

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

PKC in Bipolarzellen der Goldfischnetzhaut  
(Heterogenität der Isoformen, intrazelluläre Verteilung und  
Beteiligung an strukturellen Veränderungen)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Victoria Pohl-Sitzler

aus

Freiburg im Breisgau

2006

Dekan:

Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-J. Wagner

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Wolburg

Für Astrid und Bernhard aus dem Bächle

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Proteinkinase C .....	1
1.1.1 Allgemeines.....	1
1.1.2 Proteinkinase C: Aufbau und Funktion .....	2
1.2 Retina.....	7
1.2.1 PKC in der Retina.....	9
1.2.2 PKC und Zellmorphologie.....	9
1.2.3 PKC und Rezeptoren.....	10
1.2.4 Signaltransduktion .....	10
1.2.5 PKC und Vesikelausschüttung .....	11
1.3 PKC und synaptische Plastizität.....	11
1.4 Fragestellung .....	14
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien.....	15
2.1.2 Versuchstiere .....	16
2.1.3 Antikörper .....	17
2.1.4 Spezifität und Endkonzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz und Western Blot.....	18
2.1.5 Lösungen und Puffer zum Nachweis von PKC in Kryostatschnitten .....	19
2.2 Gewebsaufbereitung zur Herstellung von Kryostatschnitten .....	20
2.3 Lokalisation und Expression von PKC- Isoenzymen (Immunfluoreszenz) der Goldfischnetzhaute.....	21
2.4 Phorbol- Ester- Versuche.....	22
2.5 Konfokale Laserscanmikroskopie.....	22
2.6 Semiquantitative Bestimmung von PKC- Isoformimmunoreaktivität.....	24
2.7 Biochemische Methoden .....	26

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
3.1	Immunhistochemischer Nachweis von PKC Isoformen in der Goldfischnetzhaut..... 28
3.1.1	PKC- alpha Immunoreaktivität..... 29
3.1.2	PKC- beta 1 Immunoreaktivität..... 30
3.1.3	PKC- epsilon Immunoreaktivität ..... 32
3.1.4	PKC- zeta Immunoreaktivität..... 33
3.1.5	PKC- eta Immunoreaktivität..... 35
3.2	Kontrollen zur Überprüfung der Spezifität der Isoform-spezifischen Antikörper an Gefrierschnitten ..... 36
3.3	Western Blot Untersuchung von PKC- Isoformimmunoreaktivität in Homogenaten der Goldfischnetzhaut ..... 38
3.4	Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die PKC- Isoform-immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut ..... 40
3.4.1	PKC- alpha Immunoreaktivität..... 40
3.4.2	PKC- beta 1 Immunoreaktivität..... 41
3.4.3	PKC- epsilon Immunoreaktivität ..... 41
3.4.4	PKC- zeta Immunoreaktivität..... 42
3.5	Semiquantitative Bestimmung von PKC- Isoformimmunoreaktivität in Mb- Bipolarzellen in Gefrierschnitten hell- und dunkeladaptierter Netzhäute ..... 44
3.6	Einfluss von Hell und Dunkel auf die Isoformimmunoreaktivität in Western Blot- Spuren von Zytosol- und Membranfraktionen hell- und dunkeladaptierter Netzhäute.....46
3.7	Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die subzelluläre Verteilung von PKC- beta1 Immunoreaktivität in den Axonterminalen der Mb- Bipolarzellen.....50
3.8	Pharmakologische Manipulation der Aktivität von PKC durch Phorbol ester und ihre Effekte auf PKC- alpha Immunoreaktivität (in- vitro Versuche).....53

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
4.1 Kritik der Methoden.....	59
4.1.1 Kontrollen und Spezifität der Antikörper.....	59
4.1.2. Weglassen der Primärantikörper.....	59
4.1.3 Präabsorption der Primärantikörper .....	60
4.1.4 Kreuzverdrängung.....	60
4.1.5 Kontrollen bei den Western Blots .....	60
4.1.6 Schlussfolgerungen (zur Spezifität der Antikörper) .....	61
4.1.7 Anmerkungen zur Gewebeaufbereitung, zum Mikroskopieren und zur Auswertung von Grauwerten (Pixelintensitäten).....	62
4.1.8 Anmerkungen zu den Western Blot Untersuchungen.....	65
4.1.9 Phorbolesterversuche.....	66
4.2 PKC Isotypen .....	67
4.2.1 PKC- alpha .....	67
4.2.2 PKC- beta.....	68
4.2.3 PKC- epsilon .....	68
4.2.4 PKC- eta.....	69
4.2.5 PKC- zeta .....	69
4.3 Kolokalisation mehrerer Isoformen.....	72
4.3.1 Biologische Bedeutung bzw. Funktion der Kolokalisation.....	73
4.4 Funktionelle Bedeutung von PKC- Isoformen in Bipolarzellen .....	74
4.4.1 GABA- Rezeptoren.....	75
4.4.2 Vesikeldynamik .....	76
4.4.3 Aktinfilamente.....	76
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>79</b>
<b>6. ÜBERSICHT: PKC ISOFORMEN IN NETZHÄUTEN VERSCHIEDENER WIRBELTIERE .....</b>	<b>82</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>83</b>
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>96</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>97</b>
9.1 Danksagung .....	97
9.2 Lebenslauf.....	98

## Abkürzungsverzeichnis

PKC	Proteinkinase C
LTP	Langzeitpotenzierung
DAG	Diacylglycerol
IP3	Inositol- Triphosphat
PKA	Proteinkinase A
OPL	Äußere plexiforme Schicht
IPL	Innere plexiforme Schicht
ONL	Äußere Körnerschicht
INL	Innere Körnerschicht
GABA	Gamma- Aminobuttersäure
PB	Phosphatpufferlösung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDBu	Phorbol- 12,13- Dibutyrat
PMA	Phorbol- 12- Myristat- Acetat
RT	Raumtemperatur
ROI	Region- of- Interest
BC	Bipolarzelle
HC	Horizontalzelle
BCT	Bipolarzell- Terminale
MARCKS- Proteine	Myristolated alanine rich C kinase substrate- Proteine
IR	Immunoreaktivität
ZNS	Zentrales Nervensystem
LTD	Langzeitdepression

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Proteinkinase C

### 1.1.1 Allgemeines

Im Jahre 1977 wurde die Proteinkinase C durch die Gruppe von Nishizuka in Japan beschrieben (Takai et al. 1977). Seitdem gewann dieses Enzym zunehmend an Bedeutung für die Zell- und Neurobiologie. Anfang der 80er Jahre entdeckte man, dass PKC Phorbolster binden, welche mit Diacylglycerol um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren (Castagna et al. 1982). PKC wird durch Phorbolster aktiviert (Castagna et al. 1982). Seit bekannt ist, dass PKC eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielt, ist das Interesse sowie auch die Zahl der Veröffentlichungen zum Thema PKC gestiegen (van der Zee und Douma 1997). Bereits 1986 konnten die ersten Isoformen dieses Enzyms (PKC-alpha, beta, gamma) molekularbiologisch im Genom des Menschen, der Ratte sowie beim Kaninchen nachgewiesen werden (Cussens et al. 1986; Ohno et al. 1987). Man vermutete zu dieser Zeit schon einen Zusammenhang von PKC und Lernen (bzw. Gedächtnis), da Untersuchungen von DeRiemer und Mitarbeitern zeigen konnten, dass die Aktivierung von endogenem PKC den spannungsabhängigen Calcium-Strom in „bag cell-Neuronen“ der Nacktschnecke *Aplysia californica* steigert (DeRiemer et al. 1985). Dies wiederum bewirkt eine langandauernde Erhöhung der Erregbarkeit dieser Zellen. Somit wurde hier ein Grundstein für weitere Untersuchungen der PKC im Bezug auf synaptische Plastizität sowie auf „Informationsspeicherung“ gelegt.

In den frühen 90er Jahren begann man die Rolle von PKC bei Langzeitpotenzierung (LTP) zu studieren. Dabei beschäftigte man sich mit der Beteiligung von PKC an prä- und postsynaptischen Komponenten der LTP. Man konnte hierbei beobachten, dass es prä- und postsynaptisch zu einer unterschiedlichen Lokalisation von PKC-Isoformen kommt (Huang et al. 1999).



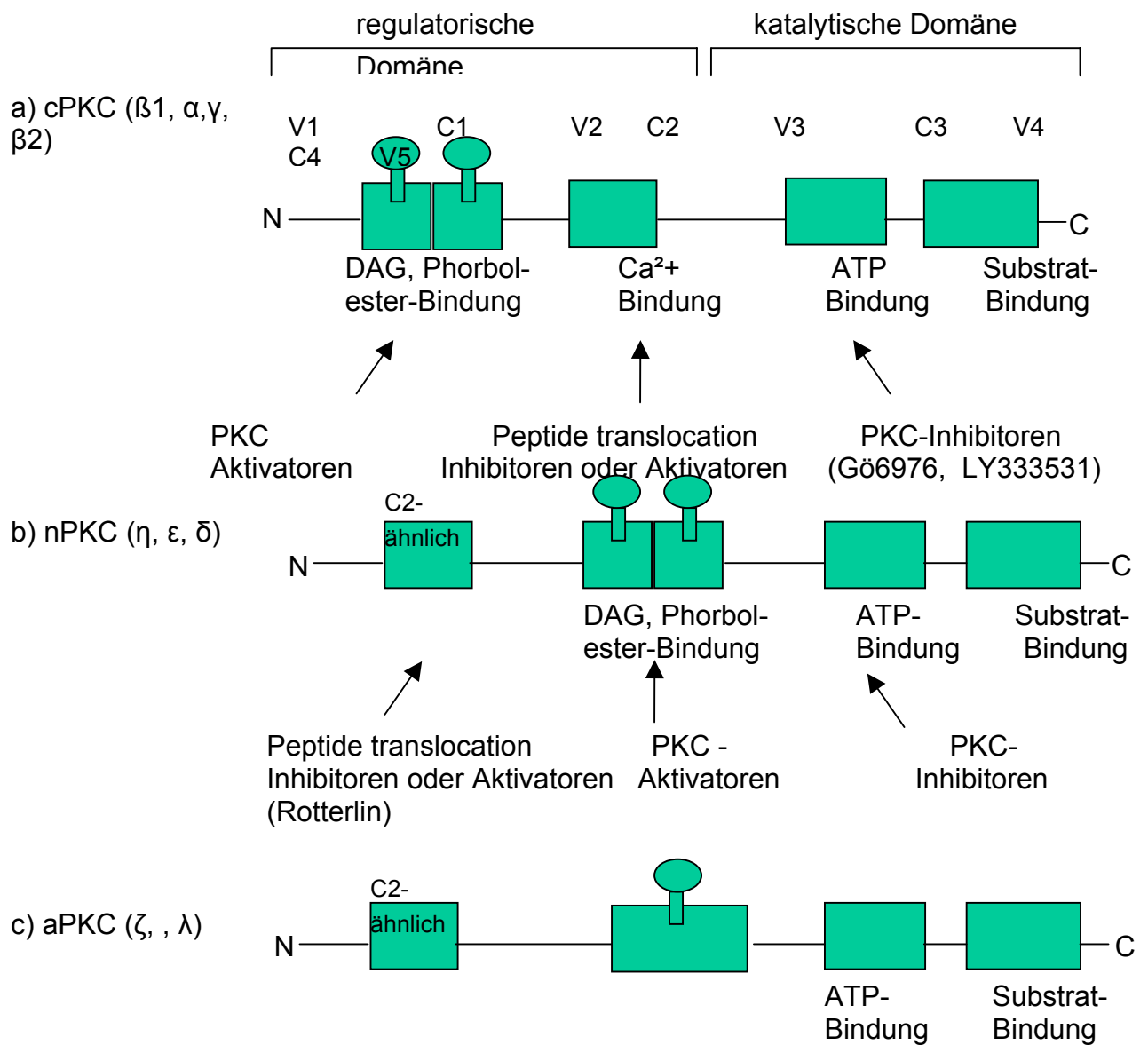
### 1.1.2 Proteinkinase C: Aufbau und Funktion

PKC (das C steht für Calcium) repräsentiert eine Familie von mindestens 12 Serin-/ Threonin-Kinasen, welche an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Mellor und Parker 1998). Die Aktivierung PKC-abhängiger Signaltransduktionswege erfolgt in verschiedenen Zellen durch hormonelle, neuronale und auch Wachstumsfaktor-Stimuli (Nishizuka 1992). Die Familie der PKC spielt dabei eine regulatorische Rolle bei Prozessen wie Zellproliferation, pH-Hömeostase, transkriptioneller Aktivierung von Genen etc. und ist im Nervengewebe weit verbreitet.

PKC besteht aus einer einzigen Polypeptidkette, innerhalb der man eine C-terminale katalytische sowie eine N-terminale regulatorische Untereinheit unterscheidet (Abb. 1.1). Die Untereinheiten sind über ein flexibles „Gelenk“ miteinander verbunden, welches „labil“ ist, wenn die PKC membrangebunden vorliegt (Kishimoto et al. 2000; Gomperts et al. 2003). Dies ist ein wichtiger Unterschied zu einigen anderen Proteinkinasen (zum Beispiel der Proteinkinase A), welche oft aus mehreren Polypeptidgruppen bzw. mehreren Untereinheiten bestehen, die bei Aktivierung des Enzyms abgespalten werden (Gomperts et al. 2003) (Abb. 1.2).

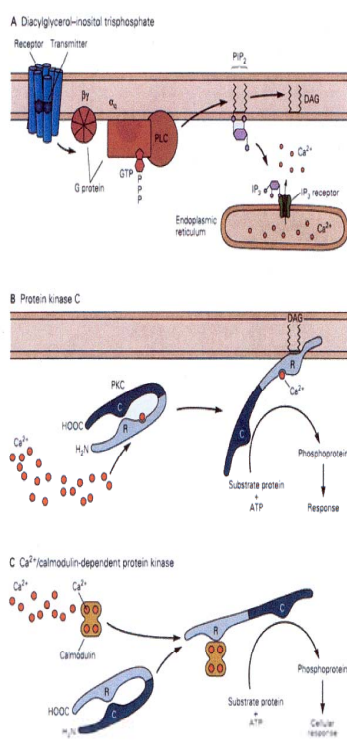
Die PKC-Isoformen unterscheiden sich in ihrer katalytischen Untereinheit kaum, aber in der regulatorischen Untereinheit weisen sie deutliche Differenzierungen auf, so dass man die PKC-Familie in drei Gruppen aufteilen kann: die klassischen, die neuen sowie die atypischen PKC-Isoenzyme (siehe Abbildung 1.1) (Way et al. 2000). Zu den klassischen Isoformen zählen PKC-alpha, beta1, beta2, gamma. In diesem Fall besteht die regulatorische Untereinheit aus zwei „konstanten“ Regionen, die als C1 und C2 bezeichnet werden, und Diacylglycerol (DAG) und Phorbol ester (beides PKC-Aktivatoren) binden (C1), sowie deren Calciumabhängigkeit bedingen (C2) (Way et al. 2000). Im Unterschied dazu fehlt bei den neuen Isoenzymen (delta, epsilon, mu, Psi) die C2-Region, anstelle von dieser besitzen sie eine C2-ähnliche Region, die strukturell mit der C2-Domäne

verwandt ist, aber kein Calcium bindet. Die Gruppe der neuen PKC-Isoformen kann Calcium-unabhängig aktiviert werden, wird allerdings - wie die klassischen Isoenzyme auch – durch DAG, Phosphatidylserin und Phorbol ester aktiviert. Die Gruppe der atypischen Isoenzyme unterscheidet sich dagegen deutlich von den anderen darin, dass sie zusätzlich zu der C2-ähnlichen Region auch noch eine veränderte C1-Region besitzen, welche weder DAG noch Phorbol ester bindet. Folglich werden die Enzyme dieser Gruppe (zeta und lamda) Calcium-unabhängig und nicht durch DAG oder Phorbol ester aktiviert, ihre Aktivität wird durch Phosphatidylserin gesteuert.



**Abb. 1.1.** Schematische Darstellung der klassischen (a), der neuen (b) und der atypischen PKC-Isoformen. Zu unterscheiden sind jeweils regulatorische und katalytische Domänen der PKC-Isoformen. Eingezeichnet sind auch die Orte der Bindung von PKC-Aktivatoren, PKC-Inhibitoren, von ATP und  $Ca^{2+}$ ; die PKC-Isoform-Familien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Regulation durch  $Ca^{2+}$ , DAG und Phosphatidylcholin (modifiziert nach Way et al. 2000).

Da für die Aktivierung von klassischen PKC-Isoformen DAG benötigt wird, ist die Aktivität von PKC direkt verbunden mit der Aktivität von Phospholipase C (Gomperts et al. 2003). Dies geschieht u.a., indem Acetylcholin als Transmitter an muskarinische Rezeptoren bindet und dadurch die Abspaltung der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins bewirkt (Albright et al. 2001). Durch diese  $\alpha$ -Untereinheit wird die Phospholipase C aktiviert, welche wiederum Phosphoinositol-Diphosphat in DAG und Inositol-Triphosphat spaltet. DAG ist der natürliche endogene Aktivator der PKC. Doch da zur PKC-Aktivierung zum Teil auch Calcium notwendig ist, gewinnt das Inositol-Triphosphat an Bedeutung: es bindet an einen IP<sub>3</sub>-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, wodurch Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden kann. Aktivierte PKC kann in membrangebundener, DAG-gebundener Form sowie in zytosolischer Form vorliegen. Weitere wichtige PKC-Aktivatoren sind die Phorbolster, welche zu den Pflanzengiften zählen (Castagna et al. 1982) und große Ähnlichkeit mit DAG besitzen.



**Abb. 1.2.** Die Hydrolyse von Phospholipiden in der Zellmembran aktiviert drei unterschiedliche second messenger Kaskaden: A zeigt die für PKC relevante Aktivierungskaskade, bei der DAG und IP<sub>3</sub> freigesetzt werden, in B wird die Aktivierung einer membrangebundenen PKC durch Calcium und DAG dargestellt, und C zeigt die Aktivierung einer Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (Abbildung aus

Kandel et al. 2001).

Außer der PKC gibt es noch einige andere Proteinkinasen, wie zum Beispiel die PKA oder die cGMP-abhängige Proteinkinase. Sie unterscheiden sich in ihrem Aufbau ebenso wie in der Signaltransduktionskaskade, mit welcher sie verknüpft sind (siehe hierzu die Übersicht in: Gomperts et al. 2003).

PKC ist ein Schlüsselenzym intrazellulärer Signalkaskaden, welches an verschiedenen Formen synaptischer Plastizität beteiligt ist (Van der Zee und Douma 1997): es spielt bei der Fazilitation (Bahnung) eine Rolle, worunter man eine Sekunden bis Minuten lang anhaltende Verstärkung der Neurotransmission nach vorausgegangener Aktivität in der präsynaptischen Endigung versteht (Kandel et al. 2001). Weiterhin hat PKC Einfluss auf die Habituation (Kandel et al. 2001). Die Beteiligung von PKC an Langzeitpotenzierung (LTP) konnte ebenfalls gezeigt werden (Angenstein und Staak 1997). Als LTP bezeichnet man eine über Stunden oder gar Tage anhaltende Verstärkung der synaptischen Übertragung nach einer kurzen Serie von Aktionspotentialen in einer präsynaptischen Nervenfasern (Kandel et al. 2001).

PKC spielt nicht nur für Lern- und Gedächtnisleistungen eine wichtige Rolle, auch bei einer Vielzahl höchst unterschiedener Krankheiten ist eine Beteiligung von PKC gezeigt worden. Zum Beispiel trägt ein Überschuss an PKC-alpha zur Transformation und Proliferation von malignen Tumoren bei (Dean et al. 1996). Eine Beteiligung von PKC-alpha an Diabetes und Herzkrankheiten konnte belegt werden: eine Überexpression von PKC-beta2 ist in Kardiomyopathien (Herzmuskelerkrankungen), Krebs und diabetisch bedingte kardiovaskuläre Komplikationen verwickelt (Ishii et al. 1998; Wakasaki et al. 1997). Von PKC-epsilon vermutet man dagegen, dass es den kardialen Schutz vor Ischämien unterstützt (Dietel 2005).

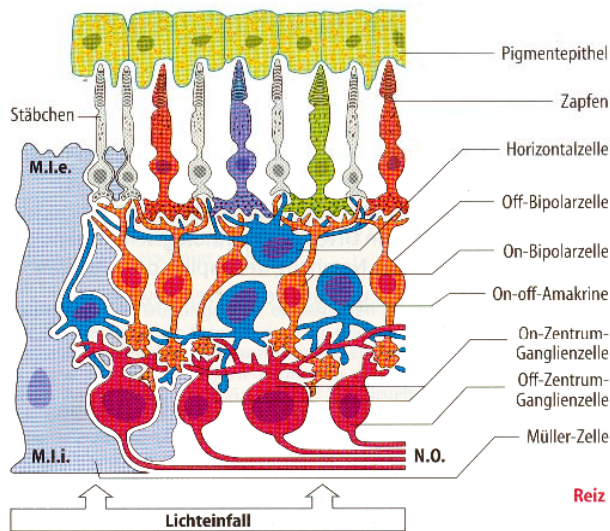
## 1.2 Retina

In den letzten Jahren wurden Antikörper gegen PKC als Marker zur Darstellung von Stäbchenbipolarzellen in der Säugernetzhaut, bzw. als Marker für eine Population von Bipolarzellen in der Goldfischnetzhaut, die Stäbchen- und Zapfeneingänge erhalten, verwendet (Ishida et al. 1980; Suzuki und Kaneko 1990). Diese Anfärbung diskreter Zellpopulationen ermöglichte damit Untersuchungen zu adaptionsabhängigen strukturellen Veränderungen in der Netzhaut (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996; Behrens et al. 1998).

Im Folgenden soll kurz der Aufbau der Retina beschrieben werden (Abb. 1.3), um sodann adaptionsabhängige morphologische Veränderungen von Bipolarterminalen zu erwähnen.

Der gemeinsame Grundaufbau der Wirbeltiernetzhaut besteht aus den synaptischen Schichten OPL und IPL (äußere bzw. innere plexiforme Schicht) und den drei Zellkörperschichten ONL, INL (äußere bzw. innere Körnerschicht) sowie Ganglienzellschicht. Sie sind folgendermaßen angeordnet:

Zwischen der äußeren und der inneren Körnerschicht, welche von den Zellkörpern der Stäbchen und Zapfen (ONL) bzw. den Zellkörpern der Bipolarzellen, Amakrinzellen und Horizontalzellen (INL) gebildet werden, liegt die äußere plexiforme Schicht. Die innere plexiforme Schicht liegt zwischen innerer Körnerschicht und Ganglienzellschicht; die Axone der Ganglienzellen bilden den Nervus opticus (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3.** Anhand dieser Abbildung wird der Aufbau der Säugernetzhaut verdeutlicht. M.I.e. steht für Membrana limitans externa, M.I.i. dementsprechend für Membrana limitans interna und N.O. für Nervus opticus. (Schmidt et al. 2000).

Das in das Auge eintreffende Licht muss zuerst die gesamten Schichten der Retina durchdringen, bevor es die lichtsensitiven Außensegmente der Photorezeptoren erreicht. Das Lichtsignal der Photorezeptoren wird in der OPL auf die Bipolarzellen übertragen, deren Zellkörper in der INL liegen. Die Bipolarzellen übertragen dann die „visuelle Information“ auf die Ganglienzellen, deren Axone den optischen Nerv bilden (Abb. 1.3).

### **1.2.1 PKC in der Retina**

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Rolle von PKC in den Mb-Bipolarzellen der Goldfischretina beschäftigt, soll in diesem Abschnitt ein kurzer Überblick über einige der bisher bekannten Effekte der PKC in der Retina gegeben werden.

Die enzymatische Aktivität von PKC konnte mit biochemischen Methoden schon frühzeitig in der Rindernetzhaut und in der Rattenretina nachgewiesen werden (Inoue und Isayama 1984; Wood et al.1997). Es gibt ebenfalls Untersuchungen über Immunoreaktivität von PKC-alpha und -beta in dopaminergen Zellen in Retinae von verschiedenen Fischarten, Fröschen, Katzen etc. (Negishi et al. 1988). Weiterhin haben Suzuki und Kaneko gezeigt, dass in den Bipolarzellen der Goldfischretina PKC-alpha vorhanden ist (Suzuki und Kaneko 1990).

### **1.2.2 PKC und Zellmorphologie**

Die Morphologie von Zellen wird durch PKC beeinflusst, indem diese u.a. auf die Organisation des Aktinnetzwerkes von Zellen wirkt (Hartwig et al. 1992; Rösner et al. 1995; He et al. 1997). In ON-Bipolarzellen mit großen Axonterminalen in der Goldfischretina spielt PKC eine Rolle beim Wachstum der Aktinfilamente (Job und Lagnado 1998): depolarisiert man Bipolarzellen für 5 Minuten in 50mM KCl in Gegenwart von zwei Phorbolestern (PDBu und PMA), kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Dicke des Aktinfilamentnetzwerkes.

Aktuelle physiologische Befunde legen nahe, dass die depolarisierenden Bipolarzellen auf Licht mit einem Calcium-Einstrom in ihren Dendriten antworten, die dann zu einer Aktivierung von PKC führen kann, so dass es dann zu Enzymverlagerungen im Zusammenhang mit Lichtadaptation kommen kann (Shiells und Falk 2000).



### **1.2.3 PKC und Rezeptoren**

#### *Inhibitorische Rezeptoren:*

Gamma-Aminobuttersäure (GABA) ist ein wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter des Säugernervensystems (Sivilotti & Nistri 1991; Feigenspan und Bormann 1998). GABA kann auf mindestens drei strukturell sowie pharmakologisch unterschiedliche GABA-Rezeptoren (GABA-A-, GABA-B-, GABA-C-Rezeptoren) wirken (Bormann 2000). Durch PKC kommt es zu einer Herunterregulation der Funktion von GABA-A- und GABA-C-Rezeptoren (Feigenspan und Bormann 1994; Krishek et al. 1994).

#### *Exzitatorische Rezeptoren:*

Zu den exzitatorischen Rezeptoren zählen die Glutamat-Rezeptoren, von denen mindestens fünf pharmakologisch deutlich unterschiedliche Rezeptoren existieren (Massey 1990; Brandstätter und Hack 2001). Diese sind in der Lage, die Gruppe der klassischen sowie der neuen PKCs zu aktivieren, indem intrazelluläre Calcium- oder DAG-Spiegel angehoben werden, oder spannungsabhängige Calcium-Kanäle geöffnet werden (Pin und Duvoisier 1995). Weiterhin wird die Funktion der Glutamat-Rezeptoren durch Phosphorylierung mit Hilfe von PKC reguliert.

### **1.2.4 Signaltransduktion**

PKC spielt im Zusammenhang mit der Regulation der Phototransduktionskaskade eine Schlüsselrolle, da sie in der Lage ist, die Phosphorylierung von Rhodopsin und Transducin zu katalysieren (Newton und Williams 1993). Dabei bewirkt eine Phosphorylierung von Rhodopsin durch PKC, dass die Aktivierung von Transducin reduziert wird (Newton und Williams 1993).

### **1.2.5 PKC und Vesikelausschüttung**

In vielen Synapsen wird die Transmitterausschüttung der präsynaptischen Terminale durch Aktivierung verschiedener Proteinkinasen wie zum Beispiel der PKA oder der PKC moduliert (Nicoll und Malenka 1995; Byrne und Kandel 1996). Im Falle der Bipolarzellen in der Goldfischnetzhaute wurde von Minami und Mitarbeitern untersucht, ob durch Aktivierung von PKC die Transmitterausschüttung beeinflusst wird (Minami et al. 1998). Die Autoren konnten zeigen, dass eine pharmakologische PKC-Aktivierung die Transmitterausschüttung erhöht. Nicht ganz in Deckung mit einer einfachen Rolle von PKC waren Befunde, die ergaben, dass eine Zugabe von spezifischen PKC-Hemmern nicht zu einer erwarteten Herabsetzung der Transmitterausschüttung führt (Minami et al. 1998). Dieser Beobachtung wurde dahingehend interpretiert, dass PKC wohl nicht das entscheidende Enzym ist, was an der Transmitterausschüttung beteiligt ist. Neuere Arbeiten zeigen ein differenzierteres Bild; so konnte man mit pharmakologischen und physiologischen Methoden zeigen, dass PKC an der langsamen Komponente der Transmitterfreisetzung in der Bipolarzellen beteiligt ist (Berglund et al. 2002).

### **1.3 PKC und synaptische Plastizität**

Als Plastizität (neuronal Plastizität) bezeichnet man ganz allgemein die Veränderbarkeit neuronaler Verbindungen im Nervensystem (Kandel et al. 2001). Häufig werden plastische Vorgänge im Nervensystem in physiologische und strukturelle Plastizität unterschieden. Unter physiologischer Plastizität werden eher Veränderungen in der Effizienz der synaptischen Übertragung verstanden, während man als strukturelle oder auch anatomische Plastizität eher Vorgänge zusammenfasst, bei denen es zu morphologischen Veränderungen im Nervensystem kommt (Kandel et al. 2001). Veränderungen in der Aktivität von Nervenzellen führen zu biochemischen, physiologischen und strukturellen Veränderungen von synaptischen Kontakten (Zieglmond et al. 1999). Synaptische Plastizität findet nicht nur im sich entwickelnden Nervensystem statt (Jacobson

1991), sondern plastische Veränderungen sind auch bei Regenerationsvorgängen zu beobachten (Deller und Frotscher 1997). In jüngster Zeit konnten auch plastische Veränderungen im Nervensystem adulter Wirbeltiere mehrfach gezeigt werden (Buonomano und Merzenich 1998).

Die Vorstellung davon, dass Nervenzellen zu strukturellen Veränderungen in der Lage sind, besteht schon seit geraumer Zeit. Bereits 1906 stellte Ramon y Cajal eine sogenannte „Plastizitätshypothese“ auf, welche später (1949) von dem polnischen Psychologen Jerzy Konorski und dem Montrealer Psychologen Donald Hebb übernommen wurde. Diese besagt, dass ein Stimulus eine zweifache Veränderung im Nervensystem bewirkt: erstens reagieren die Neuronen auf einen ankommenden Impuls und bewirken Veränderungen und zweitens kommt es zu plastischen Veränderungen. Hebb und Konorski sind dabei von der Annahme ausgegangen, dass Lernen und Erinnerung mit Aktivitätsänderungen in Zellverbänden und speziellen Neuronenkreisen zu tun haben muss. Aufgrund dieser Vorüberlegungen erlangte die Untersuchung der synaptischen Plastizität unter Einbeziehung verschiedener Gebiete (Biochemie, Elektrophysiologie, Anatomie) ein hohes Interesse.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Studien zur Plastizität im Hippocampus veröffentlicht, wobei man sich hier besonders für LTP interessiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich nach Auslösung von LTP die Anzahl von Schaft- und Dornsynapsen langfristig verändert (Lee et al. 1980), während die Gestalt synaptischer Kontaktzonen nur kurzfristigen Veränderungen unterliegt (Chang und Greenough 1984). Intensive Aufmerksamkeit wird der Frage gewidmet, in welcher Weise physiologische Veränderungen in der synaptischen Übertragung nun genau mit morphologischen und strukturellen Veränderungen einhergehen und wie die Kausalitätsbeziehungen dabei aussehen.

Vor diesem Hintergrund sind auch die Bemühungen zu verstehen, die Rolle von Proteinkinasen bei dynamischen Veränderungen neuronaler Kommunikation zu verstehen.

In den letzten Jahren wurde die Retina von Knochenfischen immer mehr zu einem Forschungsobjekt, um Mechanismen synaptischer Signalübertragung und damit auch von synaptischer Plastizität zu untersuchen. Bipolarzellen aus der Goldfischnetzhaute wurden zu einem bevorzugten Studienobjekt von Physiologen, um u.a. Mechanismen neuronaler Kommunikation auf der Seite der Präsynapse zu untersuchen (Matthews 1999). Für physiologische Untersuchungen werden Bipolarzellen herangezogen, die über große Axonterminale verfügen (Durchmesser der Axonterminale: ca. 10-15µm). Diese Bipolarzellen mit großen synaptischen Terminalen lassen sich (wie schon erwähnt) z. T. mit Antikörpern gegen PKC anfärben. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die großen Terminalen von PKC-immunoreaktiven Bipolarzellen im Hellen eine andere Morphologie besitzen als im Dunkeln (Yazulla und Studholme 1992). Diese adaptationabhängigen strukturellen Veränderungen der PKC-immunoreaktiven Bipolarterminalen beziehen sich zum einen auf Form und Gestalt der gesamten Terminalen (eher rundlich im Hellen und weniger „rundlich“ im Dunkeln) und zum anderen auf Spinules (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996). Die Bipolarzellspinules sind fingerförmige Evaginationen der Bipolarzellterminalen, die in Amakrinzellboutons invaginieren. Bipolarzellspinules sind zahlenmäßig in der helladaptierten Netzhaut häufiger anzutreffen als in der dunkeladaptierten Netzhaut.

## 1.4 Fragestellung

Vor dem Hintergrund der größer werdenden Gruppe der PKC-Isoformen stellt sich konkret die Frage, ob in der Goldfischnetzhaute neben den bisher gut untersuchten Vertretern der klassischen Isoformen sich auch Vertreter der neuen und atypischen PKC-Isoformen mit immunhistochemischen Methoden nachweisen lassen. Hierzu sollen jeweils mehrere Vertreter dieser Isoformgruppen immunhistochemisch und mit Western Blot Techniken in der Goldfischnetzhaute untersucht werden.

Zunehmend mehren sich Berichte, die zeigen das in einzelnen Zellpopulationen mehr als nur eine PKC-Isoform vorkommt. In Herzmuskelzellen wurden 5 PKC-Isoformen gefunden, die in den Myozyten kolokalisieren (Dorn und Mochly-Rosen 2002). In Bindegewebszellen wurden sogar 8 verschiedene PKC-Isoformen gefunden, die kolokalisiert vorkommen (Goodnight et al. 1995). Mit Hilfe von isoformspezifischen Antikörper soll untersucht werden, ob sich verschiedene Isoformen in Mb-Bipolarzellen nachweisen lassen.

Beschrieben ist der Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die Verteilung von PKC-alpha- Immunoreaktivität in Mb-Bipolarzellen. Mit Methoden der computergestützten Bildauswertung und Western Blot Techniken soll untersucht werden, welchen Einfluss Hell und Dunkel auf die Verteilung von PKC-Isoformimmunoreaktivität in Gefrierschnitten bzw. in Zytosol- und Membranfraktionen (nach subzellulärer Fraktionierung) hat.

Klassische PKC-Isoformen lassen sich durch Phorbolester aktivieren. Mit Hilfe von in-vitro Versuchen (Kurzzeitkulturen von isolierten Netzhäuten) soll untersucht werden, ob Inkubationen in Ringerlösungen mit Phorbolester einen Einfluss auf PKC-alpha Immunoreaktivität in Mb Bipolarzellen hat.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Coomassie Brilliant Blue G-250	Merck, Darmstadt
DAKO-Pen	DAKO, Dänemark
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol p.a.	Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
EGTA	ICN, Eschwege
FluorSave® Reagent	Calbiochem, Bad
Soden	
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glycin	ICN, Eschwege
DAKO Pen	DAKO, Dänemark
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat p.a.	Merck, Darmstadt
beta-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
2-Methylbutan (Isopentan)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat p.a.	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen p.a.	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd reinst	Merck, Darmstadt
Perchlorsäure 70 %	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe

Ponceau S	Merck, Darmstadt
10 kDa-Proteinleiter (10 000 - 200 000 Da)	Gibco BRL,
Eggenstein	
Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V, pH 7,0,	Boehringer
Ingelheim,	
D(+)-Saccharose p.a.	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat) ultra pure	Roth, Karlsruhe
TEMED p.a.	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek®	Sakura, Niederlande
Trichloressigsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Tris-HCl p.a.	Merck, Darmstadt
Triton® X-100 (Polyethylenglykol-tert-octylphenylether)	Fluka, Neu-Ulm
Wasserstoffperoxid 30 %	Fluka, Neu-Ulm
Ziegen-Normalserum	Gibco BRL,
Eggenstein	

### 2.1.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden ausgewachsene Goldfische (*Carassius auratus*) (Standardlänge: 8 bis 12 cm) verwendet. Die Tiere wurden aus dem Aquarien- und Fischhandel bezogen (Fischzuchtbetrieb Schwarz, Göttingen) und im Anatomischen Institut bei einer Wassertemperatur von 20°C und einem 12/12h Hell-Dunkel-Zyklus gehalten.

### 2.1.3 Antikörper

#### Primärantikörper:

Spezifität	Wirt	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
Anti-PKC alpha	Kaninchen	sc-208	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PKC beta 1	Kaninchen	sc-209	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PKC-delta	Kaninchen	sc-937	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PKC-epsilon	Kaninchen	sc-214	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PKC-eta	Kaninchen	sc-215	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PKC-zeta	Kaninchen	sc-216	Santa Cruz, Heidelberg

Bei diesen Primärantikörpern handelt es sich um polyklonale Antikörper (IgG-Typ), die affinitätschromatographisch aufgereinigt wurden; sie reagieren jeweils spezifisch mit den C-terminalen Enden der jeweiligen PKC-Isoformen von Mensch, Maus und Ratte (siehe die Datenblätter der Firma Santa Cruz).

#### Sekundärantikörper:

Wirt und Spezifität	Konjugat	Bezugsquelle
Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L) Niederlande	Alexa488	Molecular Probes,
Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L)	HRP	Sigma, Deideshofen



#### **2.1.4. Spezifität und Endkonzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz und Western Blot**

##### Primärantikörper

Die isoformspezifischen Primärantikörper wurden routinemäßig in einer Endkonzentration von 0.5µg/ml (Immunfluoreszenz), und 0.1 µg/ml (Western Blot) eingesetzt. Zu verschiedenen Vorversuchen siehe jeweils die weiter unten angeführten Angaben.

##### Sekundärantikörper

Der Sekundärantikörper muß gegen die Spezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper stammt. Grundsätzlich können Antikörper, die für eine bestimmte Spezies spezifisch sein sollen, mit vielen anderen Spezies ebenfalls reagieren (= Kreuzreaktion), wenn sie nicht entsprechend präabsorbiert sind. Die verwendeten Ziegen-Antikaninchen Sekundärantikörper wurden laut Angaben der Datenblätter mit IgGs aus Mensch, Ratte und Maus präabsorbiert.

##### Fluorochrommarkierte Sekundärantikörper (Immunfluoreszenz)

Als fluoreszierende Konjugate der Sekundärantikörper wurde der Alexafarbstoff Alexa488-Ziege-Anti-Kaninchen (Molecular Probes) verwendet. Das Exzitationsmaximum (= Wellenlänge, bei der die Anregung am stärksten ist) von Alexa 488 (Carbocyanin) liegt bei 495 nm, das Emissionsmaximum bei 519 nm. Der Sekundärantikörper wurden in einer Konzentration von 2 µg / ml verdünnt aufgetragen.

## 2.1.5. Lösungen und Puffer zum Nachweis von PKC in Kryostatschnitten

### Phosphatpufferlösung (PB)

1,068 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

0,828 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

wurden in 33 ml A. bidest. gelöst; der pH 7.4 wurde mit 1 N HCl eingestellt.

### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

7,0 g NaCl, 2,86 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit 950 ml A. bisdest gelöst; der pH 7.4 wird mit 1 N NaOH-Lösung eingestellt; zum Schluß wird ad 1000 ml mit A. bidest aufgefüllt.

### Paraformaldehyd-Fixierlösung

4 % Paraformaldehyd und 3 % Sucrose in 0,06 M Phosphatpuffer:

4 g Paraformaldehyd, 3 g Sukrose, 66 ml A. bidest., 3 Tropfen 5 N NaOH wurden unter Rühren auf 60 °C erhitzt.; nachdem die Lösung abkühlte wurden 33 ml der 0.2 M Phosphatpufferlösung (pH 7.4) hinzugegeben.

10% Saccharoselösung: 5 g Saccharose, ad 50 ml PBS

20% Saccharoselösung: 10 g Saccharose, ad 50 ml PBS

30 %ige Saccharoselösung: 15 g Saccharose, ad 50 ml PBS

### Präinkubationslösung für Primär- und Sekundärantikörper

4 % Ziegen-Normalserum-Normalserum, 1 % BSA, 0,25 % Triton X-100 in PBS.

### Antikörper-Verdünnungslösung

Die Präinkubationslösung wurde mit PBS (mit 0,25 % Triton X-100) 1:1 verdünnt. Mit dieser Lösung wurden die Antikörper aufgenommen.

### Präabsorption der PKC-Antikörper

Die Primärantikörperlösung (0.5µg/ml) wurde mit einem Überschuß des korrespondierenden Peptids (2µg/ml) versetzt; Dauer der Präabsorption der verschiedenen PKC-Isoformantikörper mit den korrespondierenden Peptiden: 2 h, 4°C. Danach wurden die Antikörper- und Peptid-Mischungen auf Kryoschnitte aufgetragen oder für Western Blots verwendet.

## **2.2. Gewebsaufbereitung zur Herstellung von Kryostatschnitten**

Nachdem die Fische dekaptiert worden sind, wurden die Augen aus der Orbita präpariert und mit Hilfe einer Rasierklinge halbiert. Aus den hinteren Augenbechern wurde dann die Netzhaut herauspräpariert. Isolierte Netzhäute wurden für eine Stunde bei 4 °C immersionsfixiert. Anschließend wurden die Netzhäute 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen, um sie daraufhin in einer aufsteigenden Saccharose-Lösungen nacheinander zu überführen (Kryoprotektion): für 30 Minuten in eine 10%ige Saccharose-Lösung, anschließend für 60 Minuten in eine 20%ige und zum Schluss für 90 Minuten bzw. auch über Nacht in eine 30%ige Saccharose-PBS-Lösung. Danach wurden die Netzhäute mit „Tissue Tek“ eingefroren. Kryoschnitte (ca. 20 µm dick) wurden bei -20 °C mit einem Gefriermikrotom (Firma Slee) hergestellt. Die Gefrierschnitte wurden auf mit 0.5% Gelatine und 0.05% Kaliumdichromatsulfat beschichtete Objektträger aufgebracht und anschließend 4 h oder über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet (Larsson 1988; Romeis 1989). Gefrierschnitte hell- und dunkeladaptierter Tiere wurden nebeneinander auf die Objektträger aufgezogen und später gemeinsam inkubiert.

### **2.3. Lokalisation und Expression von PKC- Isoenzymen in Kryostatschnitten (Immunfluoreszenz) der Goldfischnetzhaut**

Für die immunhistochemischen Anfärbungen wurden die Schnitte am folgenden Tag mit einem Fettstift umrandet und für 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer feuchten Kammer mit einer Präinkubationslösung behandelt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen (Larsson 1988). Darauf folgte das Auftragen der Primärantikörper (Anti-PKC- alpha, beta1, delta, epsilon, eta, zeta in einer Verdünnung von 0.5 µg/ml (s.u.). Verdünnt wurden die Primärantikörper mit einer verdünnten Präinkubationslösung (s.o.). Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Am folgenden Tag wurden die Objektträger erneut 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend 1.5 Stunden mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, Alexa488-Anti-Kaninchen-IgG inkubiert (Verdünnung 1 µg/ml). Danach wurden die Objektträger ein letztes Mal 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen und daraufhin mit Fluorsave® (Calbiochem) versiegelt.

Als methodische Kontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen, sonst wurde wie weiter unten beschrieben verfahren. Durch das Weglassen des Primärantikörpers kann man feststellen, ob der Sekundärantikörper ein unspezifisches Bindungsverhalten zeigt. Da diese Versuche keine Färbungen zeigten, kann man davon ausgehen, dass die Markierungen auf die Bindungen der jeweiligen Primärantikörper zurückzuführen sind.

Als weitere Kontrolle wurden die Primärantikörper gegen die verschiedenen PKC-Isoformen mit den jeweiligen Peptiden präabsorbiert (Konzentration 5 µg/ml; Dauer der Präabsorption: 2 h, 4 °C). Danach wurden diese Mischungen aus Primärantikörpern und dem entsprechenden Peptid auf die Gefrierschnitte gegeben und wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben in gleicher Weise behandelt wie die Präparate, die mit den Primärantikörpern versetzt wurden.

## **2.4. Phorbolester-Versuche**

Um Effekte von Phorbolester auf PKC-Isoformimmunoreaktivität zu untersuchen, wurden helladaptierte Goldfischnetzhäute präpariert. Durchgeführt wurden die Versuche mittags um 12 Uhr.

Isolierte Netzhäute helladaptierter Fische wurden 30 Minuten in einer Fischringerlösung (115mM NaCl, 2.5mM KCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Glucose, 10mM HEPES; Angaben nach: Zenisek und Matthews 2000) mit Pharmaka inkubiert.

Folgende Aktivatoren und Inhibitoren von PKC wurden verwendet: Phorbol 12,13-Dibutyrat (PDBu), Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA); PDBu und PMA sind potente Aktivatoren von PKC (Hockberger et al. 1989; Broad et al. 1999; Hori et al. 1999; Murphy et al. 1999). Um die Wirkung von PKC-Aktivierung durch Phorbolester zu kontrollieren, wurde auch ein inaktiver Phorbolester (4-alpha-Phorbol, bzw. 4-alpha-PDBu) verwendet; es ist seit längerem bekannt, dass 4-alpha-PDBu PKC nicht aktiviert (Job und Lagnado 1998; Frayer et al. 1999).

Die Phorbolester (aktive und inaktive Formen) wurden in einer Konzentration von 10-50 nM (PDBu und PMA) bzw. in einer Konzentration von 100 nM (4-alpha-PDBu) verwendet.

Nach der Inkubation wurden die Netzhäute 1 Stunde in 4% Paraformaldehyd-Lösung überführt und anschließend für Immunfluoreszenzmarkierungen an Gefrierschnitten mit Anti-PKC-Beta1 als Primärantikörper weiterbehandelt. Die histologische Aufarbeitung erfolgte in gleicher Weise wie es in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurde.

## **2.5. Konfokale Laserscanmikroskopie**

Die immunfluoreszenzmarkierten Gefrierschnitte hell- und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 410, Zeiss) untersucht. Für die Untersuchung wurden zwei Wasserimmersionsobjektive verwendet (40 x, NA= 1.2; 63 x NA= 1.2). Alexa 488

wurde mit einem externen Argonlaser (Anregungslinie 488nm) angeregt und die Emission mit einem Bandpassfilter von 515 bis 565nm bzw. einem Langpass-Filter >515nm beobachtet.

Von jeder Isoform wurden 20-25 Mb-Bipolarzellen pro individueller Netzhaut untersucht; es wurden jeweils kleine Serien angefertigt, indem 15-25 optische Schnitte (Intervall in der Z-Achse: 0.5  $\mu\text{m}$ ) durch einzelne Terminalen gelegt wurden. Das Pinhole war auf 20 eingestellt und der elektronische Zoom betrug 2-2.5 (Übersichtsaufnahmen) bzw. 6-8 (bei hochauflösenden Serien durch einzelne Terminalen). Die Scan-Zeit betrug 8 Sekunden bei 2-facher Averagefunktion; durch die Averagefunktion wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert (Pawley 1995; Yuste et al. 1999).

Die Intensität des Argonlasers wurde in der Regel 100-fach abgeschwächt. Um eine „Übersteuerung“ des Fluoreszenzsignals zu vermeiden, wurde mit Hilfe der Range-Indikator-Funktion der LSM-Software eine elektronische Aussteuerung von Kontrast und Helligkeit vorgenommen.

Wenn Immunfluoreszenzmarkierung hell- und dunkeladaptierter Netzhäute miteinander verglichen wurden, oder wenn wie bei den Phorbolesternversuchen Effekte von Phorbol ester auf PKC-Isoformimmunoreaktivität untersucht werden sollten, wurden jeweils die gleichen Helligkeits- bzw. Kontrasteinstellungen verwendet (Mossberg et al. 1990; Gabriel et al. 2001).

Im nachfolgenden Abschnitt über semiquantitative Immunfluoreszenzbestimmungen werden weitere methodische Angaben aufgeführt, die beim Umgang mit dem LSM410 berücksichtigt wurden. Das Ziel dieser Bemühungen war es, standardisierte Bedingungen bei der Untersuchung von Immunfluoreszenzmarkierungen in hell- und dunkeladaptierten Netzhäuten einzuhalten.

## **2.6. Semiquantitative Bestimmung von PKC-Isoformimmunoreaktivität**

Immunfluoreszenzmarkierungen von PKC-Isoformen sollen für semiquantitative Bestimmungen herangezogen werden. Durch den Begriff „semiquantitativ“ soll ausgedrückt werden, dass es nicht darum geht, Aussagen über absolute Mengenangaben bzw. Konzentrationen eines Proteins (hier einer PKC-Isoform) zu erhalten, was methodisch nicht einfach wäre.

Es wurde eine Methode und ein Auswerteverfahren etabliert, mit dessen Hilfe unter kontrollierten und standardisierten Bedingungen es möglich sein sollte, bei einem „mehr“ oder „weniger“ von Immunfluoreszenzmarkierung auf zugrundeliegende Änderungen in der relativen Menge eines Antigens zu schließen (siehe hierzu auch die Übersichtsarbeiten in: Björklund und Hökfelt 1983; Larsson 1988; Harlow und Lane 1999).

Um Aussagen über relative Veränderungen eines Antigens in einem Gewebe auf eine verlässliche Grundlage zu stellen, ist es notwendig die Rahmenbedingungen zu standardisieren (O'Leary 2001).

Zu den Rahmenbedingungen, die in dieser Arbeit berücksichtigt worden sind, gehören:

1. Die gleichen Parameter bei der histologischen Aufbereitung von hell- und dunkeladaptierten Netzhäuten: Aldehydfixierung, waschen der Präparate, Saccharoseinfiltration, Dicke der Gefrierschnitte, Antikörperkonzentrationen und Dauer der Antikörperinkubation wurden bei allen Präparaten, die miteinander verglichen wurden, gleich eingehalten.

2. Gefrierschnitte hell- und dunkeladaptierter Netzhäute wurden nebeneinander auf Objektträger aufgezogen und gemeinsam inkubiert, um vergleichbare und damit identische Inkubationsbedingungen zu gewährleisten.

3. Vor dem Hintergrund, dass unterschiedliche Mengen (Konzentrationen) von Primärantikörpern die Intensität einer immunhistochemischen Anfärbung beeinflussen können (Larsson 1988; Harlow und Lane 1999), wurde zuerst der

angemessene Konzentrationsbereich eines Primärantikörpers bestimmt, innerhalb dessen eine Beziehung zwischen Antikörperkonzentration und „Signalintensität“ beobachtet werden konnte (siehe hierzu einen vergleichbaren Ansatz bei Ricci et al. 2002). Hierbei wurde wie folgt vorgegangen: Die Primärantikörper wurden in einem Vorversuch in einer Konzentrationsreihe von 0.1 - 2 µg/ml eingesetzt (Dauer der Inkubation 4h, bei RT); danach erfolgte die Inkubation mit einem Alexa 488 gekoppelten Sekundärantikörper (Konzentration: 2 µg/ml). Unter Verwendung gleicher „Mikroskopierparameter“ (63 x Wasser-Immersionsobjektiv, elektronischer Zoomfaktor 4, Scandauer 2 Sekunden, 2-facher Average der aufgenommenen optischen Schnitte, bei unveränderten Range-Indikator-Funktion) wurde die Antikörperkonzentration ermittelt, bei der keine weitere Zunahme der Immunfluoreszenzmarkierung festzustellen war. Es zeigte sich, dass bei einer Antikörperkonzentration > 1µg/ml dieser Sachverhalt zu beobachten war (Daten nicht gezeigt). Sodann wurden für die weiteren Versuche die Primärantikörper in einer Konzentration eingesetzt, die der Hälfte dieses Wertes entsprach (0.5 µg/ml).

4. Um adaptionsabhängige Veränderungen in PKC-Isoformimmunoreaktivität in Mb- Bipolarzellen zu erfassen, wurde in Anlehnung an vergleichbare Arbeiten aus der Literatur das relative Verhältnis der PKC-Isoformimmunoreaktivität Terminale / Zellkörper bestimmt (Osborne et al. 1991; Vaquero et al 1996, 1997; Gabriel et al. 2001). Digitale Bilder von immuoreaktiven Mb- Bipolarzellen (aufgenommen mit dem 63x Wasserobjektiv; elektronischer Zoom 2.5) wurden mit dem NIH Image Programm (Scion Image, Version Beta 4.0.2 von Scion Corporation; [www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)) bearbeitet. Mit Hilfe des „freehand selection“ Werkzeuges des NIH Image Programmes wurde ein 0.95 µm<sup>2</sup> großes ROI (Region-of-Interest) umfahren. Dieses ROI wurde für die Bestimmung der Pixelintensitäten verwendet in der Terminale bzw. im Zytoplasma des Zellkörpers positioniert.

Pro PKC-Isoform wurden jeweils 4 verschiedene hell- und dunkeladaptierte Netzhäute herangezogen; es wurden jeweils 25 Mb- Bipolarzellen pro Netzhaut für die Messung der Pixelintensitäten in den Zellkörpern bzw. in der



Axonterminale verwendet. Pro Mb- Bipolarzelle wurde das ROI an vier verschiedenen Positionen innerhalb des Zellkörpers (im Zytoplasma der Mb- Bipolarzelle) bzw. innerhalb der Terminale positioniert.

Von allen Messwerten wurde ein Leerwert (Hintergrundwert) abgezogen; dieser Leerwert wurde, wie in der Arbeit von Gabriel et al. 2001 empfohlen und beschrieben, im Bereich Zellkerne der Photorezeptoren aufgenommen. Zellkerne von Photorezeptoren wurden als Orte eines „Leerwertes“ herangezogen, da sie sich mit den PKC-Isoformantikörpern nicht anfärben lassen (Gabriel et al. 2001).

Nach Abzug dieses Leerwertes wurde für jede Mb Bipolarzelle das relative Verhältnis der Pixelintensität Terminale / Zellkörper gebildet; für eine PKC-Isoform wurde sodann der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwertes (Mittelwert  $\pm$  SEM) ermittelt.

Um zu überprüfen, ob zwischen den ermittelten Werten für hell- und dunkeladaptierte Netzhäute statistisch signifikante Unterschiede bestehen, wurde ein students-t Test verwendet.

Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn sie innerhalb eines Vertrauensintervalles von  $p < 0.05$  blieben.

## **2.7. Biochemische Methoden**

Präparierte Netzhäute wurden in flüssigem Stickstoff ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) schockgefroren. Gefrorene Netzhäute wurden unter Zugabe von Homogenisationspuffer und Proteasehemmern (20mM Tris HCl (pH 7.5), 0.5 mM EGTA, 0.1 mM PMF, 140 mM Dithiothreitol) mit Hilfe eines Homogenisators homogenisiert (10 Strokes, 25 Umdrehungen / Sek., Stufe 2).

Das Homogenat wurde sodann in 100 $\mu$ l Homogenisationspuffer aufgenommen und zentrifugiert (1500g, 8min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , Rotor TLA 100.4, Beckmann Optima TL),

um Zelltrümmer im Pellet (P1) abzutrennen, die dann verworfen wurden (siehe Abb. 3.7). Der Überstand (S1) wird der Ultrazentrifugation (Beckmann Optima TL) zugeführt (50000 U/min, 100000 g, 30min, 4 °C, Rotor TLA 100.4). Man erhält hierbei den Überstand (S 2) und das Pellet (P 2). Durch dieses Verfahren der Ultrazentrifugation (modifiziert nach Osborne 1991) erhält man ein Pellet, das Pellet 2 (P2), in dem sich Membranfragmente befinden, während der Überstand 2 (S2) die zytosolische Fraktion enthält. Mit der Membranfraktion und der zytosolischen Fraktion wird eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) durchgeführt, um gleiche Proteinmengen (5µg) in der SDS-PAGE Gelelektrophorese einzusetzen.

Die Gelelektrophorese (BIO-RAD System) wird unter standardisierten Bedingungen durchgeführt (Probenpuffer: 62.5 mM Tris-HCL (pH 6.8), 4% SDS, 10% Dithiothreitol (als Ersatz von 2-Mercaptoethanol), 0.0.1% Bromphenol-Blau, Gelzusammensetzung: Acrylamid und N,N`-Methylenbisacrylamid 40% (w/v) in Aqua (Standardpack von Serva); Endkonzentration des Gels: Trenngel 15%, Sammelgel 5%, Probemenge pro Spur 5 µg (144 min bei 80mV, 15 min Nachlaufzeit).

Für das Blotting wurde eine PVDF Membran (Immobilon-P von Millipore, Porengröße 0.45 µm) verwendet. Das Blotting erfolgte über Nacht bei 30mV bei 4 °C. Die Blotmembran wurde dann mit Ponceau S in 1% Essigsäure angefärbt, um sich davon zu überzeugen, dass der Transfer erfolgreich verlaufen ist. Danach wurden die Membranen wieder entfärbt und getrocknet.

Vor der Immunmarkierung des Blots erfolgte zuerst ein Spülen der Blotmembran für wenige Sekunden mit Methanol, um danach die Blotmembran über Nacht mit einer Präinkubationslösung zu versetzen (Präinkubationslösung: Milchpulver 5% in TBS verdünnt (20mM Tris, 0.9% NaCl, pH 8.0)). Die polyklonalen Erstantikörper (gewonnen in Kaninchen) gegen die verschiedenen PKC-Isoformen, sowie der Zweitantikörper werden jeweils in einer Konzentration 1:1000 eingesetzt (verdünnt in TBS mit 0.1 Tween). Danach erfolgte DAB Reaktion unter Standardbedingungen.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Immunhistochemischer Nachweis von PKC Isoformen in der Goldfischnetzhaut**

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei Fragen beantwortet werden:

1. welche PKC-Isoformen lassen sich mit immunhistochemischen Methoden in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut nachweisen;

2. welche Zellen in der Goldfischnetzhaut sind immunoreaktiv für verschiedene PKC-Isoformen. Es werden folgende isoformspezifische PKC-Antikörper an Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut getestet:

- I. zwei Antikörper gegen Vertreter der „klassischen“ Isoformen: PKC-alpha- und PKC-beta1-Isoform,
- II. ein Antikörper gegen einen Vertreter der „neuen“ Isoformen: PKC-Epsilon- Isoform.
- III. zwei Antikörper gegen Vertreter der Gruppe der „atypischen“ Isoformen: PKC-Eta- und PKC-Zeta-Isoform.

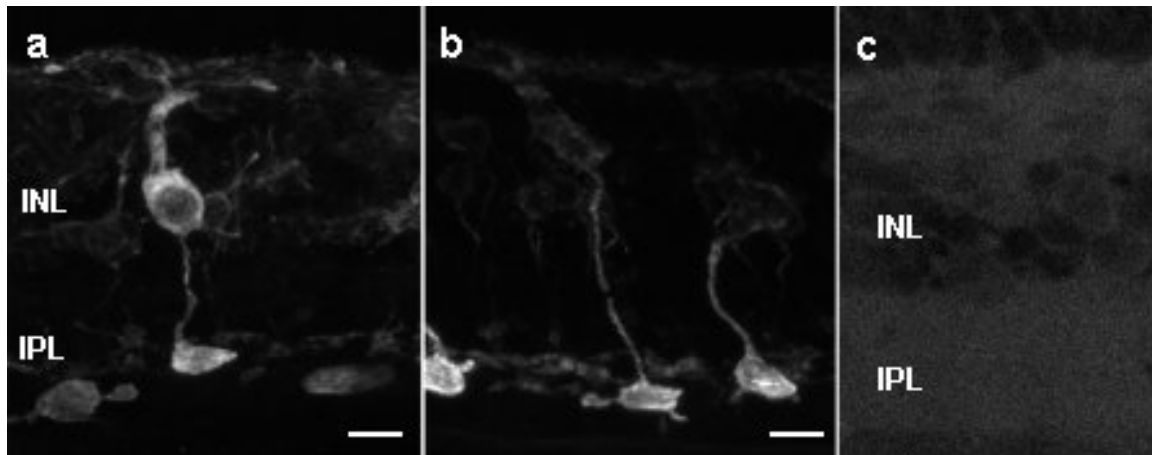
In früheren immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass Hell und Dunkel einen Einfluss auf die PKC-alpha- und PKC-beta1 Immunoreaktivität in Bipolarzellen der Goldfischnetzhaut hat (Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996; Job und Lagnado 1998). In dieser Arbeit sollen Effekte von Hell und Dunkel auf die PKC- Immunoreaktivitäten eingehender untersucht werden.

### 3.1.1 PKC-alpha Immunoreaktivität

Anfärbungen mit dem Antikörper gegen die alpha-Isoform ergaben besonders intensive Markierungen einer Population von Bipolarzellen in der Goldfischnetzhaut, welche die charakteristischen Merkmale von Mb-Bipolarzellen aufwiesen (Abb. 3.1): 1. Die intensiv markierten Zellen besitzen einen großen Zellkörper, der in der Mitte bzw. distalen Hälfte der Inneren Körnerschicht (INL) der Goldfischnetzhaut lokalisiert ist (Abb. 3.1a). 2. Die intensiv markierten Zellen besitzen eine große Axonterminale (Durchmesser: 10-15 µm), die in der Sublamina b der Inneren plexiformen Schicht (IPL) (Abb. 3.1a) stratifiziert.

Daneben sind Zellen angefärbt, die eine deutlich schwächere PKC-alpha-Immunoreaktivität aufweisen. Ihr Zellkörper ist kleiner als der Zellkörper der Mb-Bipolarzellen; der „rundliche Zellkörper“ dieser Zellen liegt eher in der „Mitte“ der INL (Abb. 3.1a+b). Die Axonterminalen dieser schwächer PKC-alpha-immunoreaktiven Zellen verzweigen in der IPL in einer Schicht, die etwas weiter photorezeptorwärts liegt, als die Schicht, in der sich die großen Mb-Terminalen befinden (Abb. 3.1a+b). Bei diesen schwächer markierten Zellen PKC-alpha-immunoreaktiven Bipolarzellen handelt es sich um ON-Zapfenbipolarzellen (Suzuki und Kaneko 1990, 1991).

In Kontrollversuchen, bei denen der Primärantikörper mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid präabsorbiert wurde, ist keine Markierung erkennbar (Abb.3.1c). Die Anfärbungen mit dem Antikörper ergaben unterschiedliche Anfärbungen in den Gefrierschnitten der hell- und der dunkeladaptierten Netzhäute. Der Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die PKC-alpha Immunoreaktivität wird weiter unten besprochen.



**Abb. 3.1.** PKC-alpha Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut. (a) helladaptierte Netzhaut; (b) dunkeladaptierte Netzhaut; (c) Präabsorptionskontrolle. INL= innere Körnerschicht IPL= innere plexiforme Schicht; Balken: 10 µm

### 3.1.2 PKC-beta 1 Immunoreaktivität

Der isoformspezifische Antikörper gegen die PKC-beta1-Isoform markiert in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut ebenfalls zwei Populationen von Bipolarzellen: Intensiv PKC-beta1- immunoreaktiv sind ebenfalls die Mb-Bipolarzellen (Abb. 3.2a+b); schwächere PKC-beta1- Immunoreaktivität ist in einer Population von Zapfenbipolarzellen anzutreffen (Abb. 3.2a+b).

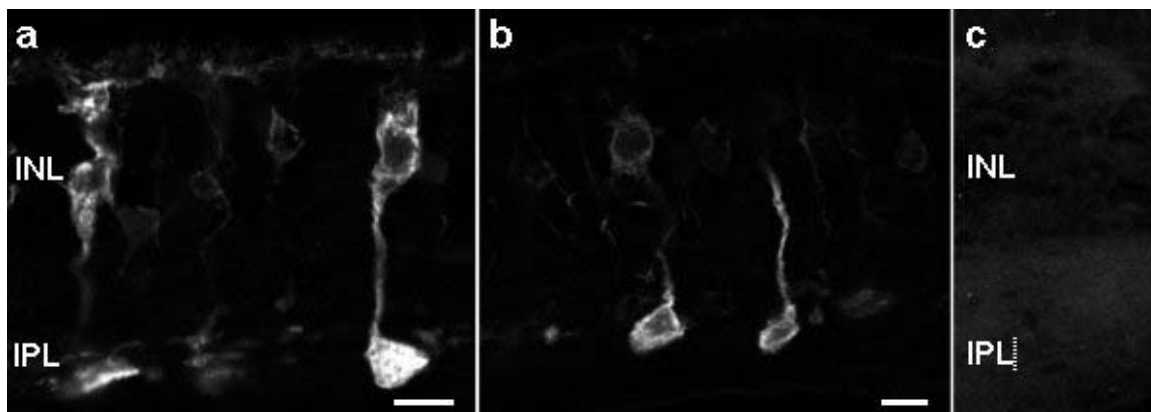
Die Präabsorption des Antikörpers mit dem entsprechenden Peptid führt zu keiner erkennbaren Anfärbung von Zellen im Gefrierschnitt der Goldfischnetzhaut (Abb. 3-2c). Aufgrund dieser Beobachtung kann gefolgert werden, dass der verwendete Antikörper keine weitere Antigene als das „Peptid“ im Gefrierschnitt erkennt; dies kann man als ein Kriterium bei der Beurteilung der Spezifität eines Antikörpers ansehen (Larsson 1988).

Die immunhistochemischen Anfärbungen mit den Antikörpern gegen die alpha- und gegen die beta1-Isoform weisen einen hohen Grad an Übereinstimmung auf. Da beide Primärantikörper in Kaninchen gewonnen worden sind, ist eine Doppelmarkierung aus praktischen Gründen nicht durchgeführt worden. Die Mb-Bipolarzellen können aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie eindeutig identifiziert werden. Bei den schwächer alpha- und beta1- immunoreaktiven Zapfenbipolarzellen dürfte es sich ebenfalls in beiden Fällen um ON-Zapfenbipolarzellen handeln. Hierfür spricht zum einen, dass die Zellkörper in vergleichbarer Höhe der INL lokalisiert sind (nämlich in der zweiten bis dritten Zellreihe, wenn man von der IPL/INL-Grenze ausgeht); zum anderen sind die Zellkörper der alpha- und beta1- immunoreaktiven Zellen gleich groß [Durchmesser der PKC-alpha immunoreaktiven Zapfenbipolarzellen:  $5.2 \pm 0.24$   $\mu\text{m}$  (Mittelwert und Standardabweichung; n=80 gemessene Zellen aus zwei hell- und zwei dunkeladaptierten Netzhäuten); Durchmesser der PKC-beta1 immunoreaktiven Zapfenbipolarzellen:  $5.1 \pm 0.21$   $\mu\text{m}$  (Mittelwert und Standardabweichung; n=80 gemessene Zellen aus zwei hell- und zwei dunkeladaptierten Netzhäuten)]. Der Durchmesser der alpha- und beta1 immunoreaktiven Zapfenbipolarzellen ist statistisch nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0.5$ , Studens t-Test).

Die Axonterminalen der alpha- und beta1- immunoreaktiven Zapfenbipolarzellen verzweigen innerhalb eines schmalen Abschnittes in der IPL, im Bereich von 60-65% „IPL-Tiefe“, während die Mb-Terminalen in der IPL in einer Zone von 65-92% „IPL-Tiefe“ liegen und stratifizieren (0%=Grenze IPL-INL; 100%: Grenze: IPL-GCL (GCL Ganglienzellschicht)). Die Bestimmung der „Stratifizierungshöhe“ wurde an 60 Zapfenbipolarzellen aus 6 Gefrierschnitten von 3 unterschiedlichen dunkeladaptierten Netzhäuten durchgeführt; die Bestimmung der „Stratifizierungshöhe“ der Mb-Terminalen erfolgte an 40 Terminalen aus zwei unterschiedlichen dunkeladaptierten Goldfischnetzhäuten. Eine weitergehende morphologische Charakterisierung dieser alpha- und beta1-Isoform-immunoreaktiven Zapfenbipolarzellen wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Es bleibt an dieser Stelle offen, ob die beiden Antikörper jeweils den gleichen

Zelltyp von Zapfenbipolarzellen anfärben, oder ob sie mehrere ON-Zapfenbipolarzelltypen markieren.

Der Einfluss von Hell und Dunkel auf die Verteilung von PKC-alpha Immunoreaktivität wird weiter unten besprochen.



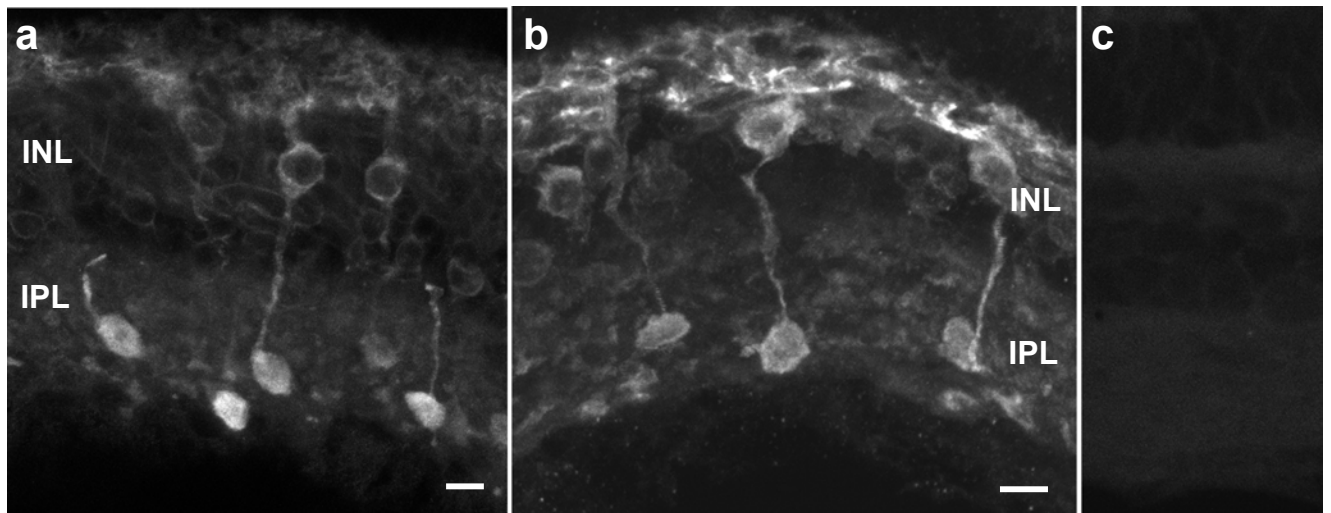
**Abb. 3.2.** PKC-beta1- Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaue. (a) helladaptierte Netzhaut; (b) dunkeladaptierte Netzhaut; (c) Präabsorptions-Kontrolle. INL= innere Körnerschicht; IPL= innere plexiforme Schicht; Balken: 10  $\mu$ m.

### 3.1.3 PKC-epsilon Immunoreaktivität

Der verwendete isoformspezifische PKC-epsilon Antikörper markiert in der Goldfischnetzhaue Bipolarzellen, die aufgrund der Lage ihrer Zellkörper und ihrer Axonterminalen ebenfalls als Mb-Bipolarzellen angesprochen werden können (Abb. 3.3). Immunhistochemische Hinweise, dass weitere Zellpopulationen durch diesen Isoformantikörper angefärbt werden, liegen nicht vor.

Die Präabsorption des Primärantikörpers mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid führen zu einem Verschwinden der PKC-epsilon-Immunoreaktivität in den Gefrierschnitten der Kontrollversuche.

Der Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf PKC-epsilon- Immunoreaktivität in Gefrierschnitten von Goldfischnetzhäuten wird weiter unten besprochen.



**Abb. 3.3.** PKC-epsilon Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut. (a) helladaptierte Netzhaut; (b) dunkeladaptierte Netzhaut; (c) Präabsorptions-Kontrolle. INL= innere Körnerschicht; IPL= innere plexiforme Schicht; Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

#### 3.1.4 PKC-zeta Immunoreaktivität

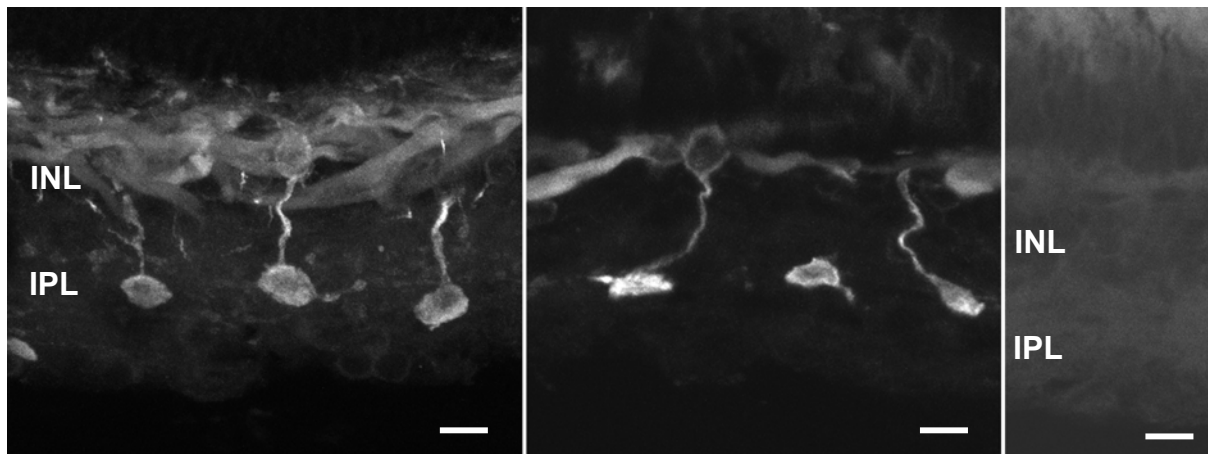
Weiterhin wurde ein Peptidantikörper gegen die PKC-zeta-Isoform für immunhistochemische Anfärbungen an Gefrierschnitten hell- und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute verwendet (Abb. 3.4). Intensive PKC-zeta-Immunoreaktivität wurde in Bipolarzellen gefunden, die aufgrund der Lage der Zellkörper und der Lage und Größe der Axonterminalen ebenfalls als Mb-



Bipolarzellen angesehen werden können. Darüber hinaus ist eine schwächere PKC-zeta- Immunoreaktivität in elongierten und schlanken Strukturen in der INL auszumachen (Abb. 3.4a+b). Diese langgestreckten PKC-zeta- immunoreaktiven Strukturen reichen von der OPL bis zur Mitte der INL. Morphologisch ähneln diese schwach PKC-zeta immunoreaktiven Strukturen sehr den Axonterminalen von Horizontalzellen (HCs), wie sie in Golgi-Studien beschrieben bzw. nach intrazellulären Farbstoffinjektionen erhalten wurden (Stell und Lightfoot 1975; Weiler 1978). PKC-zeta- immunoreaktive Zellkörper von HCs sind ebenfalls in der Abb. 3.4b auszumachen. In der Abbildung kann man eine Reihe schwach PKC-zeta- immunoreaktiver putativer HCs ausmachen. Da die drei Zapfen-HC-Typen „dachziegelartig“ übereinander liegen und man hier nur eine Reihe schwach markierter Zellen erkennen kann, dürfte in den vorliegenden Präparaten wohl auch nur ein Typ der Zapfen-HC durch den Anti-PKC-zeta Antikörper markiert sein. Da die Markierung verhältnismäßig schwach ausfiel, wurde von einer Bestimmung des HC-Typs abgesehen.

Neben den Mb-Bipolarzellen und einer Population putativer PKC-zeta-immunoreaktiver Zapfen-HCs wurden keine Hinweise auf weitere Zelltypen gefunden, die sich mit dem PKC-zeta Antikörper anfärben ließen.

Die Präabsorption des Primärantikörpers mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid führte zu einem Verschwinden von PKC-zeta-Immunoreaktivität in den Gefrierschnitten (siehe Abb. 3.4.c). Wurde nur der Sekundärantikörper verwendet, war ebenfalls keine Markierung in den Gefrierschnitten auszumachen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.4.** PKC-zeta Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut. (a) helladaptierte Netzhaut; (b) dunkeladaptierte Netzhaut; (c) Präabsorptionskontrolle. INL= innere Körnerschicht; IPL= innere plexiforme Schicht; Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.5 PKC-eta Immunoreaktivität

Immunhistochemische Versuche mit einem Antikörper gegen die eta Isoform waren erfolglos. Der polyklonale Antikörper gegen die PKC-eta Isoform zeigte keine spezifischen Markierungen in den Gefrierschnitten hell- und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurde dieser Antikörper in weiteren Untersuchungen nicht weiter verwendet.

### **3.2 Kontrollen zur Überprüfung der Spezifität der Isoform-spezifischen Antikörper an Gefrierschnitten**

Um sicher zu gehen, ob man einer immunhistochemischen Anfärbung trauen kann oder nicht, müssen Kontrollen durchgeführt werden; mit diesen soll die Spezifität immunhistochemischer Markierungen überprüft werden (Björklund und Hökfelt 1983). Es gibt verschiedene „Ebenen“ immunhistochemischer Kontrollen (siehe hierzu auch Larsson 1988). Eine erste „Kontrolle“ besteht darin, den primären Antikörper wegzulassen und die Gefrierschnitte nur mit den Sekundärantikörpern zu inkubieren. Danach zu beobachtende Anfärbungen sollten dann auf die Zweitantikörper zurückzuführen sein.

Bei den vorliegenden Versuchen wurden für die immunhistochemischen Anfärbungen mit den PKC-Isoformantikörpern (alpha, beta1, epsilon, zeta) als Kontrolle auch die jeweiligen Primärantikörper weggelassen und nur Inkubationen mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Antikaninchen-IgG) (1:400) vorgenommen. In keinem Fall wurde ein Fluoreszenzsignal in der inneren Netzhaut registriert (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Kontrolle ist die Präabsorption und damit die Absättigung des Primärantikörpers mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid. Bei den vorliegenden Versuchen wurden die Primärantikörper (in einer Konzentration von 0.5 µg/ml) mit den jeweiligen Peptiden (in einer Konzentration von 2 µg/ml) versetzt und nach 2 h Koinkubation auf die Gefrierschnitte aufgetragen. Die Ergebnisse der Präabsorptionsversuche sind in den Abbildungen 3.1c (alpha-Isoform), 3.2c (beta1-Isoform), 3.3c (PKC-epsilon) und 3.4c (PKC-zeta) aufgeführt. Die 4 hier untersuchten PKC-Isoformantikörper zeigten nach der Präabsorption mit den entsprechenden Peptiden keine Markierung in den Gefrierschnitten. Hieraus kann aber nur geschlussfolgert werden, dass die jeweiligen Antigen-Bindungsstellen der verwendeten IgG's sich durch exogen hinzugefügtes Antigen absättigen ließen. Diese Kontrollen lassen nur den Schluss zu, dass die entsprechenden Peptidsequenzen im Gewebe vorkommen. Andererseits kann man daraus nicht folgern, dass die entsprechenden PKC-Proteinketten im Gewebe vorliegen.

In einer weiteren Versuchsserie wurden die jeweiligen Primärantikörper (Konzentration: 0.5 µg/ml) mit den jeweils „falschen“ Peptiden (Konzentration: 2µg/ml) durchgeführt (Beispiel: PKC-alpha-IgG wurden jeweils mit den Peptiden von beta1, eta und zeta inkubiert). Nachfolgende Immunfluoreszenzmarkierungen ergaben, dass die Präabsorption mit den „falschen“ Peptiden zu keiner Beeinträchtigung der Anfärbungen führte (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung unterstreicht die Spezifität der verwendeten Antikörper.

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die verwendeten Primärantikörper jeweils C-terminale Abschnitte (einen 15-20 Aminosäuren langen Abschnitt) der PKC-Isoformen erkennen. Die verwendeten Primärantikörper sind umfangreich getestet und kreuzreagieren nicht miteinander (siehe die entsprechenden Charakterisierungen der Antikörper im Santa Cruz Katalog und den dort aufgeführten Datenblättern; wir führen an dieser Stelle auch den persönlichen Hinweis von Dr. König an (Technischer Service, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Bergheimer Str. 89-2, 69115 Heidelberg), der noch einmal versicherte, dass die Peptidantikörper nicht miteinander kreuzreagieren).

Weitere Präabsorptionsversuche wurden bei den biochemischen Versuchen vorgenommen; sie werden weiter unten besprochen.

### **3.3 Western Blot Untersuchung von PKC-Isoform-Immunoreaktivität in Homogenaten der Goldfischnetzhaute**

Western Blot Untersuchungen wurden herangezogen, um mit Hilfe von proteinbiochemischen Methoden Aussagen über die Gegenwart von PKC-Isoformimmunoreaktivitäten in Goldfischnetzhäuten zu erhalten.

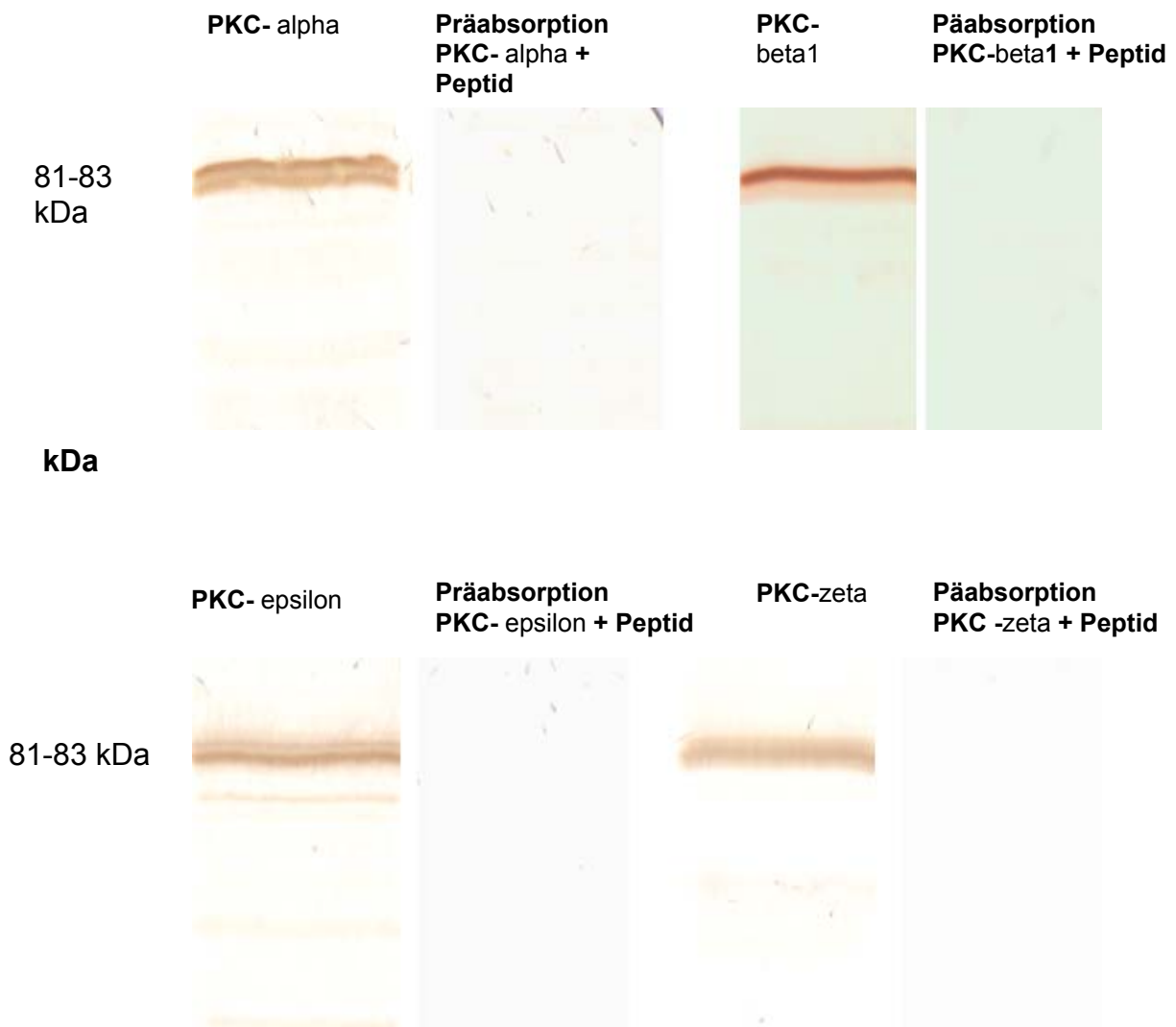
Die Abb. 3.5. zeigt eine Zusammenstellung aus unterschiedlichen Versuchsdurchgängen. Mit SDS-PAGE wurden standardmäßig jeweils Proteinmengen von 5 µg pro Spur (bzw. Geltasche) beladen und elektrophoretisch aufgetrennt und danach auf Membranen übertragen. Einzelne Membranstreifen wurden sodann mit Antikörpern gegen die nachfolgend aufgeführten Isoformen inkubiert: Anti-PKC-alpha-IgG, Anti-PKC-beta1-IgG, Anti-PKC-epsilon-IgG und Anti-PKC-zeta-IgG, jeweils in einer Konzentration von 1 µg / ml. Alle hier aufgeführten Isoformantikörper erkennen eine Bande bzw. mehrere nahe beieinander liegende Banden im Bereich von 81-83 kDa (Abb. 3.5).

Man kann beim Western Blot Signal des PKC-alpha Antikörpers zwei nahe zusammen liegende Banden erkennen. Möglicherweise handelt es sich hier um PKC-alpha Banden, die sich in ihrem Glykolysierungsgrad unterscheiden.

Zwei dicht zusammen liegende Banden kann man ebenfalls in der Spur erkennen, die mit dem PKC-epsilon Antikörper behandelt wurde. Hier sind nicht zwei gleich intensiv gefärbte Banden zu erkennen (wie bei der Spur nach der Inkubation mit dem PKC-alpha Antikörper); eine Proteinbande ist intensiver angefärbt, während eine zweite Bande ein schwächeres Signal aufweist; beide Banden in dieser Spur liegen ebenfalls im Bereich von 81-83 kDa.

Die Inkubation mit dem Antikörper gegen die PKC-beta1 Isoform ergab eine breite Bande im Bereich von 81-83 kDa; der Antikörper gegen die PKC-zeta Isoform färbte ebenfalls eine Proteinbande im Bereich von 81-83 kDa an.

In allen vier Fällen führte die Präabsorption der Primärantikörper mit den jeweiligen Peptiden nicht zu einer Anfärbung von Proteinbanden .



**Abb. 3.5.** Western Blot Untersuchung von Goldfischnetzhaughtomogenaten mit PKC-Isoform spezifischen Antikörpern. Nitrozellulosemembranstreifen wurden mit Isoform-spezifischen Antikörpern (alpha-, beta1-, epsilon- und zeta-Isoform) inkubiert. In Kontrollexperimenten wurde der jeweilige Primärantikörper mit dem entsprechenden Peptid abgesättigt und sodann auf die Nitrozellulosemembran gegeben.

### **3.4 Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die PKC- Isoform Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaute**

In den letzten Jahren wurden mehrfach Berichte veröffentlicht, welche beschrieben, dass Hell und Dunkel einen Einfluss auf immunhistochemische Anfärbungen mit PKC-Antikörpern in Wirbeltiernetzhäuten haben (Osborne et al. 1991; Yazulla und Studholme 1992; Behrens und Wagner 1996; Job und Lagnado 1998). In diesen immunhistochemischen Studien wurden in der Regel nur Antikörper gegen eine klassische PKC-Isoform verwendet bzw. es wurden Antikörper verwendet, die nicht in der Lage waren, zwischen den alpha- und den beta-Isoformen zu unterscheiden (Negishi et al. 1988; Chun et al. 1993). Somit fehlen bisher genauere Angaben darüber, welche PKC- Isoformimmunoreaktivität durch Hell und Dunkel in ihrer Verteilung beeinflusst werden.

Um den Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die Immunoreaktivität der Isoformen zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte von hell- und dunkeladaptierten Netzhäuten gemeinsam auf Objektträger mit den isoformspezifischen Antikörpern inkubiert.

#### **3.4.1 PKC-alpha Immunoreaktivität**

Die Abb. 3.1. zeigt typische Immunfluoreszenzmarkierungen hell- und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute, die mit dem PKC-alpha Antikörper angefärbt wurden. Besonders auffällig ist der Effekt der Hell- und Dunkeladaptation auf die PKC-alpha Markierung der Mb-Bipolarzellen. Während helladaptierte Mb-Bipolarzellen eine intensive PKC-alpha- Immunoreaktivität sowohl im Zytoplasma der Zellkörper und der Axonterminalen aufweisen, ist das Immunfluoreszenzsignal in dunkeladaptierten Mb-Bipolarzellen im Bereich des Zytoplasmas der Zellkörper im Vergleich zu den Axonterminalen deutlich schwächer (Abb. 3.1.). Die Verteilung von PKC-alpha Immunoreaktivität in den Mb-Terminalen ist im Hellen und im Dunkeln nicht gleich. PKC-alpha Immunoreaktivität ist in den Mb-Terminalen helladaptierter Netzhäute eher

homogen in der Terminale verteilt; in den Mb-Terminalen aus dunkeladaptierten Netzhäuten ist eine deutlich intensivere „saumartige“ bzw. membranassoziierte PKC-alpha Immunmarkierung auszumachen; die PKC-alpha Immunoreaktivität im Innern der Terminale ist abgeschwächt.

#### **3.4.2 PKC-beta1 Immunoreaktivität**

Die Immunfluoreszenzmarkierungen mit dem beta1-Antikörper ergaben in Mb-Bipolarzellen in hell- und dunkeladaptierten Netzhäuten vergleichbare Befunde wie sie im vorangegangenen Abschnitt für die PKC-alpha- Isoform beschrieben wurden. Auch für die PKC-beta1- Isoform ist das Immunfluoreszenzsignal im Zytoplasma von Zellkörpern dunkeladaptierter Mb-Bipolarzellen deutlich schwächer als in den Zellkörpern helladaptierter Mb-Bipolarzellen (Abb. 3.2.). Das Immunfluoreszenzsignal für beta1- Immunoreaktivität ist in dunkeladaptierten Mb-Terminalen auch deutlich „saumartig“ bzw. membranassoziiert, während es in helladaptierten Mb-Terminalen nicht „saumartig“, sondern eher diffus und homogen verteilt vorliegt (Abb. 3.2.).

Während ein deutlicher Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf PKC beta1- Immunoreaktivität in Mb-Bipolarterminalen dargestellt werden kann, ist der Effekt von Hell und Dunkel auf die beta1-Immunoreaktivität im Zellkörper und im Dendritenbaum dieser Zellen schwächer ausgeprägt.

#### **3.4.3 PKC-epsilon Immunoreaktivität**

Hell und Dunkel beeinflussen die PKC-epsilon Immunoreaktivität in Mb-Bipolarzellen der Goldfischnetzhaut. Während die Intensität des Immunfluoreszenzsignals in den Axonterminalen der Mb-Bipolarzellen im Hellen und im Dunkeln nur wenig voneinander unterschieden ist, kann im dendritischen Abschnitt der Mb-Bipolarzellen dunkeladaptierter Fische eine intensivere Immunfluoreszenzmarkierung ausgemacht werden (Abb. 3.3.). Auch im



Zytoplasma von Zellkörpern dunkeladaptierter Mb-Bipolarzellen ist die Fluoreszenzmarkierung etwas intensiver als in den Zellkörpern dieser Zellen in helladaptierten Netzhäuten. Das Immunfluoreszenzsignal für PKC-epsilon ist in den Terminalen aus hell- und dunkeladaptierten Netzhäuten homogen verteilt.

#### **3.4.4 PKC-zeta Immunoreaktivität**

Die Untersuchung immunfluoreszenzmarkierter Gefrierschnitte ergab, dass die Immunoreaktivität für diese „atypische“ PKC- Isoform ebenfalls von Hell- und Dunkeladaptation beeinflusst zu sein scheint. Das Immunfluoreszenzsignal in den schlanken und langgestreckten Horizontalzellaxonterminalen in hell- und dunkeladaptierten Tieren weist keine grundsätzlichen Unterschiede in der Intensität der Markierung auf. Die Intensität der Immunmarkierung in den Axonterminalen der Mb-Bipolarzellen wird dagegen durch Hell- und Dunkeladaptation beeinflusst. Die Fluoreszenzmarkierung ist einerseits in dunkeladaptierten Terminalen intensiver als in helladaptierten Terminalen (Abb. 3.4.). Andererseits gibt es Hinweise, die darauf hindeuten, dass das Fluoreszenzsignal in dunkeladaptierten Terminalen im Bereich der Plasmamembran intensiver ist, während die Immunoreaktivität im Innern der Terminale schwächer ausgeprägt ist.

	Isoform	IR im Hellen	IR im Dunklen	markierter Zelltyp
klassische PKC	alpha	intensive IR in Zytoplasma und BCT	intensive IR in der BCT, saumartig	Mb-BC Zapfen-BC
klassische PKC	beta 1	homogene Verteilung der IR im Zytoplasma und BCTs	intensive saumartige IR in der BCT	Mb-BC Zapfen-BC
neue PKC	Epsilon	homogene Verteilung der IR im Zytoplasma und BCTs	intensive IR in den BCTs, homogene Verteilung	vor allem Axonterminalen der Mb-BCs
atypische PKC	Zeta	Homogene IR in Zytoplasma und Axonterminalen	Intensive, saumartige IR der Mb-BCTs	-Mb-BCs -eine Population von Zapfen-HCs
Atypische PKC	Eta			Keine Markierungen

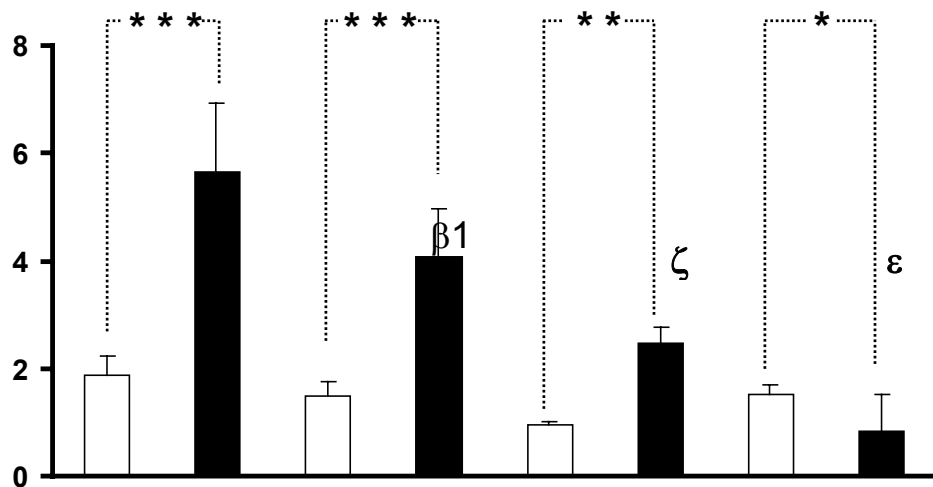
**Tab. 3.6** Tabellarische Übersicht der verwendeten Isoformantikörper; der markierten Strukturen in der Goldfischnetzhaut und des Einflusses von Hell und Dunkel auf PKC-Immunoreaktivität.

### **3.5 Semi quantitative Bestimmung von PKC- Isoformimmunoreaktivität in Mb-Bipolarzellen in Gefrierschnitten hell- und dunkeladaptierter Netzhäute**

Um den Einfluss von Hell und Dunkel auf Verteilung und Intensität von PKC-Isoformimmunoreaktivität in den Mb-Bipolarzellen eingehender zu untersuchen, wurde mit Hilfe von Bildverarbeitung und computergestützter Bildauswertung die Intensität (bzw. die Grauwerte) der Fluoreszenzmarkierung von Zellkörper und Terminale erfasst und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Diese Art der Darstellung der subzellulären Verteilung eines Fluoreszenzsignals wurde aus der Literatur übernommen und ist eine geeignete Methode, um subzelluläre Veränderungen von PKC- Immunoreaktivität semiquantitativ darzustellen (Osborne et al. 1991; Valquero et al. 1996, 1997; Job und Lagnado 1998). Die angeführten Autoren sind bei ihren Untersuchungen von der Annahme ausgegangen, mit dieser Methode einen intrazellulären Transport von PKC zu erfassen (Transport von Immunoreaktivität aus dem Zytosol des Zellkörpers in die Terminale und umgekehrt).

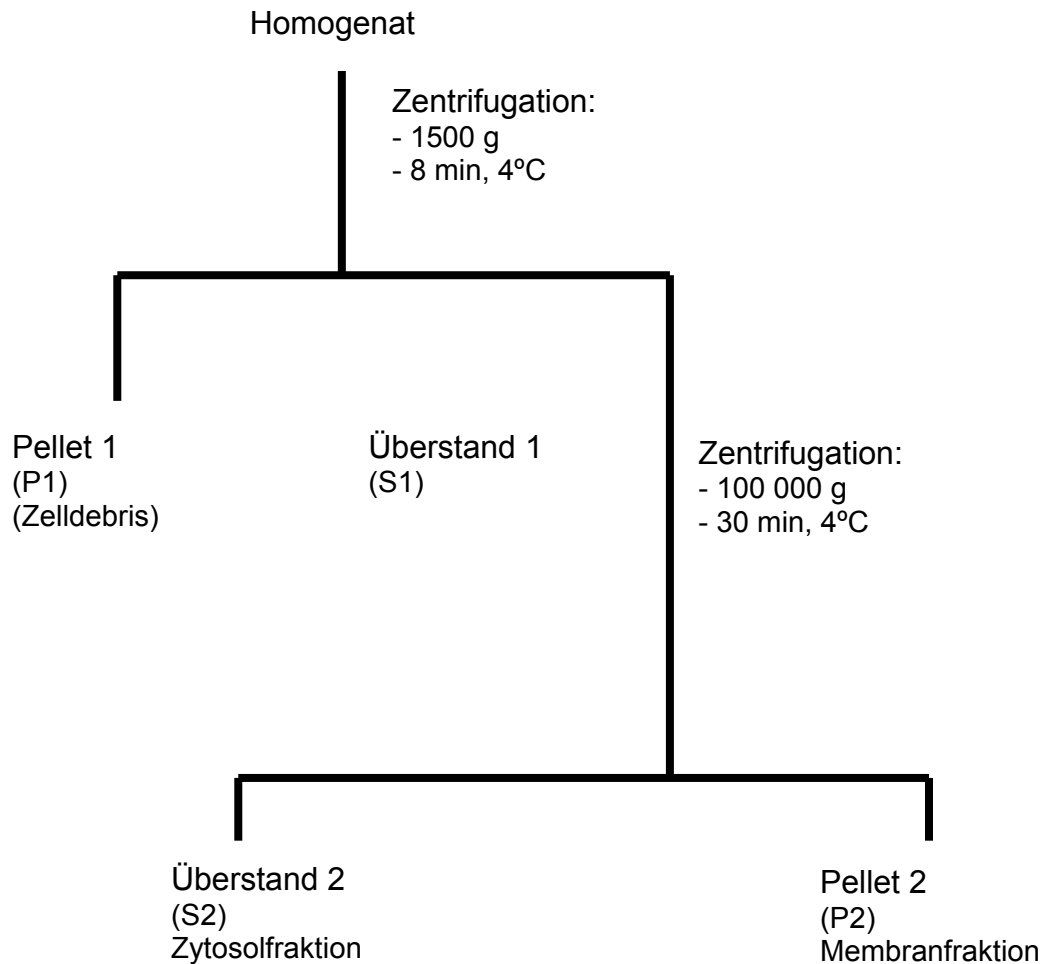
In der Abbildung 3.7. ist ein Balkendiagramm aufgeführt, welches die Relation von Grauwerten bzw. Pixelintensitäten für Isoform-Immunoreaktivitäten (Terminale / Zellkörper) in hell- und dunkeladaptierten Mb-Bipolarzellen aufführt. Der Graphik kann man entnehmen, dass für die alpha-, beta1- und zeta-Isoformen signifikante Unterschiede in den Grauwertrelationen (Terminale / Zellkörper) vorliegen. Die Unterschiede waren für die beiden Vertreter der klassischen Isoformen hochsignifikant, während die Unterschiede für die atypische Isoform (Zeta) ebenfalls noch signifikant war. Kein signifikanter Unterschied in der Verteilung von Immunoreaktivität in Mb-Bipolarzellen wurde für den Vertreter der neuen Isoform (epsilon) gefunden.

**Verhältnis der  
PKC-IR  
Terminale / Soma**



**Abb. 3.7.** Balkenhistogramm zur Darstellung von Grauwertrelationen (PKC-Immunoreaktivität im Zytoplasma der Terminalen und Immunoreaktivität im Zytoplasma der Zellkörper) von Mb- Bipolarzellen für die alpha-, beta1-, zeta- und epsilon-Isoform von PKC in hell- und dunkeladaptierten Netzhäuten. Pro Isoform wurden 4 verschiedenen Netzhäute mit jeweils 25 Mb- Bipolarzellen ausgewertet (siehe Material und Methoden) (nicht gefüllte Balken: helladaptierte Netzhäute; gefüllte Balken: dunkeladaptierte Netzhäute). Die Grauwertrelationen zeigen, dass Dunkeladaptation einen deutlichen Effekt auf die Immunimmunoreaktivität von drei untersuchten Isoformen hat (alpha-, beta1- und zeta-Isoformen). Hell- und Dunkel hatten keinen Einfluss auf die Grauwertrelation der epsilon-Isoform. Die statistische Signifikanz der Grauwertrelationen wurde durch einen t-Test ermittelt; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.05$ ; \* kein signifikanter Unterschied.

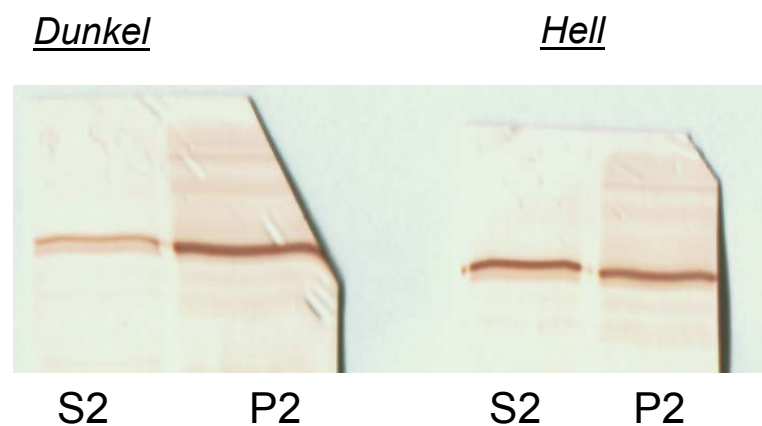
### 3.6 Einfluss von Hell und Dunkel auf die Isoformimmunreaktivität in Western Blot-Spuren von Zytosol- und Membranfraktionen hell- und dunkeladaptierter Netzhäute



**Abb. 3.8.** Schematische Darstellung der subzellulären Fraktionierung (bzw. Ultrazentrifugation) zur Gewinnung von zytosolischer Fraktion (S2) und Membranfraktion (P2) aus Netzhauthomogenaten (modifiziert nach Osborne et al. 1991).

In der Abb. 3.8 ist ein Flussdiagramm zur Gewinnung von zytosolischer Fraktion (S2) und von Membranfraktion (P2) aus Netzhauthomogenaten durch differentielle Ultrazentrifugation nach einem Protokoll aus der Literatur dargestellt (Osborne et al. 1991). Mit Hilfe der differentiellen Ultrazentrifugation und proteinbiochemischen Methoden (SDS-PAGE und Western Blot) soll für eine klassische PKC-Isoform (PKC-alpha) der Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die subzelluläre Verteilung von PKC-Immunoreaktivität in Membran- und Zytosolfractionen von Netzhauthomogenaten untersucht werden.

### Western Blot PKC(alpha): in-vivo



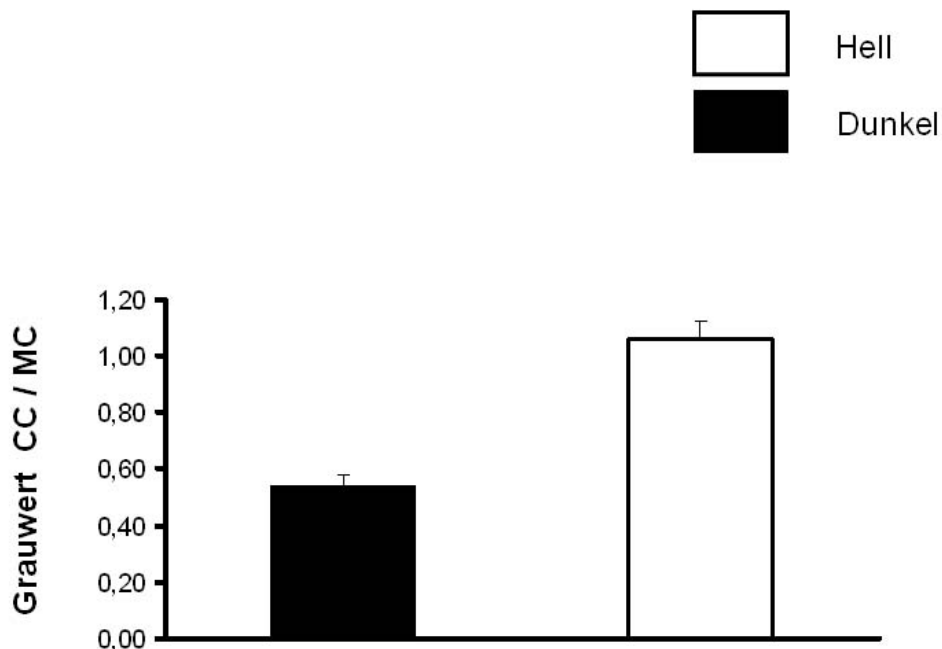
**Abb. 3.9.** Western Blot Spuren von hell- und dunkeladaptierten Goldfischnetzhauthomogenaten angefärbt mit einem Antikörper gegen die PKC-alpha-Isoform und nachfolgender DAB-Reaktion. Aufgetragen wurde jeweils 5 µg Protein pro Spur; S2= Zytosolfraktion, P2= Membranfraktion.

Mit Hilfe von Western Blot-Techniken wurde PKC-alpha- Immunoreaktivität sowohl in Zytosol- wie auch in Membranfraktionen von Homogenaten hell- und dunkeladaptierter Netzhäute nachgewiesen (Abb. 3.9.). In den Spuren ist jeweils eine Proteinbande intensiv markiert. Die Banden aus den Zytosolfractionen weisen schwach immunoreaktive „Begleitbanden“ auf, die sich knapp unterhalb

der „Hauptbande“ befinden; die Intensität dieser „Nebenbande“ ist deutlich schwächer als die der Hauptbande.

Die PKC-alpha immunoreaktive Bande in der Zytosol- sowie in der Membranfraktion der helladaptierten Netzhäute weisen annähernd gleiche Intensitäten auf. Anders dagegen stellen sich die Verhältnisse für die Proben der dunkeladaptierten Netzhäute dar. Die PKC-alpha-Bande der zytosolischen Fraktion ist deutlich schwächer immunoreaktiv angefärbt als die entsprechende Bande in der Membranfraktion (Abb. 3.9.). Dieser Unterschied war in allen untersuchten Proben zu finden (in 6 von 6 untersuchten Durchgängen).

Mit Hilfe des Programms „Scion Image“ (Version Beta 4.0.2.) wurden die Grauwerte der PKC-alpha Banden in den Fraktionen (S2 und P2) hell- und dunkeladaptierter Netzhäute bestimmt und zueinander in Relation gesetzt (Abb. 3.10.).



**Abb. 3.10.** Balkendiagramm zur Darstellung der Grauwertrelation (CC / MC) von PKC-alpha Immunoreaktivität von Western Blot Spuren hell- und dunkeladaptierter Netzhäute. CC = zytosolische Fraktion (S2); MC = Membranfraktion (P2). (n=4 Durchgänge); Mittelwert und Standardabweichung.

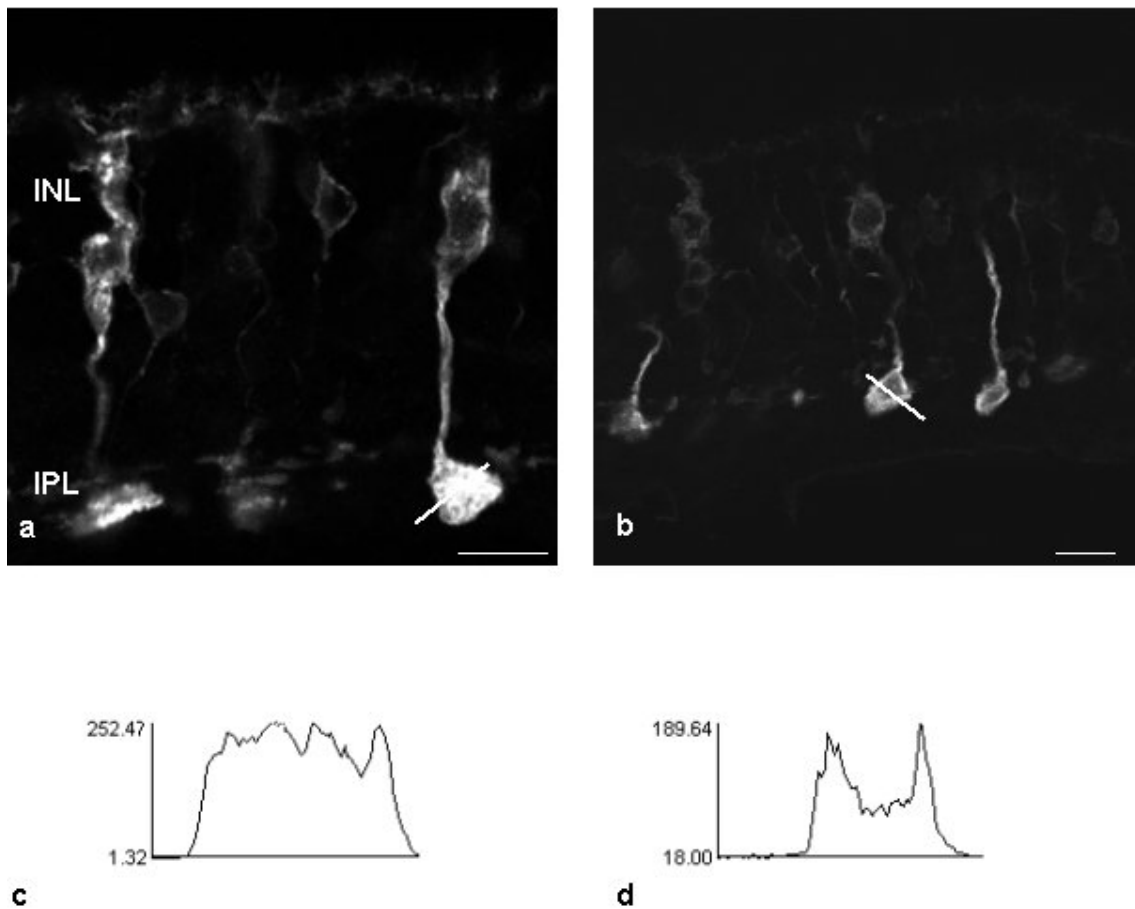
Die Berechnungen der Grauwertrelationen (CC / MC) ergaben für die Proben helladaptierter Netzhäute einen Wert von  $1,06 \pm 0,06$  und für die Proben dunkeladaptierter Netzhäute einen Wert von  $0,54 \pm 0,04$  (mit n= 4 Durchgänge; pro Durchgang wurden 3 Netzhäute für die biochemische Untersuchung verwendet). Der Unterschied der Zahlenwerte ist hochsignifikant (bei einem Signifikanzkriterium von  $p < 0,05$ , Mann-Whitney U-Test). Der numerisch kleinere Zahlenwert der Grauwertrelation CC / MC der dunkeladaptierten Netzhaut unterstreicht, dass die PKC-alpha- Immunoreaktivität im Zytosol der Proben deutlich verringert ist.



### **3.7 Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die subzelluläre Verteilung von PKC-beta1 Immunoreaktivität in den Axonterminalen der Mb-Bipolarzellen**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Lokalisation von PKC-alpha- und PKC-beta1- Immunoreaktivität in Mb- Bipolarzellen vorgestellt. Da beide Antikörper unterschiedliche Sequenzen der C-terminalen Region der jeweiligen Isoform erkennen und sie nicht miteinander kreuzreagieren, wird aus den vorliegenden Anfärbungen der Schluss nahe gelegt, dass beide Proteine in den Mb- Bipolarzellen vorzukommen scheinen. Für die alpha- Isoform wurde im vorangegangenen Abschnitt gezeigt, dass die Verteilung der PKC- Immunoreaktivität durch Hell und Dunkel beeinflusst wird. Im Folgenden soll kurz der Einfluss von Hell und Dunkel auf die Verteilung von PKC-beta1- Immunoreaktivität in fluoreszenzmarkierten Gefrierschnitten hell- und dunkeladaptierter Mb Bipolarzellen eingegangen werden.

Im Abschnitt 3.4.2. wurde erwähnt, dass der verwendete Isoformantikörper in Gefrierschnitten u. a. die Mb- Bipolarzellen anfärbt. In der Abb. 3.7. wurde der Einfluss von Hell und Dunkel in der Verteilung der PKC-beta1-Immunoreaktivität im Zytosol des Zellkörpers und der Terminale vorgestellt (in Anlehnung an publizierte Darstellungsweisen nach Valquero et al. 1996, 1997). Im Laufe der Auseinandersetzung stellte sich allerdings heraus, dass, bezogen auf die subzelluläre Verteilung von PKC-Immunoreaktivität, die biologisch relevante Information eher in der Verteilung zwischen dem zytosolischen und dem membranassoziierten Kompartiment der Terminale zu finden sein dürfte (Wood et al. 1997; Majewski und Iannazzo 1998). Aus diesem Grunde werden in der Abbildung 3.11. charakteristische Intensitätsprofile entlang einer Linie (line scans) durch jeweils eine hell und dunkeladaptierte PKC-beta1- immunoreaktive Mb- Bipolarzelle vorgestellt, um anhand dessen exemplarisch den Einfluss von Hell und Dunkel auf die Verteilung von PKC-beta1- Immunoreaktivität in den Mb- Terminalen zu zeigen. Die line scans wurden an optischen Schnitten aus der Mitte von Bildstapeln aufgenommener Mb- Terminalen durchgeführt.



**Abb. 3.11.** Hell und Dunkel beeinflussen die Lokalisation und Verteilung von PKC-IR innerhalb von Mb- Bipolarterminalen. (a+b): Immunfluoreszenzaufnahmen von Gefrierschnitten hell- (a) und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute (b). c+d): Linescanprofile durch Mb- Terminalen; die hellen Balken in (a) und (b) geben den Streckenverlauf der Linescanprofile wieder. INL= innere Körnerschicht; IPL= innere plexiforme Schicht; Balken: 10  $\mu$ m

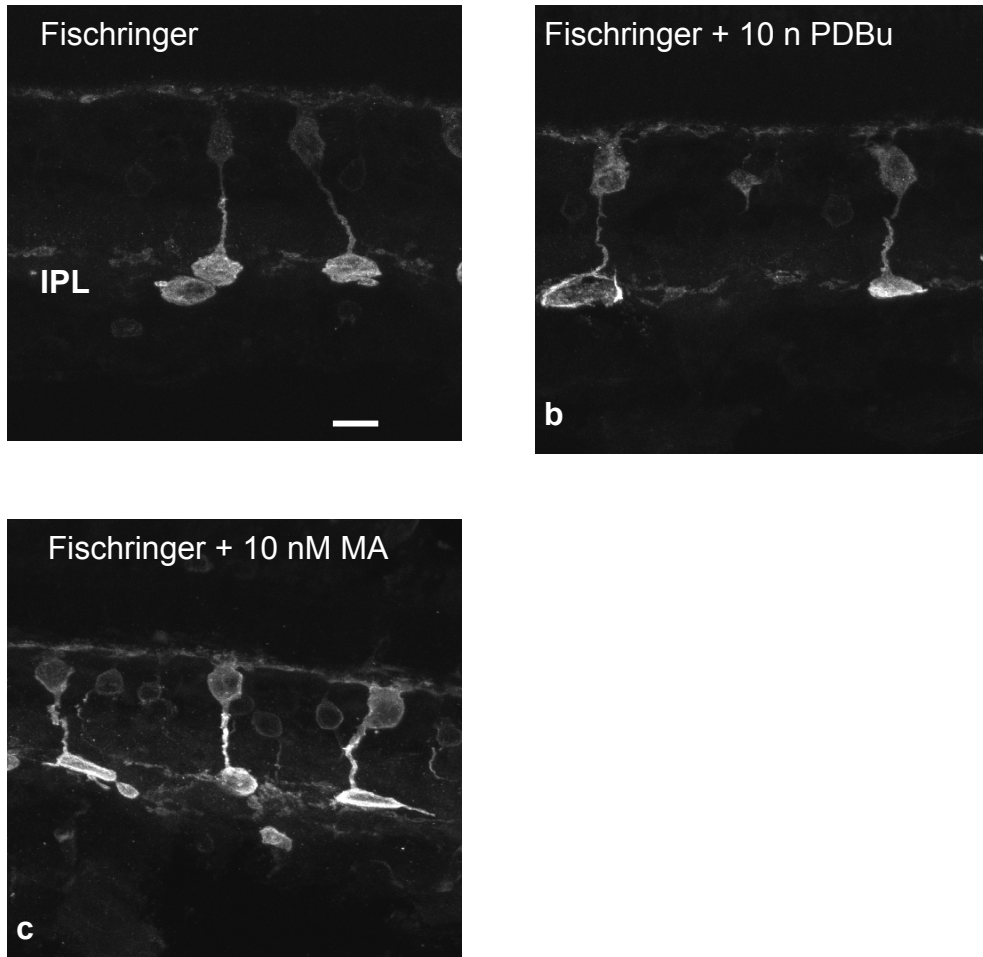
Die Intensitätsprofile (Pixelintensität) entlang von diskreten Linien durch hell- und dunkeladaptierte Mb Terminalen unterstreichen, dass die Verteilung von PKC-Immunoreaktivität im Hellen anders ist als im Dunkeln (Abb. 3.11). In helladaptierten Mb Terminalen zeigen die line scans im Innern der Terminale

(von Schwankungen abgesehen) eher hohe Pixelintensitäten; die PKC-Isoform-immunoreaktivität ist in den Terminalen, von einzelnen Schwankungen abgesehen, eher homogen und diffus verteilt. Die Intensitätsprofile durch dunkeladaptierte Mb- Terminalen weisen im Bereich der Membranen der Terminale höhere Pixelwerte auf, während im Innern die Pixelintensitäten deutlich niedriger ausfallen. Diese Beobachtungen wurde an einer großen Zahl von PKC- markierten Terminalen vorgenommen: von 120 helladaptierten Terminalen (aus 4 verschiedenen Netzhäuten, von 4 unterschiedlichen Tieren) zeigten 112 Terminalen vergleichbare Intensitätsprofile wie in der Abb. 3.11c aufgeführt; von 120 untersuchten dunkeladaptierten Terminalen (ebenfalls aus 4 verschiedenen Netzhäuten, von 4 unterschiedlichen Tieren) zeigten 108 Terminalen saumartig höhere Pixelintensitäten, während die PKC-beta1-Immunoreaktivität im Innern der Terminalen deutlich niedriger ausfielen (siehe Abb. 3.11d) (Daten sonst nicht weiter gezeigt).

### **3.8 Pharmakologische Manipulation der Aktivität von PKC durch Phorbolster und ihre Effekte auf PKC-alpha Immunoreaktivität (in-vitro Versuche)**

Seit Anfang der 80er Jahre ist bekannt, dass die Proteinkinasen der PKC-Familie sich durch Tumorpromotoren wie die Phorbolster aktivieren lassen (Newton 2001, 2003). Die Phorbolster gehören chemisch zu den Derivaten des Diterpen-Alkohols Phorbol (4b,9a,12b,13a,20-Pentahydroxy-1,6-tigliadien- 3- on). Sie kommen u.a. in vielen Wolfsmilch- und Seidelbastgewächsen vor. Phorbolster wurden und werden vielfach eingesetzt, um Kinasen der PKC-Familie zu aktivieren, um dann PKC- abhängige Vorgänge zu studieren.

In der Abb. 3.12. sind PKC-alpha Anfärbungen von Gefrierschnitten aufgeführt, die von isolierten Netzhäuten stammen, die 30 min in-vitro im Dunkeln inkubiert wurden: (a) nur mit Fischringer, (b) mit Fischringer und 10 nM PDBu, und (c) Fischringer und 10 nM MA. Die verwendeten Konzentrationen der beiden verwendeten Phorbolster bewegten sich in einem gängigen Konzentrationsbereich pharmakologischer und physiologischer Versuche; in physiologischen Untersuchungen werden in der Regel Phorbolsterkonzentrationen von 1-50 nM verwendet (Blumberg 1981). Zum anderen wurden in Vorversuchen keine grundsätzlich unterschiedenen Effekte von 10 bzw. 50 nM auf die PKC-Anfärbungen von Bipolarzellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.12** Der Einfluss von Phorbol ester auf die PKC-alpha- Immunoreaktivität in Mb- Bipolarzellen der Goldfischnetzhaute. Die Abbildungen zeigen immunfluoreszenzmarkierte Gefrierschnitte von Netzhäuten, die 30 min in Fischringer (im Dunkeln) ohne Phorbol ester (a), mit 10 nM Phorboldibutyrat (PDBu) (b), und 10 nM Myristat-Acetat (MA) (c) in Fischringer inkubiert wurden. INL= innere Körnerschicht; IPL= innere plexiforme Schicht; Balken: 10 µm.

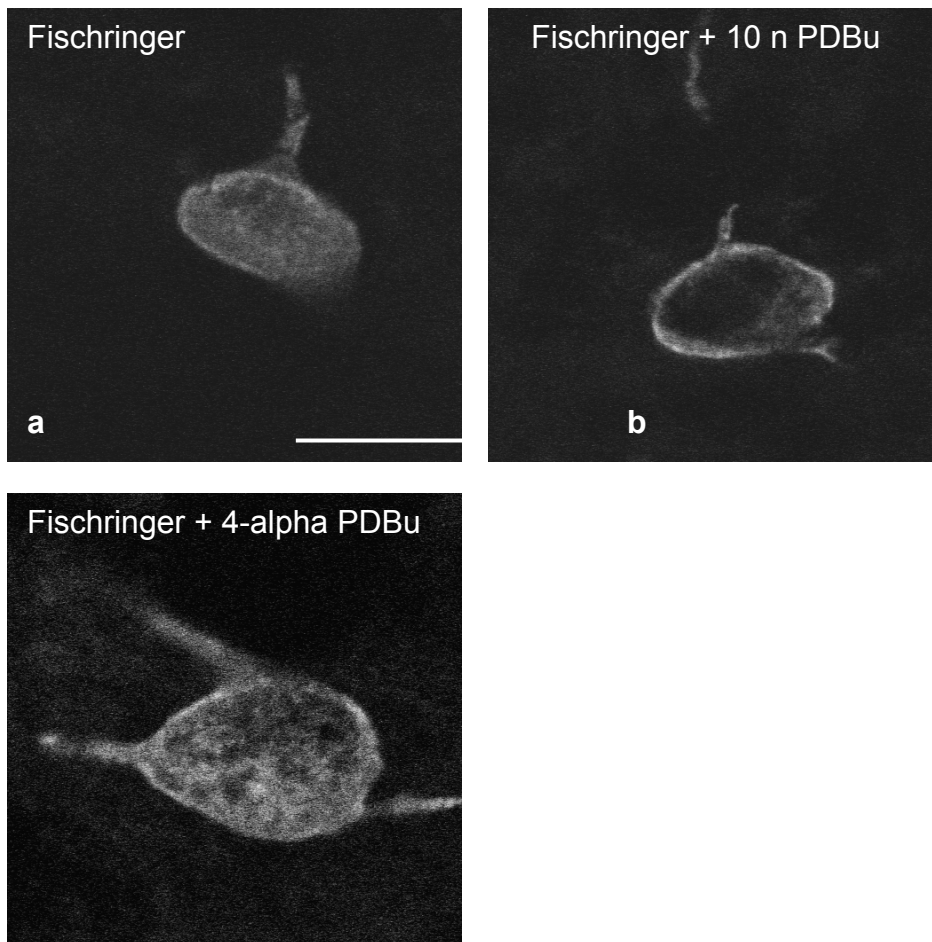
10 nM PDBu bewirkte eine Zunahme der Intensität „randständiger“ (bzw. membranassoziierter) PKC-alpha- Immunoreaktivität in den Mb- Terminalen

(Abb. 3.12b); die Inkubation von isolierten helladaptierten Netzhäuten nur in Fischringer hatte keinen Effekt auf die Verteilung von PKC-Immunoreaktivität; das Immunsignal blieb eher gleichmäßig diffus in den Terminalen verteilt (siehe Abb. 3.12a.). Die Inkubation mit 10 nM MA bewirkte ebenfalls eine intensive saumförmige PKC-alpha-Immunoreaktivität, während die PKC-Markierung im Innern der Terminalen deutlich niedrigere Pixelintensitäten aufwies (Abb. 3.12c). Weiterhin konnte man in den Präparaten erkennen, dass die saumförmige PKC-Immunoreaktivität in den MA-behandelten Präparaten ein intensiveres Fluoreszenzsignal zeigten als die PDBu behandelten Präparate.

Vergleichbare Beobachtungen wurden an einer größeren Zahl von PKC markierten Terminalen erhoben: von jeweils 90 untersuchten Terminalen pro Ansatz (Fischringer; PDBu; MA) zeigten 81 Terminalen der PDBu-Gruppe und 87 Terminalen der MA-Gruppe vergleichbare Intensitätsverteilungen wie sie in der Abb. 3.12b. bzw. 3.12c. dargestellt sind; die 90 untersuchten Terminalen pro Ansatz wurden jeweils in 3 Gefrierschnitten (jeweils ein Gefrierschnitt von einem anderen Tier) beobachtet; es wurden jeweils benachbarte Terminalen inspiziert; es sei an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, dass eine selektive Berücksichtigung von angefärbten Terminalen während der Untersuchung nicht vorgenommen wurde.

In einem weiteren Versuchsdurchgang wurde die Frage untersucht, ob die in-vitro Inkubation isolierter helladaptierter Netzhäute mit einem inaktiven Phorbolster einen Einfluss auf die PKC-alpha-Immunoreaktivität hat. Für diesen Versuchsdurchgang wurden isolierte Netzhäute nur mit Fischringer inkubiert (Abb. 3.13a), bzw. mit PDBu in Fischringer (Abb.3.13b) oder mit dem inaktiven Phorbolster 4-alpha-PDBu (Abb. 3.13c.). Die 30 min. Inkubation helladaptierter Netzhäute im Dunkeln in Fischringer hatte keinen Effekt auf die PKC-alpha- Immunoreaktivität (Abb.3.13a.), die diffus in der Terminale verteilt verblieb. Die Inkubation mit dem „aktiven“ Phorbolster PDBu ergab wie in der vorangegangenen Versuchsserie PKC-alpha markierte Mb- Terminalen mit intensiv markiertem „Saum“, während das Innere der Terminalen eine deutlich schwächere Immunfluoreszenz zeigte (Abb. 3.13c.).

Die Inkubation mit dem inaktiven Phorbol ester hatte eine andere Wirkung auf die PKC-alpha-Immunoreaktivität als der aktive Phorbol ester (Abb. 3.13c.). Nach Inkubation mit 4-alpha PDBu war die PKC-Immunoreaktivität im Innern der Terminale eher so verteilt wie in den Präparaten, die nur in Fischringel inkubiert wurden; einen deutlichen Gradienten der Pixelintensität (Zirkumferenz der Terminale – Inneres der Terminale) wie sie in den Präparaten, welche mit PDBu behandelt wurden, war nicht auszumachen. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass 4-alpha PDBu keinen Effekt auf die PKC-Immunoreaktivität in den Mb- Terminalen hat.



**Abb. 3.13.** Der Einfluss von aktiven und inaktiven Phorbol ester auf die PKC- $\alpha$ - Immunoreaktivität in Mb- Bipolarzellen der Goldfischnetzhaut. Die Abbildungen zeigen immunfluoreszenzmarkierte Gefrierschnitte von Netzhäuten, die 30 min in Fischringer ohne Phorbol ester (a), mit 10 nM PDBu (b), und 10 nM 4- $\alpha$ -PDBu (inaktiver Phorbol ester) (c) in Fischringer inkubiert wurden. Balken 10  $\mu$ m.



#### 4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von Antikörpern Hinweise auf die Gegenwart mehrerer PKC-Isotypen in der Goldfischnetzhaut zu erhalten. Es wurden Antikörper verwendet, die spezifisch Vertreter der a) klassischen bzw. konventionellen Isotypen (PKC-alpha, PKC-beta-I), b) neuer Isotypen (PKC-epsilon) und c) zweier atypischer Isotypen (PKC-eta und PKC-zeta) erkennen. Von den fünf verwendeten Antikörpern ergaben vier spezifische Signale, die sich in Kontrollversuch verdrängen ließen. In Gefrierschnitten wurden hauptsächlich Bipolarzellen [Mb- Bipolarzellen und Zellen mit der Morphologie von ON-Zapfen-Bipolarzellen markiert (alpha-, beta-I-, epsilon- und zeta-Isotyp)] bzw. eine Population von Zapfen-Horizontalzellen wurde angefärbt (zeta-Isoform).

In bisherigen Arbeiten wurden in Bipolarzellen der Wirbeltiernetzhaut zum einen nicht so viele PKC-Isotypen beschrieben (Wood et al. 1997); zum anderen ist die Kolokalisation von vier Isoformen in einer Zellpopulation (den Mb Bipolarzellen) ein neuer Befund. Bisherige immunhistochemische Studien haben höchstens zwei PKC-Isoformen in einer Nervenzellpopulation einer Wirbeltiernetzhaut nachgewiesen (Wood et al. 1997). Vor dem Hintergrund dieser Befunde ergeben sich eine Reihe von Fragen, die in dem Diskussionsteil dieser Arbeit angeschnitten werden sollen:

1. Zuerst soll nach der methodischen Relevanz, nach Kontrollen etc. gefragt werden, um hierdurch Auskunft über die Zuverlässigkeit und die methodischen Grenzen der verwendeten Techniken zu erhalten (Stichwort: Methodenkritik).
2. Sodann werden die hier vorgestellten Befunde zu den einzelnen Isotypen mit Befunden aus der Literatur verglichen.
3. Ein wichtiger Aspekt der Diskussion ist es des weiteren, die Frage nach der Kolokalisation von Kinasen (bzw. hier von mehreren Isotypen) und der biologischen Bedeutung dieser Kolokalisation zu stellen. In diesem Zusammenhang sollen dann kurz einige Punkte zu biochemischen Aspekten von PKC-Isotypen angesprochen werden (Anzahl der Isotypen; Unterschiede

zwischen den Isotypen; Steuerung der Enzymaktivität durch Agonisten; Substratspezifität der Isotypen; Stimulus abhängige Redistribution von Isotypen).

4) Abschließend soll die Frage nach der funktionellen Bedeutung verschiedener PKC-Isotypen in konventionellen chemischen Prä- und Postsynapsen angerissen werden, um dann nach möglichen Beziehungen zu den unkonventionellen chemischen Synapsen (den Ribbonsynapsen) der Bipolarzellterminalen zu fragen.

## **4.1 Kritik der Methoden**

### **4.1.1 Kontrollen und Spezifität der Antikörper**

Ein zentraler Punkt ist die Spezifität der verwendeten polyklonalen Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen PKC-Isoformen (Anti-PKC- $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $-\delta$ ,  $-\eta$ ,  $-\epsilon$ ,  $-\xi$ , Santa Cruz, Heidelberg). Diese Isotypenantikörper wurden gegen C-terminale Abschnitte der jeweiligen Enzyme hergestellt. Die Isotypenantikörper kreuzreagieren untereinander nicht (siehe hierzu die Angaben beim Hersteller; dieser Sachverhalt wurde auch von dem Mitarbeiter der Firma Santa Cruz in Heidelberg noch einmal telefonisch versichert; die für die Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen können auf Nachfrage von der Firma zur Verfügung gestellt werden).

### **4.1.2 Weglassen der Primärantikörper**

Als eine methodische Kontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen; ansonsten wurde wie im Material- und Methodenteil beschrieben verfahren. Gefrierschnitte von Goldfischnetzhäuten wurden nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die verwendeten Sekundärantikörper ergaben jeweils keine Anfärbungen in den Gefrierschnitten. Man kann daher davon ausgehen, dass die erhaltenen Fluoreszenzmarkierungen auf die spezifischen Bindungen der jeweiligen Primärantikörper zurückzuführen sind und nicht durch die Zweitantikörper hervorgerufen wurden.

#### **4.1.3 Präabsorption der Primärantikörper**

Als weitere Kontrolle wurden die Primärantikörper mit dem für die Immunisierung verwendeten Peptid präabsorbiert (abgesättigt). Nach Präabsorption der Primärantikörper war keine Immunmarkierung in den Gefrierschnitten auszumachen. Man kann daher davon ausgehen, dass die jeweiligen Antigen-Bindungsstellen der Primärantikörper durch exogen zugeführtes Antigen blockiert wurden. Da eine Immunmarkierung nach Präabsorption in den Gefrierschnitten nicht mehr auszumachen war, kann man hieraus nur folgern, dass die entsprechenden Peptidsequenzen in dem untersuchten Gewebe vorkommen. Man kann hieraus allerdings nicht mit letzter Sicherheit darauf schließen, dass es sich um die entsprechenden PKC- Proteinketten handelt. Hierzu würde man weitere Kontrollen benötigen (z.B. Kinaseassays nach Immunpräzipitation; Reyland et al. 1999).

#### **4.1.4 Kreuzverdrängung**

Jeweilige Primärantikörper wurden auch mit den Peptiden der anderen Isotypen abgesättigt. Die Absättigung hatte, wie im Ergebnisteil dargelegt, jeweils keinen Einfluss auf die Immunmarkierungen in den Gefrierschnitten. Es kam jeweils nicht zum Verschwinden der Immunfluoreszenzmarkierungen, wenn die „falschen“ Peptide verwendet wurden. Diese Kreuzverdrängungsversuche können als weitere Bestätigungen aufgefasst werden, dass die verwendeten Primärantikörper nicht miteinander kreuzreagieren.

#### **4.1.5 Kontrollen bei den Western Blots**

Die Western Blots der untersuchten Isotypen (mit Ausnahme von PKC- $\epsilon$ ) ergaben jeweils eine markierte Bande im Bereich von 81-83 kDa, der zu erwartenden molekularen Größe von PKC-Proteinketten (Parker und Dekker 1997). Die Tatsache, dass Antikörper im Western Blot nur eine Bande (im erwarteten Größenbereich) markieren, wird in der Biochemie u. a. auch als

Hinweis auf die Spezifität von Antikörpern interpretiert (Harlow und Lane 1999; Newton 2001).

Bei den biochemischen Versuchen wurden ebenfalls Präabsorptionskontrollen mit den entsprechenden Peptiden bzw. mit den Peptiden der anderen Isotypen (Kreuzverdrängung) durchgeführt. Wie im Ergebnisteil angegeben, führte die Präabsorption der Primärantikörper mit den „richtigen“ Peptiden zum Verschwinden der markierten Banden im Western Blot (siehe dort). Die Präabsorption mit den „falschen“ Peptiden (Kreuzverdrängung) hatte jeweils keinen Einfluss auf die Anfärbungen im Blot. Die biochemischen Versuche stützen somit die Befunde aus der Histologie.

#### **4.1.6 Schlussfolgerungen (zur Spezifität der Antikörper)**

Die bisher durchgeführten Kontrollen legen nahe, dass in der Goldfischnetzhaute die Peptidsequenzen der entsprechenden PKC-Isotypen PKC-alpha, PKC-beta-I, PKC-epsilon und PKC-zeta vorkommen, und damit möglicherweise auch die entsprechenden Proteinketten der Isotypen. Da aber die Verwendung von Antikörpern generell keine endgültige Sicherheit bieten (Stichwort: falsch-positive Reaktionen; Larsson 1988; Harlow und Lane 1999), ist daher hier nur von PKC-Isoformimmunoreaktivität zu reden. Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden muss in nachfolgenden Studien daher der genaue Nachweis der Isoformen erbracht werden. Erste PCR-Versuche auf der Basis von Gensequenzen des Zebrafisches ergaben Hinweise für den spezifischen Nachweis von PKC-alpha mRNA in Homogenaten der Goldfischnetzhaute (Palmada, Borde, Behrens; Daten unveröffentlicht). Im Zebrafischgenom sind die Sequenzen für die hier behandelten Isotypen nachgewiesen und beschrieben (Woods et al. 2000; Hubbard et al. 2002). In den Datenbanken des NIH bzw. des Sanger Institutes sind die Sequenzen von PKC-alpha, PKC-beta-I, PKC-epsilon und PKC-zeta aus dem Zebrafischgenom aufgeführt (<http://www.sanger.ac.uk/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/zebrafish/index.html>).

Sie weisen hohe Strukturhomologien zu entsprechenden Sequenzen aus dem Säuger genom auf (siehe hierzu ebenfalls: <http://www.sanger.ac.uk/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide.html>).

#### **4.1.7 Anmerkungen zur Gewebeaufbereitung, zum Mikroskopieren und zur Auswertung von Grauwerten (Pixelintensitäten)**

Bei der Untersuchung von PKC-Isoformimmunoreaktivität wurde besonders auf die Einhaltung reproduzierbarer und vergleichbarer Rahmenbedingungen geachtet (siehe hierzu die Ausführungen im Methodenteil). Nur so ist es möglich, etwaige Unterschiede in der Intensität und Verteilung von Immunoreaktivität im Sinne von Veränderungen im Gewebe und damit in Zellen zu interpretieren (Larsson 1988; Harlow und Lane 1999). Aus diesem Grunde wurde z.B. die Aldehydfixierung immer gleichlang durchgeführt. Auch wurden die nachfolgenden Schritte der histologischen Aufarbeitung immer zügig durchgeführt. In einigen Fällen wurde fixiertes Gewebe in Saccharose-Lösung kurzfristig (für einige Tage bei -80°C) gelagert; Hinweise, die auf eine Beeinträchtigung der Markierungsgüte schließen lassen, lagen nicht vor.

Wenn Aussagen über Intensitäten und Verteilungen von Immunoreaktivität gemacht wurden, so wurde nur auf Unterschiede innerhalb eines optischen Schnittes (digitalen Bildes) hingewiesen. Digitale Aufnahmen aus unterschiedlichen Mikroskopiersitzungen wurden nicht semiquantitativ miteinander verglichen.

Legt man die verschiedenen Vorsichtsmassnahmen zugrunde, so lässt sich schon sagen, dass Unterschiede in der Fluoreszenzintensität bzw. Unterschiede in der Verteilung von Immunoreaktivität innerhalb der Mb- Bipolarzelle auf Unterschiede in der Menge und der Distribution von PKC-Isotyp-Protein in den Zellen hinweisen könnten.

Vergleicht man die PKC-Anfärbungen hell- und dunkeladaptierter Netzhäute mit den Antikörpern für die alpha-, beta-I-, epsilon- und zeta-Isoform, so ist bemerkenswert, dass im Grunde genommen für jede Isoform ein Einfluss von Hell und Dunkel auf die subzelluläre Verteilung bzw. Intensität von Isoform-Immunoreaktivität gefunden wurde. Die Beobachtung von Intensitäts- und Verteilungsunterschieden innerhalb der Mb- Bipolarzelle verweist daher auf zugrundeliegende Dynamiken der einzelnen Isoformen auf Proteinebene.

Die biochemische Literatur zum Thema PKC und PKC-Isoformen weist eine Vielzahl von Beispielen auf, wo Veränderungen in der subzellulären Lokalisation von PKC-Isotypen im Zusammenhang gebracht werden mit Vorgängen der Redistribution (Stichwort: Translokation) oder der Herunterregulation (downregulation) (Pears und Goode 1997; Srinivasan und Blundell 1997). Während Translokationsvorgänge zeitlich in direkter Folge einer rezeptorvermittelten Aktivierung von PKC-Isoformen ablaufen (Pears und Goode 1997), so sind Herunterregulationen von PKC-Proteinen vor einem zeitlich längerfristigeren Horizont zu sehen; sie werden daher nach mehrstündiger Exposition von Aktivatoren (z.B. Phorbol ester) beobachtet (Srinivasan und Blundell 1997).

An dieser Stelle soll nur kurz darauf eingegangen werden, dass zu Beginn dieser Arbeit die Aufmerksamkeit auf die Veränderungen in der Verteilung von PKC-Immunoreaktivität im Zytoplasma des Zellkörpers und im Zytoplasma der Mb-Terminale gelegt wurde. Hierzu wurden die Grauwerte bzw. Pixelintensitäten innerhalb beider Kompartimente (Terminale & Zellkörper) in Relation gesetzt. Diese Art der Darstellung wurde –wie schon weiter oben erwähnt- aus der Literatur übernommen. Diese Art der Darstellung wurde von Osborne et al. (1991) und in den Arbeiten von Vaquero et al. (1996, 1997) verwendet, um Veränderungen in der subzellulären Verteilung von PKC-Immunoreaktivität in Mb- Bipolarzellen der Goldfisch- und in Stäbchenbipolarzellen in der Säugernetzhaut semiquantitativ zu beschreiben. Mit dieser Methode ließen sich

Unterschiede in der Verteilung von PKC-Immunoreaktivität innerhalb der untersuchten Bipolarzellpopulationen darstellen (siehe z.B. die Abb. 3.7 im Ergebnisteil). Schwierig war aber die biologische Interpretation dieser Zahlenwerte. Letztlich legen sie den Schluss nahe, dass Hell und Dunkel einen Einfluss auf die Verteilung von PKC-Protein im Zytoplasma der beiden subzellulären Kompartimente (Terminale und Zellkörper) hat. Vom biologischen Standpunkt aus betrachtet kann man dies so interpretieren, dass hierdurch intrazelluläre Transportvorgänge für das untersuchte Protein erfasst werden (Osborne et al. 1999; Vaquero et al. 1996, 1997). Für verschiedene PKC-Isotypen ist ihr Transport innerhalb von Nervenzellen auch beschrieben (Parker und Dekker 1997; Nakhorst et al. 2002). Für längerfristige Anpassungsvorgänge ist die (Mikrotubuli- abhängige) subzelluläre Distribution und Redistribution innerhalb unterschiedener zytoplasmatischer Räume, wo größere Strecken überbrückt werden müssen (Zellkörper; Terminale), in der Tat realisiert (siehe hierzu auch Lehrbücher der Zellbiologie: Alberts et al. 2002; Lodish et al. 2003; Kandel et al. 2000). Diese Transportvorgänge sind aber sicher vor einem anderen Zeithorizont zu sehen bzw. zu stellen wie die PKC-Distributionen (Redistributionen) im synaptischen Komplex der Bipolarterminale. Es stellt sich z.B. auch das Problem, wie schnell und effektiv „größere Mengen“ von PKC-Protein vom Zellkörper durch das verhältnismäßig dünne Axon („Flaschenhals“) zur Terminale gelangen, wie dies in den Arbeiten von Osborne und Vaquero nahegelegt wird. In der neueren neurobiologischen Literatur zum Thema PKC werden für kurzfristige und aktivitätsabhängige Translokationsvorgänge von PKC-Protein dagegen andere Mechanismen von Transportvorgängen diskutiert, als die, die bei Osborne et al. (1991) und Vaquero et al. (1996; 1997) vorgestellt wurden. In der neueren Literatur werden Translokationsvorgänge schwerpunktmäßig untersucht, bei denen das Protein „nur“ zwischen dem Zytosol und der Plasmamembran stimulusabhängig redistribuiert wird (Parker und Dekker 1997; Siegel 1999).

An dieser Stelle sind auch die Hinweise aus der Arbeit von Gabriel et al. 2001 zu berücksichtigen; Gabriel und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine verringerte PKC-Immunoreaktivität in Stäbchenbipolarzellen der Ratte nicht dahingehend

interpretiert werden kann, dass das Protein (dort: aktiviertes PKC) nicht am gegebenen Ort vorliegt; die Autoren schlussfolgerten aus ihren Versuchen, dass für bestimmte Antikörper ein in der Tat vorliegendes Protein nicht erkannt wurde (Stichwort: Konformationssensitivität der Antikörper).

#### **4.1.8 Anmerkungen zu den Western Blot Untersuchungen**

Bei der Beurteilung der Western Blot-Spuren ist die Frage zu stellen, inwieweit die Unterschiede in der PKC-alpha-Immunoreaktivität in den zytosolischen Fraktionen hell- und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute auf Veränderungen in der subzellulären Lokalisation des Proteins in den Mb- Bipolarzellen zurückzuführen sind (siehe Abb. 3.9).

In diesem Zusammenhang muss man auch berücksichtigen, dass PKC-alpha kein Marker ist, mit dem sich selektiv nur eine Population von Zellen anfärben lässt. Dieses wäre für ein Schlüsselenzym intrazellulärer Signalkaskaden auch gar nicht zu erwarten. In den ersten immunhistochemischen Arbeiten mit einem monoklonalen Antikörper gegen PKC (dem Mab 5 von Amersham) färbten Negishi und Mitarbeiter in der Netzhäuten verschiedener Wirbeltiere neben „Stäbchen-Bipolarzellen“ auch dopaminerge Amakrine bzw. andere Amakrine (Negishi et al. 1988; siehe hierzu auch Kato et al. 1990). Seit längerem ist bekannt, dass man mit PKC-Antikörpern (alpha- und beta-Isoform-IgGs) in der Goldfischnetzhaut neben den Mb- Bipolarzellen (einer Subpopulation der „Stäbchenbipolarzellen“) auch ON-Zapfenbipolarzellen anfärben kann (Suzuki und Kaneko 1990, 1991; Yazulla und Studholme 2001). Die Population der Mb-Bipolarzellen ist diejenige, die sich sehr intensiv mit Antikörper gegen die Alpha-Isoform anfärben lässt. Aus diesem Grunde erscheint es nahe liegend, dass Veränderungen der PKC-alpha Immunoreaktivität in den zytosolischen Spuren hell- und dunkeladaptierter Netzhauthomogenate im Wesentlichen auf Vorgängen in dieser Zellpopulation beruhen dürften. Andererseits ist es sicherlich klar, dass durch den Vorgang der Homogenisation und der nachfolgenden



subzellulären Fraktionierung örtlich begrenzt ablaufende Transportvorgänge in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten „niveliert“ werden.

#### **4.1.9 Phorbol ester Versuche**

Die verwendeten aktiven Phorbol ester bewirken eine konstitutive und nicht reversible Aktivierung von PKC-Isoformen, die zur Gruppe der klassischen und neuen Isoformen gehören (Parker und Dekker 1997; Kiley 1997). Aus diesem Grunde sind Phorbol ester ungeeignet, um Aussagen zu diskreten Isoformen der klassischen und neuen Isotypen zu gewinnen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden Phorbol ester eingesetzt, um Effekte der Aktivierung von PKC-alpha auf die zelluläre Lokalisation zu untersuchen. In den Abb. 3.12b und 3.12c ist aufgeführt, dass die Enzymaktivierung zu einer verstärkten Immunoreaktivität im Bereich der Plasmamembran der Terminale führt. Ein vergleichbarer Effekt wurde von Osborne et al. (1991) für PKC-alpha immunoreaktive Stäbchenbipolarzellen in der Kaninchennetzhaut berichtet. Aus diesen Versuchen kann man schlussfolgern, dass die Aktivierung von PKC (hier die von klassischen und neuen Isoformen) zu einer vermehrt membranassoziierten Lokalisation des aktivierten Enzyms führt. Eine membranassoziierte Lokalisation von PKC-alpha ist besonders in dunkeladaptierten Mb- Terminalen zu finden. Unklar ist bisher, welche biologischen Vorgänge durch die membranassoziierte Lokalisation des Enzyms vermittelt werden (siehe hierzu die Ausführungen weiter unten).

Im Zusammenhang mit Phorbol ester Versuchen sei noch kurz auf Sachverhalte hingewiesen, die die Aussagekraft von Phorbol ester Inkubationen auf komplexe Gewebe einschränken: zum einen muss man neuere Befunde berücksichtigen, welche zeigen konnten, dass neben (konventionellen und neuen) PKC-Isoformen noch andere Phorbol ester bindende Proteine in Nervenzellen vorliegen; hierzu zählt u.a. das Protein munc13 (Rhee et al. 2002). Munc13, das für die Nachlieferung "akut freisetzbarer" Vesikel an Synapsen notwendig ist, hat auch eine Schlüsselfunktion bei der Kurzzeitplastizität (Junge et al. 2004).

Munc13 ist ein Bestandteil der Transmitterfreisetzungsmaschinerie konventioneller chemischer Synapsen; es ist nicht in Ribbon-Synapsen lokalisiert (Schmitz et al. 2001). Vor diesem Hintergrund kann man sagen, dass die Phorbolstereffekte wohl durch eine direkte Wirkung auf PKC in den Bipolarzellen zurückzuführen sein dürften, und weniger durch indirekte Effekte.

## **4.2 PKC Isotypen**

Nachfolgend soll ein kurzer Überblick zu einigen PKC- Isotypen gegeben werden; es wird kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben. Die Hinweise beschränken sich auf immunhistochemische Studien zur Lokalisation von PKC- Isoformen in unterschiedlichen Zelltypen in Wirbeltiernetzhäuten. Im Kapitel 6 ist eine Übersichtstabelle aus der Arbeit von Wood et al. (1997) angeführt. Ein Problem vieler immunhistochemischer Studien aus den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts ist die z.T. wenig klare Charakterisierung der Antigene und der Aminosäuresequenzen, die von den Antikörpern „erkannt“ werden.

### **4.2.1 PKC- alpha**

Antikörper gegen PKC alpha markieren in allen untersuchten Wirbeltierarten ON-Bipolarzellen (Wood et al. 1997; Marc 1999). Vereinzelt wurde berichtet, dass sich auch bestimmte Zapfen, bzw. allgemein Photorezeptoraußensegmente sich mit Antikörper gegen PKC- alpha in verschiedenen Spezies anfärben ließen (siehe die Übersicht bei Wood et al. 1997; hier: Anhang 1). In der vorliegenden Arbeit sind Anfärbungen von Photorezeptoren nicht beobachtet worden.

In der Kaninchennetzhaut wurde die Kolokalisation von PKC-alpha mit PKC-zeta-Immunoreaktivität berichtet (Koistinaho und Sagar 1994).

Über funktionelle Aspekte von PKC- alpha wird in den Studien, die bei Woods et al. (1997) aufgelistet sind, keine Angaben gemacht.

#### **4.2.2 PKC- beta**

Die Isoform PKC- beta ist mit zwei Spleißvarianten beschrieben. Antikörper gegen beta1 und beta2 haben in den bei Wood et al. (1997) aufgelisteten Studien nahezu jeden Zelltyp (in unterschiedlichen Spezies) markiert. Antikörper gegen die beta- Isoform markieren in der Menschen- und in der Affennetzhaut OFF-Bipolarzellen (Haverkamp et al. 2003). In älteren Arbeiten wurden z.T. Antikörper verwendet, die nicht zwischen der beta1 und der alpha- Isoform unterschieden. Die Stäbchenbipolarzellen (einschließlich die Mb- Bipolarzellen in der Goldfischnetzhaut) werden in vielen untersuchten Spezies mit diesen Antikörpern angefärbt. Problematisch bleibt das Thema „Kreuzreaktivität“. Beide konventionellen Isoformen weisen einen hohen Grad an Sequenzhomologien auf (siehe die Darstellungen in den angegebenen Datenbanken); aus diesem Grunde muss bei vielen Studien offen bleiben, ob mit den verwendeten Antikörpern jeweils unterschiedene Isoformen dargestellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper kreuzreagieren nicht miteinander, so dass man hier im ersten Schritt davon ausgehen kann, dass neben der alpha- Isoform auch die beta1- Isoform in Mb- Bipolarzellen vorhanden sein dürften. Endgültige Klärung hierzu bieten aber nur PCR- Untersuchungen.

In der Kaninchennetzhaut wurde eine Kolo-kalisation von PKC-beta mit PKC-epsilon berichtet (Koistinaho und Sagar 1994).

Unklar ist auch, wie im Falle einer Kolo-kalisation von klassischen (konventionellen) Isoformen in einer Zellpopulation diese Isoformen unterschiedlich „aktiviert“ werden, da die Schritte zu ihrer Aktivierung und ihre Liganden identisch sind (Newton 2001, 2003).

#### **4.2.3 PKC- epsilon**

Über die Lokalisation der epsilon- Isoform in der Wirbeltiernetzhaut liegen bisher nur wenige Berichte vor. Antikörper gegen diese Isoform markieren neben Außensegmenten (Rind) und Innensegmenten (Huhn) von Photorezeptoren auch Bipolarterminalen (in einer Vielzahl von Arten) sowie auch Amakrine und

Horizontalzellen (Kaninchen) (Osborne et al. 1994; siehe auch die Übersicht bei Wood et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit markiert der Antikörper gegen die epsilon- Isoform die Mb- Bipolarzellen. Hinweise auf andere epsilon- Isoform- immunoreaktive Zelltypen konnten nicht erbracht werden. Gleichwohl ist die Hintergrundmarkierung mit diesem Antikörper vergleichsweise hoch. Aus diesem Grund muss offen bleiben, ob andere Zelltypen diese Isoform besitzen, oder ob die Menge dieses Proteins unterhalb der Nachweisgrenze lag.

PKC- epsilon ist eine Isoform, über die in den letzten Jahren intensiv geforscht wurde. PKC- epsilon bindet u.a. über Brückenproteine an N-Typ Kalziumkanäle und steuert damit die Funktion von Präsynapsen (Maeno-Hikichi et al. 2003). Im Vordergrund des neurobiologischen Interesses steht die Rolle von PKC- epsilon bei zellulären Anpassungsvorgängen nach ischämischen Schädigungen (Raval et al. 2003).

Funktionelle Aspekte zur Rolle dieser PKC- Isoform in der Wirbeltiernetzhaut sind bisher nicht aufgeklärt worden.

#### **4.2.4 PKC- eta**

Immunhistochemische Anfärbungen mit dem Antikörper gegen die eta- Isoform waren im Rahmen dieser Arbeit erfolglos. In der Literatur sind bisher keine Anfärbungen mit Antikörpern gegen diesen Vertreter der atypischen Isoformen beschrieben worden. Molekularbiologische Arbeiten weisen auf eine Beteiligung dieser Isoform bei der Steuerung der Proliferation von Glioblastomzellen (Aeder et al. 2004) sowie bei der Tumorprogression hin (Brenner et al. 2003).

#### **4.2.5 PKC- zeta**

Die atypische PKC- zeta- Isoform wurde in früheren immunhistochemischen Arbeiten in Innensegmenten von Photorezeptoren verschiedener Wirbeltiere

(einschließlich Goldfisch) lokalisiert (Osborne et al. 1994). Dieser Befund konnte in der hier vorgelegten Arbeit nicht bestätigt werden (an isolierten Netzhäuten ohne Pigmentepithel; Daten nicht gezeigt).

In der hier vorgelegten Arbeit werden zum ersten Mal PKC- zeta- immunoreaktive Bipolarzellen gezeigt. Der verwendete Antikörper markiert neben den Mb- Bipolarzellen auch Axonterminalen einer Population von Zapfen-Horizontalzellen. Von den verwendeten fünf PKC- Isoformantikörpern ist dieser damit der einzige, der neben den Mb- Bipolarzellen eine weitere Zellpopulation immunhistochemisch in der Goldfischnetzhaute anfärbt.

Die atypische zeta- Isoform unterscheidet sich von den konventionellen und von den neuen Isoformen dadurch, dass sie persistent als aktives Enzym vorliegt (Serrano et al. 2005). Zellbiologische Arbeiten konnten zeigen, dass diese Isoform über ein Verbindungsprotein (ZIP3, protein kinase C-zeta interacting proteins Nr.3) an GABA-C-Rezeptoren gekoppelt ist, wodurch ein ternärer postsynaptischer Komplex (bestehend aus PKC- zeta, ZIP3 und GABA-C-Rezeptor) gebildet wird (Crocì et al. 2003). GABA-C-Rezeptoren wurden immunhistochemisch u.a. an Mb- Terminalen lokalisiert (Koulen et al. 1997). Elektrophysiologische Versuche an Stäbchenbipolarzellen der Rattennetzhaute ergaben, dass Phorbol-ester GABA-C vermittelte Chloridströme herunterreguliert (Feigenspan und Bormann 1994). Dieser Befund wurde dahingehend interpretiert, dass GABA-C-Rezeptoren durch aktivierte PKC phosphoryliert und somit von dieser Kinase gesteuert werden (Feigenspan und Bormann 1994; Borman und Feigenspan 1995). Da aber die atypischen PKC- Isoformen nicht durch Phorbol-ester gesteuert werden (Parker und Dekker 1997), weisen die Befunde von Cori et al. (2003) darauf hin, dass die GABA-C-Rezeptoren in den Bipolarterminalen funktionell mit zwei PKC-Isoformen verknüpft sind (1. eine konventionelle (bzw. auch neue) Isoform, die durch Phorbol-ester aktiviert werden kann; und 2. eine atypische Isoform (PKC- zeta), die an der Ausbildung von Proteinkomplexen auf der postsynaptischen Seite beteiligt ist).

Ob ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen GABA-C-Rezeptoren und der PKC- zeta- Isoform auch für die Axonterminalen der Zapfenhorizontalzellen vorliegt, ist nicht bekannt; man dürfte ihn aber zumindest erwarten. Elektrophysiologische Versuche konnten zeigen, dass nur die Axonterminalen von H1 Zapfenhorizontalzellen über GABA-C-Rezeptoren verfügen, während die anderen Horizontalzelltypen nur mit GABA-A-Rezeptoren ausgestattet sind (Paik et al. 2003).

### 4.3 Kolokalisation mehrerer Isoformen

Über 500 Kinasen wurden bisher jeweils im Genom der Hefe, der Maus, der Ratte und des Menschen gefunden (Manning et al. 2002; Pelech und Zhang 2002; Caenepeel et al. 2004; Coito et al. 2004). Die Serin-Threonin-Kinasen, zu denen die PKC Kinasen gehören, stellen dabei nur eine kleine Gruppe von Kinasen. In den letzten Jahren wurden einige Studien veröffentlicht, in denen die Kolokalisation mehrerer PKC- Isoformen in einzelnen Zelltypen berichtet wurde: 8 PKC- Isoformen kolokalisieren in NIH 3T3 Fibroblasten (Goodnight et al. 1995); 7 PKC- Isoformen kolokalisieren in PC12 Zellen (Borgatti et al. 1996); eine andere Studie konnte dagegen nur 6 PKC- Isoformen in PC12 Zellen nachweisen (Huang et al. 1999); 5 PKC-Isoformen wurden in Herzymyozyten nachgewiesen (Dorn und Mochly-Rosen 2002). Kolokalisationen mehrerer PKC- Isoformen in dem Ausmaß, wie in den aufgeführten Beispielen sind in Nervenzellen bzw. Nervenzelllinien (mit Ausnahme der PC12 Zellen) bisher nicht beschrieben worden. In Purkinjezellen des Kleinhirns wurden z.B. die gamma- und die delta-Isoform nachgewiesen (Barmack et al. 2000).

Bisher wenig verstanden ist die biologische Bedeutung der Kolokalisation mehrerer Isoformen in einer Zelle. Alle Isoformen sind Serin-Threonin-Kinasen, die sich in ihrer Substratspezifität nicht auffällig voneinander unterscheiden (Jaken 1996; Newton 2001). Die funktionelle Bedeutung der unterschiedlichen Isoformen ergibt sich daher aufgrund der unterschiedlichen Liganden, die zu ihrer Aktivierung benötigt werden (Way et al. 2000; Newton 2001), sowie aufgrund der Isoform-spezifischen Interaktionspartner (Jaken und Parker 1996; Poole 2004).

Bemerkenswert ist nun, dass PKC- Isoformen nach Aktivierung in alle „Himmelsrichtungen“ innerhalb einer Zelle wandern (transloziert), um dann am Bestimmungsort die Substratproteine zu phosphorylieren; siehe hierzu als Beispiel die Herzmuskelzellen, bei denen die aktivierten Isoformen vom Zytoplasma zur Membran, vom Zytoplasma zum Kern, vom Zytoplasma zu den Glanzstreifen und vom Zytoplasma zu unterschiedlichen Zellorganellen transportiert werden (Dorn und Mochly-Rosen 2002). Den intrazellulären Bindungspartnern (PKC-Rezeptoren, wie z.B. den MARCKS-Proteinen

(myristolated alanine rich C kinase substrat -Proteinen) kommt hierbei eine entscheidende Rolle zu (Newton 2001).

Bisher wurden keine systematischen Studien betrieben, um die Vielzahl der PKC-bindenden Proteine in Nervenzellen der Wirbeltiernetzhaut zu untersuchen; die Untersuchungen zur zeta- Isoform stellen eine Ausnahme dar (siehe oben).

Die mögliche Kolokalisation von vier PKC- Isoformen in Mb- Bipolarzellen muss man an dieser Stelle als Beispiel für eine divergente Signaltransduktion ansehen (Hug und Sarre 1993). Die Bipolarzellen sind unter diesem Aspekt bisher zellbiologisch nicht untersucht worden.

Denkbar wäre auch, dass man eine intrazelluläre Kompartimentalisierung hinsichtlich der Lokalisierung von PKC-Isoformen als einen Mechanismus zur funktionellen Spezifität der Isoformen ansehen kann (Naik et al. 2000). Ob dies nun auch für die Mb Bipolarzellen gilt, bleibt in Grenzen zweifelhaft.

#### **4.3.1 Biologische Bedeutung bzw. Funktion der Kolokalisation**

Auch wenn die biologische Bedeutung der Kolokalisation von vier PKC-Isoformen in der Goldfischnetzhaut bisher nicht klar ist, sollen in Anlehnung an Ausführungen von Naik et al. (2000) stichwortartig einige Punkte aufgeführt werden, die bei der funktionellen Interpretation der Kolokalisation mehrerer Isoformen berücksichtigt werden können:

1. es gibt Isoformtypische (spezifische) Aufgaben innerhalb einer Zelle in Abhängigkeit von der Lokalisation und der Gegenwart weiterer Aktivatoren;
2. mehrere Isoformen bieten die Möglichkeit einer Feinregulation intrazellulärer Signalwege;
3. die Redundanz von Signalwegen bietet die Möglichkeit einer quasi biochemischen „Mehrfachsicherung“;



4. divergente Signaltransduktionswege vergrößern das „Wirkungsspektrum“ eines einkommenden Signals;

Nachfolgende Untersuchungen müssen zeigen, ob diese Punkte auch für die PKC- Isoformen in Bipolarzellen zutreffen. Man sollte sie jedenfalls nicht vorschnell verwerfen.

#### **4.4 Funktionelle Bedeutung von PKC-Isoformen in Bipolarzellen**

Bisherige Vorstellungen zu Aufgaben und funktioneller Bedeutung von PKC-Isoformen in Bipolarzellen der Wirbeltiernetzhaut sind äußerst lückenhaft und erlauben daher noch kein abschließendes Urteil über diese Familie der Proteinkinasen. Ist schon die Datenlage für Vertreter der klassischen oder konventionellen Isoformen unübersichtlich (siehe die Hinweise zu den klassischen Isoformen in Wood et al. 1997, sowie die Literaturhinweise im Abschnitt 4.2 dieser Arbeit), so ist die Datenlage für Vertreter der neuen und atypischen Isoformen erst recht bescheiden. Die komplexe und mehrschichtige Steuerung von PKC-Isoformen (siehe hierzu besonders Newton 2001 und Gomperts et al. 2003) sowie die große Zahl der Interaktionspartner der einzelnen Isoformen (siehe hierzu besonders Poole et al. 2004) erschwert zudem die Untersuchung der PKC-Isoformen in Bipolarzellen.

Erst weitergehende molekularbiologische Arbeiten zu den einzelnen Isoformen, verbunden mit der Untersuchung von „Knock-out“ Tieren (Tieren, die bestimmte Isoformen nicht mehr bilden, da man die entsprechenden Gene molekularbiologisch herausgeschnitten oder „neutralisiert“ hat) bieten die Möglichkeit, Fragen zur Funktionalität von PKC-Isoformen in Bipolarzellen zu beantworten. PKC- Knock-out Fische (Zebrafische) sind bisher nicht beschrieben. Maus-Mutanten, denen das Gen für PKC-beta fehlt, zeigen erwartungsgemäß eine verringerte Phosphorylierung von Substratproteinen bzw. quantitative Veränderungen von down-stream Substraten (Fujita et al. 2004).

In den vorangegangenen Abschnitten wurde versucht, einige Literaturstellen zu einzelnen Isoformen (und Wirbeltiernetzhaut) zu berücksichtigen.

Die Aufgaben von PKC-Isoformen in den Terminalen der Bipolarzellen betreffen unterschiedliche Aspekte der Biologie dieser Zellen: (1) Modulation von GABA-Rezeptoren, (2) Vesikeldynamik, (3) das Aktinnetzwerk bzw. (4) die Gestalt und Morphologie der Bipolarterminalen. Im Folgenden sollen diese Punkte noch einmal kurz zusammengetragen werden, um deutlich zu machen, an welchen Vorgängen PKC beteiligt ist.

#### **4.4.1 GABA-Rezeptoren**

Weiter oben wurde schon darauf hingewiesen, dass PKC-Aktivierung via Phorbolsterstimulation eine Verringerung von GABA-A-vermittelten Chloridströmen in Stäbchenbipolarterminalen bewirkt (Feigenspan und Bormann 1994). Da die Mb-Terminalen massive GABAerge Eingänge erhalten (Liu und Marc 2000) und die GABA-Wirkung über GABA-A- und GABA-C-Rezeptoren vermittelt wird (Wassle et al. 1998; Fletcher et al. 1998), dürfte eine Modulation des GABAergen feedbacks durch PKC den Signalfuß an den Mb-Terminalen beeinflussen. Man sollte erwarten, dass die Modulation von GABA-A-Rezeptoren besonders die schnellen feedback Interaktionen verändert. In physiologischen Versuchen konnte eine bis zu 10 Minuten anhaltende poststimulatorische Verstärkung von GABA-feedback an Mb-Terminalen der Goldfischnetzhaut beschrieben werden (Vigh et al. 2005). Ob PKC hieran beteiligt ist, wurde nicht untersucht, ist andererseits aber auch nicht auszuschließen (Vigh et al. 2005).

Da Phorbolsterversuche nicht erlauben, zwischen den verschiedenen Vertretern der klassischen und neuen Isoformen zu unterscheiden, muss die Frage nach den Isoformen, die die von Feigenspan und Borman 1994 beschriebenen Effekte vermitteln, offen bleiben.

Ob GABA-C-Rezeptoren PKC-abhängig moduliert werden, ist bisher nicht bekannt; bisherige Arbeiten weisen darauf hin, dass GABA-C-Rezeptoren nicht

von PKC phosphoryliert werden (Kusama et al. 2000). Andererseits sind PKC-, abhängige Mechanismen der GABA-C-Rezeptorinternalisierung beschrieben worden (Kusama et al. 2000). Die Internalisierung von Neurotransmitterrezeptoren ist ein oft beobachteter Vorgang im Zusammenhang mit aktivitätsabhängigen Veränderungen der synaptischen Signalübertragung (Craig 1998). Hinweise, ob ähnliche Vorgänge auch für GABA-C-Rezeptoren an Mb-Terminalen vorkommen, liegen nicht vor, dürften aber nicht auszuschließen sein. Sie böten die Möglichkeit, vor einem längeren Zeitfenster die Effizienz der Signalübertragung zu modulieren.

#### **4.4.2 Vesikeldynamik**

Die Beteiligung von PKC-Isoformen an sekretorischen Vorgängen bzw. der Neurotransmitterfreisetzung wurde für verschiedene neurobiologische Modelle beschrieben (chromaffine Zellen: Yang et al. 2002; neuromuskuläre Endplatte: Santafe et al. 2005; hippocampale Neurone: Stevens and Sullivan, 1998). Die funktionelle Rolle von PKC bei der Transmitterfreisetzung von Mb-Bipolarzellen wird kontrovers diskutiert. Phorbolesternversuche haben gezeigt, dass eine PKC-Aktivierung (durch Phorbolester) eine Verstärkung der Transmitterausschüttung bewirkt (Minami et al. 1998). Neuere Untersuchungen konnten dabei herausstellen, dass die PKC-Aktivierung besonders die „pool-Größe“ der langsamen Komponente der Vesikelfreisetzung beeinflusst (Berglund et al. 2002). Aufgrund der vorliegenden Datenlage ist es noch nicht möglich, diese Effekte eindeutig nur mit bestimmten Isoformen in Zusammenhang zu bringen (außer, dass atypische Isoformen hierbei nicht in Betracht kommen).

#### **4.4.3 Aktinfilamente**

Biochemische Versuche haben gezeigt, dass PKC-Isoformen auch an Aktinfilamente binden und diese phosphorylieren (Nakhost et al. 1998). Aktin bzw. das Aktinzytoskelett ist ein Bestandteil der Prä- und der Postsynapse konventionell chemischer Synapsen (Dillon und Goda 2005). Aktin ist in

Synapsen an einer Vielzahl unterschiedlicher Vorgänge beteiligt; eine Auflistung dieser Aufgaben würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen; daher sei der interessierte Leser auf die Darstellung von Dillon und Goda (2005) verwiesen. Festgehalten werden soll hier nur kurz der Sachverhalt, dass Aktin in unterschiedlichen Synapsenpopulationen an unterschiedlichen Aufgaben beteiligt sein dürfte (Halpain 2003). Diese Vielfalt der Aufgaben wird durch die große Zahl der Aktin- bindenden Proteine bestimmt (dos Remedios et al. 2003).

Phorbolesternversuche an isolierten Mb- Bipolarzellen bewirkten das „Auswachsen“ von Aktinfilamenten, die sich zu einem ringförmigen subplasmalem Aktin-Saum anordnen (Job und Lagnado, 1998). Die funktionelle Bedeutung dieses Aktin-Saumes ist nicht bisher verstanden. Neuere Befunde weisen darauf hin, dass das Aktinnetzwerk in Mb- Terminalen nicht im Zusammenhang mit der Freisetzung synaptischer Vesikel steht, da die pharmakologisch bewirkte Desintegration der Aktinfilamente keinen Einfluss auf die Vesikeldynamik und die Vesikelbewegung innerhalb der Mb- Terminale hat (Holt et al., 2004).

Job und Lagnado (1998) vermuten daher, dass die Aufgaben von Aktin in Bioplarterminalen funktionell eher mit der Gestalt, bzw. der Morphologie der Nervenzellen zu tun haben.

In den letzten Jahren wurden adaptionsabhängige morphologische Veränderungen an Bipolarterminalen in der Fisch- und Säugernetzhaut beschrieben (Yazulla and Studholme, 1992; Behrens and Wagner, 1998; Behrens et al., 1998; Job and Lagnado, 1998). Diese strukturellen Veränderungen betreffen in erster Linie die Gestalt der Stäbchenbipolarterminalen in der Fisch- und Säugernetzhaut sowie die Bildung und Rückbildung kleiner fingerähnlicher Ausstülpungen von Stäbchenaxonterminalen in der Cyprinidennetzhaut (den Bipolarzell-Spinules). Das Aktinnetzwerk unter der Kontrolle von PKC ist daher ein Kandidat für adaptionsabhängige strukturelle Plastizität der Mb Terminale. Wie PKC das

Aktinnetzwerk beeinflusst, bzw. welche Isoform hier im Vordergrund steht, ist nicht klar und muss daher an dieser Stelle offen bleiben.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die PKC ist Gegenstand umfangreicher Untersuchungen, nicht zuletzt der Retina. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich erstmals Hinweise auf das Vorliegen mehrerer PKC- Isoformen in der Goldfischnetzhaut (PKC- alpha, PKC- beta 1, PKC- epsilon, PKC- zeta). Weiterhin wurden diese verschiedenen Isoformen auf Hell- und Dunkelunterschiede in der Immunreaktivität untersucht. Desweiteren wurden, unter Berücksichtigung dessen, dass PDBu und PMA als PKC- Aktivatoren wirksam sind, in- vitro- Experimente mit diesen Pharmakologika durchgeführt.

(1) Zu Beginn der Versuchsreihe wurden Gefrierschnitte von Goldfischnetzhäuten angefertigt und mit Anti- PKC- Antikörpern gegen verschiedene Isoformen (PKC- alpha, PKC- beta 1, PKC- epsilon, PKC- zeta) behandelt. Zur Darstellung der Mb- Bipolarzellen verwendete man als Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 goat- anti- rabbit. Es waren hauptsächlich Mb-Bipolarzellen zu erkennen. Anhand verschiedener Kontrollversuche (Weglassen des Primärantikörpers, Präabsorption) konnte die Spezifität der verwendeten Antikörper unterstrichen werden. Mit Hilfe der durchgeführten Western Blot Untersuchungen war es möglich, auf proteinbiochemischer Ebene Aussagen über die Gegenwart von PKC-Isoformimmunoreaktivitäten in Goldfischnetzhäuten zu erhalten.

(2) Um den Einfluss von Hell- und Dunkeladaptation auf die Immunreaktivität der Isoformen zu untersuchen, wurden Gefrierschnitte von hell- und dunkeladaptierten Netzhäuten gemeinsam auf Objektträger mit den isoformspezifischen Antikörpern inkubiert. Es fielen deutliche Unterschiede der Immunreaktivitätsverteilung der hell- und dunkeladaptierten Netzhäute auf zellulärer Ebene auf.

Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von Bildverarbeitung und computergestützter Bildauswertung die Intensität (bzw. die Grauwerte) der Fluoreszenzmarkierung von Zellkörper und Terminale erfasst und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dabei handelt es sich um eine geeignete Methode, um subzelluläre Veränderungen von PKC- Immunreaktivität semiquantitativ darzustellen (Osborne et al. 1991; Valquero et al. 1996, 1997; Job und Lagnado 1998). Hier zeigten sich hochsignifikante Unterschiede bei den klassischen Isoformen (PKC-alpha, PKC- beta1), signifikante Unterschiede waren auch für die atypische Isoform zu erkennen, während ein signifikanter Unterschied in der Verteilung von Immunreaktivität in Mb-Bipolarzellen für den Vertreter der neuen Isoform (epsilon) nicht zu erkennen war.

(3) Zur Durchführung der in- vitro- Versuche wurden die isolierten Netzhäute 30 min in-vitro im Dunkeln inkubiert bzw. nur mit Fischringer, mit einer mit 10 nM PDBu versetzten Fischringerlösung, oder mit einer mit 10 nM MA versetzten Fischringerlösung behandelt.

10 nM PDBu bewirkte eine Zunahme der Intensität „randständiger“ (bzw. membranassoziierter) PKC-alpha- Immunreaktivität in den Mb- Terminalen, während die Inkubation von isolierten helladaptierten Netzhäuten nur in Fischringer keinen Effekt auf die Verteilung von PKC-Immunreaktivität hatte; das Immunsignal blieb eher gleichmäßig diffus in den Terminalen verteilt. Auch die Inkubation mit 10 nM MA bewirkte eine intensive saumförmige PKC-alpha-Immunreaktivität, während die PKC-Markierung im Innern der Terminalen deutlich niedrigere Pixelintensitäten aufwies. Vergleicht man die mit MA und PDBu behandelten Präparate, so war zu erkennen, dass die saumförmige PKC-Immunreaktivität in den MA-behandelten Präparaten ein intensiveres Fluoreszenzsignal zeigten als die PDBu behandelten Präparate.

Um die Frage zu untersuchen, ob die in-vitro Inkubation isolierter helladaptierter Netzhäute mit einem inaktiven Phorbol ester einen Einfluss auf die PKC-alpha-Immunreaktivität hat, wurden isolierte Netzhäute nur mit Fischringer je 30 min

inkubiert (bzw. mit PDBu in Fischringer oder mit dem inaktiven Phorbol ester 4-alpha-PDBu). Kein Effekt war erkennbar bei inkubierten helladaptierten Netzhäuten, im Dunkeln in Fischringer; die PKC-alpha Immunreaktivität verblieb diffus in der Terminale verteilt. Die Inkubation mit dem „aktiven“ Phorbol ester PDBu ergab PKC-alpha markierte Mb- Terminalen mit intensiv markiertem „Saum“, während das Innere der Terminalen eine deutlich schwächere Immunfluoreszenz zeigte.

Die Inkubation mit dem inaktiven Phorbol ester hatte eine andere Wirkung auf die PKC-alpha-Immunreaktivität als der aktive Phorbol ester. Nach Inkubation mit 4-alpha PDBu war kein deutlicher Gradienten der Pixelintensität (Zirkumferenz der Terminale – Inneres der Terminale) wie in den Präparaten, welche mit PDBu behandelt wurden, auszumachen. Folglich scheint 4-alpha PDBu keinen Effekt auf die PKC-Immunreaktivität in den Mb Terminalen zu haben.

(4) Unter Berücksichtigung der Literatur und der in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse kann man die Hypothese vertreten, dass die hier untersuchten Isoformen der PKC in den Mb- Bipolarzellen vorkommen. Allerdings ist natürlich zu berücksichtigen, dass die Verwendung von Antikörpern generell keine endgültige Sicherheit bietet (Stichwort: falsch-positive Reaktionen; Larsson 1988; Harlow und Lane 1999), und man daher hier nur von PKC-Isoform-immunoreaktivität sprechen kann. Weiterhin bestehen deutliche Unterschiede in der Hell- und Dunkel- Immunreaktivität. Es scheint, als hätte Hell und Dunkel einen Einfluss auf die Verteilung von PKC-Protein im Zytoplasma der beiden subzellulären Kompartimente Terminale und Zellkörper. Anhand der vorliegenden Versuche und der vorhanden Literatur zeigte sich außerdem, dass Phorbol ester als PKC- Aktivatoren ebenfalls einen Einfluss auf die veränderte Immunreaktivität haben.



## 6. ÜBERSICHT: PKC ISOFORMEN IN NETZHÄUTEN VERSCHIEDENER WIRBELTIERE

Table 2. Occurrence of PKC isoenzymes in retinas from different species

PKC isoenzyme	Cellular localisation	Species of retina	References
$\alpha$	ON-Bipolar Cells	Goldfish, Turtle, Rat, Rabbit	1,2,3
$\alpha$	Cone Cells	Turtle	2
$\alpha$	Rod Bipolar/Blue Cone Bipolar Cells	Human	4
$\alpha$	Photoreceptor Outer Segments	Rabbit, Bovine	3,5
$(\alpha + \beta)^1$	Rod Bipolar Cells	Teleost Fish, Chick, Guinea Pig, Rabbit, Cat, Rat	6-11
$(\alpha + \beta)^1$	Cone Photoreceptors (Inner/Outer Segments)	Rat	12
$(\alpha + \beta)^1$	Some Müller cell mitochondria	Carp	17
$\beta^2$	Ganglion/Amacrine Cells	Rabbit, Goldfish	3
$\beta^2$	Bipolar Cells	Frog	3
$\beta^2$	Cone Bipolar/ Amacrine/Ganglion Cells	Human	4
$\beta^2$	Photoreceptor Outer Segments	Bovine	5
$\gamma$	Ganglion/Amacrine Cells	Rabbit, Human	3,4
$\gamma$	Amacrine Cells	Goldfish	3
$\gamma$	Ganglion Cells	Frog	3
$\gamma$	Photoreceptor Outer Segments	Bovine	5
$\delta$	Müller Cells	Rat, Rabbit, Guinea Pig, Frog	13,18
$\delta$	Ganglion Cells	Goldfish	13
$\delta$	Photoreceptor Inner Segments	Chick	13
$\epsilon$	Bipolar Cells (Terminals)	Rabbit, Rat, Guinea Pig, Goldfish	13
$\epsilon$	Amacrine Cells/ Horizontal Cells	Rabbit	14
$\epsilon$	Photoreceptor Inner Segments	Chick	13
$\epsilon$	Photoreceptor Outer Segments	Bovine	5
$\theta$	Bipolar Cells	Rabbit, Rat, Guinea Pig	15
$\zeta$	Cone Outer Segments/ Müller Cells (microvilli)	Frog	18
$\zeta$	Photoreceptor Inner Segments	Rabbit, Rat, Guinea Pig, Goldfish, Chick	13,16
$\lambda/\iota$	Horizontal Cells	Rabbit, Rat, Guinea Pig	15

<sup>1</sup>Monoclonal antibody recognising both isoenzymes.  
<sup>2</sup>No distinction made between  $\beta_1$  or  $\beta_2$  isoenzymes.  
 Refs (1) Suzuki and Kaneko, 1990; (2) Cuenca *et al.*, 1990; (3) Osborne *et al.*, 1992; (4) Kolb *et al.*, 1993; (5) Udovichenko *et al.*, 1993; (6) Negishi *et al.*, 1988; (7) Karschin and Wässle, 1990; (8) Greferath *et al.*, 1990; (9) Grünert and Martin, 1991; (10) Wässle *et al.*, 1991; (11) Yamashita and Wässle, 1991; (12) Ohki *et al.*, 1994; (13) Osborne *et al.*, 1994; (14) Koistinaho and Sagar, 1994; (15) McCord *et al.*, 1996; (16) Ghalayini *et al.*, 1994; (17) Fernández *et al.*, 1995; (18) Terasawa *et al.*, 1991.

Tabelle 2, aus Wood et al. 1997

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

### A

Aeder SE, Martin PM, Soh JW, Hussaini IM (2004) PKC- $\eta$  mediates glioblastoma cell proliferation through the Akt and mTOR signaling pathways. *Oncogene*. 2004 Dec 2; 23(56): 9062-9

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M; Roberts K, Walter P (2002) *Molecular biology of the cell*. 4. ed.. - New York, Garland Science.

Angenstein F, Staak S (1997) Receptor-mediated activation of protein kinase C in hippocampal long-term potentiation: facts, problems and implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 21, 427-454.

### B

Barmack,-N-H; Qian,-Z; Yoshimura,-J (2000) Regional and cellular distribution of protein kinase C in rat cerebellar Purkinje cells. *-Comp-Neurol*. 2000 Nov 13; 427(2): 235-254.

Behrens UD, Wagner HJ (1996) Adaptation-dependent changes of bipolar cell terminals in fish retina: effects on overall morphology and spinule formation in Ma and Mb cells. *Vision Res*. 36, 3901-3911.

Behrens UD, Kasten P, Wagner HJ (1998) Adaptation-dependent plasticity of rod bipolar cell axon terminal morphology in the rat retina. *Cell Tissue Res*. 294, 243-251.

Berglund K, Midorikawa M, Tachibana M (2002) Increase in the pool size of releasable synaptic vesicles by the activation of protein kinase C in goldfish retinal bipolar cells. *J Neurosci* 22, 4776-4785.

Björklund A, Hökfelt T (1983) *Methods in chemical neuroanatomy*. In *Handbook of chemical neuroanatomy Vol. 1*, Herausgeber der Serie Björklund A, Hökfelt T. Amsterdam, Elsevier, 1983

Borgatti P, Mazzoni M, Carini C, Neri LM, Marchisio M, Bertolaso L, Previati M, Zauli G, Capitani S (1996) Changes of nuclear protein kinase C activity and isotype composition in PC12 cell proliferation and differentiation. *Exp Cell Res* 224, 72-78.

Bormann,-J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends-Pharmacol-Sci*. 21(1): 16-19.

Bormann J, Feigenspan A (1995) GABAC receptors. *Trends Neurosci*. 1995 Dec;18(12):515-9.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72; 248-254.
- Brandstätter,-J-H; Hack,-I (2001) Localization of glutamate receptors at a complex synapse. The mammalian photoreceptor synapse. *Cell-Tissue-Res.* 303, 1-14.
- Brenner,-W; Farber,-G; Herget,-T; Wiesner,-C; Hengstler,-J-G; Thuroff,-J-W (2003) Protein kinase C eta is associated with progression of renal cell carcinoma (RCC). *Anticancer-Res.* 2003 Sep-Oct; 23(5A): 4001-6
- Broad LM, Cannon TR, Short AD, Taylor CW (1999) Receptors linked to polyphosphoinositide hydrolysis stimulate Ca<sup>2+</sup> extrusion by a phospholipase C-independent mechanism. *Biochem. J.* 342, 199-206 (1999)
- Buonomano D.V., Merzenich M.M. (1998) Cortical plasticity: from synapses to maps *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 149-186
- Byrne J.H., Kandel E.R. (1996) Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence *Journal of Neuroscience* 16, 425-435.

## C

- Caenepeel S, Charydczak G, Sudarsanam S, Hunter T, Manning G (2004) The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 10;101(32):11707-12
- Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikawa U., Nishizuka Y. (1982) Direct activation of calcium. Activated, phospholipid- dependent protein kinase by tumor- prompting phorbol- esters *J. Biol. Chem.* 257, 7847- 7851
- Chang F.-I., Greenough W.T. (1984) Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice *Brain Res.* 309, 35-46.
- Chun M.H., Han S.H., Chung J.W. & Wässle H. (1993) Electron microscopic analysis of the rod pathway of the rat retina. *J. Comp. Neurol.*, 332, 421-432
- Coito C, Diamond DL, Neddermann P, Korth MJ, Katze MG (2004) High-throughput screening of the yeast kinome: identification of human serine/threonine protein kinases that phosphorylate the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol.* 2004 Apr;78(7):3502-3513.
- Craig AM. (1998) Activity and synaptic receptor targeting: the long view. *Neuron.* 21, 459-462.

Croci C, Brandstatter JH, Enz R (2003) ZIP3, a new splice variant of the PKC-zeta-interacting protein family, binds to GABAC receptors, PKC-zeta, and Kv beta 2. *J Biol Chem* 278, 6128-6135.

## D

Dean,-N; McKay,-R; Miraglia,-L; Howard,-R; Cooper,-S; Giddings,-J; Nicklin,-P; Meister,-L; Ziel,-R; Geiger,-T; Muller,-M; Fabbro,-D (1996) Inhibition of growth of human tumor cell lines in nude mice by an antisense of oligonucleotide inhibitor of protein kinase C-alpha expression. *Cancer-Res.* 56, 3499-3507.

Deller,-T; Frotscher,-M (1997) Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Prog-Neurobiol.* 53, 687-727.

DeRiemer SA, Strong JA, Albert KA, Greengard P, Kaczmarek LK. Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. *Nature.* 1985 Jan 24-30;313(6000):313-6.

Dillon C; Goda Y (2005) The Actin Cytoskeleton: Integrating Form and Function at the Synapse. *Annual Review of Neuroscience* 28, 25-55.

Dorn GW 2nd, Mochly-Rosen D. 2002 Intracellular transport mechanisms of signal transducers. *Annu Rev Physiol.* 64, 407-29.

dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83, 433-473.

## E

## F

Feigenspan A., Bormann J. 1994 Modulation of GABA<sub>A</sub> receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J. Physiol.*, 481, 325-330

Feigenspan,-A; Bormann,-J (1998) GABA-gated Cl<sup>-</sup> channels in the rat retina. *Prog-Retin-Eye-Res.* 17, 99-126.

Frayer SM, Barber LA, Vasko MR (1999) Activation of protein kinase C enhances peptide release from rat spinal cord slices. *Neurosci Lett* 265, 17-20.

Fletcher EL, Koulen P, Wassle H. (1998) GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors on mammalian rod bipolar cells. *J Comp Neurol.* 396, 351-356.

Fujita T, Asai T, Andrassy M, Stern DM, Pinsky DJ, Zou YS, Okada M, Naka Y, Schmidt AM, Yan SF. (2004) PKCbeta regulates ischemia/reperfusion injury in the lung. *J Clin Invest.* 113,1615-1623.

## G

Gabriel R, Lesauter J, Silver R, Garcia-Espana A, Witkovsky P (2001) Diurnal and circadian variation of protein kinase C immunoreactivity in the rat retina. *J Comp Neurol* 439,140-150.

Gomperts BD, Tatham PER, Kramer IM (2003) *Signal transduction*. San Diego, Calif., Academic Press.

Goodnight,-J-A; Mischak,-H; Kolch,-W; Mushinski,-J-F (1995) Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J-Biol-Chem.* 270, 9991-10001.

## H

Halpain S. (2003) Actin in a supporting role. *Nat Neurosci.* 6,101-102.

Harlow E, Lane D (Eds) (1999) *Using Antibodies : a laboratory manual* / Ed Harlow ; David Lane. - Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hartwig,-J-H; Thelen,-M; Rosen,-A; Janmey,-P-A; Nairn,-A-C; Aderem,-A (1992) MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature.* 356, 618-622.

Haverkamp,-S; Haeseleer,-F; Hendrickson,-A (2003) A comparison of immunocytochemical markers to identify bipolar cell types in human and monkey retina. *Vis-Neurosci.* 2003 Nov-Dec; 20(6): 589-600

He,-Q; Dent,-E-W; Meiri,-K-F (1997) Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. *J-Neurosci.* 17, 3515-3524.

Hebb D.O. (1949) *The Organization of Behavior*. John Wiley, New York.

Hockberger P, Toselli M, Swandulla D, Lux HD (1989) A diacylglycerol analogue reduces neuronal calcium currents independently of protein kinase C activation. *Nature* 338, 340-342

Holt M, Cooke A, Neef A, Lagnado L (2004) High mobility of vesicles supports continuous exocytosis at a ribbon synapse. *Curr Biol* 14: 173-183.

Hori T, Takai Y, Takahashi T (1999) Presynaptic mechanism for phorbol ester-induced synaptic potentiation. *J. Neurosci.* 19, 7262-7267 (1999)

Huang HM, Wenig CH, Ou SC, Hwang T (1999) Selective subcellular redistributions of protein kinase C isoforms by chemical hypoxia. *J Neurosci Res* 56, 668-678

Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., Durbin, R., Eyras, E., Gilbert, J., Hammond, M., Huminiecki, L., Kasprzyk, A., Lehvaslaiho, H., Lijnzaad, P., Melsopp, C., Mongin, E., Pettett, R., Pockock, M., Potter, S., Rust, A., Schmidt, E., Searle, S., Slater, G., Smith, J., Spooner, W., Stabenau, A., Stalker, J., Stupka, E., Ureta-Vidal, A., Vastrik, I., Clamp, M.(2002) The Ensembl genome database project. *Nucl Acids Res* 30, 38-41.

Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.* 1993 Apr 15;291 ( Pt 2):329-43.

## I

Inoue,-M; Isayama,-Y (1984) Calcium ion and phospholipid-dependent protein kinase in rod outer segment. *Jpn-J-Ophthalmol.* 28, 47-56.

Ishida, A.T., W.K. Stell, and D.O. Lightfoot (1980) Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 191:315-335.

Ishii,-H; Koya,-D; King,-G-L (1998) Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J-Mol-Med.* 76, 21-31.

## J

Jacobson M. (1991) *Developmental Neurobiology* 3. Auflage, New York, Plenum Press

Jaken, S. 1996. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:168–173

Jaken S, Parker PJ (2000) Protein kinase C binding partners. *Bioessays.* 22(3):245-254.

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.

Jordan R, Lemke EA, Klingauf J (2005) Visualization of synaptic vesicle movement in intact synaptic boutons using fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys J*. 2005 Sep;89(3):2091-102.

Junge HJ, Rhee JS, Jahn O, Varoqueaux F, Spiess J, Waxham MN, Rosenmund C, Brose N. (2004) Calmodulin and Munc13 form a Ca<sup>2+</sup> sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell* 118, 389-401.

## K

Kandel E, Schwarz M, Jessel T (Hrsg.) (2000) Principles of neural sciences. 4th Edition, Elsevier, Amsterdam.

Kato S, Ishita S, Mawatari K, Matsukawa T, Negishi K (1990) Dopamine release via protein kinase C activation in the fish retina, *J. Neurochem.* 54, 2082-2090.

Kiley SC (1997) PKC isoenzymes and myeloid cell differentiation. In Parker PJ, Dekker LV Protein Kinase C. Springer, New York Berlin, pp.121-132.

Konorski J. (1948) Conditioned Reflexes and Neuron organization Cambridge Univ. Press

Koistinaho,-J; Sagar,-S-M (1994) Localization of protein kinase C subspecies in the rabbit retina. *Neurosci-Lett* 177, 15-18.

Koulen P, Brandstatter JH, Kroger S, Enz R, Bormann J, Wassle H (1997) Immunocytochemical localization of the GABA(C) receptor rho subunits in the cat, goldfish, and chicken retina. *J Comp Neurol.* 1997 Apr 21;380(4):520-32.

Krishek,-B-J; Xie,-X; Blackstone,-C; Haganir,-R-L; Moss,-S-J; Smart,-T-G (1994) Regulation of GABAA receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 12, 1081-1095.

Kubo K., OhnoS., Suzuki K. (1987) Primary structures of human protein kinase C beta I and beta II differ only in their C-terminal sequences. *FEBS Lett.* 1987 Oct 19;223(1):138-42.

Kusama T, Hatama K, Saito K, Kizawa Y, Murakami H. (2000) Activation of protein kinase C induces internalization of the GABA(C) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Jpn J Physiol.* 50,429-435.

## L

Larsson L.I. (1988) Immunocytochemistry: Theory and Practice. Boca Raton, CRC Press.

Lee K.S., Schottler F., Oliver M., Lynch G. (1980) Brief burst of high frequency stimulation produce two types of structural change in rat hippocampus J. Neurophysiol. 44, 247-258.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P (2003) Molecular cell biology. - 5. ed.. - New York, Freeman.

## M

Maeno-Hikichi,-Y; Chang,-S; Matsumura,-K; Lai,-M; Lin,-H; Nakagawa,-N; Kuroda,-S; Zhang,-J-F (2003) A PKC epsilon-ENH-channel complex specifically modulates N-type Ca<sup>2+</sup> channels. Nat-Neurosci. 2003 May; 6(5): 468-475.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. Science. 2002 Dec 6;298(5600):1912-1934.

Marc RE, Liu W. (2000) Fundamental GABAergic amacrine cell circuitries in the retina: nested feedback, concatenated inhibition, and axosomatic synapses. J Comp Neurol. 425, 560-582.

Massey S.C. (1990) Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina Prog. Ret. Res. 9, 399-425.

Matthews G. (1999) Synaptic mechanisms of bipolar cell terminals. Vision Res. 39, 2469-2476.

Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. Biochem J. 1998 Jun 1;332 ( Pt 2):281-92. Review.

Minami N., Berglund K., Sakaba T., Kohmoto H., Tachibana M. (1998) Potentiation of transmitter release by protein kinase C in goldfish retinal cells Journal of physiology 512, 219-225.

Mosior,-M; Newton,-A-C (1996) Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. Biochemistry. 35, 1612-1623.



Mossberg K, Arvidsson U, Ulfhake U (1990) Computerized quantification of immunofluorescence-labeled axon terminals and analysis of co-localization of neurochemicals in axon terminals with a confocal scanning laser microscope. *J Histochem Cytochem* 38, 179-190.

Murphy TV, Prountzos C, Kotsonis P, Iannazzo L, Majewski H (1999) Structural determinants of phorbol ester binding in synaptosomes: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Eur.J.Pharmacol.* 381 77-84.

## **N**

Naik MU, Benedikz E, Hernandez I, Libien J, Hrabe J, Valsamis M, Dow-Edwards D, Osman M, Sacktor TC (2000) Distribution of protein kinase Mzeta and the complete protein kinase C isoform family in rat brain. *J Comp Neurol.* 2000 Oct 16;426(2):243-258.

Nakhorst A, Kabir N, Forscher P, Sossin WS (2002) Protein Kinase C Isoforms Are Translocated to Microtubules in Neurons *J. Biol. Chem.* 277, 40633-40639.

Negishi K., Kato S., Teranishi T. (1988) Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas. *Neurosc.Letters* 94, 247-252.

Newton AC (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* 101, 2353-2364.

Newton AC (2003) The ins and outs of protein kinase C. *Methods Mol Biol.* 233,3-7.

Newton A.C., Williams D.S. (1993) Does protein kinase C play a role in Rhodopsin desensitization? *Trends Biochem. Sci.* 18, 275-277.

Nicholls DG (1997) Protein kinase c and synaptic transmission. In: Parker PJ, Dekker LV (Hrsg.) *Protein Kinase C.* New York, Berlin, Springer-Verlag, pp. 167-178.

Nicoll R.A., Malenka R.C. (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus *Nature* 377, 115-118

Nishizuka Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C *Science* 258, 607- 614

## O

O'Leary TJ (2001) Standardization in immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9, 3-8.

Osborne NN, Broyden NJ, Barnett NL, Morris NJ (1991) Protein kinase C (alpha and beta) immunoreactivity in rabbit and rat retina: effect of phorbol esters and transmitter agonists on immunoreactivity and the translocation of the enzyme from cytosolic to membrane compartments. *J Neurochem* 57, 594-604.

Osborne NN, Wood J, Groome N (1994) The occurrence of three calcium-independent protein kinase C subspecies (delta, epsilon and zeta) in retina of different species. *Brain Res.* 637, 156-162.

## P

Paik SS, Park NG, Lee SJ, Han HK, Jung CS, Bai SH, Chun MH (2003) GABA receptors on horizontal cells in the goldfish retina *Vision Res.* 2003 Sep;43(20):2101-6.

Parker PJ, Dekker L 1997 *Protein Kinase C*. Springer Verlag, New York, Berlin.

Pears CJ, Goode NT (1997) PKC downregulation: signal or adaptation? In: Parker PJ, Dekker LV (Hrsg.) *Protein Kinase C*. New York, Berlin, Springer-Verlag, pp. 45-56.

Pawley J.B. (1995) *Handbook of Biological Confocal Mikroskopy*. 2nd ed, IMR Press, Madison, Wisconsin.

Pelech S, Zhang H (2002) Plasticity of the kinomes in monkey and rat tissues. *Sci STKE*. 2002 Dec 10;2002(162):PE50.

Pin J.-P., Duvoisin R. (1995) Review: Neurotransmitter receptors I, The metabotropic glutamate Receptors: structure and functions *Neuropharmacology* 34, 1-26

Poole AW, Pula G, Hers I, Crosby D, Jones ML (2004) PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2004 Oct;25(10):528-35.

## Q

## R

Ramon y Cajal S.(1906) Notas preventivas sobre la degeneration y regeneraation de las vias nerviosas centrales. *Trab. Labor. Invest. Biol.* (Madrid) 4, 295-301.

Raval AP, Dave KR, Mochly-Rosen D, Sick TJ, Perez-Pinzon MA (2003) Epsilon PKC is required for the induction of tolerance by ischemic and NMDA-mediated preconditioning in the organotypic hippocampal slice. *J Neurosci* 23, 384-391.

Reyland, M, Anderson S, Matassa A, Barzen K, and Quissell D. (1999) Protein kinase C is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary acinar cells. *J Biol Chem* 274, 19115-19123.

Rhee JS, Betz A, Pyott S, Reim K, Varoqueaux F, Augustin I, Hesse D, Sudhof TC, Takahashi M, Rosenmund C, Brose N (2002) Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 108, 121-133.

Ricci A, Marchal-Victorion S, Bronzetti E, Parini A, Amenta F, Tayebati SK. (2002) Dopamine D4 receptor expression in rat kidney: evidence for pre- and postjunctional localization. *J Histochem Cytochem.* 50, 1091-1096.

Romeis B. (1989) *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, herausgegeben von P. Böck. MÜNCHEN, Urban & Schwarzenberg.

Rosner,-H; Vacun,-G; Rebhan,-M (1995) Muscarinic receptor-mediated induction of actin-driven lamellar protrusions in neuroblastoma cell somata and growth cones. Involvement of protein kinase C. *Eur-J-Cell-Biol.* 66, 324-334.

Rossner M, Yamada KM (2004) What's in a picture? The temptation of image manipulation. *J Cell Biol*166,11-15.

## **S**

Santafe MM, Lanuza MA, Garcia N, Tomas J (2005) Calcium inflow-dependent protein kinase C activity is involved in the modulation of transmitter release in the neuromuscular junction of the adult rat. *Synapse* 57: 76-84.

Sankaranarayanan S, Atluri PP, Ryan TA (2003) Actin has a molecular scaffolding, not propulsive, role in presynaptic function. *Nat Neurosci.* 2003 Feb;6(2):127-135.

Schmidt RF, Thews G, Lang F (2000). *Physiologie des Menschen*. 28. Auflage, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.

Schmitz F, Augustin I, Brose N. (2001) The synaptic vesicle priming protein Munc13-1 is absent from tonically active ribbon synapses of the rat retina. *Brain Res.* 895, 258-263.

Serrano P, Yao Y, Sacktor TC (2005) Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation. *J Neurosci.* 2005 Feb 23;25(8):1979-84.

Shiells,-R-A; Falk,-G (2000) Activation of Ca<sup>2+</sup>--calmodulin kinase II induces desensitization by background light in dogfish retinal 'on' bipolar cells. *J-Physiol.* 528 (Pt 2), 327-338.

Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (1999) *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* - 6. ed.. - Philadelphia : Lippincott-Raven, 1999.

Sivilotti,-L; Nistri,-A (1991) GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog-Neurobiol.* 36, 35-92.

Srinivasan N, Blundell TL (1997) Insights into the structure of functional modules in the protein kinase c family. In: Parker PJ, Dekker LV (Hrsg.) *Protein Kinase C.* New York, Berlin, Springer-Verlag, pp. 11-24.

Stell, W. K., Lightfoot, D. O. (1975). Color specific interconnection of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. *Journal of Comparative Neurology*, 159, 473-502.

Stevens CF, Sullivan JM (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. *Vis Neurosci.* 1990 Sep;5(3):223-30.

Suzuki S, Kaneko A (1991) Protein kinase C-like immunoreactivity of the ON-type bipolar cell in goldfish and mammalian retinas: a useful criterion for subtype identification of isolated cells. *Neurosci Res Suppl.* 1991;15:S107-15.

## T

Takai Y., Kishimoto A., Inoue M., Nishizuka Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide- independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem.* 1977 Nov 10;252(21):7603-9.

## U

## V

Van-der-Zee,-E-A; Douma,-B-R (1997) Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. *Prog-Neuropsychopharmacol-Biol-Psychiatry* 21(3): 379-406.

Vaquero CF, Velasco A, de la Villa P (1996) Protein kinase C localization in the synaptic terminal of rod bipolar cells. *Neuroreport*. 7, 2176-2180.

Vaquero CF; Velasco A, de la Villa P (1997) Quantitative measurement of protein kinase C immunoreactivity in rod bipolar cells of the goldfish retina. *Brain Res* 773, 208-212.

Vigh J, Li GL, Hull C, von Gersdorff H. (2005) Long-term plasticity mediated by mGluR1 at a retinal reciprocal synapse. *Neuron*. 46, 469-482.

## W

Wakasaki,-H; Koya,-D; Schoen,-F-J; Jirousek,-M-R; Ways,-D-K; Hoit,-B-D; Walsh,-R-A; King,-G-L (1997) Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A*. 94, 9320-9325.

Wassle H, Koulen P, Brandstatter JH, Fletcher EL, Becker CM. (1998) Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Res*. 38, 1411-1430.

Way KJ, Chou E, King GL (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* 21, 181-187.

Weiler,-R (1978) Horizontal cells of the carp retina: Golgi impregnation and Procion-Yellow injection. *Cell-Tissue-Res*. 195, 515-526.

Wood JP, McCord RJ, Osborne NN (1997) Retinal protein kinase C. *Neurochem Int* 30, 119-136.

Woods, Ian G., Kelly, Peter D., Chu, Felicia, Ngo-Hazelett, Phuong, Yan, Yi-Lin, Huang, Hui, Postlethwait, John H., Talbot, William S. (2000) A Comparative Map of the Zebrafish Genome. *Genome Res* 10, 1903-1914.

## X

## Y

Yang Y, Udayasankar S, Dunning J, Chen P, Gillis KD (2002) A highly Ca<sup>2+</sup>-sensitive pool of vesicles is regulated by protein kinase C in adrenal chromaffin cells *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 17060-17065.

Yazulla,-S; Studholme,-K-M (1992) Light-dependent plasticity of the synaptic terminals of Mb bipolar cells in goldfish retina. J-Comp-Neurol. 1992 Jun 22; 320(4): 521-30.

Yazulla S, Studholme K M (2001) Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry. J Neurocytol 30, 551-592.

Yuste R, Lanni F, Konnerth A [Hrsg.] Imaging neurons : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2000.

## **Z**

Zieglmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L., Squire L.R. (1999) Fundamental Neuroscience. Academic Press San Diego.

## 8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der PKC- Isoformen (modifiziert nach Way et al., 2000)
- Abbildung 1.2 Unterschiedliche second messenger Kaskaden (aus Kandel et al., 2000)
- Abbildung 1.3 Aufbau der Säugernetzhaut (Schmidt et al., 2000)
- Abbildung 3.1 PKC- alpha Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der *Goldfischnetzhaut*
- Abbildung 3.2 PKC- beta1 Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut
- Abbildung 3.3 PKC- epsilon Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut
- Abbildung 3.4 PKC- zeta Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Goldfischnetzhaut
- Abbildung 3.5 Western Blot Untersuchung von Netzhauthomogenaten
- Abbildung 3.6 Tabellarische Übersicht der Isoformantikörper
- Abbildung 3.7 Balkenhistogramm zur Darstellung von Grauwertrelationen
- Abbildung 3.8 Schematische Darstellung der subzellulären Fraktionierung (modifiziert nach Osborne et al., 1991)
- Abbildung 3.9 Western Blot PKC- alpha
- Abbildung 3.10 Balkendiagramm zur Darstellung der Grauwertrelation
- Abbildung 3.11 Immunfluoreszenzaufnahmen und Linescanprofile
- Abbildung 3.12 Einfluss von Phorbol ester auf die PKC- alpha Immunoreaktivität in Mb- Bipolarzellen
- Abbildung 3.13 Einfluss von aktiven und inaktiven Phorbol ester auf die PKC- alpha Immunoreaktivität

## **9. ANHANG**

### **9.1 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, besonders bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Wagner und Dr. Uwe D. Behrens für die Möglichkeit, diese Arbeit am Anatomischen Institut der Universität Tübingen durchführen zu können.

Desweiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Anatomischen Institutes für die tatkräftige Unterstützung während der Durchführung der Versuche bedanken.

Insbesondere meinem Freund Daniel Meinhard danke ich für die langwährende motivierende Unterstützung und die hervorragende Hilfe bei der Feinarbeit am Computer. Danke, Großer!

Astrid Baur danke ich für ihre Geduld sowie für viele fachliche und noch mehr nicht- fachliche Anregungen.

Letzendlich gilt mein herzlicher Dank meinen Eltern Hannelore und Peter Pohl-Sitzler, meiner Großmutter Bianka Heger und meinem Bruder Peterle, die mich im Laufe meines Studiums und während dieser Arbeit persönlich unterstützt und aufgemuntert haben.



## 9.2 Lebenslauf

Name: Victoria Pohl-Sitzler  
Geburtsdatum: 20. Dezember 1978  
Geburtsort: Freiburg im Breisgau (D)  
Familienstand: ledig, keine Kinder

### Schulausbildung

08/1985 – 07/1989 Feyel- Grundschule in Freiburg

08/1989 – 06/1998 Deutsch- Französisches Gymnasium in Freiburg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

### Studium

04/1999 – 03/2001 Medizinstudiums an der  
Eberhard- Karls- Universität Tübingen

10/2001– 12/2005 Medizinstudium an der RWTH Aachen

29.03.2001 Ärztliche Vorprüfung

29.08.2002 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

07.09.2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

06.12.2005 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung