

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

In-vivo und *in-vitro* Untersuchungen zur Rolle aktivierter
Proteinkinase C in der Mb-Bipolarzellterminale der
Goldfischnetzhaut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Johannes Paul Borde

aus Oberkirch

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wolburg

3. Berichterstatter: Professor Dr. J. Kapfhammer

*Der erste Schluck aus dem Becher der Natur
führt zum Atheismus,
aber auf dem Grund wartet Gott.*

Werner Heisenberg

1	Einleitung	9
1.1	Allgemeine Einleitung	9
1.2	Proteinkinase C	12
1.3	Die Aktivierung und Regulation von PKC	14
1.4	Funktion von PKC	16
1.5	PKC und synaptische Kommunikation	19
1.6	PKC immunoreaktive Bipolarzellen	20
1.7	Fragestellung :	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Materialien	25
2.2	Versuchstiere und Präparation	25
2.3	Lichtmikroskopische Immunhistochemie	25
2.4	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	26
2.5	Semiquantitative Bestimmung der PKC-IR und pPKC-IR in Mb Terminalen	27
2.6	In-vitro Versuche mit dem PKC alpha Inhibitor GÖ6976	30
2.7	Differentielle Ultrazentrifugation und Gewebeaufbereitung für Western Blot.	31
2.8	FM 1-43 Experimente	32
2.9	Antikörper-Kontrollversuche	33
2.10	Semiquantitative PCR zum Nachweis der PKC alpha Expression	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Alpha PKC Immunoreaktivität in der Goldfischnetzhaut (Übersicht)	35

3.2	Semiquantitative Bestimmung von alpha PKC-IR in Mb-Terminalen in vivo. _____	36
3.3	Subzelluläre Verteilung von „aktivierter“ alpha pPKC-IR in vivo _____	41
3.4	Western Blot Untersuchungen zum Einfluß von Hell-Dunkeladaptation auf die subzelluläre Verteilung von alpha pPKC (Ser657) und alpha PKC in Netzhauthomogenaten (in-vivo Material) _____	47
3.5	Proximal / Distal Lokalisation der alpha PKC und alpha pPKC Immunoreaktivität in Mb-BCT. _____	49
3.6	In-vitro Versuche mit dem PKC alpha Inhibitor GÖ6976 _____	52
3.7	FM 1-43 Experimente zur Vesikeldynamik _____	55
3.8	Amplifikation von PKC alpha cDNA im Goldfisch und Zebrafisch _____	57
3.9	Unterliegt die PKC Dynamik in-vivo endogenen Rhythmen oder ist Hell / Dunkel der Reiz für die Auslösung dynamischer Vorgänge? _____	59
3.10	Zapfenbipolarzellterminalen _____	61
4	Diskussion _____	63
4.1	Diskussion der Methoden _____	63
4.2	Nachweis von alpha pPKC-IR _____	63
4.2.1	Immunhistochemie _____	64
4.2.2	Semiquantitative Immunhistochemie _____	65
4.2.3	Biochemische Methoden _____	68
4.2.4	Spezifität und Quantifizierung der FM 1-43 Markierungen _____	69
4.3	Diskussion der Ergebnisse _____	70
4.3.1	Die Bipolarzellterminale: Eine funktionell und morphologisch heterogene Struktur ? _____	70
4.3.2	Hell- und Dunkeladaptation in-vivo und in-vitro haben Einfluß auf die subzelluläre Verteilung des Enzyms _____	74

4.3.3	Ist Translokation ein Schlüsselmechanismus für die subzelluläre Wirkung von Protein Kinase C? _____	76
4.3.4	Welchen Einfluß hat PKC auf die Vesikeldynamik? _____	78
4.3.5	Isoformheterogenität in Mb-Bipolarterminalen _____	81
4.4	Molekularbiologische Erkenntnisse über PKC alpha im Goldfisch und Zebrafisch _____	82
4.5	Exkurs: Rolle von Proteinkinase C in der Psychiatrie _____	84
5	Zusammenfassung _____	86
6	Literaturverzeichnis _____	87
7	Publikationen _____	96
8	Danksagung _____	97
9	Tabellarischer Lebenslauf _____	98

Abkürzungsverzeichnis

AC	Amakrinzelle
CC	zytosolisches Kompartiment
CLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
GC	Ganglienzelle
GCL	Ganglienzellschicht
HC	Horizontalzelle
INL	innere Körnerschicht
IPL	innere plexiforme Schicht
Mb-BCT	gemischte Stäbchen-Zapfen Bipolarzellterminale
Mb-BC	gemischte Stäbchen-Zapfen Bipolarzelle, deren Terminale in der Sublamina b der IPL stratifiziert
MC	Membrankompartiment
NGS	normal goat serum (normales Ziegen Serum)
OPL	äußere plexiforme Schicht
ONL	äußere Körnerschicht
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PKC	Proteinkinase C
PKC-IR	Proteinkinase C Immunoreaktivität
PKC-ir	Proteinkinase C immunoreaktiv
ROI	Region of interest (Auswertungsraum)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasenkettenreaktion

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Sequenzmotive von PKC
Abb. 2	Funktionen von PKC
Abb. 2.1	Aktivierung von PKC alpha
Abb. 3	Schematische Darstellung der Goldfischretina
Abb. 4	Methode zur Erfassung der Grauwerte
Abb. 5	PKC alpha markierte Retina
Abb. 6+7	PKC alpha markierte Retina; Messung der PKC-IR im Zytosol und an der Membran; Hell vs. Dunkel
Abb. 8	Auswertung der Grauwertverteilung an PKC alpha markierter Retina
Abb. 9	pPKC alpha markierte Retina
Abb. 9.1	pPKC alpha markierte Retina
Abb. 10+11	pPKC alpha markierte Retina; Messung der pPKC-IR im Zytosol und an der Membran; Hell vs. Dunkel
Abb. 12	Auswertung der Grauwertverteilung an pPKC alpha markierter Retina
Abb. 13+14	Western Blots pPKC und PKC Hell / Dunkel Semiquantitative Western Blot Auswertung
Abb. 15+16	PKC alpha proximal/distal Verteilung in der Mb-BCT
Abb. 17+18	pPKC alpha proximal/distal Verteilung in der Mb-BCT
Abb. 19+20	PKC Inhibitor Versuch
Abb. 21	FM1-43 Versuche zur Vesikeldynamik
Abb. 22	PCR Versuch; PKC alpha Hell/Dunkel
Abb. 23+24	Zirkadiane Rhythmik von PKC alpha; Dauerdunkelversuch
Abb. 25	Zapfenbipolarzellen

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Ein zentrales Anliegen der aktuellen neurowissenschaftlichen Forschung ist die Beantwortung der Frage: Welcher Art sind die molekularen Veränderungen in chemischen Synapsen nach Stimulation in-vivo und in-vitro? (Murase et al., 2002). Wiederholtem Reizen synaptischer Verbindungen kommt eine Schlüsselrolle zu bei der Untersuchung zellulärer Grundlagen von Lernen und Gedächtnisbildung (Albright et al., 2000).

Der kanadische Psychologe Donald O. Hebb formulierte in „The Organisation of Behavior“ (Hebb, 1949): „Wenn ein Axon des Neurons A das Neuron B erregt und wiederholt oder anhaltend das Feuern, d.h. die überschwellige Erregung von Neuron B bewirkt, so wird die Effizienz von Neuron B durch einen Wachstumsprozess oder eine Stoffwechseländerung in beiden oder einem der beiden Neurone erhöht“. Synapsen, welche die genannten Eigenschaften zeigen werden daher auch als Hebb-Synapsen bezeichnet. Hebb-Synapsen wurden und werden herangezogen, um Mechanismen und Prinzipien von synaptischer Plastizität zu untersuchen (Sejnowski, 1999).

Unter dem Begriff synaptische Plastizität werden eine Vielzahl von Vorgänge zusammengefaßt, die die Effizienz synaptischer Übertragung beeinflussen. Langzeitpotenzierung (LTP), Langzeitdepression (LTD), Habituation, Sensitivierung und Bahnung ermöglichen so eine, auch längerfristig anhaltende, Regulation der neuronalen Übertragungsleistung bei der synaptischer Kommunikation (Kandel et al., 1999).

Ein wichtiges Modell zur Untersuchung von synaptischer Plastizität ist die LTP. Experimentelle Ergebnisse von Bliss und Lomo zur LTP zeigten eine Verstärkung neuronalen Antwortverhaltens nach mehrmaliger hochfrequenter elektrophysiologischer Reizung eines Neurons (Bliss und Lomo ,1973).

Komplexe Vorgänge, wie Lernen, Gedächtnis und Verhalten sind untrennbar mit dem Begriff der synaptischen Plastizität verbunden. Das Gedächtnis wird u.a. danach eingeteilt, für wie lange Zeit sein Inhalt erinnert wird. Die Einteilung

erfolgt in ein Kurzzeitgedächtnis (KZG) und in ein Langzeitgedächtnis (LZG) (Milner, 1965; Milner, 1985). Das KZG behält seinen Inhalt nicht länger als Stunden, wohingegen das LZG seine Information wesentlich länger bzw. lebenslang speichert.

Alle Lernprozesse sind Ausdruck der Plastizität des Nervensystems, aber umgekehrt bedeutet nicht jeder plastische Vorgang Lernen. Unter Lernen wird der Neuerwerb einer Verhaltensweise verstanden, die bisher nicht im Verhaltensrepertoire des Organismus enthalten war. Lernen unterscheidet sich von Reifung. Reifung sind genetisch determinierte Wachstumsprozesse, die allerdings als unspezifische Voraussetzung mit Lernvorgängen assoziiert sind (Denisenko-Nehrbass et al., 2000).

Die Hypothese zum Lernen (Hebb, 1949) geht davon aus, daß erhöhte Aktivität der Präsynapse zu einer erhöhten Neurotransmitterausschüttung führt. Auf der postsynaptischen Ebene können hierdurch Modifikationen der Rezeptoren und der an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle erfolgen. Erhöhte Reizung des präsynaptischen Neurons bewirkt, daß stille neuronale Verbindungen aktiviert und damit verwendet werden. Dieser Vorgang wurde exemplarisch am Nervensystem der Nacktschnecke *Aplysia californica* gezeigt (Kandel et al., 2001). Daneben sind morphologische Veränderungen in der Fläche des synaptischen Kontaktes und die Zunahme bzw. Abnahme der Anzahl der Synapsen beschrieben worden (Cotman und Nadler, 1978).

Neuere Studien konnten zeigen, daß Proteinsynthese an unterschiedlichen Phasen von LTP beteiligt ist. Wird die Proteinsynthese gehemmt, so wird die Dauer der LTP signifikant reduziert (Nguyen et al., 1994). Die Überführung des Gelernten vom KZG in das LZG bedarf der Proteinsynthese, da Translationshemmer die Konsolidierung des LZG beeinträchtigen.

Proteinphosphorylierung ist einer der molekularen Mechanismen, durch welche die Funktion von Proteinen einer Zelle reguliert werden (Siegel et al., 1998; Alberts et al., 2002). Serin-Threoninkinasen spielen bei der Steuerung von

Proteinen eine Schlüsselrolle. Die bekanntesten Vertreter der Serin- / Threoninkinasen sind u.a. die second-messenger abhängigen Proteinkinasen: 1. cAMP-Kinase oder Proteinkinase A, 2. cGMP-Kinase, 3. Ca²⁺/Calmodulinkinasen (und hier besonders die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, CaMKII) und 4. Proteinkinase C (PKC) (Siegel et al. 1999). Jede dieser Proteinkinasen bzw. Kinasefamilien ist an unterschiedlichen zellulären Vorgängen beteiligt, die in dynamische Abläufe neuronaler Signalübertragung eingreifen; in der Literatur wird jede dieser genannten Kinasen mit unterschiedlichen Modellen von synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht (beispielhaft zum Thema „Proteinkinasen und synaptischer Plastizität“ seien angeführt: Abel et al., 1997 (cAMP-PKA); Vaillant et al., 2002 (CaMKII); Van der Zee und Douma, 1997 (PKC)).

In den letzten Jahren wurden besonders die Beteiligung von PKA und PKC an Gedächtnisleistungen im Säugergehirn herausgestellt. cAMP moduliert über aktivierte PKA den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP responsive element binding Protein), der dann seinerseits „Lernvorgänge“ in der CA1 und CA3 Region des Hippokampus von Ratten steuert (Impey et al., 1998).

PKC ist auf verschiedenen Ebenen an Mechanismen der Gedächtnisbildung beteiligt (Zee und Douma 1997; Selcher et al., 2002). Dies zeigt sich besonders bei Beeinträchtigungen von Lernvorgängen; so ist die räumliche Gedächtnisleistung adulter älterer Ratten mit einer Fehlregulation von PKC in der CA 1 Region des Hippokampus korreliert (Colombo et al., 2002).

Pharmakologische Studien belegen ebenfalls eine Beteiligung von Proteinkinasen an höheren Gedächtnisleistungen von Säugetieren (Walleinstein et al., 2002). Die präzisen Mechanismen, durch die höhere Gedächtnisleistungen mittels Proteinkinasen gesteuert werden, sind bisher nur in Ansätzen verstanden.

Modifizierungen der Wirksamkeit synaptischer Übertragungsleistungen führen zu dynamischen und plastischen Veränderungen bestehender Synapsen (Malenka und Siegelbaum, 2001).

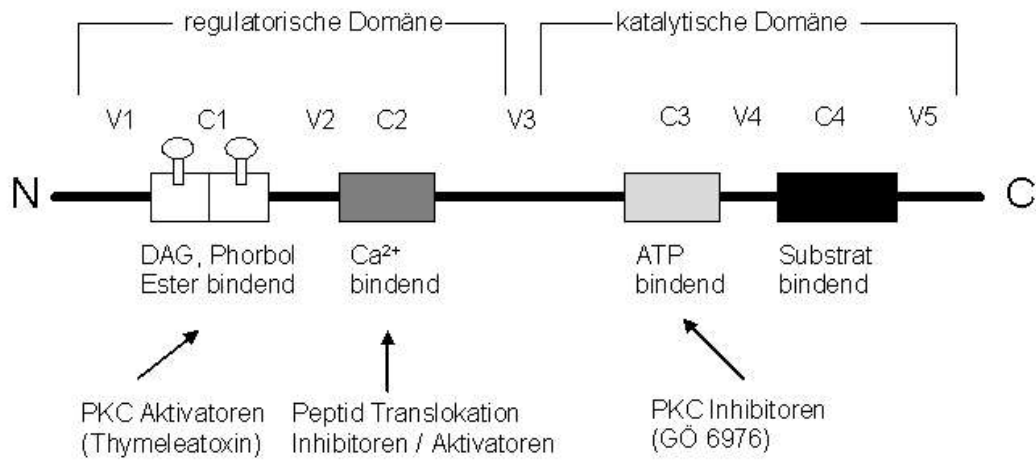
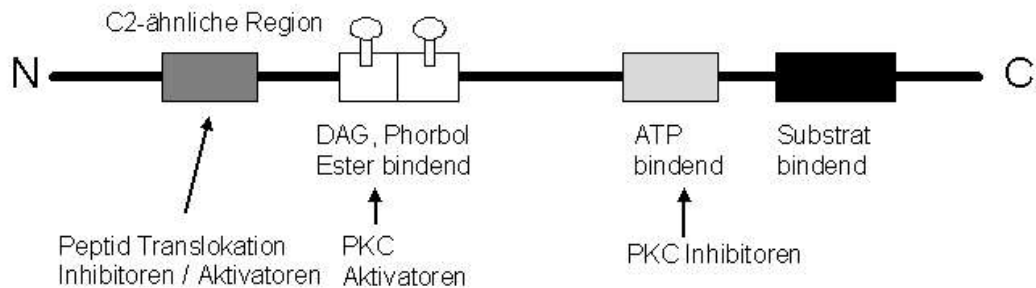
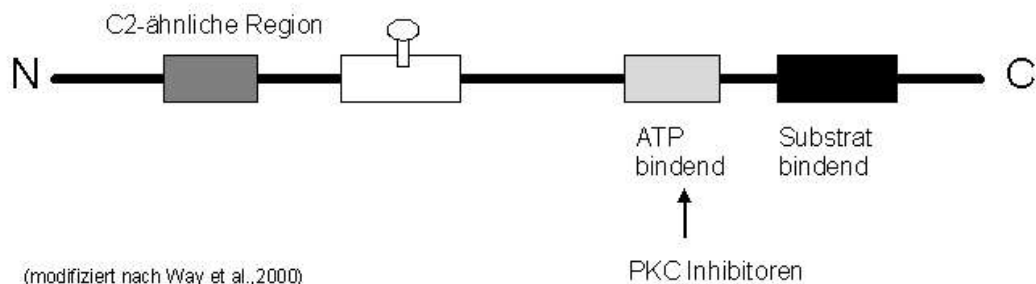
Viele Studien belegen, daß gesteigerte synaptische Aktivität die Struktur bestehender synaptischer Kontakte im adulten Gehirn beeinflusst. Aktivitätsabhängig kann z.B. die Anzahl von Synapsen kurzfristig Änderungen unterliegen (Knott et al., 2002). Gut untersucht sind strukturelle Veränderungen von dendritischen Dornen (Spines) nach Reizung in-vivo und in-vitro (Yuste und Bonhoeffer, 2001).

Ein Nachteil vieler Untersuchungen zur Plastizität von dendritischen Spines ist die geringe Größe der beteiligten Prä- und Postsynapsen (ca. 3-5 µm im Durchmesser), und die Schwierigkeit der gezielten experimentellen Manipulation gleicher Strukturen innerhalb eines komplexen neuronalen Schaltkreises. Aus diesem Grunde wurden in den letzten Jahren gezielt große synaptische Komplexe herangezogen, an denen Untersuchungen zur Physiologie der Signalübertragung mit Untersuchungen zur Morphologie dieser synaptischen Kontakte verknüpft wurden. Ein Modell einer großen phasischen Synapse bzw. eines synaptischen Komplexes sind die „Calyx of Held Synapsen“ im Hirnstamm, an denen u.a. Mechanismen der Vesikeldynamik wie auch morphologische Veränderungen an Synapsen nach erhöhter elektrischer Stimulation untersucht worden sind (Ryugo et al., 1996; Sakaba und Neher, 2001).

Ein Modell zur Untersuchung von Mechanismen der Vesikeldynamik und Signalübertragung in tonischen Synapsen sind Bipolarzellen mit großen Axonterminalen (Durchmesser: 10-15µm) aus der Goldfischnetzhaute. Die Vorteile von Bipolarzellen mit großen Axonterminalen als Modellsystem bestehen einerseits in der leichten präparatorischen Zugänglichkeit der Netzhaut; andererseits ist die Wirbeltiernetzhaute schichtenartig gegliedert, deren struktureller Aufbau gut verstanden ist (Dowling, 1987).

1.2 Proteinkinase C

Um die Rolle von Proteinkinase C (PKC) bei der Modulation neuronaler Kommunikation zu verstehen und die große Anzahl an Beispielen der Beteiligung dieses Enzyms an synaptischer Plastizität zu überblicken, ist es

A) cPKC ($\alpha, \beta I, \beta II, \gamma$)B) nPKC ($\delta, \epsilon, \eta, \theta$)C) aPKC (ξ, i, λ)

(modifiziert nach Way et al., 2000)

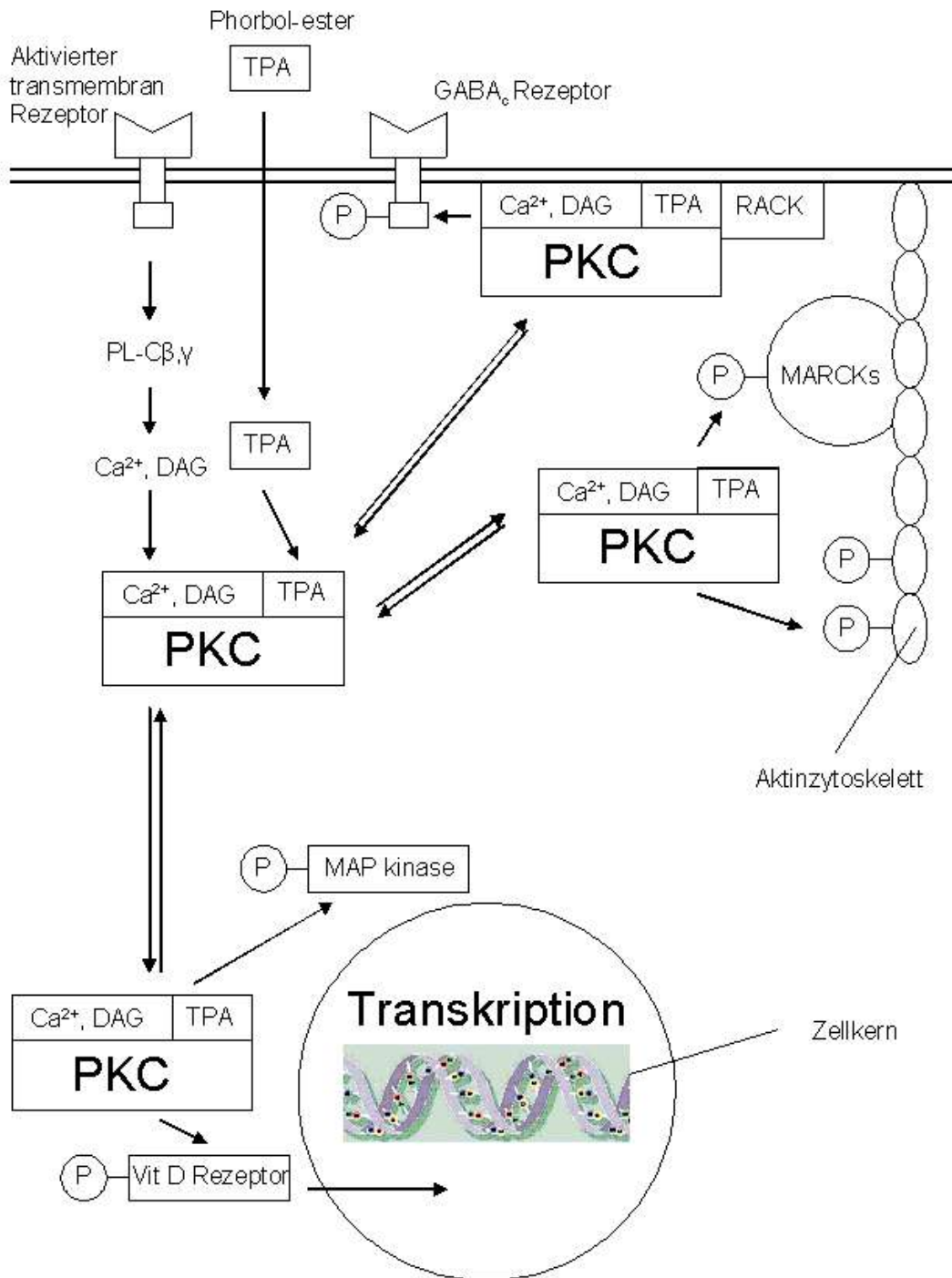
Abb. 1. Schematische Darstellung der Sequenzhomologien von PKC Isoformen. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz werden drei Gruppen von PKC-Isoformen unterschieden: (a) klassische (konventionelle), (b) neue und (c) atypische. Die Sequenz besteht aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne. Die konventionellen cPKC Isoformen unterteilen sich weiter in vier hochkonservierte Regionen C1-C4 und variable Abschnitten V1-V5. Die C1 Region funktioniert als DAG-, Phorbol esterbindungsstelle, wohingegen die C2 Region für Ca^{2+} Bindung verantwortlich ist. Die Regionen C3 und C4 binden ATP und PKC spezifische Substrate. Die neuen nPKC Isoformen und atypischen aPKC Isoformen besitzen keinen Bindungsstelle für Ca^{2+} , daher ist deren Aktivierung von Ca^{2+} unabhängig.

notwendig, kurz einige allgemeine Ausführungen zu PKC vorwegzunehmen, um sodann die Struktur dieses Enzyms knapp zu umreißen.

PKC ist eine Serin/Threonin spezifische Kinase, zu deren Aktivierung Ca^{2+} , Diacylglycerol (DAG) und Phospholipide, wie z.B: Phosphatidylcholin notwendig sind. Abhängig von Aminosäuresequenz, Stimulation und Regulation werden zur Zeit 12 Isoformen im Säuger unterschieden, von denen man annimmt, daß sie spezifische Funktionen im Organismus erfüllen (Hug und Sarre, 1993; Dekker und Parker, 1994; Gomperts et al., 2003). Die zwischen 68-83kDa schweren Isoformen werden aufgrund der unterschiedlichen Substrate der Aktivationsdomänen in drei Gruppen eingeteilt: klassische, atypische und neue PKC Isoformen (Way et al., 2000). In der Abb.1 sind die Proteinstrukturen und Aktivatoren der PKC Isoformen im Detail vorgestellt.

1.3 Die Aktivierung und Regulation von PKC

Die Signalkaskade zur Aktivierung von PKC kann durch Stimulation eines metabotropen Rezeptors initiiert werden, dessen Gq Protein, Phospholipase β (PLC β) aktiviert und membranständig DAG entstehen läßt. Andererseits kann ein Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität PLC β aktivieren. Bei Aktivierung erfährt PKC eine Konformationsänderung, welche das aktive Zentrum freilegt und die Membranassoziation des Enzyms fördert. PKC steht im Gleichgewicht zwischen membrangebundener und zytosolischer Form (Dorn und Mochly-Rosen, 2002). Sowohl natürliche Aktivatoren (DAG, Ca^{2+} und Phospholipide), als auch PKC-aktivierende Pharmaka (Thymeleatoxin und Phorbolster) verschieben das Gleichgewicht in Richtung der Membranassoziation. Pharmakologische Hemmung von PKC durch Inhibitoren wie GÖ6976 und HBDDE begünstigen dagegen die zytosolische Lokalisation des Enzyms. Neben der Translokation an die Zellmembran, verlagert sich aktivierte PKC auch in Richtung des Zellkerns, um dort modulierend auf Transkriptionsfaktoren einzuwirken (Abb.2).



(modifiziert nach Gerhard Krauss, 2001)

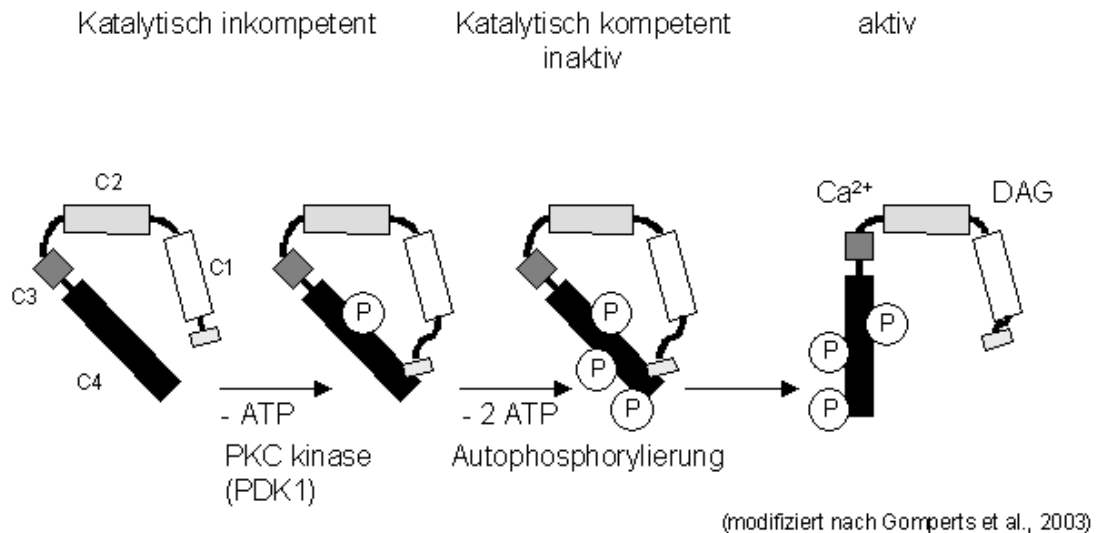
Abb. 2. Schematische Darstellung von Funktion und Regulation von PKC. Rezeptorkontrollierte Signalwege führen zur Bildung bzw. Freisetzung der intrazellulären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Ca²⁺, die wie Phorbol-ester (TPA) zur Aktivierung von PKC führen. Die Translokation an die Zellmembran ist mit einer Aktivierung von PKC verbunden. Substrate für PKC sind MARCKs (myristolated alanine rich C kinase substrat)-Proteine und andere mit dem Zytoskelett assoziierte Proteine. Man beachte auch nukleäre Signalwege, die z.B. über Steroidhormonrezeptoren (Vitamin D Rezeptor) und die MAP-Kinase (mitoseabhängige Kinase) vermittelt werden.

PKC wird durch Phosphorylierung reguliert. Neueste Untersuchungen legen nahe, daß PKC phosphoryliert wird, um aktivierbar zu sein für die second messenger Diacylglycerol (DAG), Ca^{2+} und Phospholipide. Zwei von drei Phosphorylierungsorten werden autophosphoryliert (Kraus, 2000; Keranen et al., 1995), wobei am dritten Ort möglicherweise die Phosphoinosid 3-Kinase bzw. eine Proteinkinase C Kinase angreift (Le Good et al., 1998; Gomperts et al., 2003). Die Phosphorylierungsorte im Molekül von PKC alpha sind die Aminosäuren Threonin 497 (Aktivierungsdomäne), Threonin 638 (C-Terminus 1) und Serin 657 (C-Terminus 2) – die genauen Sequenzen sind aus Abb.2.1. zu entnehmen.

PKC wird als inaktives nichtphosphoryliertes Vorläuferprotein synthetisiert. Das aktive Zentrum des Enzyms ist in diesem Zustand nur für Adenosintriphosphat (ATP) zugänglich. Das katalytisch inkompetente Enzym wird durch eine PKC Kinase phosphoryliert, und erhält dadurch seine katalytische Kompetenz. Es entsteht ein katalytisch kompetentes, aber inaktives Enzym. Die folgenden beiden Autophosphorylierungsschritte führen dazu, daß die Pseudosubstratdomäne das katalytische Zentrum freilegt und PKC somit aktivierbar wird für DAG, Ca^{2+} und Phospholipide (Gomperts et al., 2003). Die dargestellten Aktivierungsschritte gelten für die klassischen PKC Isoformen (cPKC α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ), bei den neuen (nPKC δ , ϵ , η , θ) und atypischen PKC Isoformen (aPKC λ , ι , ξ , μ) fehlen Phosphorylierungsorte.

1.4 Funktion von PKC

Es gibt eine Vielzahl von Proteinen, die PKC an spezifischen subzellulären Lokalisationen binden (siehe Tabelle 1). Die STICK Proteine (substrates that interact with C-kinase) verbinden das Aktinzytoskelett mit der Plasmamembran. In dieser Substratklasse finden sich auch die MARCK Proteine (myristoylated, alanin-rich C-kinase substrate), die eine Schlüsselstellung bei der Dynamik und Organisation der Aktinfilamente und somit bei einer Vielzahl morphologischer Veränderungen auf zellulärer Ebene übernehmen (Hartwig et al., 1992; Aderem, 1995; Chang et al., 1996).



Phosphorylierungsorte bei PKC alpha

Inaktivierungsdomäne	GVTTR T FCGTPDYIAPE	T497
C-Terminus	RGQPVL T PPDQLVI	T638
C-Terminus	QSDFEFG S YVNPQ	S657

Abb.2.1 Die Aktivierung von PKC alpha verläuft in vier Schritten. Die katalytisch inkompetente Vorläuferform wird durch eine Kinase (PKC kinase PDK1) phosphoryliert. Es entsteht eine katalytisch kompetente aber inaktive Form von PKC, durch Autophosphorylierung wird das Pseudosubstrat aus dem katalytischen Zentrum entfernt und PKC ist aktivierbar durch Ca²⁺ und DAG. Im unteren Teil des Bildes sind die Proteinsequenzen von PKC und die entsprechenden Phosphorylierungsorte dargestellt.

Neben den STICK Proteinen gibt es noch die Gruppen der RACKs (receptors for activated protein kinase C) und PICKs (proteins interacting with C-kinase). Diese beiden Proteinklassen stellen keine Substrate dar, sondern sind vielmehr Ankerproteine, die die korrekte Lokalisation von PKC in verschiedenen subzellulären Kompartimenten vermitteln. Dadurch wird einerseits eine optimale Aktivierung erreicht und andererseits wird PKC in engen Kontakt mit Substratproteinen gebracht. Die Gruppe der Substratproteine und regulierter zellulärer Vorgänge ist somit sehr heterogen und reicht von der Regulation transmembraner Rezeptoren (z.B. AMPA-, GABA_c Rezeptor) bis zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. VitaminD Rezeptor) sowie Modulation weiterer Kinasen, beispielsweise der MAP Kinase (Abb.2).

Tabelle 1

<u>Substrat- / Ankerprotein</u>	<u>Zelluläre Lokalisation</u>	<u>Funktion</u>
STICKs		
Vinculin/Talin	Zellkontakte	Adhäsion an die extrazelluläre Matrix
Annexin I und II	-	-
MARCKS	Vesikel, Plasmamembran	Vesikeldynamik, Sekretion
Desmoyokin, AHNAK	Desmosomen, Nucleus	Zell / Zellkontakte
α Adducin	Kortikales Zytoskelett	Zellpolarität
γ Adducin	Kortikales Zytoskelett	Aktin / Spektrin Interaktion
STICK72 und Gravin	Plasmamembran	
STICK32	Zytoskelett	
GAP43 (B-50)	Dendriten	Dendritenwachstum, Neurotransmitterfreisetzung
P47 ^{phox}	Zytoplasma der Neutrophilen	Aktivierung der NADPH Oxidase
AKAP79	Synapsen	Neurotransmitterfreisetzung
PAR-3	ZNS	Zellpolarität
PICKs		
InaD (Drosophila)	Photorezeptor	Koppelt PKC an PLC
ASIP	Tight junctions	
PICK I	Perinukleär	
RACKs		
RACK I (PKC β)	Interleukin-5 Rezeptor	
β – COP (PKC ϵ)	Golgiapparat	Proteinsekretion

Tabelle 1: PKC bindende Proteine (modifiziert nach Jaken und Parker, 2000).

1.5 PKC und synaptische Kommunikation

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß von Hell- und Dunkeladaptation auf die subzelluläre Lokalisation von Proteinkinase C in Axonterminalen von Bipolarzellen untersucht werden. Um die Aufgaben von PKC bei der neuronalen Kommunikation zu verstehen, ist es sinnvoll die Rolle von PKC in der Präsynapse von den Aufgaben in der Postsynapse zu unterscheiden.

Aktuelle Untersuchungen deuten daraufhin, daß das Ausmaß der PKC-abhängigen Substratphosphorylierung maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung von LTP und Langzeitdepression (LTD) in hippokampalen Synapsen beteiligt sind. Wichtige präsynaptische Substratproteine sind hierbei GAP-43 (growth associated protein 43), SNAP-25 (synaptosomal associated protein 25) und VAMP (vesicle associated protein), die mit Axonsprossung und Modulation der Vesikeldynamik in Verbindung gebracht werden (Pasinelli et al., 1995). Auf der postsynaptischen Seite phosphoryliert PKC in der CA1 Region des Hippokampus Neurogranin, ein Protein, das in dendritischen Spines zu finden ist (Geert et al., 2000).

Unser Modell eines synaptischen Komplexes ist die Bipolarzellterminale (BCT), die sowohl Prä- als auch Postsynapse ist. In der BCT finden sich synaptische Ribbons, die strukturelle Elemente einer „unkonventionellen“ chemischen Synapse sind (Wagner, 1997; Lenzi und von Gersdorff, 2001). Die Annahme, daß synaptische Ribbons eine strukturelle Anpassung an hohe Vesikelumsatzraten in sensorischen Organen darstellen, wird einerseits durch elektronenmikroskopische Befunde gestützt, die zahlreiche Vesikel an der Ribbonoberfläche zeigen, andererseits ist kürzlich das Motorprotein Kinesin an Ribbons nachgewiesen worden, das Vesikelbewegungen ermöglicht (siehe hierzu: Innenohr (Roberts et al., 1990); Corpus pineale (Swetlitschkin und Vollrath, 1988)). Die synaptischen Ribbons sind die charakteristischen strukturellen Kennzeichen der Präsynapsen in den Bipolarterminalen. Andererseits ist die Bipolarterminale auch Postsynapse, da sie von sehr vielen Amakrinzellboutons GABAerge und peptiderge Eingänge erhält (Marc, 1999).

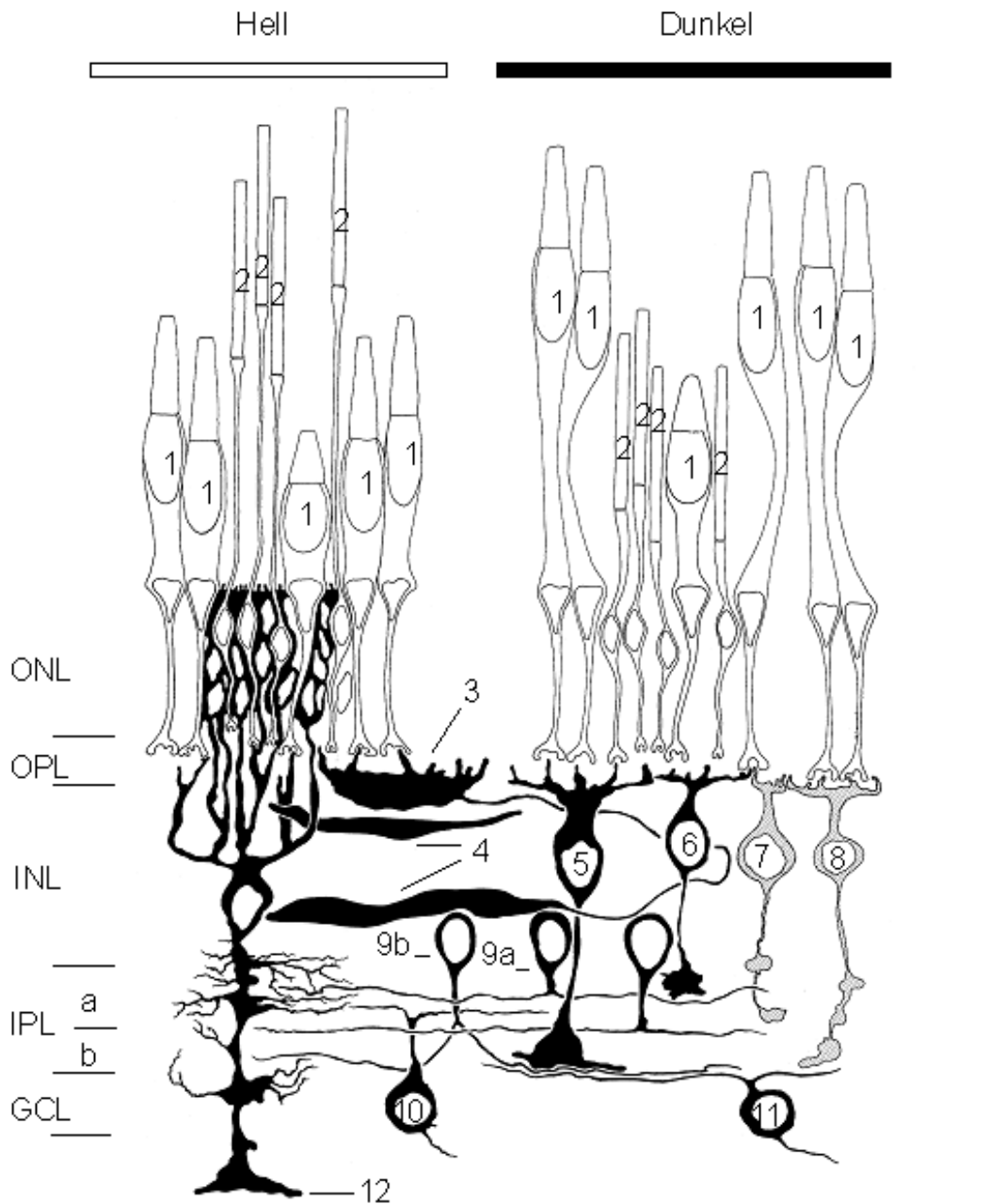
In der Goldfischnetzhaut bildet die Ribbonsynapse mit einem lateral anliegenden Dendriten einer Ganglienzelle, und einem Amakrinzellfortsatz eine sog. Dyade. In dieser Dyade übernimmt die Amakrinzelle sowohl präsynaptische als auch postsynaptische Funktion. Die Verschaltung und Schichtengliederung der Netzhaut wird exemplarisch anhand der Abb. 3 veranschaulicht (Zur Übersicht hierzu: Marc, 1999; Masland, 2001).

Elektrophysiologische Befunde und Untersuchungen mit dem Aktivitätsfarbstoff FM 1-43 deuten daraufhin, daß PKC die Transmitterfreisetzung in Bipolarzellen moduliert (Minami et al., 1998). Eine Aktivierung von PKC begünstigt die langsame Komponente der Transmitterfreisetzung an der Präsynapse der Bipolarzelle (Berglund et al., 2002). Unklar bleibt bisher, ob dieser Effekt durch eine Vergrößerung des sofort verfügbaren Vesikelpools oder auf eine Zunahme der Fusionswahrscheinlichkeit der Vesikel zurückzuführen ist (Minami et al., 1998; von Gersdorff und Matthews, 1999).

Auf der Ebene der Rezeptoren greift PKC durch Phosphorylierung zytoplasmatischer Domänen in die synaptischen Kommunikation ein. Beispielsweise wird in Bipolarzellterminalen der GABA_c Rezeptor moduliert und damit der GABAerge Chlorideinstrom durch PKC reguliert (Feigenspan und Bormann, 1994).

1.6 PKC immunoreaktive Bipolarzellen

Seit einigen Jahren werden Antikörper gegen PKC dazu verwendet, um Bipolarzellen in der Wirbeltiernetzhaut immunhistochemisch zu markieren (Negishi et al., 1988; Boycott und Wässle, 1999; Caminos et al., 2000). In der Säugetiernetzhaut färben Antikörper gegen PKC selektiv Stäbchenbipolarzellen (Wässle et al., 1991; Behrens et al., 1998). In der Cyprinidennetzhaut lassen sich mit Antikörper gegen die alpha- und beta-Isoform von PKC zwei Populationen von Bipolarzellen anfärben: zum einen eine Population von



- | | | |
|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 Zapfen | 6 Ma-Bipolarzelle | 10 OFF-Ganglienzelle |
| 2 Stäbchen | 7 OFF-Zapfenbipolarzelle | 11 ON-Ganglienzelle |
| 3 Horizontazelle | 8 ON-Zapfenbipolarzelle | 12 Müllerzelle mit Endfuß |
| 4 Horizontazellaxonterminalen | 9a OFF-Amakrinzelle | |
| 5 Mb-Bipolarzelle | 9b ON-Amakrinzelle | |

Abb. 3. Schematische Zeichnung der Goldfischnetzhautebene (modifiziert nach Marc, 1999). Man beachte die Retinomotorik der Photorezeptoren (im Hellen sind die Zapfenmyoide „kontrahiert“ und die Stäbchenmyoide „verlängert“; im Dunkeln verhält es sich umgekehrt). Abkürzungen: ONL (Outer Nuclear Layer); OPL (Outer Plexiform Layer); INL (Inner Nuclear Layer); IPL (Inner Plexiform Layer) mit Sublamina a (OFF-Schicht) und Sublamina b (ON-Schicht); GCL (Ganglion Cell Layer).

Stäbchen-dominierten Bipolarzellen, die auch synaptische Eingänge von Zapfen erhalten und deren große Axonendigung in die Sublamina b der inneren plexiformen Schicht (IPL) hineinzieht (Ishida et al., 1980; Negishi et al., 1988); diese Population wird im weiteren als Mb-Bipolarzellen (Mb-BCs) bezeichnet. Zum anderen markieren PKC Antikörper in der Goldfisch- und Zebrafischnetzhaute eine Population von Zapfenbipolarzellen (Suzuki und Kaneko, 1990; Yazulla und Studholme, 2001) (siehe hierzu Abb. 25 im Ergebnisteil).

Axonterminalen von PKC-immunoreaktiven (PKC-ir) Mb Bipolarzellen haben im Hellen eine andere Morphologie als im Dunkeln. Adaptationabhängige morphologische Veränderungen betreffen einerseits die Gestalt der Axonterminalen (eher rundliche und glatte Kontur im Hellen, bzw. eine eher „amöboide“ und unregelmäßigere Kontur im Dunkeln) und zum anderen das Vorhandensein von fingerförmigen Evaginationen (Spinules) in Amakrinzellfortsätze, die im Dunkeln zahlreicher sind (Yazulla und Studhome, 1992; Behrens und Wagner, 1996).

Die Verteilung von PKC Immunoreaktivität (PKC-IR) in den Mb-BCs wird durch Hell und Dunkel beeinflusst. In dunkeladaptierten Mb-BCTs akkumuliert das PKC Signal im submembranösen (membranassoziierten) Kompartiment, besonders im Axon und in der BCT, während in helladaptierten Terminalen die Immunoreaktivität im Zytoplasma der Terminalen und des Perikaryons dominiert. Diese Unterschiede in der subzellulären Verteilung von PKC werden als lichtmikroskopische Korrelate einer Translokation von PKC aufgefasst, die auch zu morphologischen Veränderungen in Beziehung gebracht werden (Vaquero et al., 1996; Vaquero et al., 1997).

Jede Formveränderung ist mit einem Umbau des Zytoskeletts verbunden. Besonders an Aktinfilamenten konnte der Einfluß von PKC auf die Kondensation monomeren Aktins zu polymerem F-Aktin gezeigt werden (Job und Lagnado, 1998). Ob MARCKs Proteine, wie in anderen Zellen gezeigt

(Chang et al., 1996), in der Bipolarzelle eine vergleichbare Funktion als PKC Substrate ausüben, die maßgeblich an der Organisation der Aktinfilamente beteiligt sind, ist noch nicht bekannt.

1.7 Fragestellung :

Vor dem Hintergrund der aktuellen Befunde zur Rolle von PKC in Synapsen und insbesondere in Bipolarzellterminalen ist ersichtlich, daß bisher wenig Daten zu grundlegenden Beobachtungen, wie der Translokation und differentiellen subzellulären Verteilung von PKC im Modellsystem der Bipolarzellterminale oder zur Rolle einzelner PKC Isoformen bei adaptionsabhängigen strukturellen Veränderungen der Synapse, vorliegen. Weiterhin unklar ist auch die Rolle einzelner PKC Isoformen bei der Vesikeldynamik in Bipolarzellen, weil in bisherigen Untersuchungen Isoformen unspezifisch manipuliert wurden.

Ziel dieser Arbeit soll sein :

1. Vor dem Hintergrund, daß synapsenassoziierte Proteine wie Gephyrin und der PKC regulierte GABA_c Rezeptor differentiell verteilt sind, soll die Verteilung der PKC-Immunoreaktivität (PKC-IR) und der Einfluß der Hell/Dunkeladaptation auf die PKC-IR in der proximalen und distalen Hälfte der BCT untersucht werden. Neben PKC-IR soll auch die Dynamik von aktivierter pPKC immunhistochemisch verfolgt werden (pPKC steht für phosphorylierte und damit aktivierte PKC).

2. Bei der Beobachtung der Translokation aktivierter PKC stellt sich die Frage nach auslösenden Stimuli im betrachteten Modellsystem. Beantwortet werden soll, ob die Translokation von pPKC exogen lichtabhängig ist, oder ob endogene zirkadiane Rhythmen hierfür verantwortlich sind.

3. Als methodologische Kontrolle der immunhistochemischen Untersuchungen sollen biochemische Methoden dienen. Translokationsvorgänge sollen mit Hilfe

differentieller Ultrazentrifugation und Western Blot Analyse nachvollzogen werden. Gleichzeitig sollen in der Goldfischretina mRNA Transkripte für PKC alpha mittels RT-PCR nachgewiesen werden und die adaptionsabhängige Expression von PKC alpha untersucht werden.

4. In neuster Literatur wird der Einfluß von PKC auf die Vesikeldynamik beschrieben. Hier soll mit Hilfe des Aktivitätsfarbstoffes FM 1-43 und des isoformspezifischen Inhibitors GÖ6976 der Einfluß von PKC alpha auf die Aktivitätsmarkierungen mit FM1-43 in Slicepräparaten untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

cPKC α (C-20) Antikörper (sc-200)	Santa Cruz
p-cPKC α (Ser 657) Antikörper (sc-12356)	Santa Cruz
Anti rabbit Alexa488	Molecular Probes
GÖ6976	Calbiochem
FM 1-43	Molecular Probes
Protein Kinase C alpha, Human, Recombinant	Calbiochem

Alle Reagenzien für die PCR wurden von der Firma Quiagen bezogen. Die Primer für die RT-PCR wurden von der Firma Invitrogen hergestellt.

Sonstige im Folgenden erwähnten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen, Biotrend, Fluka, Merck, Miles, Serva, und Sigma erworben.

2.2 Versuchstiere und Präparation

Ausgewachsene Goldfische (*Carassius auratus*), mit einer Länge von 10-15 cm wurden in Aquarien bei 20 °C Wassertemperatur gehalten. Der Beleuchtungszyklus war mit 12/12h Hell-Dunkel festgelegt. Die Präparation von helladaptierten Tieren erfolgte bei normalen Tages- bzw. Raumlicht, wohingegen dunkeladaptierte Tiere in der Mitte des Dunkelzyklus (22-24 Uhr) getötet und unter Infrarotlicht bei Verwendung eines Nachtsichtgerätes (AEG) präpariert wurden. Die Augen wurden mit einer feinen Schere aus der Orbita herausgelöst und mit einer Rasierklinge halbiert.

2.3 Lichtmikroskopische Immunhistochemie

Die halbierten Augenbecher wurden für 60min in 4% Paraformaldehyd, 0.1M Natriumphosphatpuffer (PB pH 7.4) fixiert, um dann für 3 x 5 min in 0.1M PBS (pH 7.4) gespült zu werden. Die Kryoprotektion erfolgte in einer aufsteigenden Sukrosereihe mit 10%-, 20%- und 30%iger Lösung in phosphatgepufferter Saline (PBS), wobei die Präparate in den ersten beiden Schritten jeweils 60min

in der Sukroselösung belassen wurden. Die Infiltration in 30%iger Sukrose in PBS erfolgte über Nacht.

Am folgenden Tag wurden die gewonnenen Präparate bei -20°C schockgefroren und mit Tissue Tek[®] im Gefriermikrotom ausgerichtet. Es wurden 16 μm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Die Gefrierschnitte wurden auf mit 0.5% Gelatine und 0.5% Kaliumchromat beschichtete Objektträger überführt und mit einem Fettstift umrandet. Anschließend wurden die Schnitte jeweils 3 x 5 min mit PBS (pH 7.4) gespült. Danach wurden die Schnitte mit einer Präinkubationslösung versetzt (4% Ziegenserum (NGS), 1% Rinderserumalbumin (BSA), 0.1% Triton X-100 in PBS); die Präparate wurden für 30 min bei Raumtemperatur (RT) in dieser Lösung belassen. Der Erstantikörper (Kaninchen alpha pPKC (Ser657) oder Kaninchen alpha PKC) wurde anschließend (1:200) mit halbkonzentrierter Präinkubationslösung verdünnt und auf die Objektträger aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C . Der Zweitantikörper (Ziege Anti Kaninchen Alexa488) wurde am folgenden Tag nach 3 x 5 min Spülung der Präparate mit PBS (pH 7.4) in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen. Nach 2 h wurden die Objektträger erneut 3 x 5 min mit PBS (pH 7.4) gespült und mit Fluorosave[®] eingedeckelt.

Die Gefrierschnitte hell- und dunkeladaptierter Netzhäute wurden immer auf einem Objektträger gemeinsam inkubiert, um gleiche Inkubationsbedingungen herzustellen.

2.4 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Jeder lichtmikroskopische Strahlengang hat eine endliche Tiefenschärfe. Nicht nur Licht aus der Brennebene des Objektivs, sondern auch Licht aus den Bereichen außerhalb der Brennebene geht beim konventionellen Lichtmikroskop in die Bildinformation ein. Bei der Untersuchung der Translokationsvorgänge von PKC in der Bipolarzelle ist es jedoch notwendig Bilder auszuwerten, die keine Überlagerung mit Licht aus Bereichen oberhalb und unterhalb der Fokusebene enthalten. Beim konfokalen Mikroskop wird das Licht, das nicht aus der Brennebene kommt, ausgeblendet und man erhält

sodann nur Bildinformation aus der Fokusebene (Pawley 1995; Matsumoto 2002).

Die in dieser Arbeit ausgewerteten Serien „optischer Schnitte“ wurden mit Hilfe des LSM Zeiss 410 aquiriert. Alle Serien wurden ohne zwischenzeitliches Ausschalten und erneutes Einschalten des 488 nm Ar-Lasers durchgeführt, um Aufwärmefekte des Laser zu vermeiden. Die Scanbedingungen während einer Sitzung waren konstant, um eine Vergleichbarkeit der Untersuchung PKC-immunoreaktiver hell- und dunkeladaptierter Gefrierschnitte zu ermöglichen.

Für die Gewinnung der optischen Schnitte wurde ein 63x Wasserimmersionsobjektiv ausgewählt. Der Bandpassfilter LP 505 und ein „FITC“-Filterblock wurden verwendet, um die FITC bzw. Alexa488 Fluoreszenz zu untersuchen. Der Argonlaser (Argonlaserlinie 488nm) wurde 100-fach abgeschwächt; das Pinhole wurde auf einen Wert von 20 eingestellt. Übersichtsaufnahmen wurden mit einem elektronischen Zoom von 1.5 - 2 gewonnen, während bei hochvergrößerten Serien ein elektronischer Zoom von 8 gewählt wurde. Die Dicke der optischen Schnitte betrug 0.7 µm. Es wurde darauf geachtet, daß nur Terminalen gescannt wurden, die dicht unter der Oberfläche es Gefrierschnittes lagen (5 - 10µm unter der Oberfläche), um möglichen Penetrationsproblemen der Antikörper in den Schnitten zu begegnen.

2.5 Semiquantitative Bestimmung der PKC-IR und pPKC-IR in Mb Terminalen

Es war notwendig einige Rahmenbedingungen einzuhalten, um standardisierte Aussagen über Veränderungen der Immunfluoreszenzmarkierungen machen zu können. Zum einen mußte die Konzentration der verwendeten Primärantikörper so gewählt werden, daß Veränderungen in der Antikörperkonzentration sich auch als Veränderungen auf der Ebene des Fluoreszenzsignals verfolgen ließen. Auch mußte man „Sättigungseffekte“ der Primärantikörper vermeiden. Diese Zusammenhänge wurden in Vorversuchen untersucht (Daten nicht gezeigt).

ROI Größe 20x20 Pixel
(Fläche 0,95 μm^2)

Zytosol
 Membran

Scion Image 
(Analyse/Measure)

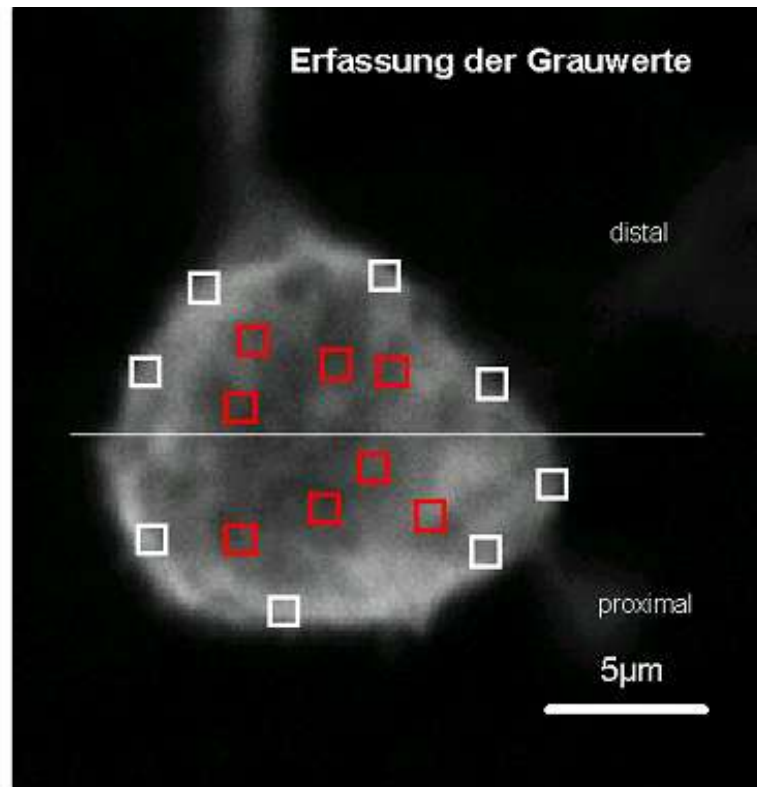


Abb. 4. Anhand der aufgeführten Abbildung soll die Erfassung der Grauwerte an einem optischen Schnitt einer Mb Terminale erläutert werden. Die Terminale wurde zusätzlich in einen proximalen und distalen Abschnitt eingeteilt. Die Grauwertmessung erfolgte mit Hilfe definierter ROI (region of interest) von jeweils $0.95\mu\text{m}^2$ an der Membran (Membran-assoziiertes Kompartiment) und im Zytosol (zytosolisches Kompartiment) (weitere Einzelheiten: siehe Text). Die ROI wurden zufallsmäßig über das membran- und das zytosolische Kompartiment plziert. Die Erfassung der Grauwerte wurde mit dem Programm Scion Image vorgenommen. Das Programm SigmaStat 2.03 wurde für statistische Berechnungen herangezogen.

Um semiquantitative Veränderungen der PKC-IR und pPKC-IR an hell- und dunkeladaptierten Bipolatzellterminalen bestimmen zu können, wurde darauf geachtet, daß die gleichen Scan-Einstellungen zur Anwendung kamen. Die Scan Parameter wurden dabei für die PKC alpha markierten Präparate optimiert. Diese Parameter wurden dann, um eine direkte Vergleichbarkeit herstellen zu können, auch auf die pPKC alpha markierten Netzhautschnitte angewandt – unter der Inkaufnahme einer schlechteren Abbildungsqualität.

Für die Bestimmung der Grauwerte bzw. der Pixelintensitäten wurde das Programm Scion Image for Windows[®] verwendet. Aus einem Bildstapel durch eine Terminale wurde ein mittleres Bild invertiert [Edit / Invert]. Standardisiert wurde ein ROI von 20x20 Pixel ($0.95\mu\text{m}^2$) ausgewählt, in dessen Fläche der

durchschnittliche Grauwert gemessen wurde [Analyse / Measure]. Es wurden vier Grauwerte für die proximale und distale Membran bestimmt. In gleicher Weise war das Vorgehen bei der Messung der zytosolischen Werte (Abb. 4).

In der Schicht der Photorezeptornuclei und Innensegmente, die keine PKC Immunoreaktivität zeigen, wurde der Hintergrundgrauwert bestimmt. Dieser Hintergrundgrauwert wurde von allen Meßergebnissen sodann subtrahiert (Gabriel et al., 2001). Aus den gewonnen Einzelwerten wurde ein Durchschnittswert, sowohl für den membranständigen Auswertungsraum, als auch für den zytosolischen Auswertungsraum bestimmt. Zur Bestimmung der Durchschnittswerte, Standardabweichungen und Signifikanztests wurde die statistischer Software SigmaStat 2.03 verwendet. Als statistischer Test wurde der students t-Test durchgeführt. Für den Fall, daß der Normalitätstest (nach Kolmogorov-Smirnov) oder der Varianztest (nach Fischer) negativ ausfielen, und ein t-Test nicht mehr zulässig wurde, ist ein Mann-Whitney Test durchgeführt worden.

Es ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, daß der membranständige Auswertungsraum nicht mit dem biologischen Kompartiment der Membran identisch ist, weil im Präparat und im Kombinationsbild aus Durchlicht- und Fluoreszenzbild, die Zellgrenzen nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden können. Ausgewertet wurde vielmehr eine saumförmige, randständige Region mit Hilfe definierter Meßquadrate (20x20 Pixel, 0.95 μm^2), die das biologische Kompartiment der Membran miteinschlossen.

Der pPKC alpha Antikörper erkennt PKC alpha, die an der Aminosäure Serin 657 phosphoryliert wurde. Aus der Sequenz der PKC alpha Aktivierung (Kap. 1.3) läßt sich dann ableiten, daß pPKC Antikörper einerseits aktive PKC erkennt, aber auch katalytisch kompetente und inaktive Enzyme markiert.

Wenn im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Begriffe „aktivierte PKC“ oder „pPKC“ verwendet werden, beschreiben diese Begriffe die Summe aus der einerseits aktiven PKC, und der andererseits inaktiven, aber katalytisch kompetenten PKC.

2.6 In-vitro Versuche mit dem PKC alpha Inhibitor GÖ6976

Zur Untersuchung der Frage, ob die PKC Aktivität Einfluß auf die subzelluläre Verteilung des Enzyms hat, wurden pharmakologische in-vitro Versuche in drei Ansätze durchgeführt.

1. Isolierte dunkeladaptierte Netzhäute wurden unter der Beleuchtung der Laborbank für 30min in-vitro helladaptiert.
2. Isolierte dunkeladaptierte Netzhäute wurden für 30min im Dunkeln in-vitro belassen.
3. Isolierte dunkeladaptierte Netzhäute wurden für 30min in Fischringer in-vitro inkubiert, der mit dem PKC alpha Inhibitor GÖ6976 2.3 nM (Calbiochem) versetzt war.

Für die Kurzzeitkulturen wurde ein Fischringer verwendet, wie er auch bei physiologischen Versuchen zur Anwendung kommt (Zenisek et al., 2000). Der Fischringer enthielt (in mM): 115 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 Glucose und 10 HEPES (pH wurde auf 7.4 titriert mit 1 N NaOH). Die Präparation der Netzhäute erfolgte im Dunkeln, unter Infrarotbeleuchtung, mit Hilfe eines Nachtsichtgerätes (AEG). Anschließend wurden die Netzhäute in 4% Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer (pH 7.4) fixiert. Die histologische Aufbereitung und Immunhistochemie für pPKC alpha wurde, wie bereits in Kap. 2.3 beschrieben, durchgeführt.

Die „optischen Schnitte“ der einzelnen Terminalen wurden aus der Mitte der Terminalen ausgewählt. Die Mikroskopieparameter für das LSM 510 Zeiss waren bei allen Ansätzen identisch. Die Erfassung der Grauwerte erfolgte wie in Kap. 2.5 beschrieben.

2.7 Differentielle Ultrazentrifugation und Gewebeaufbereitung für Western Blot.

Die gewonnenen Netzhäute werden in flüssigem Stickstoff (-80°C) sofort schockgefroren, um jegliche biochemische Reaktionen zu arretieren. Unter Zugabe von Homogenisationspuffer und Proteasehemmern (20mM Tris HCl (pH 7.5), 0.5 mM EGTA, 0.1 mM PMF, 140 mM Dithiothreitol) wird das Gewebe mit Hilfe eines Homogenisators unter Eiskühlung verarbeitet (10 Strokes, 25 Umdrehungen / Sek., Stufe2).

Das Homogenisat wird in 100µl Homogenisationspuffer aufgenommen und zentrifugiert (1500g, 8min, 4 ° C, Rotor TLA 100.4, Beckmann Optima TL), um Zelltrümmer im Pellet (P1) abzutrennen und zu verwerfen. Der Überstand (S1) wird der Ultrazentrifugation (Beckmann Optima TL) zugeführt (50 000 U/min, 100000 g , 30min, 4 Grad C, Rotor TLA 100.4) und man erhält den Überstand (S2) und das Pellet (P2). Mittels dieses differentiellen Ultrazentrifugationsprotokolls (modifiziert nach Osborne, 1991) erhält man ein Pellet, das Pellet2 (P2), in dem sich Membranfragmente befinden, während der Überstand2 (S2) die zytosolische Fraktion enthält. Mit der Membranfraktion und der zytosolischen Fraktion wird eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt, um gleiche Proteinmengen (25µg) in die folgende 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 10 µg (144 min bei 80mV, 15 min Nachlaufzeit).

Die Proteinbanden werden vor dem Abblotten in einigen Fällen mit einer Coomassie Brilliant Blue Färbung dargestellt. Das Blotting wird mit einer PVDF Membran (Immobilon-P von Millipore, Porengröße 0.45µm) über Nacht bei 30mV bei 4 °C auf einem Magnetrührer durchgeführt. Zur Anfärbung der

Blotmembran wird Ponceau S in 1% Essigsäure verwendet (Dauer ca. 4min). Vor der Immunmarkierung des Blots erfolgt 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 Erstantikörper alpha pPKC und alpha PKC, sowie der Zweitantikörper werden jeweils in einer Konzentration 1:1000 eingesetzt (verdünnt in TBS mit 0.1 Tween). Die Dauer der DAB Reaktion wurde kontrolliert und auf 120s festgesetzt. Nach Trocknung der Membran wurden die Blots eingescannt. Die Grauwertbestimmung bzw. die Bestimmung der Pixelintensitäten der markierten Spuren erfolgte mittels NIH Image /Scion und dem Gelplot2 Macro.

2.8 FM 1-43 Experimente

Helladaptierte isolierte Netzhäute wurden in ca. 150µm dicke Schnitte (Slice), mittels eines Gewebhackers (Sorvall, Newtown, CT, USA) geschnitten und dann mit dem Farbstoff FM 1-43 inkubiert (Mack und Fernald, 1991; Mack et al. 2000), um die Rolle von PKC alpha bei der Vesikeldynamik in Bipolarzellterminalen im intakten Zellverband untersuchen zu können. Der Styrylfarbstoff FM 1-43 baut sich in das äußere Blatt von Lipiddoppelmembranen ein, und wird durch Endozytose der Membran ins Zellinnere aufgenommen (Betz und Bewick 1993; Cochilla et al., 1999; Ryan 2001).

Die Slice-Präparate wurden bei moderatem Raumlicht für 40min mit Normal-Fisch-Ringer inkubiert (115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 CaCl₂, 2 mM HEPES, 10 mM Glucose bei pH 7.4). Anschließend wurde der FM 1-43 Farbstoff in Normal-Fisch-Ringer zu einer 5 µM Lösung verdünnt, mit welcher die Slice Präparate 5 min inkubiert wurden. Nach kurzem Spülen mit Fisch-Ringer (1 min) wurde die Untersuchung mit dem konfokalen Mikroskop vorgenommen. Im Falle einer Kaliumstimulation mit 50 mM Kalium-Fisch-Ringer (67.5 mM NaCl, 50 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2 mM HEPES, 10 mM Glucose bei pH 7.4) wurde ebenfalls 40 min mit Normal-Fisch-Ringer vorinkubiert, um den in Kaliumringer

gelösten Farbstoff 5 min einwirken zu lassen. PKC isoformspezifische Pharmaka wie GÖ6976 (Calbiochem) wurden der Normalringerinkubation zugegeben. Zu beachten war, daß das Pharmakon in einer Konzentration im isoformspezifischen Bereich für PKC alpha vorliegt (GÖ6976 IC₅₀ 2.3 nM; dazu Way et al., 2000).

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte mit dem LSM Zeiss 510 META (Argon Laser 488 nm, 63 Apochromat corr / w, Zoom 1, Laserabschwächung 0.1 und geeignete Filtersets). Aufgrund der ungleichmäßigen Penetration des Farbstoffs in das Gewebe und unspezifischen Anfärbungen an der Oberfläche des Schnittes wurden ausschließlich Terminalen zwischen 5 µm und 20 µm unter der Oberfläche gezählt. BCT waren dann als positiv gefärbt zu bewerten, wenn sie deutlich FM 1-43 aufgenommen und klar als BCT zu identifizieren waren (siehe hierzu Mack et al., 2000). Erfasst wurde sodann die Anzahl der Terminalen auf einer Bildbreite von 146µm.

In jedem experimentellen Durchgang wurden die Slice-Präparate nie länger als 3h in Normal-Fisch-Ringer Kultur gehalten.

2.9 Antikörper-Kontrollversuche

Bei allen Inkubationen mit den PKC alpha und pPKC alpha Antikörpern wurden Kontrollversuche durchgeführt, wobei der Erstantikörper mit dem jeweiligen „Blocking Peptide“ gesättigt worden ist. Ein Immunoblot mit rekombinanter PKC alpha wurde angefertigt, um Kreuzreaktionen zwischen dem pPKC alpha und PKC alpha Antikörpern ausschließen zu können. Das Ergebnis war eindeutig negativ und keine PKC Bande sichtbar.

2.10 Semiquantitative PCR zum Nachweis der PKC alpha Expression

Das Ziel ist die Amplifikation des PKC alpha Signals in Gewebeproben der Goldfischnetzhaute und der mögliche Nachweis eines Expressionsunterschiedes für PKC alpha in der hell- bzw. dunkeladaptierten Goldfischretina. Da keinerlei Sequenz- und Genominformationen beim Goldfisch vorlagen ging die Suche nach geeigneten Primersequenzen von humaner PKC aus. Es war möglich,

mittels Datenbankanalyse, eine 71% Analogie der humanen PKC alpha Sequenz und einer Zebrafischsequenz zu ermitteln, die mit hoher Wahrscheinlichkeit PKC alpha entspricht. Zebrafische sind ebenfalls, wie der Goldfisch, der Gattung der Cypriniden zugeordnet. Unter der Annahme, daß es sich bei den gesuchten Sequenzen um hochkonservierte Proteine handelt, wurden die aus dem Zebrafisch gewonnenen sense und antisense Primer im Goldfisch mit Erfolg zur Anwendung gebracht (PKC alpha: sense Primer 5` TCA TCC CTG ACC CCA AG 3` und antisense Primer 5` ACC ATG AGG AAA TTG AAG TCA G 3`). PKC alpha wurde immer zusammen mit beta Aktin dargestellt, um semiquantitative Aussagen treffen zu können. Im Goldfisch sind für beta Aktin die Primersequenzen bekannt (beta Aktin: sense Primer 5` GAT GAG GAA ATC GCT GCC CT 3` und antisense Primer 5` CAG TTG GTC ACA ATA CCG TGC TC 3`).

Die Gewebeaufbereitung erfolgt unter Clean Bench Bedingungen mit DNA/RNA freien Präparationsbesteck. Die isolierten Netzhäute wurden in einem manuellen Homogenisator (10 Strokes) auf Eis in Pufferlösung aufbereitet. Die Pufferlösung enthält β Mercaptoethanol und RLT (Quiagen) Lösung, hierdurch wird eine RNA Degradation unterbunden. Das weitere Vorgehen bei der mRNA Isolierung entspricht exakt dem von Quiagen empfohlenem Protokoll, Details sind daher dem RNeasy Mini Handbook (06/2001, S.50-55) zu entnehmen. Nach der Gewinnung der cDNA wurde die optimale Thermocycler Temperatur, Primer und cDNA Konzentrationen durch „Gradient Cycling“ ermittelt. Ein akzeptables Signal erhält man für Goldfisch cDNA bei folgenden MasterMix Bedingungen: Temperatur 54.8 °C, 10 μ l cDNA, 15 μ l Puffer, 12 μ l dNTPmix 10nM, 1.5 μ l sense Primer, 1.5 μ l antisense Primer, 1.5 Taq Polymerase, 58.5 μ l Aqua demin. dest., 35 Zyklen). Die DNA Darstellung erfolgte anschließend auf einem mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegel unter UV Beleuchtung.

3 Ergebnisse

3.1 Alpha PKC Immunoreaktivität in der Goldfischnetzhaute (Übersicht)

PKC alpha Antikörper werden seit einigen Jahren dazu verwendet, „Stäbchen“-Bipolarzellen in der Wirbeltiernetzhaute anzufärben. PKC alpha Antikörper markieren im Gefrierschnitt hell- und dunkeladaptierter Netzhäute zwei unterschiedliche Populationen von Bipolarzellen: Zum einen werden Mb Bipolarzellen markiert (Abb. 5). Sie besitzen große Axonterminalen in der Sublamina b der IPL. Die Zellkörper liegen in der distalen INL, die einen kräftigen Primärdendriten aufweisen.

Zum anderen markieren PKC alpha Antikörper eine Population von Zapfenbipolarzellen (Abb. 5) (Stern), mit kleinen rundlichen Zellkörpern in der Mitte der INL und mit Axonterminalen (Pfeil), die bezogen auf die Mb-BCTs etwas weiter distal in der IPL liegen. Die Zapfenbipolarzellterminalen sind in den Gefrierschnitten immer deutlich schwächer markiert als Mb-BCTs.

Vor einigen Jahren wurden adaptionsabhängige Unterschiede der alpha PKC Immunoreaktivität (PKC-IR) in der Goldfischnetzhaute beschrieben (Yazulla und Studholme, 1992; Behrens und Wagner, 1996). Zur allgemeinen Übersicht sollen diese adaptionsabhängigen Veränderungen kurz zusammengefasst werden. PKC alpha Antikörper markieren im helladaptierten Netzhautpräparat deutlich intensiver die Mb-BCT, während die PKC-IR im Zellkörper schwächer ausfällt. In Gefrierschnitten dunkeladaptierter Präparate ist die alpha PKC-IR im Soma und in der Terminale der Mb-BCs zu finden. Bereits in der Übersichtsaufnahme ist die „Randständigkeit“ des alpha PKC Signals in den Terminalen, bei dunkeladaptierten Präparaten deutlich erkennbar (Abb. 5). Helladaptierte Mb-BCTs weisen demgegenüber eine diffuse Verteilung der PKC-Immunfluoreszenz im Innern auf. In dunkeladaptierten Mb-BCTs ist eine intensive Immunfluoreszenz randständig ausgeprägt. Im Inneren der Terminalen ist die PKC-Markierung im Vergleich zu helladaptierten Terminalen deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 5).

Diese randständige Markierung befindet sich in der Mb-BCT in einem „Raum“, der im folgenden als „membranassoziertes Kompartiment“ bzw. als „membranständiger Auswertungsraum“ der Terminale bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu wird das schwächer PKC-ir Innere der Mb-BCT im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „zytosolisches Kompartiment“ benannt.

3.2 Semiquantitative Bestimmung von alpha PKC-IR in Mb-Terminalen in vivo.

Um adaptionsabhängige dynamische Veränderungen in der Verteilung der PKC-IR präziser darstellen zu können, wurden Methoden der „Bildanalyse“ herangezogen, die Veränderungen der PKC-IR auf der Ebene von Grauwerten (bzw. Pixelintensitäten) semiquantitativ wiedergeben.

In einem ersten Durchgang wurden die alpha PKC-IR in jeweils 40 Terminalen aus hell- bzw. dunkeladaptierten Goldfischnetzhäuten (n=5 Netzhäute) untersucht. Die Pixelintensitäten (im folgenden „Grauwerte“ genannt) werden in GL (Greylevel) von 0-255 angegeben. Die Abb. 4 zeigt in welchen Bereichen der Terminale die Pixelintensitäten registriert wurden.

Aus der semiquantitativen Auswertung von konfokalen Aufnahmen mit Hilfe von NIH Scion geht hervor, daß alpha PKC in dunkeladaptierten und im Dunkeln präparierten Terminalen im membranständigen Auswertungsraum ($0.95\mu\text{m}^2$) ein Signal von $139.5 \text{ GL} \pm 37.4 \text{ GL}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung; n=10 Terminalen) aufweist. Im Zytosol der Terminale ist die Fluoreszenz deutlich schwächer ausgeprägt; es wurde ein Mittelwert und Standardabweichung von $82.6 \text{ GL} \pm 19.8 \text{ GL}$ (n=10 Terminalen) gemessen (Abb. 6+7).

Die alpha PKC-IR ist in helladaptierten Terminalen in der Regel deutlich intensiver als in dunkeladaptierten Terminalen (Behrens und Wagner, 1996; Job und Lagnado, 1998). So wurden im membranassozierten Kompartiment im Mittel $165.8 \text{ GL} \pm 47.4 \text{ GL}$ (n=10 Terminalen) bestimmt, im zytosolischen Kompartiment wurde ein Grauwert von $142.0 \text{ GL} \pm 48.2 \text{ GL}$ (n=10 Terminalen) ermittelt. Diese Präparate weisen keinen signifikanten Unterschied in der Markierungsintensität und damit in den Grauwerten zwischen Membrankompartiment und zytosolischen Auswertungsraum auf (Abb. 6+7).

Hieraus ergibt sich, daß die Pixelintensitäten in den membran- und zytosolischen Kompartimenten helladaptierter Mb-BCTs sich weniger stark unterscheiden als in den dunkeladaptierten Netzhäuten.

Wie aus Abb. 8a ersichtlich ist, ist die alpha PKC-IR in der Terminale nicht gleichmäßig homogen verteilt, was einen z.T. fleckenförmigen Eindruck vermittelt. Dunkeladaptierte Mb-Terminalen weisen demgegenüber keine so deutlichen „Inhomogenitäten“ in der alpha PKC-IR im Innern auf.

Zur Verdeutlichung der alpha PKC-IR Verteilung wurden Linescans durch zwei exemplarische Mb-Terminalen durchgeführt (Abb. 8c+d). Biologisch relevant ist die alpha PKC Verteilung zwischen Zytosol und Membran, daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit, der Quotient zwischen membranständiger PKC-IR und zytosolischer PKC-IR angegeben werden. Je näher der Quotient beim Wert 1 liegt, desto gleichmäßiger ist die PKC-IR Verteilung zwischen Membran und Zytosol.

Für die alpha PKC-IR bedeutet das, daß man für die helladaptierten Terminalen einen Quotienten Membrankompartiment (MC) / zytosolisches Kompartiment (CC) von 1.2 ± 0.11 (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=10 Terminalen) erhält, wohingegen der Quotient für die dunkeladaptierte Terminalen 1.7 ± 0.30 (Mittelwert \pm Standardabweichung, n=10 Terminalen) deutlich größer ist (Abb. 8e).

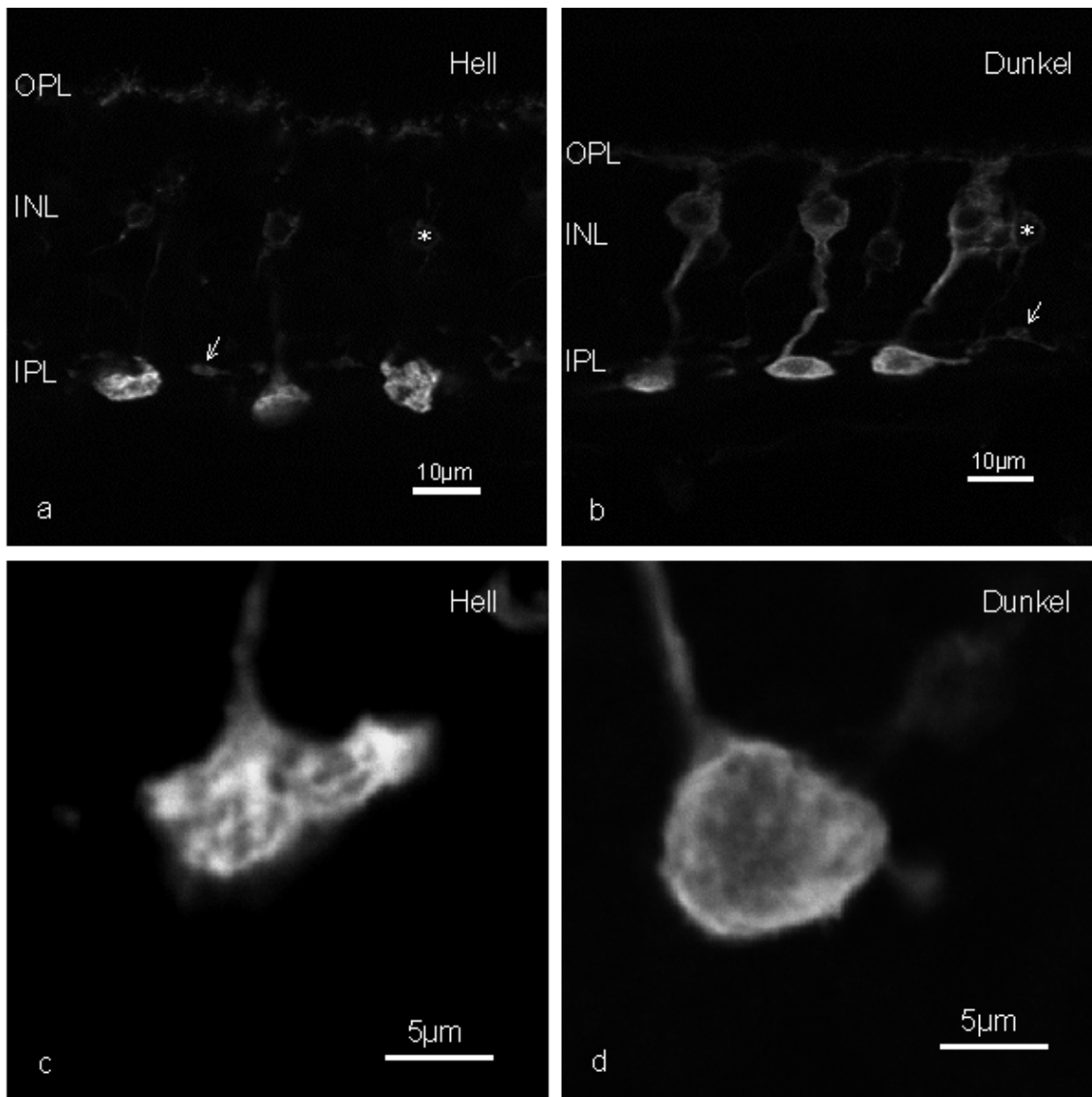


Abb.5. Alpha-PKC-Immunfluoreszenz in Gefrierschnitten hell- (Abb. a+c) und dunkeladaptierter (Abb. b+d) Goldfischnetzhäute (Übersicht: a+b; Ausschnittsvergrößerung (proximale IPL): c+d). Der Antikörper markiert zwei Populationen von Bipolarzellen in der Goldfischnetzhaut: Mb-Bipolarzellen und eine Population von ON-Zapfen-Bipolarzellen. Alpha PKC-ir Mb-Bipolarzellen können anhand ihrer großen Axonterminalen in der proximalen IPL und der Zellkörper in der distalen INL identifiziert werden; die Fluoreszenzmarkierung der alpha-PKC-IR Zapfenbipolarzellen ist schwächer als die der Mb-Bipolarzellen; ein * in den Abb. a+b markiert jeweils einen Zellkörper der Zapfenbipolarzellen; die Pfeile in Abb. a+b weisen auf die Axonterminalen dieser Zapfenbipolarzellen hin. Die alpha PKC-ir ist in helladaptierten Mb Terminalen inhomogen verteilt (Abb. a+c). Die Immunfluoreszenzmarkierung ist in dunkeladaptierten Mb Terminalen (Abb. b+d) deutlich „randständiger“, bzw. „membranständiger“. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist im „Innern“ der Mb Terminalen schwächer als im Membran-assoziierten Kompartiment. Man beachte bitte, daß die Zellkörper der Mb-Bipolarzellen in der Abb.a außerhalb der Fokusebene liegen, da dieses Präparat leicht tangential angeschnitten wurde.

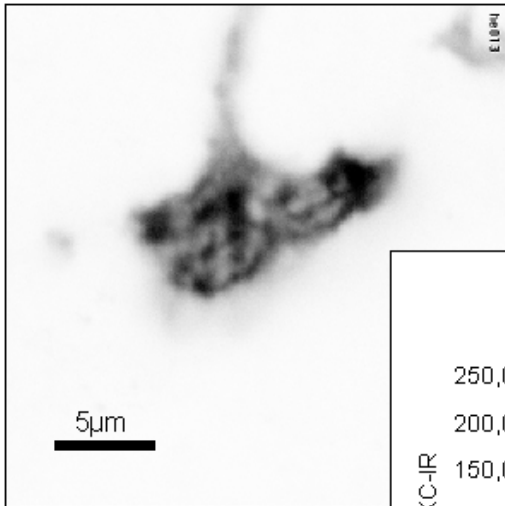


Abb. 6. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (links) einer helladaptierten alpha PKC-ir Mb Terminale (das Bild wurde invertiert). Das Diagramm (unten) zeigt für 10 Mb Terminalen Grauwertmessungen aus dem membran-ständigen Auswertungsraum (schwarze Säulen) und Messungen aus dem zytosolischen Auswertungsraum (graue Balken). Grauwerte von 0-255 werden durch die y-Achse angezeigt.

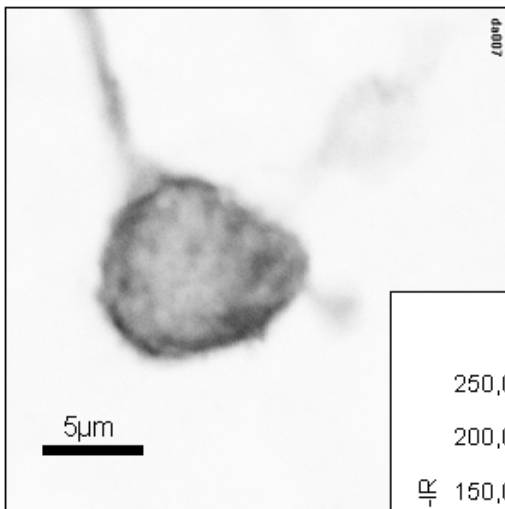
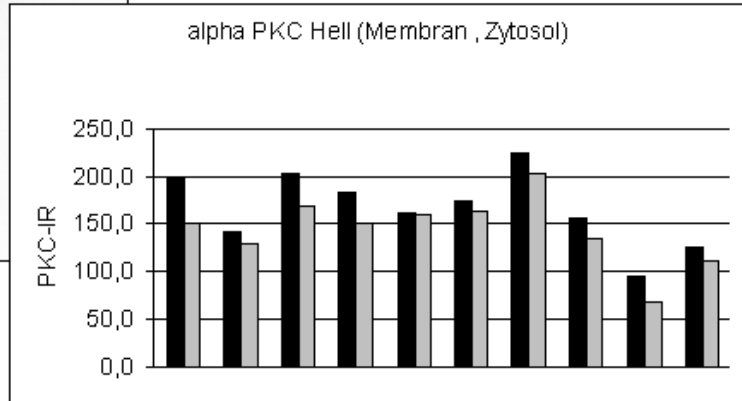
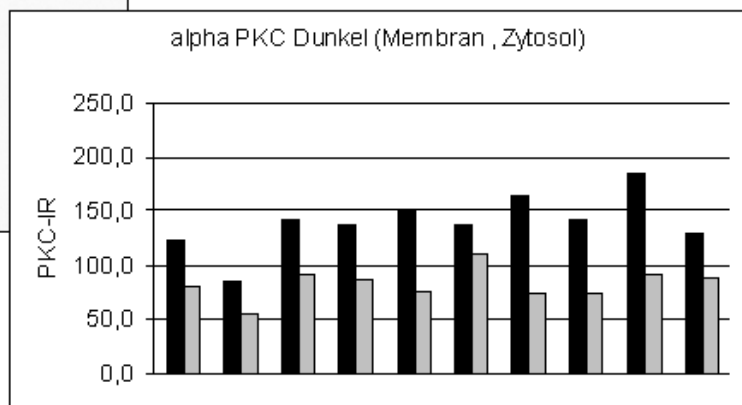


Abb. 7. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (links) einer dunkeladaptierten alpha PKC-ir Mb Terminale (das Bild wurde invertiert). Das Diagramm (unten) zeigt für 10 Mb Terminalen Grauwertmessungen aus dem membran-ständigen Auswertungsraum (schwarze Säulen) und Messungen aus dem zytosolischen Auswertungsraum (graue Balken). Grauwerte von 0-255 werden durch die y-Achse angezeigt.



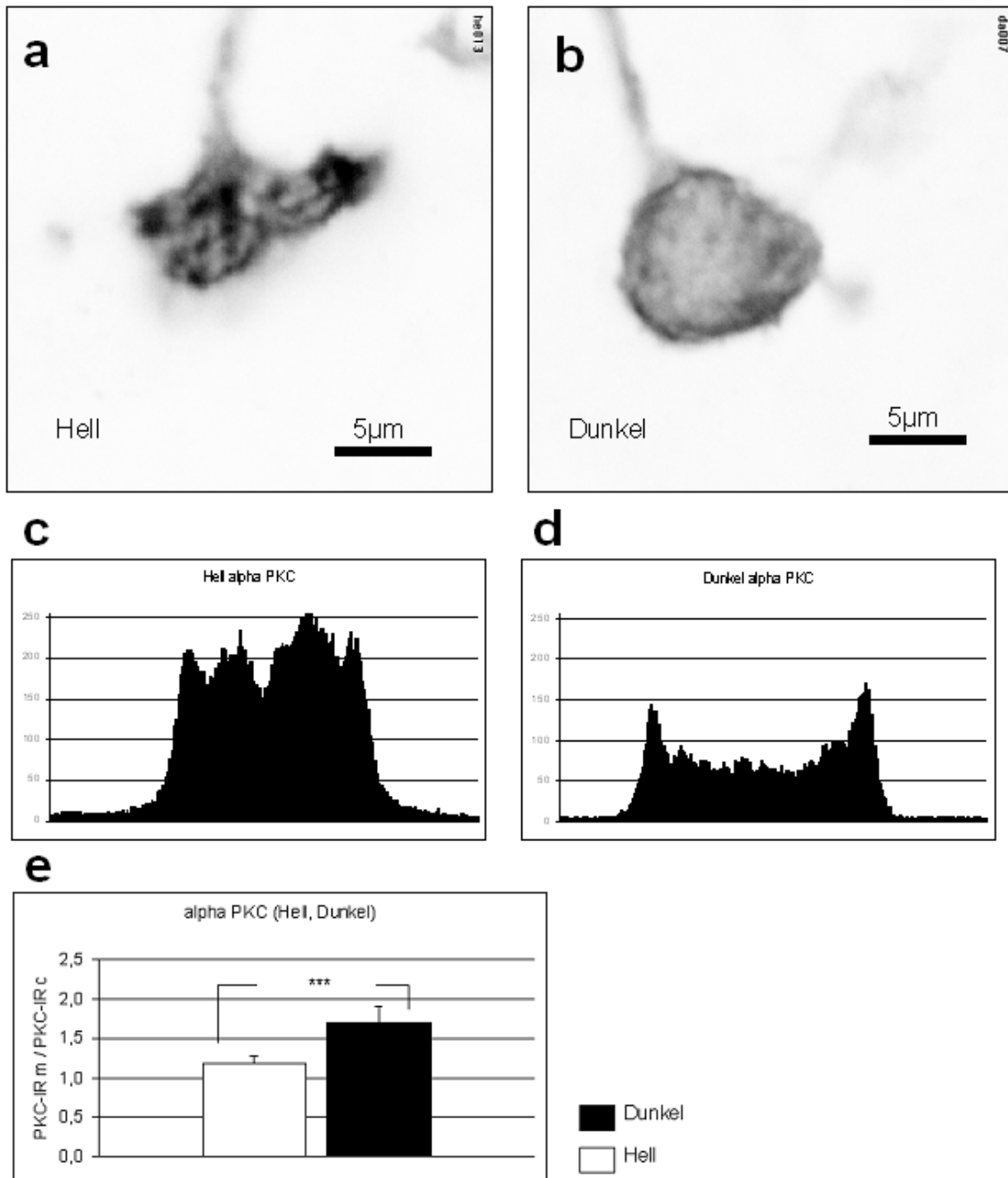


Abb. 8. Untersuchung der Verteilung von alpha-PKC-IR an hell- und dunkeladaptierten Mb Terminalen. In der ersten Reihe sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer hell- (Abb. a) und einer dunkeladaptierten (Abb. b) alpha-PKC-IR Mb Terminalen aufgeführt (invertierte Aufnahmen); diese Terminalen wurden schon in den Abb. 6+7 gezeigt (siehe dort die Beschreibung der Abbildungen). Die Abb. c+d zeigen Linescans durch die jeweils darüber aufgeführten Terminalen mit den dabei erhaltenen Grauwertprofilen. Die Skalierung der Grauwerte ist von 0-255 angegeben. Die Abb. e zeigt ein Diagramm in welchem das Verhältnis der Grauwerte aus dem membranassoziierten und dem zytosolischen Auswertraum für hell- und dunkeladaptierte PKC-ir Terminalen angegeben ist. Die Anzahl n der untersuchten Terminalen betrug jeweils 20. Auf den Diagrammbalken sind Standardabweichungen angegeben. Signifikanzniveaus : ***: $p < 0.001$ (Test: students t-Test).

3.3 Subzelluläre Verteilung von „aktivierter“ alpha pPKC-IR in vivo

Aktivierte alpha PKC (siehe dazu auch Kap. 1.3; Kap. 2.5) läßt sich immunhistochemisch mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper im Gefrierschnitt lokalisieren. In Abb.9 und Abb. 9.1 sind Anfärbungen mit einem phosphospezifischen Primärantikörper in Gefrierschnitten hell- und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute aufgeführt. Der phosphospezifische Antikörper erkennt das an der Aminosäure Ser657 phosphorylierte Protein. Diese phosphorylierte PKC alpha wird im folgenden als „aktivierte“ PKC alpha oder als pPKC alpha bezeichnet (siehe hierzu auch die Diskussion, wo ausführlicher auf diesen Sachverhalt erörtert wird).

Werden alpha pPKC markierte Gefrierschnitte mit den elektronischen Einstellungen des CLSM 410 untersucht, die für die Untersuchung mit dem PKC-Antikörper optimiert wurden, so ergaben sich in vielen Fällen schwach pPKC alpha markierte Mb-Bipolarzellen (Abb. 9).

Trotz der vergleichsweise schwachen Anfärbung ist in den optischen Schnitten hell- und dunkeladaptierter Mb-Bipolarzellen ebenfalls ein Einfluß von Hell- und Dunkeladaptation auf die Verteilung der alpha pPKC-IR in den Mb-Terminalen zu erkennen. In helladaptierten und im Hellen präparierten Netzhäuten ist die alpha pPKC-IR diffus im Inneren der Mb-Terminals lokalisiert, wohingegen in dunkeladaptierten Präparaten die Lokalisation von pPKC alpha-IR deutlich randständig ist (Abb. 9). An dieser Stelle sei noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, daß die pPKC Markierung in Abb. 9 mit den für die PKC Markierungen optimierten Scanparametern durchgeführt wurden (siehe auch dazu Kap. 2.5; bzw. Abb. 9.1).

Der bereits zu Beginn beschriebene Intensitätsunterschied zwischen der alpha PKC und der schwächeren alpha pPKC Markierung soll hier noch einmal aufgegriffen werden. Die alpha pPKC Markierung zeigt in der Terminale nur Pixelintensitäten von ca. 10-20 GL, während alpha PKC Markierungen Pixelintensitäten von bis zu 200 GL aufweisen.

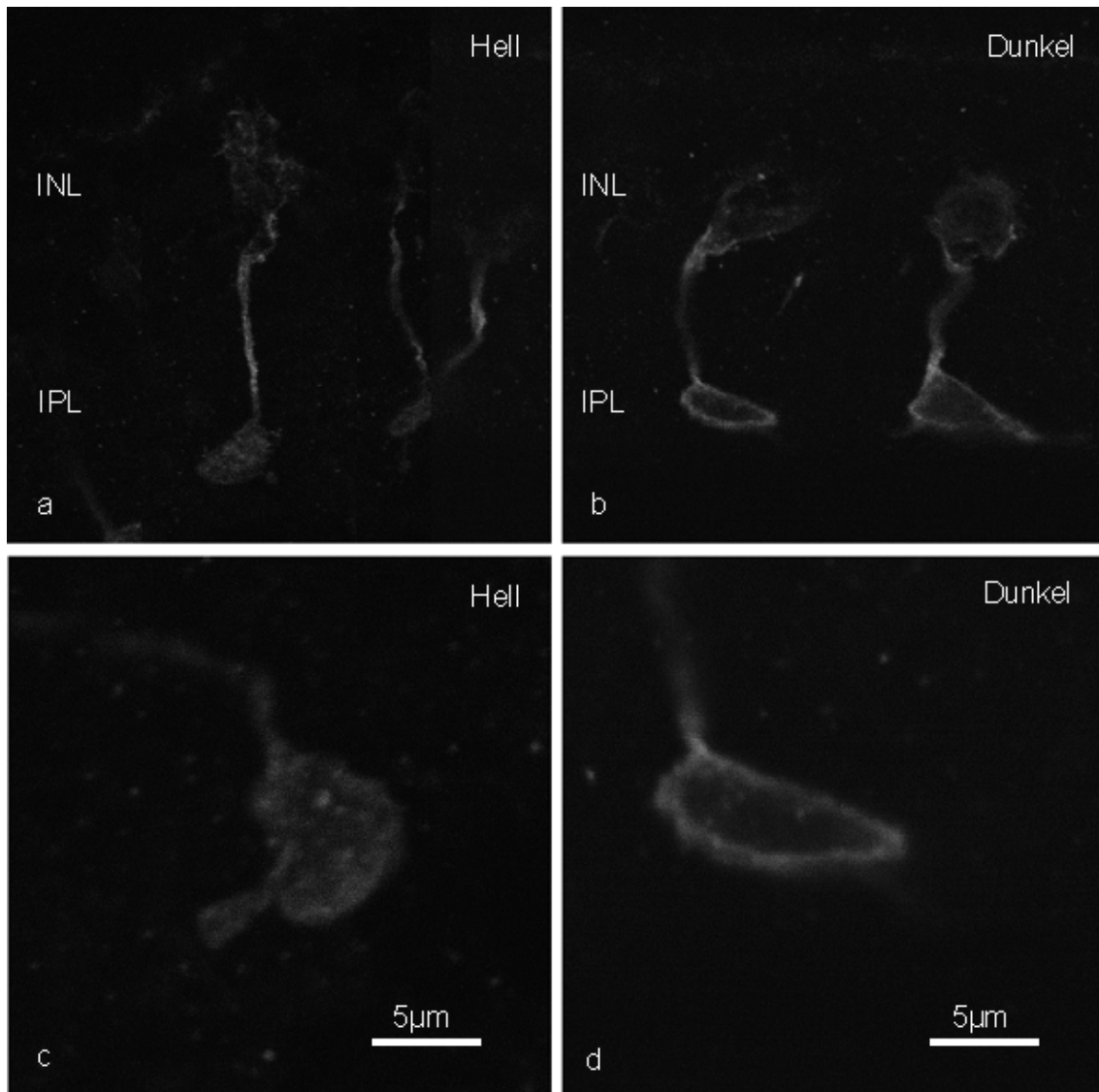


Abb. 9. Immunfluoreszenzmarkierungen mit einem phosphospezifischen Antikörper in Gefrierschnitten hell- (Abb. a+c) und dunkeladaptierter (Abb. b+d) Goldfischnetzhäute (Übersicht: Abb. a+b; Ausschnittsvergrößerung (proximale IPL): Abb. c+d). Der verwendete Primärantikörper erkennt spezifisch die alpha-PKC-Isoform, phosphoryliert an der Position Ser657.

Man beachte das Hell- und Dunkeladaptation die Verteilung von alpha pPKC-IR im Innern der Mb Terminale beeinflussen. Während das Fluoreszenzsignal in helladaptierten Mb Terminalen eher diffus verteilt ist, ist es in dunkeladaptierten Terminalen dagegen deutlich membranständig lokalisiert (Abb. b+d). Die LSM Scanparameter sind für PKC Markierungen optimal ausgereicht, um eine Vergleichbarkeit der pPKC und PKC Markierungen zu ermöglichen. Die Abb. 9.1. zeigt eine pPKC markierte Netzhaut, die mit für pPKC optimierten LSM Einstellungen aufgenommen wurde.

Die semiquantitative Auswertung der „optischen Schnitte“ ergab für die Markierungen mit dem Antikörper gegen alpha pPKC Isoform, daß die Immunreaktivität im Dunkeln deutlich membranständig ist mit einem Mittelwert von $14.3 \text{ GL} \pm 2.8 \text{ GL}$ ($n=10$ Terminalen). Das zytosolische Signal weist nur die Hälfte der Pixelintensität auf, Mittelwert $7.7 \text{ GL} \pm 1.5 \text{ GL}$ ($n=10$ Terminalen). Die Markierung der Mb-Terminals aus helladaptierten Präparaten ist schwach und homogen ausgeprägt. Der membranständige Grauwert von im Mittelwert $11.8 \text{ GL} \pm 2.4 \text{ GL}$ ($n=10$ Terminalen) hebt sich weniger deutlich von den zytosolischen Messungen ab. Im Mittelwert fand man für das Zytosol $8.2 \text{ GL} \pm 1.9 \text{ GL}$ ($n=10$ Terminalen). Exemplarisch sind für jeden Adaptationszustand in der Abb.10 und Abb.11 jeweils zehn Mb-Terminals mit ihren zytosolischen und membranständigen pPKC-IR dargestellt.

Bei der Darstellung der Immunreaktivitäten als dimensionsloser Quotient (Membran pPKC-IR / Zytosol pPKC-IR) ergibt sich im Hellen ein Wert 1.45 ± 0.19 ($n=10$ Bestimmungen). Demgegenüber steht ein Dunkelwert 1.9 ± 0.23 ($n=10$ Bestimmungen) (Abb. 8e). Die Quotienten für die pPKC-IR und die PKC-IR zeigen die gleiche Tendenz. Die Hell/Dunkel Unterschiede der Quotienten (MC/CC) sind für beide Antikörper jeweils hochsignifikant (t-Test; $p < 0.001$). Die Linescans (Abb. 8c+8d) verdeutlichen noch einmal Randständigkeit von pPKC alpha in dunkeladaptierten Gefrierschnitten.

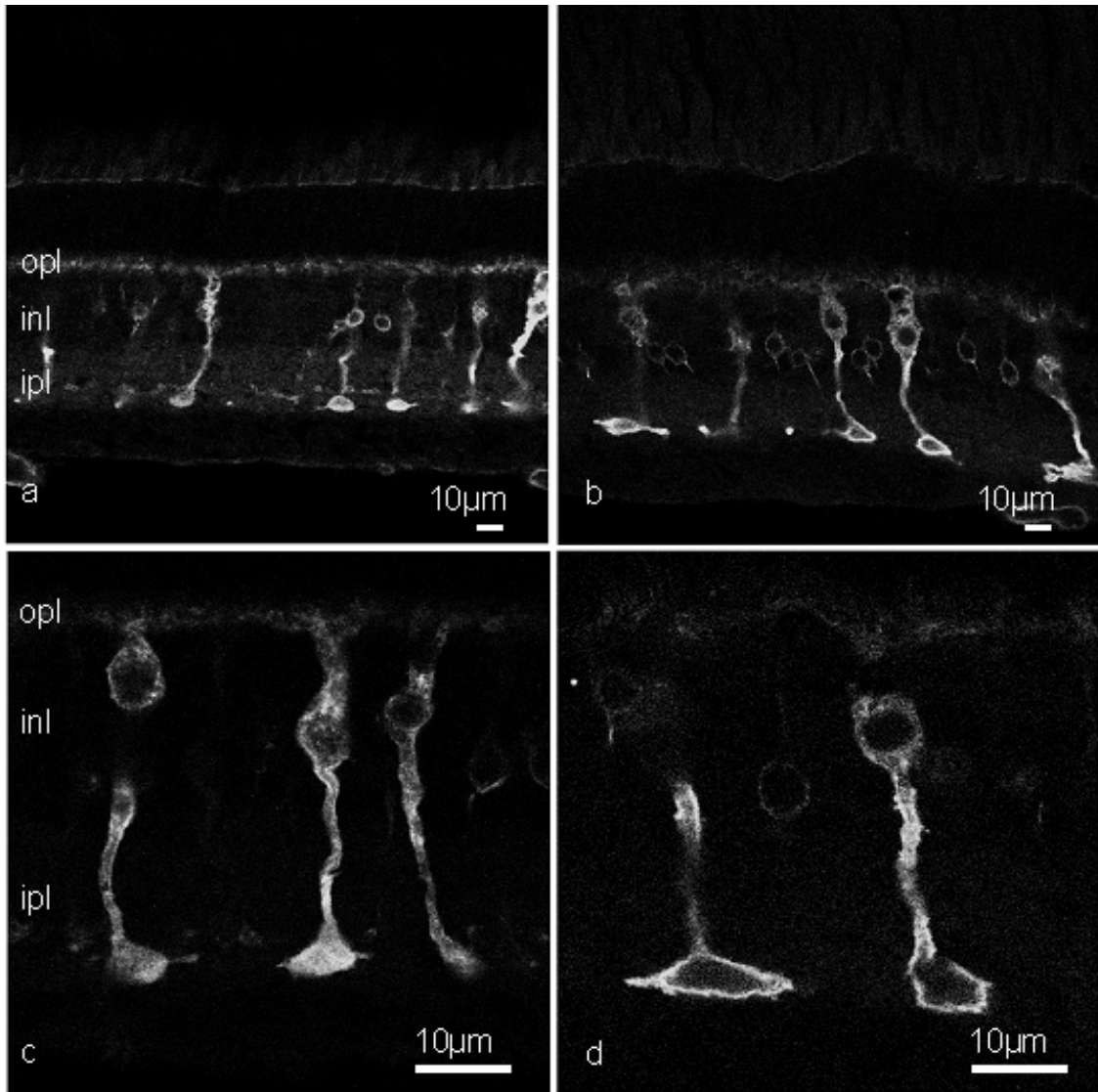


Abb. 9.1. pPKC alpha Immunoreaktivität in helladaptierten (a+c) und dunkeladaptierten (b+d) Goldfischnetzhäuten. Es wurde der phosphospezifische Antikörper angewandt, der an der Position Ser657 phosphorylierte PKC alpha erkennt. Einzelne pPKC-ir Mb-BCTs werden in den Abbildungen c+d bei einer höheren Vergrößerung gezeigt; pPKC-IR ist homogen verteilt in helladaptierten Netzhautpräparaten, wohingegen in dunkeladaptierten Präparaten die pPKC-IR hauptsächlich an der Membran zu finden ist. (Abbildung wurde freundlicherweise von Ralf Peukert überlassen).

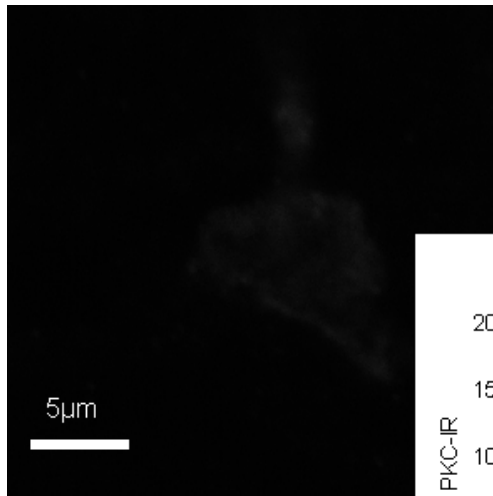


Abb. 10. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (links) einer helladaptierten alpha pPKC-ir Mb Terminale (das Bild wurde nicht invertiert). Das Diagramm (unten) zeigt für 10 Mb Terminalen Grauwertmessungen aus dem membran-assoziierten Auswertungsraum (schwarze Säulen) und Messungen aus dem zytosolischen Auswertungsraum (graue Balken). Grauwerte von 0-255 werden durch die y-Achse angezeigt.

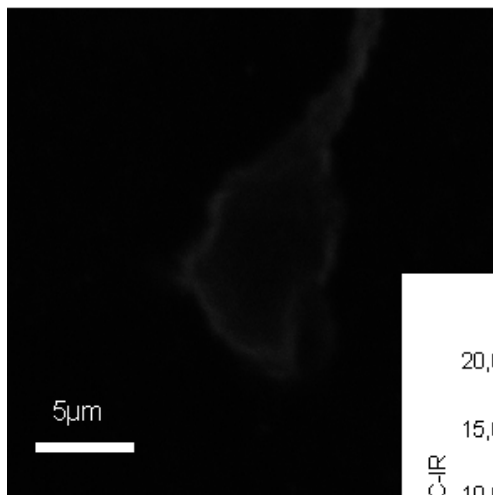
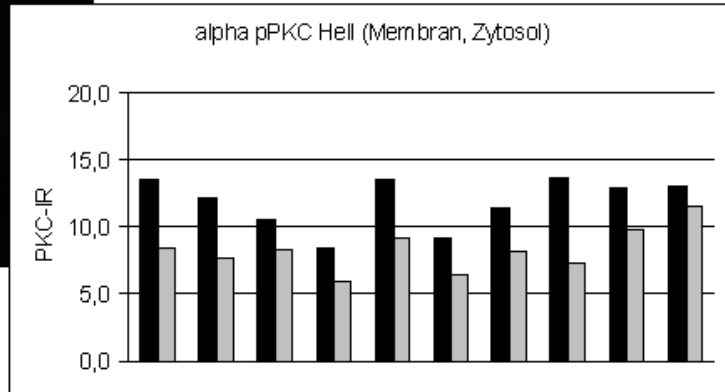
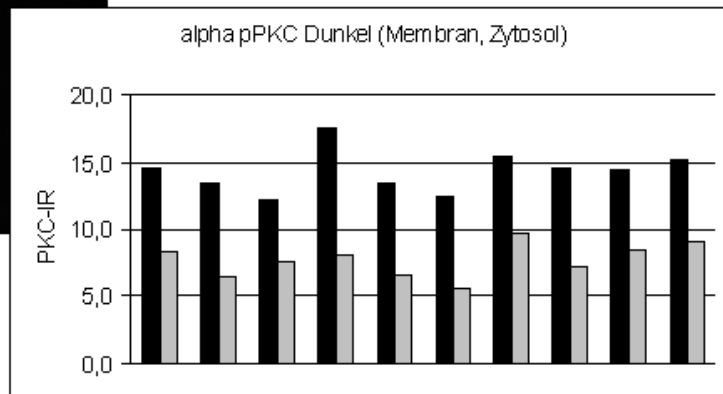


Abb.11. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (links) einer dunkeladaptierten alpha pPKC-ir Mb Terminale (das Bild wurde nicht invertiert). Das Diagramm (unten) zeigt für 10 Mb Terminalen Grauwertmessungen aus dem membran-assoziierten Auswertungsraum (schwarze Säulen) und Messungen aus dem zytosolischen Auswertungsraum (graue Balken). Grauwerte von 0-255 werden durch die y-Achse angezeigt.



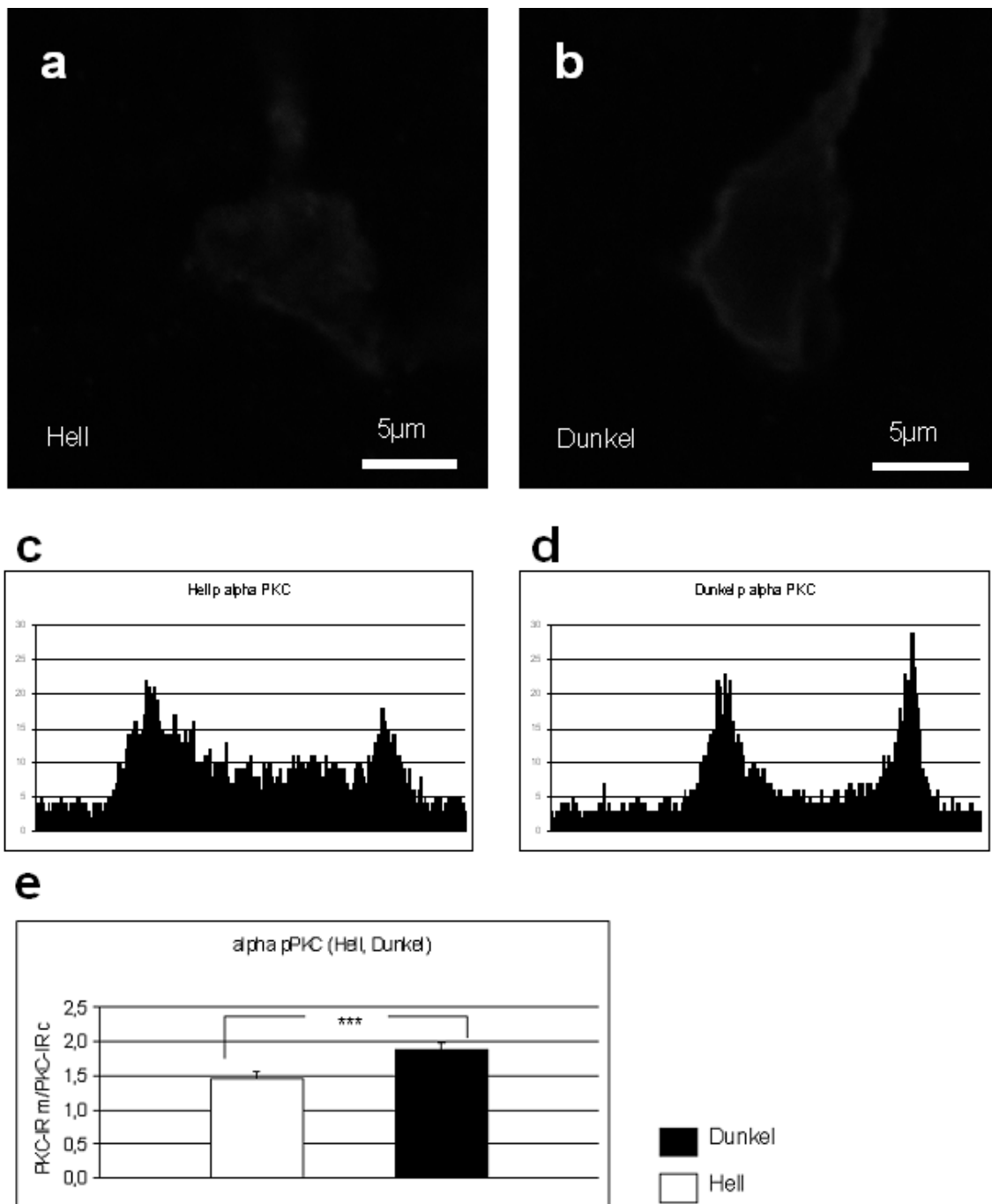


Abb. 12. Untersuchung der Verteilung von alpha pPKC-IR an hell- und dunkeladaptierten Mb Terminalen. In der ersten Reihe sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer hell- (Abb.a) und einer dunkeladaptierten (Abb.b) alpha p-PKC-ir Mb Terminalen aufgeführt (nicht invertierte Aufnahmen); diese Terminalen wurden schon in den Abb. 10 +11 gezeigt (siehe dort die Beschreibung der Abbildungen). Die Abbildungen Abb. c+b zeigen Linescans durch die jeweils darüber aufgeführten Terminalen (Bilder wurden zuvor invertiert) mit den dabei erhaltenden Grauwertprofilen. Die Skalierung der Grauwerte ist von 0-255 angegeben. Die Abb. e zeigt ein Diagramm in welchem das Verhältnis der Grauwerte aus dem membranassoziierten und dem zytosolischen Auswertraum für hell- und dunkeladaptierte PKC-ir Terminalen angegeben wird. Die Anzahl n der untersuchten Terminalen betrug jeweils 20. Auf den Diagrammbalken sind Standardabweichungen angegeben. Signifikanzniveaus : ***: $p < 0.001$ (Test: students t-Test).

3.4 Western Blot Untersuchungen zum Einfluß von Hell-Dunkeladaptation auf die subzelluläre Verteilung von alpha pPKC (Ser657) und alpha PKC in Netzhauthomogenaten (in-vivo Material)

Im bisherigen Verlauf dieser Arbeit wurde der Einfluß von Hell- und Dunkeladaptation auf die subzelluläre Verteilung von phosphorylierter und dephosphorylierter alpha PKC an Kryoschnitten mit histologischen Methoden in Verbindung mit Techniken der Bildverarbeitung untersucht. Mit Hilfe einer hierzu unabhängigen biochemischen Methode soll der Einfluß von Hell- und Dunkeladaptation auf die subzelluläre Lokalisation eingehender untersucht werden.

Die Western Blot Analyse (Abb. 13) der unterschiedlichen Zellfraktionen ergab folgende Ergebnisse. Nach Ultrazentrifugation und SDS-PAGE Elektrophorese von Homogenaten hell- und dunkeladaptierter Goldfischnetzhäute wurden in der Zytosolfraktion und in der Membranfraktion im Bereich von 80 - 83 kDa ein Signal für alpha PKC (Abb. 13b+d) und alpha pPKC (Abb.13a+c) erhalten. Das Signal kann als spezifisch angesehen werden, da es in dem aus Western Blots mit rekombinanter PKC zu erwartenden Molekulargewichtsbereich liegt (Daten nicht gezeigt) und von spezifischen Antikörpern gefärbt wird. Die durchgeführten Antikörperkontrollversuche (Peptidabsorption) führten zum Verschwinden der 80 - 83 kDa Bande (siehe auch Kap. 2).

Für alpha pPKC zeigt sich im Dunkeln eine deutliche Bande in der Membranfraktion bei ca. 80 kDa. Die Bande der Zytosolfraktion ist schwächer gefärbt als die Bande der Membranfraktion. Im Hellen zeigen beide Banden ein intensives Signal. Das alpha PKC Signal verhält sich analog zur alpha pPKC Antikörperfärbung. Im Dunkeln ist die Membranbande deutlich gefärbt und es zeigt sich ein schwaches zytosolisches Signal. Im Hellen hat die zytosolische Bande an Intensität zugenommen. Die bei genauer Betrachtung der Banden auffallenden feinen Doppelbanden sind als Glykosilierungsunterschiede zu deuten.

Nach densitometrischer Auswertung und Berechnung der MC/CC Quotienten aus den biochemischen Versuchen sind Relationen auszumachen, die mit den

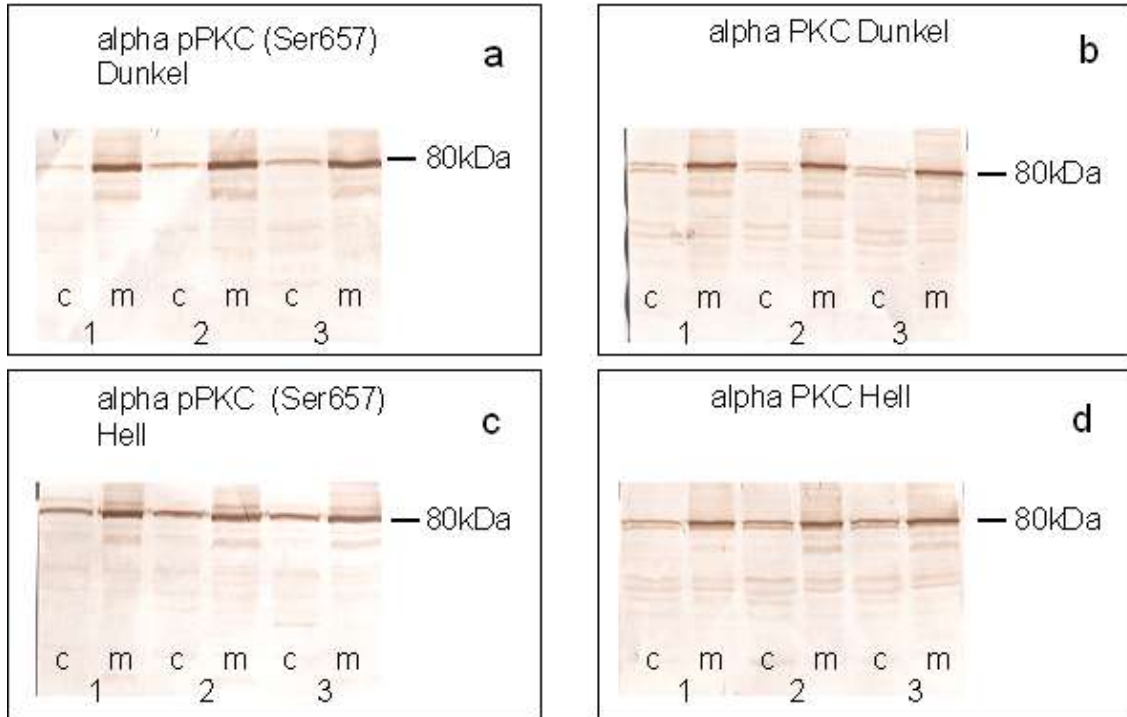


Abb. 13. Western Blots für alpha pPKC (Abb. a+c) und alpha PKC (Abb. b+d) von homogenisierten Netzhautproben dunkel- (Abb. a+b) und helladaptierter (Abb. c+d) Netzhäute. Beide Antikörper zeigen spezifische Markierungen bei 80kDa (Erläuterungen: siehe Text). Man beachte die Unterschiede zwischen zytosolischer Fraktion (c) und Membranfraktion (m) von Homogenaten nach subzellulärer Fraktionierung. Die Zahlen stehen jeweils für parallele Ansätze (n=3), bei denen jeweils 4 Netzhäute (von n=2 Fischen) verwendet wurden.

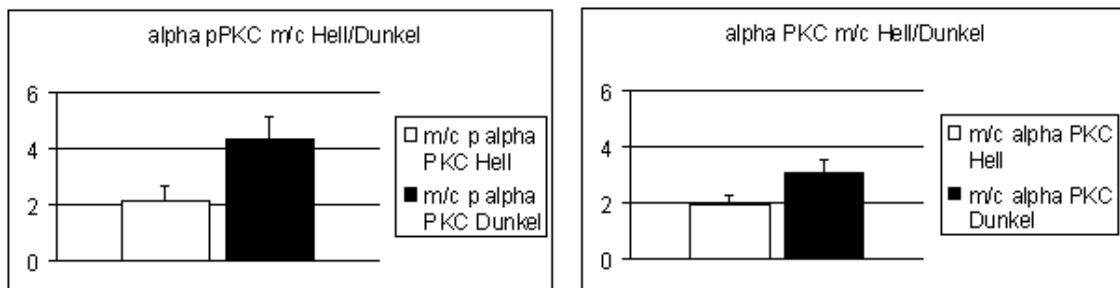


Abb. 14. Semi-quantitative Darstellung von Grauwertrelationen (Membranfraktion/Zytosolfraktion) nach densitometrischer Auswertung von Western Blot Spuren von Proben hell- und dunkeladaptierter Netzhäute (siehe Abb. 13; weitere Erläuterungen: siehe Text). Auf den Diagrammbalken sind Standardabweichungen angegeben. Die y-Achse ist dimensionslos.

immunhistochemischen Untersuchungen qualitativ in Deckung zu bringen sind. Im Dunkeln ist das Verhältnis sowohl von alpha PKC als auch alpha pPKC Membran zu Zytosol größer als im Hellen (Abb. 14). Abweichend zu den immunhistochemischen Untersuchungen zeigen hier die Immunoblots beider Antikörper etwa gleiche Intensitäten.

3.5 Proximal / Distal Lokalisation der alpha PKC und alpha pPKC Immunoreaktivität in Mb-BCT.

Unterschiede in der proximal und distal Verteilung von GABA_c Rezeptoren und des synapsenassoziierten Proteins Gephyrin an Bipolarterminalen sind z.T. aus der Literatur bekannt (Koulen et al., 1997). Daher liegt die Vermutung nahe, daß Komponenten von Signaltransduktionswegen ebenfalls in der Terminale ungleichmäßig verteilt sind.

Bei der Lokalisation der alpha PKC-IR an der Membran (Abb. 15) ist in Gefrierschnitten helladaptierter Netzhäute kein signifikanter Unterschied zwischen dem proximalen und distalen Teil der Terminale auszumachen.

Im Dunkeln hingegen ist der Unterschied zwischen proximaler und distaler BCT signifikant (t-test; $p < 0.001$). Die durchschnittlichen Immunoreaktivitäten betragen für proximal $155 \text{ GL} \pm 36 \text{ GL}$ und für distal $123 \text{ GL} \pm 31 \text{ GL}$. Im distal Hell / distal Dunkel Vergleich findet sich nur für den distalen Teil der Membran ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney; $p < 0.001$), proximal ist keine Signifikanz (t-test; $p = 0.101$) nachzuweisen.

Zytosolisch wird eine distale PKC-IR mit $77 \text{ GL} \pm 17 \text{ GL}$ und eine proximale PKC-IR mit $87 \text{ GL} \pm 21 \text{ GL}$ gemessen. Die Verteilungsunterschied ist signifikant (t-Test; $p < 0.05$). Im Hellen ist diese Signifikanz nicht mehr gegeben. Im Hell/Dunkel Vergleich sind die Unterschiede sowohl für das proximale als auch für das distale Zytosol deutlich (jeweils: Mann-Whitney Test; $p < 0.001$). Im zytosolischen Auswertungsraum (Abb. 16) bestätigt sich also der an der Membran, bereits für den dunkeladaptierten Zustand beschriebene, Verteilungsunterschied.

Die alpha PKC Immunoreaktivität zeigt im Dunkeln Unterschiede in ihrer Verteilung zwischen dem proximalen und distalen Abschnitten der Terminale. Das alpha pPKC Signal bestätigt das Ergebnis für die Verteilungsunterschiede, die in der Terminale bereits für alpha PKC gemessen wurden. Alpha pPKC ist im Dunkeln an der proximalen Membran signifikant (t-Test; $p = 0.005$) stärker lokalisiert als distal. Im helladaptierten Zustand findet sich keine signifikanten

Unterschiede in der Verteilung im membranständigen Auswertungsraum (Abb. 17). Die zytosolischen Messungen zeigen, daß pPKC alpha näherungsweise gleichmäßig in der BCT sowohl im Hellen, als auch im Dunkeln verteilt ist (Abb. 18).

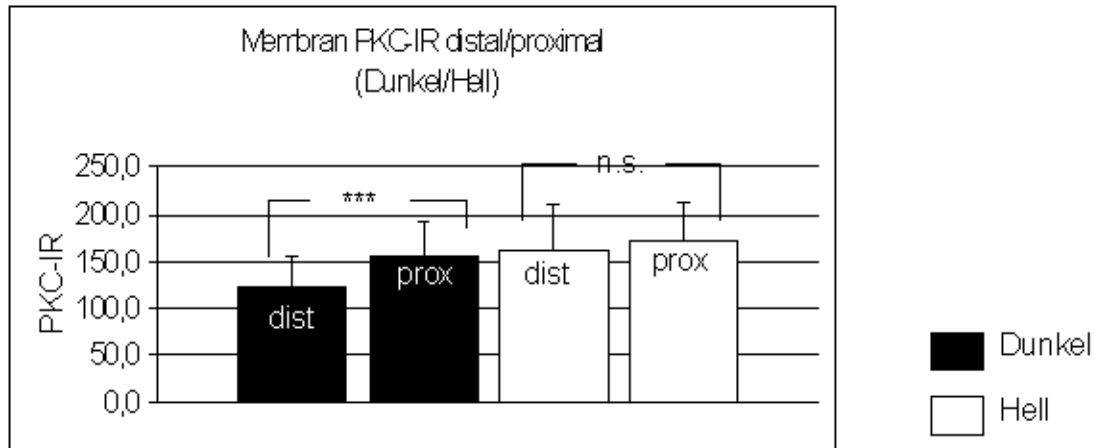


Abb. 15. Balkenhistogramm zur semiquantitativen Bestimmung von membranassoziierter alpha PKC-IR in Mb Terminalen fluoreszenzmarkierter Gefrierschnitte hell- und dunkeladaptierter Netzhäute. Aufgetragen sind Grauwertmessungen von distalen und proximalen Hälften markierter Terminalen (siehe Abb. 4); Mittelwert \pm Standardabweichung; die Anzahl n der untersuchten Terminalen betrug jeweils 20. Die y-Achse ist in Grauwerte (0-255) skaliert. Signifikanzniveaus : ***: $p < 0.001$ und n.s.: nicht signifikant. (Test: students t-Test; Mann-Whitney Test). Man beachte, daß im Dunkelpräparat ein signifikanter Unterschied zwischen proximaler PKC-IR und distaler PKC-IR an der Membran vorliegt.

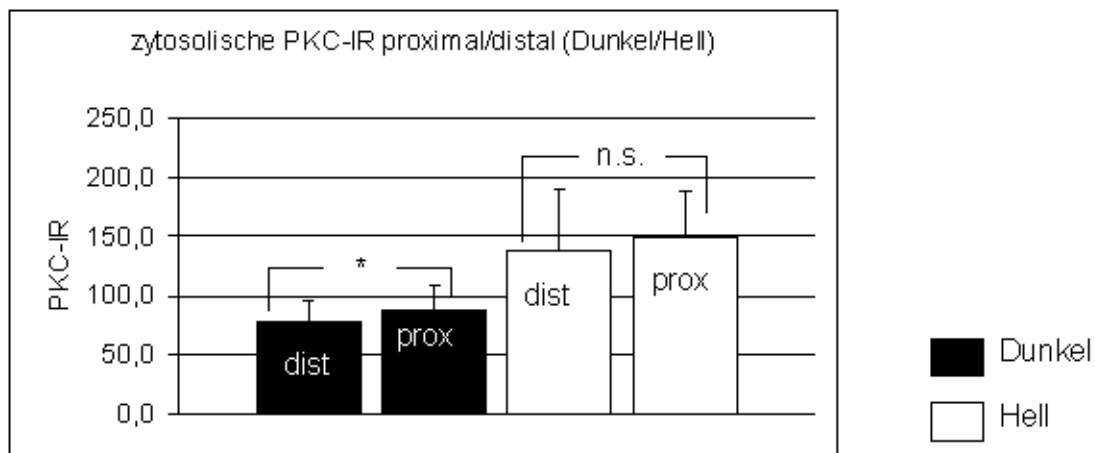


Abb. 16. Balkenhistogramm zur semiquantitativen Bestimmung von zytosolischer alpha PKC-IR in Mb Terminalen fluoreszenzmarkierter Gefrierschnitte hell- und dunkeladaptierter Netzhäute. Aufgetragen sind Grauwertmessungen von distalen und proximalen Hälften markierter Terminalen (siehe Abb. 4); Mittelwert \pm Standardabweichung; die Anzahl n der untersuchten Terminalen betrug jeweils 20. Die y-Achse ist in Grauwerte (0-255) skaliert. Signifikanzniveaus : * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ und n.s.: nicht signifikant. (Test: students t-Test; Mann-Whitney Test). Man beachte, daß im Dunkelpräparat ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen proximaler PKC-IR und distaler PKC-IR im zytosolischen Auswertungsraum vorliegt.

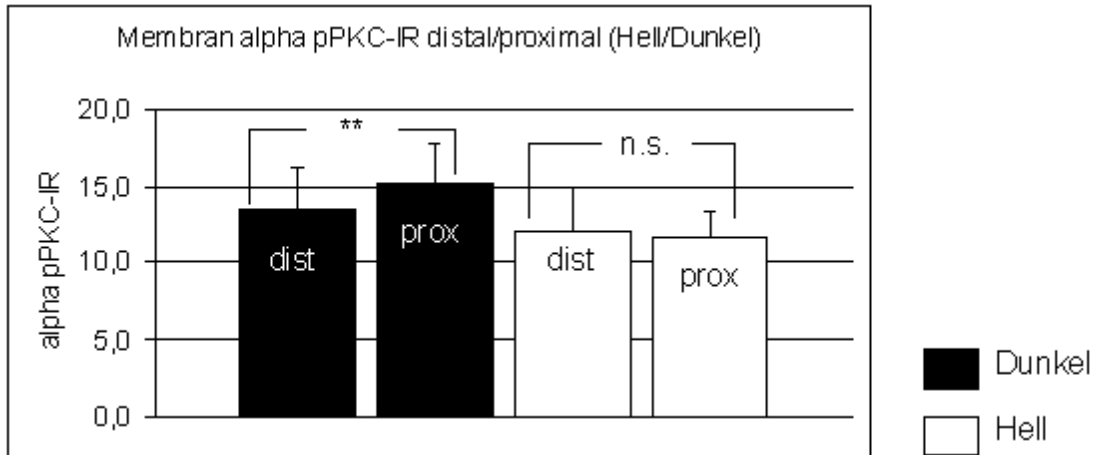


Abb. 17. Balkenhistogramm zur semiquantitativen Bestimmung von membranassoziierter alpha pPKC-IR in Mb Terminalen fluoreszenzmarkierter Gefrierschnitte hell- und dunkeladaptierter Netzhäute. Aufgetragen sind Grauwertmessungen von distalen und proximalen Hälften markierter Terminalen (siehe Abb. 4); Mittelwert \pm Standardabweichung; die Anzahl n der untersuchten Terminalen betrug jeweils 20. Für dunkeladaptierte Mb Terminalen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen proximalem und distalem Teil der Terminalen ermittelt. Signifikanzniveaus : ** : $p < 0.01$ und n.s.: nicht signifikant. (Test: students t-Test). Auf den Diagrammbalken sind Standardabweichungen angegeben. Die y-Achse ist in Grauwerte (0-255) skaliert.

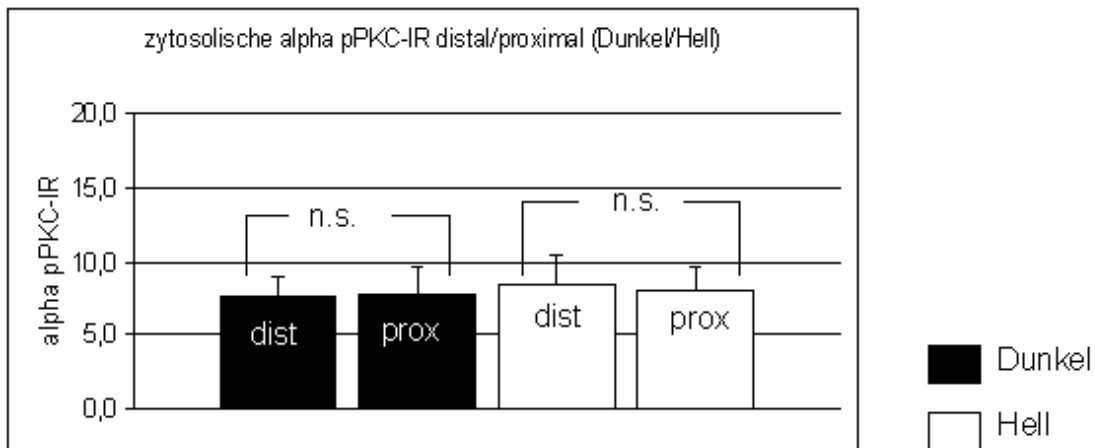


Abb. 18. Balkenhistogramm zur semiquantitativen Bestimmung von zytosolischer alpha pPKC-IR in Mb Terminalen fluoreszenzmarkierter Gefrierschnitte hell- und dunkeladaptierter Netzhäute. Aufgetragen sind Grauwertmessungen von distalen und proximalen Hälften markierter Terminalen (siehe Abb. 4); Mittelwert \pm Standardabweichung; die Anzahl n der untersuchten Terminalen betrug jeweils 20. Weder im Dunkeln noch im Hellen finden sich signifikante Unterschiede zwischen proximaler und distaler pPKC-IR im Zytosol. Signifikanzniveaus : n.s.: nicht signifikant. (Test: students t-Test).

Aufgrund den zugegebenermaßen geringen Verteilungsunterschieden, ist es nicht möglich diese „Messungen“ durch überzeugende Immunfluoreszenzmarkierungen für das „unbewaffnete“ Auge zu untermauern. Grauwertunterschiede in Bereichen kleiner als 10 GL lassen sich nur schwer an optischen Schnitten nachvollziehen und man kann nicht ausschließen in wie weit methodisch bedingte Parameter Unterschiede in Pixelintensitäten um den numerischen Wert von 10 GL bewirken. Gleichwohl hat aber die semiquantitative Auswertung dieser optischen Schnitte Befunde geliefert, die Signifikanztests standhalten und sich in den weiteren Kontext der aktuellen Literatur zu dieser Thematik einfügen lassen (siehe Kapitel 4.).

3.6 In-vitro Versuche mit dem PKC alpha Inhibitor GÖ6976

Dunkeladaptierte Mb-Terminalen, die 30 min helladaptieren zeigen eine pPKC-IR, wie sie sich auch von in-vivo helladaptierten Terminalen bekannt ist (Abb. 19). Die pPKC-IR ist in den Terminalen homogen verteilt.

Dunkeladaptierte Mb-Terminalen, die weiterhin 30 min im Dunkeln gehalten wurden, zeigen eine eher membranassoziierte pPKC-IR, während im Inneren der Terminale die Immunfluoreszenz schwächer ausgeprägt ist. Dieser Befund ist ebenfalls vergleichbar mit der in-vivo gefundenen Verteilung der pPKC-IR dunkeladaptierter Bipolarzellen. Somit bleibt zunächst festzustellen, daß sich Mb-Terminalen in-vitro helladaptieren lassen bzw. sie verbleiben dunkeladaptiert.

Wird PKC alpha pharmakologisch mit einem isoformspezifischen Inhibitor (GÖ6976) blockiert, so wird dadurch die subzelluläre Verteilung der pPKC-IR beeinflusst. Dunkeladaptierte und 30 min im Dunkeln belassene Netzhautpräparate, die in Gegenwart von GÖ6976 inkubiert wurden, zeigen eine deutlich diffusere pPKC-IR, als Präparate die ohne GÖ6976 inkubiert wurden. Die pPKC-IR zeigt ein Verteilungsmuster ähnlich dem helladaptierten Zustand.

Die semiquantitative Auswertung (Angabe des Verhältnisses von MC pPKC-IR / CC pPKC-IR) ergibt für helladaptierte Mb Terminalen annähernd einen

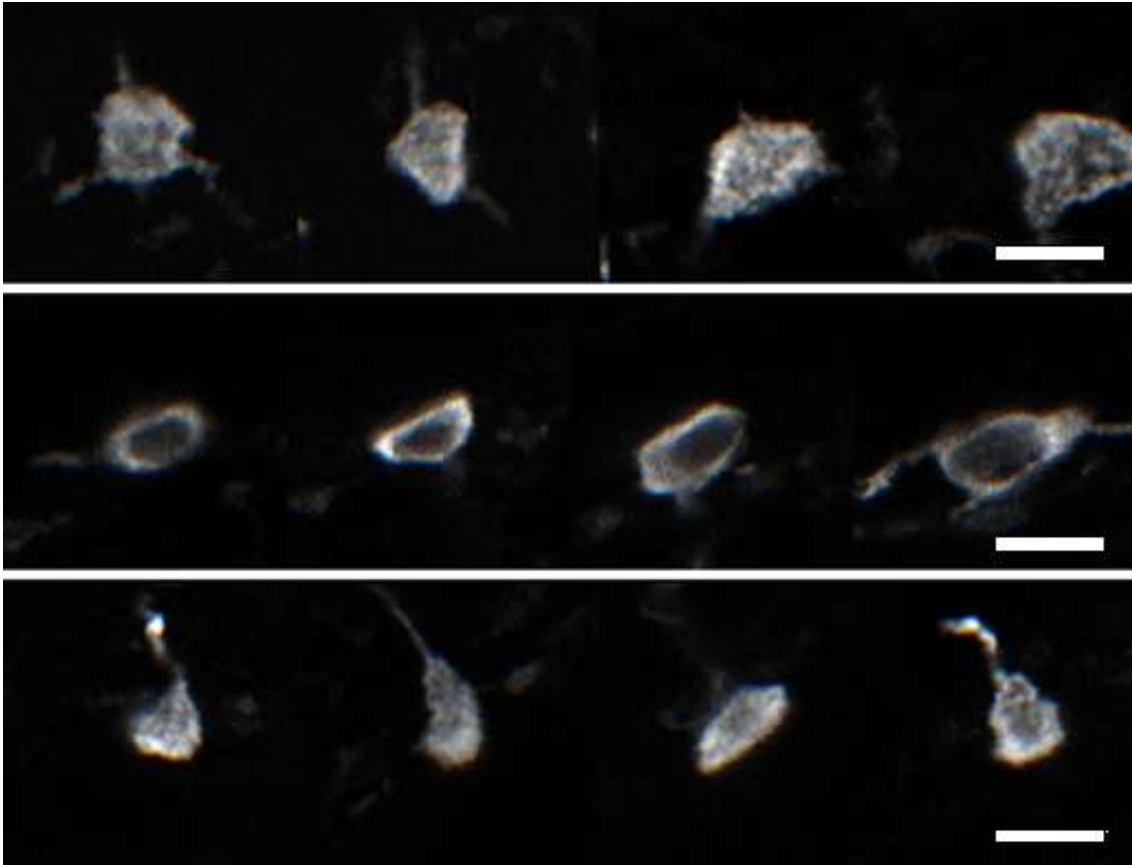


Abb.19. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen alpha pPKC-ir Mb-Terminalen aus Netzhäuten, die 30 min in-vitro unterschiedlichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt wurden. In den drei Reihen sind repräsentative Beispiele markierter Terminalen aufgeführt (jeweils ein optischer Schnitt aus der Mitte der Terminalen). Versuchsansätze: obere Reihe, dunkeladaptierte Netzhäute wurden 30 min in Normalringern helladaptiert; mittlere Reihe: dunkeladaptierte Netzhäute wurden 30 min in Normalringern im Dunkeln belassen; untere Reihe: Versuchsansatz wie bei der mittleren Reihe beschrieben, in Gegenwart von Gö6976 im Medium. Die in-vitro Versuche zeigen, daß die membranständige Lokalisation von alpha pPKC IR von dunkeladaptierten Terminalen (mittlere Reihe) deutlich diffuser wird in Gegenwart von 2.3 nM Inkubationslösung des spezifischen alpha PKC Inhibitor (Gö6976) (untere Reihe). Die Aktivität von alpha PKC hat somit Einfluss auf die subzelluläre Verteilung des Enzyms. Balken: 10 µm.

Quotienten von 1, wohingegen in dunkeladaptierten Terminalen ein fast dreifach höherer Wert bestimmt wurde. Die Auswertung von Gö6976 behandelten dunkeladaptierten Terminalen ergab Werte, die sich von denen der helladaptierten Terminalen nicht unterscheiden (Abb. 20). Diese Befunde konnten mit Hilfe von Western Blot Analysen nach differentieller Ultrazentrifugation, bei gleichen Versuchsansätzen, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Aktivität von PKC alpha beeinflusst also die Verteilung des Enzyms.

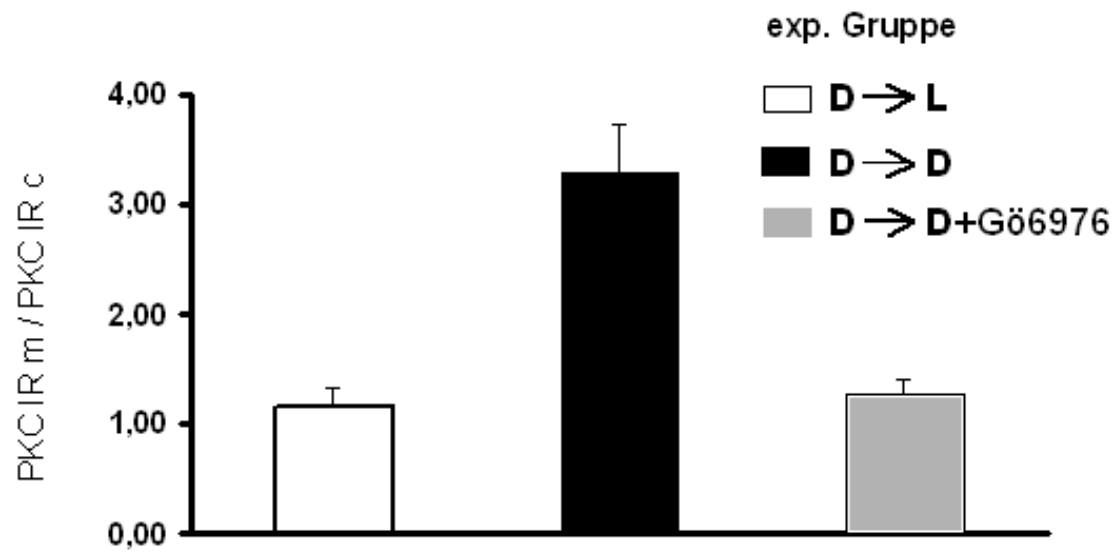


Abb.20. Balkenhistogramm zur Darstellung von Änderungen von PKC-IR innerhalb von Mb Terminalen *in vitro* in Abhängigkeit von Hell- und Dunkeladaptation und alpha PKC Inhibition. PKC-IR wird in kleinen Arealen ($0,95 \mu\text{m}^2$) dicht an der Plasmamembran (Membrankompartiment) und im Innern der Terminale (zytosolisches Kompartiment) gemessen (siehe Kap. Material und Methoden). Dargestellt ist das relative Verhältnis der Fluoreszenz- bzw. Pixelintensität in den beiden Kompartimenten nach 30 min Kurzzeitkultur. Zum einen zeigt die Graphik, daß Helladaptation im Gegensatz zu dunkeladaptierten gehaltenen Netzhäuten eine Zunahme des PKC-Signals im zytosolischen Kompartiment zur Folge hat. Zum anderen bewirkt die pharmakologische Hemmung von alpha PKC durch den spezifischen Blocker GÖ6976, daß die bevorzugt membranassoziierte PKC-IR gestört wird. Je Ansatz wurden 8 Netzhäute (von 4 Tieren) mit jeweils 20 Terminalen pro Netzhaut untersucht (Mittelwert \pm Stabw.).

3.7 FM 1-43 Experimente zur Vesikeldynamik

Mittels isoformspezifischer Pharmaka, wie GÖ6976 (Calbiochem) soll die Rolle der alpha PKC Isoform bei der Vesikeldynamik untersucht werden (Abb. 21).

Initial wurde die spontane endozytotische Aktivität gemessen, um eine Vergleichbarkeit herzustellen. Die beobachtete FM 1-43 Aufnahme betrug nach 40min Normal-Fisch Ringer Inkubation der Slice-Präparate durchschnittlich 1.7 ± 1.2 FM 1-43 markierte Mb-BCTs pro $146\mu\text{m}$ Bildbreite (Abb. 21a). In einem weiteren Durchgang wurde überprüft, ob die Präparate unter den gegebenen Bedingungen noch auf Stimuli reagieren können. Bei einer Stimulation mit 50mM Kalium-Ringer über einen Zeitraum von 5 min, führte die Inkubation zu einer Zunahme der Anzahl gefärbter Bipolarzellterminalen auf 2.3 ± 1.3 pro Bildbreite, somit war von einer funktionellen Unversehrtheit der Präparate auszugehen (Abb. 21d).

Bei Inkubation mit dem alpha PKC spezifischen Inhibitor GÖ6976 (IC_{50} 2.3nM) nimmt die Anzahl der gezählten Mb-Terminalen signifikant ab (Mann Whitney Test: $p < 0.05$). Durchschnittlich erhält man 0.8 ± 0.7 Terminalen pro Bildbreite (Abb. 21b). Aus dieser Beobachtung ist zu schließen, daß PKC alpha unter Normalringerinkubation einen modulierenden Einfluß auf die Vesikeldynamik ausübt. Die Blockade von alpha PKC beeinträchtigt aber nicht die Kalium-Ringer vermittelte Farbstoffaufnahme.

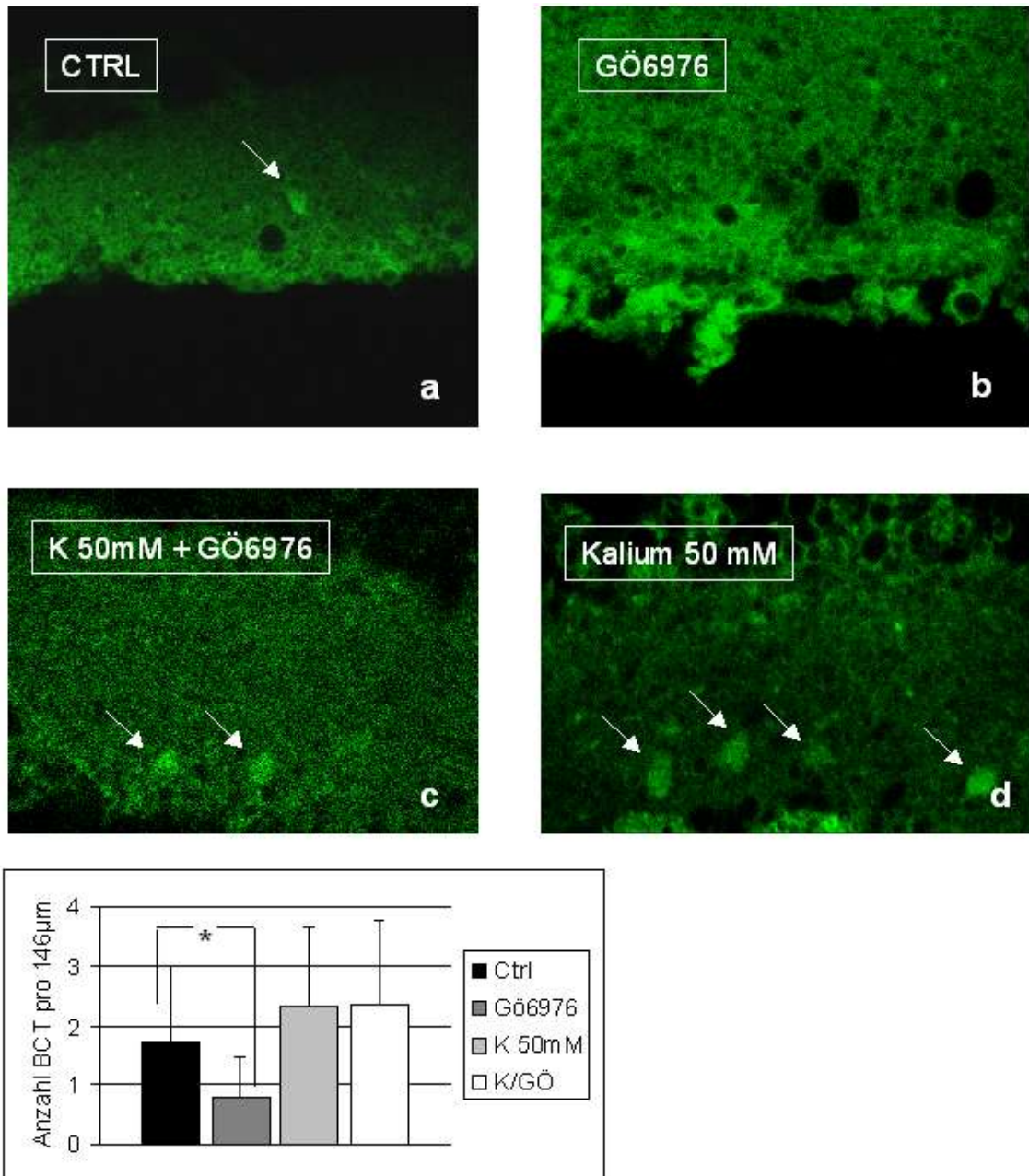


Abb.21. Inkubiert wurden 50µm dicke Slice von helladaptierten Goldfischen. Die Inkubationsdauer für GÖ6976 betrug 30min. Kalium Ringer (50mM) wurde zusammen mit FM 1-43 (5µm) nach 5 min mit normal Ringer ausgewaschen. Eine Entfärbung tritt nach 5min FM 1-43 Inkubation nicht mehr auf (Mack et al., 2000). Gezählt wurden nur deutlich positive Mb Terminalen in einem Bild (63Acroplan Objektiv / w; Zoom 1;), dessen Bilddurchmesser 146µm betrug. Signifikanzniveaus : * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ *** : $p < 0.001$ und n.s.: nicht signifikant (Test: Mann-Whitney Test). Unter Kontrollbedingungen (Bild a) färben sich signifikant mehr Terminalen an als bei Inkubation mit dem PKC alpha Inhibitor GÖ6976 (Bild b). Zur Überprüfung der Reaktionsfähigkeit und Vitalität des in-vitro Systems wurden Inkubationen mit 50mM Kalium Ringerlösung durchgeführt. Durch die starke Depolarisation sind sehr viele Terminalen aktiv geworden und inkorporierten FM 1-43 (Bild d). Die Kombination beider Ringersysteme, also Kalium und GÖ6976, unterschied sich nicht von der alleinigen Kaliuminkubation, vermutlich wiegt hier die durch 50mM Kalium verursachte Depolarisation stärker als die Inhibition (Bild c). PKC alpha scheint eine wichtige Rolle zu spielen bei der Aktivität von Synapsen und den damit verbundenen Änderungen in der Vesikeldynamik.

3.8 Amplifikation von PKC alpha cDNA im Goldfisch und Zebrafisch

Mit den hergestellten Primern (siehe Kap. 2.9) konnte, aus dem Homogenisat der Zebrafischretina, mRNA isoliert und cDNA amplifiziert werden, deren Sequenz mit großer Wahrscheinlichkeit (siehe Kap. 2.9) für PKC alpha kodiert. Das Agarosegel für den Zebrafischversuch ist hier nicht gezeigt.

Für beta Aktin erhält man gleich intensive Banden, sowohl im Hellen als auch im Dunkeln. Die beta Aktin Expression unterliegt hier keiner adaptionsabhängigen Veränderung zu den untersuchten Zeitpunkten (4h nach Licht „an bzw. aus“).

Beta Aktin eignet sich daher gut, um relativ dazu, semiquantitative Aussagen treffen zu können über weitere cDNA Amplifikate, wie PKC alpha cDNA. Wie bereits im Zebrafisch gezeigt erhält man beim Goldfisch eine cDNA Bande an gleicher Position im Agarosegel. Im Hellen ist deutlich mehr cDNA für PKC alpha amplifiziert worden als im Dunkeln. Zu beachten ist, daß in Abb. 22 immer nur die Bahnen miteinander verglichen werden, in welchen die gleiche cDNA Menge (1.5µl) in die PCR eingesetzt wurde.

Im biologischen Kontext interessant ist die Tatsache, daß mit den gleichen Primersequenzen, sowohl im Goldfisch als auch im Zebrafisch PKC alpha cDNA amplifiziert werden konnte. Beide Cypriniden sind eng verwandt, doch deuten neueste immunhistochemische Untersuchungen auch (Yazulla und Studholme, 2001) auf eine Vielzahl von Unterschieden hin.

Weiterhin sind aus dem Agarosegel (Abb. 22) klar ersichtlich, die zu diesem Zeitpunkt bestehenden methodologischen Schwierigkeiten. Bei den verwendeten PCR Bedingungen stellen sich zwei unspezifische Banden dar, deren Auftreten bisher noch nicht eliminiert werden konnte. Vor diesem Hintergrund sind die hier vorgestellten Ergebnisse mit Rücksicht zu interpretieren.

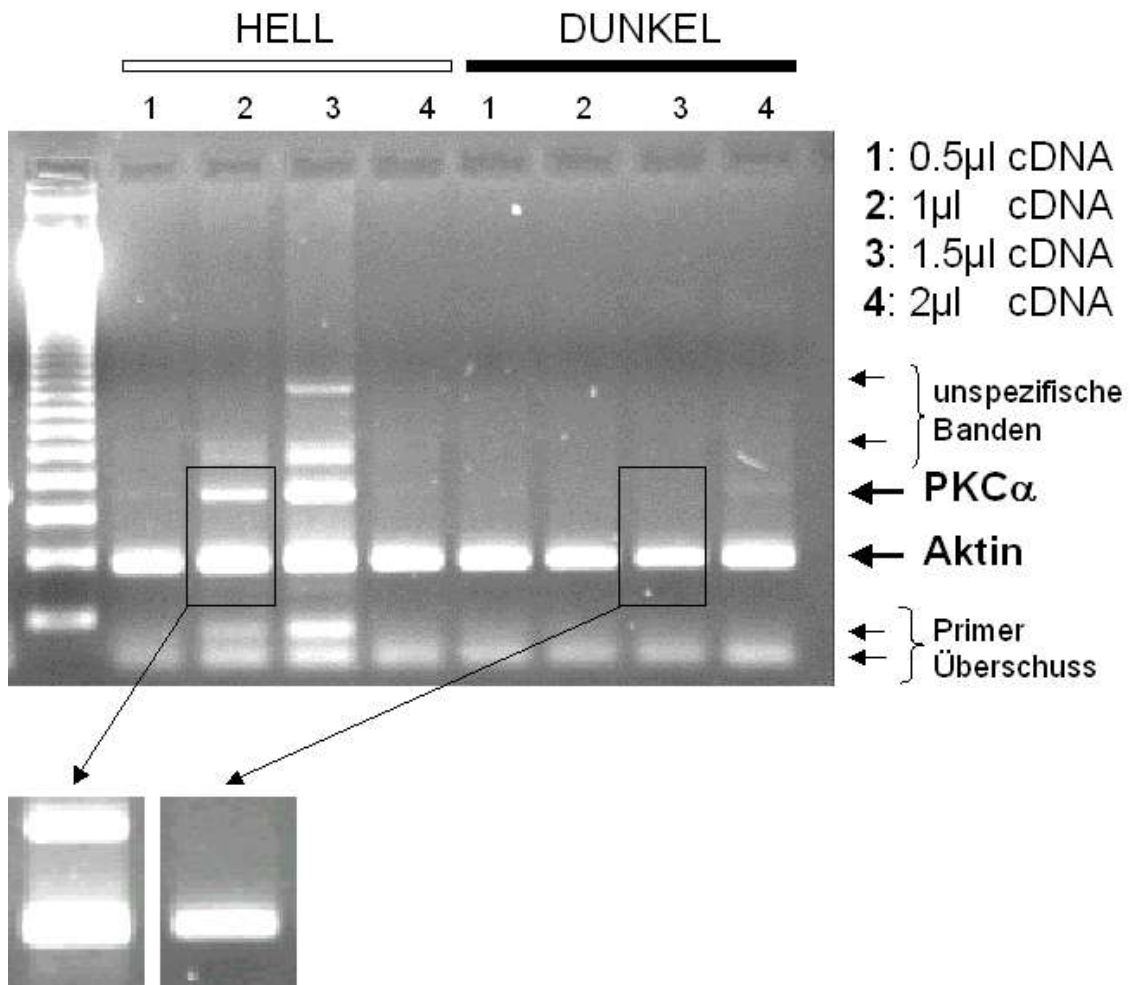


Abb.22. Das obere Bild zeigt ein Agarosegel von alpha PKC und beta Aktin Amplifikaten bei unterschiedlich eingesetzter cDNA Menge. Die beta Aktin Bande ist im Hellen und im Dunkeln konstant. PKC alpha zeigt ausschließlich im Hellen eine intensive Bande. Im unten dargestellten Ausschnitt aus dem oben gezeigten Agarosegel wird das Vorliegen von PKC alpha mRNA im Hellen (Zeitpunkt: 4h nach Licht „an“) noch einmal verdeutlicht. Die PCR Bedingungen sind noch nicht vollständig optimiert, daher finden sich im unteren Bereich des Gels ein deutlich sichtbarer Primerüberschuss und zwei unspezifische Banden über dem alpha PKC Signal im Hellen. Qualitativ wurde dieser Versuch mehrfach wiederholt und das oben wiedergegebene Ergebnis reproduziert.

3.9 Unterliegt die PKC Dynamik in-vivo endogenen Rhythmen oder ist Hell / Dunkel der Reiz für die Auslösung dynamischer Vorgänge?

Initial stand die Frage im Vordergrund, wie schnell laufen die Translokationsvorgänge ab, die zwischen den Hell/Dunkel Adaptationszuständen stattfinden. In einer Zeitreihe wurden dunkeladaptierte Mb-Terminalen in-vivo untersucht, die 1 min , 5 min , 15 min und 25 min Licht exponiert waren. Es wurde keine Translokation beobachtet (Befunde nicht gezeigt). Im Folgeexperiment wurde die pPKC (Ser657) Dynamik in Mb-Terminalen über 24h beobachtet, um endogene Rhythmen für dynamische Prozesse, wie Translokation des Enzyms, auszuschließen.

Wie aus vorrausgegangenen Experimenten bekannt, zeigte sich zu den Zeitpunkten im Hellen ein durchschnittlich kleinerer MC/CC Quotient im Vergleich zum Dunkeln. Innerhalb der Hell- und der Dunkelphasen wurden Veränderungen gemessen, die sich signifikant zu vorrausgehenden und direkt folgenden Zeitpunkten unterscheiden (Hell/Dunkel 06:00 Uhr / 18:00 Uhr). Im Dunkeln nimmt MC/CC Quotient signifikant von 5.3 ± 1.5 (n=12), um 22:00 Uhr, nach 2.4 ± 0.8 (n=11), um 02:00 Uhr, ab (t-Test; $p < 0.001$). Eine signifikante Zunahme ist im helladaptierten Präparat von 1.3 ± 0.6 (n=11), um 10:00 Uhr, auf 3.2 ± 1.2 (n=11), um 14:00 Uhr, zu beobachten (t-Test; $p < 0.001$) (Abb. 23).

Die deutlichsten Unterschiede des Membran/Zytosol Quotienten der pPKC-IR finden sich zwischen den Zeitpunkten des Beleuchtungswechsels. Um 18:00 Uhr, beim Ausschalten des Lichtes beträgt der Wert 1.4 ± 0.3 (n=11), im Vergleich zum Zeitpunkt 22:00 Uhr ist der Quotient 5.3 ± 1.5 (n=11). Zu diesem Zeitpunkt findet man die signifikanteste (t-Test; $p < 0.001$) Zunahme des Membran/Zytosol Quotienten. Hochsignifikant (t-Test; $p < 0.001$) ist dazu die Abnahme des Wertes von 3.2 auf 1.3 um 10:00 Uhr.

Im Dauerdunkelversuch wurde besonders der Zeitpunkt des Wechsels von Dunkel nach Hell beobachtet, um den Einfluß von endogenen Rhythmen zu untersuchen. Die Messungen ergaben eine Tendenz zur zunehmenden zytosolischen Lokalisation von pPKC alpha, wie es in helladaptierten

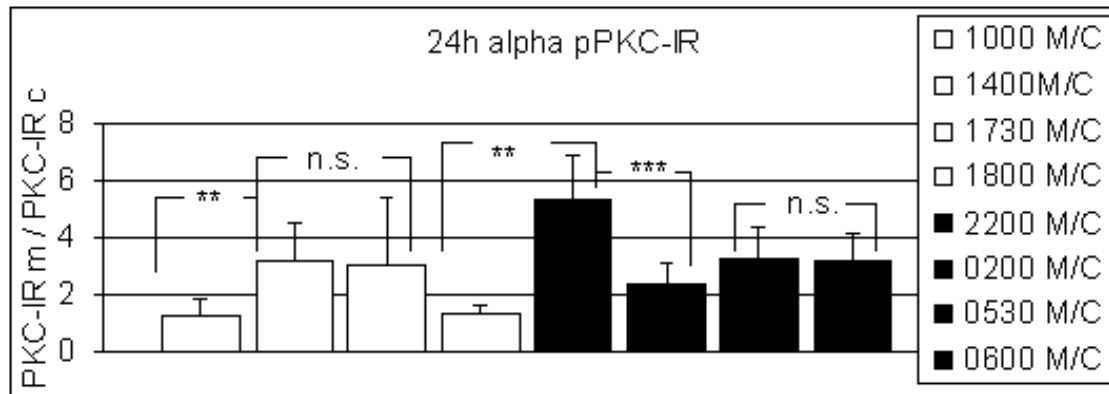


Abb.23. Balkenhistogramm zur Darstellung möglicher endogener Effekte auf die Verteilung von pPKC-IR in Mb Terminalen über einen Zeitraum von 24 h. Aufgeführt sind Grauwertrelationen (membranassoziierter Auswertraum / zytosolischer Auswertraum) von markierten Mb Terminalen (weitere Erläuterungen siehe Text). Der Wechsel von Hell nach Dunkel und umgekehrt beeinflussen signifikant Verteilung von pPKC-IR in Mb Terminalen. Auf den Diagrammbalken sind Standardabweichungen angegeben. Signifikanzniveaus : * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ *** : $p < 0.001$ und n.s.: nicht signifikant. (Test: students t-Test; Mann-Whitney Test).

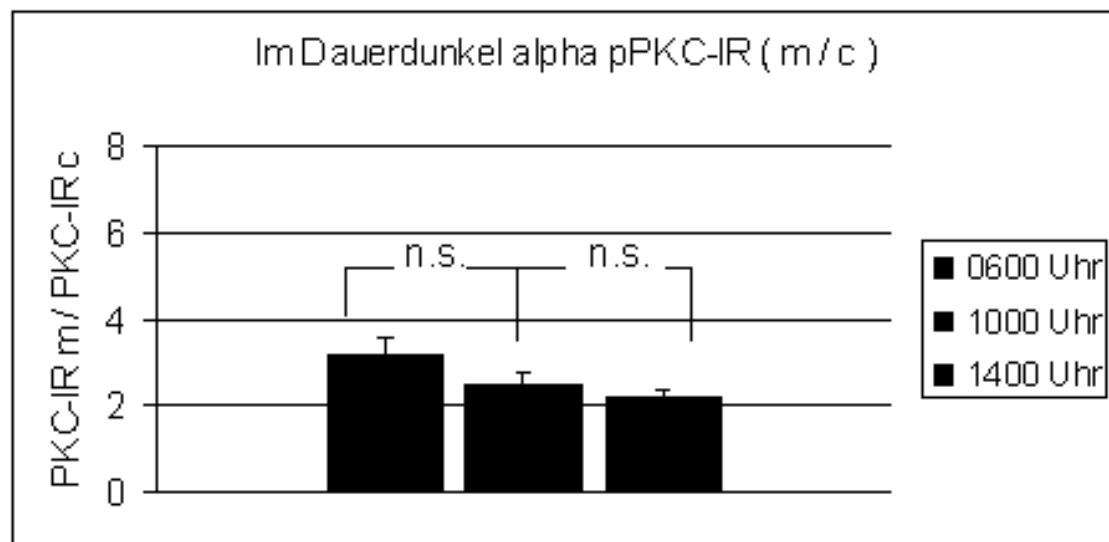


Abb.24. Balkendiagramm zur Darstellung möglicher Effekte von Dauerdunkel auf subzelluläre Verteilung von pPKC-IR in Mb Terminalen. Dauerdunkel hat keinen signifikanten Einfluß auf die Verteilung von pPKC-IR (hier dargestellt als Membran/Zytosol Verhältnis) in Mb Terminalen, die zu unterschiedlichen Zeiten während der subjektiven Hellphase präpariert wurden. Signifikanzniveaus : * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ *** : $p < 0.001$ und n.s.: nicht signifikant. (Test: students t-Test; Mann-Whitney Test). (Anzahl n der untersuchten Terminalen zu jedem Zeitpunkt 12).

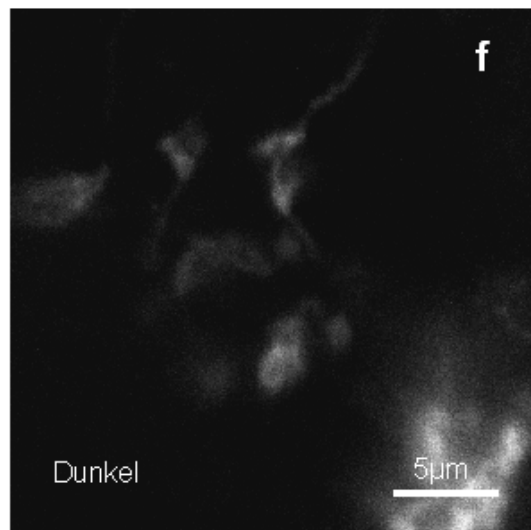
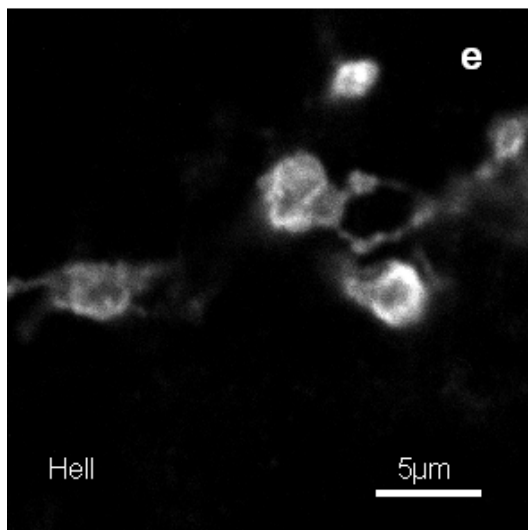
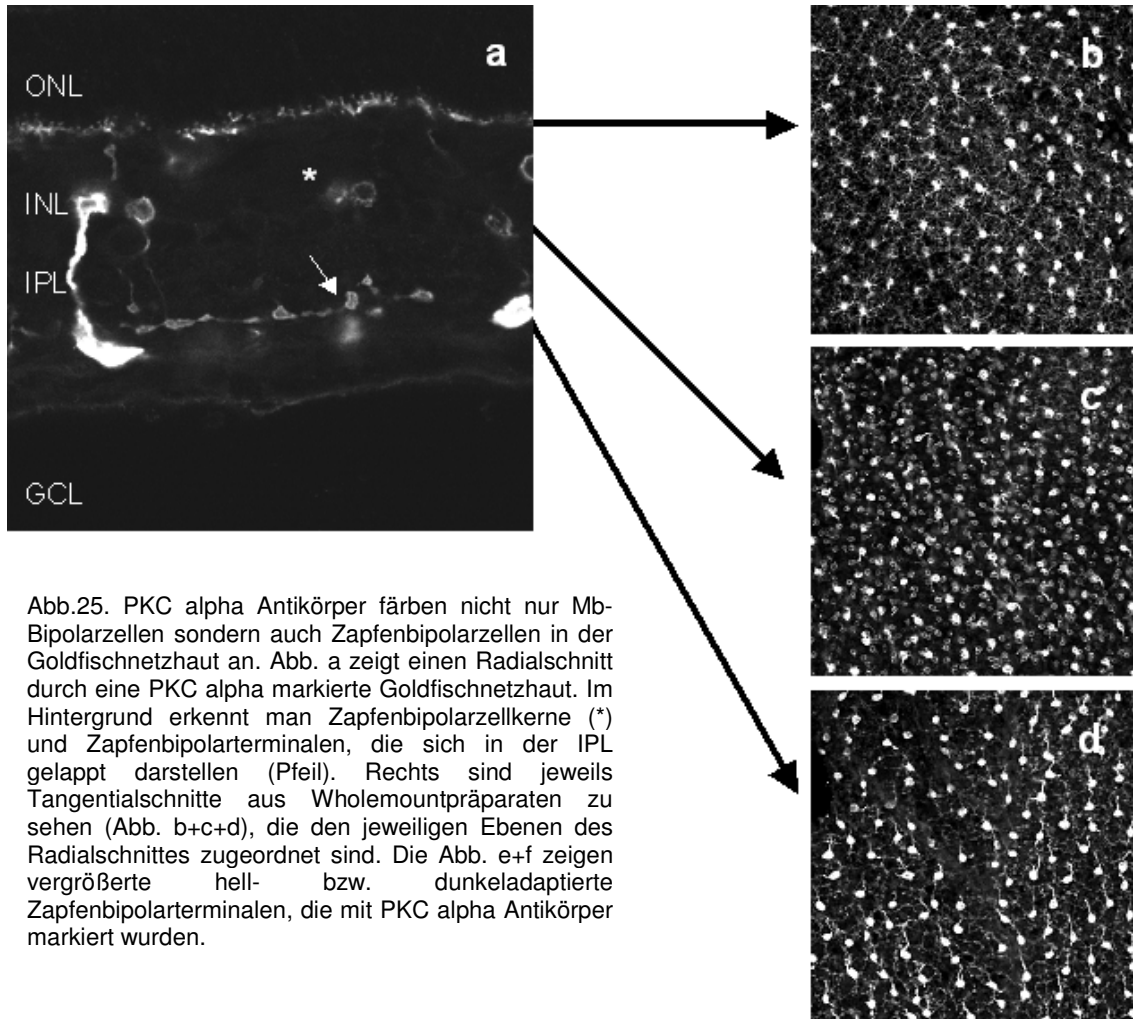
Netzhäuten beobachtet wurde. Diese Tendenz war aber statistisch nicht signifikant (t-Test; n.s.). Hieraus kann geschlossen werden, das der exogene Reiz „Licht“ ein entscheidender Stimulus sein dürfte, in dessen Ereigniskette die Translokationsvorgänge von PKC bzw. pPKC in Mb-BCTs eingebunden sind. Eine schwache, in ihrer Bedeutung für die PKC Dynamik nachrangige,

endogene Komponente ist aber bei den vorliegenden Befunden nicht ganz auszuschließen (Abb. 24).

3.10 Zapfenbipolarzellterminalen

In lichtmikroskopischen Aufnahmen von Goldfischnetzhautpräparaten wird deutlich, daß alpha PKC Antikörper nicht nur Mb-BCTs markieren, sondern auch eine zweite Zellpopulation, bei der es sich um PKC-ir Zapfen-BCs handelt (Abb. 25a, (Pfeil)).

Morphologisch erscheinen die Zapfenterminalen in der IPL lobulär, mit zwei bis drei PKC-ir „Lobuli“. Im Tangentialbild (Abb. 25 b+c+d) wird die, im Vergleich zur Mb-Terminals, wesentlich größere „Verzweigungsfläche“ der Zapfenterminals sichtbar. Die Terminalen der Zapfenbipolarzellen enden und verzweigen etwas weiter distal in der IPL als die der Mb-Bipolarzellen. Die Zellkörper der Zapfen-BCs liegen in der Mitte der INL, während die Perikarya der Mb-Bipolarzellen sich in der distalen INL befinden. Die Zellkörper der PKC-ir Zapfenbipolarzellen sind schwächer angefärbt als die Somata der Mb-BCs (siehe auch Abb. 5). In ihrem Adaptationsverhalten folgen die Zapfenterminals dem der Mb-BCTs, d.h. in helladaptierten Zapfenbipolarzellen ist die PKC-IR deutlich homogen in den „Lobuli“ verteilt, wohingegen in dunkeladaptierten Zapfenbipolarzellen die PKC-IR schwächer und „randständig“ bzw. membranassoziiert lokalisiert ist (Abb. 25 e+f). Line-Scan Messungen Zapfenterminals haben sich aufgrund ihrer Größe als unpraktisch erwiesen, und wurden daher nicht in diese Arbeit aufgenommen.



4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von PKC alpha in der Bipolarzellterminale des Goldfisches durchgeführt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die unterschiedliche subzelluläre Verteilung nicht auf zirkadiane Einflüsse zurückzuführen ist, sondern durch unterschiedliche Adaptationszustände verursacht wird. Darüberhinaus wurde im Ergebnisteil der Einfluß von PKC alpha auf die Vesikeldynamik berichtet.

Im Gegensatz zu früheren Studien (Vaquero et al., 1997; Behrens et al., 1998; Gabriel et al., 2001), wurden hier zum erstmal immunhistochemische und biochemische Experimente mit phosphospezifischen Antikörpern in der Goldfischnetzhaute durchgeführt. Neu ist ebenfalls die isoformspezifische pharmakologische Manipulation von PKC alpha mittels eines selektiver Inhibitors (GÖ6976).

Im Folgenden sollen zuerst methodische Aspekte dieser Arbeit besprochen werden, um dann die Ergebnisse vor den Hintergrund anderer aktueller Untersuchungen und Erkenntnisse zu diskutieren.

4.1 Diskussion der Methoden

Kritische Betrachtung der Methoden und die Kenntnis der Grenzen der angewandten Methoden sind wichtige Gesichtspunkte bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse. Im Folgenden sollen einige Bemerkungen zu den verwendeten Methoden angeführt werden.

4.2 Nachweis von alpha pPKC-IR

Mit Hilfe des phosphospezifischen Antikörpers ist es gelungen, in Kryoschnitten ein spezifisches Signal für pPKC alpha zu erhalten. Der phosphospezifische Antikörper erkennt PKC alpha, welches an der Position Ser657 phosphoryliert ist (siehe Datenblatt zu diesem Antikörper, Santa Cruz). Die Aktivität von PKC wird u.a. durch Phosphorylierungen reguliert. Neueste Untersuchungen legen

nahe, daß PKC phosphoryliert wird, um aktivierbar zu sein für die second messenger und Koaktivatoren Diacylglycerol (DAG), Ca^{2+} und Phospholipide (Gomperts et al., 2003). Zwei von drei Phosphorylierungsorten werden autophosphoryliert (Keränen et al., 1995; Kraus, 2000), wobei am ersten Ort möglicherweise die Phosphoinosid 3-Kinase und PDK1-Proteinkinase angreifen (Gomperts et al., 2003). Zusammengefasst muß gesagt werden, daß all diese Phosphorylierungsvorgänge sequenzartig zu einer Zunahme der Aktivität und katalytischen Kompetenz von PKC führen (Kap 2.5.) (Le Good et al., 1998; Gomperts et al., 2003).

Es bleibt allerdings unbekannt, wie lange PKC alpha in aktiver Form verweilt, bevor das „aktive“ Enzym einerseits durch die Wirkung von Phosphatasen dephosphoryliert wird, oder andererseits durch die „Wegnahme“ der Koaktivatoren die Aktivität des Enzyms herunterreguliert wird; phänomenologisch wird letzteres auch als Desensitisierung bezeichnet. Literaturbefunde zeigen, daß das Enzym z.T. sehr schnell desensitiert (im unteren Sekunden- bis Minutenmaßstab) (Parker und Dekker, 1997). Somit sind die immunhistochemischen Markierungen stets vor dem Hintergrund der komplexen Steuerung der Aktivität von PKC zu betrachten, bei denen die Phosphorylierung- und Dephosphorylierungskinetik eine entscheidende Rolle spielen (Liu und Heckman, 1998).

4.2.1 Immunhistochemie

Werden Antikörper bei dickeren Gewebeproben (16µm) verwendet, stellt sich das grundsätzliche Problem der Penetration von Immunglobulinen in das Gewebe. Die Verwendung von Detergenzien (Triton X-100), fördert durch Permeabilisierung von Membranen das Eindringen von Antikörpern in die Zelle. Allerdings wird dadurch die Struktur der Zelle teilweise geschädigt (Eldred et al., 1983). Werden die Gewebestücke in einer aufsteigenden Sukrosereihe (10 - 30% Sukrose in PBS) zur Kryoprotektion inkubiert und anschließend eingefroren, wird die Antikörperpenetration gefördert. Hierunter leidet ebenfalls die Gewebeintegrität.

Im Allgemeinen war die Beeinträchtigung der Gewebe durch immunhistochemische Aufbereitung gering, und hatte keinen Einfluß auf die lichtmikroskopische Auswertung der subzellulären Verteilung der unterschiedlichen Fluoreszenzsignale.

An dieser Stelle ist noch einmal ausdrücklich darauf hinzuweisen, daß Hell- und Dunkelmaterial histologisch in gleicher Weise behandelt wurde, und nur Gewebe miteinander verglichen wurden, die auf einem Objektträger nebeneinander und damit gemeinsam inkubiert wurden.

4.2.2 Semiquantitative Immunhistochemie

Da in dieser Arbeit auch geringe Änderungen von Grauwerten gemessen wurden, hängt die Validität der Ergebnisse stark vom Versuchsansatz und vom Ausschluß von Störgrößen ab. Ein wesentlicher Punkt bei der Erhebung von Grauwerten ist die Konstanzhaltung von Laserparametern (Attenuation und Filterset), sowie ein möglichst optimales Aussteuern (Thresholding) der Kontrast- und Helligkeitsparameter. Das Aussteuern der beiden Parameter ist ein subjektiver Vorgang (Riux et al., 2002), der aber durch die Range Control Funktion des LSM 410 objektivierbar und damit handhabbar wird. Mittels dieser Funktion lassen sich Übersteuerungen sichtbar machen, die sodann vermieden wurden. Die lichtmikroskopischen Parameter, wie Blendeneinstellungen und Objektiv wurden ebenfalls immer gleich belassen.

Es gibt nur wenige Beispiele in der Literatur, wo überzeugend der Versuch unternommen wurde, Unterschiede in der Intensität immunhistochemischer Markierungen als Grundlage zu nehmen, um Aussagen über quantitative Veränderungen der nachgewiesenen biologischen Substanzen (Neurotransmittermoleküle, Proteine) zu treffen.

Beispielhaft hierfür sind Untersuchungen über dynamische Veränderungen in der Menge kleinerer Aminosäuren in der Wirbeltiernetzhaut von Marc et al. zu nennen (Marc et al., 1995; Marc und Cameron, 2001). In diesen Arbeiten werden quantitative Veränderungen in der Immunmarkierung mit Antikörper gegen kleine Aminosäuretransmitter (u.a. Glutamat, Glyzin) an

Semidünnschnitten der Cyprinidennetzhaut untersucht. Die Autoren verwenden für ihre quantitativen Aussagen Immunmarkierungen an geschnittenen „Gewebehomogenat-Blöcken“, die definierte Menge eines Antigens enthalten (externer Standard). Mit Hilfe dieser Standards können dann Aussagen über die Veränderung von Aminosäuremengen in diskreten Zellpopulationen in Abhängigkeit von Hell- und Dunkeladaptation erbracht werden. Vergleichbare Ansätze, um Mengenveränderungen von Proteinen in einem intakten Gewebeverband darzustellen, liegen bisher überzeugend noch nicht vor. Dies hängt auch mit besonderen Schwierigkeiten von immunhistochemischen Nachweisen von Proteinen zusammen. So konnten Gabriel et al. (2001) bei ihren Untersuchungen zum Einfluß endogener Rhythmen auf PKC-markierte Stäbchenbipolarzellen in der Rattennetzhaut zeigen, daß schwächere oder abwesende alpha PKC Markierungen nicht zwangsläufig bedeuten müssen, daß das Protein nicht am Ort vorhanden ist. Durch die Verwendung von „konformations-sensitiven“ Antikörper gegen PKC-Alpha konnte die Gegenwart des Proteins gezeigt werden, welche mit einem anderen Antikörper keine Anfärbungen ergaben (Gabriel et al., 2001). Der von Gabriel und Mitarbeiter verwendete „konformations-sensitive“ Antikörper war leider kommerziell nicht mehr verfügbar, sodaß er für unsere Untersuchungen nicht zur Verfügung stand.

Vor diesem Hintergrund wurde eine andere semiquantitative Untersuchung und Auswertung vorgezogen und etabliert. Da es nicht möglich war einen internen Standard für PKC alpha und pPKC alpha zu entwickeln, erfolgte eine Kalibrierung an einem externen Grauwerttablet. Diese Kalibrierung erlaubt nur einen relativen Vergleich der Grauwerte zueinander, nicht aber absolute Aussagen über Konzentrationenverhältnisse. Daher wurden in dieser Arbeit nur relative Grauwerte, nach der Subtraktion eines durchschnittlichen Hintergrundwertes, angegeben.

Um die subzelluläre Verteilung von PKC in Mb-BCTs untersuchen zu können mußte eine Methode entwickelt werden, die verschiedene subzelluläre Räume unterscheiden kann. Mittels eines 20 x 20 Pixel ($0.95\mu\text{m}^2$) großen ROI (ROI bei

einer Verwendung des 63x Immersionsobjektivs; elektronischer Zoom 8) wurde jeweils der durchschnittliche Grauwert eines subzellulärer Raumes erfaßt, der entweder zufällig an einem Membranabschnitt lokalisiert war, oder sich an einer zufälligen Stelle im Zellinneren befand.

Hinterfragt werden muß hier die zufällige Verteilung der ROI. Das Bildmaterial wurde durch zwei Personen ausgewertet, denen es zum Zeitpunkt der Auswertung nicht möglich war Kontrolle und Verum zu unterscheiden. Dieses Vorgehen erlaubte subjektive Einflüsse, wie Voreingenommenheit und Erwartungshaltung, zu minimieren. Die Ergebnisse beider Auswertungen waren innerhalb einer Toleranzbreite von $\pm 5\%$ der Grauwerte gelegen.

Die Auswertung mittels definiert großer ROI erhielt den Vorzug vor einer Auswertung der Grauwerte anhand von Linescans, weil Linescans die Grauwerte auf einer Linie der Breite eines Pixels wiedergeben und somit mit einer größeren Ungenauigkeit vergesellschaftet sind, was die Repräsentativität der Messwerte angeht. Die Erfassung definierter ROI ist somit repräsentativer für die tatsächliche Situation.

In den im Ergebnisteil vorgestellten Experimenten wurden unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen eines Enzymes untersucht. Wenngleich in dieser Arbeit von einem zytosolischen Kompartiment (CC) und einem Membrankompartiment (MC) gesprochen wird, handelt es sich nicht um klar abgegrenzte Kompartimente (Alberts et al., 2000), wie sie für Organellen definiert sind. Vielmehr werden in dieser Arbeit funktionelle Räume in der Mb-BC bzw. BCT betrachtet, die man als membranassoziiert und zytosolassoziiert verstehen muß. Gerade diesem membranassoziierten Raum gilt besonderes Interesse, da hier MARCK Proteine und RACK Proteine zu finden sind, die als Substrate und Ankerproteine für aktivierte PKC dienen (Aderem, 1995; Dorn und Mochly-Rosen, 2002; Gomperts et al., 2003). Im zytosolischen Raum wird eine Abgrenzung einzelner Kompartimente schwieriger, hier wird zunehmend der Begriff der Domänen und Mikrodomänen auf Proteinebene verwendet (De Camilli et al., 2001).

4.2.3 Biochemische Methoden

Es wurden Western Blots zum Nachweis von PKC durchgeführt, um die immunhistochemischen Ergebnisse mit einer weiteren und unabhängigen Methode zu validieren. Hierzu wurden Netzhäute homogenisiert und durch Zentrifugationsschritte aufgearbeitet. Die Methode der differentiellen Ultrazentrifugation orientierte sich an vorrausgegangen Arbeiten (Osborne et al., 1991)

Die eingescannten Immunoblots wurden in ein digitales Bild überführt, mit einem Grauwertbereich von 0-255, analog zu der Vorgehensweise bei den Immunfluoreszenzaufnahmen. Als interner Standard wurde rekombinante PKC alpha verwendet, die bei allen Elektrophoresen zusätzlich zur Markerbande eingesetzt wurde.

Unter internem Standard versteht man, im eigentlichen Sinne, einen Standard, der in gleicher Weise experimentell behandelt wurde, wie die eigentliche Probe. Das rekombinante Protein durchlief in diesem Falle aber keine immunhistochemische und biochemische Aufbereitung, somit sind auch keine Aussagen über den Verlust von Material bei der Aufarbeitung bzw. auf die erhaltenen Proteinmengen möglich gewesen. Angesichts dieser Tatsache, werden die Western Blot Ergebnisse nicht quantitativ zur Interpretation herangezogen, sondern nur qualitativ.

In der immunohistochemischen Beurteilung, wurden nur PKC positive Mb Bipolarzellterminalen untersucht. Im Vergleich dazu, werden in der biochemischen Untersuchung des Netzhauthomogenisates nicht nur Bipolarzellterminalen sondern alle Zellen der Netzhaut verarbeitet. Darunter befinden sich u.a. die PKC-ir Zapfen-BCs, die ebenfalls eine Hell/Dunkel abhängige PKC Verteilung aufweisen. Die immunhistochemischen Befunde zeigen, daß die Mb-BCs PKC alpha intensiv exprimieren. Man kann in erster Näherung davon ausgehen, daß die Veränderungen in der Verteilung des Enzyms (Zytosolfraktion versus Membranfraktion) zu einem entscheidenden Anteil die Veränderungen in dieser Zellpopulation zurückgeführt können.

In der immunhistochemischen Untersuchung der Mb-BCs und Mb-BCTs zeigt sich, daß sich bei gleichen Laserparametern das pPKC Signal deutlich schwächer darstellt als das PKC Signal. Abweichend zu den immunhistochemischen Untersuchungen zeigen die Immunoblots beider Antikörper etwa gleiche Intensitäten.

4.2.4 Spezifität und Quantifizierung der FM 1-43 Markierungen

In vorrausgegangenen Versuchen wurde beobachtet, daß FM 1-43 nicht das Präparat in seinem gesamten Durchmesser/Tiefe färbt. An der Oberfläche treten eine Vielzahl unspezifischer Markierungen auf (Mack et al., 2000). Aufgrund der ungleichmäßigen Penetration des Farbstoffes in das Gewebe, wurden mittels LSM nur ein Bereich zwischen 5µm-20µm unterhalb der Oberfläche für die Untersuchung herangezogen und berücksichtigt.

FM 1-43 ist ein Styrylpyridiniumfarbstoff, der bei vielfältigen Fragestellungen im Bereich des Vesikeltransports an lebenden Zellen verwendet wird (Cochilla et al., 1999). Bewiesen ist, daß der Farbstoff in den verwendeten Konzentrationen (5µM) keine toxischen Effekte an lebenden Zellen zeigt (Murthy, 1999).

In der Versuchsreihe mit GÖ6976 als PKC alpha Inhibitor schien es, daß eine erhöhte Anzahl an BCTs keinen Farbstoff annehmen. Allerdings war es unmöglich diese Beobachtung zur Quantifizierung heranzuziehen, weil es nicht möglich war, die nicht gefärbten Mb-BCTs eindeutig zu identifizieren. Daher wurden nur klar positiv gefärbte und somit eindeutig als Mb-BCTs erkennbare Strukturen in die Auswertung aufgenommen.

Die vorgenommene Auswertung setzt voraus, daß über den Auswertungszeitraum die spezifische Färbung konstant bleibt und keine Entfärbung eintritt. Mack et al. zeigten, daß nach 5 minütiger Anfärbung keine signifikante Entfärbung in einem Zeitraum von 5min nach Färbung auftrat (Mack et al., 2000).

Somit diene als einzige Größe zur Quantifizierung der Vesikeldynamik die klar positiv gefärbten Bipolarzellterminalen. Die beobachteten signifikanten

Unterschiede wurde an mindestens 5 Goldfischen durchgeführt, wobei jeweils immer ein Experiment mit der Kontrolle in einem Durchgang verglichen wurde.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Die Bipolarzellterminale: Eine funktionell und morphologisch heterogene Struktur ?

Die selektiv mit PKC alpha Antikörpern anfärbbare Mb-BCT in der Goldfischnetzhaute, durchspannt einen großen Anteil der IPL und der Sublamina b (Abb.5). Die Sublamina b gliedert sich ihrerseits in weitere Schichten (Cajal, 1894; Marc, 1999). Entsprechend zahlreich sind die Kontakte zu unterschiedlichen Amakrinzellpopulationen und Ganglienzellen. Es wurde gezeigt, daß pro Mb-BCT etwa 350-390 vorwiegend GABAerge und glyzinerge Amakrinzellkontakte vorhanden sind (Marc und Liu, 2000).

Die große Mb Terminale liegt in der proximalen IPL in der Schicht S4 und S5 der IPL. Die IPL wird durch die Fortsätze der in sie hineinziehenden Zellen schichtenartig aufgebaut (Marc, 1999). Unklar ist bei verschiedenen Autoren wie viele Schichten die IPL aufbauen. Die prä- und postsynaptischen Partner der Mb Terminale sind auf der Ebene der konkreten Zelltypen wenig charakterisiert. Man kann man aber davon ausgehen, daß in Abhängigkeit von der jeweiligen Lage eines Abschnittes der Mb Terminale, die Terminale mit unterschiedlichen Partner synaptische Kontakte eingeht. Es ist daher naheliegend davon auszugehen, daß dieser große synaptische Komplex nicht als eine „Einheit“ funktionell aufgefaßt werden kann, sondern sicher funktionell „untergliedert“ sein dürfte (hier: funktionelle Mikrodomäne, siehe auch De camilli et al., 2001). Ansatzweise wird dies durch die ungleichmäßige Verteilung der synaptischen Ribbons angedeutet, die in proximalen Abschnitten der Mb Terminale zahlenmäßig häufiger vorhanden sind als in anderen Abschnitten (von Gersdorff et al., 1996; Wagner und Behrens, persönliche Mitteilung). Diese

strukturelle Heterogenität der Mb Terminale ist für neurochemische Marker inhibitorischer Neurone besser beschrieben.

So sind z.B. die PKC modulierten GABA_C Rezeptoren in proximalen Arealen der BCT häufiger zu finden als distal (Koulen et al., 1997). Das submembranös lokalisierte Protein Gephyrin, das an der Membranaggregation von GABA_A Rezeptoren beteiligt ist (Kneussel et al., 2001), findet sich im Goldfisch mehr distal als proximal an der BCT lokalisiert (Behrens et al., 1999).

Ob die Menge und die Verteilung von GABA-Rezeptoren an Mb Terminalen durch Hell und Dunkel beeinflusst wird, ist unklar. Immunhistochemische Befunde an Photorezeptorterminalen weisen darauf hin, das Hell und Dunkel keinen Einfluß auf die Verteilung und Menge von GABA_A Rezeptoren hat (Yazulla et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse präsentiert, die zeigen, daß die alpha PKC Immunoreaktivität der Mb Terminale sich topologisch nicht einheitlich verhält, da signifikante Unterschiede in der Verteilung von PKC-IR im submembranösen Raum des proximalen und des distalen Abschnittes der Terminale gefunden wurden. Weiterhin war die Immunoreaktivität im distalen Abschnitt der Terminale durchschnittlich schwächer ausgeprägt. Eine ähnliche Aussage, wenn auch weniger „zugkräftig“, ließe sich aus der Beurteilung von manchen Anfärbungen mit dem pPKC(Ser657) formulieren. Andererseits entspräche es einer gewissen Normvarianz, wenn man demgegenüber an optimal ausgesteuerten Mb Terminalen im Dunkeln eher nur einen „zusammenhängenden“ Saum von PKC-IR ausmacht.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob man submembranöse PKC-IR Flecken als Orte synaptischer Zonen an der Mb Terminale interpretieren kann.

In der Mb Terminale sind die Orte präsynaptischer aktiver Zonen durch die Gegenwart von synaptischen Ribbons charakterisiert (Wagner, 1997; Lenzi und von Gersdorff, 2001; Lagnado, 2003).

Die Anzahl der synaptischen Ribbons in Mb Terminalen wird mit ca. 45-65 angegeben, wobei diese Ribbons –worauf schon hingewiesen wurde- nicht gleichmäßig im Innern verteilt sind (von Gersdorff et al., 1996).

Kolokalisationsversuche mit Antikörper gegen Bestandteile von synaptischen Ribbons (KIF3A, Muresan et al., 1999) waren bisher in Goldfischnetzhäuten erfolglos, da dieser Antikörper im Gewebe niederer Wirbeltiere (Fische) kein spezifisches Signal ergaben (Behrens, persönliche Mitteilung).

Aufgrund der Befunde aus der Literatur kann man sagen, daß zwar PKC in Prä- und Postsynapsen vorkommt (De Camilli et al., 2001), andererseits aber nicht als Synapsenmarker verwendet wird. Präsynapsen sind heterogen hinsichtlich ihrer Größe, ihrer Struktur und ihrer molekularen Ausstattung (Atwood und Karunanithi, 2002; Murthy und De Camilli, 2003). Als Präsynapsenmarker werden u.a. Antikörper gegen Komponenten von synaptischen Vesikel (SV2) bzw. Bestandteile der Exozytosemaschinerie (SNAP25) verwendet. Diese Präsynapsenmarker bieten aber auch in den Präsynapsen konventioneller chemischer Synapsen nicht die Möglichkeit, funktionell unterschiedene Mikrodomänen in der Präsynapse darzustellen.

Von den Proteinkinasen, die man an Synapsen beobachtet, eignet sich bisher am ehesten die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase-II (CaCMII), als Marker für Postsynapsen in asymmetrischen chemischen Synapsen, da sie in der PSD dieser Synapsen angereichert ist (De Camilli et al., 2001).

In der Literatur sind Modelle von sehr großen präsynaptischen Terminalen beschrieben, an denen man ohne Zweifel, aufgrund des hinreichenden Abstandes zwischen den einzelnen präsynaptischen aktiven Zonen, diese mit Hilfe von Präsynapsenmarker individuell darstellen kann (Tsen et al., 2000; Shupliakov et al., 2002).

Aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten der Regulation von PKC, die räumliche und zeitliche Komponenten aufweist (Stichwort: aktivitätsabhängige Translokation; membranassoziierte Lokalisation des Koaktivators DAG; Parker und Dekker, 1997), könnte man möglicherweise von einer vorübergehenden räumlichen Nähe von PKC mit aktiven Zonen der Präsynapsen ausgehen. An

dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß PKC an einer Vielzahl von Schritten der Signalübertragung eingreifen kann (siehe unten).

Weitere Hinweise für strukturelle Unterschiede an Mb Terminalen im Zusammenhang mit Hell und Dunkel, sind die adaptionsabhängigen Unterschiede in der Verteilung von kleinen Evaginationen (Spinules) an der Bipolarzellterminale. Im helladaptierten Zustand ist die Spinuledichte von distal nach proximal annähernd gleich niedrig, während im Dunkeln die Dichte der Spinules proximal deutlich höher ist als im mittleren Bereich der BCT (Behrens et al., Manuskript eingereicht).

Viele Hinweise deuten darauf hin, daß das Zytoskelett an aktivationsabhängigen Veränderungen an Synapsen beteiligt ist (Lisman and Harris, 1993; Wagner und Djamgoz, 1993; Harris und Kater, 1994; Edwards, 1998; Fischer et al., 1998). Strukturen, die ebenfalls als Spinules bezeichnet werden, aber strukturell von denen in der Netzhaut unterschieden sind, finden sich beispielsweise im Hippokampus des Säugetiers verstärkt nach Lang-Zeit-Potenzierung (LTP) (Edwards, 1995) und in *Aplysia* nach Sensitivierung (Bailey und Thompson, 1979). Neben den Spinules der Ma- / Mb Bipolarterminalen (Behrens und Wagner, 1996) sind auch Spinules von Zapfen-Horizontalzellen in der Cyprinidennetzhaut beschrieben, die ebenfalls wie die der Bipolarzellen plastische Strukturen sind (Wagner und Djamgoz, 1993; Weiler et al., 1991).

PKC spielt bei dynamischen Prozessen des Zytoskeletts eine wichtige Rolle. Eine Aktivierung von PKC führt zu einer beschleunigten Bildung von F-Aktin, wobei bei Inhibition von PKC die Bildung von polymerem Aktin eingeschränkt ist bzw. in Abwesenheit von Ca^{2+} der F-Aktin Abbau schneller abläuft (Job und Lagnado, 1998). In hippokampalen Zellkulturen und an Horizontalzellspinules konnte gezeigt werden, daß die Organisation von F-Aktin entscheidenden Einfluß auf die Bildung und Rückbildung von Spinules hat (Ter Margarian und Djamgoz, 1992; Weiler und Janssen-Bienhold, 1993; Fischer et al., 1998).

Wie bei der PKC-IR Verteilung zeigt die Spinuledynamik ein adaptionsabhängiges Bild, wobei eine Zunahme von PKC Immunoreaktivität mit einer Zunahme der Spinulebildung vergesellschaftet ist. Vor dem Hintergrund der berichteten Befunde für die Rolle von PKC bei der Spinuledynamik, stellen die Ergebnisse dieser Arbeit weitere Evidenz für die Hypothese der heterogenen funktionellen und strukturellen Organisation der Mb-BCT dar. Ob PKC an der Spinules-Dynamik der Mb Terminale beteiligt ist, ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen.

4.3.2 Hell- und Dunkeladaptation in-vivo und in-vitro haben Einfluß auf die subzelluläre Verteilung des Enzyms

In dieser Arbeit wird phosphorylierte PKC (aktivierte PKC; siehe dazu auch Kap. 1.3) nachgewiesen. Im Hellen finden wir eine homogene bzw. diffuse und fleckförmige pPKC-IR; dieses deutet darauf hin, daß aktivierte PKC sowohl an der Membran als auch im zytosolischen Kompartiment (CC) benötigt wird. Die saumförmige Markierung im Dunkeln läßt auf einen bevorzugten Gebrauch bzw. funktionelle Notwendigkeit im Membrankompartiment (MC) in der BCT schließen.

Bei der Betrachtung von FM 1-43 Färbungen an Slice Präparaten aus hell- und dunkeladaptierten fällt auf, daß in helladaptierten Netzhautpräparaten in Fischringern immer mehr Terminalen mit FM 1-43 angefärbt waren, als in Präparaten dunkeladaptierter Netzhäute (Daten nicht gezeigt). Die geringere FM 1-43 Anfärbbarkeit von Mb-BCTs in dunkeladaptierten Netzhäuten kann als deutlich reduzierte Vesikeldynamik im Vergleich zu helladaptierten Terminalen interpretiert werden. Dies steht in Übereinstimmung mit den elektrophysiologischen Erkenntnissen, daß Mb-BCTs im Dunkeln hyperpolarisiert und somit weniger „aktiv“ sind (Kato und Negishi, 1979; Ishida et al., 1980; Saito und Kurjiraoka, 1982; Kaneko et al., 1991; Lasansky et al., 1992; Zenisek und Matthews, 1998; Protti et al., 2000).

In Abb. 19 (mittlere Reihe) ist ersichtlich, daß an der Terminale keine konkaven Einziehungen zu erkennen sind, wie sie in vivo typisch sind für dunkeladaptierte Mb-BCTs (Yazulla und Studholme, 1992; Behrens und Wagner, 1996; Job und Lagnado, 1998). Die Gestalt der synaptischen Kontaktflächen (Kurvatur der synaptischen Kontaktzone) hell- und dunkeladaptierter Mb-BCTs läßt sich in Beziehung setzen zu den physiologischen definierten Aktivitätszuständen dieser Zellen. Im Hellen ist das Membranpotential depolarisiert und die Gestalt der Postsynapse der nicht-ribbon-assoziierten chemischen Synapsen stellt sich konvex dar. Im Dunkeln hingegen finden wir hyperpolarisierte Mb Terminalen und konkave Kurvaturen der nicht-ribbon-assoziierten chemischen Synapsen an der Mb Terminale.

Die Gestalt der synaptischen Kontaktzone ist eng verknüpft mit der Stärke der Signalübertragung (Xu-Friedman und Regehr, 2003). Da PKC-IR in den Terminalen der Abb. 19 (mittlere Reihe) nicht mit einem amöboiden Aussehen bzw. mit konkaven Einziehungen verknüpft ist, muß man zu dem Schluß kommen, daß die membranassoziierte Lokalisation von PKC-alpha nicht mit der Kurvatur der Mb-BCT verknüpft ist. Dies hat auch zur Folge, daß die Gestalt der synaptischen Kontaktzone und damit wohl auch die Effizienz der synaptischen Signalübertragung nicht mittelbar eine Funktion der subzellulären Lokalisation von PKC sein dürfte.

Interessant wäre für weitere Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene die Beantwortung der Frage, ob die Kurvatur synaptischer Kontaktzonen unter dem Einfluß des isoformspezifischen Inhibitors GÖ6976 sich ändern oder nicht.

4.3.3 Ist Translokation ein Schlüsselmechanismus für die subzelluläre Wirkung von Protein Kinase C?

„Function is inextricably linked with location“

Dorn und Mochly-Rosen, 2002

In zahlreichen untersuchten biologischen Systemen ist die subzelluläre Lokalisation eines Enzyms von entscheidender Bedeutung für dessen Funktion, denn nur an seinem Wirkort kann das Enzym seine adäquate Funktion ausüben (Dorn und Mochly-Rosen, 2002).

Beispielsweise eine Reihe psychiatrischer Erkrankungen, aus dem Formenkreis der affektiven Störungen, wie die bipolare Depression, sind eben dadurch gekennzeichnet, daß die subzelluläre Verteilung eines Enzymes von einem zellulären Kompartiment zum anderen verschoben ist. Bei der Behandlung der bipolaren Depression werden Lithiumsalze eingesetzt, die im Rattenkortex die Translokation und Aktivierung von PKC signifikant reduzieren (Wang et al., 2002).

In verschiedenen Neuronen wurde gezeigt, daß PKC aus dem Zytosol bei Aktivierung an die Membran transloziert wird. Haloethan, ein häufig verwendetes Inhalationsnarkotikum, nimmt Einfluß auf die subzelluläre Verteilung von PKC in cholinergen Zellen des ZNS (Gomez et al., 2002). In der aktuellen Literatur wird gezeigt, wie PKC nach Translokation an die Membran die Verteilung von NMDA Rezeptoren reguliert (Fong et al., 2002). Andere Studien berichten über die Modulation des Vesikeltransports und der Vesikelfreisetzung durch Phosphorylierung der membranständigen MARCK Proteine durch PKC (Yang et al., 2002).

In dem in dieser Arbeit gewählten Modell, der Bipolarzelle aus dem Goldfisch, sind bisher wenig Daten bekannt über Translokationsvorgänge von PKC. Beschrieben wurde die adaptionsabhängige Verteilung der PKC Immunreaktivität zwischen Soma und Bipolarzellterminale (Vaquero et al.,

1998), die hinsichtlich ihrer funktionellen Bedeutung wenig bis gar nicht verstanden ist.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen dagegen Befunde, die in Übereinstimmung stehen mit Auffassungen einer Translokation des Enzyms aus dem zytosolischen Kompartiment in das membranassoziierte Kompartiment nach seiner Aktivierung. Die Beobachtung, daß in dunkeladaptierten Mb Terminalen im Innern die pPKC alpha-IR verringert ist, bzw. in der zytosolischen Fraktion ebenfalls eine Abreicherung dieses Enzyms stattfindet, kann man sodann in dem Sinne als adaptationsabhängige Translokation bezeichnen. Es soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, daß in den vorliegenden Befunden der Prozess der Translokation selber nicht direkt beobachtet wird, da hier mit den verfügbaren Methoden nur statische Ansichten eines dynamischen Vorganges erfaßt werden.

Im Rattenmodell von basophilen Leukämiezellen wurde die Translokationsgeschwindigkeit am GFP-PKC γ Fusionsprotein (Green Fluoreszent Protein) untersucht. Diese Tumorzelllinie wurde mit dem PAF (Platelet Activating Factor) Rezeptor transfiziert, der die PKC Kaskade durch Aktivierung von PLC startet. Nach Stimulation dieses Rezeptors erreichte die Membranassoziation von PKC γ nach 80 s ihr Maximum, wobei nach weiteren 200 s der Ausgangszustand wiederhergestellt war (Oancea et al., 1998); ähnliche Werte wurden von Meyer und Oancea (2000) an mit GFP-PKC transfizierten in Zellen erhoben.

Die in der Goldfischnetzhaute beobachteten Veränderungen in der subzellulären Lokalisation von PKC fanden im Bereich von Stunden nach Reizung und Reizaufrechterhaltung statt. Wie im Ergebnisteil dargestellt, ist Licht der entscheidende Reiz für die Translokation von PKC in Bipolarzellterminalen (Gabriel et al., 2002). Licht ist aber angesichts der beschriebenen Daten aus dem Rattenmodell einen wesentlich schwächeren Reiz, der eine langsamere Kinetik nach sich zieht. Neben der Kenntnis der Geschwindigkeitsterme für Translokationsvorgänge, ist auch die Kenntnis der an diesem

Translokationsvorgang selber beteiligten molekularen Partnern von Bedeutung. Für Vorgänge in den Mb Bipolarzellen sind dazu bisher keine Daten bekannt.

4.3.4 Welchen Einfluß hat PKC auf die Vesikeldynamik?

Fluoreszierende Styrylfarbstoffe wie FM 1-43 haben sich als gut geeignet erwiesen, um Vesikeldynamik und insbesondere Vesikelendozytose darzustellen (Mack et al., 2000; Guatimosim und von Gersdorff, 2002). In den vergangenen Jahren wurde der Prozess der Transmitterfreisetzung eingehend untersucht und in mehrere funktionelle Schritte eingeteilt (Nestler et al., 2001). Am Beginn des Zyklus steht das Anlagern (Docking) des Vesikels an die aktive Zone. Elemente des Zytoskeletts und präsynaptische Strukturen wie synaptische Ribbons scheinen diesen Vorgang zu modulieren (Wagner 1997; Lenzi und von Gersdorff, 2001). Nachdem die Vesikel einen ATP verbrauchenden Reifungsprozess durchlaufen, erfolgt die Ca^{2+} abhängige Exozytose.

Neueste Erkenntnisse zeigen, daß die Exozytose unterschiedlichen Kinetiken folgen kann. Weitere Evidenzen deuten daraufhin, daß in der Mb-BC die Vesikelfreisetzung drei Geschwindigkeitskonstanten folgt, einer langsamen, einer schnellen und einer weiteren, die eine kontinuierliche Transmitterfreisetzung ermöglicht (Neves und Lagnado, 1999; von Gersdorff und Matthews, 1999). Auf der molekularen Ebene faßt man die Strukturen die ein Anlagern der Vesikel an die aktive Zone ermöglichen als v-SNARE (vesicle) und t-SNARE (target) Komplexe zusammen. Synaptotagmin kommt dabei vermutlich, die Rolle des Ca^{2+} Sensors zu, der die Ca^{2+} Abhängigkeit der Transmitterfreisetzung bedingt (Richmond und Brodie, 2002; Brodie und Richmond, 2002). Neben den genannten Proteinen, spielen noch eine Vielzahl anderer und bisher wenig verstandener molekularer Komponenten bei der Exozytose eine Rolle.

Exozytose und Endozytose sind funktionell eng miteinander gekoppelt. Bei der Endozytose werden zwei verschiedenartige Modelle seit mehreren Jahren diskutiert. Eine langsam ablaufende clathrin-vermittelte Einstülpung eines

Membranabschnittes lateral der aktiven Zone einer Synapse, wird der schnellen clathrin-unabhängigen „Kiss and Run“ Variante gegenübergestellt (Morgan et al., 2002).

Im gesamten Prozess der Vesikeldynamik spielt die Phosphorylierung und Dephosphorylierung, vermittelt durch Kinasen und Phosphatasen, eine entscheidende Rolle, insbesondere an den Ribbonsynapsen der Mb-BCT (Cousin et al., 2001; Guatimosim et al., 2002). PKC Aktivierung führt in vielen Typen von Neuronen zu einer verstärkten Botenstofffreisetzung, wenngleich die Rolle von PKC bei der Vesikeldynamik nicht essentiell zu sein scheint, so herrscht ein modulierender Effekt vor (Majewski und Iannazzo, 1998).

Die auch in der Bipolarzelle des Goldfisches beobachtete Potenzierung der Transmitterfreisetzung wird auf eine Mobilisierung von Vesikelpools zurückgeführt (Minami et al., 1998; Berglund et al., 2002). Die im Ergebnisteil vorgelegten Daten unterstützen den Eindruck der modulierenden Funktion von PKC. Bei der selektiven Blockade der alpha PKC Isoform nimmt die, durch FM 1-43 visualisierte, Endozytose signifikant auf Werte ab, die vergleichbar sind mit Daten aus vorangegangenen Inkubationsversuchen mit dem inhibitorischen Transmitter GABA (Mack et al., 2000).

Erst kürzlich veröffentlichte Daten, weisen auf die besondere Bedeutung des hydrostatischen Druckes bei der elektrophysiologischen Erfassung der Endozytose hin (Heidelberger et al., 2002). In dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau ist dieses Problem weitestgehend durch die Verwendung von Slicepräparaten umgangen worden, die stetig vom gleichen Volumen Ringerlösung überschichtet waren.

Eine Übersicht über die Funktionen von PKC liefert Tabelle 2.

Tabelle 2.

An welchen Prozessen ist PKC beteiligt:

Kompartiment	Aufgabe	Referenz
Dendriten von Mb BCs	Immunhistochemische Lokalisation in Dendriten der Mb BC`s (Die Funktion ist unklar; mögliche Substrate: mGluR6, Gap junction, Connexine)	Fyk-Kolodziej et al., 2002
Dendriten von OFF-Zapfen-BCs in der Katzenretina sind PKC-beta-II-positive	Nicht bekannt	Fyk-Kolodziej et al., 2002
Zellkörper von Bipolarzellen (zytosolisch)	Nicht bekannt	
Axonterminale von Mb BCs	Modulation von GABA-C Rezeptoren	Feigenspan und Bormann, 1994
Zytosol	Organisation des Aktinnetzwerkes	Job und Lagnado, 1998

PKC ist an weiteren Prozessen beteiligt :

präsynaptisch Bipolarzellen	zu	PKC aktiviert GluR4 in Amakrinen	Carvalho et al., 2002
		In Bipolarterminalen wurden GLUT1 Glutamattransporter nachgewiesen; es ist nicht bekannt ist, ob sie durch PKC gesteuert werden	Vandenbranden et al. 2003
Präsynapse (BCs)		Modulation von Glutamat- transporter	Bull et al., 2002
Synapse		Veränderung der Pool- Größe (Vesikeldynamik)	Berglund et al., 2002

4.3.5 Isoformheterogenität in Mb-Bipolarterminalen

PKC findet sich in einer Vielzahl von Zellen in unterschiedlichen Organismen, wo die verschiedenen Isoformen die unterschiedlichsten Funktionen ausüben. An dieser Stelle sei auf die entsprechenden Kapitel in der Einleitung verwiesen. In der Goldfischnetzhaute lassen sich verschiedene PKC Isoformen mittels Immunhistochemie darstellen (Behrens et al., unveröffentlichte Daten). Die Funktion dieser Isoformen ist im wesentlichen unverstanden und läßt nur Raum für Spekulationen.

Einige Experimente mit PKC isoformselektiven Knock-Out Mäusen weisen daraufhin, daß zwischen den Isoformen eine funktionelle Redundanz besteht. Einfach Knock-Out Mäuse sind lebensfähig, wohingegen Knock-Out Mäuse mit zwei Genausfällen nicht überleben (Leitges, 2002 Vortrag in Tübingen). Andere Studien weisen oftmals auch entgegengesetzte Wirkungen einzelner PKC Isoformen nach. In gastrointestinalen Epithelien haben PKC alpha und PKC

epsilon antagonistische Wirkungen auf das Remodelling des basolateralen Aktinzytoskeletts in Enterozyten (Song et al., 2002). Weitere Evidenzen für die teilweise entgegengesetzte Wirkungen sind aus Überexpressionsexperimenten einzelner PKC Isoformen in unterschiedliche Tumorzelllinien bekannt PKC alpha überexprimierende Glioblastomzelllinien zeigen sich in ihrer Proliferationsfähigkeit gesteigert, bedingt durch eine PKC induzierte p21^{WAF/CIP} Suppression. PKC delta inhibiert jedoch beispielweise in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur die Zykline D/E und führt somit zu einer Tumorregression (Gomperts et al., 2003).

4.4 Molekularbiologische Erkenntnisse über PKC alpha im Goldfisch und Zebrafisch

Zur Diskussion der molekularbiologischen Befunde soll einleitend noch einmal der Weg erläutert und diskutiert werden, der beschritten wurde, um Unterschiede in der adaptionsabhängigen PKC Expression darstellen zu können. Ausgehend von einer Datenbankrecherche konnte die PKC alpha Sequenz beim Menschen mit einer Sequenz beim Zebrafisch verglichen werden. Beide Sequenzen zeigten 70% Übereinstimmung. Da keinerlei Sequenzinformationen für PKC alpha beim Goldfisch vorlagen, wurden die Primer anhand der Zebrafischsequenzen synthetisiert.

Hierbei wird allerdings vorausgesetzt, daß die Serin/Threoninkinase PKC in einer hochkonservierten Sequenz innerhalb der Cypriniden vorliegt. Für diese Annahme sprechen immunhistochemische Befunde in Netzhautpräparaten, die belegen, daß man mit den identischen Antikörpern sowohl im Goldfisch als auch im Zebrafisch vergleichbare Daten bei der Darstellung von Enzymen und Rezeptoren erhält (Yazulla und Studholme, 2001). Allerdings finden sich neben den Gemeinsamkeiten, zu denen auch PKC zu gehören scheint, auch eine Reihe von Verschiedenheiten.

Die Annahme, daß es sich bei der in Abb. 24 amplifizierte Bande tatsächlich um cDNA handelt, die spezifisch ist für PKC im Goldfisch, basiert darauf, daß diese Bande genau am gleichen Ort des Agarosegels zu finden ist, wie im Zebrafisch (Befunde nicht gezeigt).

Neben den Aussagen zur Verwandtschaft zwischen den beiden Cypriniden läßt die semiquantitative PCR auch Vermutungen über die Regulation von PKC zu. Zur Regulation der Translokation von aktivierter PKC alpha ist in den GÖ6976 in-vitro Versuchen gezeigt worden, daß die Aktivität des Enzyms die Lokalisation beeinflußt. Je höher die Aktivität, desto wahrscheinlicher findet sich die Serin/Threoninkinase an ihren membranständigen Zielsubstraten wieder. Die Regulation der absoluten PKC alpha Enzymmenge, erfolgt entweder auf der Ebene der Proteinbildung, also transkriptional oder translational, oder auf der Ebene des Proteinabbaus. Die immunhistochemisch nachweisbare adaptionsabhängige Veränderung der PKC-IR bzw. Menge wird möglicherweise auf der Ebene der Transkription reguliert. Im dunkeladaptierten Präparaten finden sich kaum PKC alpha mRNA Transkripte. Nach Helladaptation ist jedoch mit Hilfe der RT-PCR eine deutliche PKC alpha cDNA Bande nachweisbar. Somit ist aus den im Ergebnisteil vorgestellten Daten zu vermuten, daß es sich um eine transkriptionale Regulation handelt, allerdings existieren eine Vielzahl zellulärer Gene und Genprodukte, bei denen nicht von der Menge des Genproduktes oder der mRNA Transkripte unmittelbar auf die Regulation der zur Verfügung stehenden Mengen Protein geschlossen werden kann (Alberts et. al, 2001).

An diesem Punkt sollten zukünftige Experimente anknüpfen. Mit den vorliegenden Primern läßt sich die Kinetik der transkriptionalen adaptionsabhängigen Regulation eingehender untersuchen. Eine geeignete Aspirations- und Punktionstechnik kann das Zytoplasma einer einzelnen Bipolarzelle zugänglich machen und uns den letztendlichen Nachweis über die Existenz von PKC alpha und der verschiedenen Isoformen, im Goldfisch und im Zebrafisch, liefern.

4.5 Exkurs: Rolle von Proteinkinase C in der Psychiatrie

In der Vergangenheit waren die Mechanismen der Transmitterwirkung am postsynaptischen Rezeptor und die Prozesse der Wiederaufnahme von Neurotransmitter am besten pharmakologisch zugänglich. Heute fokussiert die psychopharmakologische und psychiatrische Forschung ihr Interesse auf die Transduktionsmechanismen in Nervenzellen, die Einfluß auf die Transmitterfreisetzung nehmen. PKC moduliert über seine Zielproteine die Freisetzung von Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln. Daher wurden psychiatrische Erkrankungen, die vermutlich mit Störungen in mehreren Signaltransduktionswegen vergesellschaftet sind, wie beispielsweise bipolare Erkrankungen, im Hinblick auf eine Beteiligung von PKC untersucht (Hahn und Friedman, 1999).

Patienten mit bipolaren Erkrankungen zeigen in der manischen Phase Erhöhung von PKC-Aktivität. Im Vergleich zur schizophrenen Störungen und zu Patienten mit endogener Depression scheint die PKC-Aktivitätserhöhung „der“ krankheitsspezifische Marker zu sein (Hahn und Friedman, 1999). Parallel zu den Daten aus Thrombozyten konnte in post-mortem Studien an präfrontalen Cortices gezeigt werden, daß der membranassoziierte Anteil an PKC erhöht ist.

Lithium wird zur Behandlung von bipolaren Erkrankungen seit seiner Einführung in den 50iger Jahren durch John Cade verwendet. Es senkt die Aktivität von PKC signifikant. Es existieren mehrere mögliche Wirkungsmechanismen für Lithium. Der bekannteste Mechanismus ist die Inhibition der Inositol Synthese (Nestler et al., 2000) und den sich daraus ergebenden Folgen für hiervon abhängigen Signaltransduktionswege. Neuere Ergebnisse deuten jedoch auf Effekte hin, die nicht durch Inositol Inhibition verursacht werden (Salinas und Hall, 1999), beispielsweise die Hemmung der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β , die regulatorisch in plastische Prozesse, wie die Bildung und Zurückbildung dendritischer Dornen, eingreift.

Im Zusammenhang mit der Fragestellung dieser Arbeit und der Rolle von PKC bezüglich synaptischer Plastizität ist folgende Beobachtung interessant. Growth associated protein (GAP)-43 ist ein Substrat (STICKs) von PKC (Salinas und Hall, 1999). PKC vermittelte Phosphorylierung von GAP-43 ist assoziiert mit Axonsprossung und Long-Term-Potentiation (LTP).

In der Pathobiochemie bipolarer Erkrankungen spielt PKC Aktivität und die PKC abhängigen Gene und Genprodukte möglicherweise eine wichtige Rolle. Sie stehen im Zusammenhang mit plastischen Vorgängen an Nervenzellen, dies läßt sich leicht an Hand der gängigen psychopharmakologischen Therapie mit Lithium darlegen. Somit liefern Ergebnisse aus Modellsystemen, wie beispielsweise der Cyprinidennetzhaut, mit ihren großen synaptischen Mb-Bipolarzellterminalen, immer auch Hinweise zum Verständnis synaptischer Funktion oder Fehlfunktion höherer kortikaler Prozesse, soweit allgemeine zellbiologische Vorgänge beteiligt sind.

5 Zusammenfassung

1. Der alpha PKC Antikörper markiert Mb-Bipolarzellen. Darüberhinaus ist noch eine Population der ON-Zapfenbipolarzellen PKC-ir markiert. Die PKC-IR zeigt in den Mb-BCTs eine adaptionsabhängige Verteilung, wobei im helladaptierten Präparat die PKC-IR homogen durch die Mb-Terminale verteilt ist, im dunkeladaptierten Präparat ist die PKC-IR u.a. charakteristisch an der Membran der Terminale lokalisiert.
2. Der alpha pPKC Antikörper (Ser657) ist gegen „aktivierte“ PKC alpha gerichtet. Die Mb-Terminale sind pPKC-ir. Helladaptierte Mb-Terminale zeigen eine eher im Zytosol lokalisierte pPKC-IR, wohingegen im dunkeladaptierten Netzhautpräparat die pPKC-IR deutlich membranständig ist. Diese Translokation aktivierter PKC läßt sich mit Western Blot Untersuchungen nach differentieller Ultrazentrifugation bestätigen.
3. Mit Hilfe von geeigneten Primern konnte mit RT-PCR in Goldfisch- und Zebrafischnetzhautpräparaten PKC alpha und beta Aktin nachgewiesen werden. In der Goldfischnetzhaut zeigt sich, daß die Anzahl der alpha PKC mRNA Transkripte adaptionsabhängig variiert. Im Hellen liegen deutlich vermehrt PKC alpha Transkripte vor. Beta Aktin zeigt keine adaptionsabhängige Dynamik.
4. Sowohl PKC-IR als auch die pPKC zeigt eine geringe, wenngleich signifikant unterschiedliche Verteilung in der proximalen und distalen Mb-Terminale. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die funktionelle Heterogenität der Mb-Bipolarzellterminale.
5. In-vitro Untersuchungen mit dem alpha PKC spezifischen Inhibitor Goe6976 zeigen, daß PKC alpha für die Endozytose nicht essentiell ist, sondern modulierend auf die Vesikeldynamik wirkt.

6 Literaturverzeichnis

Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourchouladze R. 1997 Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 88, 615-626.

Aderem A. 1995 The MARCKS family of protein kinase-C substrates. *Biochem Soc Trans*. 23, 587-591.

Alberts et al., 2002 *Molecular Biology of the Cell* 4.Edn. Garland.

Albright TD, Jessell TM, Kandel ER, Posner MI. 2000 Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Cell*. 2000 Feb 18; 100 Suppl: S1-S55.

Atwood HL, Karunanithi S 2002 Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 3, 497-516.

Bailey, C.H., and E.B. Thompson. 1979. Indented synapses in *Aplysia*. *Brain Res*. 173: 13-20

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.

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

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.

Betz WJ, Bewick GS. 1993 Optical monitoring of transmitter release and synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*. 460, 287-309.

Bliss T.V.P., Lomo T. 1973 Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dendate area of anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (London)* 232, 331-356.

Burrone J, Neves G, Gomis A, Cooke A, Lagnado L. 2002 Endogenous calcium buffers regulate fast exocytosis in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron*. 33, 101-112.

Bull,ND; Barnett,NL 2002 Antagonists of protein kinase C inhibit rat retinal glutamate transport activity in situ. *J-Neurochem*. 81, 472-480.

Broadie KS, Richmond JE. 2002 Establishing and sculpting the synapse in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol*. 12, 491-498.

Cajal Ramon y 1984. *Die Retina der Wirbeltiere*. Hrsg. Von Greeff R, Verlag von JF Bergmann, Wiesbaden.

Carvalho,AL; Correia,S; Faro,CJ; Duarte,CB; Carvalho,AP; Pires,EM 2002 Phosphorylation of GluR4 AMPA-type glutamate receptor subunit by protein kinase C in cultured retina amacrine neurons. *Eur-J-Neurosci*. 15, 465-474.

Chang S, Hemmings HC Jr, Aderem A. 1996 Stimulus-dependent phosphorylation of MacMARCKS, a protein kinase C substrate, in nerve termini and PC12 cells. *J Biol Chem*. 271, 1174-1178.

Cochilla AJ, Angelson JK, Betz WJ 1999 Monitoring secretory membrane with FM 1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci* 22, 1-10.

Colombo PJ, Gallagher M. 2002 Individual differences in spatial memory among aged rats are related to hippocampal PKC γ immunoreactivity. *Hippocampus*.12, 285-289.

Cotman CW, Nadler LG 1978 Reactive synaptogenesis in the hippocampus. In: Cotman CW (Ed) *Neurol Plasticity*. Raven, New York.

Cousin MA, Tan TC, Robinson PJ. 2001 Protein phosphorylation is required for endocytosis in nerve terminals: potential role for the dephosphorylating dynamin I and synaptojanin, but not AP180 or amphiphysin. *J Neurochem*. 76,105-116.

Cuello AC 1993 *Immunohistochemistry II*. John Wiley & Sons.

De Camilli P, Haucke V, Takei K, Mugnaini E 2001 *The Structure of Synapses*. In: Cowan WM, Südhof TC, Stevens CF, Davies K (Eds.) *Synapses*. Baltimore, Johns Hopkins Univ. Press, pp. 98-134.

Dekker LV, Parker PJ. 1994 Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci*.19, 73-77.

Dekker LV, Palmer RH, Parker PJ. 1995 The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Curr Opin Struct Biol*. 5, 396-402.

Dekker LV, Parker PJ. 1997 Regulated binding of the protein kinase C substrate GAP-43 to the V0/C2 region of protein kinase C-delta. *J Biol Chem.* 272, 12747-12753.

Desmond NI, Levy WB 1986 Changes in the numerical density of synaptic contacts with long term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 253, 466-475.

Desmond NI, Levy WB 1986 Changes in the postsynaptic density with long term potentiation in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 253, 476-482.

Denisenko-Nehrbass NI, Jarvis E, Scharff C, Nottebohm F, Mello CV. 2000 Site-specific retinoic acid production in the brain of adult songbirds. *Neuron.* 27, 359-370.

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

Dowling G.E. 1987 *The Retina, an Approachable Part of the Brain.* The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Edwards, F.A.. 1998. Dancing dendrites. *Nature.* 394, 129-130.

Edwards, F.A.. 1995. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation. *Physiol. Rev.* 75, 759-787.

Eldred WD, Zucker C, Karten HJ, Yazulaa S 1983 Comparison on fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 13, 285-292.

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

Fischer, M., S. Kaech, D. Knutti, and A. Matus. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 20, 847-854

Gerhard K. 2001 *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.* Second Edition Wiley-VCH.

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

Guatimosim C, Hull C, Von Gersdorff H, Prado MA. 2002 Okadaic acid disrupts synaptic vesicle trafficking in a ribbon-type synapse. *J Neurochem.* 82, 1047-1057.

Guatimosim C, von Gersdorff H. 2002 Optical monitoring of synaptic vesicle trafficking in ribbon synapses. *Neurochem Int.* 41, 307-312.

Harris, K.M., and S.B. Kater. 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-371.

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

Heidelberger R, Zhou ZY, Matthews G. 2002 Multiple components of membrane retrieval in synaptic terminals revealed by changes in hydrostatic pressure. *J Neurophysiol.* 88, 2509-2517.

Hug H, Sarre TF. 1993 Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.* 291, 329-343.

Impey S, Smith DM, Obrietan K, Donahue R, Wade C, Storm DR. 1998 Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat Neurosci.* 1, 595-601.

Ishida AT, Stell WK, Lightfoot DO 1980, Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina. *J Comp Neurol* 191, 315-335.

Jaken S, Parker PJ 2000, Protein kinase C binding partners. *Bioessays* 22, 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.

Kandel ER. 2001 The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 294, 1030-1038.

Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. 1995 *Essentials of Neural Science and Behavior.* Appleton & Lange; Deutsch: Neurowissenschaften. Eine Einführung. Spektrum, Heidelberg.

Kaneko A., Suzuki S., Pinto L.H., Tachibana M. 1991, Membrane currents and pharmacology of retinal bipolar cells: a comparative study on goldfish and mouse. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 98, 115-127.

Kato S, Negishi K 1979, Rod- and cone-bipolar cell responses in the carp retina. *Exp Eye Res.* 28, 159-166.

Keranen LM, dutil EM, Newton Ac 1995 Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol* 5 , 1394-1403.

Kneussel M. 2002 Dynamic regulation of GABA(A) receptors at synaptic sites. *Brain Res Brain Res Rev.* 39, 74-83.

Knott GW, Quairiaux C, Genoud C, Welker E. 2002 Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron*. 34, 265-273.

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*. 380, 520-532.

Lagnado L, Gomis A, Job C 1996 Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron* 17, 57-67.

Lagnado L 2003 Ribbon synapses. *Curr Biol* 13, R631.

Lasansky A. 1992 Properties of depolarizing bipolar cell responses to central illumination in salamander retinal slices. *Brain Res*. 576, 181-196.

Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ 1998 Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Sci* 281,2042-2045.

Lenzi D, von Gersdorff H. 2001 Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines. *Bioessays*. 23, 831-840.

Lisman, J.E., and K.M. Harris. 1993 Quantal analysis and synaptic anatomy: integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends Neurosci*. 16, 141-147.

Liu W S, Heckman C A 1998 The Sevenfold Way of PKC Regulation. *Cellular Signalling* 10, 529-542.

Marc RE 1999 The structure of vertebrates retinas. In: Toyoda J-I, Musakami M, Kaneko A, Saito T (Hrsg.): *The retinal basis of vision*. Elsevier, Amsterdam.

Marc RE, Murry RF, Basinger SF 1995, Pattern recognition of amino acid signatures in retinal neurons. *J. Neurosci*. 15, 5106-5129.

Marc RE, Cameron D 2001 A molecular phenotype atlas of the zebrafish retina. *J Neurocytol*. 30, 593-654.

Marc RE, Liu WLS 2000 Fundamental GABAergic Amacrine Cell Circuitries in the Retina: Nested Feedback, Concatenated Inhibition, and Axosomatic Synapses. *J Comp Neurol* 425, 560-582.

Masland RH, Raviola E 2000 Confronting complexity: strategies for understanding the microcircuitry of the retina. *Annu Rev Neurosci* 23, 249-284.

Matsumoto B (Ed.) 2002 *Cell Biological Application of Confocal Microscopy*. Amsterdam, Academic Press.

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

Messinger A, Squire LR, Zola SM, Albright TD. 2001 Neuronal representations of stimulus associations develop in the temporal lobe during learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 12239-12244.

Minami N, Berglund K, Sakaba T, Kohmoto H, Tachibana M. 1998 Potentiation of transmitter release by protein kinase C in goldfish retinal bipolar cells. *J Physiol.* 512, 219-225.

Morgan JR, Augustine GJ, Lafer EM. 2002 Synaptic vesicle endocytosis: the races, places, and molecular faces. *Neuromolecular Med.* 2, 101-114.

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

Murase S, Mosser E, Schuman EM. 2002 Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron.* 35, 91-105.

Murthy VN 1999 Optical detection of synaptic vesicle exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* 9, 314-320.

Murthy VN, De Camilli P 2003 Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu Rev Neurosci* 26, 701-728.

Nestler E, Hyman S, Malenka R, 2001 *Molecular Neuropharmacology – A Foundation for Clinical Neuroscience*, McGrawHill Medical Publishing Division.

Neves G, Gomis A, Lagnado L. 2001 Calcium influx selects the fast mode of endocytosis in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Proc Natl Acad Sci* 98, 15282-15287.

Neves G, Lagnado L 1999 The kinetics of exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish bipolar cells. *J Physiol* 515, 181-202.

Nguyen PV, Abel T, Kandel ER. 1994 Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science.* 265, 1104-1107.

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

Pasinelli P, Ramakers GM, Urban IJ, Hens JJ, Oestreicher AB, de Graan PN, Gispen WH. 1995 Long-term potentiation and synaptic protein phosphorylation. *Behav Brain Res* 66, 53-59.

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

Protti DA, Flores-Herr N, von Gersdorff H. 2000 Light evokes Ca^{2+} spikes in the axon terminal of a retinal bipolar cell. *Neuron* 25, 215-227.

Richmond JE, Broadie KS. 2002 The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C.elegans*. *Curr Opin Neurobiol.* 12, 499-507.

Rodieck R.W. (1973) *The Vertebrate Retina. Principles of Structure and Function.* Freeman and Company, San Francisco.

Ryan TA. 2001 Presynaptic imaging techniques. *Curr Opin Neurobiol.* 11, 544-549.

Ryugo DK, Wu MM, Pongstaporn T. 1996 Activity-related features of synapse morphology: a study of endbulbs of held. *J Comp Neurol.* 365, 141-158.

Sakaba T, Neher E. 2001 Calmodulin mediates rapid recruitment of fast-releasing synaptic vesicles at a calyx-type synapse. *Neuron.* 32, 1119-1131.

Saito-T; Kujiraoka-T 1982 Physiological and morphological identification of two types of on-center bipolar cells in the carp retina. *J Comp Neurol* 205 161-170.

Selcher JC, Weeber EJ, Varga AW, Sweatt JD, Swank M. 2002 Protein kinase signal transduction cascades in mammalian associative conditioning. *Neuroscientist.* 8, 122-131.

Sejnowski T.J. 1999 The book of Hebb. *Neuron.* 24,773-776.

Shupliakov O, Bloom O, Gustafsson JS, Kjaerulff O, Low P, Tomilin N, Pieribone VA, Greengard P, Brodin L 2002 Impaired recycling of synaptic vesicles after acute perturbation of the presynaptic actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci* 99, 14476-14481.

Siegel et al., 1999 *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* 6.Edn. Philadelphia: Lippincott-Rave.

Song JC, Rangachari PK, Matthews JB. 2002 Opposing effects of PKC α and PKC ϵ on basolateral membrane dynamics in intestinal epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283, C1548-C1556.

Swetlitschkin R, Vollrath L. 1988 Synaptic bodies in the different rows of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 97, 308-312.

Ter-Margarian, A., and M.B. Djamgoz. 1992 Cytochalasin inhibits light-dependent synaptic plasticity of horizontal cells in teleost retina. *Neurosci. Lett.* 147, 131-135.

Tsen G, Williams B, Allaire P, Zhou YD, Ikonomov O, Kondova I, Jacob MH 2000 Receptors with opposing functions are in postsynaptic microdomains under one presynaptic terminal. *Nat Neurosci* 3, 126-132.

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.

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.

Wallenstein GV, Vago DR, Walberer AM. 2002 Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. *Behav Brain Res.* 133, 159-164.

Wagner HJ, Djamgoz MB 1993. Spinules: a case for retinal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 16, 201-206.

Wagner HJ 1997 Presynaptic bodies ("ribbons"): from ultrastructural observations to molecular perspectives. *Cell Tissue Res.* 287, 435-446.

Wässle H., Boycott BB. 1991 Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev.* 71, 447-480.

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, Janssen-Bienhold U 1993 Spinule-type neurite outgrowth from horizontal cells during light adaptation in the carp retina: an actin-dependent process. *J. Neurocytol.* 22, 129-139.

Weiler R, Kohler K, Janssen U 1991 Protein Kinase C mediates transient Spinule-type neurite outgrowth in the retina during light adaptation. *PNAS* 88, 3603-3607.

Wilson M 2004 Retinal Synapses. In: Chalupa LM, Werner JS (Editors) *The Visual Neurosciences.* 2004. Bradford Book. MIT Press.

Vandenbranden CA, Yazulla S, Studholme KM, Kamphuis W, Kamermans M 2000 Immunocytochemical localization of the glutamate transporter GLT-1 in goldfish (*Carassius auratus*) retina. *J Comp Neurol.* 423, 440-451.

Van der Zee EA, Douma BR. 1997 Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 21, 379-406.

Vaillant AR, Zanassi P, Walsh GS, Aumont A, Alonso A, Miller FD. 2002 Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron*. 34, 985-998.

Vollrath L., Spiwoкс-Becker I. 1996 Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature* 367,735-739.

von Gersdorff H, Vardi E, Matthews G, Sterling P 1996 Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16, 1221-1227.

von Gersdorff H, Matthews G. 1999 Electrophysiology of synaptic vesicle cycling. *Annu Rev Physiol* 61,725-752.

Yazulla S., Studholme KM. 1992 Light dependent plasticity of synaptic terminals of Mb bipolar cells in goldfish retina. *J Comp Neurol*. 320, 521-530.

Yazulla S, Studholme KM. 1997 Light adaptation affects synaptic vesicle density but not the distribution of GABAA receptors in goldfish photoreceptor terminals. *Microsc Res Tech*. 36, 43-56.

Yazulla S, Studholme KM. 2001 Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry. *J Neurocytol*. 30, 551-592.

Yuste R, Bonhoeffer T. 2001 Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 24:1071-1089.

Xu-Friedman MA, Regehr WG 2003 Structural Contributions to Short-Term Synaptic Plasticity. *Physiol Rev*.84, 69-85.

Zenisek D, Matthews G. 1998 Calcium action potentials in retinal bipolar neurons. *Vis Neurosci*. 15, 69-75.

Zenisek D, Steyer JA, Almers W. 2000 Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406, 849-854.

7 Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Behrens U, Borde J, Mack A (2002)

PKC-immunoreactive cone bipolar cells in goldfish, zebrafish and cichlid fish retineae: Effects of light and dark adaptation and relation to double cones. Posterpräsentation beim "3rd FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE" am 14. Juli 2002 in Paris.

Uwe D. Behrens, Johannes Borde, Hans-Joachim Wagner (2003)

Light and dark adaptation and pharmacological inhibition of PKC-alpha influences the distribution of PKC-alpha immunoreactivity in axon terminals of Mb bipolar cells of goldfish retineae. Posterpräsentation bei der Tagung der Anatomischen Gesellschaft in Dresden.

Uwe D. Behrens, Johannes Borde, Hans-Joachim Wagner (2003)

Pharmacological inhibition of PKC alpha activity reduces synaptic activity in bipolar cell terminals of goldfish retineae as monitored by FM1-43 imaging PKC staining using phosphospecific antibodies. Posterpräsentation bei (ARVO) "Annual Meeting of Vision Research and Ophthalmology".

Behrens UD, Borde J, Wagner HJ (2004)

Light and Dark Adaptation and Pharmacological Inhibition Influence the Subcellular Distribution of Phosphorylated Protein Kinase C alpha Isoform in Bipolar Cells of Goldfish Retinae. (manuskript in preparation).

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die durch Anregungen, Ratschläge aber auch Kritik die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben, meinen Dank aussprechen.

Danken möchte ich Herrn Prof. H.-J. Wagner für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen und die stete Aufmunterung neue Methoden und Herangehensweisen auszuprobieren. Herrn Dr. U.D. Behrens bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, denn er begleitete diese Arbeit mit großem Engagement und Geduld. Er führte mich in die Grundlagen des naturwissenschaftlichen Arbeitens ein und vermittelte mir die Freude an der experimentellen Arbeit. Herrn Ralf Peukert danke ich für die freundliche Überlassung einiger Abbildungen. Dank gilt auch Herrn Dr. A. Mack für Hilfe bei den Experimenten und Einweisung am CLSM 510. Weiterhin gilt mein Dank Frau B. Aichele für die Unterstützung bei biochemischen Laborarbeiten und allen anderen hier nicht namentlich genannten Mitgliedern der Forschungsgruppe.

In besonderer Weise ist die Zusammenarbeit im Bereich der Molekularbiologie mit dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen zu betonen, die durch Herrn Prof. F.Lang und Frau Dr. M. Palmada ermöglicht wurde und diese Arbeit in besonderer Weise bereicherte.

Zu guter Letzt möchte ich auch Herrn Oberstabsarzt P.Kilb sowie der Firma Schreiber EDV für die fachliche und nicht-fachliche Unterstützung danken.

9 Tabellarischer Lebenslauf cand. med. Johannes Paul Borde

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 28.11.1979
 Geburtsort: Oberkirch/Baden
 Familienstand: ledig
 Eltern: Dr. med. Karl Borde, Internist
 Helene Borde, *geb.* Surgent, MTA

Schulbildung:

1986-1990 Grundschohle in Oberkirch/Ödsbach
 1990-1999 Hans-Furler Gymnasium in Oberkirch
 1996/1998 "CERAN summer school in York/UK und in Dublin/Ireland"
 1999 Abitur (1.4)
 Buchpreis des "Fonds der deutschen chemischen Industrie"
Sprachkenntnisse: Englisch, Tschechisch, Russisch

Wehrdienst:

1999-2000 Grundausbildung im Sanitätsregiment 10 in Horb a.N.;
 anschließend Truppsanitäter in Sigmaringen, Feldwebel der
 Reserve.
 09/2004 Lehrgang an der „Gebirgs- und Winterkampfschule“ in
 Mittenwald: „Versorgung Verwundeter in schwierigem Gelände“.

Universitätsausbildung:

03/2000 Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der Eberhard-Karls-
 Universität in Tübingen
 03/2002 Ärztliche Vorprüfung
 08/2003 1. Staatsexamen
 09/2005 2. Staatsexamen
 31.10.2006 3. Staatsexamen
 09.11.2006 Erteilung der ärztlichen Approbation
 01.01.2007 Assistenzarzt in der medizinischen Klinik II (Hämatologie,
 Onkologie, Kardiologie) des Klinikums Karlsruhe

Forschung / Praktika:

- 03/2002 Mitarbeit im DFG SFB430 Projekt C4 – Thema: Synaptische Plastizität von Bipolarzellterminalen in der Cyprinidennetzhaut, am Institut für Anatomie, Abteilung Neurobiologie (Direktor: Prof. Wagner).
- 09/2002 Famulatur in Prag/CZ, Karlsuniversität, Innere Medizin, Abt. Gastroenterologie (Primarius: Doz. MUDr. Mertl).
- 03/2002 Famulatur an der Universitätsklinik für Neurologie in Tübingen (Direktor: Prof. Dichgans)
- 04/2003 DFG Graduiertenkolleg(686)-Stipendium im Bereich Onkologie mit dem Schwerpunkt somatische Lebergentherapie des hepatozellulären Karzinoms. Medizinische Universitätsklinik I in Tübingen (Chefarzt: Prof. Gregor).
- 08/2004 Auslandsfamulatur im Fach Gastroenterologie (Chefarzt: Prof. Wands) am Rhode Island Hospital, Providence, Brown University, RI, USA.
- 03/2005 Famulatur am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München (Direktor: Prof. Holsboer)

Stipendien:

- 04/2003 DFG Graduiertenkollegstipendium 686 Onkologie, mit Schwerpunkt somatische Lebergentherapie des hepatozellulären Karzinoms. „Charakterisierung einer SuperCD-Suizid-Gen vermittelten protektiven anti-Tumor Immunantwort im hepatozellulären Karzinom“.
- 11/2003 Stipendium und Aufnahme in Studienstiftung des deutschen Volkes
- 08/2004 Reise/Kurzstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes für Auslandsfamulatur im Fach Gastroenterologie (Chefarzt: Prof. Wands) am Rhode Island Hospital, Providence, Brown University, RI, USA.

Publikationen und Poster:

Behrens U, **Borde J**, Mack A (2002)

PKC-immunoreactive cone bipolar cells in goldfish, zebrafish and cichlid fish retinae: Effects of light and dark adaptation and relation to double cones.

Posterpräsentation auf dem "3rd FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE", 14. Juli 2002 in Paris.

Uwe D. Behrens, **Johannes Borde**, Hans-Joachim Wagner (2003)

Light and dark adaptation and pharmacological inhibition of PKC-alpha influences the distribution of PKC-alpha immunoreactivity in axon terminals of Mb bipolar cells of goldfish retinae.

Posterpräsentation auf der „Tagung der deutschen anatomischen Gesellschaft“ in Dresden.

Uwe D. Behrens, **Johannes Borde**, Hans-Joachim Wagner (2003)

Pharmacological inhibition of PKC alpha activity reduces synaptic activity in bipolar cell terminals of goldfish retinae as monitored by FM1-43 imaging PKC staining using phosphospecific antibodies.

Posterpräsentation (ARVO) "Annual Meeting of Vision Research and Ophthalmology", in Miami, FL, USA.

Behrens UD*, **Borde J***, Mack A, Wagner HJ (2006)

Light and Dark Adaptation and Pharmacological Inhibition Influence the Subcellular Distribution of Phosphorylated Protein Kinase C alpha Isoform in Bipolar Cells of Goldfish Retinae. (*Cell and Tissue Research*).

* authors equally contributed to the manuscript