“ charakterisiert wurde (Schmitt et al. 1987) und den Namen Gephyrin (vom griechischen: γεφυρα = Brücke) bekam. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß Gephyrin postsynaptisch zu glyzinergergen und einem Teil der GABAergen Neuronen der Retina ist (Sassoè-Pognetto et al. 1995, Todd et al. 1995).

Auffällig ist auch die Tatsache, daß Gephyrin eine ausgeprägte Homologie zu Polypeptiden von Pflanzen und Bakterien besitzt, die bei der Biosynthese des Molybdän-Kofaktors involviert sind (Prior et al. 1992; Stallmeyer et al. 1995). Welche funktionelle Bedeutung hinter dieser Beobachtung steht, ist dabei noch unklar. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß Fehler des Gephyrin-Proteins sowohl die Funktion von Gephyrin als „anchoring-Protein“ als auch seine Aktivität als Molybdän-Enzym in der Art und Weise beeinflussen, daß es zu hyperkinetischen Erkrankungen kommt (Feng et al. 1998). Darüber hinaus kann man davon ausgehen, daß die gefundene Expression von Gephyrin in „nicht-neuronalem“ Gewebe (Leber, Niere usw.) ein Hinweis dafür ist, daß sich die Funktion von Gephyrin nicht nur auf die Verankerung von „Neurotransmitterrezeptoren“ beschränkt (Prior et al. 1992). Zudem finden sich Cl⁻-Kanäle allerorts in Zellmembranen. So wäre es auch denkbar, daß Gephyrin

⁴ Zur Übersicht s. Kuhse et al. 1995

diese nicht-neuronalen Cl⁻-Kanäle aggregiert. Die Analyse der cDNA von Gephyrin zeigte, daß es mehrere Varianten gibt, deren Entstehung durch alternatives Splicing erklärt werden kann (Prior et al. 1992). Der MAb 7a Antikörper erkennt alle dieser „Splicing-Varianten“ von Gephyrin (Kirsch und Betz 1993). Unklar ist, welche Splice-Varianten in der Goldfischnetzhaute vorkommen.

Die Anwesenheit von Gephyrin ist essentieller Bestandteil bei der Bildung von postsynaptischen „GlyR-Clustern“ (Kneussel und Betz 2000), da die Blockierung von Gephyrin mit Antisense-Oligonukleotiden die Bildung von Rezeptor-Aggregationen verhindert (Kirsch et al. 1993). Ebenfalls zeigte sich, daß die β -Untereinheit der Bindungspartner des GlyR mit Gephyrin ist (Meyer et al. 1995; Kirsch et al. 1995) und daß das Einfügen des Bindungsmotivs für Gephyrin in GABA_AR-Untereinheiten zu einem ähnlichen Bindungsverhalten der veränderten GABA-Rezeptoruntereinheiten führt (Meyer et al. 1995). In der gleichen Veröffentlichung von Meyer et al. (1995) wurde beobachtet, daß die β_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors Bindungsaffinität zu Gephyrin besitzt. Diese Beobachtung unterstützt die immunhistochemischen Daten, die eine Kollokalisierung von Gephyrin und GABA-Rezeptoren zeigen (Todd et al. 1996). Um funktionelle „Cluster“ zu bilden, ist neben Gephyrin und der β -Untereinheit des GlyR eine Rezeptoraktivierung notwendig (Kirsch und Betz 1998).

In-vitro-Kopolymerisationsstudien zeigten eine hohe Affinität von Gephyrin zu polymerisiertem Tubulin (Kirsch et al. 1991). Alkaloide, welche die Polymerisation von Tubulin verhindern, beeinträchtigen ebenfalls die Bildung von „Gephyrin-Clustern“ (Kirsch und Betz 1995). Darüber hinaus zeigen neueste Ergebnisse, daß Collybistin, ein Protein der GDP/GTP Austauschfamilie, zur Bildung von funktionellen „Gephyrin-Clustern“ notwendig ist (Kins et al. 2000). Man geht aus diesen Gründen heute davon aus, daß Gephyrin eine entscheidende Rolle bei der Verankerung und Aggregation von inhibitorischen Synapsen (GABA_A- und GlyR) mit dem subsynaptischen Zytoskelett spielt (Wheal et al. 1998; Kneussel und Betz 2000). Auffällig ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß GABA- und Glyzin-Rezeptoren, wie auch andere Rezeptoren (z.B. Acetylcholin; Siegel 1999), in der frühen Entwicklung noch nicht in „hot spots“ zusammengeballt, sondern eher „diffus“ (extrasynaptisch) über die Oberfläche der Zelle verteilt sind. Erst nachdem Synapsen geformt werden, kommt es zu einer Aggregation der Rezeptoren (Sassoè-Pognetto und Wässle 1997; Koulen et al. 1996).

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Gephyrin-IR auf der Oberfläche von Mb-Terminals zu finden ist. Die Immunofluoreszenz befand sich mehr auf der distalen („photorezeptorwärts“) Hälfte der Terminalen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen unterstreichen die Befunde, daß die Gephyrin-IR diskret postsynaptisch, in konventionellen chemischen Synapsen und in einem Teil der Spinules zusammenaggregiert, lokalisiert ist. In Anbetracht der Tatsache, daß Gephyrin in diesen Versuchen als Marker für inhibitorische Synapsen (GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren; Kins et al. 2000) verwendet wurde, wurden, entgegen der Erwartung, auffällig wenige Gephyrin-IR Flecken gefunden.⁵

Die Mb-Bipolarterminalen erhalten wenige glyzinerge synaptische Eingänge von Amakrinen und Interplexiformen Zellen (Marc et al. 1981; Muller et al. 1990; Yazulla und Studholme 1991). Betrachtet man diese Befunde aus der Literatur, so sollten weniger Gephyrin-IR-Flecken an den Terminalen zu finden sein, wenn man davon ausgeht, daß möglicherweise der Anti-Gephyrin-Antikörper nur Gephyrin assoziiert mit dem GlyR erkennt. Die bisher aufgeführten Befunde zur Kolo-kalisation von Gephyrin- und GABA_A-R sprechen aber gegen die Hypothese, daß Gephyrin nur mit GlyR assoziiert ist.

Die Anzahl von Gephyrin-IR Synapsen könnte damit erklärt werden, daß auch noch ein Teil der GABAergen Synapsen auf der Oberfläche der Terminalen durch den Anti-Gephyrin Antikörper erkannt wird. Möglicherweise ist Gephyrin nur mit einer Subpopulation von GABA_A-R und mit GlyR verknüpft. Ein Marker für alle inhibitorischen Synapsen dürfte Gephyrin also nicht sein, da sonst auch Photorezeptorterminalen markiert werden müßten, was die vorliegenden Ergebnisse nicht zeigen.

Die Gephyrin-IR befand sich bevorzugt an „strategisch“ wichtigen Bereichen der Terminalen: am Übergang des Axons („Axonfadens“) zur Axonterminale, in einigen Spinules auf der distalen Hälfte der Terminalen und vereinzelt am Übergang von großen Fortsätzen zum zentralen Element der Terminalen. Die strategische Lokalisation von Gephyrin-IR eignet sich besonders dazu, eintreffende Signale mit inhibitorischen „Impulsen“ zu modulieren oder zu unterdrücken. Ebenso wichtig ist es, daß es sich bei diesen inhibitorischen Rezeptoren um

⁵ Mb-Terminals erhalten viele GABAerge synaptische Eingänge (Marc et al. 1978; Yazulla 1986; Marc 1989 und 1992; Muller und Marc 1990; Yazulla und Studholme 1991). Darüber hinaus gibt es auch glyzinerge Eingänge auf die Mb-Terminals (Marc und Lam 1981; Muller und Marc 1990). Marc und Lui (2000) schätzen, daß es in etwa 350-390 AC-Profilen gibt, die an die Mb-Terminals gehen. Genaue Zählungen hinsichtlich der von diesen Amakrinen verwendeten Transmitter gibt es nicht. Viele Autoren gehen jedoch davon aus, daß ca. 40-50% der Amakrinen GABAerg und 30% glyzinerge sind (Marc 1989; Menger et al. 1990). Dies würde für die Mb-Terminals bedeuten, daß, falls der Anti-Gephyrin-Antikörper inhibitorische Synapsen (GABA und Glyzin) erkennt, ca. $350 * (0,5+0,3) = 280$ Gephyrin-IR Flecken an den Terminalen zu finden sein müßten. Tatsächlich konnten jedoch nur 62 bzw. 66 Gephyrin-IR Flecken gefunden werden.

schnell reagierende und effektiv arbeitende GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren handelt, welche ebenso schnell wieder inaktiviert werden können (Feigenspan und Bormann 1994; Lukasiewicz und Shields 1998).

Da Mb-Spinules häufiger an dunkel- als an helladaptierten Terminalen vorkommen, war mit der Ausgangshypothese, daß Gephyrin als Marker für BC-Spinules verwendet werden kann, die Erwartung verbunden, daß die Anzahl der Gephyrin-IR Flecken an den dunkeladaptierten Mb-Terminals höher sein würde. Es konnten aber keine Unterschiede in der Verteilung und Häufigkeit der Gephyrin-IR an den Mb-Terminals beobachtet werden. Dies kann bedeuten, daß durch methodische Schwierigkeiten nicht alle Gephyrin-IR Flecken gezählt wurden oder daß die Gephyrin-IR Spinules zahlenmäßig gering ausfielen und im Verhältnis zu anderen Gephyrin-IR Synapsen nicht erfaßt wurden. An dieser Stelle soll noch einmal hervorgehoben werden, daß der Gephyrin-Antikörper in der Tat Gephyrin-IR-Spinules anfärbt, aber umgekehrt waren nicht alle Spinules mit dem Antikörper anzufärben, was auf eine neurochemische Heterogenität der BC-Spinules schließen läßt.

Im Zusammenhang mit dem Sachverhalt, daß nur ein Teil der Spinules Gephyrin-IR ist und daß diese Spinules selbst bevorzugt auf der distalen Hälfte der Terminale vorkommen, stellt sich die zellbiologisch wichtige Frage nach den Mechanismen des „Sortings“, d.h., woher weiß das Gephyrin-Protein, an welchen subplasmalemalen Domänen es sich funktionell „einbauen“ muß? ⁶

Abgesehen von der Neubildung von Synapsen kann man auch vermuten, daß die Größe bestehender Synapsen selbst aktivitätsabhängig unterschiedlich ist. So zeigten Lim et al. (1999), daß die Stärke einer synaptischen Transmission direkt von der Größe der Postsynapse abhängt. In Anbetracht dieser Ergebnisse könnte man sich vorstellen, daß unterschiedliche synaptische Aktivität sich in verschieden großen und unterschiedlich intensiv fluoreszierenden Gephyrin-Flecken in der Retina niederschlägt. Tatsächlich findet man diese Variationen der Gephyrin-IR Flecken in der IPL. Das vorliegende Datenmaterial wäre aus diesem Grund für eine genaue Analyse von Größe und Intensität der Gephyrin-IR Flecken an den Mb-Terminals noch einmal zu inspizieren.

Eine Messung der Fluoreszenzintensität von Gephyrin-IR Flecken ist methodisch nicht unproblematisch. Zum einen muß man hier die methodischen Grenzen der histologischen Technik für quantitative Bestimmungen aufzeigen und auf die grundsätzlichen Schwierigkeiten der quantitativen Immunzytochemie verweisen (Larsson 1989); zum anderen

⁶ S. zum Thema Proteinsorting Kapitel 17.3 in Lodih et al. 2000

stellt sich das Problem eines externen bzw. eines internen Standards (Marc et al. 1995). Im vorliegenden Material dürfte eine saubere quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität methodisch nicht möglich sein, da im Laufe der Versuche z.T. verschiedene Konzentrationen des Zweitantikörpers verwendet wurden.

Ein weiteres Problem von Gephyrin-IR an Bipolarterminalen sind die Befunde von Sassoè-Pognetto et al. (1994), die wenige bis keine Gephyrin-IR Flecken an Bipolarterminalen in der Säugernetzhaut gefunden haben. Übereinstimmend mit Sassoè-Pognetto et al. (1994) fanden Enz und Bormann (1995) in isolierten Stäbchen-Bipolarzellen der Ratten-Retina keine mRNA für Gephyrin; dagegen fanden sie die mRNA für die α_1 - und die β -Untereinheit des Glyzin-Rezeptors. Vergleichbare single-cell-PCR-Untersuchungen liegen für die Mb-Bipolarzellen bisher noch nicht vor. Diese Unterschiede machen deutlich, daß noch nicht eindeutig geklärt ist, wie inhibitorische Rezeptoren von Bipolarterminalen in der Säugernetzhaut postsynaptisch zusammengehalten werden. Sicher ist hierbei die zunehmende Anzahl postsynaptisch charakterisierter Proteine zu berücksichtigen, wie z.B. die membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUKs oder PSD-95) (Ziff 1997). In der Fischnetzhaut sind daneben auch noch Spezies-spezifische Unterschiede der Rezeptorzusammensetzung und -verknüpfung zu erwarten.

In verschiedenen Regionen des Nervensystems von Wirbeltieren gibt es Synapsen, die sich dadurch auszeichnen, daß sie fingerartige Ausstülpungen der postsynaptischen Membran (Spinules) besitzen, welche die Präsynapse perforieren. Diese „Spinules“ wurden zuerst im Hippokampus der Ratte gefunden (Westrum und Blackstad 1962; Calverley und Jones 1990; Schuster et al. 1990; Edwards 1995a, b).⁷ Spinules bzw. Spinules-ähnliche Strukturen sind auch im Nervensystem von Invertebraten beschrieben worden (Aplysia: Bailey et al. 1979).

In der Netzhaut von Cypriniden findet man zwei Populationen von Spinules: Horizontalzellspinules (von H1 und H2 Horizontalzellen: Wagner 1980; Wagner und Djamgoz 1993; Weiler und Schulz 1993) und Bipolarzellspinules (Mb-Terminalen: Yazulla

⁷ Ähnliche Strukturen gibt es aber auch in vielen anderen Gebieten des ZNS: Szentagothai und Hamori 1969. Gyrus dentatus des Hippokampus der Ratte: Routtenberg und Tarrant 1975, Tarrant und Routtenberg 1977
Parietallappen des Neocortex bzw. Cortex der Ratte: Calverley und Jones 1987
Limbisches System (Nucleus accumbens bzw. Molekularschicht des Hippokampus der Ratte): Boyne und Tarrant 1982
„Sensomotorischer“ Cortex der Ratte: Bozhilova-Pastirova und Ovtsharoff 1999
Gyrus dentatus des Menschen: Zhang und Houser 1999

und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996; Ma-Bipolarterminalen: Behrens und Wagner 1996).

Die Spinules in der Netzhaut (Fisch) und im Hippokampus der Säuger sind morphologisch und damit auch funktionell nicht identisch (HC-Spinules: Wagner und Djamgoz 1993; BC-Spinules: Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996; Hippokampus-Spinules: Chicurel und Harris 1992; Edwards 1995a, b). Während die Spinules in der Netzhaut jeweils dann vorhanden sind, wenn man davon ausgehen kann, daß die Horizontal- bzw. Bipolarzelle hyperpolarisiert ist, werden die Spinules im Hippokampus mit gesteigerter Erregung (d.h. Depolarisation) in Verbindung gebracht (Edwards 1995a/b).

Spinules im Hippokampus werden einerseits im Zusammenhang mit einer „Kompartimentalisierung“ der Postsynapse diskutiert, wobei die Spinules hierbei eine räumliche Barriere (Diffusionsbarriere) darstellen (Bashir et al. 1993; Lisman und Harris 1993; Edwards 1995a, b); andererseits wurden Hypothesen formuliert, nach denen Spinules die Wirksamkeit der synaptischen Transmission beeinflussen sollen (Weiler et al. 1995). Unklar ist in diesem Zusammenhang, wie die Verstärkung der synaptischen Übertragung auf zellulärer Ebene ablaufen soll. Die Spinules im Hippokampus zeigen nicht die typischen Merkmale synaptischer Kontakte, wie Vesikelakkumulation und Membranverdichtungen. Bei Mb-Spinules sind diese ultrastrukturellen Merkmale meistens vorhanden (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996). Die HC-Spinules sind morphologisch auf ultrastruktureller Ebene nicht einfach zu interpretieren: An den Spitzen der HC-Spinules befinden sich Membranverdichtungen, die man im Sinne einer modifizierten postsynaptischen Verdichtung auffassen kann, wenn man die Spinules als postsynaptische Elemente betrachtet (Weiler und Schulz 1993). Aufgrund physiologischer Befunde lassen sich die HC-Spinules aber auch als morphologisches Korrelat der „feedback“-Interaktion zwischen Zapfen und Zapfen-HCs interpretieren (Djamgoz und Wagner 1993).

Die Spinules des Hippokampus bilden sich dagegen erst, wenn es bereits zu einer gesteigerten Aktivität gekommen ist. Die weitere Verstärkung soll nun eine langfristige Etablierung ermöglichen und wird von den meisten Autoren als Grundlage der Langzeit-Potenzierung (LTP) angesehen (Edwards 1995a, b). Man kann also sagen, daß die Hippokampus-Spinules die Folge einer Verstärkung darstellen, wohingegen die BC-Spinules der Fischnetzhaut möglicherweise als eine Verstärkung der synaptischen Übertragung von einer bestimmten Population hemmender Amakrin-Synapsen unter Bedingungen allgemein reduzierter Aktivität anzusehen sind (Yazulla und Studholme 1992).

Wie bereits erwähnt, sind nicht alle Spinules Gephyrin-IR und nicht alle Gephyrin-IR Synapsen sind Spinules. Eine Möglichkeit, diese Heterogenität der Spinules zu erklären, könnte in der Annahme bestehen, daß der Antikörper eine Struktur erkennt, die zwar große Homologie zu Gephyrin besitzt, jedoch mit der Verankerung und Aggregation von inhibitorischen Rezeptoren nichts zu tun hat. Vielmehr könnte es sich um ein Protein handeln, welches ebenfalls mit Zytoskelettelementen „zusammenarbeitet“. Somit spielt möglicherweise Gephyrin eine transitorische Rolle beim Auf- und Abbau der Spinules. Darüber hinaus ist es auch möglich, daß es durch unterschiedliche Aktivitätszustände der Spinules zu Konformationsänderungen von Gephyrin kommt, welche eine Bindung des Antikörpers verhindern.

4.5. Gephyrin-IR in Photorezeptoren der Netzhaut

Im Ergebnisteil konnte gezeigt werden, daß in den Photorezeptoren auch Gephyrin-IR vorhanden ist. Diese Beobachtung wurde bereits von Yazulla und Studholm (1992) gemacht, damals noch in der Annahme, daß es sich bei der Gephyrin-IR um Glyzin-Rezeptoren handele. Damals wie heute war dieses Ergebnis überraschend und nicht sofort einleuchtend. In der Literatur findet man jedoch einige Hinweise, die Aufklärung bieten können.

Craig et al. (1996) zeigten, daß die Gephyrin-IR von Kulturen aus Hippokampus-Neuronen in der Entwicklung von einem mehr axonalen⁸ zu einem mehr dendritischen⁹ Erscheinungsbild wechseln. Aus der Tatsache, daß Gephyrin in „nicht-synaptischen“ Bereichen gefunden wurde, folgerten die Autoren, daß Gephyrin auch eine weitere Funktion neben der Verankerung von Rezeptoren in der Postsynapse besitzt. Diese Funktion könnte darin bestehen, andere Membranmoleküle am Zytoskelett zu verankern oder Vesikel auf dem Weg zu ihrem Bestimmungsort zu begleiten. Diese Hypothesen werden durch die Tatsache gestützt, daß Gephyrin auch in vielen „nicht-neuronalen“ Geweben gefunden wird (Prior et al. 1992).

⁸ Die Gephyrin-IR wird bevorzugt in den auswachsenden Axonen gefunden.

⁹ Gephyrin-IR findet sich mehr in den Dendriten in „hot-spots“ gelagert.

Fallah und Clowry fanden 1999 heraus, daß Gephyrin ein Marker für unmyelinisierte auswachsende Axone im Hinterstrang von jungen Ratten ist. Die Bedeutung dieser Beobachtung bestand für die Autoren zum einen darin, daß die Axone Glyzin-Rezeptoren exprimieren könnten, zum anderen schlugen sie vor, daß sich Gephyrin auf dem Weg zu seinem „Einsatzort“ befinden könnte. Außerdem weiß man, daß es von Gephyrin mindestens 5 „Splicing-Varianten“ gibt (Prior et al. 1992), welche alle, wie bereits erwähnt, von dem MAb 7a Antikörper erkannt werden. Trotzdem ist es nicht ausgeschlossen, daß der Antikörper auch darüber hinaus noch weitere Moleküle, die sich in ihrer Sequenz und Struktur nicht wesentlich von Gephyrin unterscheiden, erkennt. Mögliche Kandidaten hierfür sind funktionell ähnliche Moleküle, wie neuronale Zell-Adhäsionsmoleküle (N-CAMs) und transmembranäre Glykoproteine (Fallah und Glowry 1999), die den Kontakt zwischen Neuronen einerseits und Neuronen und Gliazellen andererseits regulieren (Keilhauer et al. 1985). Darüber hinaus kann Gephyrin polymerisiertes Tubulin binden, und es erscheint Fallah und Glowry (1999) möglich, daß Gephyrin auf diesem Weg, ähnlich wie Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs), hinter der auswachsenden Axonkoppfindung Mikrotubuli in ihrer Form stabilisiert.

Diese Ergebnisse lassen sich möglicherweise auch auf die Gephyrin-IR in den Photorezeptoren übertragen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß Gephyrin in den Zapfen keine Rezeptoren am Zytoskelett verankert. Vielmehr deutet die Tatsache, daß Gephyrin zytoplasmatisch gefunden wird, darauf hin, daß es eine andere Funktion ausübt. Die Möglichkeit, daß der MAb 7a Antikörper weitere strukturähnliche Moleküle erkennt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden. Weitere Untersuchungen mit „splicing-spezifischen“ Antikörpern könnten Aufschluß bringen.

Aus der Tatsache, daß die Gephyrin-IR in den Zapfen bisher nur beim Fisch gefunden wurde, kann man schließen, daß es sich um ein „fischspezifisches Problem“ handelt. Deshalb wäre es naheliegend, daß die Fische, mit der im Vergleich zu den anderen in der Literatur erwähnten Tieren einzigartigen Retinomotorik, möglicherweise Gephyrin-ähnliche Moleküle zur Stabilisierung der Myoide verwenden. Dazu müßte sich jedoch die Gephyrin-IR distal der Äußeren Grenzmembran befinden, was nicht der Fall ist (s. Abb. 3.15). Mit welchen filamentartigen Zytoskelettbestandteilen Gephyrin in den Zapfen-Photorezeptoren interagiert, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch offen.

Bevor die Befunde zu den GABA_C-Rezeptoren der Goldfischnetzhaute diskutiert werden, sollen an dieser Stelle einige Probleme angesprochen werden, die in Bezug auf Gephyrin und seine Funktion und Bedeutung als Rezeptor-Protein, seine Bindungspartner und die Modulation noch weiterer Untersuchung bedürfen:

1. Wer sind die Partner von Gephyrin beim Prozeß des „clustering“ von Rezeptoren?
2. Welches sind die „Mitspieler“ bei der Modulation der Rezeptoraggregation?
3. Was kann die Ursache sein, daß inhibitorische Rezeptoren der Netzhaut „so wenig Gephyrin haben“?
4. Gibt es neben GABA_C- noch weitere inhibitorische Rezeptoren, die kein Gephyrin zur Verankerung benötigen, oder sind die zur Verfügung stehenden Antikörper ungenügend?
5. Wenn ja, aus welchen Untereinheiten bestehen die „Gephyrin-unabhängigen“ Rezeptoren?
6. In welcher Weise beeinflusst neuronale Aktivität die Verteilung und Größe bzw. Intensität der Gephyrin-IR an isolierten Mb-Terminalen?
7. Besitzen andere Tiere (mit Retinomotorik?) auch Gephyrin in ihren Photorezeptoren?

4.6. GABA_C-Rezeptoren in der Goldfischnetzhaute

Der Neurotransmitter GABA interagiert mit wenigstens drei verschiedenen Rezeptoren, die sich sowohl pharmakologisch als auch strukturell unterscheiden: dem GABA_A-, dem GABA_B- und dem GABA_C-Rezeptor.

Der GABA_A-Rezeptor-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-3} und δ), die wie der Glyzin-Rezeptor ein Pentamer bilden, das ligandengesteuert Cl⁻ Ionen durchläßt (Bormann et al. 1987; MacDonald 1994). Der GABA_B-Rezeptor ist über G-Proteine indirekt an K⁺- oder Ca²⁺-Kanäle gekoppelt, die somit von intrazellulären „second messenger Systemen“ gesteuert werden (Bowery 1989; Slaughter und Pan 1992; Kaupman et al. 1997). In der jüngeren Vergangenheit wurden GABA-gesteuerte Cl⁻-Kanäle gefunden, die sich hinsichtlich ihrer Pharmakologie (Bicucullin-insensitiv) und Kinetik von den bisherigen Kanälen unterscheiden und GABA_C-Rezeptoren genannt wurden (Drew et al. 1984; Shimada et al. 1992; Bormann und Feigenspan 1995; Johnston 1996). Diese GABA_C-Rezeptoren bestehen aus ρ_1 und ρ_2 -Untereinheiten und sind Retina-spezifisch (Cutting et al. 1991, 1992).

Man findet sowohl GABA_A- (Bicucullin-sensitive) als auch GABA_C-Rezeptoren (Bicucullin-insensitive) auf der Oberfläche von Bipolarzellterminalen (Feigenspan et al. 1993;

Enz et al. 1996; Koulen et al. 1997). Die Arbeitsgruppe um Tachibana zeigte, daß von Mb-Terminals Biccucullin-sensitive Antworten nach GABA-Stimulation abzuleiten waren (Suzuki et al. 1990; Kaneko et al. 1991), wohingegen die Arbeitsgruppe um Matthews diese Befunde nicht bestätigen konnte (Heidelberger und Matthews 1991; Matthews et al. 1994; Matthews 1999).

Man weiß heute auch, daß GABA_C-Rezeptoren der Bipolarzellterminale den exzitatorischen Ausgang auf die Ganglienzellen beeinflussen (Lukasiewicz und Werblin 1994). Diese Beeinflussung vollzieht sich durch reziproke Synapsen, die das morphologische Korrelat von „feed-back Mechanismen“ zwischen den Bipolarzellen und den Amakrinen darstellen. Die „feed-back Signale“ können die Übertragung in der Art und Weise beeinflussen, daß sie a) das „signal to noise ratio“ (SNR) positiv verstärken oder b) zu einer Verringerung des synaptischen Informationsflusses führen¹⁰. Da die GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren unterschiedliche Konzentrationen von Transmitter zur Aktivierung benötigen (Feigenspan und Bormann 1994b), bietet sich hier an der Bipolarterminalen die Möglichkeit, zwischen den beiden Varianten zu wählen. Bei geringer GABA-Konzentration im synaptischen Spalt werden fast ausschließlich die GABA_C-Rezeptoren aktiviert (Lukasiewicz 1996). Dies könnte zu einer reziproken „feed-back Inhibition“ durch Amakrinzellen führen, welche das SNR in positiver Weise beeinflußt, so daß es so zu einem „kontrastreichen“ Signal der Bipolarzellen auf die Amakrinzellen kommt (Lukasiewicz 1996). Dieser „feed-back-Mechanismus“ würde auch länger anhalten und im Vergleich zu GABA_A-Rezeptoren nicht desensibilisieren. Bei höherer Konzentration von GABA im synaptischen Spalt werden die GABA_A-Rezeptoren aktiviert und über metabotrope Autorezeptoren die GABA_C-Rezeptoren der Bipolarzellen inhibiert. Durch die nun alleinige Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren auf Ganglienzellendriten und Bipolarzellen kommt es zu einer Unterdrückung eingehender Signale in den Ganglienzellendriten (Lukasiewicz 1996; „feed-forward-Inhibition“) und „feed-back“-Inhibition der Bipolarzelle (siehe Abb.4.1).

Weiterhin muß man in Betracht ziehen, daß die Verteilung der GABA_A- und GABA_C-Rezeptoren in der Netzhaut sehr komplex ist (Kaneko et al. 1991). Der GABA_A-Rezeptor wird sowohl auf Bipolarzellen als auch auf Ganglienzellen gefunden, wohingegen der GABA_C-Rezeptor bevorzugt auf den Bipolarterminalen lokalisiert ist (Heidelberger und Matthews 1991; Lukasiewicz et al. 1994; Pan und Lipton 1995) (Abb. 4.1). Eine Ausschüttung von GABA eines Amakrinzellfortsatzes in den Bereich der Dyade führt somit sowohl zu „feed-back“ als auch „feed-forward“ Inhibition. Dabei ist die „feed-forward“

¹⁰ Zu entsprechender Thematik an Photorezeptorterminalen s. Smith 1995.

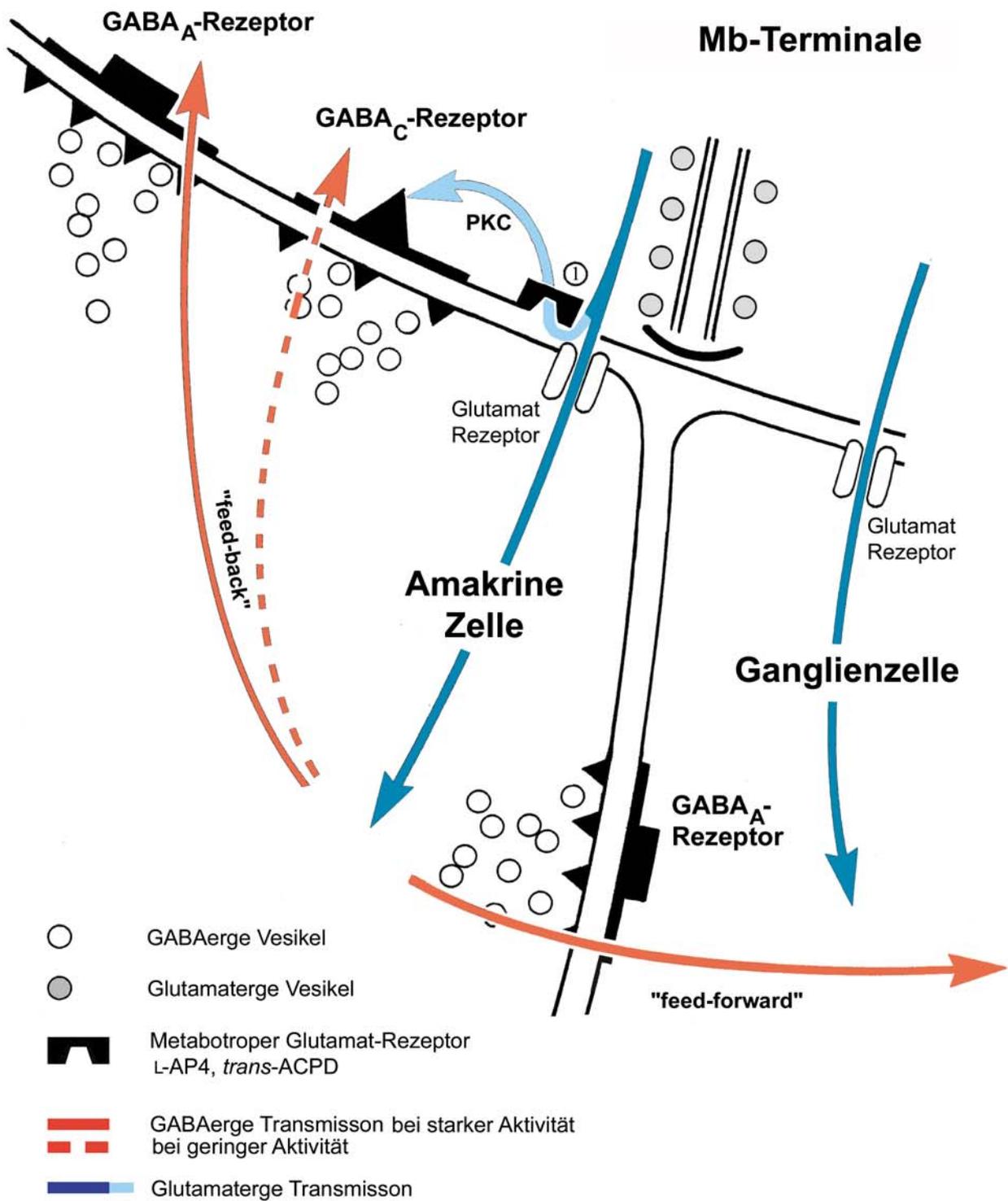


Abb. 4.1.

Schematische Darstellung von GABA-Rezeptoren im Bereich einer Dyade einer Mb-Terminale (modifiziert nach Lukasiewicz 1996).

Die Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt bewirkt über die Aktivierung eines metabotropen Glutamat-Rezeptors ① eine Abschwächung der Leitungseigenschaften der GABA_C-Rezeptoren. Bei geringer GABAerger Aktivität der Amakrinen Zellen kommt es nur zu einer "feed-back" Inhibition der Bipolarzellterminale, wohingegen eine gesteigerte GABAerge Aktivität sowohl eine "feed-back" als auch "feed-forward" Inhibition bewirkt (durchgezogene rote Pfeile).

Inhibition aber auf höhere Konzentrationen von GABA angewiesen.¹¹ Somit läßt sich die Informationsübertragung von Bipolarzelle auf Ganglienzelle durch Veränderung der GABA-Ausschüttung modulieren (Lukasiewicz 1996).

Die enorme Vielfalt in der Zusammensetzung synaptischer Rezeptoren (v.a. der GABA_A-Rezeptoren) und ihre topographische Anordnung¹² ist für die Netzhaut und für die Informationsübertragung bisher nur unzureichend aufgeklärt. Trotzdem kann man vermuten, daß diese Variation der GABA-Rezeptoren auf den Bipolarzellen und auch auf den Ganglienzellen in ihrer Gesamtheit dazu führt, Mechanismen wie die Veränderungen der „Rezeptiven Felder“ in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen zu erklären.¹³

4.7. Räumliche Segregation der inhibitorischen Eingänge auf die Mb-BTs

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden Befunde zu einer räumlich unterschiedlichen Verteilung von Gephyrin- und GABA_C-IR aufgeführt. So befinden sich mehr Gephyrin-IR Flecken auf der distalen Hälfte (photorezeptorwärts) der Mb-Terminale, während die GABA_C-IR Flecken eher auf der proximalen Hälfte liegen. Diese Ergebnisse passen gut zu der Beobachtung, daß die proximale und die distale Hälfte der Mb-Terminale von verschiedenen Subpopulationen von Amakrinzellen synaptische Eingänge erhalten (Yazulla et al. 1987). Wenn man davon ausgeht, daß Gephyrin in der Netzhaut des Goldfisches an der Verankerung und Aggregation von GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren beteiligt ist (GABA_A- und Glyzin-Rezeptor: Koulen 1999; GABA_C-Rezeptor: Hanley et al. 1999), würde das bedeuten, daß es eine räumliche Segregation von verschiedenen inhibitorischen Rezeptoren auf der Oberfläche von Mb-Terminalen gibt.¹⁴ Im folgenden soll eine funktionelle Interpretation der Segregation inhibitorischer synaptischer Orte vorgenommen werden. Dazu ist es zuerst notwendig, die beiden Rezeptorklassen (GABA_A-Rezeptoren auf der einen Seite und GABA_C-Rezeptoren auf der anderen) miteinander zu vergleichen.

Die Rezeptorklassen unterscheiden sich sowohl hinsichtlich der Bindungsaffinität (Feigenspan und Bormann 1994b) als auch der zeitlichen Reaktion (Lukasiewicz und Shields 1998) auf den endogenen Liganden. So benötigt der GABA_C-Rezeptor eine geringere

¹¹ Zum biochemischen Bindungsverhalten der verschiedenen GABA-Rezeptoren siehe auch Tabelle 4.1

¹² Siehe „feed-forward-“ und „feed-back-Inhibition“, Lukasiewicz und Werblin 1994; Lukasiewicz 1996; Lukasiewicz und Shields 1998

¹³ S. hierzu auch: Cook und McReynolds 1998; Haverkamp et al. 1997

¹⁴ Zur Lokalisation der GABA_C-Rezeptoren an Bipolarterminalen s. Vaquero und de la Villa 1999 bzw. für GABA_A-Rezeptoren s. Yazulla et al. 1989

Ligandenkonzentration (GABA), um eine zeitlich langanhaltende Wirkung auf die Zelle auszuüben, die wenig desensitivierende Eigenschaften zeigt. GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren dagegen stehen für eine schnelle und ebenso schnell wieder abklingende Inhibition der Zelle, die dazu hohe Transmitterkonzentrationen benötigt und die auch schnell desensitiviert (siehe Tabelle 4.1). So kann man zusammenfassend sagen, daß die Mb-Terminale zwei ionotrope GABA-Rezeptor-Klassen besitzt: GABA_C-Rezeptoren zur feinmodulierenden Signalabstimmung und GABA_A-Rezeptoren zur starken und effektiven Unterdrückung der Informationsübertragung.

Tabelle 4.1

Eigenschaften von GABA-Rezeptoren (nach H. Qian 2000)

	GABA_A-Rezeptor	GABA_B-Rezeptor	GABA_C-Rezeptor
Kategorie	Ligandengesteuerter Ionenkanal	G-Protein gekoppelter Rezeptor	Ligandengesteuerter Ionenkanal
Untereinheiten	α , β , γ , δ , ϵ , π ,	GBR1, GBR2	ρ
Agonisten	Muscimol, THIP	Baclofen	
Antagonisten	Bicucullin, Picrotoxin	Phaclofen	TPMPA, Picrotoxin
Modulatoren	Benzodiazepine Barbiturate		Zink
Relative Affinität zu GABA	geringe Affinität	hohe Affinität	hohe Affinität
Geschwindigkeit und Ansprechverhalten	schnell	langsam	langsam
Desensibilisierung	ja	nein	nein

Weshalb die langsame feinmodulierende Inhibition durch die GABA_C-Rezeptoren vor allem auf der proximalen Hälfte der Terminale lokalisiert ist, ist bisher nicht verstanden. Die Mb-Terminale erhält synaptische Eingänge von unterschiedlichen GABAergen Amakrinen (Yazulla 1987), deren Rezeptoren mit unterschiedlichem Empfindlichkeitsprofil auf den

endogenen Liganden differentiell verteilt sind. Man kann davon ausgehen, daß verschiedene Amakrin-Zelltypen in unterschiedlichen Zonen auf der Terminale synaptische Kontakte eingehen. Für die IPL ist eine Laminierung (Schichtung) von Fortsätzen von Amakrinen, von Ganglienzellen und von Bipolarterminalen charakteristisch (Cajal 1894; Stell 1972; Rodieck 1973, 1998); dieser Laminierung von „Fortsätzen“ entspricht u.a. eine Laminierung von Synapsen (Guiloff et al. 1988), Neurotransmittern (Marc 1986) oder Rezeptoren (Wässle et al. 1998). Das funktionelle Konzept der Stratifizierung wird dabei v.a. im Sinne der Informationsverarbeitung in parallelen Kanälen interpretiert (Boycott und Wässle 1999).

Wenn man die räumliche Segregation der verschiedenen GABA-Rezeptoren an der Mb-Terminale zusammenfaßt, so kommt man zu dem Schluß, daß eine Bildung von funktionellen Mikrodomänen wahrscheinlich ist. Funktionelle Mikrodomänen findet man auch für andere große synaptische Komplexe, z.B. in Photorezeptorterminalen in der Retina oder den großen Moosfaserterminalen im Hippokampus. Das Wissen um die Zellbiologie dieser großen synaptischen Komplexe steht insgesamt betrachtet erst am Anfang.

4.8. Funktionelle Bedeutung von GABA_C-Rezeptoren und PKC für Mb-Terminalen

In diesem Abschnitt soll auf die Modulation der GABA_C-Rezeptoren in der Goldfischnetzhaute eingegangen werden. Diskutiert werden Aspekte der Modulation von GABA_C-Rezeptoren und die funktionelle Bedeutung von PKC für die Terminalen. Auf die Modulation der GABA_C-Rezeptoren durch Zn²⁺ und Ca²⁺ wird nicht eingegangen.¹⁵

GABA_C-Rezeptoren werden in der Netzhaut auf den Terminalen der gemischten Stäbchen-Zapfen Bipolarzellen wie auch auf Horizontalzellen gefunden (Koulen et al. 1997). Die GABA_C-Rezeptoren werden aus ρ₁- und ρ₂-Untereinheiten zusammengesetzt, welche aus 4 transmembranären Domänen mit einer cytoplasmatischen Schleife zwischen dem Segment M₃ und M₄ bestehen (Cutting et al. 1991, 1992). Diese Schleife besitzt eine ausgeprägte Homologie zu den bisher bekannten Phosphorylierungsstellen von PKC und deutet damit eine Beteiligung von PKC an der Modulation der GABA_C-Rezeptoren an. Es stellte sich heraus, daß die Phosphorylierung durch PKC die Leitungseigenschaften der GABA_C-Rezeptoren verändert. Die Aktivierung von PKC durch Phorbolster führt zu einer Verminderung der Leitfähigkeit der Rezeptoren (Feigenspan und Bormann 1994a). Nach einer Aktivierung von

¹⁵ Siehe hierzu: Dong und Werblin 1994; Wellis und Werblin 1995; Qian und Dowling 1995; Kaneda et al. 1997; Qian et al. 1997 Dong und Werblin 1998

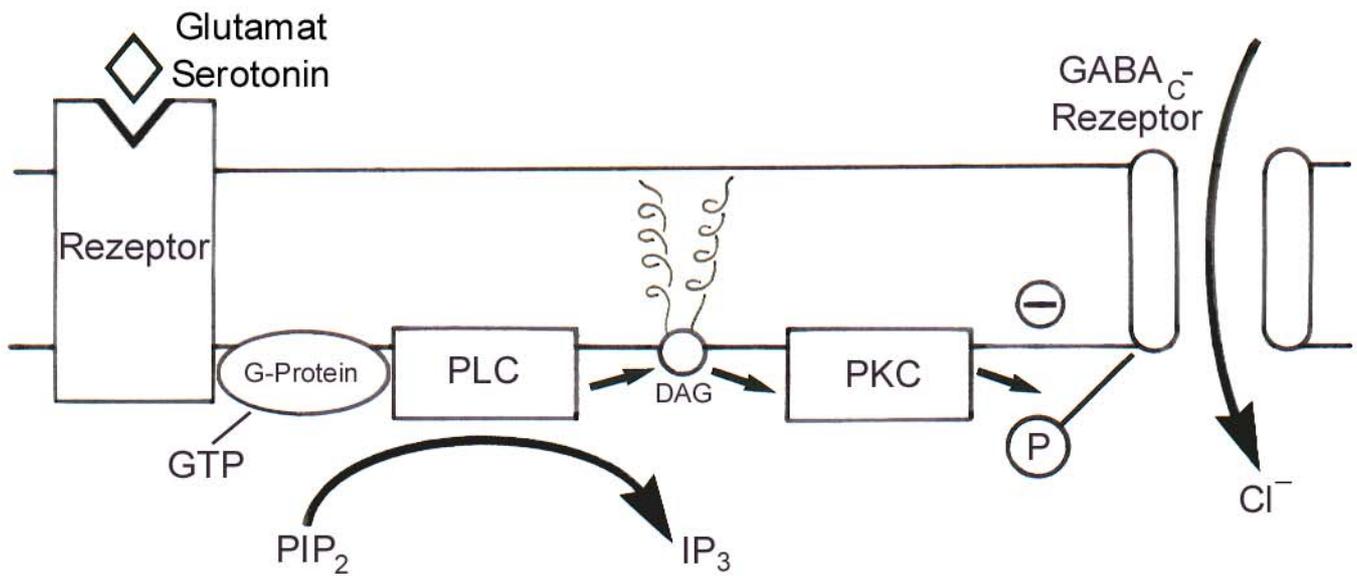


Abb. 4.2.

Modell zur Modulation von GABA_C-Rezeptoren durch Glutamat und Serotonin (modifiziert nach Feigenspan und Bormann 1994).

Durch Bindung von Glutamat oder Serotonin an *L*-AP₄, *trans*-ACPD und 5-HT₂ Rezeptoren kommt es zu einer G-Protein gekoppelten Aktivierung von PLC (Phospholipase C). Über Diacylglycerol (DAG) wird PKC aktiviert, welche wiederum den GABA_C-Kanal phosphoryliert und somit in seinen Leitungseigenschaften inhibiert. Diese Modulationsschritte finden sich in unmittelbarer Nähe der Ribbonsynapsen der Bipolarterminalen (siehe Abb 4.1).

PLC (Phospholipase C) und der Spaltung von Membranlipiden zu PIP_2 (PIP_2 wird dann weiter zu IP_3 umgewandelt) und Diacylglycerol (DAG), aktiviert DAG die PKC, welche die GABA_C -Rezeptoren dann phosphoryliert und dadurch den Cl^- -Einstrom verringert (Feigenspan und Bormann 1994a) (Abb. 4.2.).

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe Abb. 3.1 und 3.13b), konnten sowohl die α - als auch die β_1 -Isoform von PKC in den Mb-Terminalen nachgewiesen werden. Die Verteilung von PKC in den Terminalen zeigten dabei Hell-Dunkel-Unterschiede. Die PKC-IR lag im dunkeladaptierten Zustand eher randständig (membrangebunden) vor, wohingegen die helladaptierte Terminale gleichmäßig mit PKC-IR gefüllt war (diffus). Dieser Umstand wird dadurch erklärt, daß es zu einer Translokation von PKC von der membrangebundenen Form in das zytosolische Kompartiment kommt: Dies wird im allgemeinen mit der Stimulation bzw. Aktivierung von PKC in Verbindung gebracht (Osborne et al. 1992; van der Zee et al. 1997). Aktivitätsabhängige Veränderungen in der Verteilung von PKC in den Terminalen sind in der Literatur bisher wenig beschrieben worden.

Es liegen auch Hinweise vor, daß auch die Leitungseigenschaften der GABA_A -Rezeptoren wie die der GABA_C -Rezeptoren durch PKC moduliert werden können (Siegel et al. 1991; Kellenberger et al. 1992; Leidenheimer et al. 1992; Krishek et al. 1994).

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit, die GABA_C -Rezeptor-vermittelte Inhibition der Bipolarterminalen über die Ligandenbindung der Rezeptoren mit GABA durch Dopamin zu modulieren (Dong und Werblin 1994/1995; Wellis und Werblin 1995). Da Dopamin vor allem im Hellen ausgeschüttet wird, könnte es die GABA_C -Rezeptoren über einen cAMP-abhängigen Weg inhibieren (Dong und Werblin 1994, 1995). Dopamin führt somit zu einer Feineinstellung des inhibitorischen GABAergen Systems, das möglicherweise die „Kontrastschärfe“ Rezeptiver-Felder (von Ganglienzellen) und die synaptische Übertragung von der Bipolarterminale auf die Ganglienzelle beeinflusst (Lukasiewicz 1996; Dong und Werblin 1998).

4.9. Adaptationsabhängige Unterschiede in der Verteilung von SNAP-25-IR in der Goldfischnetzhaut

Die Exozytose von synaptischen Vesikeln wird durch die Dynamik der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration gesteuert (Siegel 1999). Eine Reihe von Proteinen, die an diesem Prozeß beteiligt sind, wurden in jüngster Zeit durch biochemische, genetische und zellbiologische Techniken genauer charakterisiert (Hanson et al. 1997). Im folgenden soll das „synaptosome-associated protein“ mit einer molekularen Masse von 25 kDa (SNAP-25) genauer dargestellt werden.

SNAP-25 wird von vielen Neuronen exprimiert. Man findet es sowohl auf der zytoplasmatischen Seite in Neurotransmittervesikeln als auch in der zytoplasmatischen Hälfte der Plasmamembran (Abb. 4.3). SNAP-25 spielt nach der heute gängigen Vorstellung eine wichtige Rolle bei der Initiierung, dem „Docking“ und der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran. Es bildet zusammen mit Syntaxin I und Synaptobrevin einen stabilen Komplex (Hanson et al. 1997). Die Notwendigkeit dieses Komplexes für die Exozytose ist gut dargestellt. Es ist jedoch nicht endgültig geklärt, wann er gebildet wird und welche Funktion er genau ausübt (Fernández-Chacón und Südhof 1999). Synaptobrevin wird dabei ausschließlich auf den synaptischen Vesikeln gefunden, wohingegen Syntaxin I mit SNAP-25 kolokalisiert ist und sowohl an der präsynaptischen Membran als auch an der Vesikelmembran gefunden wird (Hodel 1998). Die zytosolische ATPase NSF („N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein“) und α -SNAP (soluble NSF attachment protein) katalysieren die Dissoziation des SNAP-25-Syntaxin-Synaptobrevin-Komplexes (bzw. SNARE = SNAP Rezeptor Komplex), indem sie eine Konformationsänderung des Syntaxins bewirken (Wilson et al. 1996; Hanson et al. 1997). Man vermutet, daß dadurch die Vesikel in engeren Kontakt zu Ca^{2+} -Kanälen kommen und dies somit ein wesentlicher Bestandteil der Exozytose-Kinetik ist (Lawrence et al. 1997). Weiterhin kommt es durch Interaktion von SNAP-25 mit Synaptobrevin und Synaptotagmin, welches wahrscheinlich der Ca^{2+} -Sensor der Vesikel sein dürfte, zum „docking“ an der Plasmamembran. Die Bindung von SNAP-25 an Syntaxin I verstärkt dadurch seine Affinität zu Synaptobrevin. Dies erlaubt einen von Synaptotagmin stabilisierten Komplex von Syntaxin und Synaptobrevin auf entgegengesetzten Membranen (Zigmond 1998). Ein zytoplasmatischer Ca^{2+} -Anstieg in der Zelle bewirkt die Dissoziation von Synaptotagmin von dem SNARE Komplex, wonach es dann zur Verschmelzung von Vesikel- und Plasmamembran kommt (Banerjee et al. 1996; Mehta et al. 1996; Wilson et al. 1996) (zur Übersicht siehe Abb. 4.3).

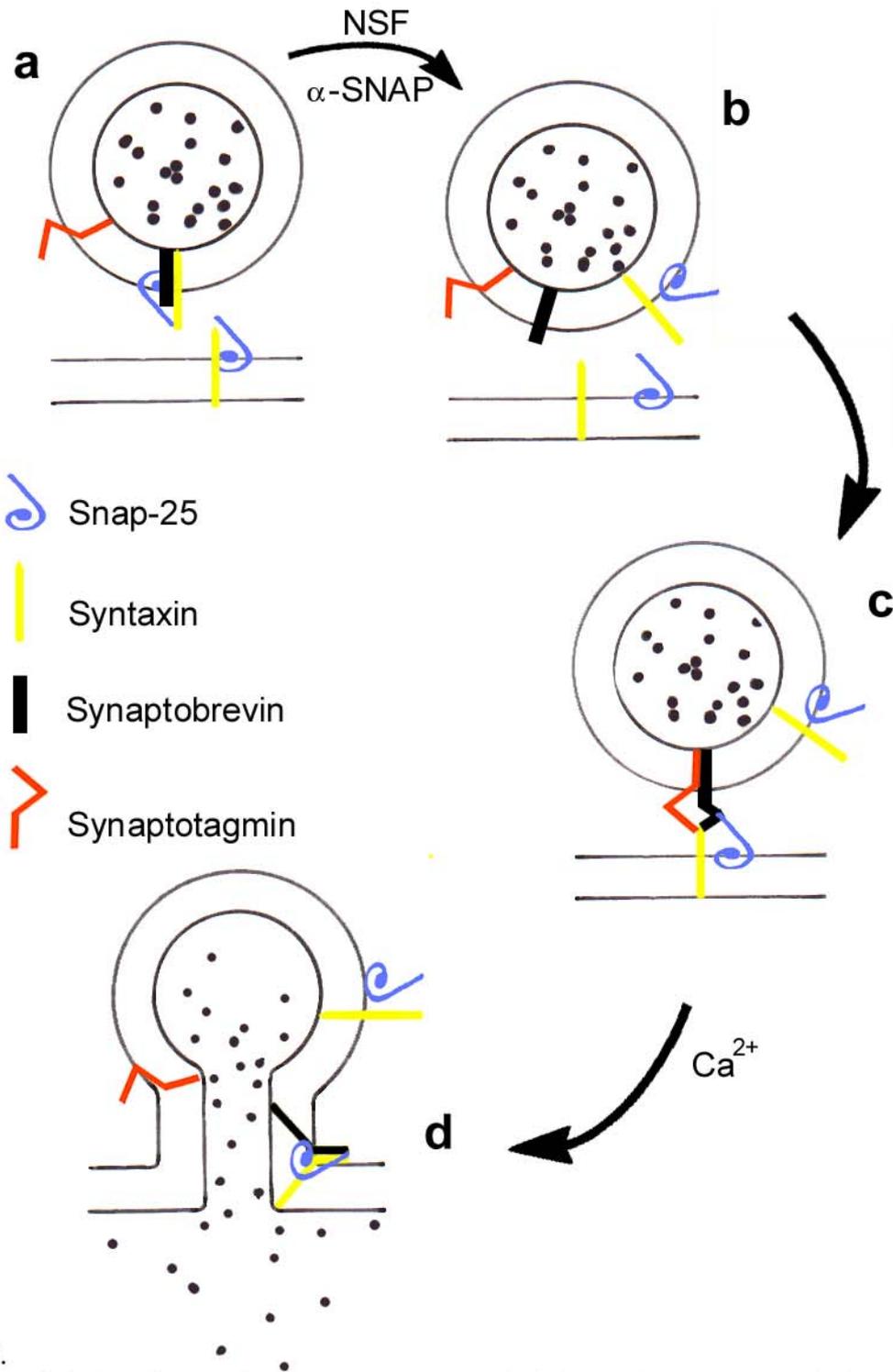


Abb. 4.3.

Modell der funktionellen Bedeutung von SNAP-25 bei der Fusion von synaptischen Vesikeln (modifiziert nach Hodel 1998).

- (a) SNAP-25 und Syntaxin befinden sich sowohl auf der Plasma- als auch auf der Vesikelmembran, wohingegen Synaptotagmin und Synaptobrevin nur vesikulär vorkommen.
- (b) Der SNARE Komplex dissoziiert durch die Aktivierung von α -SNAP und NSF und ermöglicht das "docking" durch Interaktion des Carboxyterminalen Endes von SNAP-25 und Synaptobrevin, Syntagmin oder noch bislang unbekannter Proteine (c).
- (d) Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bewirkt die Dissoziation von Synaptotagmin vom SNARE Komplex und ermöglicht zusammen mit einer Konformationsänderung des SNARE Komplexes die Verschmelzung des Vesikels mit der Plasmamembran (d).

Dieses Modell für die Ausschüttung von Transmitter in den synaptischen Spalt ist für konventionelle chemische Synapsen etabliert. Die in dieser Arbeit untersuchten Ribbon-Synapsen der Mb-Terminalen unterscheiden sich in vielfältiger Weise von den konventionellen chemischen Synapsen. So sind Synapsine, die eine bedeutende Funktion beim Vesikeltransport („recruiting“) zur synaptisch „aktiven Zone“ haben (Greengard et al. 1993; Pieribone et al. 1995; Rosahl et al. 1995), nicht in Ribbon-Synapsen zu finden (Brandstätter et al. 1996). Man vermutet, daß die Proteine der synaptischen Ribbons diese Aufgabe übernehmen (Parsons et al. 1994; Rao-Mirotnik et al. 1995). Des weiteren wird die Kontrolle der Exozytose in konventionellen Synapsen von Ca^{2+} -Kanälen vom N- oder P-Typ gesteuert (Dunlap et al. 1995), wohingegen die Ribbon-Synapsen den L-Typ des Ca^{2+} -Kanals verwenden (Heidelberger und Matthews 1992; Juusola et al. 1996; Matthews et al. 1998; Satoh et al. 1998). Außerdem findet man in Bipolarzellen kein Syntaxin-1, Syntaxin-3 und SNAP-25 dagegen sind vorhanden (Brandstätter et al. 1996; Morgans et al. 1996). Aus all diesen Erkenntnissen kann man schließen, daß die Ribbon-Synapsen zwar viele Ähnlichkeiten mit dem Exozytosemechanismus der konventionellen Synapsen aufweisen, jedoch auch ihre eigene Spezialisierung zeigen.¹⁶

Der Ergebnisteil zeigt SNAP-25-IR sowohl in der IPL als auch in der OPL. Das Signal in der OPL befand sich in den Photorezeptorterminalen. Damit konnten die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt werden (siehe Brandstätter et al. 1996), welche SNAP-25 in den Photorezeptoren und Bipolarzellen nachweisen. Die lichtmikroskopische Verteilung der SNAP-25-IR in der OPL zeigte Hell-Dunkel-Unterschiede. Diese Unterschiede können mit der variablen Aktivität der Photorezeptorterminalen korreliert werden. Im Hellen sind die Terminalen weniger aktiv, d.h., sie schütten weniger Transmitter aus als im Dunkeln, wo eine beständige tonische Ausschüttung von Transmitter stattfindet (Dowling 1987). Der beständige Vesikelumsatz führt möglicherweise dazu, daß das vesikelgebundene SNAP-25 sich gleichmäßiger über die Photorezeptorterminale verteilt, wohingegen im Hellen die Vesikel gebunden an den Ribbons und in nächster Nähe zur Fusionsstelle „lagern“. Dadurch beobachten wir im Hellen eine „zusammengeballte“ Immunoreaktivität in dem proximalen, den invaginierenden Horizontalzellfortsätzen zugewandten Abschnitt der Photorezeptorterminale.

Diese Überlegungen sind auch auf die überlappenden subplasmatischen Fluoreszenzsignale in den Mb-Terminalen anwendbar. Daß sich die „patches“ in den dunkeladaptierten Mb-

¹⁶ Siehe hierzu auch: Morphologie und Plastizität der Mb-BTs

Terminalen deutlicher abzeichnen, läßt sich durch eine geringere Aktivität und einem damit verbundenen geringeren Umsatz der synaptischen Vesikel in der Mb-Terminale erklären. Im Dunkeln könnten somit die synaptischen Vesikel subplasmatisch gelagert auf einen Reiz zur Ausschüttung warten (sozusagen auf „stand by“), während im Hellen ein beständiger Vesikelumsatz die Lagerung und Aggregation subplasmatisch verhindert.

In der IPL der Goldfischnetzhaute konnten wir bis auf einen stärker „streifigen“ (im Dunkeln) bzw. „klumpigen“ Gesamteindruck (in der helladaptierten Netzhaut) keine weiteren Unterschiede feststellen. Unterschiede in der Immunreaktivität von Sublamina a und b waren nicht zu erkennen. Anfänglich galt die Hypothese, daß man Unterschiede in der SNAP-Markierung erkennen sollte, wenn man vereinfachend annimmt, daß die beiden Sublaminae der IPL global jeweils entgegengesetzt „aktiver“ oder „weniger aktiv“ sind. Nun ist festzustellen, daß die ON-OFF Gliederung der IPL lediglich funktionell und physiologisch für neuronale Elemente (Bipolarzellen, Amakrine und Ganglienzellen) gültig ist. Auch kann man von einer Ausgewogenheit der ON-OFF Ein- und Ausgänge sprechen; hieraus lassen sich jedoch nur spekulativen Aussagen zur SNAP-25-Verteilung ableiten, wobei sich diese Vermutungen selbst experimentell nicht einfach überprüfen lassen.

Die vorschnelle Annahme, daß SNAP-25-IR aktivitätsabhängig in den Terminalen unterschiedlich verteilt wird – diese Verteilung hätte man dann auch in der IPL sehen müssen - muß zumindest für die IPL relativiert werden. Eine weitere Besonderheit der IPL besteht darin, daß hier heterogenere Synapsenpopulationen vorliegen als in der OPL. In der OPL findet man hauptsächlich die Ribbon-Synapsen in den Photorezeptorterminalen; in der OPL der Cypriniden und speziell bei Cichliden zeigen sich außerdem noch Fasern dopaminergere Zellen, die in der Nähe von Photorezeptorterminalen ihren Transmitter freisetzen (Wagner und Wulle 1992).

Es gibt Hinweise darauf, daß es zu einer aktivitätsabhängigen Phosphorylierung von SNAP-25 durch PKC (Genoud et al. 1999) kommt. Eine Beteiligung von SNAP-25 an der Langzeitpotenzierung im Hippokampus der Ratte konnte ebenfalls gezeigt werden (Roberts et al. 1998).

4.10. Die „Quantal-size“ korreliert mit der Größe der postsynaptischen Region

Man nimmt heute an, daß Lernen und Gedächtnis durch eine Änderung der Anzahl und „Effektivität“ von Synapsen verursacht werden (Hebb 1948; Wallace et al. 1991; Squire und Kandel 1999). Um die molekularen Mechanismen von Lernen und Gedächtnis zu verstehen, konzentrierten sich die modernen Neurowissenschaften auf die strukturellen und physiologischen Veränderungen von Synapsen (Wallace et al. 1991; Edwards 1995a, b; Walmsley et al. 1998). In den vorausgegangenen Abschnitten wurden bereits verschiedene Mechanismen von synaptischer Plastizität vorgestellt. Plastizität kann sich dabei sowohl präsynaptisch¹⁷ als auch postsynaptisch¹⁸ zeigen. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß es über einen retrograden Messenger (NO und/oder Arachidonsäure) zu einer Kopplung von prä- und postsynaptischen Komponenten plastischer Veränderungen kommt (Bazan et al. 1997; Hawkins et al. 1998). Im folgenden soll nun auf die synaptischen Plastizität der Postsynapse und im besonderen auf die „quantal size“ eingegangen werden.

Synaptische Kontakte zwischen Neuronen des ZNS sind hoch spezialisierte Membrandomänen, in welchen die postsynaptischen Rezeptoren (dicht zusammengeballt in „Clustern“) in enger Nachbarschaft zur Zone der präsynaptischen Transmitterausschüttung stehen (Siekevitz 1985; Walmsley 1991; Kirsch et al. 1996; Nusser et al. 1997; Colledge et al. 1998; Walmsley et al. 1998). Eine beträchtliche Variationsbreite in Größe und Form der synaptischen Zonen ist in der Literatur beschrieben und korreliert möglicherweise mit unterschiedlichen funktionellen Aktivitätsparametern (Lisman und Harris 1993; Nusser et al. 1997; Schikorsky und Stevens 1997; Nusser et al. 1998; Walmsley 1998).

Bei einer einzelnen Synapse hängt die Größe des postsynaptischen Stroms theoretisch von der Konzentration und dem zeitlichen Verhalten des Transmitters im synaptischen Spalt und dem Transmitterbindungsverhalten der postsynaptischen Rezeptoren ab (Clements 1996). Erreicht die ausgeschüttete Transmittermenge eine sättigende Konzentration, so bildet die absolut zur Verfügung stehende Rezeptoranzahl den limitierenden Faktor für die Größe des postsynaptischen Stroms (Clements 1996). Vorausgehende Arbeiten zeigten eine große Variabilität sowohl der postsynaptischen „Cluster-Größe“ als auch der Amplitude der postsynaptischen Ströme (Walmsley et al. 1998). Dabei variierte nicht nur die „Cluster-

¹⁷ Als Beispiele siehe zur Vesikeldynamik: von Gersdorff et al. 1996; Angleson und Betz 1997

Zur Rolle von Kalzium: Verhage et al. 1994

Zur Beteiligung der CAM II Kinase: Chapman et al. 1995

¹⁸ Entwicklungsabhängige Veränderung in der Rezeptorverteilung: Arai et al. (1997)
Postsynaptische Rezeptorzunahme: Nusser et al. 1998

Größe“ einzelner Neuronen, sondern auch die gemittelte postsynaptische „Cluster-Größe“ zwischen einzelnen Populationen verschiedener Neuronen (Alvarez et al. 1997). Es zeigte sich, daß die Größe, z.B. von Glyzin-Rezeptor Clustern entlang des Dendritenbaums, mit zunehmender Entfernung vom Zellsoma zunimmt (Triller et al. 1990; Alvarez et al. 1997). Dies führte zu der Hypothese, daß hieraus eine Kompensation der Abschwächung der postsynaptischen Potentiale bzw. Ströme auf ihrem Weg entlang des Dendritenbaums zum Zellsoma resultiert (Triller et al. 1990; Alvarez et al. 1997).

Die „Größenzunahme“ der Postsynapse ist häufig von einer Perforierung der postsynaptischen Zone begleitet (Lisman und Harris 1993; Lim et al. 1999). Diese Perforierung vollzieht sich u.a. durch Bildung eines Spinules und führt möglicherweise zu einer Diffusionsbarriere für den Transmitter (Triller et al. 1990; Lisman und Harris 1993; Nusser et al. 1998; Walmsley et al. 1998; Lim et al. 1999). 1999 legten Lim, Alvarez und Walmsley darüber hinaus Hinweise darauf vor, daß die postsynaptischen Ströme direkt mit der postsynaptischen Rezeptorregion glyzinerger Synapsen korrelieren (Nusser et al. 1997; Walmsley et al. 1998). Dies wird sehr wahrscheinlich von einer Insertion weiterer Glyzin-Rezeptoren in die postsynaptische Zone begleitet (Kirsch et al. 1993; Meyer et al. 1995; Kirsch und Betz 1995, 1998). Im folgenden muß die Frage aufgeworfen werden, inwieweit diese Befunde die Interpretation der hier präsentierten Ergebnisse beeinflussen.

Im Ergebnisteil und in der Diskussion der Gephyrin-IR wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Größe und Intensität der Immunoreaktivitäten breit variierten. Diese Ergebnisse könnten in Hinblick auf die obigen Ausführungen dahingehend interpretiert werden, daß es sich bei den beobachteten Gephyrin-IR Flecken um inhibitorische Synapsen handelt, die unterschiedlich große Ströme vermitteln. Die Zellen sind nach dem von Lim et al. (1999) vorgeschlagenen Modell in der Lage, die Übertragungsstärke, bzw. im vorliegenden Fall die Inhibition, durch Insertion weiterer Rezeptoren zu modulieren. Weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der Größe, Verteilung und Intensität der Gephyrin-IR auf den Mb-Terminalen wurden nicht durchgeführt. Dazu wäre es u.a. notwendig gewesen, einzelne Zellen enzymatisch zu dissoziieren und einer standardisierten Untersuchung zugänglich zu machen.

Die Immunoreaktivität der GABA_C-Rezeptoren unterschied sich von der Gephyrin-IR. Während in den Schnitten die Gephyrin-IR eine ausgeprägte Heterogenität in der Größe der Immunoreaktiven-Flecken zeigte, war die Größe der GABA_C-IR Spots dagegen auffallend einheitlich, was die Bedeutung von PKC bei der Modulation der inhibitorischen Ströme verdeutlicht.

5.0. Zusammenfassung

Die großen Axonterminalen der Mb-Bipolarzellen aus der Goldfischnetzhaute entwickelten sich in den letzten Jahren zu einem etablierten Modell zur Untersuchung der Präsynapse. Die Mb-Bipolarterminalen zeigen adaptionsabhängige morphologische Veränderungen der Gestalt der Terminalen (Kurvatur), der Anzahl endständiger Anschwellungen von Fortsätzen der Terminalen und der Anzahl fingerförmiger Spinules. Nicht bekannt ist, ob und inwieweit die strukturellen Veränderungen der Mb-Bipolarterminalen Folgen hat für die Expression und Verteilung prä- und postsynaptischer Proteine in bzw. an der Terminalen.

Mittels immunhistochemischer Methoden wurden prä- und postsynaptische Proteine an hell- und dunkeladaptierten Mb-Bipolarterminalen untersucht. Die Auswahl der Antikörper zur Markierung von Postsynapsen erfolgte unter dem Gesichtspunkt, elektrophysiologisch verschiedene inhibitorische Rezeptoren zu erfassen. Es wurden Antikörper gegen Gephyrin, ein 93kD großes Protein, das an der Verankerung und Aggregation von GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren beteiligt ist, und gegen die Rho-Untereinheit des GABA_C-Rezeptors verwendet. Die Anfärbung der Präsynapse erfolgte mit einem Antikörper gegen SNAP-25, ein Protein, das am „docking“ und „fusion“ Prozeß synaptischer Vesikel beteiligt ist. Die Anfärbung der Mb-Bipolarzellen erfolgte mit einem Antikörper gegen PKC.

Lichtmikroskopisch wurde in der IPL eine fleckenförmige Verteilung der Gephyrin-IR gefunden, mit einer „Laminierung“ bei 23, 37, 62 und 77% in der IPL. An den Mb-Bipolarterminalen ist Gephyrin-IR am zentralen Element und an den Fortsätzen lokalisiert, mit einer deutlichen Häufung auf der äußeren (distalen) Seite, d.h. der den Photorezeptoren zugewandten Hälfte der Terminalen, und an der Einmündung des Axons in die Mb-Terminalen. Ultrastrukturell wurde Gephyrin-IR auf der Seite von Postsynapsen gefunden. Etwa 30% der Mb-Spinules waren Gephyrin-IR, wobei die Gephyrin-IR Spinules ausschließlich auf der distalen Hälfte der Terminalen gefunden wurden. Diese Beobachtung führt zu zwei Schlußfolgerungen: 1) Zum einen sind Spinules heterogen; die Heterogenität bezieht sich hier auf die neurochemische Heterogenität. 2) Zum anderen ist die räumliche Beschränkung dieser Subpopulation der Gephyrin-IR Spinules auf der äußeren (distalen) Seite der Terminalen höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit diskreten AC-Populationen zu sehen, die an dem großen synaptischen Komplex der Mb-Terminalen in unterschiedlichen Zonen ihre zumeist inhibitorischen Eingänge „einspeisen“.

Eine Häufung der „fleckenförmigen“ GABA_C-Rezeptor-IR wurde auf der den Ganglienzellen zugewandten Seite der PKC-IR Mb-Bipolarterminalen gefunden. Neben diesen „korbähnlichen“ GABA_C-Rezeptor-IR an den Mb-Terminalen waren auch die lateralen Fortsätze der Bipolarterminalen GABA_C-Rezeptor-IR. Gephyrin- und GABA_C-Rezeptor-IR waren nicht kolokalisiert. Auffällig war dabei die einheitliche Größe der GABA_C-Rezeptor-IR im Vergleich zur heterogenen Größe der Gephyrin-IR.

Unterschiede in der adaptionsabhängigen Verteilung von Gephyrin- und GABA_C-Rezeptor-IR wurden nicht gefunden.

Die Untersuchung inhibitorischer synaptischer Orte zeigt eine differentielle Verteilung unterschiedlich sensibler inhibitorischer Eingänge an den Mb-Terminalen (Gephyrin stellvertretend für GABA_A- und Glyzin-Rezeptoren: auf der distalen Hälfte; GABA_C-Rezeptoren: auf der proximalen Hälfte); diese differentielle Verteilung inhibitorischer synaptischer Orte kann im Sinne einer funktionellen Kompartimentalisierung der Terminalen interpretiert werden. Die Betrachtung der Mb-Terminals von außen als „funktionelle Einheit“ wird also der Tatsache nicht gerecht, daß neuronale Signalübertragung an der Terminalen jeweils an vielen lokal verteilten Mikrodomänen vonstatten geht; synaptische Ereignisse an einer Mikrodomäne können daher für die Terminalen als ganze eher bedeutungslos sein.

Die Untersuchung von synaptischen Mikrodomänen an diesen Bipolarterminalen wird gegenwärtig dadurch noch eingeschränkt, daß die genauen Partner (Amakrine und Ganglienzellen) der Mb-Bipolarterminalen unzureichend charakterisiert sind.

Der präsynaptische Marker SNAP-25 wurde immunhistochemisch in der OPL und in der IPL gefunden, und zwar in Ribbon-Synapsen (Zapfen-, Stäbchen- und Bipolarterminalen) und in konventionellen chemischen Synapsen. Es wurden Hinweise auf adaptionsabhängige Unterschiede in der Verteilung der SNAP-25-IR in der IPL und OPL gefunden. Dunkeladaptierte Zapfenfüße zeigten eine diffuse Verteilung von SNAP-25-IR im Zytoplasma, während in helladaptierten die SNAP-25-IR eher im „Zentrum“ der Zapfenfüße aggregiert erschien. In der IPL waren die adaptionsabhängigen Unterschiede in der Verteilung der SNAP-25-IR weniger deutlich ausgeprägt. Mb-Terminals sind zwar SNAP-25-IR, deutliche adaptionsabhängige Unterschiede wurden aber nicht gefunden. Unterschiede in der SNAP-25-IR in den Sublaminae a bzw. b der IPL waren nicht zu erkennen.

Aus diesen Befunden ist zu schließen, daß SNAP-25 sicher kein ideales Protein ist, um langsame adaptionsabhängige dynamische Vorgänge an der Mb-Terminals zu untersuchen. Es muß an dieser Stelle offen bleiben, ob sich mit Hilfe anderer Antikörper, z.B. SV2, aktivitätsabhängige Veränderungen in der Dynamik synaptischen Vesikel darstellen lassen.

6.0. Literaturverzeichnis

- Abel T., Nguyen P.V., Barad M., Deul T.A.S., Kandel E.R. (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.
- Abeles M. (1991) *Corticonics. Neural circuits of the cerebral cortex.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Akissar E., Vaadia E., Akissar M., Bergman H., Arieli A., Abeles M. (1992) Dependence of cortical plasticity on correlated activity of single neurons and in behavioral context. *Science* 257:1412-1415.
- Ali M.A. (1975) Retinomotor responses. In Ali, M.A. (ed) *Vision in Fishes. New approaches in research,* New York, Plenum., pp. 313-356.
- Arai Y., Mizuguchi M., Takashima S. (1997) Developmental changes of glutamate receptors in the rat cerebral cortex and hippocampus. *Anat. Embryol. Berl.* 195:65-70.
- Alvarez F.J., Dewey D.E., Harrington D.A., Fyffe R.E.W. (1997) Cell-type specific organization of glycine receptor clusters in the mammalian spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 279:150-170.
- Angleson J.K., Betz W.J. (1997) Monitoring secretion in real time: capacitance, amperometry and fluorescence compared. *Trends Neurosci.* 20:281-287.
- Ayoub G.S., Matthews G. (1992) Substance P modulates calcium current in retinal bipolar neurons. *Visual Neurosci.* 8:539-544.
- Bailey C.H., Thompson E.B., Castellucci V.F., Kandel E.R. (1979) Ultrastructure of the synapses of sensory neurons that mediate the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J. Neurocytol.* 8:415-444.
- Bannerjee A., Kowalchuk J.A., DasGupta B.R., Martin T.F.J. (1996) SNAP-25 is required for a late post docking step in Ca^{2+} -dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* 271:20227-20230.
- Barnes J. (1984) *The complete works of Aristotle. Vol I, On Memory,* pp. 714-720.
- Barondes S.H., Cohen H.D. (1968) Arousal and the conversion of short-term to long-term memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61:923-929.
- Bashir Z.I., Botolotto Z.A., Davies C.H., Berreta N., Irving A.J., Seal A.J., Henley J.M., Jane D.E., Watkins J.C., Collingridge G.L. (1993) Introduction of TLP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* 363:347-350.
- Baylor D.A., Fuortes M.G., O'Bryan P.M. (1971) Receptive fields of cones in the retina of the turtle. *J. Physiol.* 214:265-294.
- Bazan N.G., Packard M.G., Teather L., Allan G. (1997) Bioactive lipids in excitatory neurotransmission and neuronal plasticity. *Neurochem. Int.* 30:225-231.
- Becker C. M., Hermans-Borgmeyer I., Schmitt B., Betz H. (1986) The glycine receptor deficiency of the mutant mouse spastic: evidence for normal glycine receptor structure and localization. *J. Neurosci.* 6: 1358-1364.
- Behrens U.D., Kirsch M., Wagner H.-J. (1992) c-Amp mediated second messenger mechanisms are involved in spinule formation in teleost cone horizontal cells. *Neurosci. Lett.* 147:93-96.
- Behrens U.D., Wagner H.-J. (1996) Adaptation dependent changes on bipolar cell terminals in the goldfish retina: differential effects on overall morphology and spinule formation in Ma and Mb cells. *Vision Res.* 36:3901-3911.
- Behrens U.D., Kasten P., Wagner H.-J. (1998) Adaptation-dependent plasticity of rod bipolar cell axon terminal morphology in the rat retina. *Cell Tissue Res.* 194:243-251.

- Behrens U.D., Lutz S.P., Wagner H.-J. (1999) Adaption-dependent Plasticity of Mb Bipolar Axon Terminals in Goldfish Retina: Time Course and Role of Dopamine (Manuskript).
- Besharse J.C., Iuvone P., Pierce M.E. (1988) Regulation of rhythmic photoreceptor metabolism: a role for post-receptor neurons. *Prog. Ret. Res.* 7:21-61.
- Betz H. (1998) Gephyrin, a major player in GABAergic postsynaptic membrane assembly? *Nature neurosci.* 1:541-543.
- Bliss T.V.P., Lomo T. (1973) Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (London)* 232:331-356.
- Bliss T.V.P., Collingridge G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term-potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bolshakov V.Y., Golan H., Kandel E.R., Siegelbaum S.A. (1997) Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP-dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus. *Neuron* 19:635-651.
- Bormann J., Hamill O.P., Sakmann B. (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J. Physiol. (London)* 385:243-286.
- Bormann J., Feigenspan A. (1995) GABA_C receptors. *Trends Neurosci.* 12:515-521.
- Bowery N. (1989) GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 10:401-407.
- Boyott B., Wässle H. (1999) Parallel processing in the mammalian retina – The Proctor Lecture. *Inves. Ophthalm. Vis. Sci.* 40:1313-1327.
- Boyne A.F., Tarrant S.B. (1982) Pseudopodial interdigitations between abutted nerve terminals: diffusion traps which occur in several nuclei of the rat limbic system. *J. Neurosci.* 2:463-469.
- Bozhilova-Pastirova A., Ovtcharoff W. (1999) Intramembranous structure of synaptic membranes with special reference to spinules in the rat sensorimotor cortex. *Eur. J. Neurosci.* 11:1843-1846.
- Braitenberg V., Schüz A. (1991) *Anatomy of the cortex.* Springer Berlin Heidelberg New York.
- Brandstätter J.H., Wässle H., Betz H., Morgans C.W. (1996) The plasma membrane protein SNAP-25, but not Syntaxin, is present at photoreceptor and bipolar cell synapses in the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 8:823-828.
- Buchs P.A., Müller D. (1996) Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8040-8045.
- Burns M.E., Augustine G.J. (1995) Synaptic structure and function: dynamic organization yields architectural precision. *Cell* 83:187-194.
- Cajal S.Y.R. (1894) *Die Retina der Wirbeltiere.* Hrsg. von Greeff R., Wiesbaden, Verlag von J.F. Bergmann
- Calverley R.K., Jones D.G. (1987) A serial-section study of perforated synapses in rat neocortex. *Cell Tissue Res* 247, 565-572
- Calverley R.K., Jones D.G. (1990) Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res.* 15:125-249.
- Carlson N.R. (1991) *Physiology of behavior*, 4th edn. Allyn and Bacon, Boston.
- Chang E. Y., Szallasi Z., Acs P., Raizada V., Wolfe P. C., Fewtrell C., Blumberg P. M., Rivera J. (1997) Functional effects of overexpression of protein kinase C- α , - β , - ϵ , and - η in the mast cell line RBL-2H3. *J. of Immunology* 159:2624-2632.

- Chapman P.F., Frenguelli B.G., Smith A., Chen C.M., Silva A.J. (1995) The alpha-Ca²⁺/calmodulin kinase II: a bidirectional modulator of presynaptic plasticity. *Neuron* 14:591-597.
- Chicurel M.E., Harris K.M. (1992) Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 325:169-182.
- Chieriegatti E., Ceccaldi P.E., Benfenati F., Valtora F. (1996) Effects of synaptic vesicles on actin polymerization. *FEBS Lett.* 398:211-216.
- Chun M.H., Wassle H. (1989) GABA-like immunoreactivity in the cat retina: electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 279:55-67.
- Chun M.H., Han S.H., Chung J.W., Wassle H. (1993) Electron microscopic analysis of the rod pathway of the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 332:421-432.
- Clements J.D. (1996) Transmitter time course in the synaptic cleft: its role in central synaptic function? *Trends Neurosci.* 19:163-171.
- Colledge M., Froehner S.C. (1998) To muster a cluster: anchoring neurotransmitter receptors at synapses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95:3341-3343.
- Collingridge G.L., Bliss T.V. (1995) Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci.* 18:54-56.
- Cook P.B., McReynolds J.S. (1998) Lateral inhibition in the inner retina is important for spatial tuning of ganglion cells. *Nature Neurosci.* 1:714-719.
- Craig A.M., Banker G., Chang W., McGrath M.E., Serpinskaya A.S. (1996) Clustering of Gephyrin at GABAergic but Not Glutamatergic Synapses in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 16:3166-3177.
- Cutting G.R., Lu L., O'Hara B.F., Kasch L.M., Montrose-Rafizadeh C., Donovan D.M., Shimada S., Antonarakis S.E., Guggino W.B., Uhl G.R., Kazazin H.H. (1991) Cloning of γ -aminobutyric acid (GABA) ρ 1 cDNA: A GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2673-2677.
- Cutting G.R., Curristin S., Zoghbi H., O'Hara B.F., Selding M.F., Uhl G.R. (1992) Identification of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho2 cDNA and colocalization of the genes encoding rho2 (GABRR2) and rho1 (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics* 12:801-806.
- Das M., Stenmark K. R., Ruff L. J., Dempsey E. C. (1997) Selected isozymes of PKC contribute to the augmented growth of fetal and neonatal bovine PA adventitial fibroblasts. *American J. Physiology* 273:L1216-L1284.
- Davis H.P., Squire L.R. (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.* 96:518-559.
- Dearry A., Edelman J.L., Miller S., Burnside B. (1990) Dopamine induces light-adaptive retinomotor movements in bullfrog cones via D2 receptors and in retinal pigment epithelium via D1 receptors. *J. Neurochem.* 54:1367-1378.
- Desmond N.I., Levy W.B. (1986a) Synaptic interface surface area increases with long-term-potential in the hippocampal dentate gyrus. *Brain Res.* 453:308-314.
- Desmond N.I., Levy W.B. (1986b) Anatomy of associative long-term synaptic modification. In Landfield P.W. and Deadwyler S.A. (eds), *Neurology and Neurobiology 35, Long-Term-Potential: from Biophysics to Behavior*, New York, Alan R. Liss, pp. 265-305.
- DeVries S.H., Schwartz E.A. (1989) Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. *J. Physiol.* 414:351-375.
- DeVries S.H., Schwartz E.A. (1992) Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *J. Physiol.* 445:201-230.

- DeVries S.H., Baylor D.A. (1993) Synaptic circuitry of the retina and olfactory bulb. *Cell* 72 / *Neuron* 10 (Suppl.) 139-149.
- Djamgoz M.B.A., Wagner H.-J. (1992) Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem. Intern.* 20, 139-191.
- Dong C.-J., McReynolds J.S. (1991) The relationship between light, dopamine release and horizontal cell coupling in the mudpuppy retina. *J. Physiol.* 440:291-309.
- Dong C.-J., Werblin F.S. (1994) Dopamine modulation of GABA_C receptor function in an isolated retinal neuron. *J. Neurophysiol.* 71:1258-1260.
- Dong C.J., Werblin F.S. (1998) Temporal contrast enhancement via GABA_C feedback at bipolar terminals in the tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 79:2171-2180.
- Douglas R.H., Wagner H.-J. (1983) Endogenous control of spine formation in horizontal cells of the teleost retina. *Cell. Tiss. Res.* 229:443-449.
- Dowling J.E. (1987) *The Retina. An approachable part of the brain.* Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Dowling J.E., Ehinger B. (1978) The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. *Proc. Roy. Soc. London Series B* 201:7-26.
- Drew C.A., Johnston G.A.R., Weatherby R.P. (1984) Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci. Lett.* 52:317-322.
- Dubnau J., Tully (1998) Gene discovery in drosophila; new insights for learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 21:407-444.
- Dunlap K., Luebke J.I., Turner T.J. (1995) Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 18:89-98.
- Dyson S.E., Jones D.G. (1984) Synaptic remodelling during development and maturation: Junction differentiation and splitting as a mechanism for modifying connectivity. *Dev. Brain Res.* 13:125-137.
- Eccles J.C. (1964) *Physiology of Synapses.* Springer Verlag, Berlin.
- Edwards F.A. (1995a) LTP – a structural model to explain the inconsistencies. *Trends Neurosci.* 18:250-255.
- Edwards F.A. (1995b) Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term-potential. *Physiol. Rev.* 75:759-787.
- Eldred W.D., Zucker C., Karten H.J., Yazulla S. (1983) Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 13:285-292.
- Engert F., Bonhoeffer T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70.
- Enz R., Bormann J. (1995) Expression of glycine receptor subunits and gephyrin in single bipolar cells of the rat retina. *Visual Neurosci.* 12:501-507.
- Enz R., Brandstätter J.H., Wässle H., Bormann J. (1996) Immunocytochemical localization of the GABA_C receptor ρ subunits in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 16:4479-4490.
- Essrich C., Lorez M., Benson J.A., Fritschy J.-M., Lüscher B. (1998) Postsynaptic clustering of major GABA_A receptor subtypes requires the γ 2 subunit and gephyrin. *Nature Neurosci.* 1:563-571.
- Fallah Z., Clowry G.J. (1999) Gephyrin-like immunoreactivity is a marker for growing axons in the central nervous system of the immature rat. *Dev. Neurosci.* 21:50-57.
- Feigenspan A., Wässle H., Bormann J. (1993) Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* 312:449-451.
- Feigenspan A., Bormann J. (1994a) Modulation of GABA_C receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J. Physiology* 481:325-330.

- Feigenspan A., Bormann J. (1994b) Differential pharmacology of GABA_A and GABA_C receptors on retinal bipolar cells. *Eur. J. Pharmacol. Molec. Pharmacol. Sect.* 288:97-104.
- Feigenspan A., Bormann J. (1998) GABA gated Cl⁻ channels in the rat retina. *Prog. Retinal and Eye Res.* 17:99-126.
- Feng G., Tintrup H., Kirsch J., Nichol M.C., Kuhse J., Betz H., Sanes J.R. (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* 282:1321-1324.
- Fernández-Chacón R., Südhof T.C. (1999) Genetics of synaptic vesicle function: toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annu. Rev. Physiol.* 61:753-776.
- Finger S. (1994) *Origins of Neuroscience*. New York, Oxford University Press.
- Fischer M., Kaech S., Knutti D., Matsuda A. (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847-854.
- Fox A.P., Nowycky M.C., Tsien R.W. (1987) Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons. *J. Physiology (London)* 394:149-172.
- Frey U., Huang Y.Y., Kandel E.R. (1993) Effects of cAMP stimulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* 260:1661-1664.
- Froehner S.C. (1998) Gathering glycine receptors at synapses. *Science* 282:1277-1279.
- Fuortes M.G.F., Schwartz E.A., Simon E.G. (1973) Color-dependence of cone response in the turtle retina. *J. Physiol.* 234:199-216.
- Geinisman Y., deToledo-Morrell L., Morrell F. (1991) Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Res.* 566:77-88.
- Geinisman Y., deToledo-Morrell L., Morrell F., Persina I., Beatty M.A. (1996) Synapse restructuring associated with the maintenance phase of hippocampal long-term potentiation. *J. Comp. Neurol.* 368:413-423.
- Genoud S., Pralong W., Riederer B.M., Eder L., Catsicas S., Müller D. (1999) Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures. *J. Neurochem.* 72:1699-1706.
- Glauert A.M. (1975) Fixation, dehydration and embedding of biological specimens, *Practical methods in electron microscopy* (Glauert AM, Ed), Elsevier, Amsterdam.
- Goellet P., Castellucci V.F., Schacher S., Kandel E.R. (1986) The long and short of long-term memory – a molecular framework. *Nature* 322:419-422.
- Gomis A., Burrone J., Lagnado L. (1999) Two actions of calcium regulate the supply of releasable vesicles at the ribbon synapse of retinal bipolar cells. *J. Neurosci.* 19:6309-6317.
- Greengard P., Valtorta F., Czernik A.J., Benfanati F. (1993) Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259:780-785.
- Grünert U., Wässle H. (1996) Glycine receptors in the rod pathway of the macaque monkey retina. *Visual Neurosci.* 13:101-115.
- Guiloff G.D.; Jones J.; Kolb H. (1988) Organization of the inner plexiform layer of the turtle retina: an electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 272, 280-92
- Han M.-H., Li Y., Yang X.-L. (1997) Desensitizing GABA_C receptors on carp retinal bipolar cells. *Neuroreport* 8:1331-1335.
- Hanley J.G., Koulen P., Bedford F., Gordon-Weeks P.R., Moss S.J. (1999) The protein MAP-1B links GABA_C-receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* 397:66-69.
- Hanson P.I., Heuser J.E., Jahn R. (1997) Neurotransmitter release – four years of SNARE complexes. *Current Opinion Neurobiol.* 7:310-315.

- Hauser C.J., Fekete Z., Livingston D.H., Deitch E.A., (1998) Chemokine stimulation of human neutrophil $[Ca^{2+}]^i$ signaling in biologic environments. *Shock*. 10:324-328.
- Haverkamp S., Eldred W.D., Ottersen O.P. Pow D., Ammermuller J. (1997) Synaptic inputs to identified color-coded amacrine and ganglion cells in the turtle retina. *J. Comp. Neurol.* 389: 235-248.
- Haverstick D. M., Dicus M., Resnick M. S., Sando J., Gray L. (1997) A role for protein kinase C- β 1 in the regulation of Ca^{2+} entry in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 272: 15426-15433.
- Hawkins R.D., Son H., Aranico O. (1998) Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term-potential in hippocampus. *Prog. Brain Res.* 118:155-172.
- Hirokawa N., Sobue K., Kanda K., Harada A., Yorifuji H. (1989) The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J. Cell Biol.* 108:111-126.
- Hebb D.O. (1949) *The Organization of Behavior*. John Wiley, New York.
- Heidelberger R., Matthews G. (1991) Inhibition of calcium influx and calcium current by γ -aminobutyric acid in single synaptic terminals. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 88:7135-7139.
- Heidelberger R., Matthews G. (1992) Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J. Physiology (London)* 447:235-256.
- Heidelberger R., Matthews G. (1994) Dopamine enhances Ca^{2+} responses in synaptic terminals of retinal bipolar neurons. *Neuroreport* 5:729-732.
- Hess E. J., Collins K. A., Wilson M. C. (1996) Mouse model of hyperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation. *J. Neurosci.* 16:3104
- Hodel (1998) Molecules in focus: SNAP-25. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:1069-1073.
- Holscher C. (1999) Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *J. Neurosci.* 58:62-75.
- Hosokawa T., Rusakov D.A., Bliss T.V., Finne A. (1995) Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *J. Neurosci.* 15:5560-5573.
- Houser C. R., Crawford G. D., Barber R. P., Salvaterra P. M., Vaughn J. E. (1983) Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res.* 266: 97-119.
- Impey S., Smith D.M., Obrietan K., Storm D.R. (1996) Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 16:973-982.
- Impey S., Smith D.M., Obrietan K., Donahue R., Wade C., Storm D.R. (1998) Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nature Neurosci.* 1:595-601.
- Impey S., Storm D.R., Obrietan K., Donahue R., Wade C. (1999) Crosstalk between ERK and PKA is required for calcium stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* (in press).
- Ishida A.T., Stell W.K., Lightfoot D.O. (1980) Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 191:315-335.
- Job C., Lagnado L. (1998) Calcium and protein kinase C regulate the actin cytoskeleton in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *J. Cell Biol.* 143:1661-1672.
- Johnston G.A.R. (1996) GABA_C receptor: relative simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 17:319-323.

- Juusola M., French A.S., Uuisotalo R.O., Weckström M. (1996) Information processing by graded-potential transmission through tonically active synapses. *Trends Neurosci.* 19:292-297.
- Kandel E.R. (1997) Genes, synapses, and long-term memory. *J. Cell. Physiol.* 173:124-125.
- Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessel T.M. (eds) (1991) *Principles of neural science*, 3rd edn. Elsevier New York.
- Kaneda M., Mochizuki M., Aoki K., Kaneko A. (1997) Modulation of GABA_C response by Ca²⁺ and other divalent cations in horizontal cells of the catfish retina. *J. Gen. Physiol.* 110:741-747.
- Kaneko A. (1970) Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *J. Physiol. (Lond)* 207:623-633.
- Kaneko A., Tachibana M. (1985) Effects of L-glutamate on the anomalous rectifier potassium current in horizontal cells of *Carassius auratus* retina. *J. Physiol. (Lond)* 358:169-182.
- Kaneko A., Tachibana M. (1985) A voltage-clamp analysis of membrane currents in solitary bipolar cells dissociated from *Carassius auratus*. *J. Physiol. (Lond)* 358:131-152.
- Kaneko A., Suzuki S., Pinto L.H., Tachibana M. (1991) Membrane currents and pharmacology of retinal bipolar cells: a comparative study on goldfish and mouse. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 98:115-127.
- Kang C.-M., Lavoie P.-A., Gardiner P. F. (1996) Chronic exercise increases SNAP-25 abundance in fast transported proteins of rat motoneurons. *Neuroreport* 6:549
- Kaupmann K., Huggel K., Held J. (1997) Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-246.
- Keilhauer G., Faissner A., Schachner M. (1985) Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion of L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316:728-730.
- Kellenberger S., Malherbe P., Siegel E. (1992) Function of the $\alpha 1\beta 2\gamma 2S$ γ -aminobutyric acid type A receptor is modulated by protein kinase C via multiple phosphorylation sites. *J. Biol. Chemistry* 267:25660-25663.
- Kins S., Betz H., Kirsch J. (2000) Collybistin, a newly identified brain specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat. Neurosci.* 3:22-29.
- Kirsch M., Djamgoz M.B.A., Wagner H.-J. (1990) Correlation of spinule dynamics and plasticity of the horizontal cell spectral response in cyprinid fish retina: quantitative analysis. *Cell Tiss. Res.* 260:401-412.
- Kirsch M., Wagner H.-J., Djamgoz M.B.A. (1991) Dopamine and plasticity of horizontal cell function in teleost retina: regulation of spectral mechanism through D1-receptors. *Vis. Res.* 31:401-412.
- Kirsch J., Langosh D., Prior P., Littauer U.Z., Schmitt B., Betz H. (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J. Biol. Chem.* 266:22242-22245.
- Kirsch J., Betz H. (1993) Widespread expression of gephyrin, a putative glycine-tubuline linker protein, in rat brain. *Brain Res.* 621:301-310.
- Kirsch J., Wolters I., Triller A., Betz H. (1993) Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366:745-748.
- Kirsch J., Betz H. (1995) The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein gephyrin is regulated by the cytoskeleton. *J. Neurosci.* 15:4148-4156.
- Kirsch J., Kuhse J., Betz H. (1995) Targetting of glycine receptor subunits to gephyrin-rich domains in transfected human embryonic kidney cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 6:450-461.

- Kirsch J., Meyer G., Betz H. (1996) Synaptic targetting of ionotropic neurotransmitter receptors. *Mol. Cel. Neurosci.* 8:93-98.
- Kirsch J., Betz H. (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392:717-720.
- Kleinig H., Sitte P. (1992) *Zellbiologie*. Dritte Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Knapp A.G., Dowling J.E. (1987) Dopamine enhances excitatory amino acid-gated conductances in cultured retinal horizontal cells. *Nature* 325:437-439.
- Kneussel M., Betz H. (2000) Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci.* 23:429-435.
- Kneussel M., Betz H. (2000) Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol (Lond)* 15:1-9.
- Koontz M.A., Hendrickson A.E. (1993) Comparison of immunolocalization patterns for the synaptic vesicle protein p65 and synapsin I in macaque monkey retina. *Synapse* 14:268-282.
- Koulen P. (1999) Clustering of neurotransmitter receptors in the mammalian retina. *J. Membr. Biol.* 171:97-105.
- Koulen P., Sassoè-Pognetto M., Grünert U., Wässle H. (1996) Selective clustering of GABA_A and glycine receptors in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 16:2127-2140.
- Koulen P., Brandstätter J.H., Kröger S., Enz R., Borman J., Wässle H. (1997) Immunocytochemical Localization of the GABA_C Receptor ρ Subunits in the Cat, Goldfish, and Chicken Retina. *J. Comp. Neurol.* 380:520-532.
- Koulen P., Brandstätter J.H., Enz R., Borman J., Wässle H. (1998) Synaptic clustering of GABA_C receptor ρ -subunits in the rat retina. *Eur. J. Neurosci.* 10:115-127.
- Kuhse J., Laube B., Magalei D., Betz H. (1993) Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 11:1049-1056.
- Kuhse J., Betz H., Kirsch J. (1995) The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5:318-323.
- Krishek B.J., Xie X., Blackstone C., Haganir R.L., Moss S.J., Smart T.G. (1994) Regulation of GABA_A receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 12:1081-1095.
- Laughlin S.B. (1987) The role of sensory adaptation in the retina. *Trends Neurosci.* 10, 478-483.
- Laughlin S.B. (1994) Retinal information capacity and the function of the pupil. *Prog. Ret. Res.* 13, 1655-196.
- Langosch D., Hoch W., Betz H. (1992) The 93 kDa protein gephyrin and tubulin associated with the inhibitory glycine receptor are phosphorylated by an endogenous protein kinase. *Fed. Eur. Bioch. Soc.* 2:113-117.
- Larsson L.I. (1988) *Immunocytochemistry: Theory and Practice*. Boca Raton, CRC Press.
- Lasater E.M. (1987) Retinal horizontal cell gap junction conductance is modulated by dopamine through a cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7319-7323.
- Lasater E.M., Dowling J.E. (1985) Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3025-3029.
- Lawrence G.W., Foran P., Mohammed N., DasGupta B.R., Dolly J.O. (1997) Importance of two adjacent C-terminal sequences of SNAP-25 in exocytosis from intact and

- permeabilised chromaffin cells revealed by inhibition with botulinum neurotoxins A and E. *Biochemistry* 36:3061-3067.
- Leidenheimer N.J., McQuilkin S.J., Hahner L.D., Whiting P., Harris R.A. (1992) Activation of protein kinase C selectively inhibits the γ -aminobutyric acid_A receptor: role of desensitization. *Mol. Pharmacology* 41:1116-1123.
- Li L., Chin L.S., Shupliakov O., Brodin L., Sihra T.S., Hvalby O., Jensen V., Zheng D., McNamara J.O., Greengard P. (1995) Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9235-9239.
- Lim R., Alvarez F.J., Walmsley B. (1999) Quantal size is correlated with receptor cluster area at glycinergic synapses in the rat brainstem. *J. Physiology* 516.2:505-512.
- Lisman J.E., Harris K.M. (1993) Quantal analysis and synaptic anatomy – integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends Neurosci.* 16:141-147.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira D., Baltimore D., Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th edition; Freeman and Company, New York.
- Lukasiewicz P.D. (1996) GABA_C receptors in the vertebrate retina. *Mol. Neurobiol.* 12:181-194.
- Lukasiewicz P.D., Werblin F.S. (1994) A novel GABA receptor modulates synaptic transmission from bipolar to ganglion and amacrine cells in the tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 14:1213-1223.
- Lukasiewicz P.D., Maple B.R., Werblin F.S. (1994) A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 14: 1202-1212.
- Lukasiewicz P.D. Shields C.R. (1998) Different combinations of GABA_A and GABA_C receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses. *J. Neurophysiol.* 79:3157-3167.
- MacDonald R.L., Olsen R.W. (1994) GABA_A receptor channels. *Ann. Rev. Neurosci.* 17:569-602.
- Maletic Savatic M., Malinow R., Svoboda K. (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283:1923-1927.
- Mandel J.W., Townes A.E., Czernik A.J., Cameron R., greengard P., De C.P. (1990) Synapsins in the vertebrate retina: absence from ribbon synapses and heterogeneous distribution among conventional synapses. *Neuron* 5:19-33.
- Marc R.E. (1986) Neurochemical stratification of the inner plexiform layer of the vertebrate retina. *Vision Res.* 26:223-238.
- Marc R.E. (1989) The anatomy of multiple GABAergic and glycinergic pathways in the inner plexiform layer of the goldfish retina. In R. Weiler and N. Osborne (eds): *The Neurobiology of the Inner Retina: Nato/AS Series*. Berlin: Springer-Verlag, pp.53-64.
- Marc R.E. (1992) Structural organization of GABAergic circuitry in ectotherm retinas. In Mize, R.R., Marc, R.E. & Sillito, A.M. (Eds.) *GABA in the Retina and Central Visual System*. Progress in Brain Research, Vol. 90 (pp. 61-92). Amsterdam, Elsevier.
- Marc R.E., Stell W.K., Bok D., Lam D.M.K. (1978) GABAergic pathways in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 182:221-246.
- Marc R.E., Lam D.M. (1981) Glycinergic pathways in the goldfish retina. *J. Neurosci.* 1:152-165.
- Marc R.E., Murray R.F., Basinger S.F. (1995) Pattern recognition for amino acid signatures in retinal neurons. *J. Neurosci.* 15:5106-5129.
- Marc R.E., Lui W.L.S. (2000) Fundamental GABAergic amacrine cell circuitries in the retina: Nested feedback, contactenated inhibition, and axosomatic synapses. *J. Comp. Neurol.* 425:560-582.

- Massey S.C., Redburn D.A. (1987) Transmitter circuits in the vertebrate retina. *Prog. Neurobiol.* 28:55-96.
- Matthews G. (1999) Synaptic mechanisms of bipolar cell terminals. *Vision Res.* 39:2469-2476.
- Matthews G. (2000) Vesicle fiesta at the synapse. *Nature* 406:835-836.
- Matthews G., Ayoub G.S., Heidelberger R. (1994) Presynaptic inhibition by GABA is mediated via two distinct GABA receptors with novel pharmacology. *J. Neurosci.* 14:1079-1090.
- Mehta P.P., Battenberg E., Wilson M.C. (1996) SNAP-25 and synaptotagmin involvement in the final Ca^{2+} -dependent triggering of neurotransmitter exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10471-10476.
- Menger N., Pow D.V., Wässle H. (1998) Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J Comp Neurol* 401:34-46.
- Mennerick S., Matthews G. (1996) Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons. *Neuron* 17:1241-1249.
- Meyer G., Kirsch J., Betz H., Langosch D. (1995) Identification of a Gephyrin Binding Motif on the Glycine Receptor β Subunit. *Neuron* 15:563-572.
- Minami N., Berglund K., Skaba T., Kohmoto H., Tachibana M. (1998) Potentiation of transmitter release by protein kinase C in goldfish retinal bipolar cells. *J. Physiol.* 512:219-225.
- Morgans C.W., Brandstätter J.H., Kellerman J., Betz H., Wässle H. (1996) A SNARE complex containing syntaxin3 is present in ribbon synapses of the retina. *J Neurosci.* 16:6713-6721.
- Moser M.B. (1999) Making more synapses: a way to store information? *Cell. Mol. Life Sci.* 55:593-600.
- Muller J.F., Marc R.E. (1990) GABA-ergic and Glycinergic pathways in the inner plexiform layer of the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 291:281-304.
- Murakami M., Ohtsuka T., Shimazaki H. (1975) Effects of aspartate and glutamate on bipolar cells in the carp retina. *Vision Res.* 15:456-458.
- Nakamura H., Kobayashii S., Ohashi Y., Ando S. (1999) Age-changes of brain synapses and synaptic plasticity in response to an enriched environment. *J. Neurosci. Res.* 56:307-315.
- Negishi K., Kato S., Teranishi T. (1988) Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C immunoreactivity in some vertebrate retinas. *Neurosci. Lett.* 94:247-252.
- Nguyen P.V., Kandel E.R. (1996) A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16:3189-3198.
- Nomura T., Shigemotu R., Nakamura Y., Okamoto N., Mizuno N., Nakanishi S. (1994) Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77:361-369.
- Nusser Z., Cull-Candy S., Farrant M. (1997) Differences in synaptic GABA_A receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19:697-709.
- Nusser Z., Hájos N., Somogyi P., Mody I. (1998) Increased number of synaptic GABA_A receptors underlies potentiation at hippocampal synapses. *Nature* 395:172-177.
- Okabe S., Collin C., Auerbach J.M., Meiri N., Bengzon J., Kennedy M.B., Segal M., McKay R.D. (1998) Hippocampal synaptic plasticity in mice overexpressing an embryonic subunit of the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 18:4177-88.
- Osborne N.N., Barret N.L., Morris N.J., Huang F.L. (1992) The occurrence of three isoenzymes of protein kinase C (alpha, beta and gamma) in the retinas of different species. *Brain Res.* 570:156-162.

- Pan Z.-H., Lipton S.A. (1995) Multiple GABA receptor subtypes mediate inhibition of calcium influx at rat retinal bipolar cell terminals. *J. Neurosci.* 15:2668-2679.
- Parsons T.D., Lenzi D., Almers W., Roberts W.M. (1994) Calcium-triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell: capacitance measurements in saccular hair cells. *Neuron* 13:875-883.
- Pawley J. (1997) The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning* 19:324-336.
- Pawley J. (2000) The 39 steps: a cautionary tale of quantitative 3-D fluorescence microscopy. *Biotechniques* 28:884-886.
- Peschke E., Spessert R., Spiwojs B.I., Dorner P., Vollrath L. (1996) Morphometry of pineal synaptic ribbon profile numbers after cytochalasin D treatment. *Acta Anat. Basel* 145:94-98.
- Pfeiffer F., Simler R., Grenningloh G., Betz H. (1984) Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7224-7227.
- Piccolino M., Neyton J., Gerschenfeld H.M. (1984) Decrease of gap junction permeability induced by dopamine and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in horizontal cells of turtle retina. *J. Neurosci.* 4:2477-2488.
- Pieribone V.A., Shupliakov O., Brodin L., Hilfiker-Rothenfluh S., Czernik A.J., Greengard P. (1995) Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature* 375:493-497.
- Prior P., Schmitt B., Grenningloh G., Pribilla I., Multhaup G., Beyreuther K., Maulet Y., Werner P., Langosh D., Kirsch J., Betz H. (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8:1161-1170.
- Qian H., Dowling J.E. (1993) Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature* 361:162-164.
- Qian H., Dowling J.E. (1995) GABA_A and GABA_C receptors on hybrid bass retinal bipolar cells. *J. Neurophysiol.* 74:1920-1928.
- Qian H., Li L., Chappell R.L., Ripps H. (1997) GABA receptors of bipolar cells from the skate retina: actions of zinc on GABA-mediated membrane currents. *J. Neurophysiol.* 78:2402-2412.
- Qian H. (2000) Properties of GABA-Receptors. In Kolb H., Fernandez E., Nelson R. (Ed.) *Webvision. Organization of the vertebrate retina.* University of Utah. URL: <http://webvision.med.utah.edu/> (Dez. 2000).
- Rao B.S., Raju T.R., Meti B.L. (1999) Increased numerical density of synapses in CA3 region of hippocampus and molecular layer of motor cortex after self-stimulation rewarding experience. *Neurosci.* 91:799-803.
- Rao-Mirotnik R., Harkins A.B., Buchsbaum G., Sterling P. (1995) Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14:561-569.
- Raynauld J.-P., Laviolette J.R., Wagner H.-J. (1979) Goldfish retina: A correlate between cone activity and morphology of the horizontal cell in cone pedicles. *Science* 204:1436-1438.
- Roberts L.A., Morris B.J., O'Shaughnessy C.T. (1998) Involvement of two isoforms of SNAP-25 in the expression of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neuroreport.* 5:33-36.
- Romeis B. (1989) *Mikroskopische Technik.* 17. Auflage, herausgegeben von P. Böck. München, Urban & Schwarzenberg.
- Rosahl T.W., Spillane D., Missler M., Herz J., Selig D.K., Wolf J.R., Hammer R.E., Malenka R.C., Südhof T. (1995) Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375:488-493.

- Routtenberg A., Tarrant S.B. (1975) The extended spinule complex: dendritic spine invagination of presynaptic terminals. *Anat. Rec.* 181:467-477.
- Rusakov D.A., Stewart M.G. Kogorod S.M. (1996) Branching of active dendritic spines as a mechanism for controlling synaptic efficacy. *J. Neurosci.* 75:315-323.
- Saito T., Kondo H., Toyoda J.-I. (1979) Ionic mechanisms of two types of ON-center bipolar cells in the carp retina. *J. Gen. Physiology* 73:73-90.
- Saito T., Kujiraoka T. (1982) Physiological and morphological identification of two types of on-center bipolar cells in the carp retina. *J. Comp. Neurol.* 205:161-170.
- Saito, T., Kujiraoka T., Yanaha T. (1983) Connections between photoreceptors and horseradish peroxidase-injected bipolar cells in the carp retina. *Vision Res.* 23:353-362.
- Saito, T., Kujiraoka T., Yanaha T., Chino Y. (1985) Reexamination of photoreceptor-bipolar connectivity patterns in carp retina: HRP-EM and golgi-EM studies. *J. Comp. Neurol.* 236:141-160.
- Sassoè-Pognetto M., Wässle H., Grünert U. (1994) Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the alpha 1 subunit of the glycine receptor. *J. Neurosci.* 14:5131-5146.
- Sassoè-Pognetto M., Kirsch J., Grünert U., Greferath U., Fritschy J.M., Möhler H., Betz H., Wässle H. (1995) Colocalization of Gephyrin and GABA_A-Receptor Subunits in the Rat Retina. *J. Comp. Neurol.* 357:1-14.
- Sassoè-Pognetto M., Wässle H. (1997) Synaptogenesis in the rat retina: Subcellular localization of glycine receptors, GABA_A receptors, and the anchoring protein gephyrin. *J. Comp. Neurol.* 381:158-174.
- Sakaba T., Tachibana M., Matsui K., Minami N. (1997) Two components of transmitter release in retinal bipolar cells: exocytosis and mobilization of synaptic vesicles. *Neurosci. Res.* 27:357-370.
- Satoh H., Aoki K., Watanabe S., Kaneko A. (1998) L-type calcium channels in the axon terminal of mouse bipolar cells. *Neuroreport* 9:2161-2165.
- Schmidt R.F., Thews G. (1995) *Physiologie des Menschen.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Schikorski T., Stevens C.F. (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J. Neurosci.* 17:5858-5867.
- Schmitt B., Knaus P., Becker C.-M., Betz H. (1987) The Mr 93.000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor is a peripheral membrane protein. *Biochemistry* 26:805-811.
- Schuman E.M., Madison D.V. (1994) Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus. *Science* 263:532-535.
- Schuster T., Krug M., Wenzel J. (1990) Spinules in axospinous synapses of the rat dentate gyrus: changes in density following long-term-potentiation. *Brain Res.* 16:171-174.
- Schwartz E.A. (1982) Calcium-independent release of GABA from isolated horizontal cells of the toad retina. *J. Physiol.* 323:211-227.
- Schwartz E.A. (1987) Depolarization without calcium can release γ -aminobutyric acid from retinal neuron. *Science* 238:350-355.
- Scoville W.J., Milner B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 20:11-21.
- Sheng M., McFadden G., Greenberg M.E. (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571-582.
- Sherry D.M., Yazulla S. (1993) Goldfish bipolar cells and axon terminal pattern: a Golgi study. *J. Comp. Neurology* 329,188-200.

- Sherry D.M., Yazulla S. (1993) Immunofluorescent identification of endogenous neurotransmitter content in Golgi-impregnated neurons. *J. Neurosci. Methods* 46:41-48.
- Shimada S., Cutting G., Uhl G.R. (1992) γ -aminobutyric acid A or C receptor? γ -aminobutyric acid ρ_1 receptor RNA includes bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive γ -aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 41:683-697.
- Siegel G.J. (1999) Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Ed.-in chief G.J. Siegel. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Siegel E., Bauer R., Malherbe R. (1991) Activation of protein kinase C results in down-modulation of different recombinant GABA_A channels. *FEBS Letters* 291:150-152.
- Siekevitz P. (1985) The postsynaptic density: a possible role in long-lasting effects in the central nervous system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82:3494-3498.
- Silva A.J., Stevens C.F., Tonegawa S., Wang Y. (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257:201-206.
- Silva A.J., Paylor R., Wehner J.M., Tonegawa S. (1992) Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257:206-211.
- Silva A., Kumar S., Pereda A., Faber D.S. (1995) Regulation of synaptic strength at mixed synapses: effects of dopamine receptor blockade and protein kinase C activation. *Neuropharmacology* 34:1559-1565.
- Smith R.G. (1995) Simulation of an anatomically defined local circuit: the cone-horizontal cell network in cat retina. *Vis. Neurosci.* 12:545-561.
- Sorra K.E.; Fiala J.C.; Harris K.M. (1998) Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. *J. Comp. Neurol.* 398; 225-240.
- Squire L.R., Zola-Morgan S. (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* 253:1380-1384.
- Squire L.R., Kandel E.R. (1999) Gedächtnis : die Natur des Erinnerns. Niehaus-Osterloh M. (ed). Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg; Berlin.
- Stallmeyer B., Nerlich A., Schiemann J., Brinkmann H., Mendel R.R. (1995) Molybdenum co-factor biosynthesis: the arabidopsis thaliana cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein cinnamon and three escherichia coli proteins. *Plant J.* 8:751-762.
- Stell W.K., Ishida A.T., Lightfoot D.O. (1977) Structural basis for on-and off-center responses in retinal bipolar cells. *Science* 198:1269-1271.
- Stevens C.F. (1998) A million dollar question: Does LTP = memory? *Neuron* 20:1-2
- Stevens C.F., Sullivan J.M. (1998) Regulation of the readily releasable vesicle pool by protein kinase C. *Neuron* 21:885-893.
- Suzuki S., Kaneko A. (1990) Identification of bipolar cell subtypes by protein kinase C-like immunoreactivity in the goldfish retina. *Visual Neuroscience* 5:223-230.
- Suzuki S., Tachibana M., Kaneko A. (1990) Effects of glycine and GABA on isolated bipolar cells of the mouse retina. *J. Physiol.* 421:645-662.
- Suzuki S., Kaneko A. (1991) Protein kinase C-like immunoreactivity of the ON-bipolar cell in goldfish and mammalian retina: a useful criterion for subtype identification of isolated cells. *Neurosci. Res. Suppl.* 15:107-115.
- Slaughter M.M., Pan Z.H. (1992) The physiology of GABA_B receptors in the vertebrate retina. *Prog. Brain Res.* 90:47-60.
- Stell W.K., Ishida A.T., Lightfoot D.O. (1977) Structural basis for On- and Off-center responses in retinal bipolar cells. *Science* 198:1269-1271.

- Szentagothai J., Hamon J. (1969) Growth and differentiation of synaptic structures under circumstances of deprivation of function and of distant connections. In Wolstenholme G.E.W. and O'Conner (eds), *Cellular Dynamics of the Neuron*, New York Academic Press, pp. 301-320.
- Tachibana M., Kaneko A. (1987) γ -Aminobutyric acid exerts a local inhibitory action on the axon terminal of bipolar cells: evidence for negative feedback from amacrine cells. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 84:3501-3505.
- Tachibana M., Okada T. (1991) Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina. *J. Neurosci.* 11:2199-2208.
- Tachibana M., Okada T., Arimura T., Kobayashi K., Piccolino M. (1993) Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina. *J. Neurosci.* 13:2898-2909.
- Tarrant S.B., Routtenberg A. (1977) The synaptic spinule in the dendritic spine. Electron microscopic study of the hippocampal dentate gyrus. *Tiss. Cell* 9:461-473.
- Teranishi T., Negishi K., Kato S. (1983) Dopamine modulates S-potential amplitude and dye-coupling between external horizontal cells in carp retina. *Nature* 301:243-246.
- Todd A.J., Spike R.C., Chong D., Neilson M. (1995) The relationship between glycine and gephyrin in synapses of the rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 7:1-11.
- Todd A.J., Watt C., Spike R.C., Sieghart W. (1996) Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 16:974-982.
- Toni N., Buchs P.A., Nikonenko I., Bron C.R., Muller D. (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421-425.
- Triller A., Seitanidou T., Franksson O., Korn H. (1990) Seize and shape of glycine receptor clusters in a central neuron exhibit a somato-dendritic gradient. *New Biology* 2:637-641.
- Triller A., Cluzeaud F., Pfeiffer F., Betz H., Korn H. (1985) Distribution of glycine receptors at central synapses: an immunoelectron microscopy study. *J. Cell Biol.* 101: 683-688.
- Tully T. (1998) Toward a molecular biology of memory: the light is coming on. *Nature Neurosci.* 1:543-545.
- Tully T., Preat T., Boynton S.C., Del Vecchio M. (1994) Genetic dissection of consolidated memory in drosophila. *Cell* 79:35-47.
- Usuda N., Kong Y., Hagiwara M., Uchida C., Terasawa M., Nagata T., Hikida H. (1991) Differential localisation of protein kinase C isoenzymes in retinal neurons. *J. Cell Biol.* 112:1241-1247.
- Usukura J., Yamada E. (1987) Ultrastructure of the synaptic ribbons in photoreceptor cells of *Rana catesbeiana* revealed by freeze-etching and freeze-substitution. *Cell Tissue Res.* 247:483-488.
- Van der Zee E.A., Luiten P.G., Disterhoft J.F. (1997) Learning-induced alterations in hippocampal PKC-immunoreactivity: a review and hypothesis of its functional significance. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry.* 21:531-572.
- Vaquero C.F., Velasco A., de la Villa P. (1996a) Protein kinase C localization in the synaptic terminal of rod bipolar cells. *Neuroreport* 7: 2176-2180.
- Vaquero C.F., Velasco A., de la Villa P. (1996b) Protein kinase C activation in the axon terminal of rod bipolar cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37 (Suppl.):633-.
- Vaquero C.F., de la Villa P. (1999) Localisation of the GABA_C-receptors at the axon terminal of the rod bipolar cells of the mouse retina. *Neurosci. Res.* 35:1-7.
- Verhage M., Ghijsen W.E., Lopes-da-Silva F.H. (1994) Presynaptic plasticity: regulation of Ca²⁺-dependent transmitter release. *Prog. Neurobiol.* 42:539-574.

- Van Buskirk R., Dowling J.E. (1981) Isolated horizontal cells from carp retina demonstrate dopamine-dependent accumulation of cyclic AMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7825-7829.
- von Gersdorff H., Matthews G. (1994) Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature* 367:735-739.
- von Gersdorff H., Vardi E., Matthews G., Sterling P. (1996) Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16:1221-1227.
- von Gersdorff H., Matthews G. (1997) Depletion and replenishment of vesicle pools at a ribbon-type synaptic terminal. *J. Neurosci.* 17:1919-1927.
- Wässle H., Chun M.H. (1989) GABA-like immunoreactivity in the cat retina: light microscopy. *J. Comp. Neurol.* 279:43-54
- Wässle H., Yamashita M., Greferath U., Grünert U., Müller F. (1991) The rod bipolar cell of the mammalian retina. *Visual Neurosci.* 7:99-121.
- Wässle H., Koulen P., Brandstätter J.H., Fletcher E.L. Becker C.-M. (1998) Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 38:1411-1430.
- Wagner H.-J. (1980) Light-dependent plasticity of the morphology of horizontal cell terminals in cone pedicles of fish retinas. *J. Neurocytol.* 9:573-590.
- Wagner, H.-J. (1990) Retinal structure of fishes. In Douglas, H.R., Djamgoz, M.B.A. (Eds.) *The Visual System of Fish* (pp. 109-158). London, Chapman.
- Wagner H.-J. (1997) Presynaptic bodies ("ribbons"): from ultrastructural observations to molecular perspectives. *Cell Tissue Res.* 287:435-446.
- Wagner H.-J., Behrens U.B., Zaunreiter M., Douglas R.H. (1992) The circadian component of spinule dynamics in teleost retinal horizontal cells is dependent on the dopaminergic system. *Vis. Neurosci.* 9:345-351.
- Wagner H.-J., Djamgoz M.B.A. (1993) Spinules: a case for retinal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 16:201-206.
- Wagner, H.-J., Wulle, I. (1992) Contacts of dopaminergic interplexiform cells in the outer retina of the blue acara *Vis. Neurosci.* 9, 325-333
- Wallace C.S., Hawrylak N., Geenough W.T. (1991) Studies of synaptic structural modifications after long-term-potential and kindling: context for a molecular morphology. In: Michel Baudry and Joel Davis (eds), *Long-term-potential, a debate on current issues*, MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Walmsley B. (1991) Central synaptic transmission: studies at the connection between primary afferent fibres and the dorsal spinocerebellar tract (DSCT) neurons in Clarke's column of the spinal cord. *Proc. Royal Soc. B* 161:245-250.
- Walmsley B., Alvarez J.F., Fyffe R.E.W. (1998) Diversity of structure and function at mammalian central synapses. *Trends Neurosci.* 21:81-88.
- Weiler I.J., Hawrylak N., Greenough W.T. (1995) Morphogenesis in memory formation: synaptic and cellular mechanisms. *Behavioural Brain Res.* 66, 1-6.
- Weiler R. (1994) Spinules: a case for synaptic plasticity [letter; comment]. *Trends Neurosci.* 17, 6; discussion 7-8.
- Weiler R., Wagner H.-J. (1984) Light dependent change of cone-horizontal cell interactions in carp retina. *Brain Res.* 298:1-9.
- Weiler R, Kohler K, Jansen U (1991) Protein kinase C mediates transient spinule-type neurite outgrowth in the retina during light adaptation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3603-3607.
- Weiler R., Schulz K. (1993) Ionotropic non-N-methyl-D-aspartate agonists induce retraction of dendritic spinules from retinal horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6533-6537.

- Weinheim V.C.H. (1992) Visualization in biomedical microscopies: 3-D imaging and computer applications. Ed. by Andres Kniete.
- Wellis D.P., Werblin F.S. (1995) Dopamine modulates GABA_C receptors mediating inhibition of calcium entry into and transmitter release from bipolar cell terminals in tiger salamander retina. *J. Neurosci.* 15:4748-4761.
- Westrum L.E., Blackstad T.D. (1962) An electron microscopic study of the stratum radiatum of the rat hippocampus (regio superior, CA1) with particular emphasis on synaptology. *J. Comp. Neurol.* 119:281-309.
- Wheal H., Chen Y., Mitchell J., Schachner M., Maerz W., Wieland H., van Rossum D., Kirsch J. (1998) Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity. *Prog. Neurobiol.* 55:611-640.
- Wilson M.C., Mehta P.P., Hess E.J. (1996) SNAP-25, enSNAREd in neurotransmission and regulation of behavior. *Biochem. Soc. Trans.* 24:670-676.
- Witkovsky P., Dowling J.E. (1969) Synaptic relationship of the plexiform layers of carp retina. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 100:60-82.
- Witkovsky P., Stone S., Besharse J.C. (1988) Dopamine modifies the balance of rod and cone inputs to horizontal cells of *Xenopus* retina. *Brain Res.* 449:332-336.
- Witkovsky P., Deary A. (1992) Functional roles of dopamine in the vertebrate retina. *Prog. Ret. Res.* 11:247-291.
- Wu Z.L., Thomas S.A., Villacres E.C., Xia Z., Simmons M.L., Chavkin C. Palmiter R.D., Storm D.R. (1995) Altered behavior and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:220-224.
- Wulle, I., Kirsch, M., Wagner, H.-J. (1990) Cyclic changes in dopamine and DOPAC content, and tyrosine hydroxylase activity in the retina of a cichlid fish. *Brain Res.* 515:163-167.
- Yamada K., Yu B., Gallagher J.P. (1999) Different subtypes of GABAB receptors are present at pre- and postsynaptic sites within the rat dorsolateral septal nucleus. *J. Neurophysiol.* 81:2875-2883.
- Yazulla, S. (1986) GABAergic mechanisms in the retina. In N. Osborn (ed): *Progress in Retinal Research*, Vol. 5. Oxford: Pergamon, pp.1-52.
- Yazulla, S. (1989) Transmitter-specific synaptic contacts involving mixed rod-cone bipolar cell terminal in goldfish retina. In R. Weiler and N. Osborne (eds): *Neurobiology of the Inner Retina*. NATO ASI Series, pp. 91-102.
- Yazulla S., Studholme K.M., Wu J.-Y. (1987) GABAergic input to the synaptic terminals of Mb-1 bipolar cells in the goldfish retina. *Brain Res.* 411:400-405.
- Yazulla S., Zucker C.L. (1988) Synaptic organisation of dopaminergic interplexiform cell in the goldfish retina. *Visual Neurosci.* 1:13-29.
- Yazulla S., Studholme K.M., Victorica J., de-Blas A.L. (1989) Immunocytochemical localization of GABA_A-receptors in goldfish and chicken retinas. *J. Comp. Neurol.* 280:15-26.
- Yazulla S, Studholme K.M. (1991a) Glycine-receptor immunoreactivity in retinal bipolar cells is postsynaptic to glycinergic and GABAergic amacrine cell synapses, *J. Comp. Neurol.* 310:11-20.
- Yazulla S, Studholme K.M. (1991b) Glycinergic interplexiform cells make synaptic contact with amacrine cell bodies in goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 310:1-10.
- Yazulla S., Studholme K.M. (1992) Light-dependent plasticity of the synaptic terminals of Mb bipolar cells in goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 320:521-530.
- Yuko K., Jiro K., Stephen E. H., Clifford A. L., Reuben P. S., Toshiaki K. (2000). Regulation of protein kinase C β 1 by two protein-tyrosine kinases, Btk and Syk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7423-7428.

- Zhang N., Houser C.R. (1999) Ultrastructural localization of dynorphin in the dentate gyrus in human temporal lobe epilepsy: a study of reorganized mossy fiber synapses. *J. Comp. Neurol.* 405:472-490.
- Zensiek D., Matthews G. (1998) Calcium action potentials in retinal bipolar neurons. *Visual Neurosci.* 15:69-75.
- Ziff E.B. (1997) Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19:1163-1174.
- Zola-Morgan S., Squire L.R. (1993) Neuroanatomy of memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:547-563.
- Zucker C.L. (1998) Localization of gephyrin and glycine receptor subunit immunoreactivity in the rabbit retina. *Visual Neurosci.* 15:389-395.
- Zucker C., Yazulla S. (1982) Localization of synaptic and nonsynaptic nicotinic-acetylcholine receptors in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 204:188-195.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen von PKC-Immunoreaktiven Mb-BC der Goldfischnetzhaut	18
Abb. 3.2: Ausschnitt einer PKC-IR dunkeladaptierten Mb-BT	19
Abb. 3.3: Gefrierschnitte von hell- und dunkeladaptierten PKC Gephyrindoppelmarkierten Goldfischnetzhäuten.....	22
Abb. 3.4: Projektion von „optischen Schnitten“ durch die IPL eines PKC-Gephyrin doppelmarkierten Gefrierschnitts	23
Abb. 3.5: Gephyrin-PKC doppelmarkierter Gefrierschnitt einer dunkeladaptierten Goldfischnetzhaut.....	25
Abb. 3.6: Orthogonale Schnitte durch eine dreidimensional rekonstruierte Mb-BT	26
Abb. 3.7: Verteilung und quantitative Auszählung der Gephyrin-IR an Mb-BTs	27
Abb. 3.8: Gephyrin Preembedding Montage von elektronenmikroskopischen Einzelbildern der Goldfisch-IPL.....	29
Abb. 3.9: Gephyrin-IR Postsynapsen in der IPL	30
Abb. 3.10: Gephyrin-IR preembedding Elektronenmikroskopie	31
Abb. 3.11: Gephyrin-IR Spinules an Mb-BTs der Goldfischnetzhaut	32
Abb. 3.12: Tabelle der elektronenmikroskopischen Auswertung der Gephyrin-IR Spinules .	34
Abb. 3.13: Gephyrin-IR in der äußeren Goldfischnetzhaut.....	35

Abb. 3.14: Gephyrin-IR in der ONL der Goldfischnetzhaut.....	36
Abb. 3.15: Immunhistochemische Darstellung der GABA _C -Rezeptoren in der IPL der Goldfischnetzhaut.....	37
Abb. 3.16: Immunhistochemische Doppelmarkierung von GABA _C -Rezeptoren und Gephyrin	38
Abb. 3.17: SNAP-25-PKC doppelmarkierte Gefrierschnitte	40
Abb. 3.18: Elektronenmikroskopische Darstellung der SNAP-25-Immunoreaktivität in der OPL der Goldfischnetzhaut.....	41
Abb. 4.1: Schematische Darstellung von GABA-Rezeptoren im Bereich einer Dyade einer Mb-Terminale.....	60
Abb. 4.2: Modell zur Modulation von GABA _C -Rezeptoren durch Glutamat und Serotonin	64
Abb. 4.3: Modell der funktionellen Bedeutung von SNAP-25 bei der Fusion von Synaptischen Vesikeln	67

Abkürzungsverzeichnis

AC	Amakrinzelle
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BC	Bipolarzelle
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
BT	Bipolarterminale
cAMP	zyklisches Adenosin-Tri-Phosphat
CLSM	confocal laser scanning microscop (konfokales Laser-Scan-Mikroskop)
CRE	calcium response element
CREB	calcium response element binding-protein
DAB	Diaminobenzidin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Ganglienzelle
GlyR	Glycin Rezeptor
INL	inner nuclear layer (innere Körnerschicht)
IPL	inner plexiforme layer (innere Faserschicht)
-IR	Immunoreaktivität
LTP	long-term potentiation (Langzeitpotenzierung)
L-LTP	long lasting LTP
Mb-BC	mixed rod cone bipolar cell (gemischte Stäbchen-Zapfen Bipolarzelle)
Mb-BT	mixed rod cone bipolar terminal (gemischte Stäbchen-Zapfen Bipolarzellterminale)
NGS	normal goat serum (Ziegenserum)
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
ONL	outer nuclear layer (äußere Körnerschicht)
OPL	outer plexiforme layer (äußere Faserschicht)
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PKC	Protein Kinase C
PKA	Protein Kinase A
SNAP	soluble NSF attachment protein
SNARE	SNAP-receptor Komplex

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Hans-Joachim Wagner bedanken, der mir diese Arbeit am Anatomischen Institut ermöglichte, sie mit stetem Interesse begleitete und mit wertvollen Hinweisen bereicherte.

Mein ganz spezieller Dank gilt Dr. Uwe D. Behrens. Ihm verdanke ich die ersten Einblicke und das beginnende Verständnis für naturwissenschaftliche Fragestellungen. Seine Art, empirisch zu denken, wird mir immer nützlich sein. Weiterhin bedanke ich mich für sein nicht selbstverständliches Engagement an Sonntagnachmittagen am Elektronenmikroskop und seiner Fähigkeit, Begeisterung für Spinules weiterzugeben. Außerdem versetzte er mich immer wieder in Erstaunen, mit seinem Wissen über Literatur, Kunst, Philosophie und Musik. Leider hab ich nicht halb so viel davon behalten, wie ich gerne behalten und v.a. verstanden hätte.

Ein besonderer Dank auch Herrn Dr. Andreas Mack für Rat und Tat am CLSM, fruchtbare Diskussionen („Ich sehe da keine Laminierung, Unterschiede usw.“) und Beistand in ratlosen Krisen. Sein Humor und Art, die Dinge gelassen anzugehen, halfen mir immer weiter.

Außerdem bedanke ich mich bei Uli Mattheus, Bernhard Hirt, Heiko Kaiser, Mihnea Nicolescu, Karin Tiedemann, Birgit Dettmann-Geprägs, Barbara Wallenfels, May Daraban, Familie Fridrich und Familie Uhl. Bei allen anderen, die ich vergessen habe, bitte ich um Nachsicht.

Publikationen

Behrens UD, Uhl M, Wagner H-J (2002) Heterogeneity of spinules in Mb-bipolar cell axon terminals: morphology, spatial distribution, temporal dynamics, gephyrin-immunoreactivity. *Eur. J. Neurosci.* (in press).

Behrens UD, Uhl M, Wager H-J (1999) Differential distribution of inhibitory postsynapses in PKC-immunoreactive axon terminals in the inner plexiform layer of the goldfish retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 (4), S442.

Behrens UD, Uhl M, Wagner HJ (1999) Der Einfluß von Hell- und Dunkeladaptation auf die Gephyrin- und SNAP-25-Immunoreaktivität in der Goldfischnetzhaute. Supplement zum 1181. Band des Anatomischen Anzeigers (94. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft.)- *Annals of Anatomy*, 181, 32.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

- Geburtsdatum: 16.01.1975
- Geburtsort: Leutkirch im Allgäu
- Familienstand: ledig
- Eltern: Arthur Uhl
Adelheit Maria Uhl

Schulbildung:

- 1981-1985 Grundschole Bad Wurzach
- 1985-1994 Salvatorkolleg Bad Wurzach
- 1994 Abitur; Leistungskurse in
Mathematik und Physik

Ersatzdienst:

- 1994-1995 Zivildienst im St. Elisabethen Krankenhaus
Ravensburg

Studium:

- 03/1996 Immatrikulation an der
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 27.03.1998 Ärztliche Vorprüfung
- 1998 bis 2000 Promotion am Anatomischen Institut Tübingen
- 23.03.1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 05.04.2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 04/2001 Praktisches Jahr Universitätsklinik Tübingen
(Wahlfach Neurologie)
- 24.05.2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung