

Die organotypische Gewebekultur der adulten
Retina als Analysesystem
für funktionell intakte Photorezeptorzellen
- eine Alternative zum Experiment am Tier -

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

von
Boris Reidel
geb. in Mainz

Mainz, Januar 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

“There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed by the Creator into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone circling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being evolved.”

Charles Darwin

On the Origin of Species,

November 24, 1859

Anmerkungen

Die vorliegende Arbeit enthält Daten, die im Rahmen einer Diplomarbeit von und in Zusammenarbeit mit XXXXXXXXX, zu retinaler Zellbiologie und Gentransfers in die Gewebekultur der adulten Retina, zusammen mit dem Diplomanden gewonnen wurden.

Die Zitierweise und die Form des Literaturverzeichnisses wurden in Anlehnung an die Vorgaben des Verlagshauses Springer angewandt. Einige der in dieser Arbeit enthaltenen Abbildungen wurden auf internationalen Kongressen vorgestellt und für Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften verwendet. Um die Bezeichnungen und Abkürzungen in den Abbildungen konsistent zu halten, wurden diese in englischer Sprache erstellt.

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Dissertation wurden auf internationalen Kongressen vorgestellt und in folgenden Zeitschriften veröffentlicht oder sind in Vorbereitung zur Veröffentlichung:

Publikationen:

Märker T, van Wijk E, Overlack N, Goldmann T, Reidel B, tom Dieck S, Roepman R, Kremer H and Wolfrum U (2007) SANS and whirlin scaffold the Usher syndrome protein network at the photoreceptor cilium. (in Vorb.)

Reidel B, Goldmann T, Gießl A, Wolfrum U (2007) Arrestin and transducin translocations associated with the dark adaptation of rod photoreceptor cells are fully dependent on the cytoskeleton. (in Vorb.)

Reidel B, Orisme W, Goldmann T, Smith W C, Wolfrum U (2006) Molecular movements of arrestin and transducin studied in photoreceptors of organotypic cultures of mature vertebrate retinas. *Vis. Res.* 46:4464-71

Reiners J, Märker T, Jürgens K, Reidel B, Wolfrum U (2005) Photoreceptor expression of the Usher syndrome type 1 protein protocadherin 15 (USH1F) and its interaction with the scaffold protein harmonin (USH1C). *Mol Vis* 11:347-355

Reiners J, Reidel B, El-Amraoui A, Boëda B, Huber I, Petit C, Wolfrum U (2003) Differential distribution of harmonin isoforms and their possible role in Usher 1 protein complexes in mammalian photoreceptor cells. *Invest. Ophthalmol Visual Sci.* 44:5006-5015

Technische Mitarbeit:

Wolfrum U (2003) The cellular function of the usher gene product myosin VIIa is specified by its ligands. *Adv Exp Med Biol* 533:133-42

Bolz H, Reiners J, Wolfrum U, Gal A (2002) The role of cadherins in Ca²⁺-mediated cell adhesion and inherited photoreceptor degeneration. *Adv Exp Med Biol* 514: 399-410

Kongressbeiträge:

Reidel B, Goldmann T, Gießl A, Wolfrum U (2007) Gene transfer into neurons of organotypic retina cultures by electroporation and ballistic transfection. ARVO (unter Begutachtung)

Wolfrum U, Overlack N, van Wijk E, Reidel B, Goldmann T, Roepman R, Kremer H, Märker T (2007) The molecular arrangement of an Usher syndrome protein network at the photoreceptor cilium and its role in the intersegmental transport in photoreceptors. ARVO (unter Begutachtung)

- Overlack N, Märker T, van Wijk E, Reidel B, Goldmann T, Roepman R, Kremer H, Wolfrum U (2007) The USH1G scaffold protein SANS associates with microtubules and binds to whirlin in photoreceptor cells, Seventh Meeting of the German Neuroscience Society/ 31th Göttingen Neurobiology Conference (unter Begutachtung)
- Märker T, Overlack N, van Wijk E, Reidel B, Goldmann T, Roepman R, Kremer H, Wolfrum U (2006) The molecular organization of an Usher syndrome protein network at the ciliary apparatus and its function in molecular trafficking in photoreceptor cells. 6th Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network Molecular & Cellular Neurobiology, Mainz p32 (Posterpreis 2006, der Boehringer Ingelheim-Stiftung)
- Goldmann T, Reidel B, Gießl A, Wolfrum U (2006) Gene transfer into neurons of organotypic retina cultures by electroporation and ballistic transfection. 6th Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network Molecular & Cellular Neurobiology, Mainz p33
- Märker T, Overlack N, van Wijk E, Reidel B, Goldmann T, Roepman R, Kremer H, Wolfrum U (2006) SANS (USH1G) – a scaffold protein in the Usher interactome of photoreceptor cells. Usher syndrome and related disorders symposium, Omaha, p45
- Reidel B, Goldmann T, Gießl A, Wolfrum U (2006) Cytoskeletal elements participate in light-dependent translocations of arrestin and transducin in photoreceptor cells - A study in organotypic retina cultures. ISOCB, Cambridge, P102 (IS6150)
- Märker T, Overlack N, van Wijk E, Reidel B, Roepman R, Kremer H, Wolfrum U (2006) SANS (USH1G) – a scaffold protein in the Usher interactome of photoreceptor cells. ISOCB, Cambridge, P56 (IS6094)
- Reidel B, Goldmann T, Gießl A, Wolfrum U (2006) Cytoskeletal elements participate in light-dependent translocations of arrestin and transducin in photoreceptor cells - A study in organotypic retina cultures. Illuminating Molecular Complexities of the Retina, Potsdam
- Märker T, Overlack N, van Wijk E, Reidel B, Roepman R, Kremer H, Wolfrum U (2006) SANS (USH1G) – a scaffold protein in the Usher interactome of photoreceptor cells. Illuminating Molecular Complexities of the Retina, Potsdam
- Reidel B, Goldmann T, Gießl A, Wolfrum U (2006) Cytoskeletal elements participate in light-dependent translocations of arrestin and transducin in photoreceptor cells - A study in organotypic retina cultures. VRES/VR 5
- Reidel B, Gießl A, Wolfrum U (2006) Arrestin and Transducin Translocations Associated With the Dark Adaptation of Rod Photoreceptor Cells Are Fully Dependent on the Cytoskeleton. ARVO 5528/B154

- Reidel B, Gießl A, Wolfrum U (2005) Cytoskeletal elements participate in the light-dependent translocation of arrestin and transducin in photoreceptor cells of organotypic retina culture. 5th Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network Molecular & Cellular Neurobiology, Mainz p8 (Posterpreis 2005, der Boehringer Ingelheim-Stiftung)
- Reidel B, Gießl A, Trojan P, Wolfrum U (2005) Light-induced translocation of the signal transduction proteins transducin and arrestin analyzed in photoreceptor cells of organotypical retina culture. Sixth Meeting of the German Neuroscience Society/ 30th Göttingen Neurobiology Conference p159 B
- Reidel B, Wolfrum U (2004) Light-induced translocation of the signal transduction proteins transducin and arrestin analyzed in photoreceptor cells of organotypical retina culture. 4th Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network Molecular & Cellular Neurobiology, Mainz p20
- Reiners J, Reidel B, El-Amraoui A, Boeda B, Huber I, Petit C, Wolfrum U (2003) Evidence for a supramolecular Usher I complex at the photoreceptor ribbon synapse. *Europ J Cell Biol* 82 [Supplement] 53:53-54
- Reiners J, Reidel B, El-Amraoui A, Boëda B, Petit C, and Wolfrum U (2003) Molecular analysis of the supramolecular Usher 1 protein complex in the neuronal retina. In: Elsner N, Zimmermann H (eds) *Göttingen Neurobiology Report 2003*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, p585-586
- Reiners JD, Reidel B, El-Amraoui A, Boeda B, Huber I, Petit C, Wolfrum U (2003) Molecular analysis of the supramolecular Usher 1 protein complex in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci E-Abstract* 4587
- Reiners J, Reidel B, El-Amraoui A, Boëda B, Huber I, Petit C, Wolfrum U (2002) Evidence for a supra-molecular Usher I complex at the photoreceptor ribbon synapse. 2nd Annual Meeting of the Interdisciplinary Science Network Molecular & Cellular Neurobiology, Mainz pS5

Diplomarbeit:

Reidel B (2002) Funktionelle Charakterisierung des Usher 1D Genproduktes Cadherin 23. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Danksagung

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	MORPHOLOGIE UND HISTOLOGIE DES SÄUGETIERAUGES	1
1.1.1	DIE RETINA DER SÄUGETIERE	3
1.1.2	DIE PHOTOREZEPTORZELLE DER SÄUGETIERE	4
1.2	DAS ZELLSKELETT	16
1.2.1	DAS ZELLSKELETT VON PHOTOREZEPTORZELLEN	19
1.3	KULTIVIERUNG DER VERTEBRATENRETINA	24
1.3.1	EINSATZ DER RETINAKULTURTECHNIK ZUR ANALYSE DER ZELLBIOLOGISCHEN GRUNDLAGEN VON NETZHAUTDEGENERATIONEN	26
1.4	ZIELE DER ARBEIT	28
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	VERWENDETE TIERE UND ORGANENTNAHME	30
2.1.1	MAUS	30
2.1.2	KRALLenfROSch	30
2.2	CHEMIKALIEN UND GERÄTE	31
2.2.1	VERWENDETE PUFFER	31
2.3	PRÄPARATION VON RETINAE UND ANLEGEN DER KULTUR	32
2.3.1	VORBEREITUNG VON MATERIALIEN FÜR DAS ANLEGEN DER RETINAKULTUR	32
2.3.2	KULTURMEDIEN	33
2.3.3	RETINAPRÄPARATION AUS MAUSAUGEN	33
2.3.4	RETINAPRÄPARATION KRALLenfROSch	35
2.4	LICHTADAPTATIONEN	36
2.5	APPLIKATION VON PHARMAKA IN DIE RETINAKULTUR	36
2.6	TRANSFEKTIONEN DER RETINAKULTUR	37
2.6.1	PLASMIDVEKTOR	37
2.6.2	ANZUCHT VON 0,5 L FLÜSSIGKULTUREN ZUR DNA-PRÄPARATION	38
2.6.3	AUFREINIGUNG VON PLASMID DNA AUS BAKTERIEN	38
2.6.4	BESTIMMUNG DER DNA KONZENTRATION	39
2.6.5	ELEKTROPORATION	39
2.6.6	HELIOS GENE GUN™ TRANSFEKTION	41
2.7	LICHTMIKROSKOPIE	43
2.7.1	FIXIERUNG, EINBETTUNG UND SCHNEIDEN DER PRÄPARATE	43
2.7.2	„TUNEL-STAINING“ ZUM APOPTOSE-NACHWEIS AN KRYOSCHNITTEN	46

2.7.3	INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ	48
2.7.4	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	50
2.8	IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPIE	51
2.8.1	FIXIERUNG UND EINBETUNG FÜR IMMUNOGOLDMARKIERUNG.	51
2.8.2	ANFERTIGUNG VON ULTRADÜNNESCHNITTEN	52
2.8.3	IMMUNOGOLDMARKIERUNG UND SILBERVERSTÄRKUNG	52
2.8.4	SCHNITTKONTRASTIERUNG UND AUSWERTUNG	53
2.9	ELEKTRONISCHE DATENVERARBEITUNG	53
3	ERGEBNISSE	55
<hr/>		
3.1	ETABLIERUNG DER RETINAKULTUR	55
3.1.1	VITALITÄTSBESTIMMUNG DER RETINAKULTUR	56
3.1.2	PHYSIOLOGISCHE AKTIVITÄT DER RETINAKULTUR	58
3.2	TRANSLOKATIONEN VON TRANSDUCIN UND ARRESTIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN DER ORGANOTYPISCHEN RETINAKULTUR	59
3.2.1	TRANSLOKATION VON ARRESTIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN DES KRALLenfROSCHEs	62
3.3	ROLLE DES CYTOSKELETTES BEI DEN TRANSLOKATIONEN VON TRANSDUCIN UND ARRESTIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN	63
3.3.1	WIRKUNG VON CYTOCHALASIN D AUF AKTINFILAMENTE IN PHOTOREZEPTORZELLEN	64
3.3.2	EINFLUSS VON CYTOCHALSIN D AUF DIE LICHTABHÄNGIGEN TRANSLOKATIONEN VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN	67
3.3.3	BETEILIGUNG VON MYOSIN II UND VIIA AN DEN LICHTABHÄNGIGEN TRANSLOKATION VON TRANSDUCIN UND ARRESTIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN	71
3.3.3.1	EINFLUSS VON BLEBBISTATIN, EINEM MYOSIN II INHIBITOR, AUF DIE TRANSLOKATION VON TRANSDUCIN WÄHREND DER DUNKELADAPTATION	71
3.3.3.2	BETEILIGUNG VON MYOSIN VIIA AN DEN LICHTABHÄNGIGEN TRANSLOKATIONEN VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN	73
3.3.4	WIRKUNG VON THIABENDAZOL AUF MIKROTUBULI IN PHOTOREZEPTORZELLEN	75
3.3.5	EINFLUSS VON THIABENDAZOL AUF DIE LICHTABHÄNGIGEN TRANSLOKATIONEN VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN.	78
3.4	TRANSFEKTION DER RETINAKULTUR	82
3.4.1	TRANSFEKTION VON ZELLEN DER RETINAKULTUR MITTELS ELEKTROPORATION	82
3.4.2	BALLISTISCHE TRANSFEKTION DER RETINAKULTUR	85

4	DISKUSSION	89
4.1	DIE ORGANOTYPISCHE KULTUR ADULTER RETINAE ALS VITALE	
	EX VIVO-ANALYSESYSTEM AUSDIFFERENZIIERTER PHOTOREZEPTORZELLEN	89
4.1.1	BEITRAG DER RETINAKULTURTECHNIK ZUM ERSATZ UND DER REDUKTION VON TIERVERSUCHEN	93
4.2	LICHTABHÄNGIGE TRANSLOKATIONEN VON TRANSDUCIN UND ARRESTIN IN	
	PHOTOREZEPTORZELLEN	95
4.2.1	DIE TRANSLOKATIONEN VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN WÄHREND DER DUNKELADAPTATION IN PHOTOREZEPTORZELLEN SIND VOM CYTOSKELETT ABHÄNGIG	98
4.2.2	MECHANISMEN DER LICHTABHÄNGIGEN TRANSLOKATION VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN	108
4.3.1	HYPOTHESE ZUR LICHTABHÄNGIGEN TRANSLOKATION VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN	114
4.4	AUSBLICHE AUF WEITERE UNTERSUCHUNGEN	120
4.4.1	GENTRANSFERS IN DIE ORGANOTYPISCHE RETINAKULTUR	121
5	ZUSAMMENFASSUNG	123
6	LITERATURVERZEICHNIS	125
7	ANHANG	141
7.1	ABKÜRZUNGEN	141
7.2	LEBENS LAUF	143

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: DAS CYTOSKELETT BEEINFLUSSENDE SUBSTANZEN	22
TABELLE 2: MEHRFACH VERWENDETE PUFFER	32
TABELLE 3: IN DER RETINAKULTUR VERWENDETE MEDIEN	33
TABELLE 4: VERWENDETE KONSTRUKTE UND VEKTOREN ZUR TRANSFEKTION	38
TABELLE 5: VERWENDETE PRIMÄRE ANTIKÖRPER	48
TABELLE 6: AUSGEWÄHLTE ARBEITEN UND DEREN ERGEBNISSE IM KONTEXT DES AKTIVEN ODER PASSIVEN TRANSPORTS VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN.....	107

ABBILDUNGSSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: MORPHOLOGIE UND HISTOLOGIE DES SÄUGETIERAUGES.	2
ABBILDUNG 2: DIE RETINA UND DIE PHOTOREZEPTORZELLEN.	3
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PHOTOTRANSDUKTIONSKASKADE.	7
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON HELL- UND DUNKELADAPTIERTEN PHOTOREZEPTORZELLEN. .	8
ABBILDUNG 5: ÜBERSICHT DER TRANSLOKATIONEN VON ARRESTIN, RECOVERIN UND TRANSDUCIN	12
ABBILDUNG 6: WIRKUNGSWEISE VON DAS CYTOSKELETT BEEINFLUSSENDEN SUBSTANZEN	23
ABBILDUNG 7: RETINAPRÄPARATION FÜR DIE KULTIVIERUNG UND ANFERTIGUNG VON GEFRIERSCHNITTEN	35
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSAUFBAUS ZUR KULTIVIERUNG DER RETINA.	36
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU UND -ABLAUF ZUR ELEKTROPORATION VON RETINAE.....	40
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU UND -ABLAUF ZUR BALLISTISCHEN TRANSFEKTION	43
ABBILDUNG 11: ANFERTIGUNG VON SCHNITTPRÄPARATEN DER RETINAKULTUR	46
ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER „TUNEL“-METHODE	47
ABBILDUNG 13: „TUNEL-STAINING“ IN LONGITUDINALEN GEFRIERSCHNITTEN KULTIVierter RETINAE.	57
ABBILDUNG 14: LOKALISATION VON TRANSDUCIN UND ARRESTIN IN RETINASCHNITTEN (MAUS)	61
ABBILDUNG 15: LOKALISATION VON ARRESTIN IN RETINASCHNITTEN VON RETINAKULTUREN (<i>XENOPUS</i>)	63
ABBILDUNG 16: DESTABILISATION VON AKTINFILAMENTEN IN RETINAE MIT CYTOCHALASIN D.	66
ABBILDUNG 17: LOKALISATION VON ARRESTIN AND TRANSDUCIN IN VON DUNKEL NACH HELL ADAPTIERTER RETINAKULTUR, BEHANDELT ZUR DESTABILISATION VON AKTINFILAMENTEN.....	68
ABBILDUNG 18: LOKALISATION VON ARRESTIN AND TRANSDUCIN IN VON HELL NACH DUNKEL ADAPTIERTER RETINAKULTUR, BEHANDELT ZUR DESTABILISATION VON AKTINFILAMENTEN.....	70
ABBILDUNG 19: EINFLUSS VON BLEBBISTATIN, EINEM MYOSIN II-INHIBITOR, AUF DIE LICHTABHÄNGIGE LOKALISATION VON TRANSDUCIN.....	72
ABBILDUNG 20: DIE LICHTABHÄNGIGEN TRANSLOKATIONEN VON TRANSDUCIN UND ARRESTIN IN <i>SHAKER-1</i> UND WILDTYPMÄUSEN.	74
ABBILDUNG 21: LOKALISATION VON TUBULIN IN PHOTOREZEPTORZELLEN KULTIVierter RETINAE.....	77
ABBILDUNG 22: LOKALISATION VON ARRESTIN AND TRANSDUCIN IN VON DUNKEL NACH HELL ADAPTIERTER RETINAKULTUR, BEHANDELT MIT THIABENDAZOL ZUR DESTABILISATION VON MIKROTUBULI..	79
ABBILDUNG 23: LOKALISATION VON ARRESTIN AND TRANSDUCIN IN VON HELL NACH DUNKEL ADAPTIERTER RETINAKULTUR, BEHANDELT MIT THIABENDAZOL ZUR DESTABILISATION VON MIKROTUBULI..	81
ABBILDUNG 24: KULTIVIERTE RETINA NACH ELEKTROPORATION MIT eGFP-KONSTRUKT.....	83
ABBILDUNG 25: TRANSFEKTION EINER RETINAKULTUR (PN 11) MIT EINEM eGFP-CENTRIN 3 KONSTRUKT.	84
ABBILDUNG 26: RETINAKULTUR TRANSFIZIERT DURCH ELEKTROPORATION MIT eGFP-CENTRIN 1-KONSTRUKT. 85	
ABBILDUNG 27: eGFP-CENTRIN 1-EXPRIMIERENDE ZELLEN DER RETINAKULTUR NACH BALLISTISCHER TRANSFEKTION, VERGlichen MIT <i>IN VIVO</i> FARBINJIZIERTEN ZELLEN.....	86
ABBILDUNG 28: RETINAKULTUR IN DER ZELLEN MITTELS DER GENE GUN™ TRANSFIZIERT WURDEN.....	87
ABBILDUNG 29: VERTEILUNG VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN IN VEREINFACHTEN PHOTOREZEPTORZELLEN. 103	
ABBILDUNG 30: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG HELL- BZW. DUNKELADAPTIERTER PHOTOREZEPTORZELLEN... 116	
ABBILDUNG 31: ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ANALYSE MIT HILFE VON IMMUNOGOLDMARKIERUNG, ZUR BESTIMMUNG DER VERTEILUNG VON ARRESTIN UND TRANSDUCIN IM VERBINDUNGSCILIUM... 119	

1 Einleitung

Der Mensch nimmt, wie die meisten Säugetiere, den größten Teil der Informationen seiner Umwelt, über den Sehsinn auf. Dies bedingt ein hoch leistungsfähiges optisches System, beziehungsweise bevorzugte in der Evolution die Ausprägung des Säugetierauges. Das im Auge zur Aufnahme, wie Vorverarbeitung der visuellen Informationen befähigende Gewebe, ist die Retina. In ihr sind spezialisierte Neuronen zu einer Gesamtfunktionalität verschaltet. Die Vielschichtigkeit der derzeit bekannten (etwa 100 verschiedenen) Gendefekte, die retinale Degenerationen und somit Erblindung hervorrufen können (Rattner *et al.*, 1999), gibt einen Hinweis auf die komplexen molekularen Zusammenhänge, die die Funktionalität der Retina gewährleisten. Zur Untersuchung der Funktionen von Proteinen speziell in den Photorezeptorzellen, ist es notwendig diese in ihrem zellulären retinalen Umfeld zu analysieren, da Photorezeptorzellen außerhalb dieser Umgebung ihre Kompartimentierung und damit ihr (visuelles) Funktionsvermögen verlieren. In der vorliegenden Arbeit wird mit der organotypischen Kultur adulter Retinae eine Methode etabliert, die es erlaubt Photorezeptorzellen für zellbiologische Untersuchungen außerhalb des Auges experimentell zugänglich zu machen.

1.1 Morphologie und Histologie des Säugetierauges

Da die Retina (Netzhaut) von Vertebraten in der vorliegenden Arbeit das primäre Untersuchungsobjekt ist, soll hier zunächst auf den Aufbau des Vertebratenauges und dann, im speziellen, näher auf die Retina eingegangen werden. Der Aufbau eines Säugetierauges ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt, das weiße Quadrat stellt hierin den in Abbildung 2 A dargestellten Ausschnitt der Retina dar. Phylogenetisch geht das inverse Auge der Wirbeltiere aus dem Gehirn hervor (Oliver & Gruss, 1997). Ontogenetisch entsteht das Augenbläschen aus einer Ausstülpung des Zwischenhirns, das sich auf der dem Licht zugewandten Seite einstülpt. Dadurch kommen zwei Epithelschichten aneinander zu liegen, wobei die proximale Schicht das Pigmentepithel bildet, während sich aus der distalen die neuronale Retina entwickelt. Die Licht aufnehmenden Zellen, die Photorezeptoren, bilden die innerste Schicht der neuronalen Retina (Abb. 1). Da die lichtempfindlichen Außensegmente der Photorezeptoren auf der vom Licht abgewandten Seite zu liegen kommen, wird das Vertebratenauge auch als inverses Auge bezeichnet. Diesen Außensegmenten schließt sich das retinale Pigmentepithel (RPE) an, dessen Zellen durch Melanin schwarz gefärbte

Melanosomen beinhalten und als Lichtfilter fungieren. Auf der basalen Seite zeigen diese Zellen Vertiefungen, die der Oberflächenvergrößerung zum Stoffaustausch mit den Blutgefäßen der *Chorioidea* dienen. Auf der apikalen Seite umgreifen fingerartige, mikrovilläre Ausläufer jeder RPE-Zelle einige dutzend Außensegmente von Photorezeptorzellen. An das retinale Pigmentepithel grenzt die *Chorioidea* (Aderhaut), eine mit vielen Blutkapillaren versehene Schicht, die Teile der Retina mit Nährstoffen versorgt. Um die *Chorioidea* befindet sich die derbe aus Bindegewebe bestehende *Sclera* (Lederhaut), die distal an der lichtzugewandten Seite einen lichtdurchlässigen Abschnitt, die *Cornea* (Hornhaut) bildet. *Sclera* und *Cornea* bilden das Widerlager für den durch die Linse und den gallertartigen *Vitreus* (Glaskörper) aufgebauten Innendruck.

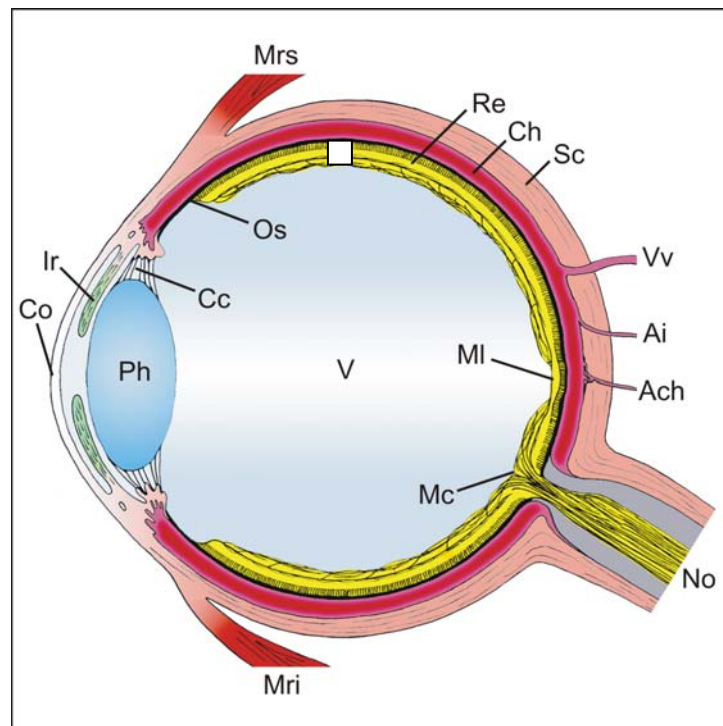


Abbildung 1: Morphologie und Histologie des Säugetierauges. Schematischer Längsschnitt durch ein Säugetierauge (Zeichnung: J. Harf). Das weiße Rechteck repräsentiert den in **Abbildung 2 A** dargestellten Ausschnitt der Retina. Co = Cornea (Hornhaut), Ir = Iris, Ph = Phakos (Linse), Cc = Corpus ciliare (Ziliarmuskel), Mri, Mrs = Musculus rectus inferior, superior, Os = Ora serrata, V = Vitreus (Glaskörper), Re = Retina (Netzhaut), Ch = Choridea (Aderhaut), Sc= Sclera (Lederhaut), Mi = Macula lutea (gelbe Fleck), Mc = Macula caesus (blinde Fleck), Vv = Vena vorticososa, Ai = Ateria iridis, Ach = Ateria chorioidea, No= Nervus opticus.

Auf Höhe der *Ora serata*, der Grenze zwischen *Sclera* und *Cornea* liegen im Augeninnern der Ziliarkörper, der Ziliarmuskel und die Iris. Das Streulicht der Umwelt wird durch den optischen Apparat, aus *Cornea*, Linse und Glaskörper, als Abbild derselben auf die Retina projiziert. Zwischen *Cornea* und Linse muss das Licht die von der Iris umgrenzte Pupille

passieren, um auf die über den Ziliarmuskel und Ziliarfasern verformbare Linse zu treffen. Dies ermöglicht die Änderung der Lichtbrechung zur Akkomodation. Nach der Linse durchquert das Licht den Glaskörper um im Augenhintergrund auf die Retina zu treffen.

1.1.1 Die Retina der Säugetiere

Die Retina oder Netzhaut ist das zum Sehen befähigende Gewebe im Augenhintergrund. Durch den optischen Apparat im Wirbeltierauge aus Cornea, Linse und Glaskörper wird ein Abbild der Umgebung auf die Netzhaut projiziert (Abb. 1). Die Netzhaut besteht aus einem komplexen Netzwerk verschiedener neuronaler Zell(typ)en die im Dienste der Lichtabsorption sowie erster Schritte in der Informationsverarbeitung stehen (Abb. 2).

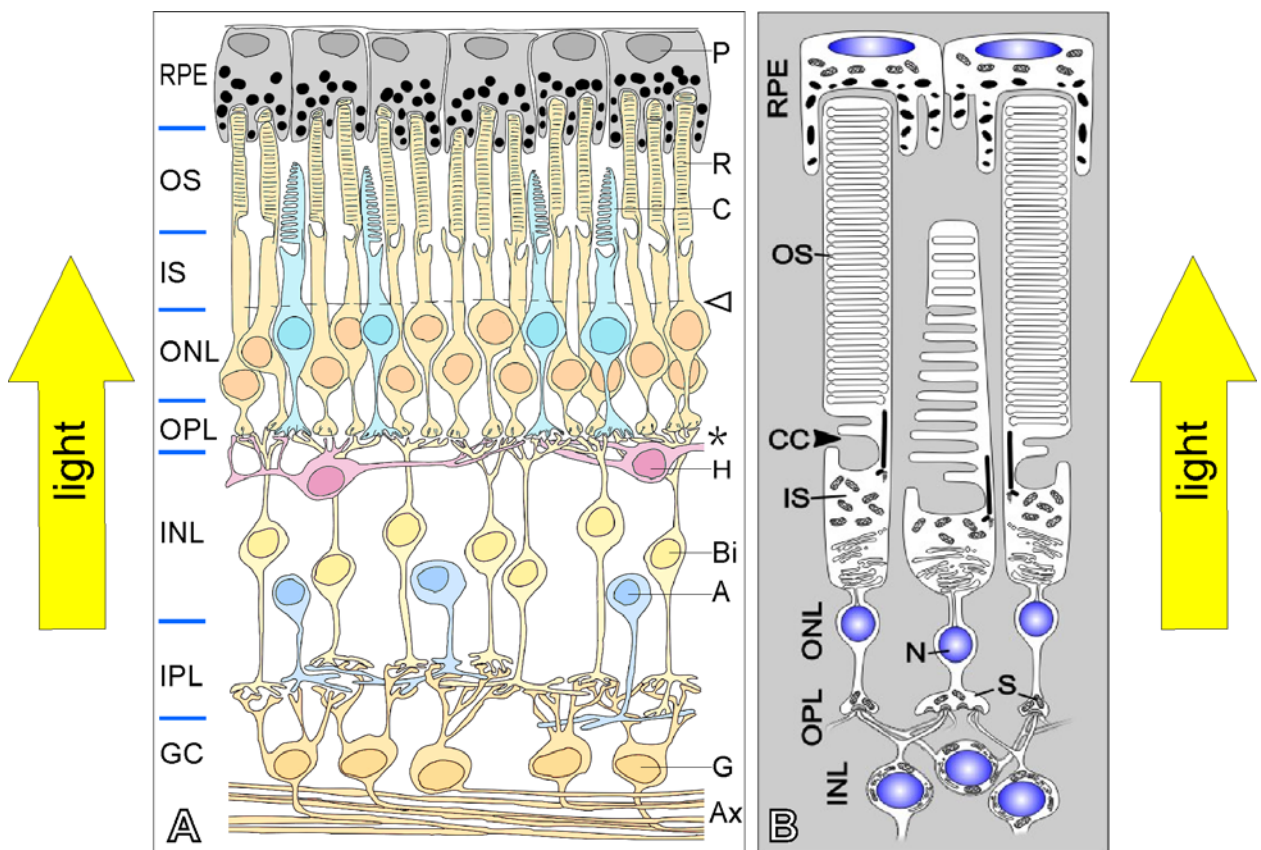


Abbildung 2: Die Retina und die Photorezeptorzellen. A: Die Zelltypen der Retina und deren Anordnung in einem schematischen Längsschnitt der Retina. (Zeichnung: J. Harf). P = Pigmentepithelzellen, R = Stäbchen-Photorezeptoren, C = Zapfen-Photorezeptoren, H = Horizontalzellen, Bi = Bipolarzellen, A = Amakrinzellen, G = Ganglienzellen, Ax = Axone der Ganglienzellen. Die gestrichelte Linie stellt die durch die Müllerzellen (nicht abgebildet) gebildete *Membrana limitans externa* dar. B: Schematische Darstellung von Photorezeptorzellen bis hin zur inneren Körnerschicht (INL). Weitere Erläuterungen im Text. RPE = Retinales Pigmentepithel, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht. Photorezeptorzellen: Stäbchen (mittlere) und Zapfen (äußeren); OS = Außensegment, IS = Innensegment der Photorezeptorzelle, CC = Verbindungscilium, N = Nucleus, S = Synapse.

Die Vertebraten besitzen morphologisch gesehen ein inverses Auge, bei dem das Licht zunächst durch die verschiedenen Schichten der Netzhaut fällt und dann erst auf den lichtempfindlichen Teil der Photorezeptorzellen, das Außensegment, trifft. Daran anschließend im Augenhintergrund befindet sich das retinale Pigmentepithel, das die Photorezeptoraußensegmente von einander isoliert und vor Streulicht schützt. Das retinale Pigmentepithel spielt des Weiteren eine wichtige Rolle bei der Regeneration des Sehfärbstoffes als auch bei der stetigen Erneuerung der Photorezeptoraußensegmente (Bok, 1993). Die von den Photorezeptorzellen in neuronale Signale umgewandelte Lichtinformation wird mit Hilfe der ihr nachgeschalteten Nervenzellen verarbeitet. Dabei stehen bipolare, horizontale, amakrine sowie Ganglienzellen (Abb. 2) im Dienste einer Informationsvorverarbeitung des Bildes, das letztlich im visuellen *Cortex* des Gehirnes entsteht. Dazu treten die gebündelten Axone der Ganglienzellen aus dem Auge als *Nervus opticus* aus und projizieren über das *Chiasma opticum* in den *Corpus geniculatum laterale* des *Thalamus* der jeweils gegenüberliegenden Hirnhälfte.

1.1.2 Die Photorezeptorzelle der Säugetiere

Die Photorezeptorzelle ist eine hochspezialisierte sensorische Nervenzelle, die einen stark polaren und kompartimentierten Aufbau aufweist. Sie ist grob in ein biosynthetisch aktives Innensegment, sowie ein lichtempfindliches Außensegment zu unterteilen, die über ein schlankes nicht bewegliches Cilium miteinander verbunden sind. Dieses Cilium stellt die einzige cytoplasmatische Verbindung zwischen diesen Hauptkompartimenten dar. Des Weiteren lässt sich noch ein, dem Innensegment sich anschließender Kernbereich, sowie eine synaptische Endigung unterscheiden. In der Retina treten die gesamten Kerne der Photorezeptoren als äußere Körnerschicht und die Region der Synapsen mit Bipolar- und Horizontalzellen als äußere plexiforme Schicht in Erscheinung. Im Innensegment finden der Energieumsatz und die Synthese der Proteinausstattung für die gesamte Photorezeptorzelle, also auch für das Außensegment statt. Deswegen müssen alle im Außensegment für die Signaltransduktion notwendigen Komponenten durch den „Flaschenhals“, das schmale, im Durchmesser ca. 0,1 μm breite Cilium transportiert werden (Wolfrum, 1995). Das Außensegment ist aus so genannte „Disks“ aufgebaut, die dicht zusammengelagerte intrazelluläre Membranstapel sind, an denen sich die Lichtsignaltransduktion vollzieht. Auf die molekulare Ausstattung dieser Disks soll später noch einmal näher eingegangen werden.

Es lassen sich zwei Haupttypen von Photorezeptorzellen in der Retina von Wirbeltieren unterscheiden. Zum einen sind dies die Zapfen (engl.: cones), die vor allem für

das Sehen bei Tageslicht und das Farbsehen verantwortlich sind. Vögel, Fische, Reptilien und Amphibien können bis zu vier Zapfentypen besitzen (Tetrachromaten). Beim Menschen und den Altweltaffen (Trichromaten) gibt es drei verschiedene Zapfentypen (L, M und S) mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima für rot (L), grün (M) und blau (S), wobei sich der M-Typ durch eine Genduplikation aus dem L-Zapfentypen auf dem X-Chromosom entwickelte. Bei allen anderen Säugetieren sind nur zwei Zapfentypen vorhanden (Dichromaten). Die Zapfen befinden sich in der humanen Retina vornehmlich im Zentrum, der *Macula lutea*. In der *Fovea centralis* (Sehgrube) im Zentrum der *Macula* befinden sich sogar ausschließlich Zapfen. Dem gegenüber gibt es den Photorezeptortyp der Stäbchen (engl.: rods). Sie sind für das Sehen bei geringen Lichtintensitäten sowie das Bewegungssehen verantwortlich und beim Menschen besonders im Randbereich der Netzhaut anzutreffen. Sie besitzen gegenüber den Zapfen ein höheres zeitliches Auflösungsvermögen und sind des Weiteren in der Lage über einen größeren Wellenlängenbereich Licht zu detektieren. Die zuvor beschriebene Verteilung der Photorezeptortypen in der Retina gilt speziell für die Altweltaffen, bei den meisten Säugetieren ist diese Verteilung der verschiedenen Photorezeptorzellen nicht so gegeben. Beispielsweise sind bei Maus und Ratte die Zapfen nicht in einer *Macula* gehäuft vorzufinden, sondern nahezu gleichmäßig über die Retina verteilt. Die Photorezeptorzellen des Stäbchentyps in der Nagerretina, waren der in der vorliegenden Arbeit vornehmlich untersuchte Zelltyp. Im nachfolgenden Kapitel soll nun auf die molekulare Funktionsweise in der Lichtdetektion der Photorezeptorzellen eingegangen werden.

1.1.2.1 Die visuelle Signaltransduktion

Die visuelle Signaltransduktion findet in den Photorezeptorzellen der Retina, genauer gesagt an den Disk-Membranen der Photorezeptoraußensegmente statt. Hierbei wird ein Lichtreiz in elektrische bzw. chemische Information umgewandelt (Phototransduktion). Der Sehfärbstoff Rhodopsin, der in die Membran der Disks integriert ist, gehört zu den Sieben-Transmembran-Rezeptoren (Palczewski *et al.*, 2000). Rhodopsin besteht aus einem Proteinanteil, dem Opsin und einem Aldehydanteil dem Retinal, das auch als Chromophor bezeichnet wird. Retinal ist in der Konformation 11-cis Retinal kovalent an Opsin gebunden (Fain *et al.*, 2001). Durch die Absorption eines Photons wird die Konformation des Chromophors von 11-cis zu all-trans Retinal geändert und dieses vom Opsin abgespalten. Die daraus resultierende Aktivierung des Opsins ermöglicht dessen Interaktion mit Transducin (Fain *et al.*, 2001). Rhodopsin gehört zu der Klasse der „G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren“ (GPCR). Transducin ist das

heterotrimäre G-Protein der visuellen Signaltransduktionskaskade, das aus den Untereinheiten $G\alpha_t$, $G\beta_t$ und $G\gamma_t$ aufgebaut ist. Im inaktiven Zustand ist GDP (Guanosin Diphosphat) an die Untereinheit $G\alpha_t$ gebunden. Nach der Interaktion mit lichtaktiviertem Rhodopsin, kommt es in α -Transducin zu einem Austausch von GDP zu GTP (Guanosin Triphosphat) und resultiert in der Dissoziation in die aktivierte $G\alpha_t$ -Untereinheit und den untrennbaren $G\beta_t\gamma_t$ -Komplex (Arshavsky, 2002; Offermanns, 2003). Die entstandene GTP-gebundene $G\alpha_t$ -Untereinheit ist nun in der Lage die inhibitorische γ -Untereinheit von der ebenfalls mit der Disk-Membran assoziierten Phosphodiesterase (PDE) abzuspalten. Es sei an dieser Stelle vorangestellt, dass in der nicht belichteten Photorezeptorzelle durch cGMP (cyclisches Guanosin-3', 5'-monophosphat) Na^+/Ca^{2+} Kanäle in der Plasmamembran des Außensegments offen gehalten werden. Durch dieses ständige Einströmen von Kationen entsteht der so genannte „Dunkelstrom“, der in einem ständiges Ausschütten von Transmittersubstanz (hier Glutamat) an der Synapse der unbelichteten Photorezeptorzelle führt. Bei Belichtung wird nun durch die zuvor geschilderte Aktivierung der PDE der „Second Messenger“ cGMP zu 5'GMP hydrolysiert. Mit dieser Reduktion des freien cGMP, werden die cGMP abhängigen Na^+/Ca^{2+} Kanäle in der Plasmamembran des Außensegments geschlossen. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Photorezeptorzelle und vermindert die Glutamatausschüttung an deren Synapse (Molday & Kaupp, 2000; Pugh & Lamb, 2000). Die Lichtreaktion wird anschließend zur Regeneration der beteiligten Komponenten „abgeschaltet“ um eine erneute Auslösbarkeit der Signalkaskade zu gewährleisten. Dazu phosphoryliert die Rhodopsinkinase das lichtaktivierte Rhodopsin (Rho^*) und ermöglicht somit die Bindung von Arrestin an das aktivierte und phosphorylierte Rhodopsin (Abb. 3, rechter Teil). Arrestin verhindert die Interaktion von (Rho^*) mit Transducin und spielt somit eine wichtige Rolle in der Terminierung der Signaltransduktion. Die Geschwindigkeit zur erneuten Bereitstellung, der an der Phototransduktion beteiligten Komponenten bestimmt die zeitliche Auflösung der Photorezeptorzellen. Diese ist höher in den Stäbchen als in den Zapfen. Die Beendigung der PDE Aktivierung durch $G\alpha_t$ -GTP wird erreicht, durch die Hydrolyse des GTPs zu GDP durch $G\alpha_t$, die unter anderem durch RGS9 („Regulators of G protein Signaling“) beschleunigt wird (Burns & Arshavsky, 2005). Der erniedrigte cGMP-Spiegel während der Lichtreaktion wird durch eine Ca^{2+} abhängige Guanylylzyklase, die GTP zu cGMP katalysiert, auf das ehemalige Niveau angehoben (Fain *et al.*, 2001). Die regenerierte Menge an cGMP öffnet die Na^+/Ca^{2+} Kanäle in der Plasmamembran, was zu einer Depolarisation der Photorezeptorzelle und damit wieder zur erhöhten Ausschüttung von Glutamat im Dunkeln führt.

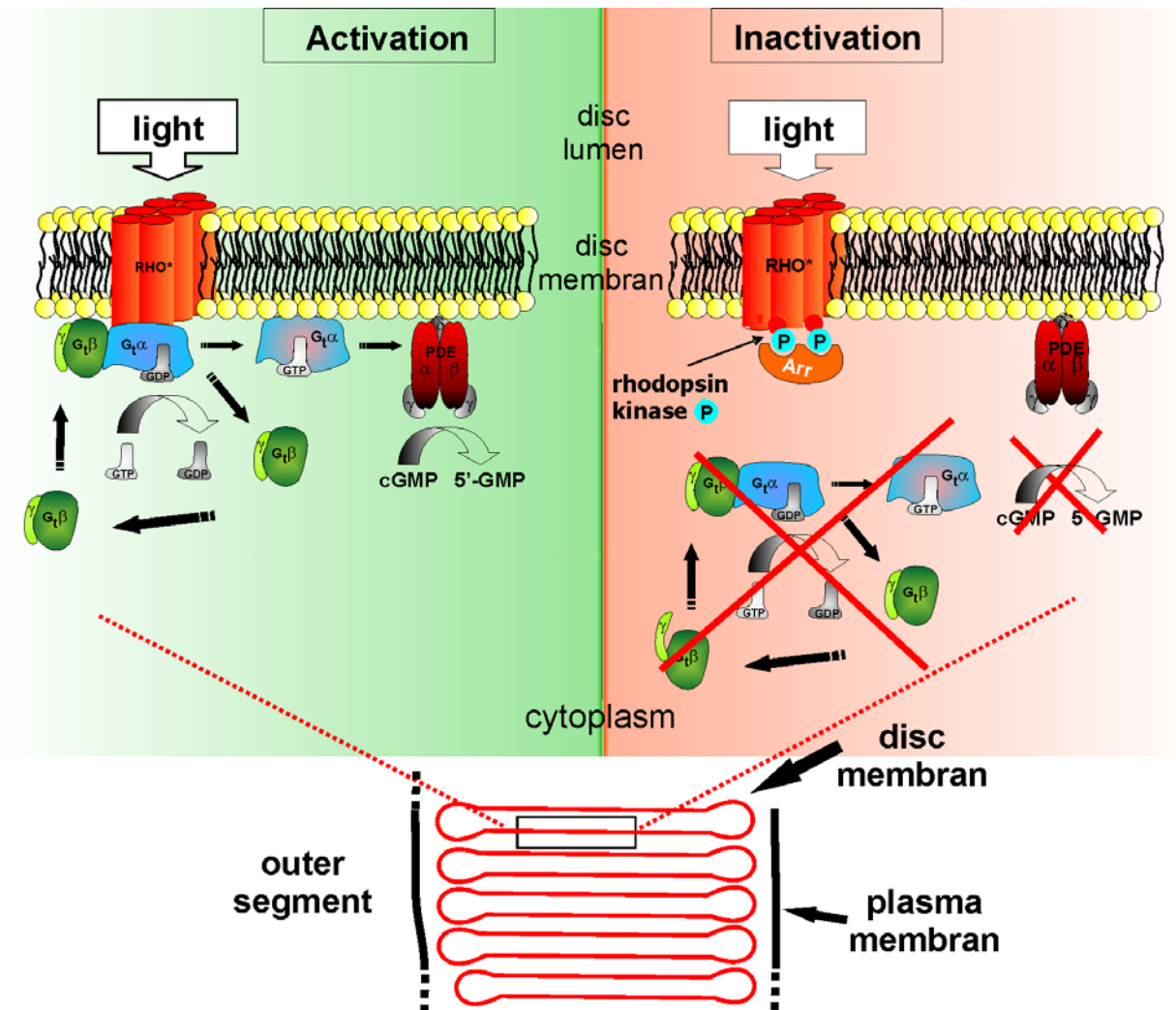


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Phototransduktionskaskade. Der obere Teil des Schemas repräsentiert die Situation in dunkeladaptierten Photorezeptoren, Rhodopsin (RHO), das heterotrimäre G-Protein Transducin (Gt) und die Phosphodiesterase (PDE) sind inaktiv. Der cGMP-Spiegel im Cytoplasma ist hoch, so dass die cGMP abhängigen Kanäle geöffnet sind und Kationen einströmen können. Der mittlere Teil des Schemas repräsentiert die Aktivierung von Rhodopsin durch ein Photon. Das aktivierte Rhodopsin katalysiert den GDP/GTP Austausch in der α -Untereinheit von Transducin. Diese wiederum aktiviert die Phosphodiesterase, die cGMP in 5'-GMP hydrolysiert. Die Molekülanzahl von cGMP sinkt, was ein Schließen der Kationen Kanäle nach sich zieht. Die Photorezeptorzelle hyperpolarisiert. Die Inaktivierung der Signalkaskade geschieht durch eine Phosphorylierung von Rhodopsin durch die Rhodopsinkinase (RK), wodurch eine Bindung von Arrestin (Arr) ermöglicht wird.

Die veränderte Ausschüttung von Transmittern in den synaptischen Spalt löst je nachdem, ob es sich bei der nachgeschalteten Bipolarzelle um eine „On- oder Off-Bipolarzelle“ handelt eine Depolarisation aus. Bereits hier und auch über Horizontalzellen finden die ersten Informationsverarbeitungen statt (laterale Inhibition). Erst wenn amakrinen Zellen und die Ganglienzellen depolarisiert werden, gelangen vorverarbeitete neuronale Signale über den *Nervus opticus* und das *Chiasma opticum* in den *Corpus geniculatum laterale* des *Thalamus*. Die über die Sehbahnen weitergeleiteten Informationen lassen schließlich im visuellen *Cortex* den optischen Sinneseindruck entstehen.

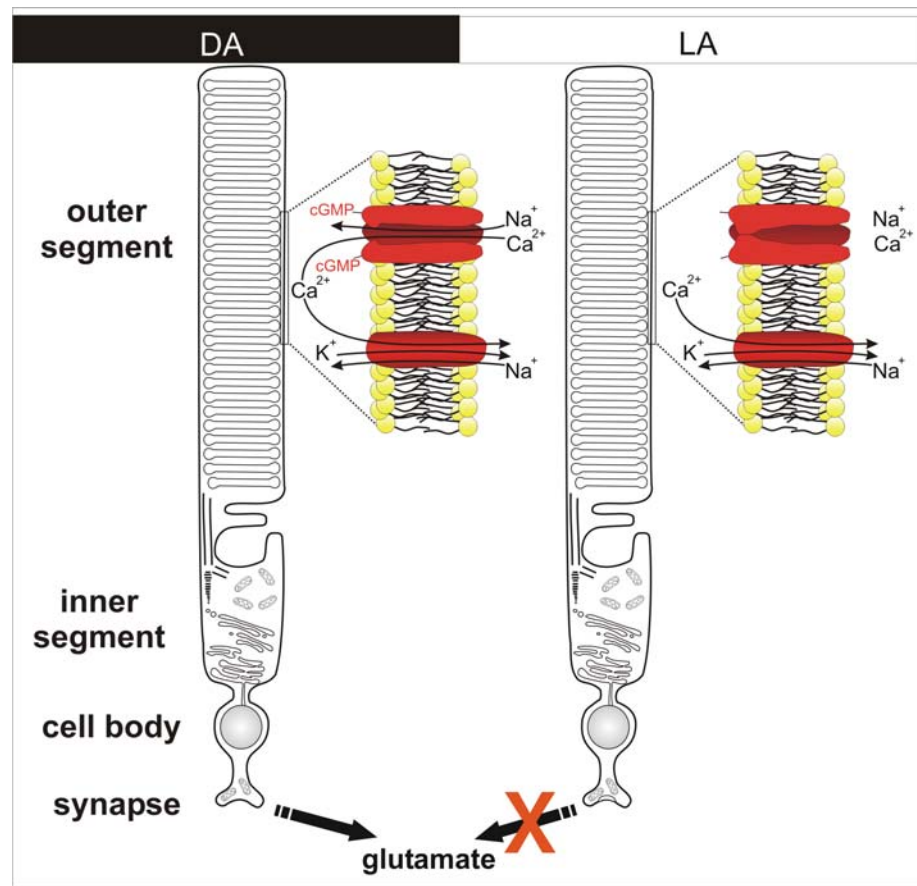


Abbildung 4: Schematische Darstellung von hell- und dunkeladaptierten Photorezeptorzellen. In der dunkeladaptierten Photorezeptorzelle (Schema links) sind von cGMP abhängige $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Kanäle geöffnet. Durch den stetigen Einstrom von Kationen ist die Photorezeptorzelle depolarisiert und schüttete den Transmitter Glutamat an der Synapse aus. Durch Belichtung der Photorezeptorzelle (Schema rechts) wird die Phototransduktionskaskade aktiviert und die Kationenkanäle werden geschlossen. Die resultierende Hyperpolarisation bewirkt eine Verminderung in der Glutamatausschüttung, Schema verändert nach Dissertation (Gießl, 2004).

Die visuelle Signaltransduktion läuft bei Invertebraten in den Rhabdomeren der Photorezeptorzellen des mikrovillären Typs ab. Auf die Unterschiede zur Signaltransduktion in ciliären Photorezeptoren der Wirbeltiere, soll nun zur Vollständigkeit kurz eingegangen werden.

Auch im Rhabdomer der Invertebratenphotorezeptorzelle ist in der Membran der mikrovillären Ausstülpungen Rhodopsin integriert (Applebury & Hargrave, 1986), das nach Lichtaktivierung und Chromophorabspaltung das visuelle G-Protein G_q aktiviert, wodurch dessen alpha-Untereinheit ($G\alpha_q$) abgespalten wird, und das an der alpha-Untereinheit gebundene GDP durch GTP ausgetauscht wird (Lee *et al.*, 1990). Die aktivierte Untereinheit $G\alpha_q$ aktiviert nun seinerseits das Enzym Phospholipase C (PLC) (Bahner *et al.*, 2000), das die Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert (Devary *et al.*, 1987). IP_3 und DAG

stellen intrazelluläre Signalmoleküle dar und bewirken eine Öffnung von TRP-Kanälen (Transient Receptor Potential) in der Photorezeptormembran (Hardie & Minke, 1992). Dadurch strömen Kationen (Ca^{2+} und Na^+) in den intrazellulären Raum und lösen somit eine Depolarisation der Rezeptorzelle aus. Das dadurch erzeugte Rezeptorpotential wird in Aktionspotentiale überführt. Die Terminierung der Photorezeptoraktivierung ist Voraussetzung für eine erneute Aktivierung und erfordert die Inaktivierung der Komponenten des Signalweges. Die Bindung von Arrestin 2 (Arr2) an Rhodopsin ist hier der entscheidende Schritt in der Inaktivierung des durch Licht aktivierten Rhodopsin Rezeptors. Der Rhodopsin-Arr2 Komplex wird nach weiteren Modifikationen (Phosphorylierung des Arr2) wieder dissoziiert, um einen neuen von Licht abhängigen Aktivierungszyklus zu ermöglichen (Hardie, 2001).

1.1.2.2 Lichtadaptation der auf Ebene der Signaltransduktion

Das Auge der Vertebraten ist in der Lage sich über einen sehr großen Bereich (bis zu 4 Zehnerpotenzen) an verschiedene Lichtintensitäten anzupassen. Dies schließt sehr geringe Helligkeiten, wie die Beleuchtungsstärke durch eine einzelne Kerze (~ 10 lux) als auch sehr helles Tageslicht an einem Sonnentag ($\sim 50\,000$ lux) ein. Dieses Anpassungsvermögen, oder Adaptation, ist für das normale Funktionsvermögen des Auges erforderlich. Die erste und offensichtliche Adaptation des Auges geschieht in Verkleinerung der Pupille durch Kontraktion der Iris. Um feinste Lichtintensitätsunterschiede bei wechselnden Helligkeiten wahrnehmen zu können, muss aber auf Ebene der Photorezeptorzellen deren Lichtempfindlichkeit optimiert werden. Dies geschieht molekular durch Aufrechterhaltung einer ausreichenden Menge an offenen cGMP-abhängigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Kanälen, unabhängig von der Aktivität der Phototransduktionskaskade. Um dies zu erreichen kann die cGMP Synthese erhöht, die cGMP Hydrolyse verringert oder die Empfindlichkeit der cGMP-abhängigen Kanäle für cGMP verändert werden. In Zusammenhang mit den molekularen Prozessen der Adaptation spielt Calcium eine wichtige Rolle. Über die Aktivierung des Ca^{2+} -abhängigen „Guanylate cyclase activating proteins“ (GCAP) kann die Guanylylzyklase direkt stimuliert werden und damit einem zu starken Abfall der cGMP Konzentration entgegensteuern (Mendez *et al.*, 2001). Über das Ca^{2+} -abhängige Protein Recoverin, das die Aktivität der Rhodopsinkinase inhibiert, kann die Empfindlichkeit der Phototransduktion für Änderungen in der Lichtintensität angepasst werden. Der durch Licht induzierte Abfall der Ca^{2+} Konzentration hebt die Inhibierung der Rhodopsinkinase durch Recoverin auf (Gorodovikova *et al.*, 1994) und verstärkt somit die Abschaltung der Signaltransduktion. Ferner können

Proteine wie Calmodulin und „Calmodulin like proteins“ durch Ca^{2+} -Aktivierung an die cGMP-abhängigen Kanäle binden und dadurch die Empfindlichkeit dieser Kanäle regulieren. Bei geringer intrazellulärer Konzentration von Ca^{2+} im Hellen löst sich Calmodulin von den Kanälen, worauf die Sensibilität dieser für cGMP erhöht wird (Rebrik *et al.*, 2000). Neben diesen Mechanismen sind noch weitere regulatorische Proteine an der Adaptation beteiligt. Einen Einfluss auf die molekulare Adaption hat zum Beispiel auch das cGMP abbauende Enzym Phosphodiesterase (PDE). Dabei spielt die Anzahl der aktivierten PDE Molekülen eine Rolle. Bei einer dunkel adaptierten Photorezeptorzelle kann ein einziges Photon über die Verstärkung durch Transducin viele PDE-Moleküle aktivieren und damit einen relativ großen Einfluss auf den cGMP Spiegel haben. Im Gegensatz dazu hat die Aktivierung der PDE durch ein zusätzliches Photon bei starker Beleuchtung, wenn bereits eine große Anzahl von PDE-Molekülen aktiviert ist, einen vergleichsweise geringen Einfluss die gesamt cGMP Konzentration.

1.1.2.3 Lichtabhängige Translokation von Proteinen der visuellen Signaltransduktion

Bereits vor über 20 Jahren konnte bei Überprüfung der Lokalisation von Transducin und Arrestin in Photorezeptorzellen eine unterschiedliche Verteilung der beiden Proteine unter verschiedenen Lichtbedingungen festgestellt werden (Broekhuysse *et al.*, 1985; Brann & Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan & McGinnis, 1988). In diesen Arbeiten wurde Arrestin im Hellen in den Außensegmenten und im Dunkeln in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen nachgewiesen. Transducin hingegen konnte im Dunkeln in den Außensegmenten und im Hellen in den Innensegmenten detektiert werden. Demnach zeigte sich für Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen eine gegensätzliche lichtabhängige Verteilung. Für diese helligkeitsbedingten Lokalisationen bewegen sich Arrestin und Transducin je nach Lichtadaptationszustand zwischen den Kompartimenten der Photorezeptorzellen (Abb. 5). In helladaptierten Stäbchen-Photorezeptorzellen befindet sich neben Transducin auch Recoverin im Innensegment der Photorezeptorzelle, wohingegen beide in dunkeladaptierten Zustand im Außensegment lokalisiert sind (Strissel *et al.*, 2005). Anfänglich wurden diese lichtabhängigen Ungleichverteilungen von Arrestin und Transducin auch der Degradation und Neusynthese, beziehungsweise der Epitopenmaskierung in immunhistochemischen Analysen zugesprochen und damit deren Translokation angezweifelt (Roof & Heth, 1988). Dass es sich hierbei aber tatsächlich um Translokationen von Arrestin

und Transducin zwischen Kompartimenten der Photorezeptorzellen handelt, konnten Experimente unter Verwendung der tangentialen Schnitttechnik zeigen (Sokolov *et al.*, 2002; Strissel *et al.*, 2006). In diesen Western Blot-Analysen, die prinzipiell nicht anfällig für Epitopenmaskierung sind, konnte anhand von Photorezeptorzellfraktionen die Translokationen von Transducin und Arrestin bestätigt werden (Sokolov *et al.*, 2002; Strissel *et al.*, 2006).

In der Regel werden in der Photorezeptorzelle Proteine nur in eine Richtung, wie zum Beispiel beim Transport des Opsins ins Außensegment, translociert. Außergewöhnlich an den beschriebenen Verteilungen ist die bidirektionale Translokation von Proteinen zwischen den Kompartimenten der Photorezeptorzelle. Der angenommene unidirektionale Transport von Molekülen (Papermaster *et al.*, 1986), stets vom Innensegment in das Außensegment der Photorezeptorzelle wurde damit widerlegt und die Frage aufgeworfen, welche Mechanismen für die unterschiedliche Verteilung, bei gleichen physiologischen Bedingungen verantwortlich sein könnten. Einen Hinweis auf die Beteiligung verschiedener Mechanismen gibt nicht nur die Ungleichverteilung der beiden Proteine, sondern auch die jeweils unterschiedlich schnelle Translokationen bei Hell- beziehungsweise Dunkeladaptation (Sokolov *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2004; Strissel *et al.*, 2006). Dieser grundsätzliche Unterschied in den Geschwindigkeiten der Translokationen konnte in den vorgenannten Arbeiten an Ratte, Maus und Krallenfrosch festgestellt werden. Während der überwiegende Anteil beider Proteine bei Helladaptation nach spätestens fünf Minuten das Kompartiment wechselt, benötigen diese bei Dunkeladaptation mindestens 45 Minuten.

Bereits in den ersten Arbeiten zu dem besprochenen Phänomen wurde vermutet (Brann & Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan & McGinnis, 1988), dass die Translokationen von Signaltransduktionskomponenten in Verbindung mit Adaptionsmechanismen stünden. Obwohl diese Vermutung nahe liegend ist, blieb man direkte Nachweise, auf Ebene einer gemessenen geänderten Empfindlichkeit von Photorezeptorzellen, zumindest für die Translokation von Arrestin, bis heute schuldig. Für Transducin konnte in isolierten Photorezeptormembranen eine lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeit der G_T -Aktivierung zu dessen Konzentration ermittelt werden (Heck & Hofmann, 2001). In einer weitergehenden Studie konnte zudem eine Korrelation zwischen der Reduktion des Transducingehaltes in Photorezeptor-Außensegmenten und Abnahmen der Signalverstärkung festgestellt werden (Sokolov *et al.*, 2002). Auch die Translokation von Arrestin ins Außensegment der Photorezeptorzelle wird als ein adaptiver Prozess angesehen. Dabei kann eine große Menge an Arrestin im Außensegment, durch seine Bindung an

lichtaktiviertes, phosphoryliertes Rhodopsin, die Lichtantwort verkürzen, beziehungsweise diese in ihrer Sensitivität reduzieren, was charakteristisch für die lichtadaptierte Photorezeptorzelle ist. Trotz dieser sinnvollen hypothetischen Korrelation konnte dafür bisher kein experimenteller Nachweis erbracht werden. Außer den Beiträgen zur Adaptation werden aber auch noch weitere Funktionen der Translokationen diskutiert. Die Translokation von Transducin könnte auch eine Schutzfunktion in Photorezeptorzellen erfüllen. So konnte gezeigt werden, dass durch kontinuierliches Licht, oder durch Mutationen induzierte konstitutive Aktivierung der Phototransduktionskaskade zu Apoptose der Photorezeptorzellen führt (Fain & Lisman, 1993; Fain & Lisman, 1999; Chen *et al.*, 1999). Die Translokation von Transducin ins Innensegment, sowie die des Arrestins ins Außensegment der Photorezeptorzelle, könnte einer schädlichen Überaktivierung der Phototransduction entgegenwirken. Des Weiteren könnte zum Beispiel die Translokation des Transducins bei Helladaptation Energie einsparen, um weniger GTP bei Aktivierungs- und Deaktivierungsschritten zu verbrauchen (Strissel *et al.*, 2004).

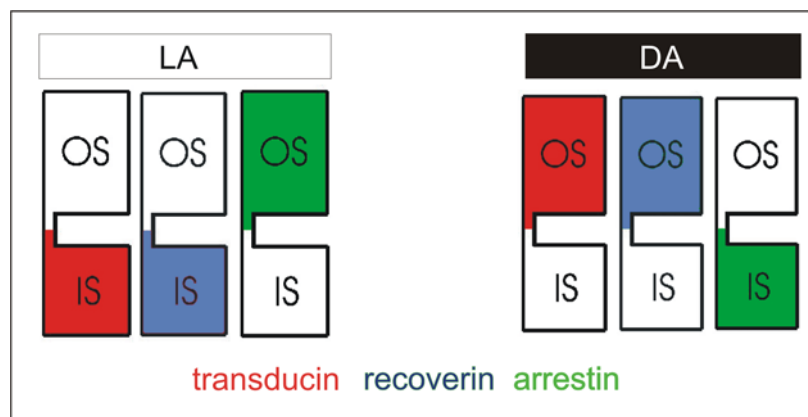


Abbildung 5: Übersicht der Translokationen von Arrestin, Recoverin und Transducin bei unterschiedlichen Lichtadaptationszuständen. In helladaptierten Photorezeptorzellen (linker Abbildungsteil) ist Arrestin (in grün) im Außensegment lokalisiert, wohingegen sich Transducin (in rot) und Recoverin (in blau) im Innensegment befinden. Im Gegensatz dazu ist die Lokalisation von Transducin und Recoverin im Dunkeln im Außensegment (rechter Abbildungsteil) und Arrestin im Innensegment. LA = helladaptierter Lichtzustand, DA = dunkeladaptierter Lichtzustand, OS = Außensegment, IS = Innensegment.

Neben der Diskussion um die funktionelle Rolle der Translokationen von Transducin und Arrestin, stehen vor allem die den molekularen Bewegungen zugrunde liegenden Mechanismen im Fokus vieler aktueller Studien und sind auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Es existieren dabei Modelle zu einem aktiven, Motorprotein-abhängigen, beziehungsweise passiven, diffusionsabhängigen Transport, basierend auf Studien mit zum Teil konträren Ergebnissen. Zum einen wird angenommen, dass aufgrund der unterschiedlichen Dauer, der mit den Adaptionen verbundenen Translokationen von Arrestin

und Transducin, vier verschiedene Mechanismen beteiligt sein könnten (Elias *et al.*, 2004). Hier wird nicht ausgeschlossen, dass passive als auch aktive Prozesse bei den verschiedenen Translokationen eine Rolle spielen könnten. In Studien, die die Diffusionshypothese favorisieren, werden unterschiedliche Affinitäten, Diffusionswiderstände, beziehungsweise Aktivierungszustände der an den Translokationen beteiligten Komponenten für die unterschiedlichen Kinetiken verantwortlich gemacht (Nair *et al.*, 2005a; Calvert *et al.*, 2006; Kerov *et al.*, 2005a). In knock-out Mäusen von Arrestin und Transducin konnte gezeigt werden, dass das jeweils andere Protein unbeeinflusst, und damit unabhängig vom anderen translociert wird (Zhang *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2003).

Im Falle des Transducins werden verschiedene Interagierende Proteine im Zusammenhang mit der Regulation seiner Translokation diskutiert. Zu diesen Proteinen gehört LGN (Leu-Gly-Asn repeat-enriched), welches in den Innensegmenten, sowie der äußeren plexiformen (Nair *et al.*, 2005b), als Regulator der G-Proteinaktivität an der Translokation von Transducin im Innensegment beteiligt sein könnte (Kerov *et al.*, 2005b). Weitere in der Photorezeptorzelle mit Transducin Interagierende Proteine, sind die im Verbindungscilium und dem Basalkörper lokalisierten Centrine (Pulvermüller *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004). Diese werden, durch ihre Calcium-, sowie Phosphorylierungs-abhängige Interaktion mit $\beta\gamma$ -Transducin und ihrer Schlüsselposition im Photorezeptorcilium, als so genannte „Gatekeeper“ der Transducintranslokation vermutet (Gießl *et al.*, 2006).

Im Zusammenhang mit der Diffusionshypothese zur Arrestintranslokation, wird dessen Affinität zu aktiviertem phosphoriliertem Rhodopsin im Außensegment (Nair *et al.*, 2005a), und zum anderen eine direkte, bisher nur *in vitro* gezeigte, Bindung an Mikrotubuli im Innensegment vorgeschlagen (Nair *et al.*, 2005b). Dem gegenüber konnte in Photorezeptorzellen von *Xenopus laevis* eine Abhängigkeit der Arrestintranslokation von Mikrotubuli im Innen- wie auch Außensegment der Photorezeptorzelle gezeigt werden (Peterson *et al.*, 2005). Die Destabilisation von Mikrotubuli führte hier zur Beeinträchtigung der Translokation von Arrestin, was für aktive Transporte spricht, aber auch direkte Bindung und Diffusion nicht ausschließt. Die Diffusionshypothese von Nair und Mitarbeitern wird durch die folgenden Annahmen gestützt: Mikrotubuli im Innensegment der Photorezeptorzelle bilden eine Art „Magnet“ oder „Abfluss“ für Arrestin. Im Hellen ist allerdings die Affinität des Arrestins zu dem „Magnet“ aktiviertes und phosphoryliertes Rhodopsin größer und bewirkt somit dessen Translokation ins Außensegment. Diese Hypothese zur diffusionsabhängigen Bewegung von Arrestin wird dadurch gestützt, dass die Transloaktionen in Augenbecherkulturen ATP unabhängig stattfinden (Nair *et al.*, 2005a). Für eine passive

Translokation von Arrestin in das Außensegment wird ferner die hohe Geschwindigkeit des Vorgangs angeführt. Diese vereinfachte „Magnet-Hypothese“ ist allerdings umstritten. Berechnungen, die einige idealisierte Annahmen zu Durchmesser und Länge der Kompartimente, des Verbindungsciliums und die Entfernung von Innen- zu Außensegment beinhalten, konnten die Diffusion als Möglichkeit einerseits bestätigen (Calvert *et al.*, 2006). Andererseits widerlegen Daten, die eine Verbindung der Arrestintranslokation in das Außensegment mit einem Schwellenwert der Menge an aktiviertem Rhodopsin herstellen (Strissel *et al.*, 2006), die „Magnet-Hypothese“ von Nair und Mitarbeitern. Nach der „Magnet-Hypothese“ müsste die Arrestintranslokation in das Außensegment bei steigender Lichtintensität linear zunehmen, dem ist aber nicht so, vielmehr scheint die Rhodopsinaktivierung einen Schwellenwert übersteigen zu müssen, um die Translokation auszulösen (Strissel *et al.*, 2006). Nach den Messungen der vorgenannten Studie, übersteigt dabei die Anzahl der ins Außensegment translocierten Arrestinmoleküle die der lichtaktivierten Rhodopsinmoleküle, um ein vielfaches (Strissel *et al.*, 2006). Diese Daten geben zusätzlich Anlass zur Überlegung, dass weitere Mechanismen an der Translokation beteiligt sein müssen. Dieser Überschuss des Arrestins zum Bindepartner Rhodopsin, setzt das Vorhandensein weiterer Signalwege voraus und macht ebenso eine Beteiligung aktiver Transportvorgänge wahrscheinlich.

Im Gegensatz zu den Argumenten zur diffusionsabhängigen Translokation der Signaltransduktionsproteine, stehen die einer Reihe anderer Arbeiten, die für einen aktiven Transport sprechen. In solchen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in knock-out Mäusen des mit Mikrotubuli assoziierten Motorproteins Kinesin II, eine Beeinträchtigung der Arrestin, aber nicht der Transducin Translokation festzustellen war (Marszalek *et al.*, 2000). Der immunhistochemische Nachweis, dass Arrestin mit den Mikrotubuli im Innensegment und im Verbindungscilium dunkeladaptierter Photorezeptoren von *Xenopus* lokalisiert, wurde für eine Struktur-Funktion Beziehung herangezogen (McGinnis *et al.*, 2002). In transgenen Kaulquappen von *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass GFP-Arrestin lichtabhängig in das Außensegment der Photorezeptorzellen translociert, aber sich nach fortdauernder Belichtung zurück in das Innensegment bewegte. Diese Rückbewegung wird als aktiver Transport angesehen (Peterson *et al.*, 2003; Strissel *et al.*, 2004).

Auch wenn die Mechanismen des Transportes von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen noch nicht aufgeklärt werden konnten, wurden allerdings bereits Abhängigkeiten von Komponenten der visuellen Signaltransduktion gezeigt. So findet die Translokation von Arrestin auch dann statt, wenn Rhodopsin nicht phosphoryliert werden

kann (Mendez *et al.*, 2003), was gegen eine bereits erläuterte „Magnet“-Theorie spricht. Der Befund, dass Arrestintranslokation auch in Transducin-defizienten Photorezeptorzellen geschieht, zeigt zudem die Unabhängigkeit des Prozesses von der Aktivierung der visuellen Signaltransduktion (Zhang *et al.*, 2003). Notwendig für die Translokation von Arrestin ist allerdings die Lichtaktivierbarkeit von Rhodopsin, da gezeigt werden konnte, dass in Photorezeptorzellen einer RPE65-defizienten Maus diese Translokation unterbunden ist (Mendez *et al.*, 2003).

Die lichtabhängige Translokation von Komponenten der visuellen Signaltransduktion, konnte nicht nur in den Stäbchen-Photorezeptorzellen der Vertebraten, sondern auch in den mikrovillären Rezeptorzellen der Invertebraten nachgewiesen werden. Dabei bewegen sich Arrestin und das G-Protein in gleicher beleuchtungsabhängiger Weise in die und aus den lichtsensitiven Kompartimenten der Photorezeptorzellen. Wie Transducin in den Stäbchen der Vertebraten, translociert das G-Proteinen G_q lichtabhängig in den Photorezeptorzellen der Invertebraten. Dies konnte zunächst in Photorezeptorzellen von Krebsen (Terakita *et al.*, 1996; Terakita *et al.*, 1998) und später auch in Studien an *Drosophila* (Kosloff *et al.*, 2003), nachgewiesen werden. Wie auch in Vertebraten, verursacht Licht die Bewegung des Arrestins, bei Invertebraten Arrestin 2 (Arr2), vom cytoplasmatischen Kompartiment in die Rhabdomere, in gegensätzlicher Weise zur Bewegung von G_q (Kiselev *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die genannten molekularen Bewegungen einen universellen Mechanismus in Photorezeptorzellen darstellen (Strissel *et al.*, 2004). Neben den lichtabhängig translocierten Proteinen $G\alpha_q$ (Kosloff *et al.*, 2003) und Arrestin 2 (Lee *et al.*, 2003) werden ferner in mikrovillären Photorezeptorzellen von *Drosophila* auch Kanäle vom TRPL-Typ, nicht aber vom TRP-Typ, in und aus den Rhabdomeren translociert (Xu *et al.*, 2001). Auch für diese lichtabhängigen Rezeptor-Translokationen konnten Hinweise gesammelt werden, dass die genannten molekularen Bewegungen im Dienste einer Lichtadaptation der Photorezeptorzellen stehen (Bahner *et al.*, 2002; Frechter & Minke, 2006).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die lichtabhängigen Translokationen von Proteinen der visuellen Signaltransduktion in Photorezeptorzellen der Vertebraten als auch der Invertebraten stattfinden. Damit scheint es sich bei diesen molekularen Bewegungen, um einen universellen adaptativen Prozess zu handeln. Eine an der physiologischen Aktivität von Photorezeptorzellen messbare Anpassung an verschiedene Lichtbedingungen konnte für einige dieser Translokationen bereits nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2003; Bahner *et al.*, 2002; Sokolov *et al.*, 2002), aber die zugrunde liegenden Mechanismen dieser molekularen

Bewegungen sind immer noch vielfach unverstanden. Da Bewegungen von Zellen und deren Bestandteilen in der Regel vom Zellskelett abhängig sind, könnten auch die Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen von Zellskelettelementen abhängig sein.

1.2 Das Zellskelett

Da in der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit von Prozessen von Elementen des Zellskeletts in Photorezeptorzellen untersucht wurde, soll im Folgenden zunächst ein kurzer allgemeiner Einblick in das Zellskelett gegeben und anschließend speziell das Zellskelettelemente von Photorezeptorzellen vorgestellt werden.

Das Zell- oder Cytoskelett ist ein intrazelluläres Netzwerk aus fädigen oder röhrenförmigen Strukturen, die aus einzelnen, vornehmlich Proteinbausteinen aufgebaut sind. Dieses Netzwerk des Cytoskeletts ist durch einen ständigen dynamischen Wandel gekennzeichnet, der in einem stetigen Auf- und Abbau der einzelnen Elemente besteht. Das Cytoskelett hat zum einen Form- und Struktur gebende, sowie stabilisierende Funktion in der Zelle. Zum anderen ermöglicht es aktive Bewegungen von ganzen Zellen oder einzelnen Teilen oder Kompartimenten und bildet zudem die Grundlage für zahllose intrazelluläre Transportvorgänge (Lodish *et al.*, 2004). Das Cytoskelett lässt sich grob in Mikrotubuli, Intermediär- und Aktinfilamente unterteilen. Des Weiteren gibt es auch noch Nanofilamente, die zum Cytoskelett gezählt werden. Diese werden zum Beispiel aus Mitgliedern der Proteingruppe der Centrine (Centrin 1-4) aufgebaut, die unter anderem in Grünalgen kontraktile Nanofilamente ausbilden (Salisbury & Floyd, 1978).

Aktinfilamente (F-Aktin), oder auch Mikrofilamente genannt, werden aus globulärem Aktin (G-Aktin) polymerisiert, wobei im F-Aktinstrang in der Regel zwei Ketten zu einer α -Doppelhelix verwunden sind (Dos Remedios *et al.*, 2003). Aktinfilamente sind polare Strukturen, die ein schnell wachsendes Ende (Pluspol) in Richtung des Zelläußeren und ein langsam wachsendes Ende (Minuspol), an dem F-Aktin vornehmlich abgebaut wird, besitzen (Lodish *et al.*, 2004). Die Aktinfilamente kommen in polar aufgebauten Zellen vornehmlich in der Peripherie und dort durch Interaktion mit anderen Proteinen häufig Membran assoziiert vor. Hier bilden sie auch das intrazelluläre Grundgerüst von feinen Fortsätzen, den Mikrovilli. Zu den F-Aktin bindenden Proteinen gehören quervernetzende Proteine, wie zum Beispiel α -Actinin, Fimbrin, Villin (Binnengerüst der Mikrovilli) Filamin oder Espin, um nur einige zu nennen, die die Struktur des Aktinnetzwerks organisieren (Small *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 2004). In den Muskeln bilden Aktinfilamente einen Hauptbestandteil des kontraktilen

Apparates. Hier sind sie Teil eines komplexen Proteinnetzwerks an dem verschiedene Bindeproteinen und vor allem auch Myosine beteiligt sind. Die Myosine sind eine umfangreiche Gruppe von mit Aktinfilamenten assoziierten Motorproteinen (Evans *et al.*, 1995; Goodson *et al.*, 1997). Unter ATP-Verbrauch bewegen sich die meisten Myosine in „Plus-Richtung“ entlang der Aktinfilamente (Small *et al.*, 2002). Eine Ausnahme bildet hierbei das Myosin VI, welches sich in gegensätzlicher Richtung, also zum Minus-Ende der Aktinfilamente bewegt (Wells *et al.*, 1999). Ein weiteres Myosin, Myosin IXb wird ebenfalls diskutiert ein sich in Minus-Richtung bewegendes Motorprotein zu sein, doch gibt es hierbei noch keine Klarheit (Inoue *et al.*, 2002; O'Connell & Mooseker, 2003). Die Myosine werden phylogenetisch in mindestens 18 verschiedene Klassen und Subklassen unterteilt (Frank *et al.*, 2004). Es wird dabei zwischen konventionellen und unkonventionellen Myosinen unterschieden. Unter konventionellen Myosinen versteht man solche, die, wie das an Muskelbewegungen beteiligte Myosin II, zur Ausbildung von Filamenten befähigt sind. Die übrigen Klassen bilden keine Filamente aus und werden als unkonventionelle Myosine zusammengefasst (Kalhammer & Bahler, 2000).

Eine weitere Gruppe von Cytoskelettelementen bilden die Intermediärfilamente (IF) mit einem Durchmesser von ca. 8-12 nm. Bei diesen handelt es sich um unpolare Polymere aus IF-Proteinen, wie zum Beispiel Keratin, Lamenin oder Vimentin (Strelkov *et al.*, 2003; Lodish *et al.*, 2004). Sie weisen eine hohe Gewebsspezifität auf und sind in so genannten „coiled-coiled“ Strukturen miteinander verbunden. Die Funktion der Intermediärfilamente besteht vornehmlich in Formgebung und Stabilisierung der Zelle. Die Intermediärfilamente sollen hier, bei der einleitenden Besprechung des Zellskeletts vernachlässigt werden, da sie nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren.

Ein wichtiges Zellskelettelement für den intrazellulären Transport zur Organisation und Bewegung der Zelle sind die Mikrotubuli (Lodish *et al.*, 2004). Mikrotubuli sind, wie ihr Name schon verrät, molekulare Kleinröhren, die aus Mikrofilamenten aufgebaut sind, die wiederum aus Heterodimeren von Alpha- und Beta-Tubulin bestehen. In der Zelle bilden vornehmlich 13 dieser Protofilamente einen Mikrotubulus der einen Durchmesser von ca. 20-25 nm besitzt (Wade & Hyman, 1997). In bestimmten Zelltypen, wie beispielsweise neuronalen Zellen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* kommen auch Mikrotubuli aus 11 und 15 Protofilamenten vor, die zudem eine unterschiedliche Angreifbarkeit für das Cytoskelett-beeinflussende Substanzen wie Colchizin aufweisen (Chalfie & Thomson, 1982). Beim Aufbau von Mikrotubuli in der lebenden Zelle (Downing & Nogales, 1998), lagern sich α -Heterodimere des Tubulins Windungen bildend aneinander und bauen so den

Mikrotubulus auf (Abb. 6). Auch die Mikrotubuli sind polare Strukturen, bei denen am Plus-Ende schnell angebaut wird, während am Minus-Ende, wenn es nicht stabilisiert ist, Tubulin-Bausteine abgebaut werden. In der konventionellen Zelle sind Mikrotubuli in Kernnähe mit ihrem Minus-Ende mit dem Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC) am Centrosom verbunden (Lodish *et al.*, 2004; Musch, 2004). Somit ergibt sich in der Regel ausgehend von den MTOC eine Nukleation mit Projektion der Mikrotubuli in die Peripherie der Zelle (Wade & Hyman, 1997). Eine prominente Funktion von Mikrotubuli ist die Trennung der Chromosomen während der Zellteilung. Prominente Mikrotubuli assoziierte Proteine sind beispielsweise MAP1, MAP2, oder TAU (Hirokawa, 1994; Mandelkow & Mandelkow, 1995). Die mit den Mikrotubuli assoziierten Motorproteine in der Zelle sind Kinesin (in Plus-Richtung) und Dynein (in Minus-Richtung) (Goldstein & Yang, 2000), die vor allem im Dienste des Transports von Molekülen und Vesikeln stehen (Pazour & Rosenbaum, 2002). Die am Centrosom durch Nukleation entspringenden Mikrotubuli bilden die „Hauptverkehrswege“ für aktive Transporte zur und von der Peripherie der Zelle. Mikrotubuli sind des Weiteren ein primärer Bestandteil von Cilien (Haimo & Rosenbaum, 1981). Jedes Cilium ist außen von einer Plasmamembran umgeben. Im Inneren liegt das sogenannte Axonem, das von Mikrotubuli aufgebaut wird. Diese sind in beweglichen Cilien nach dem so genannten 9x2+2-Muster angeordnet: In der Mitte des Axonems befinden sich zwei von einander getrennte Zentraltubuli, die von neun Doppelmikrotubuli (Dubletts) umgeben sind. Diese Dubletts bestehen jeweils aus einem A- und B-Tubulus. Dabei besitzt der A-Tubulus 13 Protofilamente, wobei der anliegende B-Tubulus nur aus 10 Protofilamenten aufgebaut ist. Allerdings können bei einer Zusammenlagerung *in vitro* auch Mikrotubuli des Axonems aus 14 oder 15 Protofilamenten aufgebaut werden (Binder & Rosenbaum, 1978).

Ein weiterer Bestandteil des Cytoskeletts sind die eingangs genannten Nanofilamente. Diese äußerst feinen Elemente bestehen aus kleinen Proteinen wie Spasmin, MSP oder Centrinen (Itabashi *et al.*, 2003; Denisov *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 1996). Centrine sind Phosphoproteine von etwa 20 kDa Molekulargewicht und gehören zur Familie der Parvalbumine, der Ca^{2+} -abhängigen „EF-Hand“-Proteine. In Säugetieren konnten vier Sequenzen für Centrine (Centrin 1–4) gefunden werden. Diese sind in eukaryotischen Zellen in Centriolen des Basalkörpers von Centrosomen und in mitotischen Spindeln nachgewiesen worden (Wolfrum *et al.*, 2002).

1.2.1 Das Zellskelett von Photorezeptorzellen

In der Retina der Vertebraten konnten Aktin-reiche Strukturen in verschiedenen Schichten und Kompartimenten von retinalen Zellen lokalisiert werden. Zu den Bereichen mit prominenter Aktinexpression gehören die plexiformen Schichten, die *Membrana limitans externa* zwischen äußerer Körnerschicht und den Innensegmenten der Photorezeptorzellen und auch das retinale Pigmentepithel, sowie Mikrovilli der Müller-Gliazellen (Woodford & Blanks, 1989). In der Photorezeptorzelle wurden Aktinfilamente zunächst an der Synapse, den Kontaktstellen zwischen Innensegmenten und Müller-Gliazellen (*Membrana limitans externa*), sowie im Innen-, als auch an der Basis des Außensegmentes gefunden (Chaitin *et al.*, 1984; Chaitin & Burnside, 1989; Williams *et al.*, 1990). In einer späteren Arbeit konnten Aktinfilamente auch als Bestandteil des Verbindungsciliums identifiziert werden (Wolfrum & Schmitt, 2000). Eine weitere Aktin-reiche Struktur in Photorezeptorzellen sind die im distalen Bereich des Innensegmentes entspringenden Calicae, die besonders bei Photorezeptorzellen der Knochenfische und Amphibien (Burnside, 1978) und weniger auffallend bei Nagetierphotorezeptorzellen ausgeprägt sind (Borwein, 1985). Ferner konnten in diesen Calix-Strukturen auch Myosinfilamente nachgewiesen werden (Burnside, 1978). Myosine spielen in Photorezeptorzellen und auch dem retinalen Pigmentepithel spezifische Rollen. So ist beispielsweise das Myosin VIIa am ciliären Transport von Opsin in das Außensegment der Photorezeptorzellen beteiligt (Liu *et al.*, 1999; Wolfrum & Schmitt, 2000). Eine wichtige Rolle spielt Myosin VIIa auch im Transport von Melanosomen in den mikrovillären Ausläufern der retinalen Pigmentepithelzellen (Liu *et al.*, 1998). Ein weiteres wichtiges Myosin in Photorezeptorzellen ist Myosin III, das an der Ausbildung der Calix-Fortsätze beteiligt ist (Lin-Jones *et al.*, 2004) und dem zumindest in Photorezeptorzellen der Invertebraten eine Rolle bei der lichtabhängigen Translokation von Arrestin 2 zugesprochen wird (Lee & Montell, 2004; Strissel *et al.*, 2004). Noch weitere Myosine werden in Zellen der Retina und speziell den Photorezeptorzellen exprimiert. So konnte Myosin Va in den plexiformen Schichten und in der Photorezeptorzelle an der Synapse und im Innensegment lokalisiert werden (Schlamp & Williams, 1996). Auch das sich in Minus-Reichtung am Aktinfilament bewegendes Myosin VI, konnte in Photorezeptorzellen der Maus im Innensegment und auch an der Synapse lokalisiert werden (Kitamoto *et al.*, 2005).

Mikrotubuli als universelle Bestandteile der Zelle, wurden in Photorezeptorzellen in verschiedenen Kompartimenten beschrieben. In den Photorezeptorzelle ist der Ursprung der Mikrotubuli der Basalkörper, er liegt an der Basis des Ciliums, beziehungsweise im apikalen Bereich des Innensegmentes (s. Abb. 2 B). Die Mikrotubuli erstrecken sich von hieraus,

sowohl ins Innensegment in Richtung des Zellkerns, als auch im Axonem, das Photorezeptorcilium aufbauend, ins Außensegment der Photorezeptorzelle (Troutt & Burnside, 1988). Das centrioläre Triplett-Arrangement der Mikrotubuli, setzt sich in der „transition zone“, als 9x2+0 Verbindungscilium fort und erstreckt sich auch in das Photorezeptoraußensegment, mit bis zu 80% dessen Länge (Rohlich, 1975; Kaplan *et al.*, 1987). Es konnte an den Cilien in Stäbchen des Kaninchens gezeigt werden, dass es der A-Tubulus der axonemalen Dubletts ist, der sich jeweils weiter in das Außensegment der Photorezeptorzellen fortsetzt (Wen *et al.*, 1982). Neben den eingangs beschriebenen beweglichen, „motilen“ Cilien handelt es sich in der Photorezeptorzelle um ein „nicht-motiles“ Cilium. Diese unbeweglichen Cilien stehen in Zellen meist im Dienste der Transduktion sensorischer Stimuli (Marshall & Nonaka, 2006; Singla & Reiter, 2006; Scholey & Anderson, 2006). Der Anteil des Photorezeptorciliums der als „Verbindungscilium“ bezeichnet wird, scheint der „transition zone“ anderer Cilien zu entsprechen (Horst *et al.*, 1990; Hong *et al.*, 2003; Roepman & Wolfrum, 2007). Diese „transition zone“, die als Verbindungscilium relativ lang ist (ca. 1,2 μm) (Wolfrum & Schmitt, 2000), könnte eine wichtige Rolle in der Photorezeptor-Organisation und Funktion, als auch in der Entwicklung und Aufrechterhaltung spielen (Rohlich, 1975; Besharse & Horst, 1990; Schmitt & Wolfrum, 2001; Roepman & Wolfrum, 2007). Des Weiteren existieren Mikrotubuli noch in Einbuchtungen des Photorezeptoraußensegments (Incisionen), die besonders prominent bei Amphibienphotorezeptorzellen ausgeprägt sind (Eckmiller, 2000). Ob diese hier eine rein stabilisierende Funktion einnehmen, oder aber auch an aktiven Transportvorgängen beteiligt sind, ist bisher noch unklar (Caruso *et al.*, 2006). Für Mikrotubuli-vermittelte Transportvorgänge konnten in Photorezeptorzellen bereits verschiedene Motoren und Transporte beschrieben werden. Der Transport von Opsin-tragenden Vesikeln aus dem Golgi-Apparat bis zum apikalen Innensegment geschieht entlang von Innensegment-Mikrotubuli (Tai *et al.*, 1999; Deretic, 2004). Auch im Verbindungscilium der Photorezeptorzelle konnten aktive Transporte an Mikrotubuli in Verbindung mit dem Motorprotein Kinesin II gezeigt werden (Williams, 2002). Ebenso konnte das Prinzip des intraflagellaren Transports (IFT) über die Kinesin II-Untereinheit KIF3A, sowie weitere IFT-Proteine im Verbindungscilium der Photorezeptorzelle gefunden werden (Pazour *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003).

Die auch zu den Cytoskelettproteinen zuzählenden Centrine (Baron & Salisbury, 1988), konnten im Verbindungscilium (Centrin 1, 2 und 3), sowie am Basalkörper (Centrin 2, 3 und 4) der Photorezeptorzellen gefunden werden (Wolfrum *et al.*, 2002; Giebl *et al.*, 2004).

Ob Centrine auch Nanofilamente in Photorezeptorzellen ausbilden, wie sie in Hefen entdeckt werden konnten (Li *et al.*, 2006), und welche funktionellen Eigenschaften solche Filamente in der Photorezeptorzelle haben könnten, wird zurzeit untersucht (Giebl *et al.*, 2006; Trojan *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Centrine (1-4) Ca^{2+} -abhängig mit dem heterotrimären G-Protein Transducin in Photorezeptorzellen interagieren (Pulvermüller *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von Centrinen reduziert dagegen die Affinität zu Transducin. Durch diese modulierbaren Bindungseigenschaften könnten Centrine an der lichtabhängigen Translokation von Transducin in Photorezeptorzellen (Barrieren-Hypothese) beteiligt sein (Giebl *et al.*, 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hauptcytoskelettelemente F-Aktin und Mikrotubuli in den drei Hauptkompartimenten der Photorezeptorzellen (Innensegment, Verbindungscilium und Außensegment) vorkommen und dort funktionell an aktiven Transportvorgängen, als auch Struktur bildend beteiligt sind. Welche Funktionen Centrine mit ihren spezifischen Lokalisationen am Basalkörper und im Cilium, in der Verbindung der Hauptkompartimente von Photorezeptorzellen ausüben, ist noch weitgehend unbekannt.

1.2.1.1.1 Cytoskelett beeinflussende pharmakologische Substanzen

Es gibt verschiedene natürliche Substanzen die durch ihre Bindung an Cytoskelettelemente, beziehungsweise in Interaktion mit Bausteinen des Cytoskeletts, spezifisch Einfluss auf die Beschaffenheit des Zellskeletts und damit assoziierten Proteinen nehmen können. In der zellbiologischen Forschung wurden und werden solche Substanzen vielfach eingesetzt. Dabei beeinflussen einzelne Substanzen in der Regel eine ganz bestimmte Gruppe von Zellskelettelementen. Eine Auswahl an gebräuchlichen Substanzen dieser Art ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Sowohl zur Untersuchung von Aktin-assoziierten, als auch mit Mikrotubuli verbundenen Prozessen in der Zelle, bedient man sich Substanzen, die diese Elemente beeinflussen, von denen einige in der Tabelle 1 kurz erläutert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem, F-Aktin-assoziierte Prozesse mit Cytochalasin D untersucht. Cytochalasine sind Pilzgifte, die an Aktinfilamente binden und die Polymerisation und damit die Elongation von Aktinfilamenten blockieren (Sampath & Pollard, 1991). Ergebnisse solcher Hemmung der Aktinpolymerisation durch Cytochalasine können Änderungen der zellulären Morphologie und die Unterbindung zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel der Zellteilung sein (Bluemink, 1978; Wodnicka *et al.*, 1992). Dabei wurden Cytochalasine zur Untersuchung von Zell-Bewegungen, -Teilungen, -Kontraktionen und auch Festigkeit

eingesetzt (Haidle & Myers, 2004). Cytochalasine binden an das schnell wachsende positive Ende von Aktinfilamenten und blockiert den An- wie auch Abbau von Aktinmonomeren (Abb. 6). Studien unter Verwendung von Cytochalasin D (CD) haben gezeigt, dass CD-Aktin-Dimere ATP-gebundenes Aktin enthalten (Sampath & Pollard, 1991). Diese CD-Aktin-Dimere werden zu CD-Aktin-Monomeren durch ATP Hydrolyse reduziert. Das resultierende CD-Aktin-Monomer kann sich wieder mit einem ATP-Aktin-Monomer zu einem CD-Aktin-Dimer verbinden (Cooper, 1987). Dies macht Cytochalasin D zu einem sehr effektiven Inhibitor der Aktinpolymerisation und kann bereits in einer Konzentration von 0,2 μM den Tretmühleneffekt unterbinden (Yahara *et al.*, 1982).

Tabelle 1: Pharmakologisch wirksame Substanzen, die sich auf das Aktin- oder Mikrotubulicytoskelett auswirken.

Aktin-spezifische Substanzen	Wirkung
Phalloidin	bindet an F-Aktin und verhindert so dessen Depolymerisation
Cytochalasine	besetzen das Plus-Ende von F-Aktin und führen so zu Filament-Abbau
Swinholide	trennt Aktin-Dimere von F-Aktin und führt so zu Filament-Abbau
Latrunculine	binden an G-Aktin und verhindert so dessen Polymerisation
Mikrotubuli-spezifische Substanzen	Wirkung
Taxol	bindet und stabilisiert Mikrotubuli
Colchizin, Colcemid	binden an Tubulin-Bausteine und verhindern deren Polymerisation
Vinblastin, Vincristin	binden an Tubulin-Bausteine und verhindern deren Polymerisation
Nocodazol	bindet an Tubulin-Bausteine und verhindern deren Polymerisation
Thiabendazol	bindet an Tubulin-Bausteine und verhindern deren Polymerisation, besonders Wirksam bei acetylierten Mikrotubuli

Auch an der Retina, beziehungsweise in Photorezeptorzellen wurden schon Zellgifte zur Untersuchung von zellbiologischen Prozessen eingesetzt. Zu diesen gehört Cytochalasin D, das die Polymerisation G-Aktin unterbindet und den Abbau von Aktinfilamenten verstärkt (Casella *et al.*, 1981; Schliwa, 1982). Bereits Anfang der achtziger Jahre konnte gezeigt

werden, dass die intraokulare Injektion von Cytochalasinen zu morpho- wie auch physiologischen Veränderungen in der Retina von Fischen führt (O'Connor & Burnside, 1981). Weiterhin konnte dargestellt werden, dass sich bei Zerstörung von F-Aktin durch Cytochalasin D, keine korrekten Disk-Membranen an der Basis der Außensegmente der Photorezeptorzellen bei Amphibien und Säugetieren bilden (Williams *et al.*, 1988; Vaughan & Fisher, 1989). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Aktinfilamente zwar zur Ausstülpung von Diskmembranen nicht notwendig sind, aber wohl eine Rolle beim Schließen, der bis zur gegenüberliegenden Plasmamembran wachsenden Disks spielen.

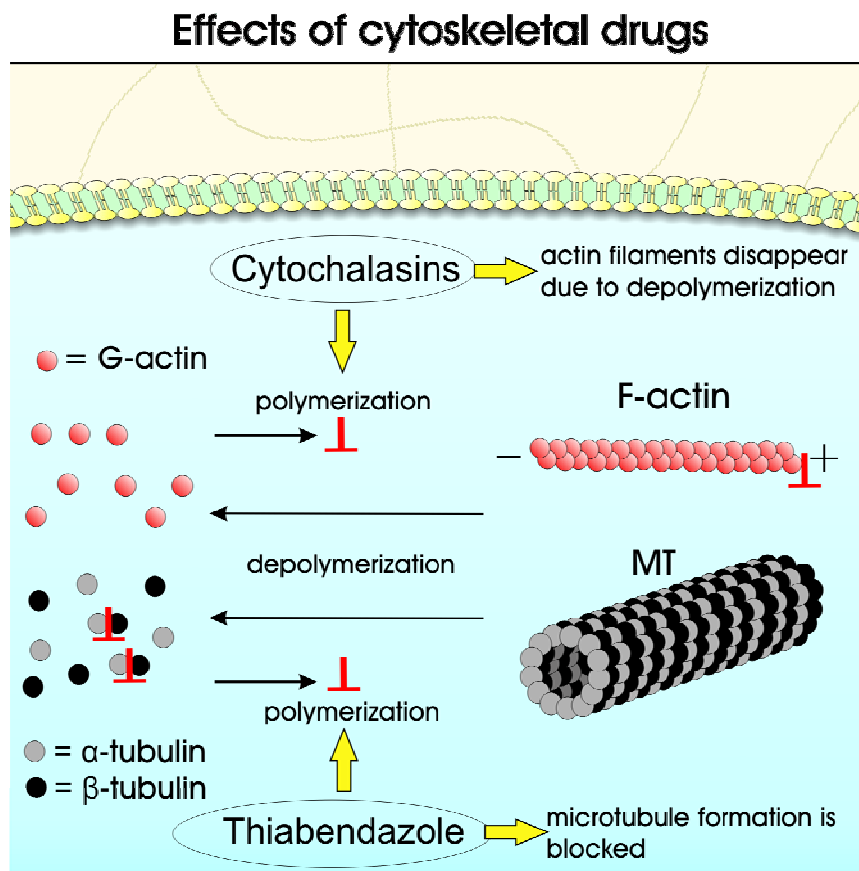


Abbildung 6: Wirkungsweise von Cytoskelett beeinflussender Substanzen am Beispiel von Cytochalasinen und Thiabendazol. Cytochalasin D bindet an das schnell wachsende Ende von Aktinfilamenten und verhindert die Neuanlagerung von Aktinbausteinen. Cytochalasin bindet an das Ende des Aktinfilamentes, das in einem Cytochalasin-Aktin-dimer resultiert und somit durch weitere Anlagerungen die Filamente nach und nach abgebaut werden. Thiabendazol bindet an β -Tubulin und verhindert somit die Formation von $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimeren die für den Aufbau der Protofilamente notwendig sind, die sich anschließend zu Mikrotubuli zusammenlagern.

Des Weiteren gibt es auch Substanzen, die in der Lage sind Aktinfilamente nicht zu destabilisieren, sondern zu stabilisieren. Zu diesen Substanzen gehört auch Phalloidin, ein

Phallotoxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*), das speziell zwischen Bausteinen des F-Aktinstranges bindet und diese miteinander fest verbindet (Cooper, 1987). Des Weiteren inhibiert Phalloidin die hydrolytische Aktivität von F-Aktin (Barden *et al.*, 1987). Phalloidin wird in der zellbiologischen Forschung häufig mit Farbstoffen gekoppelt verwendet und wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um damit Aktinfilamente in Zellen sichtbar zu machen (Cooper, 1987).

Ferner gibt es Substanzen mit deren Hilfe die Polymerisation von Mikrotubuli blockiert werden kann, als auch solche, mit denen Mikrotubuli stabilisiert werden können. Zu den häufig eingesetzten Mikrotubuli-destabilisierenden Agenzien gehören Colchizin und Nocodazol (Ludueno & Roach, 1991). Allerdings scheinen diese nicht geeignet zu sein, um speziell in Photorezeptorzellen Mikrotubuli-assoziierte Prozesse zu stören (Vaughan *et al.*, 1989). Zu den Mikrotubuli destabilisierenden Substanzen gehört das Fungi-, als auch Parasitizid Thiabendazol, das auch unter den Bezeichnungen Pestanal oder Mintezol bekannt ist (Quinlan *et al.*, 1980). Thiabendazol ist ein Benzimidazolderivat, das in der Lage ist, spezielle Subtypen von Mikrotubuli zu destabilisieren (Wallin *et al.*, 1988; Albertini, 1990; Martin *et al.*, 1997). Thiabendazol bindet dabei an β -Tubulin und blockiert somit die Formation von $\alpha\beta$ -Tubulin-Dimeren, die für den Aufbau der Mikrotubuli notwendig sind (Abb. 6). Für Thiabendazol ist beschrieben, dass es spezielle posttranslational modifizierte Mikrotubuli destabilisieren kann, genauer gesagt, bei acetylierten Mikrotubuli wirksam ist (Pisano *et al.*, 2000). Damit kann es speziell zur Inhibition von mit diesen Mikrotubuli verbundenen zellulären Prozessen, also auch bestimmten Zellen, die diese beinhalten, eingesetzt werden. Gerade in den Photorezeptorzellen vorkommende acetylierte Mikrotubuli können durch Thiabendazol selektiv destabilisiert werden (Peterson *et al.*, 2005).

1.3 Kultivierung der Vertebratenretina

Zur Untersuchung einzelner Zelltypen findet die Zellkulturtechnik in der Grundlagenforschung in biologisch- medizinischer Hinsicht breite Anwendung. Sie eignet sich in besonderem Maße für Analysen von zellulären Prozessen, Stoffwechselmechanismen oder Zellteilung. Ferner kann durch die direkte Zugänglichkeit von Zellkulturen der Einfluss und die Auswirkung von pharmakologischer Beeinflussung untersucht werden. Die Zellkultur ist daher ein hervorragendes Modellsystem zur Analyse zellbiologischer Fragestellungen und stellt zudem eine Alternative zu Tierversuchen, gerade in der grundlegenden Erprobung von

Substanzen dar. Damit kann die Anzahl von Experimenten am lebendigen Tier drastisch reduziert werden. Um spezifische Zelltypen untersuchen zu können werden meist Primärkulturen von aus Organismen entnommenen Zellen angelegt. In Versuchen isolierte Photorezeptorzellen der Vertebratenretina als Primärkultur zu etablieren zeigte sich, dass diese *in vitro* schnell ihre spezifische Kompartimentierung in Außen- und Innensegment verlieren (Fintz *et al.*, 2003). Diese Kompartimentierung ist notwendig um funktionelle Untersuchungen, wie beispielsweise zelluläre Bewegungsmechanismen zwischen Innensegment und Außensegment zu analysieren. Die eingangs beschriebene hoch spezialisierte Photorezeptorzelle ist ein fragiles Gebilde, die wohl nur in ihrem retinalen Umfeld und im Kontakt zu den benachbarten Zellen untersucht werden kann. Um Tierversuche zu umgehen bleibt hier als einzige Alternative die Kultivierung der gesamten Retina. In der organotypischen Retinakultur bleiben die Photorezeptorzellen in ihrem natürlichen zellulären Gefüge und können nahe der „*in vivo*“-Situation untersucht werden. Organotypische Kulturen von Geweben des zentralen Nervensystems wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich in Hinsicht auf Entwicklung, Physiologie und Degeneration untersucht (Kress & Reynolds, 2005). Ihren Anfang nahmen solche Analysemethoden in den 20iger Jahren des letzten Jahrhunderts unter Verwendung isolierter Vogelaugen in Kultur (Strangeways & Fell, 1926). In der darauf folgenden Zeit wurde die Entwicklung von Retinakultur beschrieben (Hild & Callas, 1967; LaVail, 1971; Tamai *et al.*, 1978), als auch retinale Degeneration in Kulturen untersucht (Lucas & Trowell, 1958; Sidman, 1963; Tamai *et al.*, 1978). In Studien der jüngeren Vergangenheit wurden meist neonatale Retinae explantiert und konnten bis zu 30 Tagen kultiviert werden (Caffé *et al.*, 1989; Ogilvie *et al.*, 1999). In diesen Studien konnte die Bildung der spezifischen Zellschichten der Retina, die Ganglienzellschicht, die inneren Körnerschicht, sowie die äußere Körnerschicht beobachtet werden. Auch die Ausbildung des neuronalen Netzwerks der plexiformen Schichten konnte in Schnitt-Kulturen juveniler Retinae gezeigt werden (Sassoe-Pognetto *et al.*, 1996). In der neonatalen Kaninchen-Retinakultur entwickeln sich Photorezeptorzellen hinsichtlich der Formierung von Innensegmenten und auch des Verbindungsciliums, allerdings bilden sie keine vollständigen Außensegmente (Germer *et al.*, 1997). Für die Ausbildung von Außensegmenten der Photorezeptoren in der neonatalen Retinakultur ist die Co-Kultivierung mit dem retinale Pigmentepithel förderlich, ohne retinales Pigmentepithel bleibt die Bildung von Außensegmenten aus (Caffé *et al.*, 1989). Obwohl in der neonatalen Retinakulturen eine Verringerung der Schichtdicke der einzelnen Zellschichten festgestellt wurde (Ogilvie *et al.*, 1999), sind solche für morpho- oder physiologische Experimente an der inneren

Körnerschicht hinreichend, zum Beispiel in der Ableitung spontan auftretender synaptischer Aktivitäten an Amakrinzellen (Perez-Leon *et al.*, 2003). Da also Photorezeptorzellen in neonatalen Retinakulturen keine vollständige Entwicklung zeigen, ist es zur Analyse von funktionellen Prozessen in diesen notwendig, ältere postnatale Stadien zu kultivieren. In diesen sind Photorezeptoren bereits vollständig differenziert und für physiologische Experimente geeignet (Reidel *et al.*, 2006). Eine Schwierigkeit liegt allerdings darin, dass das Zeitfenster der Kultivierbarkeit dieser adulten Stadien der Retina kleiner ist als jenes postnataler Retinakulturen. Es gilt dabei ein Stadium zur Explantation der Retina zu wählen, das einen gelungenen Kompromiss zwischen Entwicklungsgrad der Photorezeptorzellen, sprich Länge der Außensegmente, und Vitalitätsdauer in Kultur gewährleistet.

1.3.1 Einsatz der Retinakulturtechnik zur Analyse der zellbiologischen Grundlagen von Netzhautdegenerationen

Hunderttausende Menschen in Deutschland leiden an Netzhautdegenerationen (*retinalen Dystrophien*). Diese Erkrankungen umfassen verschiedene Krankheitsbilder wie die Makuladegeneration oder *Retinitis pigmentosa*. Die Ursachen dafür liegen meist in angeboren Defekten oder genetischen Prädispositionen, von denen einige bereits identifiziert werden konnten (Wang *et al.*, 2005). *Retinitis pigmentosa* ist die Bezeichnung für eine Gruppe von erblichen degenerativen Netzhauterkrankungen, die eine Zerstörung der Netzhaut (Retina) durch Apoptose der Photorezeptorzellen, hauptsächlich der Stäbchen, zur Folge hat. Durch die vornehmliche Verteilung der Stäbchen in der Peripherie der menschlichen Retina, kommt es bei der *Retinitis pigmentosa* zu einer für die Patienten als „Tunnelblick“ auftretenden Einengung des Sichtfeldes, sowie Nachtblindheit. Auf Ebene des Retinagewebes bzw. der Photorezeptorzellen stellen sich diese Degenerationen zu Beginn in einem Abbau der Lichtsensitiven Kompartimente, der Außensegmente der Photorezeptorzellen, dar (Fain, 2006).

Die pathologischen Prozesse in Zelltypen der Retina, vor allem in den Photorezeptoren und die kausalen Zusammenhänge, die zu retinalen Degenerationen, wie sie auch unter der *Retinitis pigmentosa* auftreten, sind noch vielfach unverstanden. Dazu müssten Photorezeptorzellen, die „gesunde“, sowie auch solche die mutierte mit *Retinitis pigmentosa* in Verbindung stehende Genprodukt exprimieren analysiert werden. Da Photorezeptorzellen isoliert *ex vivo* ihre Kompartimentierung verlieren und die zu untersuchenden krankheitsrelevanten Proteine, in Kompartimenten spezifisch anzutreffen sind, können diese

Proteine in Zellkulturen nur unzureichend untersucht werden (Fintz *et al.*, 2003; Leveillard *et al.*, 2004). Differenzierte und kompartimentierte Photorezeptorzellen finden sich nur in ihrer retinaspezifischen zellulären Umgebung, sind aber im Auge (*in vivo*) für Analysen nur schwer zugänglich. Um experimentell Photorezeptorzellen im intakten Organismus zu erreichen (z.B. für Transfektionen), wird in den Raum zwischen den Photorezeptoraußensegmenten und dem retinalen Pigmentepithel in das Auge injiziert (subretinal) (Glushakova *et al.*, 2006). Dabei wird am narkotisierten Tier zunächst die Cornea punktiert und danach mit einer stumpfen Kanüle der Vitreus und die Retina durchstoßen, um in den subretinalen Bereich zu applizieren (Bemelmans *et al.*, 2006). Leider ist diese Methodik nicht nur aufwendig in der Durchführung, sondern auch für das Versuchstier mit Belastungen verbunden. Die einzige Alternative zu solchen Experimenten am lebenden Tier unter Erhaltung des zellulären Umfeldes der Photorezeptorzellen, wäre die organotypische Retinakultur. In der Gewebekultur einer adulten Retina wäre es möglich differenzierte Photorezeptorzellen *ex vivo* zu analysieren. In organotypischen Retinakultur könnten zudem Applikationen in das Kulturmedium erfolgen und damit im Vergleich zum Tierversuch weitaus effizienter und mit geringerem Aufwand durchführbar sein. Hierbei können pharmakologische Substanzen direkt die Photorezeptorzellen erreichen und in Konzentrationen verabreicht werden, die bereits aus der Zellkultur in ihrer Wirksamkeit charakterisiert sind. Damit wäre es möglich standardisierte zellbiologische Analysen auch an ausdifferenzierten, kompartimentierten Photorezeptorzellen durchzuführen. Die organotypische Retinakultur könnte es ferner ermöglichen durch Transfektionen die Expression spezifischer Genprodukte in Photorezeptorzellen mittels RNAi herabzuregulieren, um den Phänotyp einer degenerierenden Retina zu simulieren. Umgekehrt kann durch das Einbringen eines gesunden Gens in die Retinakultur einer Mausmutante, gewissermaßen „gentherapeutisch“ eingegriffen werden, ohne dabei einen problematischen Tierversuch durchführen zu müssen.

1.4 Ziele der Arbeit

Die Ziele der vorliegenden Arbeit, sollen nun im folgenden Abschnitt herausgestellt werden. Dazu werden diese zunächst in einem Einzelpunkt, oder als eine Frage formuliert und anschließend näher erläutert.

I. Die Schaffung eines Analysesystems für voll entwickelte und funktionsfähige Photorezeptorzellen, durch die Etablierung einer vitalen und physiologisch aktiven organotypischen Kultur der adulten Retina.

Erstes Ziel dieser Dissertation ist es, ein Analysesystem für funktionsfähige Photorezeptorzellen für weiterführende Experimente zu etablieren und in seiner Eignung zu validieren. Photorezeptorzellen in Primärkulturen verlieren allerdings außerhalb des zellulären Umfeldes ihre Segmentierung und Funktionsvermögen. Die einzige Möglichkeit zur Erhaltung kompartimentierter und funktionell intakter Photorezeptorzellen außerhalb des Organismus, wäre die organotypische Gewebekultur adulter Retinae. Hierfür soll eine existierende Methodik zur Kultivierung neonataler Mausretinae weiterentwickelt werden, sodass auch die adulte Retina mit ausdifferenzierten Photorezeptorzellen organotypisch kultiviert werden kann. Für ein verlässliches Analysesystem zu erhalten, sollen Vitalität und physiologische Parameter der organotypischen Retinakultur bestimmt werden und damit deren Eignung für weiterführende Experimente sicherzustellen. Diese Verifizierung der organotypischen Kultur soll durch Apoptosetests, sowie der Überprüfung lichtabhängiger Prozesse in Photorezeptorzellen der explantierten Retina erbracht werden.

II. Sind Elemente des Cytoskeletts, im speziellen Aktinfilamente und/oder Mikrotubuli, an den lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen beteiligt?

Das Phänomen der lichtabhängigen Kompartimentierung von Signaltransduktionskomponenten in der Photorezeptorzelle wurde bereits vor fast zwei Jahrzehnten beschrieben, aber die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Dies liegt zum Teil an der Fragilität der Photorezeptorzelle und deren Unzugänglichkeit für zellbiologische Untersuchungen im Organismus. Die organotypische Kultur adulter Retinae soll es nun ermöglichen Experimente zu den zellbiologischen Grundlagen der Translokationen von Arrestin und Transducin durchzuführen. Hierfür soll die

Abhängigkeit der genannten Translokationen von den Zellskelettelementen F-Aktin und Mikrotubuli, durch die Anwendung von das Zellskelett beeinflussenden Substanzen untersucht werden. Die organotypische Retinakultur wird dazu mit Cytochalasin D zur Destabilisation von Aktinfilamenten und mit Thiabendazol zur Destabilisation von Mikrotubuli behandelt und anschließend die lichtabhängigen Molekülbewegungen in Photorezeptorzellen überprüft. Eventuelle Abhängigkeiten der untersuchten Translokationen von bestimmten Zellskelettelementen können einen Hinweis auf die an den molekularen Bewegungen beteiligten Mechanismen liefern.

III. Ist die organotypische Kultur adulter Retinae für Gentransfers in retinale Zellen zur Analyse von Proteinfunktionen und zur Evaluation von gentherapeutischen Strategien geeignet?

Durch die gute Zugänglichkeit der Zielzellen in der organotypischen Retinakultur sollte der Transfer von Fremdgenen, etwa in Photorezeptorzellen, wesentlich erleichtert sein. Ein solcher Transfer von beispielsweise markierten Konstrukten ist einerseits für viele Fragestellungen der Zellbiologie von Photorezeptorzellen enorm wichtig und ist zudem für eine Evaluation von möglichen gentherapeutischen Ansätzen zukunftssträftig. Dazu sollen zunächst mit der Hilfe unterschiedlicher Methoden markierte Fremdgene in Zellen der Retinakultur eingebracht und deren Expression überprüft werden. Hierbei soll auch evaluiert werden, welche retinalen Zelltypen durch welche Transfektionsmethode erreicht werden können. Zur späteren Untersuchung von mit retinaler Degeneration verbundenen Protein(dys)funktionen, bietet sich die organotypische Kultur adulter Retinae an, da solche Degenerationen speziell die adulte Retina und Photorezeptorzelle betreffen. Darüber hinaus könnte die Retinakulturtechnik gerade in der Frühphase der Erprobung von gentherapeutischen Strategien einen nicht unerheblichen Beitrag im Ersatz und zur Reduktion von Tierexperimenten leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Tiere und Organentnahme

Es wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Experimente am lebenden Tier durchgeführt. Sämtliche nachfolgend beschriebenen Experimente, fanden ausschließlich unter der Verwendung von Organen statt, die nach Tötung der zu untersuchenden Tiere entnommenen wurden.

2.1.1 Maus

Die in den im Folgenden beschriebenen Experimenten verwendeten Mäuse, wurden gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes (TSchG) der Bundesrepublik Deutschland gehalten und behandelt. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen bei 23°C, 55% Luftfeuchtigkeit und 12-stündigem Hell/Dunkel-Rhythmus gehalten. Die verwendeten Mäuse waren Nachzuchten aus der Tierzucht der AG Prof. Dr. Wolfrum (Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) beziehungsweise aus der Tierhaltung des Institutes für Physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Bei den verwendeten Stämmen handelte es sich um *Mus musculus* C57 BL/6J, als Wildtyp-Modell (bl6) und *Mus musculus* SH1/LeJ-Myo7a^{4626S^B} (*shaker-1*), einem Mausstamm mit Spontanmutation, der für das Motorprotein Myosin VIIa defizient ist. Die Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation bzw. cervicale Dislokation nach den Vorgaben des TSchG getötet. Vorbereitend zur eigentlichen Retinapräparation wurden zunächst die kompletten Augen des zuvor getöteten Tieres präpariert. Dazu wurde mit einer gebogenen Pinzette in der Nähe der Austrittsstelle des *Nervus opticus*, dieser und die Augenmuskulatur fixiert und dann unter konstantem Geschlossenhalten der Pinzette das gesamte Auge, ohne auf dasselbe Druck auszuüben, entfernt. Die nachfolgenden Schritte, unter anderem zur Retinapräparation und des Anlegens der organotypischen Kultur, sind auf Seite 32 ausführlich beschrieben.

2.1.2 Krallenfrosch

Studien unter Verwendung von Organen des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) wurden am Ophthalmologischen Institut der Universität von Florida in Gainesville, FL durchgeführt. Die Xenopi wurden von der Firma *Xenopus Express* (Plant City, FL) erhalten. Die in den Experimenten verwendeten Frösche wurden gemäß den dortigen institutionellen Bestimmungen gehalten und behandelt. Dies beinhaltete die Nutzung der Tiere in

ophthalmologischer Forschung nach Richtlinien der “Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)”. Die Organentnahme nach Tötung der Frösche mit Formaldehyd erfolgte im Wesentlichen wie zuvor für die Maus beschrieben. Bei adulten *Xenopi* war es nach dem Töten zum Teil notwendig vor der Augenentnahme zunächst die Haut in der Peripherie der Augen zu entfernen (Retinapräparation s. S. 32).

2.2 Chemikalien und Geräte

Die hier verwendeten Chemikalien und Materialien waren von höchster erhaltlicher Reinheit. Wenn nicht anders angegeben, wurden diese von einer der folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Becton Dickinson (Heidelberg), AppliChem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Amersham (Braunschweig) oder Invitrogen (Karlsruhe). Chemikalien wurden auf den Sartorius BP610 und K2200D Digitalwaagen eingewogen. Der pH-Wert von Lösungen wurde mit einem geeichten Fisher (Schwerte) Accumet Basic pH-Meter eingestellt. Bei Bedarf wurden Lösungen oder Material mit einem Varioklav Dampfsterilisator der Firma H+P (Oberschleißheim), beziehungsweise im Heißluftofen (Memmert, Schwabach) bei 140°C sterilisiert. Die verwendeten Kunststoffgefäße waren Produkte von Becton Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Frickhausen). Zentrifugationen bis $18'000 \times g$ und bis zu einem Probevolumen bis 2 ml wurden mit einer Heraeus Biofuge pico oder einer Beckman Coulter Microfuge 22R durchgeführt. Größere Volumen wurden bis zu einer Geschwindigkeit von $5'000 \times g$ in einer Heraeus Labofuge 400R/E zentrifugiert. Incucell 55R Wärmeschränke von MMM Medcenter oder Binder WLC Wärmeschränke wurden für Inkubationen von 30, 37 oder 55°C verwendet. Zum Kultivieren von Bakterien wurden Innova 4230 Inkubationsschüttler der Firma New Brunswick Scientific (Edison, USA) eingesetzt. Sterile Arbeiten mit Bakterien wurden unter der Werkbank LaminAir 2448GS von Heraeus (Hanau) oder für Zell- und Retinakultur unter der Cleanbench Class II von Nu-Air (Normal, USA) durchgeführt. Für photometrische Messungen wurde ein Smartspec 3000 der Firma Biorad (München) verwendet. Auf weitere verwendete Chemikalien und Geräte wird im Text hingewiesen.

2.2.1 Verwendete Puffer

In Tabelle 2 sind allgemeine Puffer angeführt, die bei verschiedenen Methoden Verwendung fanden.

Tabelle 2: Mehrfach verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS („phosphate-buffered saline“)	137 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O; pH 7,4
Sörensen-Phosphat-Puffer	100 mM Na ₂ HPO ₄ 100 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O; pH 7,4

2.3 Präparation von Retinae und Anlegen der Kultur

Die in dieser Arbeit angewandten Techniken zur Präparation von Retinae aus Mäusaugen, sowie des Anlegens der Kulturen basieren auf Protokollen für neonatale Mausstadien, beschrieben in (Caffé *et al.*, 1989; Caffé *et al.*, 2001a; Caffé *et al.*, 2001b). Auf dieser Methodik aufbauend wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen, sowie Erweiterungen hinzugefügt, die es ermöglichten die Technik auch für Retinakulturen aus juvenilen bis adulten Retinae, sowie Retinae anderer Spezies anzuwenden. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweisen ist nachfolgend zu finden.

2.3.1 Vorbereitung von Materialien für das Anlegen der Retinakultur

Für das Anlegen der, in der vorliegenden Arbeit verwendeten, organotypischen Retinakultur sind einige zeitkritische Schritte zu beachten, die sich auf den Erhaltungszustand des Gewebes auswirken können. Deswegen ist es notwendig bestimmte Materialien im Vorhinein bereitzustellen beziehungsweise individuell anzufertigen. Diese Vorbereitungen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

Bei den in dieser Arbeit angelegten und verwendeten Retinakulturen, wurden die Retinae zur Stabilisierung stets mit dem Pigmentepithel an eine Kultivierungsmembran anliegend kultiviert (s. Abb. 11). Um hierbei eine Versorgung der Photorezeptorschicht mit Nährmedium zu gewährleisten, wurden kleine Netzchen als Abstandshalter zum Kulturgefäßboden verwendet. Diese Netzchen, oder „Grids“ (ca. 1 x 2 cm) wurden aus einem Nylogewebe mit einer Maschenweite von 0,3 cm ausgeschnitten. Zur Fixierung der Kultivierungsmembran auf dem Nylonnetzchen, wurde diese an den schmalen Seiten des Gitters jeweils mit einem einzelnen Nylonfasersteg angelötet. Die zurechtgeschnittenen

Filtermembranstücke (ME 25/31, Schleicher und Schuell, Dassel) wurden dadurch nicht permanent fixiert, sondern konnten zur späteren Einbettung des Gewebes vom Netzchen abgelöst werden. Vor der Verwendung wurden die so erstellten Gewebehalter mit Ethanol beziehungsweise im Autoklaven sterilisiert.

2.3.2 Kulturmedien

Zur Präparation wie Kultivierung der Retinae wurden, wie an den entsprechenden Stellen der Vorgehensweisen, zwei verschiedene Medien verwendet, die in der detaillierten Beschreibung des nächsten Abschnitts als Basal- oder Completemedium bezeichnet sind. Die Zusammensetzung dieser Kulturmedien ist in der untenstehenden Tabelle 3 aufgeführt. Bei DMEM/HAM F12 handelt es sich um eine eins-zu-eins Mischung des standardisierten Zellkulturmediums DMEM und des Nährzusatzes HAM's F-12 mit Glukose, Aminosäuren, Salzen, Vitaminen und weiteren Komponenten und wurde gebrauchsfertig von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bzw. PAA, Linz, Österreich bezogen.

Tabelle 3: In der Retinakultur verwendete Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Basal Medium	450 ml DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 100 mg/l Penicillin 100 mg/l Streptomycin
Complete Medium	450 ml DMEM-F12 50 ml FKS (Fötale Kälberserum) 100 mg/l Penicillin 100 mg/l Streptomycin

2.3.3 Retinapräparation aus Mausaugen

Zunächst wurden die Augen der zuvor getöteten Tiere wie in Punkt 2.1.1 beschrieben entnommen und in einer Kunststoffpetrischale (Ø 3,5 cm) mit 6 mg Proteinase K in 5 ml Basal Medium für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die proteolytische Aktivität von Proteinase K daubt die Sklera der entnommenen Augen an und erleichtert somit deren spätere Entfernung vom Pigmentepithel. Die Inkubationszeit ist dabei für Mausaugen eines Alters von ca. 2 Wochen optimiert und kann für derbere Skleren älterer Tiere oder anderer Spezies variiert werden. Zur Beendigung der Enzymreaktion von Proteinase K, wurden die Augen in eine frische Kunststoffpetrischale (Ø 6 cm) mit 7,5 ml Complete Medium überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die große Menge an Protein im serumhaltigen Complete Medium wird die enzymatische Reaktion der Proteinase K gestoppt. Danach

wurden die Augen zweimal kurz (< 1 Minute) in je 5 ml Basal Medium in Kulturpetrischalen (Ø 6 cm) gewaschen und für die Präparation in eine weitere mit Basal Medium gefüllte (ca. 6 ml) Kulturpetrischale überführt. Vor Beginn der Präparation wurden die Augen hier für weitere 10-15 Minuten inkubiert. Die eigentliche Präparation der Retina erfolgte anschließend unter einem Stereomikroskop mit Binokular (Wild M3B, Leica, Bensheim) und unter Zuhilfenahme einer Kaltlichtquelle mit Schwanenhals (KL750, Schott, Mainz). Für Präparationen in Dunkelheit, wurde auf die Lichtaustrittsöffnung des Schwanenhalses ein Rotlichtfilter (Schott, Mainz) angebracht. Im ersten Schritt der Präparation wurde das Auge mit einer Feinpinzette (Größe 5) am Sehnerv festgehalten und anschließend dieser unter leichtem Zug mit der Pinzette durch eine Präparationsschere mit etwas *Sclera* abgetrennt (Abb. 7 B). Durch diesen Schnitt an der Austrittsstelle des Sehnervs entstand ein „Fenster“ in der *Sclera*, durch das das darunter liegende retinale Pigmentepithel sichtbar wurde (Abb. 7 C). Durch leichtes Anheben der *Sclera* mit der Feinpinzette an diesem „Fenster“, wurde es nun möglich mit einer Scherenklinge zwischen Pigmentepithel und *Sclera* einzudringen, um dann die *Sclera*, möglichst ohne Verletzung des Pigmentepithels bis zur *Cornea* aufzuschneiden. Dieser Schnitt wurde auf der gegenüberliegenden Seite spiegelsymmetrisch wiederholt (Abb. 7 D). Nun konnten die beiden *Sclera*-Hemisphären gänzlich vom Pigmentepithelium abgelöst und behutsam samt der *Cornea* entfernt werden (Abb. 7 E). Anschließend wurde vorsichtig mit Hilfe zweier Feinpinzetten der Glaskörper, die Iris und Gefäße entfernt, so dass nur noch die Retina mit anhaftendem Pigmentepithel in Form einer Sphere mit Öffnung übrig blieb (Abb. 7 E). Danach wurde die Retina an je zwei sich gegenüberliegenden Seiten eingeschnitten. Die wie zuvor beschriebenen vorbereiteten Grids mit Membran wurden im Medium der Präparationskulturpetrischale untergetaucht bis das Medium die Filtermembran gänzlich durchsogen hatte. Das nun absinkende Netzchen wurde unter der eingeschnittenen schwimmenden Retina positioniert. Durch Anheben des Netzchens mit einer Pinzette breitete sich die Retina flächig in Form eines Kleeblattes auf der Kulturmembran aus (Abb. 7 F). Anschließend wurde das so erstellte Explantat auf dem Trägernetzchen in eine frische mit 1 ml Complete Medium gefüllte Plastikculturschale (Ø 3,5 cm) überführt und, wenn nicht anders beschrieben, bei 37°C, 5% CO₂ sowie 12-stündigem Hell/Dunkel Rhythmus in einem Brutschrank (MMM, Gräfelting) kultiviert. Die Belichtung erfolgte dabei durch eine im Brutschrank installierte LED-Platine (Light Emitting Diode).

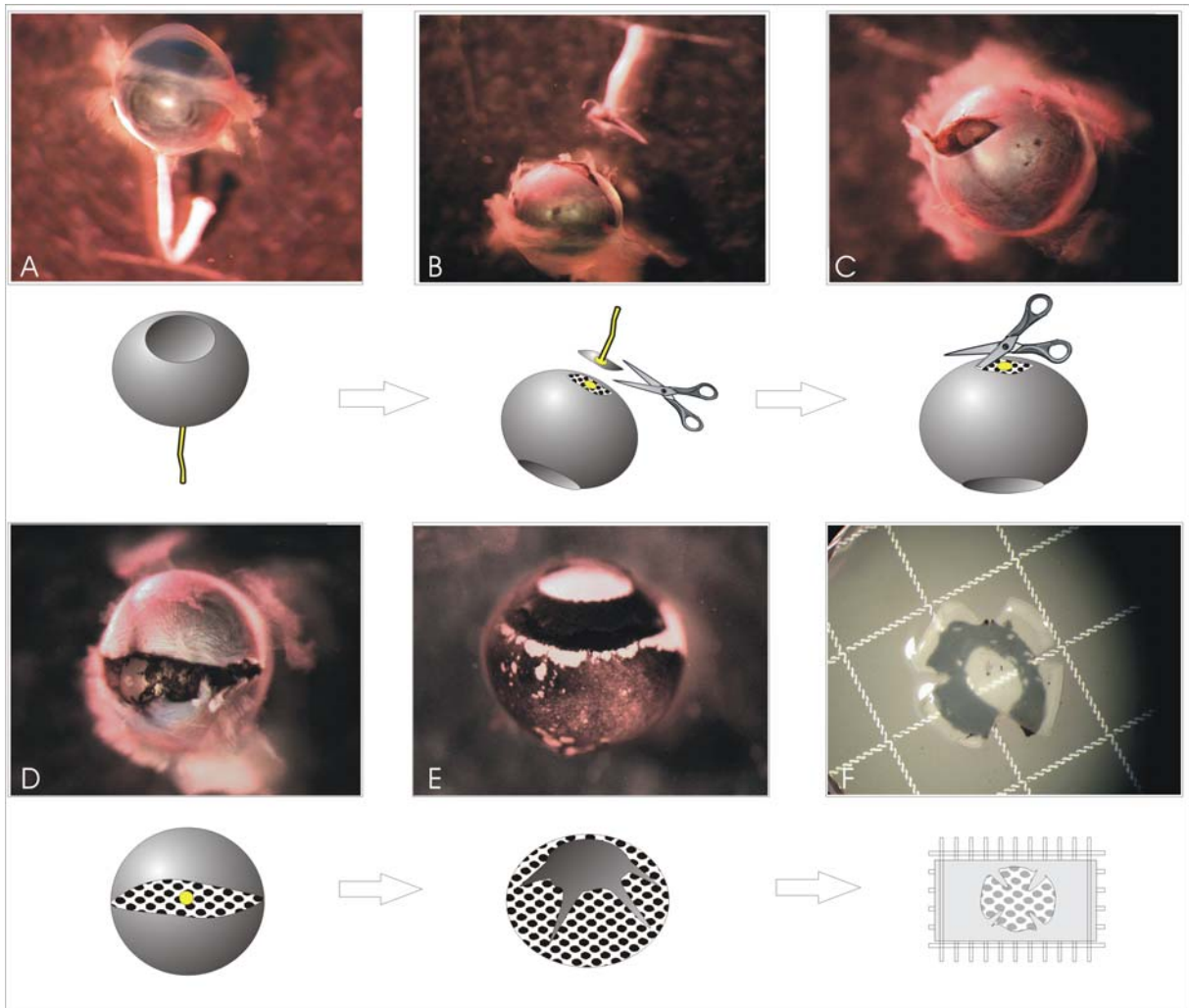


Abbildung 7: Retinapräparation für die Kultivierung und Anfertigung von Gefrierschnitten **A:** Auge mit optischem Nerv. **B:** Abschneiden des optischen Nerven mit der feinen Schere unter leichter Spannung mit einer Pinzette. **C:** Einschneiden der Sclera durch vorsichtiges Einführen der Schere zwischen dem retinalen Pigmentepithel und der Sclera. **D:** Vollständiges Einschneiden der Sclera zu beiden Seiten bis zur Cornea. **E:** Einschnitte in die sphärische Retina, die von Sclera, Cornea, Linse, Glaskörper befreit wurde. **F:** Ausbreiten der Retina auf der Kultivierungsmembran, die auf einem Nylonnetz befestigt ist.

2.3.4 Retinapräparation Krallenfrosch

Die Retinae aus *Xenopus*-Augen wurden zunächst, wie schon für die Maus beschrieben präpariert, bis zur Phase der Linsenentnahme (Abb. 7 E). Die Linse wurde aus Gründen der Stabilität für die Kultivierung der *Xenopus*-Retina nicht entfernt. Danach wurden die Retinae, die Linse umschließend, in 24er Multi-well-Platten in je 0,5 ml Medium kultiviert.

2.4 Lichtadaptationen

Soweit nicht anders beschrieben wurden in Lichtadaptationsexperimenten die Retinakulturen, sowie Kontrolltiere zunächst für vier Stunden dunkeladaptiert und anschließend einer Beleuchtungsstärke von 200 lux durch Licht-emittierende Dioden (LED) für 30 Minuten ausgesetzt. In Experimenten zur Dunkeladaptation wurden zunächst die Kontrolltiere bei 400 lux und die kultivierten Retinae bei 200 lux für 60 Minuten helladaptiert. Da den kultivierten Retinae der optische Apparat fehlt und der Winkel des einfallenden Lichtes stets senkrecht zu den Photorezeptorzellen steht, wurden für diese Adaptationen der Retinakulturen geringere Lichtintensitäten im Vergleich zu den adaptierten Tieren gewählt. Das Licht der verwendeten Weißlicht LEDs entspricht in seiner spektralen Zusammensetzung in etwa dem Tageslichtspektrum, und deckt somit einen großen Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes ab.

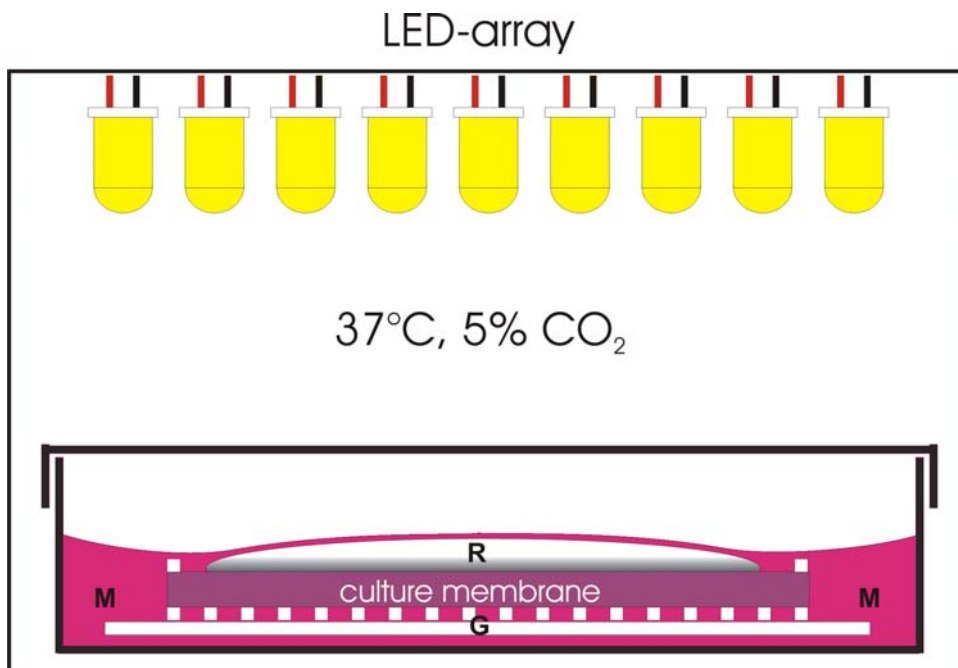


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Kultivierung der Retina. Die Herstellung der dargestellten Retinakultur ist im Text ausführlich beschrieben. LED = (Light Emitting Diode), R = Retina, M = Medium zur Kultivierung, G = Grid (Netzchen).

2.5 Applikation von Pharmaka in die Retinakultur

Die in den pharmakologischen Behandlungen verwendeten Substanzen wurden stets in 50% DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst eingesetzt. DMSO erhöht zum einen die Löslichkeit von pharmakologischen Substanzen in wässriger Lösung und vergrößert zum andern die Durchlässigkeit von Zellmembranen zur Applikation von Pharmaka. Die das Aktin-

Cytoskelett beeinflussende Substanz Cytochalasin D wurde bei Sigma-Aldrich (Germany) erworben und in einer Endkonzentration von 10 μM dem Retinakulturmedium zugesetzt. Die Applikation erfolgte in den Experimenten jeweils 30 Minuten vor dem Wechsel der Beleuchtungsbedingungen. Zur Untersuchung des Einflusses des Myosin-Inhibitors Blebbistatin in der Retinakultur, wurden Retinae im Hellen präpariert und danach mit 100 μM Blebbistatin im Kulturmedium behandelt. Die Verwendung von Blebbistatin erfolgte dabei für zwei Stunden im Hellen. Thiabendazol (Firma Fluka, Germany) wurde ebenfalls in 50% Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt und in einer Endkonzentration von 1,5 mM dem Retinakulturmedium zugegeben. Die Applikation der Pharmaka sowie der Kontrolllösung (1% DMSO) erfolgte jeweils 1½ Stunden vor Änderung der Beleuchtungsbedingungen. Alle Inkubationen mit pharmakologischen Stoffen erfolgten bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die Proben, mit Ausnahme der Hellkontrollen, für drei Stunden dunkeladaptiert. Nach Beendigung von Dunkeladaptionen wurden die Proben unter Rotlicht wie unter Punkt 2.7.1 beschrieben fixiert und eingebettet.

2.6 Transfektionen der Retinakultur

Unter Transfektion versteht man das Einbringen fremden genetischen Materials in eukaryontische Zellen. Zur Transfektion von Zellen der organotypischen Retinakultur wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Transfektionsmethoden, die Elektroporation und die ballistische Transfektionstechnik eingesetzt. Im Folgenden sollen nun die Anwendung der beiden Techniken, sowie die Isolierung der zur Transfektion verwendeten Vektoren, die die zu untersuchenden Genkonstrukte beinhalten, vorgestellt werden.

2.6.1 Plasmidvektor

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transfektionsexperimente wurden die in der Tabelle 4 aufgeführten Plasmidvektoren (eGFP-Fusionsvektoren) inklusive der entsprechenden Genkonstrukte verwendet. Die Lagerung der Vektoren erfolgte in Form der verwendeten transformierten Bakterienstämme, als Dauerkultur bei -80°C. Zur Vermehrung und Gewinnung des entsprechenden Vektors wurden Flüssigkulturen angesetzt (siehe unter Punkt 0) aus denen anschließend die DNA isoliert wurde (Punkt 2.6.3).

Tabelle 4: Verwendete Konstrukte und Vektoren zur Transfektion von Zellen der organotypischen Retinakultur.

Vektor	Klon	Resistenz
eGFP Gateway	eGFP-Centrin 1 HA	Ampicillin
eGFP Gateway	eGFP-Centrin 3 H2	Ampicillin

2.6.2 Anzucht von 0,5 l Flüssigkulturen zur DNA-Präparation (Maxipräp)

Zunächst wurden mit den verwendeten Plasmidvektor-tragenden Bakterienstämmen Flüssigkultur angeimpft. Dazu verwendete man 5 ml LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 10 g/l Kochsalz) mit 5 µl Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml). Die Anzucht der Bakterien erfolgte für 10 Stunden bei 37°C und unter konstantem Schütteln (190 rpm). Anschließend wurden die 5 ml Flüssigkulturen in einen mit 250 ml LB-Medium (+ 250 µl Ampicillin) gefüllten 500 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die weitere Anzucht erfolgte bei 37°C und unter langsamerem Schütteln (130 rpm) über Nacht. Zur Beendigung der Kultivierung wurden die Kolben dem Inkubator entnommen und zur Isolierung der DNA bereitgestellt.

2.6.3 Aufreinigung von Plasmid DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid DNA aus den angezüchteten Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Zur Aufreinigung der DNA aus dem Lysat wurde das „Plasmid DNA Purification Nucleo Bond AX500“ Kit der Firma Macherey und Nagel (Düren) verwendet. Die Durchführung der Präparation erfolgte nach den Herstellerangaben. Hierzu wurden zunächst die Bakterien aus den Anzuchtsmedien in 50 ml Zentrifugationbehältnissen bei 4000 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das erhaltene Pellet wurde anschließend mit 12 ml Puffer S1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) aufgenommen und resuspendiert. Diese Lösung wurde danach mit 12 ml Puffer S2 (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt, invertiert und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt wurden die Zellen aufgebrochen und die DNA ging in Lösung. Dann wurde dieser Suspension 12 ml des auf 4°C gekühlten Puffer S3 (2,8 M KAc, pH 5,1) zugegeben, die Lösung invertiert und diese für 5 Minuten auf Eis inkubiert. In diesem Schritt wurden die denaturierten Proteine, sowie Zellmembranbestandteile präzipitiert. Darauf folgend wurde das Lysat, mit Hilfe eines mit ddH₂O-befeuchteten Papierfilters filtriert, um die präzipitierten Zellbestandteile vom Lysat abzutrennen. Der Durchfluss wurde auf eine zuvor durch Verwendung des N2 Puffers (100

mM Tris, 15% EtOH, 900 mM KCl, 0,15% Triton X-100, pH 6,3) equilibrierte Säule gegeben. Das Plasmid bindet dabei an eine Silicamembran der Säule. Im nächsten Schritt wurde zur Reinigung der DNA, die Säule mit 32 ml N3 Puffer (100 mM Tris, 15% EtOH, 1,15 M KCl, pH 6,3) gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des N5 Puffers (100 mM Tris, 15% EtOH, 1 M KCl, pH 8,5) von der Membran gelöst und in einem 50 ml Zentrifugationsgefäß aufgefangen. Durch die Zugabe von Isopropanol wurde die DNA gefällt. Nach der Zugabe wurde die Lösung invertiert und für 1 Stunde bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol versetzt. Durch Ethanol wurden die restlichen Salze aus dem Pellet ausgewaschen und die Reinheit der DNA erhöht. Diese Lösung wurde erneut für 1 Stunde bei 4000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem Entfernen des Ethanolüberstandes wurde das Pellet 20-30 Minuten getrocknet, um Reste des Ethanols zu verdampfen. Das Pellet wurde abschließend in 150-300 µl $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde anschließend, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, photometrisch bestimmt.

2.6.4 Bestimmung der DNA Konzentration

Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Mit Hilfe eines Photometers kann über die Extinktion bei 260 nm der Gehalt einer Lösung an DNA photometrisch bestimmt werden. Dabei entspricht die optische Dichte (OD260) bei einem Wert von 1 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Mit diesem Wert als Umrechnungsfaktor kann die Konzentration der Nukleinsäure bestimmt werden. Die Berechnung erfolgte hierzu nach folgender Formel:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor}$$

Durch Ermittlung des Quotienten der gemessenen Extinktionen bei 260 (DNA) und 280 (Proteine) nm lässt sich zudem der Reinheitsgrad, sprich das Vorhandensein von Proteinresten in der Nukleinsäurelösung bestimmen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmid DNA war mit Werten für diesen Quotienten zwischen 1,7 und 1,9 von geeigneter Reinheit.

2.6.5 Elektroporation

Für Gentransfers mit Hilfe der Elektroporationstechnik, macht man sich die Eigenschaft von Zellmembranen zu Nutze, für bestimmte elektrische Impulse, kurzfristig permeabel zu sein.

Die in den Membranen der Zielzellen durch Elektroporation auftretenden Poren können dann ein Eintreten fremden genetischen Materials gewährleisten. Bei der Durchführung dieser Experimente unter Verwendung der Elektroporation, wurde weitestgehend nach den methodischen Vorgaben und mit Materialien aus der Arbeit (Matsuda & Cepko, 2004) vorgegangen. Dazu wurde zunächst die zu transfizierende Retina bis zu dem im Kapitel 2.3 beschriebenen Punkt des Einschneidens frei präpariert. Die freigelegte Retina, in Form des Augenbechers, wurde dann mit Hilfe einer Pipette mit erweiterter Pipettenspitze in eine Elektroporationskammer (Matsuda & Cepko, 2004) überführt. Diese wurde zuvor mit 500 μl einer Lösung aus Basal Medium mit Plasmid DNA befüllt, in der die Endkonzentration an Plasmid DNA bei allen Versuchen ca. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ betrug. In der verwendeten Kammer lag der Elektrodenabstand bei 1 cm. Zur Erzeugung der Elektroporationsimpulse wurde der Elektroporator ECM 830 (BTX Harvard Apparatus, Holliston, USA) verwendet. Dieser generierte Impulse von 50 ms Länge bei einer Spannung von 30 V, die fünfmal in einem Abstand von 950 ms wiederholt wurden. Die Retina wurde anschließend wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben weiterpräpariert und in Kultur genommen. Jeweils 24, 48, und 72 Stunden nach der Transfektion wurde dann die Expression der eingebrachten Fusionsproteine am Epifluoreszenzmikroskop überprüft. Eine Skizze des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 9 dargestellt. Abschließend wurden die transfizierten Retinakulturen 72 Stunden nach der Transfektion wie unter Punkt 2.7.1.1 eingebettet und fixiert.

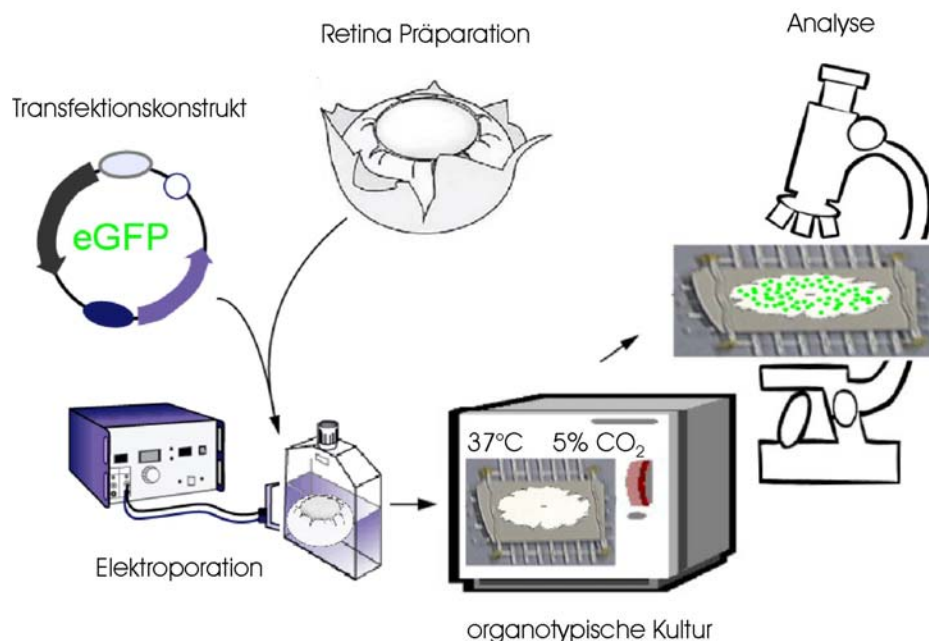


Abbildung 9: Schematischer Versuchsaufbau und -ablauf zur Transfektion von Retinae durch Elektroporation (nähere Erläuterungen im Text).

2.6.6 Helios Gene Gun™ Transfektion

Unter Verwendung der Helios Gene Gun™ (BioRad, München) wurden Experimente zur ballistischen Transfektion von Zellen der organotypischen Retinakultur durchgeführt. Der Gentransfer mit der Helios Gene Gun™ erfolgt dabei durch das Beschleunigen von mit Plasmid DNA-behafteten Goldpartikeln, die in Zielzellen eindringen. Entsprechend der Gebrauchsanweisung der Gene Gun™ wurde ein Verhältnis von 2 µg DNA pro mg Goldpartikel eingesetzt. Vor der Anwendung wurden die „Patronen“ der Gene Gun™ mit 0,5 mg Gold beladen. Die bei der Präparation und Herstellung der „Patronen“ verwendeten Chemikalien waren im Lieferumfang der Gene Gun™ enthalten.

2.6.6.1 Präparation der Goldpartikel

Zur Präparation der Goldpartikel wurden zunächst 50 mg Goldpartikel (Typ Micron 1,6 µm Durchmesser) an einer Feinwaage abgewogen und in ein Reaktionsgefäß de Volumens 1,5 ml überführt. Den Goldpartikeln wurde anschließend 100 µl einer 0,05 M Spermidinlösung zugegeben, die Suspension aufgeschüttelt und danach für einige Sekunden in einem Ultraschallbad soniert. Anschließend wurde der Lösung 100 µg DNA, in d_4H_2O gelöst, zu gegeben und erneut gevortext. Darauf folgend wurde die Gold-DNA-Suspension auf einen Schüttler gebracht, und der Probe tröpfchenweise 100 µl einer 1M $CaCl_2$ -Lösung bei Raumtemperatur hinzupipettiert. Zur Präzipitation blieb anschließend die Gold-DNA-Supsension für weitere 10 Minuten auf dem Schüttler. Im Anschluss wurde die Suspension kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die behafteten Goldpartikel wurden dann in 1 ml 100%igen Ethanol aufgenommen und das Gemisch zur Reinigung der Präzipitate gevortext und anschließend zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Ethanolwaschschritt noch zweimal wiederholt. Abschließend wurde das Pellet mit einem PVP/Ethanolgemisch (0,05 mg PVP/ml Ethanol) resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugationsgefäß überführt. Das Endvolumen der Gold-PVP/Ethanol-Suspensionen lag nun bei 6 ml und wurde bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Patronen zur Verwendung in der Gene Gun™ mit Hilfe der hergestellten Suspension beladen.

2.6.6.2 Herstellung der Patronen für die Gene Gun™

Die Herstellung der Patronen für die Gene Gun™ erfolgte mit Hilfe einer mitgelieferten Präparierstation. Zuerst wurde der Schlauch, aus dem später die Patronen geschnitten wurden, zum Trocknen und Säubern mit Stickstoff begast. Danach wurden die, wie im vorherigen

Kapitel beschrieben hergestellten, Gold-DNA-Präzipitate in der PVP/Ethanol-Lösung mit einer 10 ml Einwegspritze in den getrockneten Schlauch aufgezogen. Dieser wurde dann vorsichtig in die Präparierstation geschoben und dort fixiert. In der motorisierten Präparierstation, konnten sich nun die Goldpartikel unter Rotation gleichmäßig an der Schlauchinnenwandung anlagern. Anschließend wurde das Ethanol aus dem Schlauch mit einer Spitze abgezogen und dieser durch erneute Stickstoffzufuhr getrocknet. Der so mit DNA-behafteten Goldpartikeln beladene Schlauch wurde abschließend mit dem mitgelieferten Schneidegerät in gleichgroße Patronen geschnitten, die dann bei 4°C bis zur Transfektion gelagert werden konnten.

2.6.6.3 Ballistische Transfektion mit der Gene Gun™

Die Transfektion von Zellen der Retinakultur mit Hilfe der Gene Gun™ erfolgte über den Beschuss von zur Kultivierung präparierter Retinae mit den zuvor hergestellten in den Schlauchpatronen haftenden DNA-Goldpartikeln. Zunächst wurden hierfür die vorbereiteten Patronen mit DNA-Goldpartikeln in die Trommel der Gene Gun™ eingesetzt und stehen nun zur ballistischen Transfektion zur Verfügung. Die Goldpartikel werden dazu unter rascher Gasdruckentfaltung durch Helium aus den Schlauchhülsen beschleunigt. Hierbei wurde, wenn nicht anders angegeben, der vom Hersteller als Standarddruckstärke angegebene Wert von 140 psi am Druckausgleichsventil der Heliumgasflasche eingestellt. Die so konfigurierte Gene Gun™ wurde über der Retinakultur positioniert und mit den Goldpartikeln beschossen. Der Abstand zwischen der zu transfizierenden Retina und Gene Gun™ entsprach dabei dem des standardmäßig angeschraubten Abstandhalters der Gene Gun™. In diesen Abstandhalter war außerdem ein mitgelieferter Diffusor eingesetzt, der die Streuung der Goldpartikel auf kurze Entfernungen erhöht. Die beschossenen Retinakulturen wurden anschließend, wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, kultiviert. 24, 48 oder 72 Stunden nach dem ballistischen Einbringen der Goldpartikel in Zellen der Retina, wurde die Transfektion von Zellen durch die Expression von GFP-Fusionsproteinen am Epifluoreszenzmikroskop überprüft. Retinakulturen mit GFP-Expression wurden abschließend 72 Stunden nach der Transfektion wie unter Punkt 2.7.1 fixiert und eingebettet.

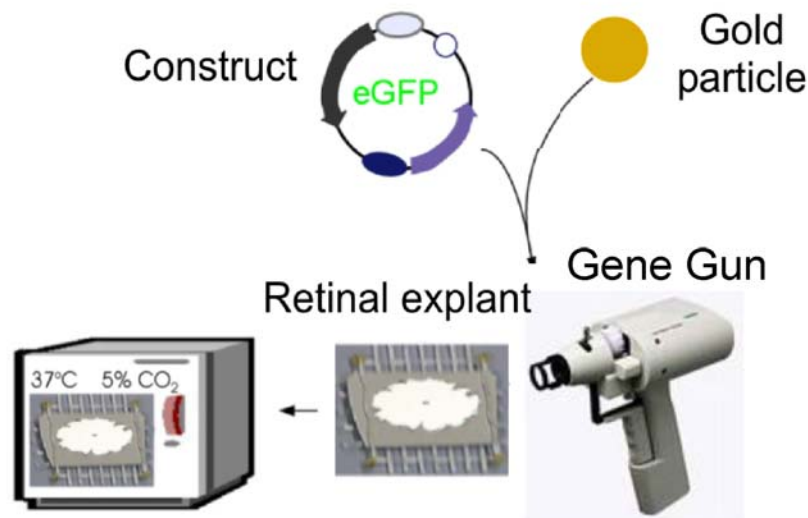


Abbildung 10: Schematischer Versuchsaufbau und -ablauf zur ballistischen Transfektion von Retinae mit der Gene Gun™ (nähere Erläuterungen im Text).

2.7 Lichtmikroskopie

Um die Lokalisation beziehungsweise Verteilung von Proteinen im Retinagewebe zu bestimmen, wurden Schnittpräparate auf lichteptischem Niveau mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie (Fluoreszenzauflicht-Mikroskopie) und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Dazu bediente man sich der „indirekten“ oder „sekundären Immunfluoreszenz“. Hierfür wurden fixierte Gewebsschnitte zunächst mit einem primären Antikörper gegen das oder die Zielprotein(e) behandelt, und anschließend dieser primäre Antikörper durch einen zweiten (sekundären), Fluorochrom-gekoppelten Antikörper detektiert und damit das Zielprotein markiert.

2.7.1 Fixierung, Einbettung und Schneiden der Präparate

Falls nicht anders beschrieben, wurden die im Folgenden dargestellten Vorgehensweisen zur Fixierung und Einbettung der Retinapräparate unter denjenigen Lichtbedingungen durchgeführt, die auch dem Endadaptationszustand des jeweiligen Experimentes entsprachen. Sprich, dunkeladaptierte Präparate wurden unter Rotlicht in abgedunkelter Umgebung weiterbehandelt. Helladaptierte Retinae wurden dementsprechend im Hellen weiterbearbeitet.

2.7.1.1 Fixierung, Einbettung von Mausretinae

Um den Zustand der Proteinverteilungen in den Photorezeptorzellen der Retinakultur bzw. ganzer Augen festhalten zu können, wurden die Retinae fixiert. Dazu wurde das Medium der Retinakultur durch 1 ml Fixans (4% PFA in 0,1 M Sörensen-Phosphat-Puffer pH 7,4) ersetzt. Für komplette Augen wurde dazu mit einer Kanüle zunächst die Cornea durchstoßen, damit das Fixans die Retina erreichen kann, die sonst durch die derbe Lederhaut geschützt ist. Nach einer Fixierungszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Fixans entfernt und mit dreimal je 1 ml 0,1 M Sörensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Retinae in eine Reihe Saccharose-Lösungen mit aufsteigenden Konzentrationen überführt. Dies verhindert bei der anschließenden Kryoeinbettung die Bildung größerer Eiskristalle bei gleichzeitiger Erhöhung der Gefriereschwindigkeit. Dazu wurden die Proben zunächst mit einer 10%igen Saccharose Lösung für zehn Minuten inkubiert. Der nächste Gefrierschutzschritt erfolgte in einer 20%igen Saccharose Lösung für weitere zehn Minuten. Danach wurden die Retinae in einer 30%igen Saccharose Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Einbettung der Retinae am darauf folgenden Tag, wurde zunächst eine Kälteplattform installiert. Dazu wurde ein hohler Metallzylinder in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und auf dessen, aus dem Stickstoff ragenden Oberfläche, ein Glasdeckgläschen positioniert. Zur Einbettung diente ein selbst angesetztes Einbettmedium nach einem Protokoll von S. Yazulla (30 g Ovalbumin und 3 g Gelatine in 100 ml ddH_2O) (Eldred *et al.*, 1983). Dazu wurden zunächst 30 g Ovalbumin in 80 ml warmem (37°C) ddH_2O homogenisiert. Die in 20 ml kaltem ddH_2O gelöste Gelatine wurde dann dem Ovalbumingemisch unter ständigen, langsamen Rühren zugegeben. Bei der anschließenden Portionierung in 2 ml Aliquots wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen im Gemisch waren. Vor dem Einsatz des Yazulla-Mediums musste dies auf 37°C erwärmt werden. Das Yazulla-Medium verliert bei abkühlen auf Raumtemperatur seine fließfähige Konsistenz und verklebt. Vor dem Aufbringen des Einbettmediums, wurde die Membran, auf der sich die fixierte Retina befand auf eine minimale Fläche, nur wenige Millimeter größer als die Retina getrimmt. Anschließend wurde ein Tropfen von ca. 150 μl des Einbettmediums Yazulla auf das Deckgläschen pipetiert. In diesen Tropfen wurde zügig die geschnittene Membran mit der Retina gelegt und mit weiteren ca. 150 μl Yazulla überschicht, bevor der erste Tropfen durchgefroren war. Hierbei entstand ein äußerlich homogenes „Sandwich“, das das Retinapräparat beinhaltet. Für das anschließende Schneiden von dünnen, weichen Präparaten wie der Retina, bietet sich das Yazulla-Medium aufgrund seiner geringen Härte und gewebesähnlichen Konsistenz an, die kommerziellen Einbettmedien in der Regel nicht liefern.

Bei der Einbettung war darauf zu achten möglichst blasenfrei zu arbeiten. Die eingebettete Kultur wurde abschließend zur Dokumentation mit einem beschrifteten Fähnchen versehen, das auch die Orientierung des Präparates anzeigt. Nachdem Einbetten wurde die Probe bei -80°C gelagert oder direkt am Kryo-Mikrotom geschnitten.

2.7.1.2 Einbettung von fixierten Augen

Vor der Einbettung ganzer Augen, wurden zur Vorbereitung Blöckchen aus gekochter Leber mit einer Kantenlänge von ca. 0,5 cm geschnitten und auf beschriftete Fähnchen mit Einbettmedium (TissueTek™ von Miles Elkhart, USA) aufgeklebt. In die Leberwürfelchen wurde mit Hilfe einer dekaptierten Pipettenspitze eine Vertiefung gestanzt und diese mit Einbettmittel gefüllt. Anschließend wurde das einzubettende Auge so in der Vertiefung positioniert, dass es in seiner Längsachse in Richtung der Beschriftung ausgerichtet war und wurde anschließend luftblasenfrei mit Einbettmittel überschichtet. Daraufhin wurden die Präparate in schmelzendem Isopentan (ca. -160°C) langsam und ohne starkes Sieden eingefroren. Dazu wurde in flüssigem Stickstoff gekühltes Isopentan mit Hilfe eines warmen Eisenobjektes zum Schmelzen gebracht. Die so eingefrorenen Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert oder direkt am Kryomikrotom geschnitten.

2.7.1.3 Fixierung, Einbettung von *Xenopus*retinae und -augen

Die verwendeten Retinae und Augen von *Xenopus* wurden in 3,7% Paraformaldehyd in 73% Methanol (23,3% H₂O) fixiert und mit Hilfe einer absteigenden Reihe von Methanol in PBS (60, 40, 20 und 0% Methanol, jeweils für 15–30 Minuten) rehydriert. Die Proben wurden anschließend in einer 30%igen Saccharose-Lösung über Nacht bei 4°C equilibriert und am darauf folgenden Tag in OCT-Medium (Sakura FineTek, Torrance, CA) eingebettet.

2.7.1.4 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Schnitte zur späteren lichtmikroskopischen Analyse fixierter Augen, sowie der Retinakultur wurden mit Hilfe eines Kryomikrotoms (Microm-HM 560) angefertigt. Dazu wurde die Temperatur der zu schneidenden Proben und des Messers auf -20°C eingestellt. Die Schnitte wurden auf Deckgläschen (22 mm x 22 mm x 0,17 mm, Firma: Roth), die mit Poly-L-Lysin (PLL) (Sigma-Aldrich) beschichtet wurden, aufgenommen. Für die zuvor PLL-Beschichtung wurden 800 µl einer 0,01 % PLL-Lösung auf Deckgläschen pipetiert, und diese

über mehrere Tage unter dem Abzug getrocknet. In Abbildung 11 ist die Orientierung der Retina auf der Kultivierungsmembran und eine lichtmikroskopische Aufnahme einer kultivierten Retina im differentiellen Interferenz Kontrast beispielhaft dargestellt.

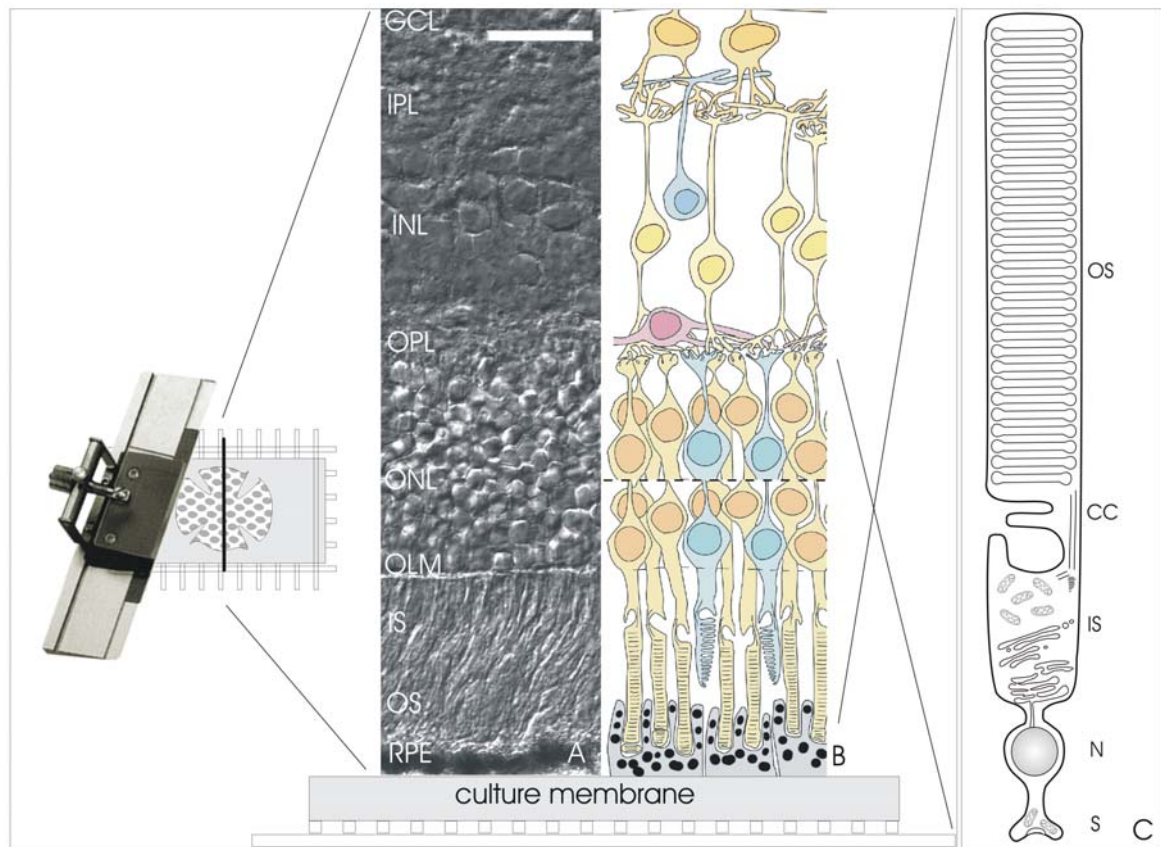


Abbildung 11: Anfertigung von Schnittpräparaten der Retinakultur auf der Kultivierungsmembran. A: Differentielle Interferenz Kontrast Aufnahme einer gefrier-geschnittenen Retina, zeigt die Orientierung des Explantates, bei der die Pigmentepithelzellen der Kultivierungsmembran zugewandt sind. **B:** Schematische Darstellung der Retina und deren Zellorganisation. **C:** Schematische Darstellung der Vertebraten-Photorezeptorzelle. OS = Außensegment, IS = Innensegment, ONL = äußere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglionzellschicht. Maßbalken, 13,2 µm.

2.7.2 „TUNEL-Staining“ zum Apoptose-Nachweis an Kryoschnitten

Um apoptotische Zellen in Schnittpräparaten nachzuweisen zu können, wurde das „In Situ Cell Death Detection Kit, Fluoreszin“, oder auch „TUNEL-Kit“ genannt, der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Mit „TUNEL-Staining“ (Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescin dUTP Nick End Labeling) ist es möglich apoptotische Zellen anhand ihrer fragmentierten DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff in Schnitt- oder Einzelzellpräparaten zu markieren (Gavrieli *et al.*, 1992). Durch die „TUNEL“-Markierung werden die bei der apoptotisch auftretenden Fragmentierung der DNA entstehenden 3'-OH

Überhänge enzymatisch verlängert und mit fluoreszenzmarkierten dUTPs inkorporiert, was eine Identifizierung apoptotischer Zellen gewährleistet (Abb. 12).

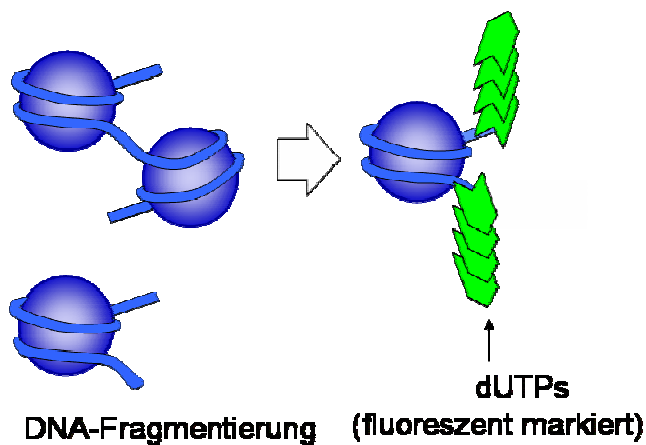


Abbildung 12: Schematische Darstellung der „TUNEL“-Methode, zur Markierung apoptotischer Zellen. (Nähere Erläuterungen im Text).

Dabei können mittels eines Epifluoreszenzmikroskops apoptotische Zellkerne durch eine grüne Fluoreszenz nachgewiesen werden. Für einen Test auf apoptotische Zellen, wurden die Retinakulturen wie in Punkt 2.3.3 beschrieben präpariert und für verschiedene Zeitspannen kultiviert. Anschließend wurden die Retinakulturen, wie in Abschnitt 2.7.1.1 beschrieben fixiert, eingebettet und wie unter Punkt 2.7.1.4 erläutert geschnitten. Zusätzlich wurden Schnitte für jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle angefertigt. Die verwendeten Lösungen zur Inkubation der Schnitte, wurden mit einer Kolbenhubpipette zugegeben und abgesogen. In einem ersten Schritt wurden die Schnitte auf den Objektträgern mit 100 µl 1x PBS für fünf Minuten vorinkubiert. Dieser Waschschrift wurde mit 50 µl 1x PBS wiederholt. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Proben darauf folgend mit 20 µl einer Lösung aus 1x PBS/0,1 % Triton/0,1 % Nacitrat für fünf Minuten inkubiert. Die Detergenzlösung wurde dann abgesogen und anschließend in zwei Schritten mit 50 µl 1x PBS für je fünf Minuten gewaschen. Während auf den Proben 1x PBS für diese Zeit geblieben war, wurde nun die Positivkontrolle abweichend behandelt. Die Positivkontrolle wurde mit einer Lösung aus 5 µl DNase I, 5 µl 10x Reaktionspuffer und 40 µl ddH_2O behandelt und mit dieser Enzymlösung für zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Positivkontrolle zweimal mit 50 µl 1x PBS gewaschen. Nach diesem Schritt wurden alle Schnitte wieder gleich weiterbehandelt. Um das Fluoreszein nicht auszubleichen wurden den Proben nun 30 µl des TUNEL-Reaktionsgemisches im Dunkeln zugegeben und diese für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dazu wird das Reaktionsgemisch aus neun Teilen mitgelieferter „label

solution“ und einem Teil „enzyme solution“ angesetzt. Nach der Markierungsreaktion wurden die Proben dreimal mit 100 µl 1x PBS gewaschen und mit Mowiol 4.88 (Hoechst, Frankfurt a.M.) eingedeckt.

2.7.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Die zur Methode der indirekten Immunfluoreszenz notwendigen Vorgehensweisen und eingesetzten Materialien sollen im Folgenden beschrieben werden.

2.7.3.1 Verwendete primäre Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Antikörper in immunhistochemischen Experimenten eingesetzt. Diese verwendeten monoklonalen, als auch polyklonalen Antikörper wurden entweder kommerziell bezogen, oder in der Arbeitsgruppe Wolfrum, bzw. in Arbeitsgruppen von Kooperationspartnern hergestellt und/oder aufgereinigt.

Tabelle 5: Aufstellung der in Immunhistochemischen Experimenten eingesetzten primären Antikörper. Des Weiteren sind die Kurzbezeichnungen, das jeweilige Antigen, der Ursprungsorganismus, die eingesetzte Verdünnung, Vektoren sowie die Quelle der verwendeten Antikörper angegeben.

Bezeichnung	Antigen	Antikörper erzeugt in	Verdünnung	Quelle
anti-Arrestin (3D1.2)	S-Antigen	Maus	1:50	AG Prof. Millecchia
anti-Arrestin (5C6.47)	S-Antigen	Maus	1:50	AG Prof. Millecchia
anti-Aktin (C4)	G-Aktin	Maus	1:200	AG Prof. D.S.Williams
anti-Centrin1 (pMmC1)	Centrin 1	Kaninchen	1:100	AG Prof. Wolfrum
anti-G _t (SA126)	G _α -Proteinen	Kaninchen	1:100	Biomol, USA
anti-G _t (T20)	G _β -Proteinen	Kaninchen	1:100-1:200	Santa Cruz Biotech., USA
anti- α-Transducin (A4)	Transducin	Maus	1:100	AG Prof. Hamm
anti-α-Tubulin (DM1A)	α-Tubulin	Maus	1:500	Sigma (USA)
anti- γ -Transducin (P19)	γ- Transducin	Kaninchen	1:100	Santa Cruz Biotech., USA
anti-GFAP	„glial fibrillary acidic protein“	Kaninchen	1:500	DAKO Cytomation, DK

2.7.3.2 Immunhistochemische Antikörperinkubation

Bei der immunhistochemischen Analyse bedient man sich häufig der Methode der sekundären Immunfluoreszenz. In der vorliegenden Arbeit wurden Schnittpräparate von Retinae zunächst mit einem primären Antikörper, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, inkubiert. Anschließend wurde das entsprechende Protein indirekt durch einen zweiten (sekundären), Fluorochrom-gekoppelten Antikörper, der den FC-Teil (fragment crystalizable) des primären Antikörpers detektiert, sichtbar gemacht.

2.7.3.2.1 Immunhistochemie: Mausretina

Vor der Inkubation wurden die Retinaschnitte auf den Deckgläschen mit einem Fettstift (Liquid Blocker Pap Pen, Daido Sangyo, Tokyo, Japan) umgrenzt, um die Menge der einzusetzenden Antikörper möglichst gering zu halten. Die Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen mit den anhaftenden Schnitten wurden in kleine feuchte Kammern (Plastikpetrischalen (Ø 4 cm) mit ddH_2O befeuchtetem Filterpapier im Deckel) gelegt. Diese feuchten Kammern sorgten dafür, dass die Gewebsschnitte nicht austrockneten und die Inkubationslösungen nicht eindampften. Die eingesetzten Lösungen wurden mit einer Kolbenhubpipette zugegeben und abgesogen. Zu Beginn der Inkubation wurde in die durch Fettstift eingegrenzten Bereiche der Deckgläschen 100 μl einer Detergenz (1x PBS, 0,01% Tween 20) für zehn Minuten bei Raumtemperatur gegeben. Im Falle von fixierten Präparaten folgte danach ein Waschschriff, mit 100 μl 50 mM NH_4Cl in 1x PBS um freie Aminogruppen abzusättigen. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden mit einer Blockierungslösung (0,1% (w/v) Ovalbumin, 0,5% (w/v) Fischgelatine in 1x PBS) unspezifische Bindungsstellen besetzt. Diese Absättigung erfolgte mit 100 μl der Blockierungslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Blockieren erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in Blockierungslösung, in dem in Tabelle 5 angegebenen Verhältnis.

Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte entweder bei 4°C über Nacht oder bei 37°C für eine Stunde. Nach dieser Inkubation wurden die Schnitte je dreimal für fünf Minuten mit 100 μl 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnittpräparate mit den entsprechenden sekundären fluorochrom-gekoppelten Alexa-Antikörpern (Molecular Probes, Leiden, NL) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auf Schnitten der Mausretina kamen dabei verschiedene Alexa-Antikörper der Typen Alexa 488 (grün-fluoreszierend) und Alexa 568 (rot-fluoreszierend), zum Einsatz. Um ein Ausbleichen des gekoppelten Farbstoffs

vor der Analyse zu verhindern, wurde die nachfolgende Inkubationen im Dunkeln und alle weiteren Arbeitsschritte unter gedämpftem Licht durchgeführt. Danach wurden die Schnitte dreimal mit 100 µl 1x PBS gewaschen. Der erste Waschschrift nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgte für 10 min mit DAPI verdünnt in 1x PBS Lösung (1:4000). Die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenyl) ermöglicht das Anfärben von DNA in Zellkernen. Abschließend wurden die Proben noch zweimal mit 100 µl 1x PBS gewaschen und in Mowiol 4.88 (Höchst, Frankfurt a. M.) eingedeckt worden. Die Präparate wurden dann bei 4°C unter Lichtabschluss bis zur mikroskopischen Analyse gelagert.

2.7.3.2.2 Immunhistochemie: *Xenopus*-Retina

Zunächst wurden die Schnitte von *Xenopus*-Retina oder ganzen Augen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 0,1% NaBH₄ in PBS für 30 Minuten, mit 1,0% Triton X-100 in PBS für 25 Minuten und abschließend mit 6-Guanidinium HCl 50 mM Na₃PO₄ pH 7 für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in ddH₂O gewaschen und in 1% γ-Globulin-freiem Pferdeserum (GGHS) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) für 2 Stunden blockiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte in einer flachen, geschlossenen Feuchtekammer auf einer sich horizontal als auch vertikal kreisförmig bewegenden Plattform („belly dancer“, Stovall Life Science Inc., Greensboro, NC, USA) bei 12–13 rpm. Die Antikörperinkubation wurde hierzu in der Gegenwart von 0,2% Triton X-100 und 0,2% GGHS in PBS für 36–42 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die sekundäre Antikörperinkubation mit (anti-Maus/Kaninchen Texas red-X (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) erfolgte unter den gleichen beschriebenen Bedingungen für 24 Stunden. Danach wurden die Schnitte 3 x 30 Minuten in PBS gewaschen, wobei der zweite Waschschrift 350 nM „Sytox green“ (Molecular Probes) zur Kernfärbung enthielt. Abschließend wurden die Proben in Mowiolösung (Glycerol, 12 mM n-Propylgallate, 96 mg ml⁻¹ Mowiol (Aldrich, St Louis, MO, USA) eingebettet und bis zur mikroskopischen Analyse abgedunkelt bei 4°C gelagert.

2.7.4 Fluoreszenzmikroskopie

Nach der immunhistochemischen Inkubation wurden die Schnitte einer epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Dabei wurde, wenn nicht anders angegeben ein für die Auflichtfluoreszenz ausgestattetes Forschungsmikroskop Leica DM RB

mit folgenden Objektiven eingesetzt: 5× (N Plan), 40× (PL Fluotar), NA = 0,70, 63× (HCX PL) APO, NA = 1,32-0,60; Ölimmersion, Planapochromat). An diesem Auflichtmikroskop wurde die Dokumentation mittels einer hochempfindlichen schwarz/weiss-CCD-Kamera ORCA® ER der Fa. Hamamatsu unter Verwendung der Hamamatsu AquaCosmos Software durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen unter Verwendung des α -Tubulin-Antikörpers (DM1A) erfolgten an einem Laserscanning-Mikroskop des Typs: LSM Leica TCS SP5. Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Retinae des Krallenfrosches wurden ein aufrecht orientiertes Epifluoreszenzmikroskop des Typs: Zeiss, AxioVision Release 4.4 eingesetzt.

2.8 Immunelektronenmikroskopie

Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Analyse, kann im Vergleich zur Lichtmikroskopie eine sehr viel höhere Auflösung (bis 100fach) der im Schnittpräparat zu untersuchenden Strukturen erhalten werden. Dazu ist es notwendig sehr dünne Schnittpräparate (ca. 1/200 der Lichtmikroskopiepräparate) durch Ultramikrotomie zu erstellen. Da in der Säule des Elektronenmikroskops ein Höchstvakuum aufgebaut wird, muß das Präparat entwässert sein, was eine Verwendung von unbehandelten Präparaten für die Elektronenmikroskopie ausschließt. Um die erwähnten Ultradünnschnitte anfertigen zu können, muss eine Fixierung der Proben, sowie deren Einbettung unter Verwendung von sehr harten Einschlussmitteln (spezielle Kunstharze) erfolgen. Die sekundäre Immunogoldmarkierung erfolgt dann an der Oberfläche der Schnittpräparate, sprich der primäre Antikörper detektiert die aus dem Kunstharzschnitt herausragenden Antigene. Für die Visualisierbarkeit der Strukturinformation von organischen Untersuchungsobjekten in der Transmissions-Elektronenmikroskopie, müssen die Präparate zudem kontrastiert werden. Dafür werden sehr große, elektronendichte Atome (Uran, Blei) in die Schnitte eingebracht.

2.8.1 Fixierung und Einbettung für Immunogoldmarkierung.

Um von kultivierten Retinae Präparate für die licht- als auch elektronenmikroskopische Analyse zu erhalten wurden diese zunächst mit gegensätzlich geführten Rasierklingen geteilt und für die Elektronenmikroskopie wie folgt weiter behandelt. Die halbierten Retinae wurden auf der Kultivierungsmembran in den Kultivierungsschalen inkubiert. Die Fixierung wurde bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 3% PFA und 0,1% Glutaraldehyd in PBS für 2 h durchgeführt. Nach anschließendem Waschen in PBS wurden die Präparate zur Entwässerung

in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, zweimal 100% Ethanol) für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur dehydriert. Dazu wurde bei jedem Schritt 1 ml Flüssigkeit verwendet und darauf geachtet, dass sich das Gewebe nicht von der Membran löste. Anschließend wurden die fixierten und entwässerten Retinahälften 1 h mit einem 30%, einem 50% und einem 70% (v/v) LR-White/Ethanol-Gemisch und zuletzt zweimal mit 100% LR-White (2 mal über Nacht) infiltriert. Am nächsten Tag wurden die Präparate in Gelatinekapseln (Fa. Plano, Wetzlar) mit 100% LR-White des Härtegrades „hard“ (Fa. Mikrotechnik EM, München) überschichtet und verschlossen. Danach erfolgte die Polymerisation der Proben unter indirekter UV-Strahlung bei 4 °C für 3-4 Tage.

2.8.2 Anfertigung von Ultradünnschnitten

Von den, wie zuvor beschrieben, eingebetteten LR-White-Präparate wurden nun mit einem Diamantmesser (Fa. Diatom, Biel, Schweiz) an einem Ultramikrotom (Ultracut S, Fa. Reichert-Jung, Wien, Österreich) Semidünnschnitte (0,75 µm = 750 nm) hergestellt und im Lichtmikroskop vorgesichtet und danach die eigentlichen Ultradünnschnitte (60 nm) für die Elektronenmikroskopie hergestellt. Diese Ultradünnschnitte von LR-White-Präparaten wurden auf mit Formvar (Fa. Serva, Heidelberg) beschichtete Nickel-Netzchen („Nickel-Grids“, 75er mesh; Fa. Plano) aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.8.3 Immunogoldmarkierung und Silberverstärkung

Die Immunogoldmarkierungen wurde nach dem Protokoll von (Wolfrum *et al.*, 1998) durchgeführt und sind im Folgenden beschrieben. Dazu wurden die beschichteten Nickel-Netzchen zunächst für 2 Minuten auf jeweils 20 µl-Tröpfchen einer gesättigten Natriumperjodat-Lösung (Fa. Fluka, Seelze) zur Oberflächenanätzung aufgelegt und anschließend zweimal mit ddH_2O gewaschen. Danach wurden die „Grids“ mit 20 µl 0,01% (w/v) Tween 20 in PBS für 10 Minuten inkubiert, gefolgt von der Absättigung der freien Aminogruppen durch 50 mM NH_4Cl in PBS (pH 7,2) für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS, erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 0,1% (w/v) Ovalbumin und 0,5% (w/v) Fischgelatine in PBS für 1 h bei Raumtemperatur. In einer Feuchtkammer wurden die Schnitte anschließend für 72 h bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Darauf folgend wurden nicht gebundene Antikörper mit PBS aus einer Spritzflasche (sog. „jet wash“) von den Schnitten entfernt und diese auf jeweils 20 µl Tropfen PBS für 5 Minuten aufgelegt. Vor der Inkubation mit dem

sekundären Antikörper wurden die Nickel-Netzchen mit IgG-Goldpuffer (0,1% Ovalbumin, 0,5% Fischgelantine, 0,5% NaCl, 0,01% Tween 20 in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2) bei Raumtemperatur für 15 Minuten vorinkubiert und anschließend mit dem jeweiligen sekundären, goldgekoppelten Antikörpern (Fa. Nanoprobes, Yaphank, USA) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die „Grids“ wurden dann wiederum mehrfach mit PBS durch „jet wash“ gewaschen. Zur Verstärkung der spezifischen Bindungen der Antikörperkomplexe an ihre jeweiligen Antigene wurden die Schnittpräparate mit 1% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,2), für 5 Minuten bei Raumtemperatur nachfixiert und danach die Fixierungslösung durch Waschen mit ddH_2O wieder entfernt und dann die Präparate für mindestens 2 h bei Raumtemperatur getrocknet. Um die gekoppelten Goldpartikel der sekundären Antikörper (Partikelgröße: 1-10 nm) für die elektronenmikroskopische Analyse besser sichtbar zu machen, wurde eine „Silberverstärkung“ nach (Danscher, 1981) durchgeführt. Dabei katalysieren die Goldpartikel die Reduktion von Silberionen durch Hydrochinon, so dass sie anschließend von metallischem Silber umgeben sind. Die Silberverstärkungslösung (60% Gummi arabicum als Schutzkolloid, 10% Citratpuffer, 15% 75 mM Hydrochinon als Reduktionsmittel, 15% 5,5 mM Silberlactat, pH 3,6) unter Rotlicht angesetzt. Dann wurden Präparate auf einem Tropfen dieser Lösung für 20-30 Minuten dunkel inkubiert und anschließend die „Netzchen“ mehrfach mit ddH_2O gewaschen.

2.8.4 Schnittkontrastierung und Auswertung

Nach der im vorherigen Abschnitt beschriebenen „Silberverstärkung“ wurden die Schnittpräparate für 5 Minuten nachkontrastiert in 2% (w/v) Uranylacetat in 50% (v/v) Ethanol für 5 Minuten auf einem Tropfen 4,4% (w/v) Bleicitrat. Darauf folgend wurden die „Grids“ in ddH_2O gewaschen und abschließend in der geöffneten Inkubationskammer über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die elektronenoptische Betrachtung und Analyse der Schnitte erfolgte an den Transmissionselektronenmikroskopen LEO EM 906E (Fa. Zeiss, Oberkochen) oder Tecnai 12 (Fa. FEI, Eindhoven, NL).

2.9 Elektronische Datenverarbeitung

Die durch die vorangestellten Methoden gewonnenen Daten wurden zwecks Darstellbarkeit in dieser und anderen Arbeiten mit Computerprogrammen verarbeitet. Die mittels Immunfluoreszenz und Immunoelektronenmikroskopie erhaltenen Aufnahmen wurden mit dem Programm Adobe Photoshop (Version 7, Adobe Systems, Unterschleißheim) bearbeitet

und hinsichtlich Tonwert und Kontrast korrigiert. Die Nachbearbeitung der Aufnahmen geschah für Proben wie Kontrollen im gleichen Verhältnis. Da die Lichtmikroskopischen Aufnahmen von Fluoreszenz mit einer Graustufen-CCD-Kamera aufgenommen wurden (außer bei *Xenopus*) wurden hier die Grautöne nachträglich durch die den eigentlichen Fluoreszenzfarben entsprechenden Falschfarben ersetzt.

3 Ergebnisse

Die Funktionalität von Photorezeptorzellen in Lichtabsorption, Signalverarbeitung und Weiterleitung ergibt sich in erheblichem Maße in ihrem hoch spezialisierten Aufbau. Das Studium dieser Funktionen, aber auch des Verlustes derselben, wie er auch bei degenerativen retinalen Erkrankungen auftritt, ist nur an der voll entwickelten Photorezeptorzelle möglich. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel ein Analysesystem zur Untersuchung voll differenzierter, das heißt kompartimentierter und somit funktionsfähiger Photorezeptorzellen zu etablieren. Da isolierte Photorezeptorzellen in Zellkulturen ihre Kompartimentierung und somit ihr Funktionsvermögen verlieren, kann außerhalb des Organismus nur die organotypische Gewebekultur einer adulten Retina Analysen an entwickelten Photorezeptorzellen gewährleisten. Im Folgenden sollen die Ergebnisse zur Untersuchung der Güte der organotypischen Retinakultur, sowie ihre Nutzung in Experimenten zur lichtabhängigen Verteilung von Proteinen in Photorezeptorzellen vorgestellt werden.

In einem experimentellen Ausblick werden anschließend Ergebnisse von Gentransfers in die organotypische Retinakultur beschrieben. Hierbei wurden Zellen der Retinakultur mit Hilfe eines ballistischen Transfektionssystems, sowie durch Elektroporation transfiziert. Solche Transfektionsmethoden sollen zukünftig für die grundlegende Erprobung von gentherapeutischen Maßnahmen an der Retina dienen. Zur Auswertung der im Folgenden beschriebenen Experimente wurden vornehmlich mikroskopische Analyseverfahren angewandt.

3.1 Etablierung der Retinakultur

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine organotypische Retinakultur etabliert und deren Nutzbarkeit optimiert werden, die auf Explantaten aus juvenilen bis adulten Mäusen (zwischen Tag 7-20 nach Geburt) beruht. Dies war notwendig, um im Gegensatz zu Retinakulturen aus embryonalen Stadien ausdifferenzierte, das heißt, in Innen- und Außensegment kompartimentierte Photorezeptorzellen untersuchen zu können. Dazu wurde eine Technik zur Kultivierung neonataler bis juveniler Retinae unter Erhaltung des retinalen Pigmentepithels (Caffé *et al.*, 1989; Caffé *et al.*, 2001a) adaptiert, um auch Retinae von adulten Mäusen in die organotypische Kultur zu bringen und für eine für weitere Experimente relevante Zeit zu kultivieren. Für alle Experimente der vorliegenden Arbeit, wurden die Retinae zur Ko-Kultur mit dem retinalen Pigmentepithel explantiert. Die dabei verwendete

Technik beruht auf experimentellen Studien die während eines Laboraufenthalts am Wallenberg Retina Center, Ophthalmologisches Institut der Universität Lund (Schweden) in der Arbeitsgruppe von Theo van Veen gemacht wurden. (Forschungsförderungsprogramm der Johannes Gutenberg Universität Mainz). Die detaillierte Beschreibung der Methodik sowie die benötigten Hilfsmittel zur Präparation, sowie des Anlegens der Retinakultur sind dem Kapitel 2.3 in Material und Methode zu entnehmen.

3.1.1 Vitalitätsbestimmung der Retinakultur

Die Retina der Vertebraten zeigt im longitudinalen Schnitt einen typischen, sich in Schichten darstellenden Aufbau. Diese Schichtung der Retina ergibt sich aus verschiedenen Zelltypen, beziehungsweise Bereichen von Zellen, die in einer Ebene zu liegen kommen (siehe auch Abb. 2). In lichtmikroskopischen Analysen von Schnitten durch die organotypische Retinakultur ist zu erkennen, dass die Schichtung, sowie die Morphologie der Retina und der Photorezeptorzellen in Kultur erhalten werden konnte (siehe Abb. 11). Allerdings gibt diese äußerliche Beurteilung keinen Hinweis darauf, ob die Zellen der Retina noch vital und damit für funktionelle Untersuchungen geeignet sind. Es ist bekannt, dass bei retinalen Degenerationen die Zellen durch Apoptose absterben (Wolfrum, 2003). Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod in dem interne oder externe Signale eine Zelle zur „Selbstaflösung“ veranlassen (zusammengefasst in (Lawen, 2003)). Die Apoptose von Ganglienzellen der Retina konnte bereits alleine durch die Abtrennung des optischen Nervis ausgelöst und in der organotypischen Retinakultur durch die so genannte „TUNEL“-Markierung beobachtet werden (Engelsberg *et al.*, 2004). Zur Bestimmung der Vitalität der im Rahmen der vorliegenden Arbeit kultivierten Retina wurde ebenfalls der „TUNEL-Assay“ (Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein dUTP Nick End Labeling) durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich apoptotische Zellen anhand ihrer fragmentierten DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff in Schnittpräparaten zu markieren. Das Zerschneiden der Kern-DNA durch Endonukleasen ist ein markantes Ereignis während der Apoptose. Bei der „TUNEL“-Markierung werden die bei der Fragmentierung der DNA entstehenden 3'-OH Überhänge enzymatisch verlängert und dabei mit fluoreszenzmarkierten dUTPs inkorporiert, was die Identifizierung apoptotischer Zellen (z.B. in Schnittpräparaten) gewährleisten kann (siehe auch Material und Methoden, Seite 47).

Bei dem in Abbildung 13 dargestellten Experiment wurden Retinae von 14 Tage alten Mäusen präpariert und anschließend für unterschiedliche Zeitspannen in Kultur gehalten. Nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer wurden die Retinae fixiert, Kryoschnitte von den

Präparaten angefertigt und an den so erhaltenen Schnitten der „TUNEL-Assay“ durchgeführt. Zur positiven Kontrolle der Enzymreaktion des Experiments diente ein mit DNase behandelter Schnitt. Durch die Fragmentierung der DNA mit DNase wurden sämtliche Zellkerne dieses Kontrollschnittes mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die mikroskopische Analyse jenes, mit DNase behandelten Schnitts zeigte folglich in allen Zellkernen der äußeren und inneren Körnerschicht, sowie der Ganglienzellschicht ein Fluoreszenzsignal (Abb. 13 A). Das fluoreszenzmikroskopische Bild des Schnittes der Retina, die für einen Tag kultiviert wurde, zeigte eine TUNEL-positive und damit apoptotische Zelle in der äußeren Körnerschicht (Abb. 13 B). Dies lässt darauf schließen, dass in der Retinakultur nach einem Tag *ex vivo*, nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen apoptotisch geworden ist. Nach drei Tagen in Kultur wurden einige wenige apoptotische Zellen im Schnitt markiert (Abb. 13 C).

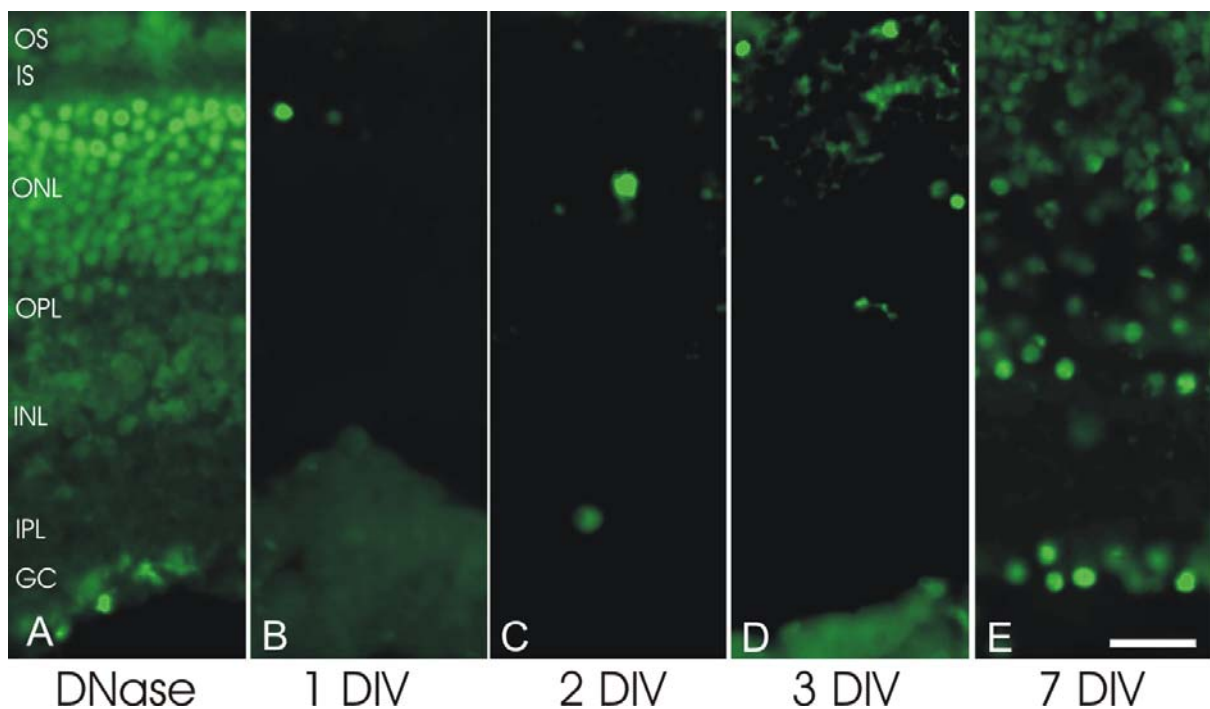


Abbildung 13: Nachweis apoptotischer Zellen mittels „TUNEL-Staining“ in longitudinalen Gefrierschnitten kultivierter Retinae. A: Positive Kontrolle durch vorherige Inkubation mit DNase und anschließender Markierung der Zellkerne in der äußeren Körnerschicht (ONL), der inneren Körnerschicht (INL), sowie der Ganglienzellen (GC) [OS: Außensegment, IS: Innensegment, OPL: äußere plexiforme Schicht; IPL: innere plexiforme Schicht]. B-E: Fluoreszenzmarkierung apoptotischer Zellen in 1-7 Tagen kultivierten Retinae. Der Apoptosetest am Schnittpräparat von kultivierten Retinae 14 Tage alter Mäusen zeigt ein Zeitfenster von 3-4 Tagen auf, in dem die Apoptoserate für weiterführende zellbiologische Experimente ausreichend gering ist. Nach sieben Tagen in Kultur stieg die Apoptoserate allerdings auf ein Maß an, bei dem die meisten Zellkerne des Schnittes durch den Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. (DIV: days in vitro = Tage in Kultur); Maßbalken: 21 μm .

Die apoptotischen Zellen dieser Retinakultur konnten in der äußeren sowie in der inneren Körnerschicht detektiert werden. Im Längsschnitt, der für fünf Tage kultivierten Retinakultur konnten mehrere apoptotische Zellen, hauptsächlich in der äußeren Körnerschicht (Abb. 13 D) festgestellt werden. Im Längsschnitt der Retinakultur, die sich für sieben Tage in Kultur befand, konnte die überwiegende Anzahl der Zellen durch die „TUNEL“-Färbung als apoptotisch angesprochen werden (Abb. 13 E).

Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe ergab sich ein Zeitfenster von drei bis vier Kultivierungstagen in dem die Apoptoserate hinreichend gering war, um Störungen in der Physiologie der retinalen Zellen durch apoptotische Ereignisse ausschließen zu können. Mit diesen Untersuchungen konnte die Grundlage für weiterführende Experimente an einer vitalen organotypischen Retinakultur geschaffen werden. Die Ergebnisse zeigten ferner, dass das gewählte Alter der Tiere, bei PN14 (PN: postnataler Tag) zur Kultivierung von Retinae unter Erhalt der zellulären Strukturen und der retinalen Architektur geeignet ist. In diesem Alter sind die Photorezeptorzellen bereits vollständig in Kompartimente differenziert, aber das Außensegment ist noch nicht zu seiner vollen Länge ausgebildet. In der Handhabung der Retinakultur stellen besonders die Photorezeptoraußensegmente eine fragile Struktur dar. Das gewählte Stadium des Entwicklungsstandes der Retina, stellt einen Kompromiss zwischen Außensegmentausprägung und Stabilität der Photorezeptorzellen dar, der sich als vorteilhaft in Bezug auf die mechanische Belastbarkeit des Gewebes bei ausgebildeten Photorezeptorzellen erwies.

3.1.2 Physiologische Aktivität der Retinakultur

Zur Bestimmung der physiologischen Aktivität von Nerven- und Sinneszellen, werden in der Regel vornehmlich elektrophysiologische Untersuchungsmethoden herangezogen. Da an Photorezeptorzellen der kultivierten Retina elektrophysiologische Experimente nicht, oder nur schwer möglich sind, wurden licht-abhängige Prozesse in Photorezeptorzellen immunhistochemisch in der vorliegenden Arbeit analysiert. Die Überprüfung der physiologischen Aktivität der kultivierten Retinae erfolgte hier durch den Nachweis licht-abhängiger Translokation von Proteinen in Photorezeptorzellen bei unterschiedlichen Beleuchtungszuständen *ex vivo* und im Vergleich mit der *in vivo*-Situation. Diese Experimente an der Retinakultur wurden möglich, durch den Einsatz einer Beleuchtungsapparatur mit definierbarer Licht quanti- und Qualität (siehe auch Material und Methoden, Seite 36). Hierdurch konnten die kultivierten Retinae mit vergleichbarer

Beleuchtungsstärke und Wellenspektrum zu den *in vivo* adaptierten Kontrolltieren behandelt werden.

3.2 Translokationen von Transducin und Arrestin in Photorezeptorzellen der organotypischen Retinakultur

Lichtabhängige Translokationen von Proteinen zwischen Kompartimenten der Photorezeptorzelle sind bereits seit ca. 20 Jahren bekannt (Broekhuysen *et al.*, 1985; Brann & Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan & McGinnis, 1988) und stehen in jüngerer Zeit, gerade in Bezug auf die beteiligten Mechanismen, wieder im Fokus intensiver Forschung (Pulvermüller *et al.*, 2002; McGinnis *et al.*, 2002; Sokolov *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2005). Die „Verlagerung“ von Proteinen der visuellen Signaltransduktion, wie Arrestin und Transducin, zwischen Innen- und Außensegment wird als Teil der Langzeitadaptation von Photorezeptorzellen an unterschiedliche Lichtbedingungen angesehen (Hardie, 2002; Hardie, 2003; Arshavsky, 2003). Die Proteine Arrestin und Transducin sind bei einem gegebenen Adaptationszustand im Innen- bzw. Außensegment der Photorezeptorzelle gegensätzlich verteilt (Sokolov *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2004; Burns & Arshavsky, 2005). Das heißt, während eines der beiden Proteine bei Beleuchtungsänderung ein Kompartiment „verlässt“, erhöht sich die Konzentration des anderen Proteins in diesem Kompartiment. Solche lichtabhängigen Translokationen von Proteinen in Photorezeptorzellen wurden in eingangs erwähnten Arbeiten, in intakten Organismen beobachtet. Ferner konnten in Studien der jüngeren Vergangenheit, solche molekularen Bewegungen auch in Photorezeptorzellen von Augenbecherkulturen nachgewiesen werden (Nair *et al.*, 2005a). Um nun einen Hinweis auf die physiologische Aktivität der organotypischen Retinakultur zu bekommen, sollten in der vorliegenden Arbeit jene lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin auch in den Photorezeptorzellen isolierter, kultivierter Retinae nachgewiesen werden. Hiermit sollen, selbst in der aus dem Organismus isolierten Retina, lichtabhängige molekulare Bewegungen *ex vivo* ein Hinweis auf erhaltenes Funktionsvermögen der Photorezeptorzellen geben. Damit kann auf molekularer Ebene die Fähigkeit der Photorezeptorzellen auf Lichtreize reagieren zu können überprüft werden. Dafür wurden Längsschnitte von Retinae dunkel- und helladaptierter Tiere, jeweils mit Längsschnitten von kultivierten Retinae unter den gleichen Lichtbedingungen verglichen (Abb. 14). Zur Detektion mittels Immunhistochemie wurden primäre Antikörper gegen α -Transducin und visuelles Arrestin eingesetzt, und die

Retinaschnitte mit Hilfe von fluorochromgebundenen sekundären Antikörpern am Epifluoreszenzmikroskop analysiert. In vollständig helladaptierten Retinae der Kultur, sowie in denen, die helladaptierten Tieren entnommen wurden, war Transducin in den Innensegmenten, im Cytoplasma um die Perikaryen, sowie an den Synapsen der Photorezeptorzellen lokalisiert (Abb. 14 A und B). In den *in vivo*, sowie der Kultur dunkeladaptierten Retinae war Transducin ausschließlich in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen zu detektieren (Abb. 14 D und E). In den gleichen bereits zur Transducin Lokalisation analysierten Schnitten helladaptierter Retinae war Arrestin in den Außensegmenten der Photorezeptorzelle zu finden (Abb. 14 F und G). In den dunkeladaptierten Retinae aus Tier und Kultur markiert der Antikörper Arrestin im Innensegment, in der äußeren Körnerschicht und in der äußeren plexiformen Schicht (Abb. 14 I und J). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete typische lichtabhängige Verteilung von Arrestin und Transducin in Kompartimenten der Photorezeptorzellen kultivierter, wie frisch entnommener Retinae, deckt sich mit den *in vivo* gewonnenen Ergebnissen anderer Autoren (siehe beispielsweise (Elias *et al.*, 2004)). Die Analysen der Längsschnitte durch Retinae aus der organotypischen Kultur (Abb. 11) zeigten im Vergleich zu Längsschnitten durch Retinae aus adaptierten Tieren keinen Unterschied in der Lokalisation von Arrestin und Transducin (Abb. 14). Damit konnte nachgewiesen werden, dass sich Arrestin und Transducin auch in der organotypischen Retina lichtabhängig bewegen, sprich sich in Kompartimenten der Photorezeptorzellen *ex vivo* genau so lichtabhängig verteilen wie *in vivo*. Die isolierten Retinae in der organotypischen Kultur sind somit, in einem Erhaltungszustand, der es erlaubt lichtabhängige Translokation von Proteinen in Photorezeptorzellen zu analysieren. Diese Ergebnisse geben, durch die auch in der Retinakultur stattfindenden lichtabhängigen molekularen Bewegungen, einen Hinweis auf die erhaltene physiologische Aktivität der Photorezeptorzellen in den Explantaten. Zusammen mit den Analysen zur Häufigkeit von Apoptose in der Kultur, die in den ersten 3-4 Tagen sehr gering ausfällt, erweist sich die organotypische Gewebekultur adulter Retinae als geeignetes Analysesystem für ausdifferenzierte Photorezeptorzellen. Die experimentell belegte Vitalität und Physiologische Aktivität der Retinakultur bildeten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen. Dadurch wurde es möglich, die im Folgenden beschriebenen Analysen zur Zellbiologie von Photorezeptorzellen, sowie Gentransferexperimente verlässlich durchführen zu können.

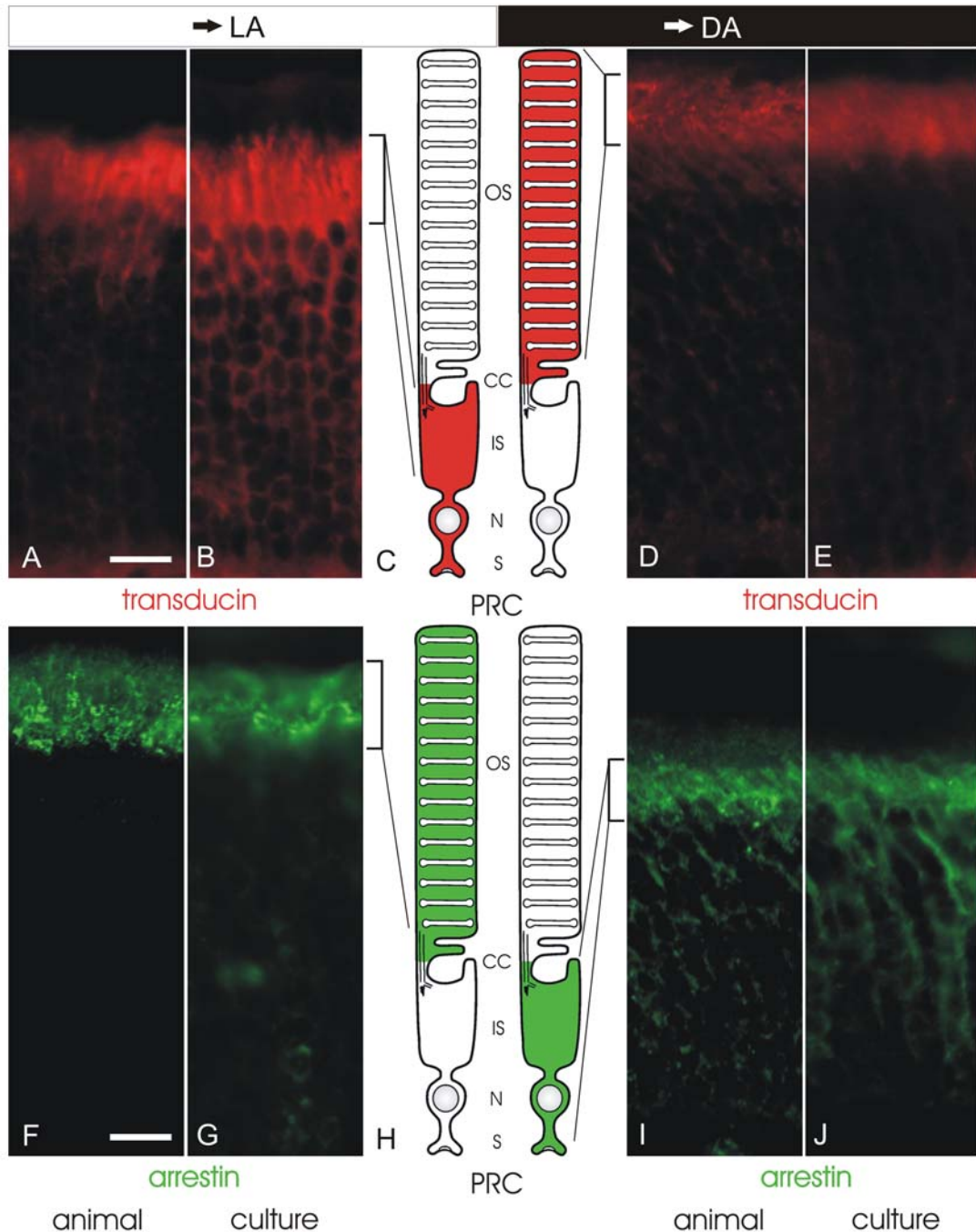


Abbildung 14: Lokalisation von Transducin und Arrestin in Retinaschnitten von hell- und dunkeladaptierten Retinakulturen von PN14+1DIV Mäusen sowie Kontrolltieren. **A und B:** Indirekte Immunfluoreszenz mittels Antikörpern gegen Transducin in Retinaschnitten hell adaptierter Tiere (A) und Retinakultur (B). **C:** Schemata der Photorezeptorzelle (PRC). Die der Lichtadaptation entsprechende Lokalisation von Transducin in der PRC ist farbig dargestellt. [OS: Außensegment, CC: Verbindungscilium, IS: Innensegment, N: Zellkern, S: Synapse]. **D und E:** Indirekte Immunfluoreszenz mittels Antikörpern gegen Transducin in Retinaschnitten dunkel adaptierter Tiere (D) und Retinakultur (E). Der Antikörper gegen Transducin detektiert Transducin bei dunkel adaptierten Retinae im Außen- und bei belichteten im Innensegment der Photorezeptorzelle. **F und G:** Indirekte Immunfluoreszenz mittels Antikörpern gegen Arrestin in Retinaschnitten hell adaptierter Tiere (F) und Retinakultur (G). **H:** Schemata der Photorezeptorzelle (PRC). Die der Lichtadaptation entsprechende Lokalisation von Arrestin in der PRC ist farbig dargestellt. [OS: Außensegment, CC: Verbindungscilium, IS: Innensegment, N: Zellkern, S: Synapse]. **I und J:** Indirekte Immunfluoreszenz mittels Antikörpern gegen Arrestin in Retinaschnitten dunkel adaptierter Tiere (I) und Retinakultur (J). Der Antikörper gegen Arrestin detektiert Arrestin bei dunkel adaptierten Retinae im Innen- und bei belichteten im Außensegment der Photorezeptorzelle; Maßbalken: 13,2 µm.

3.2.1 Translokation von Arrestin in Photorezeptorzellen des Krallenfrosches

In den im Vorherigen beschriebenen Analysen, wurden die Translokationen von Arrestin und Transducin in den Photorezeptorzellen der Retinae von Mäusen *in vivo* als auch in der organotypischen Retinakultur nachgewiesen. Zur Analyse von Photorezeptorzellfunktionen in der zellbiologischen Forschung wurde und wird, vielfach auch die Retina des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) herangezogen, siehe beispielsweise (Moritz *et al.*, 2001) oder (Peterson *et al.*, 2003). Die Photorezeptorzellen von Amphibien bieten durch ihre, im Vergleich zu Säugerphotorezeptorzellen leicht abweichende Morphologie in größerem Durchmesser und längeren Außensegmenten, eine für bestimmte Fragestellungen verbesserte Anschaulichkeit. Mit den im Folgenden dargelegten Experimenten sollte überprüft werden, ob Analysen zu lichtabhängigen Prozessen, wie sie an kultivierten Retinae von Mäusen durchführbar waren, auch an Retinakulturen des Krallenfrosches möglich sind und damit, ob die angewandte Technik zur Kultivierung von Mausretinae auch auf andere Spezies, oder hier Vertebratenklassen übertragbar ist. Hierfür wurde der Krallenfrosch ausgewählt, der bereits als Paradeorganismus zur zellbiologischen Analyse von Photorezeptorzellen etabliert ist (Papermaster, 2002). Der Krallenfrosch bietet sich ferner als Untersuchungsobjekt durch eine zum Säugetier weniger aufwendige Erzeugung transgener Organismen an. Auch mit der Hilfe solcher transgenen *Xenopi* konnten die lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin bereits in Photorezeptorzellen von *in vivo*-adaptierten Kaulquappen nachgewiesen werden (Peterson *et al.*, 2005). In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte nun überprüft werden, ob diese lichtabhängigen molekularen Bewegungen auch in den Photorezeptorzellen kultivierter *Xenopus*-Retinae stattfinden. Dazu wurden Retinae aus *Xenopus*-Augen wie unter Punkt 2.3.4 beschrieben präpariert und kultiviert. Anschließend wurden auch von den *Xenopus*-Retinae Schnitte angefertigt und diese immunhistochemisch analysiert. In diesen Experimenten zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion des *Xenopus*-Arrestins wurde ein monoklonaler Antikörper (xAr1-6) eingesetzt. Auch in *Xenopus* sollte nun der Nachweis lichtabhängiger molekularer Bewegungen in der Photorezeptorzelle einen Hinweis auf Erhaltung des physiologischen Funktionsvermögens geben. Bei helladaptierten Tieren als auch in helladaptierten organotypischen Retinakulturen des Krallenfrosches, konnte in Schnitten Arrestin in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen nachgewiesen werden (Abb. 15 A u. B). Umgekehrt zeigte die immunhistochemische Analyse eine Innensegmentlokalisation von Arrestin in Photorezeptorzellen dunkeladaptierter Tiere, wie auch in Photorezeptorzellen dunkeladaptierter Retinakulturen (Abb. 15 D u. E). Dabei ergab

sich in der Verteilung des Arrestins nach Dunkeladaptation, die typische, schon zuvor in Photorezeptorzellen der Mausretina beobachtete Lokalisation, nicht nur in den Innensegmenten, sondern auch im Cytoplasma um die Perikaryen und auch bis zur Synapse. Die betrachteten Endstadien der lichtabhängigen Translokationen von Arrestin in Kompartimente der *Xenopus*photorezeptoren waren qualitativ in der organotypischen Retinakultur nicht von der *in vivo*-Situation unterscheidbar. Arrestin bewegt sich lichtabhängig zwischen Kompartimenten der Photorezeptorzellen kultivierter *Xenopus*-Retinae. Diese Experimente zeigen, dass auch *Xenopus laevis* zur Untersuchung von lichtabhängigen Prozessen *ex vivo* in Photorezeptorzellen kultivierter Retinae geeignet ist.

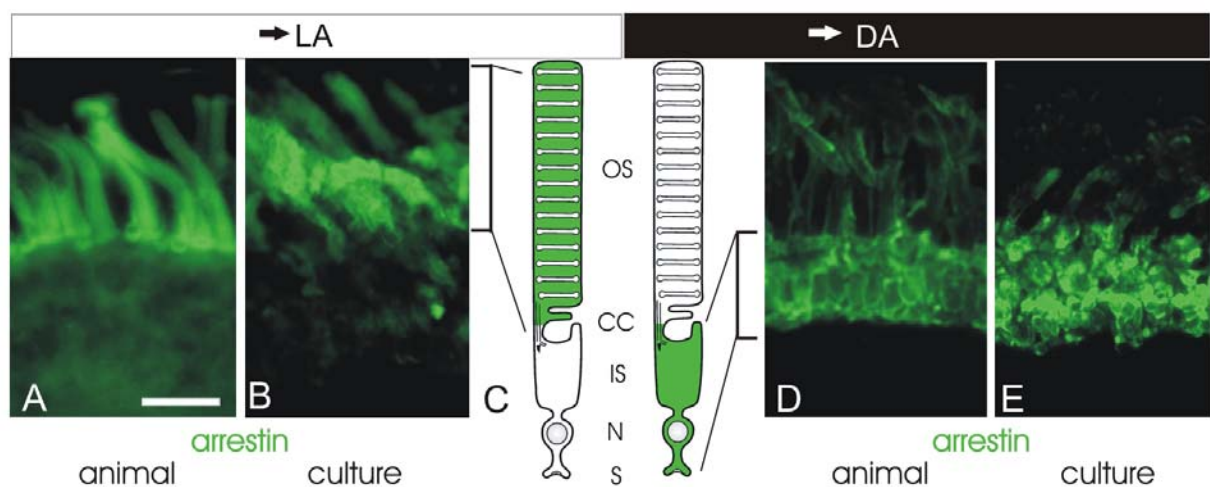


Abbildung 15: Lokalisation von Arrestin in Retinaschnitten von hell- und dunkeladaptierten Retinakulturen von *Xenopus laevis* sowie Kontrolltieren. A und B: Indirekte Immunfluoreszenz mittels monoklonaler Antikörper gegen Arrestin (xAr1-6) an Retinaschnitten hell adaptierter Tiere (A) und Retinakultur (B). **C:** Schema einer Photorezeptorzelle (PRC). Die entsprechende Lokalisation von Arrestin in der PRC ist farbig dargestellt. [OS: Außensegment, CC: Verbindungscilium, IS: Innensegment, N: Zellkern, S: Synapse]. **D und E:** Indirekte Immunfluoreszenz mittels Antikörpern gegen Arrestin in Retinaschnitten dunkel adaptierter Tiere (D) und Retinakultur (E). Der Antikörper gegen Arrestin detektiert Arrestin bei dunkel adaptierten Retinae im Innen- und bei belichteten im Außensegment der Photorezeptorzelle; Maßbalken: 22,5 μ m.

3.3 Rolle des Cytoskelettes bei den Translokationen von Transducin und Arrestin in Photorezeptorzellen

In den zuvor dargestellten Experimenten konnte die Vitalität der kultivierten Retina durch Apoptosetests, sowie den physiologischen Prozess der lichtabhängige Translokation von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen nachgewiesen werden. Damit konnte die Eignung der organotypischen Gewebekultur adulter Retinae zur Analyse lichtabhängiger Prozesse gezeigt werden. Obwohl das Phänomen der lichtabhängigen Translokationen schon recht lange bekannt ist, konnte noch nicht entschlüsselt werden, welche zellulären Strukturen

und molekularen Mechanismen dafür verantwortlich sind. Da eine Vielzahl von gerichteten molekularen Bewegungen in Zellen vom Cytoskelett abhängig sind, sollten die lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen nun hinsichtlich einer eventuellen Beteiligung des Zellskelettes analysiert werden. Es steht hierbei zur Diskussion ob genannte Translokationsprozesse vornehmlich der passiven Diffusion unterliegen, oder ob dabei auch aktive Transportmechanismen eine Rolle spielen. Um eventuell beteiligte Cytoskelettelemente wie Mikrotubuli oder Aktinfilamente, sowie involvierte Mechanismen zu identifizieren, bedient man sich in der zellbiologischen Analyse des Einsatzes cytoskelettbeeinflussender Substanzen. Mit der Hilfe dieser, können bestimmte Cytoskelettelemente gezielt stabilisiert bzw. destabilisiert werden. Solche Zellgifte werden häufig im Bereich des Pflanzenschutzes eingesetzt. In der Forschung wurden solche Substanzen bereits vielfach in cytologischen Analysen zur Beteiligung von Zellskelettelementen an zellulären Prozessen angewandt. Der Einsatz solcher Zellgifte kann in nach Funktionsverlust, beziehungsweise Mislokalisierung, auszuwertenden Experimenten, Aufschluss über die Beteiligung bestimmter Zellskelettelemente an beobachteten Prozessen liefern. Dabei können durch den Einsatz sehr spezifischer, das Zellskelett beeinflussender Substanzen, Transportwege Schritt für Schritt aufgeschlüsselt werden. Für die Abhängigkeit vom Zellskelett der eingangs geschilderten Translokationsprozesse von Signaltransduktionsproteinen in Photorezeptorzellen zu untersuchen, eignet sich die Retinakultur als zugängliches Analysesystem, bei dem die Applikation von Substanzen, hier F-Aktin- und Mikrotubuli-destabilisierende Zellgifte, direkt in das Kulturmedium erfolgen kann. Die Retinae in Kultur bieten ferner den Vorteil, dass Photorezeptorzellen hier direkt von im Medium gelösten Stoffen erreicht werden können, ohne dass eine intraokulare, bzw. subretinale Injektion notwendig ist. Die Wirkungsweise der eingesetzten Cytoskelettgifte ist in der Einleitung ab Seite 21 eingehender beschrieben.

3.3.1 Wirkung von Cytochalasin D auf Aktinfilamente in Photorezeptorzellen

Vor der Analyse des Einflusses auf Translokationsprozesse sollte zunächst einmal die Wirksamkeit Cytoskelett-beeinflussender Pharmaka in Photorezeptorzellen überprüft werden. Es ist bekannt, dass einige Zellgifte, wie z.B. Cytochalasin D, die Polymerisation von Aktinfilamenten unterbinden (Casella *et al.*, 1981). In einer ersten Experimentreihe wurde die Substanz Cytochalasin D in einer Endkonzentration von 10 µM gelöst in 50% DMSO im

Kulturmedium der Retinakultur eingesetzt und diese eineinhalb Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurden weitere Retinae nur mit dem Lösungsmittel DMSO, in einer dem DMSO-Gehalt der Cytochalasinprobe entsprechenden Endkonzentration von 1% inkubiert. Die so behandelten Retinae wurden anschließend entsprechend dem Standardprotokoll fixiert und für die histochemische Analyse eingebettet und geschnitten (siehe Kapitel 2.7.1). Anschließend wurde eine fluoreszenzmikroskopische Analyse der Verteilung von Aktinfilamenten (F-Aktin) in behandelten und unbehandelten Retinae durchgeführt. Für die Detektion von F-Aktin in Schnittpräparaten, machte man sich eine weitere cytoskelettassoziiierende Substanz, Phalloidin zu nutze. Das Pilzgift Phalloidin hat die Eigenschaft in Zellen an speziell an polymerisiertes Aktin in Aktinfilamente zu binden. In der histochemischen Analyse wurde Farbstoff-gekoppeltes Phalloidin, hier mit dem rot fluoreszierenden Rhodamin, dazu verwendet, um filamentöses Aktin in Zellen sichtbar zu machen (Abb. 16 A-D). Ferner wurden von den mit Cytochalasin D behandelten Retinae, sowie den Kontrollproben auch Präparate für die immunhistochemische Analyse auf elektronenmikroskopischem Niveau hergestellt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 16 dargestellt.

Die Markierung durch Rhodamin-gekoppeltes Phalloidin in Abbildung 16 A zeigte ein Vorhandensein von Aktinfilamenten in der äußeren plexiformen Schicht, der *Membrana limitans externa*, sowie in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen. Diese Bereiche wurden bereits als typisch aktinreiche Strukturen in Photorezeptoren erkannt und beschrieben (Woodford & Blanks, 1989). Abbildung 16 C ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 16 A, hier wird die Rhodamin-Phalloidin-Färbung des F-Aktins an der *Membrana limitans externa* (*), sowie in den Photorezeptorinnensegmenten besonders deutlich. Bei den mit Cytochalasin D behandelten Retinae ist dagegen ein drastischer Abbau von Aktinfilamenten, vor allem im Innensegment der Photorezeptorzellen festzustellen (Abb. 16 B u. D). Dieser Abbau von Aktinfilamenten in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen wird auch auf elektronenmikroskopischem Niveau, durch eine weitaus geringere Dekoration mit Goldpartikeln in diesem Bereich deutlich (Abb. 16 F). F-Aktin an der *Membrana externa limitanz*, sowie in der äußeren plexiformen Schicht scheint gegenüber dem destabilisierenden Effekt von Cytochalasin D weniger empfindlich zu sein. Dies könnte zum einen an einer geringeren Dynamik beim Auf- und Abbau von F-Aktin in diesen Bereichen oder auch an einer geringeren Zugänglichkeit dieser Strukturen für Cytochalasin D liegen. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 16 E, F) wird zudem deutlich das es sich bei der *Membrana limitans externa* (*) nicht wirklich um eine Membran handelt, sondern vielmehr um eine Aneinanderreihung von Zell-Zell-Adhäsionsstellen mit hoher Stabilität

zwischen Photorezeptorzellen und Müller-Gliazellen, die sich im lichtmikroskopischen Bild als durchgängige Grenze darstellen.

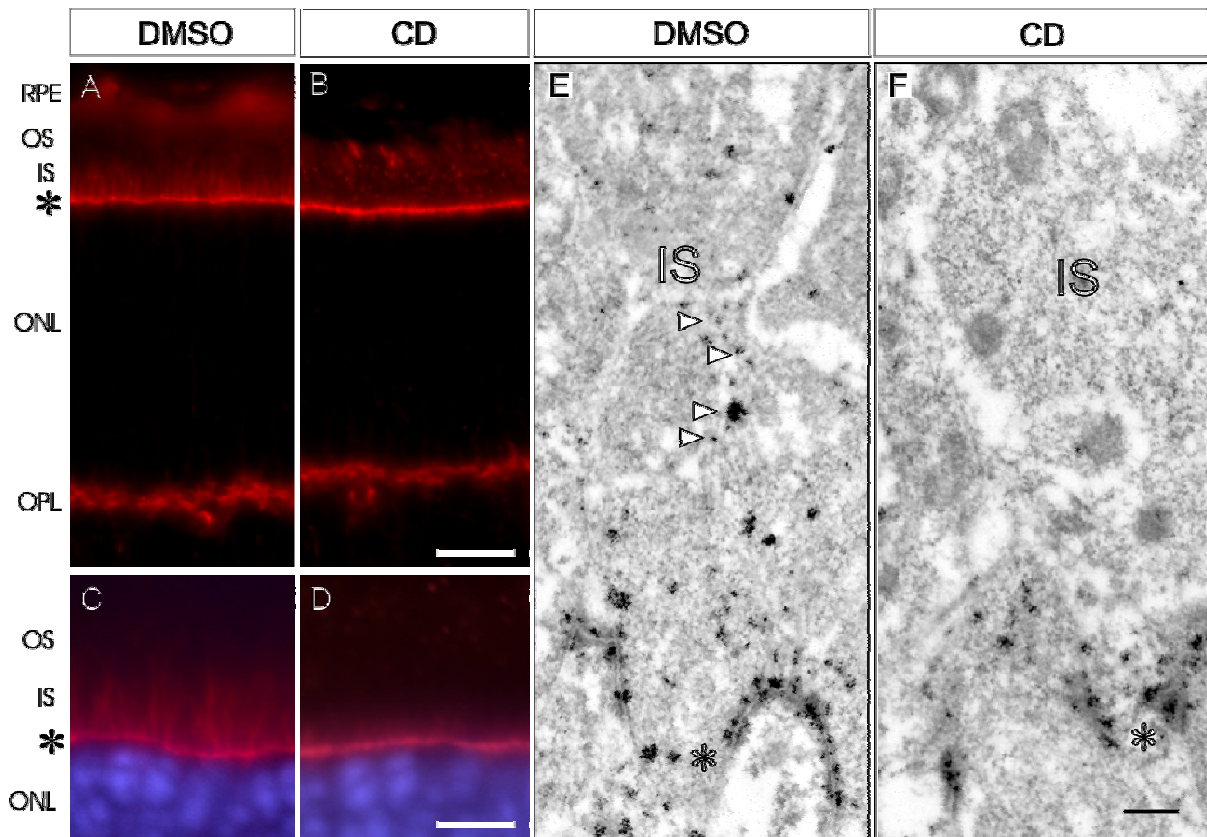


Abbildung 16: Destabilisation von Aktinfilamenten in Retinae von PN13 Mäusen nach Inkubation mit Cytochalasin D. **A:** Markierung von F-Aktin mittels Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin in der Retina. Es werden vor allem das retinale Pigmentepithel, das Innensegment der Photorezeptorzelle sowie die äußere plexiforme Schicht (OPL) markiert. [RPE = retinales Pigmentepithel, OS: Außensegment, IS: Innensegment, ONL: äußere Körnerschicht, OPL: äußere plexiforme Schicht]. **B:** Markierung von F-Aktin mittels Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin in der Retina nach Inkubation mit Cytochalasin D. Es werden vor allem das RPE, fragmentierte Filamente im Innensegment der Photorezeptorzelle, sowie die Synapsenregion markiert. **C:** Ausschnitt der Photorezeptorzellen bei stärkerer Vergrößerung, DAPI-Färbung (blau). Im Innensegment sind Aktinfilamente markiert. **(D)** Ausschnitt der Photorezeptorzellen bei stärkerer Vergrößerung, DAPI-Färbung (blau). Im Innensegment ist die Markierung von Filamenten im Vergleich zu C stark reduziert [* *Membrana externa limitans*]. **E:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ultra-dünn Schnittes durch Innensegmente von Photorezeptorzellen kultivierter Mausretina, behandelt mit DMSO. **F:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines ultra-dünn Schnittes durch Innensegmente von Photorezeptorzellen kultivierter Mausretina, behandelt mit Cytochalasin D (CD). Die Silber-verstärkte Immunogold-Markierung von F- oder G-Aktin ist erkennbar an den Zell-Zell-Kontaktstellen der *Membrana limitans externa* (OLM), siehe Stern, und in den Innensegmenten der DMSO-behandelten Retina (Pfeilspitzen in E). Im Gegensatz dazu zeigt die Cytochalasin D behandelte Retina zwar eine Markierung an der *Membrana externa limitans*, aber nur wenig Aktin-Markierung in den Innensegmenten (F). Maßbalken in B, 13,2 µm. Maßbalken in D, 7,5 µm. Maßbalken in F, 150 nm.

3.3.2 Einfluss von Cytochalasin D auf die lichtabhängigen Translokation von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen

Nach dem Nachweis des destabilisierenden Effektes von Cytochalasin D auf Aktinfilamente in Photorezeptorzellen (Abb. 16) sollte nun untersucht werden, ob sich in so behandelten Photorezeptorzellen ein qualitativer Unterschied in der lichtabhängigen Verteilung von Arrestin und Transducin ergäbe. Dazu wurden zunächst dunkeladaptierte Retinakulturen mit 10 μ M Cytochalasin D bzw. dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Retinae anschließend für weitere 30 Minuten hell adaptiert und die Verteilung von Arrestin und Transducin immunhistochemisch analysiert. Im Vergleich zur Innensegmentlokalisation von Arrestin in der Dunkelkontrolle (Abb. 17 A) ergab sich nach Helladaptation für DMSO und Cytochalasin D behandelte Retinakulturen eine Lokalisation von Arrestin in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen (Abb. 17 B u. C). Bei dunkeladaptierten Retinakulturen wurde Transducin in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen detektiert (Abb. 17 E). Nach Helladaptation jedoch, konnte Transducin in der DMSO- wie auch Cytochalasin D-behandelten Retinakultur in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen nachgewiesen werden (Abb. 17 F u. G). Die schematischen Darstellungen der Abbildung 17 D und H repräsentieren jeweils die Arrestin (D) und Transducin (H) Lokalisation in den Cytochalasin D-behandelten, lichtadaptierten Retinae. Zusammengefasst in den übereinandergelegten Abbildung 17 H bis J lässt sich erkennen, dass die Destabilisation der Aktinfilamente durch die Behandlung der Retinakultur Cytochalasin D, keinen Einfluss auf die mit der Helladaptation verbundenen Translokationen von Arrestin und Transducin hatte.

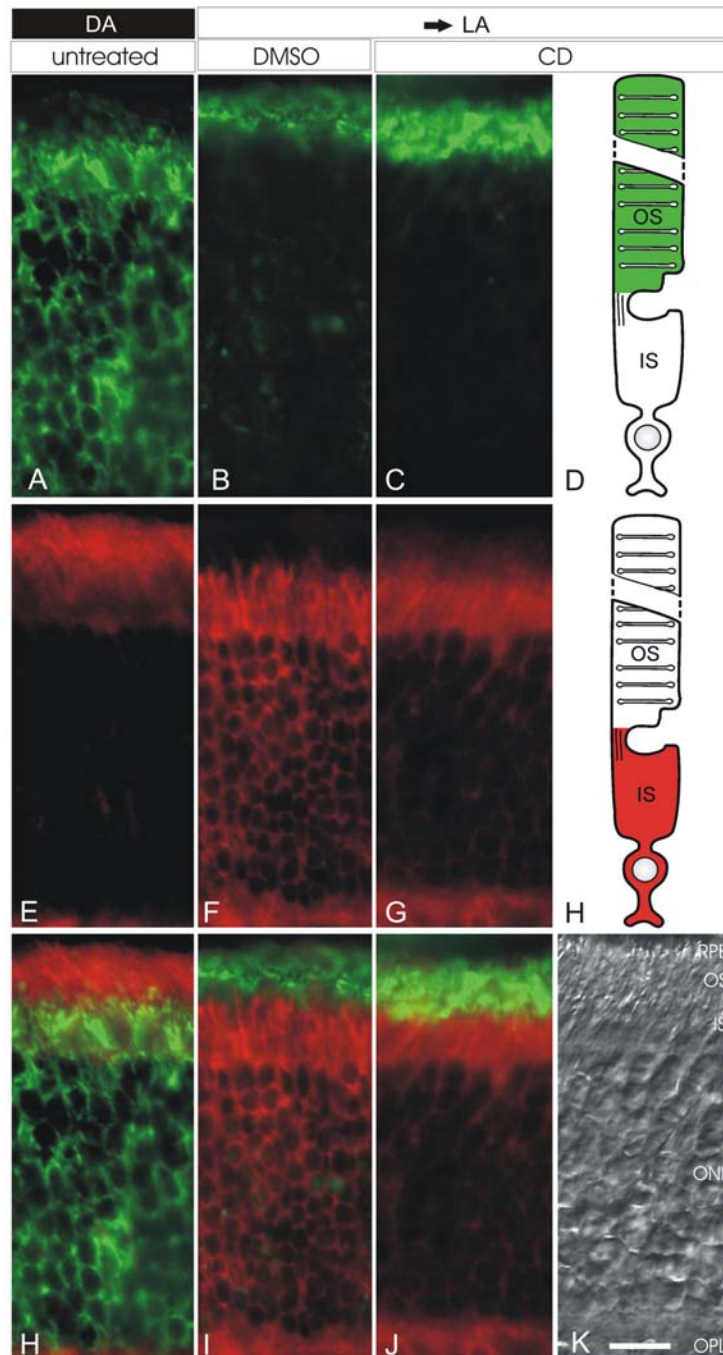


Abbildung 17: Lokalisation von Arrestin and Transducin in von dunkel nach hell adaptierter Retinakultur, behandelt zur Destabilisation von Aktinfilamenten. A-C: Immunhistochemische Lokalisation von Arrestin in longitudinalen Schnitten durch eine kultivierte dunkel adaptierte Mausretina (A), in von dunkel nach hell adaptierter Mausretina, behandelt mit DMSO (B) und in von dunkel nach hell adaptierter Mausretina, behandelt mit Cytochalasin D (C). D, H: Schematische Darstellung einer Photorezeptorzellen mit Arrestin Lokalisation (grün) aus C (D) und Transducin Lokalisation (rot) aus G (H). E-G: Immunhistochemische Lokalisation von Transducin in longitudinalen Schnitten durch eine kultivierte dunkel adaptierte Mausretina (E), in von dunkel nach hell adaptierter Mausretina, behandelt mit DMSO (F) und in von dunkel nach hell adaptierter Mausretina, behandelt mit Cytochalasin D (G). H: Übereinanderlagerung von A und E. I: Übereinanderlagerung von B und F. J: Übereinanderlagerung von C und G. K: Differentielle Interferenzkontrast (DIC) Aufnahme des Schnittes in C, G und J. Die Destabilisation von Aktinfilamenten durch Cytochalasin D kultivierten Retinae beeinträchtigte nicht die Translokation von Arrestin und Transducin zwischen Außen- und Innensegment während der Helladaptation. Retinales Pigmentepithel = RPE, Außensegment = OS, Innensegment = IS, äußere Körnerschicht = ONL, äußere plexiforme Schicht = OPL. Dunkel nach hell Adaptation (->LA), dunkel Adaptation (DA), Cytochalasin D-Behandlung (CD), Maßbalken 13,2 µm.

Nach der Analyse des Effektes destabilisierter Aktinfilamente auf die mit der Helladaptation verbundenen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen, sollte nun auch die Dunkeladaptation betrachtet werden. Dazu wurden Retinakulturen im helladaptierten Zustand mit Cytochalasin D behandelt und danach ins Dunkle überführt. Die Lokalisation von Arrestin und Transducin in behandelten und unbehandelten kultivierten Retinae wurde auch hier immunhistochemisch bestimmt. In unbehandelten helladaptierten Retinae ist Arrestin im Außensegment und Transducin im Innensegment der Photorezeptorzellen lokalisiert (Abb. 18 A u. E).

In der dunkeladaptierten Retinakultur, die mit DMSO behandelt wurde, translocierten Arrestin und Transducin unbeeinflusst, dem unbehandelten Zustand (Abb. 14) gleichend, in das Innen- bzw. Außensegment der Photorezeptorzellen (Abb. 18 B u. F). Ein dramatischer Effekt auf beide Translokationsprozesse ist allerdings in der Cytochalasin D-behandelten Retinakultur zu erkennen, in der beide molekularen Bewegungen nicht mehr stattfanden (Abb. 18 C u. G). Dieser der natürlichen Situation nicht entsprechende Zustand ist in den schematischen Darstellungen (Abb. 18 D u. H), sowie in den übereinander gelegten (Abb. 18 I bis K) verdeutlicht. Die Behandlung der Retinakultur mit Cytochalasin D, d.h. die Destabilisation von Aktinfilamenten in Photorezeptorzellen stört die mit der Dunkeladaptation einhergehenden Translokationen von Arrestin und Transducin.

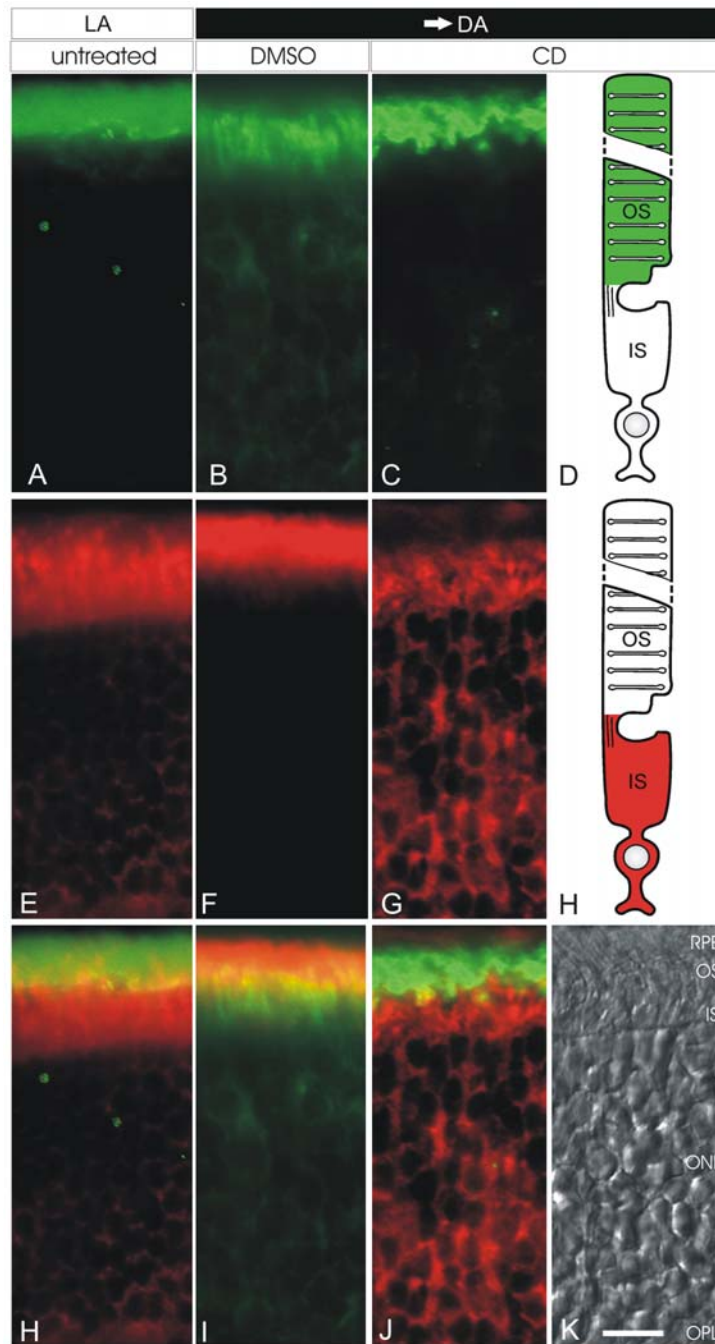


Abbildung 18: Lokalisation von Arrestin and Transducin in von hell nach dunkel adaptierter Retinakultur, behandelt zur Destabilisation von Aktinfilamenten. A-C: Immunhistochemische Lokalisation von Arrestin in longitudinalen Schnitten durch eine kultivierte hell adaptierte Mausretina (A), in von hell nach dunkel adaptierter Mausretina, behandelt mit DMSO (B) und in von hell nach dunkel adaptierter Mausretina, behandelt mit Cytochalasin D (C). D, H: Schematische Darstellung einer Photorezeptorzelle mit Arrestin Lokalisation (grün) aus C (D) und Transducin Lokalisation (rot) aus G (H). E-G: Immunhistochemische Lokalisation von Transducin in longitudinalen Schnitten durch eine kultivierte hell adaptierte Mausretina (E), in von hell nach dunkel adaptierter Mausretina, behandelt mit DMSO (F) und in von hell nach dunkel adaptierter Mausretina, behandelt mit Cytochalasin D (G). H: Übereinanderlagerung von A und E. I: Übereinanderlagerung von B und F. J: Übereinanderlagerung von C und G. K: Differentielle Interferenzkontrast (DIC) Aufnahme des Schnittes in C, G und J. Die Destabilisation von Aktinfilamenten durch Cytochalasin D in kultivierten Retinae beeinträchtigte die Translokation von Arrestin and Transducin zwischen Außen- und Innensegment während der Dunkeladaptation. Retinales Pigmentepithel = RPE, Außensegment = OS, Innensegment = IS, äußere Körnerschicht = ONL, äußere plexiforme Schicht = OPL. hell Adaptation (LA), hell nach dunkel Adaptation (>DA), Cytochalasin D-Behandlung (CD), Maßbalken 13,2 µm.

3.3.3 Beteiligung von Myosin II und VIIa an den lichtabhängigen Translokationen von Transducin und Arrestin in Photorezeptorzellen

Aufgrund der experimentellen Hinweise zur Notwendigkeit von Aktinfilamenten für die mit der Dunkeladaptation verbundenen Translokationen von Arrestin und Transducin sollte nun weitergehend analysiert werden, ob Myosine, die aktinassozierten Motoren eine aktive Rolle beim Transport von Signaltransduktionsproteinen in der Photorezeptorzelle spielen. Zur Untersuchung dessen bediente man sich zweierlei üblicher Herangehensweisen. Zum einen die Beeinträchtigung von Myosinfunktionen durch das Einbringen von Inhibitoren in die zu untersuchenden Zellen, zum anderen durch das „Ausschalten“ von Myosinfunktionen auf genetischer Ebene bzw. auf Ebene der Proteinexpression. In den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde der Inhibitor Blebbistatin gegen unkonventionelles Myosin II eingesetzt, sowie ein Myosin VIIa defizienter Mausstamm untersucht.

3.3.3.1 Einfluss von Blebbistatin, einem Myosin II Inhibitor, auf die Translokation von Transducin während der Dunkeladaptation

Myosin II wird in den Photorezeptorzellen der Retina exprimiert und ist dort im Verbindungscilium lokalisiert worden (Williams & Roberts, 1992). Myosin II könnte hier an Transportvorgängen in Verbindung mit den im Verbindungscilium gefundenen Aktinfilamenten (Chaitin *et al.*, 1984) beteiligt sein. Um eine eventuelle Beteiligung von Myosin II an der lichtabhängigen Translokation von Transducin im Dunkeln zu untersuchen, wurde der Inhibitor Blebbistatin in das Nährmedium der Retinakultur appliziert. Blebbistatin ist als ein spezifischer Hemmstoff für unkonventionelles Myosin II beschrieben worden (Straight *et al.*, 2003). Für die nachfolgend beschriebenen Experimente, wurde die Retinakultur im Hellen mit dem pharmakologischen Stoff inkubiert und anschließend dunkeladaptiert. Zur Analyse der Transducinverteilung nach Dunkeladaptation der Photorezeptorzellen wurden Längsschnitte der Retinakultur angefertigt und diese mit Antikörpern gegen Transducin (A4) inkubiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz ausgewertet.

In der helladaptierten unbehandelten Retina konnte Transducin überwiegend im Innensegment, in der äußeren Körnerschicht und in der äußeren plexiformen Schicht lokalisiert werden (Abb. 19 B). In geringerem Maße konnte Transducin in dieser helladaptierten unbehandelten Kontrolle auch im Außensegment detektiert werden. Der

Inhibitor Blebbistatin wurde in der die Zellmembran durchdringenden Substanz DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 100 μM appliziert. Um einen Einfluss von DMSO auf die Lokalisation des Transducins in der dunkeladaptierenden Photorezeptorzelle auszuschließen, wurde zur Kontrolle eine Retinakultur nur mit DMSO inkubiert. In der dunkeladaptierten, mit 1% DMSO behandelten Retinakultur war Transducin insbesondere im Außensegment der Photorezeptoren lokalisiert, sowie in geringerem Maße im Bereich des Innensegments und der äußeren Körnerschicht detektiert werden (Abb. 19 C).

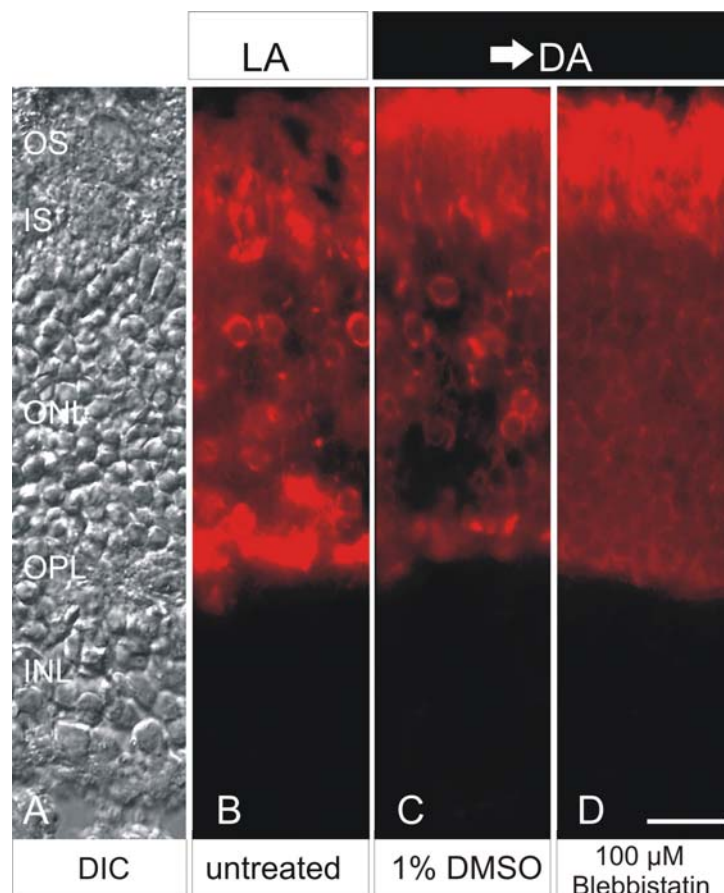


Abbildung 19: Einfluss von Blebbistatin, einem Myosin II-Inhibitor, auf die lichtabhängige Lokalisation von Transducin. (A) Differenzielle Interferenzkontrast Aufnahme eines Schnittes der helladaptierten unbehandelten Retinakultur. (B-D) Immunhistochemische Lokalisation von Transducin in Photorezeptorzellen der Retinakultur. (B) In der helladaptierten unbehandelten Retinakultur markiert der Antikörper gegen Transducin in den Innensegmenten, sowie der äußeren plexiformen Schicht. Eine weniger intensive Transducin Markierung ergibt sich zudem im Außensegment. In der dunkeladaptierten Retinakultur, zuvor mit DMSO oder Blebbistatin behandelt (C, D) detektiert der Transducin Antikörper hauptsächlich im Außensegment. Hinzu kommt eine weniger intensive Detektion des Transducins in den restlichen Bereichen der Photorezeptorzelle. Die Blebbistatinbehandlung der Retinakultur hat sich nicht auf die Translokation von Transducin in das Außensegment der Photorezeptorzellen ausgewirkt. OS = Außensegment, IS = Innensegment, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, Maßbalken: 10 μm .

DMSO hat demnach keinen Einfluß auf den Endzustand der mit der Dunkeladaptation assoziierten Translokation des Transducins vom Innensegment in das Außensegment (Abb. 19

B u. C). Auch in der mit 100 μ M Blebbistatin in DMSO behandelten Retinakultur konnte keine Beeinträchtigung der beschriebenen Bewegung von Transducin ins Außensegment der Photorezeptorzelle festgestellt werden (Abb. 8 D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das molekulare Motorprotein Myosin II in Photorezeptorzellen nicht für die Translokation von Transducin in dunkeladaptierenden Photorezeptoren notwendig ist.

3.3.3.2 Beteiligung von Myosin VIIa an den lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin

Ein weiteres aktinassoziertes Motorprotein, das in der Retina exprimiert wird, ist das Genprodukt des Usher 1 B Gens: Myosin VIIa. Das Motorprotein Myosin VIIa gehört zu den unkonventionellen Myosinen und konnte in den Verbindungscilien, sowie an den Synapsen der Photorezeptoren, als auch im retinalen Pigmentepithel nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 1997). Es konnte ferner gezeigt werden, dass Myosin VIIa am ciliären Transport des Opsins in der Photorezeptorzelle beteiligt ist (Liu *et al.*, 1999; Wolfrum & Schmitt, 2000). In einer durch Spontanmutation im Usher 1 B-Gen entstandenen Mauslinie, der *shaker-1* Maus konnte ein Defekt im Transport der Melanosomen in den retinalen Pigmentepithelzellen festgestellt werden (Liu *et al.*, 1998) Im folgenden Experiment sollte eine mögliche Rolle von Myosin VIIa bei den lichtabhängigen Translokationen von visuellem Arrestin und Transducin in den Photorezeptorzellen untersucht werden. Hierzu wurden dunkel- sowie helladaptierte wildtypische und *shaker-1* Retinae bezüglich der Arrestin- und Transducinlokalisierung analysiert. Auch hierfür wurden Schnittpräparate der Retinae angefertigt und mittels indirekter Immunfluoreszenz ausgewertet. Für die Lokalisation von Transducin wurden in diesen Experimenten zwei unterschiedliche Antikörper verwendet. In helladaptierten Retinae wurde die Lokalisation von Transducin mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen Transducin (A4) durchgeführt. Für die Lokalisation von Transducin in den dunkeladaptierten Retinae wurde ein polyklonaler Antikörper (T20) eingesetzt, der die β -Untereinheit von G-Proteinen, in diesem Fall auch von Transducin, detektiert. In der helladaptierten wildtypischen Mausretina konnte Transducin vornehmlich im Außensegment, aber auch im Innensegment und in der äußeren Körnerschicht lokalisiert werden (Abb. 20 A). Wobei Transducin in den Außensegmenten jedoch nur in relativ geringem Maße detektiert werden konnte. Im Vergleich der helladaptierten *shaker-1* Retina zur wildtypischen, war kein qualitativer Unterschied in der Verteilung von Transducin festzustellen (Abb. 20 A u. B).

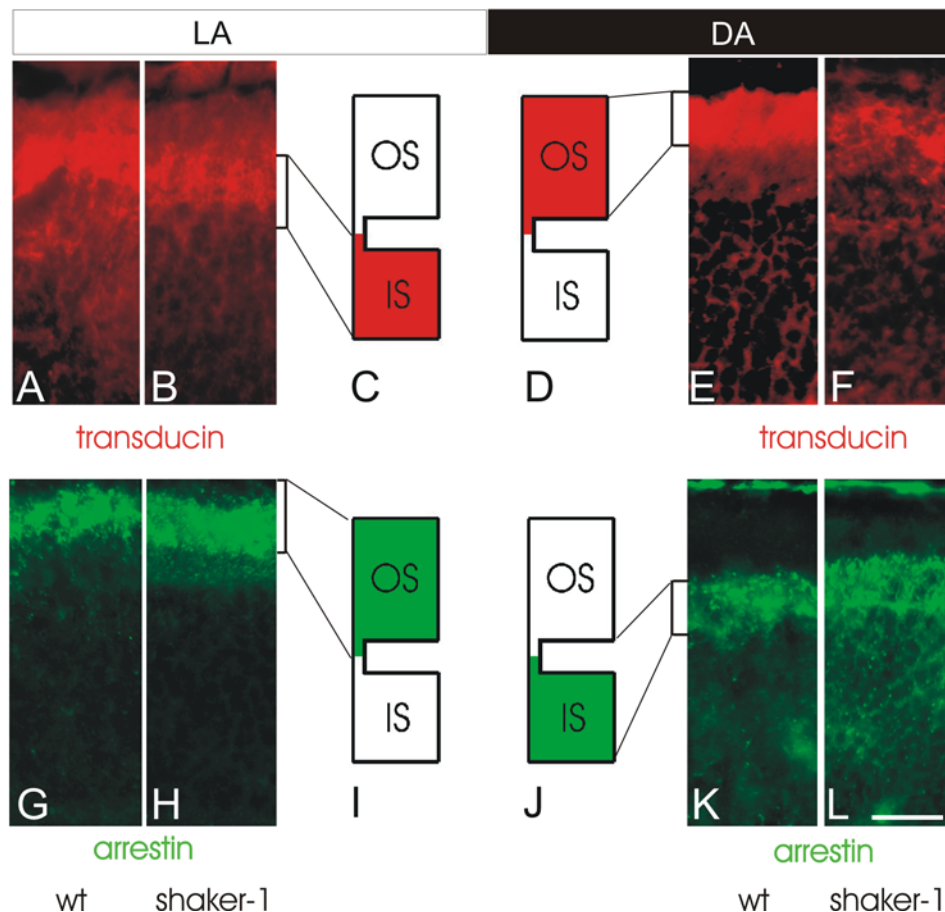


Abbildung 20: Die lichtabhängigen Translokationen von Transducin und Arrestin in *shaker-1* und Wildtypmäusen. (A, B, E, F, G, H, K, L) Immunhistochemische Nachweise von Transducin (rot) und Arrestin (grün) in Längsschnitten unfixierter wildtypischer Retinae verglichen mit *shaker-1* Retinae. Gegenüberstellung von Transducin Lokalisation in hell- und dunkeladaptierten Retinae (A, E) zu *shaker-1* Retinae in dem jeweiligen Adaptionszustand (B, F). Der Nachweis der Transducin Lokalisation erfolgte mit zwei unterschiedlichen Antikörpern. Die helladaptierten Retinae wurden mit dem monoklonalen A4 und die dunkeladaptierten mit dem polyklonalen T20 Antikörpern inkubiert. Vergleich der Lokalisation von Arrestin in hell- und dunkeladaptierten Retinae (G, K) zu *shaker-1* Retinae (H, L) in dem jeweiligen Lichtadaptationszustand. Es konnte kein Unterschied der lichtabhängigen Lokalisation von Arrestin und Transducin zwischen wildtypischen Retinae und *shaker-1* Retinae ermittelt werden. Schematische Darstellungen der lichtabhängigen Translokation von Transducin (C, D) und Arrestin (I, J) OS = Außensegment, IS = Innensegment, Maßbalken: 10 μ m.

In der dunkeladaptierten wildtypischen Retina markierte der Antikörper gegen Transducin besonders im Außensegment der Photorezeptorzelle (Abb. 20 E). Zusätzlich ergab sich in diesem Längsschnitt eine Anti-Transducin Markierung in der äußeren Körnerschicht und in der äußeren plexiformen Schicht. In der dunkeladaptierten *shaker-1* Retina entsprach, trotz schlechterer Erhaltung des Präparats, die qualitative Verteilung des Transducin in den Kompartimenten der Photorezeptorzellen derjenigen der wildtypischen Retina (Abb. 20 E und F). Arrestin dagegen, war in der helladaptierten wildtypischen, wie *shaker-1* Retina im Außensegment (Abb. 20 G und H), sowie deutlich schwächer im Innensegment lokalisiert. In der dunkeladaptierten wildtypischen wie *shaker-1* Retina konnte Arrestin im Innensegment

detektiert werden (Abb. 20 K und L), wie auch in der äußeren Körnerschicht sowie in der äußeren plexiformen Schicht. Es konnte im Falle der Arrestinlokalisierung kein Unterschied zwischen der dunkeladaptierten wildtypischen und der *Shaker-1* Retina gefunden werden. Die zum Wildtyp unveränderte Lokalisation von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen der *shaker-1* Maus lässt darauf schließen, dass Myosin VIIa an den lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin nicht beteiligt ist.

3.3.4 Wirkung von Thiabendazol auf Mikrotubuli in Photorezeptorzellen

Die Mikrotubuli sind neben den Aktinfilamenten die prominentesten und wichtigsten Zellskelettelemente im Dienste von intrazellulären Transportvorgängen. Mikrotubuli sind dabei vor allem an Transporten zwischen zentralen Strukturen und Peripherie der Zelle beteiligt. Mikrotubuli entspringen in „nicht-ciliären“ Zellen am Centrosom und in ciliären, damit auch der Photorezeptorzelle, am Basalkörper. Von diesem Nukleationspunkt erstrecken sie sich durch einen dynamischen Auf- und Abbau in die Peripherie der Zelle. Dabei entstehen durch Anlagerung von $\alpha\beta$ -Tubulinbausteinen die röhrenförmigen Mikrotubuli (siehe auch in der Einleitung ab Seite 16). Durch den Einbau posttranslational veränderten Tubulins können hierbei Subtypen von Mikrotubuli aufgebaut werden, die sich funktionell und in der Stabilität unterscheiden. Hierbei sind beispielsweise acetylierte, detyrosinierte oder glutamylierte Tubuline bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass solche Subtypen von Mikrotubuli unterschiedlich empfindlich für destabilisierende Substanzen, wie beispielsweise Thiabendazol sind (Wallin *et al.*, 1988; Albertini, 1990; Martin *et al.*, 1997). Thiabendazol ist ein Benzimidazolderivat, das zum Beispiel in der Parasitenbekämpfung eingesetzt wird, da es speziell das Cytoskelett, sprich die vornehmlich acetylierten Mikrotubuli von Helminthen angreift. In der zellbiologischen Forschung wird Thiabendazol als übliches Agens zur Untersuchung von zellulären Prozessen, die von acetylierten Mikrotubuli abhängig sind, eingesetzt (Pisano *et al.*, 2000; Peterson *et al.*, 2005). In der Zelle sind die meisten Mikrotubuli sehr dynamisch und zeigen einen rapiden Auf- und Abbau. Thiabendazol blockiert dabei die *de novo*-Formation von Mikrotubuli durch die Bindung an β -Tubulin, was den Zusammenbau von α/β -Tubulin-Heterodimeren und somit die Bildung von Tubulin-Protofilamenten verhindert (Robinson *et al.*, 2004).

Auch vor der Analyse des Einflusses destabilisierter Mikrotubuli in den Photorezeptorzellen auf die Translokation von Arrestin und Transducin, sollte zunächst die Wirksamkeit des Destabilisationsagens, hier Thiabendazol, in Photorezeptorzellen der Retinakultur überprüft werden. Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen, wurden

behandelte und unbehandelte Retinae immunhistochemisch mit Hilfe konfokaler, als auch Elektronenmikroskopie analysiert. Unter Zuhilfenahme eines Antikörpers gegen α -Tubulin zeigt die Immunhistochemische Analyse in Abbildung 21 A eine bereits gezeigte (Woodford & Blanks, 1989) Verteilung von Tubulin in nahezu allen Kompartimenten der Photorezeptorzelle. Besonders auffällig sind dabei die filamentösen Strukturen in den Innen- und auch Außensegmenten der Photorezeptorzellen, die besonders in der vergrößerten Abbildung 21 C augenscheinlich werden. Diese vor allem in den Innensegmenten und im Bereich des Verbindungsciliums auftretenden Mikrotubuli-Markierungen setzen sich in feineren Ausläufern in die Außensegmente der Photorezeptorzellen fort (Abb. 21 C). Dass es sich hierbei um Mikrotubuli handelt, konnte durch die elektronenmikroskopische Analyse unterstützt werden, in der Reihen von Immunogoldmarkierungen im Innensegment der Photorezeptorzelle sichtbar wurden (Abb. 21 E). Des Weiteren wurden auch die axonemalen Mikrotubuli des Verbindungsciliums mit dem Antikörper gegen α -Tubulin detektiert (Abb. 21 F). Nach der Behandlung der Retinakultur mit 1,5 mM Thiabendazol (TB) in DMSO, konnten die Mikrotubuli in den Innen- sowie Außensegmenten der Photorezeptorzellen nicht mehr detektiert werden (Abb. 21 B, D u. F). Die immunelektronenmikroskopische Analyse unterstützt zudem die Abwesenheit von Mikrotubuli nach Thiabendazolbehandlung im Innensegment der Photorezeptorzelle (Abb. 21 E-F).

Im Gegensatz dazu, verbleiben Goldpartikel dekorierte axonemale Mikrotubuli im Verbindungscilium, die folglich nicht durch Thiabendazol (TB) destabilisiert werden konnten (Abb. 21 F). Diese ciliären Mikrotubuli konnten ebenfalls in der immunhistochemisch analysierten, Thiabendazol-behandelten Retinakultur detektiert werden. Der Antikörper gegen α -Tubulin markierte hier weiterhin Strukturen im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen (Abb. 21 B und D). Es ist bekannt, dass diese axonemalen Mikrotubuli posttranslational modifiziertes Tubulin enthalten, das zu deren Stabilität beiträgt (Pagh-Roehl *et al.*, 1991). Ferner sind die Mikrotubuli des Ciliums durch Proteinkomplexe mit der ciliären Membran verbunden, die die Angreifbarkeit dieser Mikrotubuli weiter vermindern. Dies lässt darauf schließen, dass in der Thiabendazol-behandelten Retina Mikrotubuli im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen detektiert werden konnten, die nicht durch Thiabendazol destabilisiert werden konnten. Weitere Experimente sollten nun die Untersuchung der Translokationen von Arrestin und Transducin in den Thiabendazol-behandelten Retinakulturen zum Ziel haben, um festzustellen ob und wenn ja, welche Mikrotubuli an diesen molekularen Bewegungen beteiligt sind.

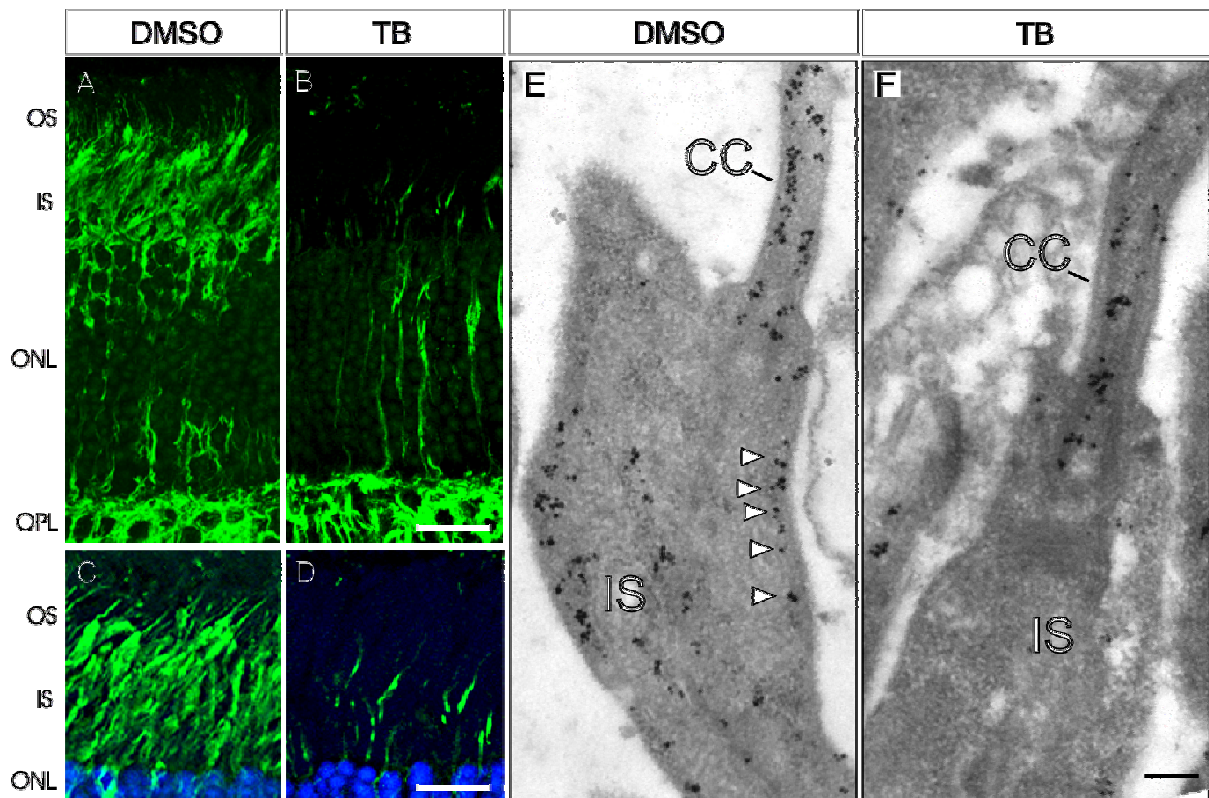


Abbildung 21: Subzelluläre Lokalisation von Tubulin in Photorezeptorzellen kultivierter Retinae. **A:** Immunhistochemische Lokalisation von α -Tubulin in mit DMSO behandelten kultivierten Retinae. **B:** Immunhistochemische Lokalisation von α -Tubulin in mit Thiabendazol (TB) behandelten kultivierten Retinae. Die Tubulinmarkierung ist in nahezu allen Kompartimenten der Photorezeptorzellen sichtbar, von der Synapsenregion, um die Zellkerne, im Innensegment, sowie auslaufend ins Außensegment. **C:** Markierung von α -Tubulin (grün) im apikalen Bereich der Photorezeptorzellen von Kontrollretinae bei höherer Vergrößerung, doppelt markiert mit DAPI (blau). **D:** Markierung von α -Tubulin (grün) im apikalen Bereich der Photorezeptorzellen mit Thiabendazol behandelter Retinae bei höherer Vergrößerung, doppelt markiert mit DAPI (blau). Die Markierung von Tubulin ist aufgrund des depolymerisierenden Effekts von Thiabendazol in den Innen- und Außensegmenten stark reduziert, bleibt aber im Verbindungscilium erhalten. **E:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch das Innensegment (IS) einer Photorezeptorzelle in mit DMSO behandelte kultivierte Retina. **F:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnittes durch das Innensegment (IS) einer Photorezeptorzelle in mit Thiabendazol (TB) behandelte kultivierte Retina. Die silberverstärkte Immunogoldmarkierung von α -Tubulin ist in Reihen sichtbar im Innensegment (s. Pfeil) und im Verbindungscilium einer Photorezeptorzellen in kultivierter Kontrollretina. Im Gegensatz dazu zeigt die silberverstärkte Immunogoldmarkierung von α -Tubulin in Thiabendazol behandelte Retina Goldgranulaedekoration nur im Verbindungscilium. Außensegment = OS, Verbindungscilium = CC, Innensegment = IS, äußere Körnerschicht = ONL, äußere plexiforme Schicht = OPL. Maßbalken in B entspricht 13,2 μm . Maßbalken in D entspricht 7,5 μm . Maßbalken in F entspricht 200 nm.

3.3.5 Notwendigkeit von Mikrotubuli für die lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen.

Da in den vorangestellten Experimenten die Wirksamkeit von Thiabendazol auf Mikrotubuli, d.h. deren Depolymerisation in Photorezeptorzellen der organotypischen Retinakultur gezeigt werden konnte, stand dieser Versuchsansatz nun zur Analyse des Einflusses von Thiabendazol auf die molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin zur Verfügung. Mit Hilfe der Immunhistochemie sollte auch hier die Verteilung der genannten Proteine in Photorezeptorzellen hell- bzw. dunkeladaptierter Retinakulturen unter Thiabendazoleinfluss bestimmt werden.

Im nachfolgend beschriebenen Experiment wurde zunächst die Auswirkung der Thiabendazolbehandlung auf die mit der Helladaptation von Photorezeptorzellen der Retinakultur assoziierten Translokationen von Arrestin und Transducin untersucht. In der dunkeladaptierten unbehandelten Retinakultur ist Transducin im Außensegment der Photorezeptorzellen lokalisiert (Abb. 22 E). Nach der Behandlung mit DMSO, als auch mit Thiabendazol, konnte Transducin in helladaptierten Photorezeptorzellen im Innensegment lokalisiert werden (Abb. 22 G). Es konnte hierbei also keine Beeinträchtigung der Transducintranslokation im Hellen nach Destabilisation von Mikrotubuli in Photorezeptorzellen der Retinakultur festgestellt werden (Abb. 22 G u. H). Im gleichen Experiment wurde ebenfalls die lichtabhängige Bewegung von Arrestin unter Behandlung der Retinakultur mit Thiabendazol analysiert. In dunkeladaptierten Photorezeptorzellen der Retinakultur konnte Arrestin im Innensegment und in DMSO-behandelten helladaptierten Photorezeptoren im Außensegment detektiert werden (Abb. 22 A u. B). Bei der Lokalisation von Arrestin in der Thiabendazol-behandelten helladaptierten Retinakultur fällt allerdings auf, dass Arrestin weder das Innensegment gänzlich verlassen, noch das Außensegment komplett „gefüllt“ hat (Abb. 22 C u. D). Dieser Zustand unter Thiabendazolbehandlung entspricht weder der vollständig hell- noch dunkeladaptierten Situation. Die Lokalisation von Arrestin, unter den genannten Bedingungen, im apikalen Bereich des Innen- und basalen Bereich des Außensegments, wird besonders im Vergleich mit der daneben dargestellten Durchlichtaufnahme des Retinaausschnittes deutlich (Abb. 22 K u. L). Die Translokation von Arrestin vom Innensegment in das Außensegment der Photorezeptorzellen scheint hier teilweise gestört oder sehr stark verlangsamt zu sein.

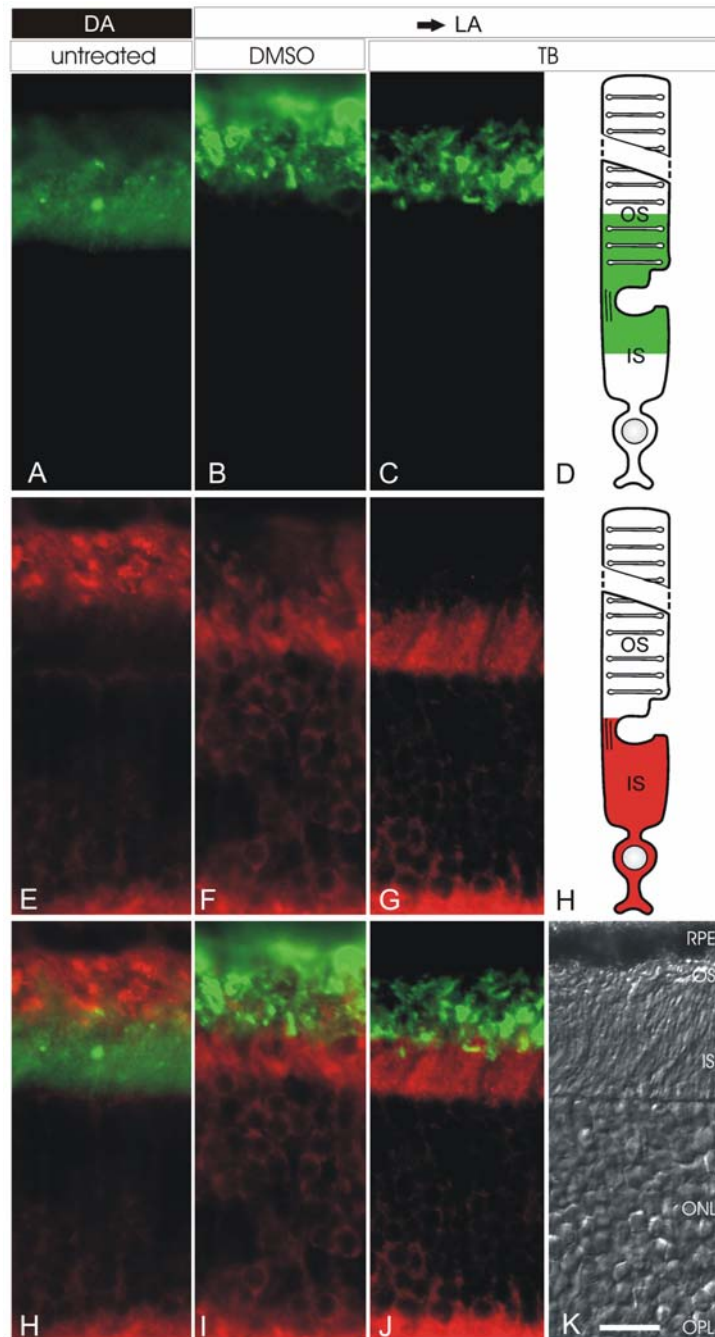


Abbildung 22: Lokalisation von Arrestin and Transducin in von dunkel nach hell adaptierter Retinakultur, behandelt mit Thiabendazol zur Destabilisation von Mikrotubuli. **A-C:** Immunhistochemische Lokalisation von Arrestin in longitudinalen Schnitten durch eine kultivierte dunkel adaptierte Mausretina (A), in von dunkel nach hell adaptierter Mausretina, behandelt mit DMSO (B) und in von dunkel nach hell adaptierter Mausretina, behandelt mit Thiabendazol (C). **D, H:** Schematische Darstellung einer Photorezeptorzellen mit Arrestin Lokalisation (grün) aus C (D) und Transducin Lokalisation (rot) aus G (H). **E-G:** Immunhistochemische Lokalisation von Transducin in longitudinalen Schnitten durch eine kultivierte dunkel adaptierte Mausretina (E), in von dunkel nach hell adaptierter Mausretina, behandelt mit DMSO (F) und in von dunkel nach hell adaptierter Mausretina, behandelt mit Thiabendazol (G). **H:** Übereinanderlagerung von A and E. **I:** Übereinanderlagerung von B and F. **J:** Übereinanderlagerung von C and G. **K:** Differentielle Interferenzkontrast (DIC) Aufnahme des Schnittes in C, G and J. Die Destabilisation von Mikrotubuli durch Thiabendazol kultivierten Retinae beeinträchtigte nicht die Translokation von Transducin zwischen Außen- und Innensegment während der Helladaptation. Jedoch scheint die Translokation von Arrestin ins Außensegment während der Helladaptation teilweise gestört oder verlangsamt (C, D u. J). Retinales Pigmentepithel = RPE, Außensegment = OS, Innensegment = IS, äußere Körnerschicht = ONL, äußere plexiforme Schicht = OPL. Dunkel nach hell Adaptation (->LA), dunkel Adaptation (DA), Cytochalasin D-Behandlung (CD), Maßbalken 13,2 µm.

Nach der Studie des Einflusses von Thiabendazol auf die mit der Helladaptation assoziierten Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen, sollte nun auch dessen Einfluss auf die Dunkeladaptation analysiert werden. Hierzu wurden kultivierte Retinae im helladaptierten Zustand mit Thiabendazol zur Destabilisation von Mikrotubuli in den Photorezeptorzellen behandelt und anschließend dunkeladaptiert. Danach wurde die Lokalisation von Arrestin und Transducin in behandelten und unbehandelten kultivierten Retinae mit Hilfe der Immunhistochemie ermittelt. In unbehandelten helladaptierten Retinae war Arrestin im Außensegment und Transducin im Innensegment der Photorezeptorzellen lokalisiert (Abb. 23 A u. E). Nach der Behandlung mit DMSO translocierten Arrestin und Transducin unbeeinflusst, wie in Experimenten ohne Behandlung (Abb. 14) in das Innen- bzw. Außensegment der Photorezeptorzellen (Abb. 23 B u. F). Bei der Analyse der Thiabendazol inkubierten kultivierten Retinae zeigte sich allerdings, wie auch schon nach der Cytochalsin D-Behandlung (Abb. 18) ein dramatischer Effekt in der dunkeladaptierten Photorezeptorzellen: Die Translokationen von Arrestin als auch Transducin sind in der Thiabendazol behandelten Retinakultur während der Dunkeladaptation unterbunden worden (Abb. 23 C u. G). Dieses Ausbleiben der, unter Kontrollbedingungen (DMSO) stattfindenden, molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin ist in den schematischen (Abb. 23 D u. H), sowie in den fusionierten Darstellungen (Abb. 23 I bis K) verdeutlicht. Die Behandlung der Retinakultur mit Thiabendazol, d.h. der Abbau von Mikrotubuli besonders in den Innensegmenten von Photorezeptorzellen führte zu einer Unterbindung der mit der Dunkeladaptation verbundenen Translokationen von Arrestin und Transducin.

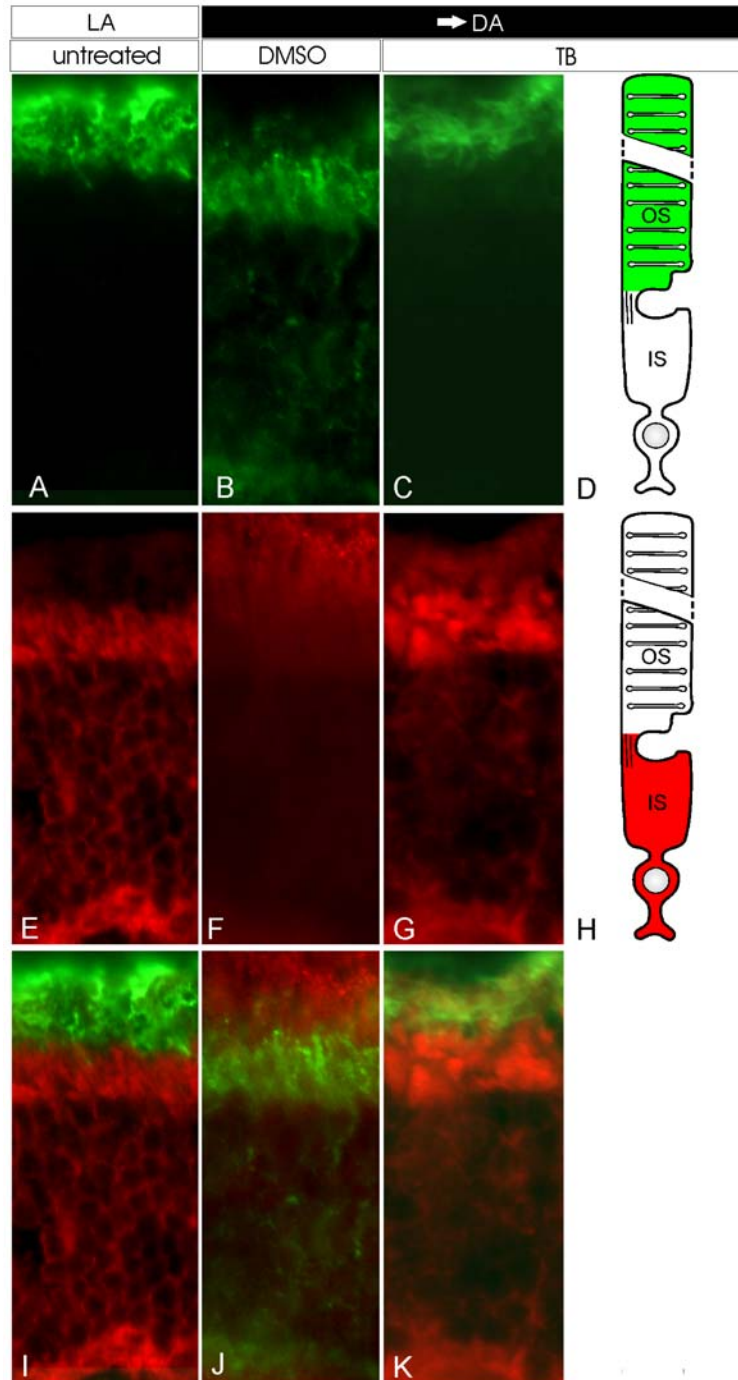


Abbildung 23: Lokalisation von Arrestin and Transducin in von hell nach dunkel adaptierter Retinakultur, behandelt mit Thiabendazol zur Destabilisation von Mikrotubuli. **A-C:** Immunhistochemische Lokalisation von Arrestin in longitudinalen Schnitten durch eine kultivierte hell adaptierte Mausretina (A), in von hell nach dunkel adaptierter Mausretina, behandelt mit DMSO (B) und in von hell nach dunkel adaptierter Mausretina, behandelt mit Thiabendazol (C). **D, H:** Schematische Darstellung einer Photorezeptorzellen mit Arrestin Lokalisation (grün) aus C (D) und Transducin Lokalisation (rot) aus G (H). **E-G:** Immunhistochemische Lokalisation von Transducin in longitudinalen Schnitten durch eine kultivierte hell adaptierte Mausretina (E), in von hell nach dunkel adaptierter Mausretina, behandelt mit DMSO (F) und in von hell nach dunkel adaptierter Mausretina, behandelt mit Thiabendazol (G). **H:** Übereinanderlagerung von A und E. **I:** Übereinanderlagerung von B und F. **J:** Übereinanderlagerung von C and G. **K:** Differentielle Interferenzkontrast (DIC) Aufnahme des Schnittes in C, G and J. Die Destabilisation von Mikrotubuli durch Thiabendazol kultivierten Retinae beeinträchtigte die Translokation von Arrestin and Transducin zwischen Außen- und Innensegment während der Dunkeladaptation. Retinales Pigmentepithel = RPE, Außensegment = OS, Innensegment = IS, äußere Körnerschicht = ONL, äußere plexiforme Schicht = OPL. hell Adaptation (LA), hell nach dunkel Adaptation (->DA), Cytochalasin D-Behandlung (CD), Maßbalken 13,2 µm.

3.4 Transfektion der Retinakultur

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen fremden genetischen Materials in eukaryontische Zellen. Bei Geweben wird dieser Vorgang oft auch als Transduktion bezeichnet. Dazu gibt es verschiedene methodische Ansätze, wie z.B. Lipofektion, Elektroporation oder virale Transduktion. In der Regel sind neuronale, ausdifferenzierte Zellen, wie die Photorezeptoren der adulten Retina nur schwierig zu transfizieren, das heißt sie nehmen externes genetisches Material nicht ohne weiteres auf, exprimieren es nicht, oder exprimieren nur in geringem Maße. In den im Folgenden vorgestellten Experimenten wurde die zur Transfektion verwendete DNA mittels Elektroporation bzw. ballistischer Transfektion in die Zellen der Retinakultur eingebracht. Dabei bediente man sich häufig Vektoren, die Reportersequenzen tragen, in diesem Falle GFP (Green Fluorescent Protein), um transfizierte Zellen identifizieren und im Preparat ansprechen zu können. Dabei ist es sogar möglich GFP-Expression *in vivo* zu verfolgen. Ferner kann mit Hilfe des GFPs die Effizienz von Transfektionen quantifiziert und bei geeigneter Auflösung eines mikroskopischen Bildes bereits eine subzelluläre Lokalisation festgestellt werden. Um transfizierten Zellen in der Retinakultur identifizieren zu können, wurde die Fluoreszenz des eGFPs bzw. von eGFP-Fusionsprotein unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Diese experimentellen Ansätze zur Transfizierbarkeit von Zellen der Retina sollen hier ein Ausblick auf zukünftige Vorhaben des Gentransfers unter der Verwendung der organotypischen Retinakultur sein. Dies kann zum Beispiel durch die Anwendung der RNAi-Technik zur Herabregulation, oder dem Ausschalten von Genexpression genutzt werden, um die Funktion von Proteinen in Zellen der Retina untersuchen zu können. Ferner kann das gezielte Einbringen von Genkonstrukten in kultivierte Retinae aus Tiermodellen retinaler Erkrankungen zur Erprobung gentherapeutisch wirksamer Sequenzen und Maßnahmen dienen.

3.4.1 Transfektion von Zellen der Retinakultur mittels Elektroporation

In nachfolgend beschriebenen Experimenten, wurde die zur Transfektion verwendete DNA mittels Elektroporation in die Zellen der organotypischen Retinakultur eingebracht. Bei der Elektroporation wird durch Spannungspulse ein elektrisches Feld erzeugt, das Poren in der Membran der Zielzellen hervorruft, durch die die Fremd-DNA eingeschleust werden kann. Die Elektroporation von Retinae *ex vivo* wurde hier mit Materialien und nach Anleitung der Arbeit (Matsuda & Cepko, 2004) durchgeführt. Eine Skizze des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 9 auf Seite 41 dargestellt. In den experimentellen Ansätzen bisheriger Arbeiten

wurden entweder Retinae von embryonalen Mausstadien transfiziert und kultiviert, oder es wurde die Methode der *in vivo* Elektroporation an Augen lebender Tiere eingesetzt (Matsuda & Cepko, 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte die Transfektion durch Elektroporation auch an adulten explantierten Retinae erprobt werden. Dazu wurden die Retinae von 14 Tage alten Wildtypmäusen präpariert und in der Elektroporationskammer so ausgerichtet, dass die Stromrichtung eine Poration von Zellen auf der Seite des retinalen Pigmentepithels bevorzugt ist. Hierbei wurde ein eGFP-Konstrukt in Zellen der Retinakultur einzubringen versucht und anschließend dessen Expression überprüft. In Abbildung 24 ist die Aufsicht auf eine kultivierte Retina unter Auflicht (Abb. 24 B), sowie Fluoreszenzlicht (Abb. 24 C) dargestellt. Unter der Anregung des Fluoreszenzlichtes waren einige eGFP-exprimierende Zellen grün fluoreszierend im ganzheitlichen Präparat sichtbar. Dieses Experiment zeigte somit, dass es möglich ist, Zellen der adulten explantierten Mausretina in der organotypischen Kultur zu transfizieren. In der Aufsicht auf das Explantat, ist allerdings nicht ersichtlich, welche Zelltypen der Retina (z.B. Photorezeptoren oder Bipolarzellen) die DNA aufgenommen und eGFP exprimiert haben.

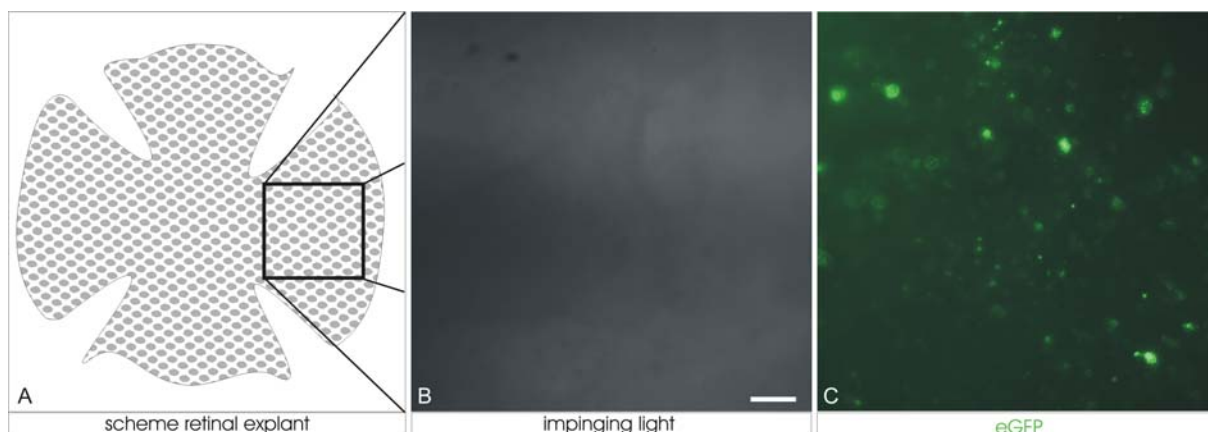


Abbildung 24: Kultivierte Retina nach Elektroporation mit eGFP-Konstrukt. A: Aufsicht auf Gesamtpräparat unter Auflicht. B: eGFP-Fluoreszenz in Zellen der kultivierten Retina unter Fluoreszenzlicht, Maßbalken: 150 μm .

Nach dem erfolgreichen Test zur Transfizierbarkeit der Retina wurden nun auch cDNAs kloniert, die Proteine in Fusion mit GFP codieren, um deren Expression zellulär und subzellulär in der Retinakultur zu untersuchen. Dabei wurden z.B. GFP-Konstrukte mit Centrin, einem in der Arbeitsgruppe Wolfrum intensiv untersuchten centrosomalen Proteins, für *in vivo*-Interaktionsstudien hergestellt. Dabei konnten durch Elektroporation verschiedene Zelltypen erfolgreich transfiziert werden. Zur Identifizierung von eGFP-exprimierenden Zellen wurden „Whole-mount“-Präparate von PN 11 (Abb. 25) und PN 8 (Abb. 26)

eingebettet und Gefrierschnitte angefertigt, um die zelluläre bis subzelluläre Expression beziehungsweise Lokalisation des eGFPs bestimmen zu können. In der mikroskopischen Analyse von Schnitten elektroporierter Retinae des Alters PN 11 in Abbildung 25 B ist zu erkennen, dass Zellen des retinalen Pigmentepithels das verwendete eGFP-Konstrukt exprimiert haben. Da es sich bei den in diesem Experiment transfizierten Zellen um retinale Pigmentzellen handelte, konnte aufgrund ihrer Lage in der Retina, sowie durch das Vorhandensein von Melanosomen bestimmt werden (Abb. 25 A).

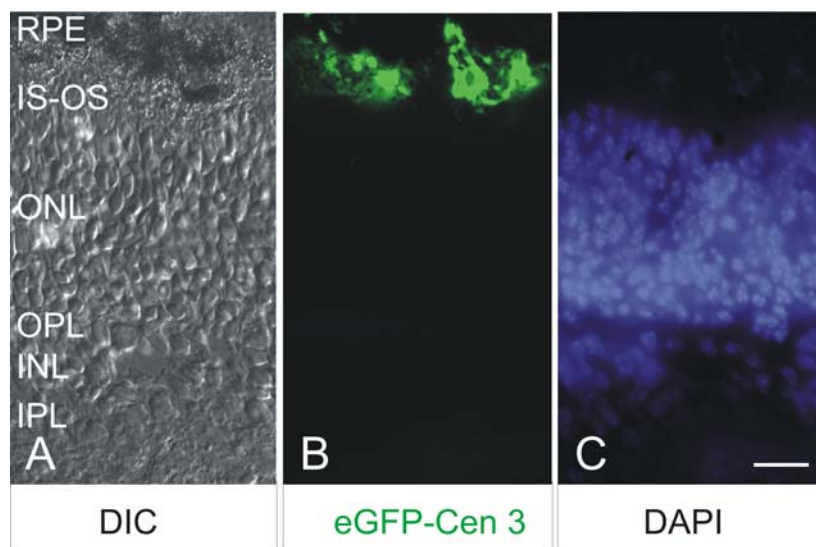


Abbildung 25: Längsschnitt durch eine Retinakultur (PN 11), transfiziert durch Elektroporation mit einem eGFP-Centrin 3-Konstrukt (A-C) Längsschnitte durch die transfizierte Retinakultur. **A:** Differenzieller Interferenzkontrast **B:** Grüne Fluoreszenz des eGFP-Centrin3 Fusionsproteins in der Schicht des retinalen Pigmentepithels. **C:** DAPI-Markierung der Zellkerne. In der Schicht des Pigmentepithels sind die Zellkerne durch das Pigment bedeckt, daher kommt es in dieser Schicht zu keiner DAPI Färbung. RPE = Retinales Pigmentepithel, OS = Außensegment, IS = Innensegment, ONL = Äußere Körnerschicht, OPL = Äußere plexiforme Schicht, INL = Innere Körnerschicht, GC = Ganglienzellschicht, Maßbalken: 10 µm.

In der Analyse der Schnitte einer Retinakultur des Stadiums PN 8, konnte eine Zelle als transfiziert identifiziert werden, deren Zellkern in der äußeren Körnerschicht (Abb. 26 A, B) lokalisiert werden konnte. Zur Kontrolle, dass es sich bei dem exprimierten Fusionsproteins um GFP-Centrin 1 handelt, wurde der Schnitt mit dem Antikörper pMmC1, einem gegen Centrin 1 generierten Antikörper, inkubiert. Aus der Übereinanderlagerung des GFP-Fluoreszenzbildes mit der sekundären Immunfluoreszenz gegen Centrin 1, ergab sich eine Deckungsgleichheit (Abb. 26 B bis D). Durch diese Detektion des exprimierten Fusionsproteins, durch den Reporteranteil, sowie einer immunhistochemischen Identifikation konnte diese Zelle als eindeutig mit dem verwendeten Konstrukt transfizierte Zelle identifiziert werden. Aufgrund der Zellmorphologie und Lage kann es sich bei dieser Zelle

um eine Photorezeptor- oder auch Müllerzelle handeln, deren Ausläufer sich in die innere Körnerschicht, sowie die äußere Körnerschicht erstrecken.

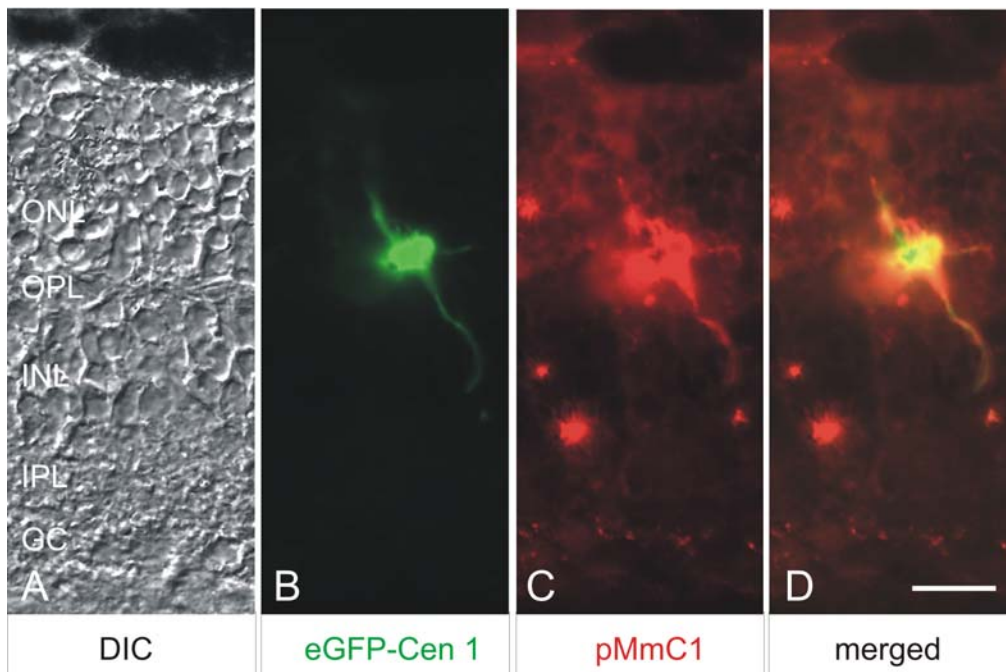


Abbildung 26: Längsschnitt durch eine Retinakultur (PN 8), transfiziert durch Elektroporation mit eGFP-Centrin 1-Konstrukt (A-D) Längsschnitte durch die transfizierte Retinakultur. **A:** Differenzieller Interferenzkontrast. **B:** Grüne Fluoreszenz des eGFP-Centrin1 Fusionsproteins in der äußeren Körnerschicht. **C:** Immunhistochemische Lokalisation von Centrin 1 in einer transfizierten Retinakultur. Der Antikörper pMmC1 markiert mehrere Zellen in der äußeren plexiformen Schicht, sowie die Centrosomen der Ganglienzellschicht. **D:** Übereinanderlagerung von B und C. In der Übereinanderlagerung der Abbildungsteile B und C zeigt sich, dass die Fluoreszenz des Fusionsproteins sowie die Markierung des Antikörpers in der äußeren Körnerschicht weitestgehend kongruent sind. OS = Außensegment, IS = Innensegment, ONL = Äußere Körnerschicht, OPL = Äußere plexiforme Schicht, INL = Innere Körnerschicht, GC = Ganglienzellschicht Maßbalken: 10 μ m.

3.4.2 Ballistische Transfektion der Retinakultur

Zum effizienten Einbringen von Genkonstrukten in Zielzellen konnte ebenfalls eine Methode zur ballistischen Transfektion etabliert werden, die kommerziell als Helios Gene Gun™ von der Firma Biorad erhältlich ist. Mithilfe dieser Gene Gun™ können mit DNA gekoppelte Goldpartikel in Zellen geschossen werden (Tang *et al.*, 1992). Damit kann die Hürde des Aufnehmens von fremder DNA überwunden und diese direkt in den Kern der Zielzellen appliziert werden. Im Gegensatz zu Methoden wie der Elektroporation können hiermit weniger Zellen, diese allerdings effizient transfiziert werden (Burkholder *et al.*, 1993). In bisherigen Studien wurde die Gene Gun™ in Zusammenhang mit der Retina nur als Methode zum Einbringen von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet (Pignatelli & Strettoi, 2004; Roizenblatt *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Gene Gun™ erstmal zur

Transfektion einer organotypischen Retinakultur eingesetzt. Hierzu wurden Retinae präpariert und wie bereits beschrieben, mit dem retinalen Pigmentepithel der Kultivierungsmembran anliegend aufgebracht, das heißt die DNA-gekoppelten Goldpartikel wurden von der vitrealen Seite der Retina mit der Gene Gun™ eingebracht. Eine Skizze des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 10 auf Seite 43 dargestellt. In der Aufsicht auf der kultivierte Retina unter Fluoreszenzlicht ist zu erkennen, dass eine Zelle mit verästelten dendritischen Ausläufern das eGFP-Cen1-Koinstrukt aufgenommen und exprimiert hatte (Abb. 27 A).

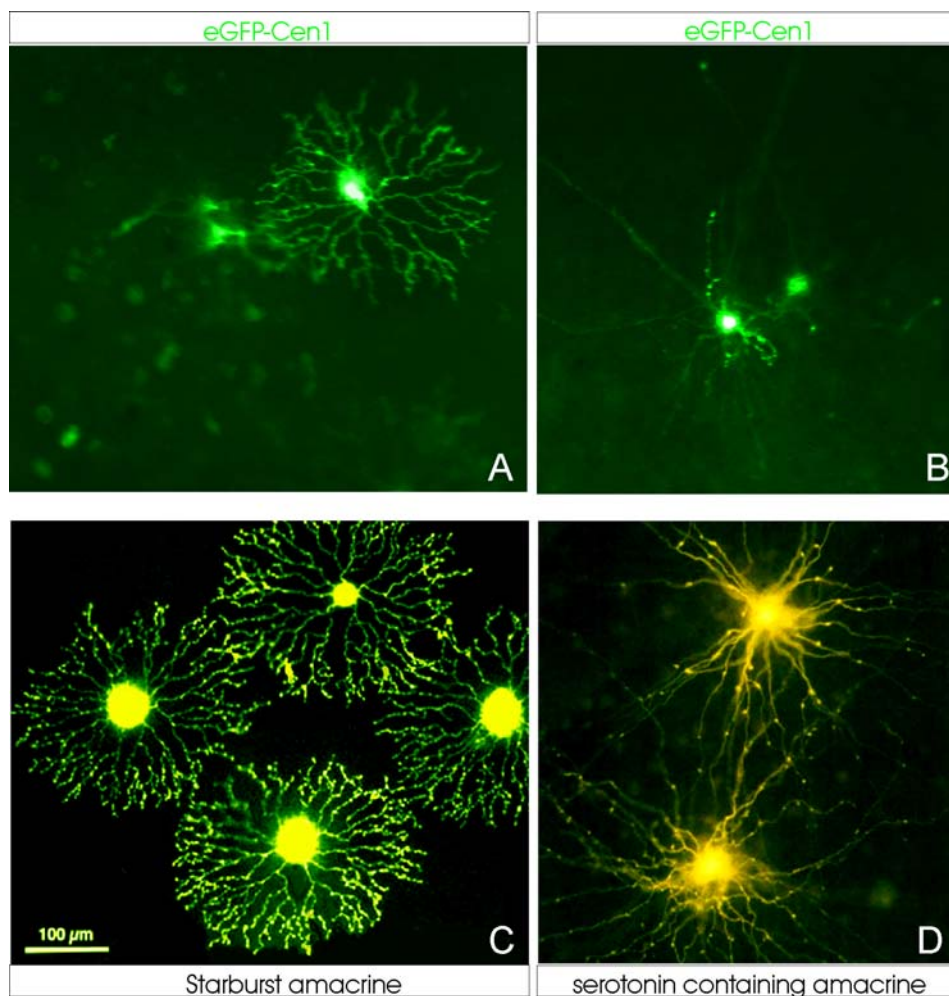


Abbildung 27: eGFP-Centrin 1-exprimierende Zellen der Retinakultur nach ballistischer Transfektion, verglichen mit *in vivo* farbinjizierten Zellen. A, B: Fluoreszenzmikroskopische Aufsicht auf eGFP-Cen1-exprimierende Zellen im Gesamtpräparat. **C:** Mikroskopische Aufnahme von Luciferase-injizierten Amakrinzellen des Subtyps „Starburst“ (Vaney, 1984). **D:** Mikroskopische Aufnahme von Luciferase-injizierten Amakrinzellen des serotonin-akkumulierenden Subtyps (Vaney, 1986), Maßbalken: 100 µm.

Durch den Vergleich mit publizierten Daten zur Morphologie von Amakrinzellen (Abb. 27 A und C), lässt sich darauf schließen, dass es sich hierbei um eine Amakrinzelle vom Subtyp „Starburst“ handelt, die auch als Acetylcholin sezernierender Typ bekannt ist (Vaney, 1984). In Abbildung 27 B ist ein weiterer Amakrinzelltyp mit charakteristischer Morphologie in der

ballistisch transfizierten Retina markiert. Auch hier lässt sich durch den Vergleich mit Luziferase-injizierten Zellen früherer Studien erschließen (Abb. 27 B und D), dass es sich demnach um eine Amakrinzelle de serotonin-beehaltenden Typs handelt (Vaney, 1986). Nach der Beurteilung von ballistisch transfizierten Zellen in „Whole mount“-Präparaten der organotypischen Retinakultur, wurden anschließend auch Gefrierschnitte der Retinae angefertigt und diese immunhistochemisch analysiert. Dabei wurden Zellen der adulten Retinakulturen (PN17), die mit Hilfe der Gene Gun™ transfiziert wurden, in Längsschnitten mit Antikörpern gegen zellspezifische Moleküle inkubiert und mittels der indirekten Immunfluoreszenz ausgewertet. Transfizierte Zellen waren an Hand der Expression des grün fluoreszierenden eGFP-Centrin 1-Fusionsproteins detektierbar (Abb. 28 B). Zur Identifikation des transfizierten Zelltyps, wurde ein Antikörper gegen GFAP, Markerprotein für Gliazellen, eingesetzt (Abb. 28 C). Die als transfizierte, durch die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins detektierbare Zelle, befindet sich in der Ganglienzellschicht (Abb. 28 A und B).

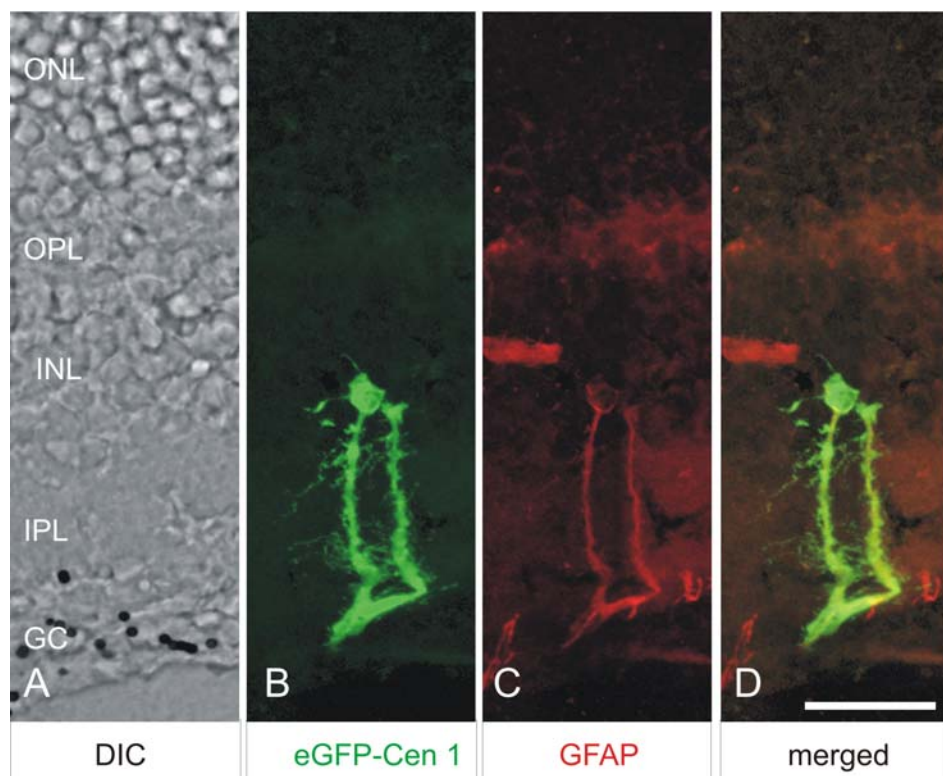


Abbildung 28: Längsschnitt durch eine Retinakultur in der Zellen mittels der Gene Gun™ transfiziert wurden. **A:** Differenzieller Interferenzkontrast der Retinakultur. **B:** Grüne Fluoreszenz des eGFP-Centrin 1-Fusionsproteins in der inneren plexiformen Schicht. **C:** Immunhistochemische Lokalisation von GFAP. **D:** Übereinanderlagerung der Teilabbildungen B und C. In der Übereinanderlagerung der Teilabbildungen B und C ergibt sich eine Kolokalisation des eGFP-Centrin 1-Fusionsproteins und dem Markerprotein GFAP. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der transfizierten Zelle um ein Astrocyte handelt. ONL = Äußere Körnerschicht, OPL = Äußere plexiforme Schicht, INL = Innere Körnerschicht, IPL = Innere plexiforme Schicht, GC = Ganglienzellschicht, Maßbalken: 10 µm.

Die in Abbildung 28 mit eGFP-Centrin1-markierte Zelle, konnte durch den zellspezifischen Marker Anti-GFAP, als eine transfizierte Gliazelle, genauer eine Astrocyte, identifiziert werden. In der Übereinanderlagerung der Fluoreszenzkanäle zeigte sich eine Kolokalisation mit dem Markerprotein GFAP und der Fluoreszenz des transfizierten GFP-Fusionsproteins (Abb. 28 D). Hierzu wurde der Schnitt am Laser Scanning Mikroskop (LSM) ausgewertet. Durch die Möglichkeit der Übereinanderlagerung der einzelnen Ebenen die durch am LSM aufgenommen wurden (konfokal), konnte die transfizierte Zelle vollständig räumlich rekonstruiert werden (Abb. 28 B bis D).

In den Experimenten zur ballistischen Transfektion von Retinakulturen, zeigte sich eine zeitlich frühere Expression von markierten Konstrukten im Vergleich zur Einbringung derselben durch Elektroporation. Eine Expression des GFP-Konstruktes konnte hier bereits nach zwei im Vergleich zu vier bis fünf Tagen nach Elektroporation in Zellen der Retinakultur detektiert werden. Außerdem konnten mit Hilfe der ballistischen Transfektion im Vergleich zur elektrischen, weitere Zelltypen in der inneren Retina erreicht werden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Analysesystem für Wirbeltierphotorezeptorzellen geschaffen werden, das es erlaubt, ausdifferenzierte Photorezeptorzellen außerhalb des Organismus zu studieren zu können. Dazu wurde eine organotypische Gewebekultur adulter Mausretinae etabliert und validiert, um sowohl zellbiologische Analysen an differenzierten Photorezeptorzellen zu ermöglichen, als auch eine Grundlage für Gentransfers in Zellen der organotypischen Gewebekultur zur Untersuchung zellspezifischer Proteinfunktionen zu schaffen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, vor allem zu lichtabhängigen Proteintranslokationen in Photorezeptorzellen sollen im Folgenden diskutiert werden. Ferner soll in einem Ausblick, die Anwendung und Eignung der organotypischen Retinakultur zur Identifikation von Proteinfunktionen in Photorezeptorzellen besprochen werden.

4.1 Die organotypische Kultur adulter Retinae als vitales ex vivo-Analysesystem ausdifferenzierter Photorezeptorzellen

Die Kultivierung von Zellen findet in der Zell- und Entwicklungsbiologie, der Toxikologie, Pharmakologie sowie vielen anderen Forschungsbereichen eine breite Anwendung und leistet einen erheblichen Beitrag zum Verständnis zellulärer Prozesse. Dabei bietet sich die Kultivierung von Zellen besonders aufgrund ihrer direkten Erreichbarkeit an. Außerdem können bei einer Kultivierung verschiedene äußerer Parameter (wie Temperatur, Nährmedienzusammensetzung usw.) konstant gehalten, aber auch zu experimentellen Zwecken manipuliert werden. Zu untersuchende Substanzen können während der Kultivierung, ohne großen Aufwand zu den, oder in die Zielzellen appliziert und die Effekte meist direkt, teilweise sogar noch in den lebenden Zellen, analysiert werden. Mit Hilfe dieser Technik können Zelltypen untersucht werden, die im intakten Organismus nur schwer zugänglich sind, wie beispielsweise Nieren- oder Ovarienzellen. Darüber hinaus leistet die Kultivierung von Zellen einen Beitrag zum Ersatz, beziehungsweise in der Reduktion von Tierversuchen. Dabei lassen sich ausdifferenzierte Zellen, zum Beispiel aus Tumorgewebe ohne großen Aufwand und für lange Zeit kultivieren. Allerdings können bei weitem nicht alle Zelltypen auf diese Weise in Kultur studiert werden. Neuronale Zellen beispielsweise sind vergleichsweise schwierig zu kultivieren, sie benötigen zum Überleben meist den Kontakt zu ihren Nachbarzellen. So war die Untersuchung von Photorezeptorzellen in Kultur bislang nur sehr eingeschränkt möglich. Die hochgradig polaren und spezialisierten Photorezeptoren

verlieren in der Primärkultur schnell ihre funktionell essentielle Kompartimentierung und dienen deshalb in Kulturen oft nur als Modell zu Degenerationsprozessen (Fintz *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Methode zur Kultivierung von Photorezeptorzellen etabliert werden, in der diese ihre Kompartimentierung *ex vivo* behalten. Vorangegangene Experimente zeigten, dass es für den Erhalt ausdifferenzierten Photorezeptoren notwendig ist, diese in ihrer zelluläre Umgebung zu belassen (Leveillard *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die gesamte neuronale Retina, zusammen mit dem retinalen Pigmentepithel kokultiviert. Die durch diese experimentelle Strategie gewonnenen Daten zeigen eindrucksvoll, dass diese Kokultivierung einer Primärkultur deutlich überlegen ist, da die Funktionalität von Photorezeptorzellen im Explantat erhalten bleibt.

Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode, stellt eine Weiterentwicklung bisheriger Techniken zur Kultivierung der Retina da. Ihren Anfang nahmen Bestrebungen zur Kultivierung der Wirbeltierretina in den 20iger Jahren des letzten Jahrhunderts, als erstmals die Kultivierung der Retina aus Vögeln als Gewebsexplantat beschrieben wurde (Strangeways & Fell, 1926). In späteren Arbeiten konnten auch Kulturen der Retina aus Mäusen angelegt und gezeigt werden, dass die neonatal entnommene Retina sich nur unvollständig *ex vivo* entwickelt (Caffé *et al.*, 1989; Germer *et al.*, 1997). In solchen, früh nach der Geburt entnommenen Retinae entwickeln sich die Photorezeptorzellen in der Kultur nicht zu ihrer vollständig kompartimentierten Form mit ausgeprägten, aus Disks aufgebauten, Außensegmenten. Es werden in diesen Kulturen zwar Innensegmente und die Verbindungscilien der Photorezeptorzellen ausgebildet, allerdings kommt es nicht zur Entwicklung von ausdifferenzierten Außensegmenten, die für die Funktion der Photorezeptorzelle in der Phototransduktion essentiell sind. Zum Studium von Molekülen, auch und gerade derer, die im Dienste der visuellen Signaltransduktion stehen, ist die Kompartimentierung der Photorezeptorzelle Voraussetzung. Zur Lokalisation dieser Moleküle in den Kompartimenten der Photorezeptorzelle, beziehungsweise um deren Austausch zwischen Innensegment und Außensegment untersuchen zu können, müssen auch vollständige Außensegmente vorhanden sein. Zur Bewahrung solcher entwickelten Außensegmente, ist es daher notwendig Retinae mit bereits ausdifferenzierten Photorezeptorzellen aus älteren Tieren für die Kultivierung zu entnehmen. Nach bisherigen experimentellen Ansätzen, war es jedoch lediglich für wenige Stunden möglich adulte Retinae mit differenzierten Photorezeptorzellen zu kultivieren (Ogilvie, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kultivierungsmethode etabliert, die unter schonender Explantationstechnik,

sowie durch Optimierung der Kulturbedingungen, eine Erhaltung der adulten Retina gewährleistet. Hierdurch konnten Retinae von Mäusen, die im Alter von 12 bis 18 Tagen nach Geburt entnommen wurden, erstmals für mehrere Tage in Kultur gehalten werden (Reidel *et al.*, 2006). Die funktionelle Erhaltung dieser Kulturen der adulten Retina konnte durch Apoptostest, sowie lichtabhängige molekulare Bewegungen gezeigt werden. Zur Integrität der Explantate beitragen konnte ferner eine schonende Präparation der Retinae unter Erhaltung des „überlebenswichtigen“ Kontaktes der Photorezeptorzellen zum retinalen Pigmentepithel. Die Funktionalität des retinalen Pigmentepithels in der Regeneration von Retinal ist eine unumgängliche Voraussetzung für die Lichtsensitivität der Photorezeptorzellen. Diese auch in der Retinakultur erhaltene Lichtsensitivität der Photorezeptorzellen, soll im nächsten Abschnitt ausführlicher beschrieben werden. Möglich wurden solche Experimente durch die Installation einer Beleuchtungsapparatur im Inkubator mit tageslichtähnlichem Lichtspektrum und zyklischer Belichtung. So konnte während der Kultivierung, der für die Physiologie der Retina wichtige natürliche Lichtwechsel, wie er auch in der Tierhaltung angewendet wird, simuliert werden. Zur Anfertigung der Explantate der Retina, wurde diese flächig mit dem retinalen Pigmentepithel auf der Kultivierungsmembran ausgebreitet. Durch diesen Arbeitsschritt konnte eine gute Haftung des Explantats auf der Membran und eine geringe mechanische Beanspruchung der fragilen Photorezeptorzellen gewährleistet werden. Bei den so präparierten Retinaexplantaten fungiert die für das Medium durchlässige Membran, als eine Art künstliche *Sclera* und *Choroidea* zugleich, die schützt und ständigen Kontakt mit dem Nährmedium gewährleistet. Im Gegensatz zur „Eyecup“-Methode, bei der die Retina tatsächlich mit *Sclera* und *Choroidea* im Augenbecher kultiviert wird, kann bei der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methode das Nährmedium die Retina sowohl von der scleralen, wie auch vitrealen Seite versorgen. Dem gegenüber ist bei der „Eyecup“-Kultur die Retina nur von der vitrealen Seite, also vornehmlich nur die Ganglienzellen, erreichbar. Vor allem aber für Experimente, in denen Photorezeptorzellen untersucht werden und für direkt Manipulationen (beispielsweise bei Gentransfers) erreichbar sein müssen, bietet sich die in dieser Arbeit beschriebene Retinakultur an.

Die wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, optimiert kultivierten adulten Retinae, lieferten zumindest im lichtmikroskopischen Bild einen nicht vom frisch entnommenen Gewebe zu unterscheidenden Erhaltungszustand auf morphologischer Ebene. Um auch eine Aussage über die Vitalität der retinalen Zellen der Kultur treffen zu können, wurde ein Apoptostest an Schnitten der Retinakultur durchgeführt. Die Ergebnisse dieses „TUNEL-Assays“ zeigen, dass es bei der Kultivierung einer, aus einem 14 Tage alten Tier

entnommenen Retina, nach einem Tag in Kultur, zu fast keinem apoptotischen Ereignis in der Retina kommt. Ferner konnte auch in den ersten drei Tagen der Kultivierung nur eine sehr geringe Apoptose Rate festgestellt werden. Nach sieben Tagen in Kultur ist allerdings ein starker Anstieg in der Anzahl apoptotischer Zellen festzustellen gewesen. Es ist bekannt, dass allein schon das Durchtrennen des Sehnervs zu einem vermehrten Absterben der Ganglienzellen in der Retina führt (Heiduschka *et al.*, 2004). Obwohl die Zellen der äußeren Retina nicht durch die Abtrennung des optischen Nervs geschädigt werden sollten (Beazley *et al.*, 1987; Mosinger *et al.*, 1998), scheint es aber für die Vitalität der Zellen der inneren Retina wichtig zu sein, neuronale Information aus den Photorezeptorzellen zu erhalten (Pavlidis *et al.*, 2000; Marco-Gomariz *et al.*, 2006). Aus diesem Grunde scheint es für die Erhaltung der gesamten Retina wichtig zu sein speziell die Photorezeptorzellen durch den Kontakt zum Pigmentepithel, als auch zyklischer Belichtung in Kultur, in einem der *in vivo*-Situation-nahen, physiologischen Umfeld zu halten. Als Resultat der Apoptosetests der vorliegenden Arbeit bleibt, dass es möglich ist, die adulte Retina mit differenzierten Photorezeptoren zumindest für den Zeitraum von 3-4 Tagen in einem nahezu von Apoptose freien Zustand zu kultivieren. Dies ergibt für verschiedenste experimentelle Ansätze ein Zeitfenster beispielsweise für Gentransfers von etwa fünf Tagen.

Zur Überprüfung der physiologischen Aktivität der Retina, werden am intakten Organismus in der Regel Elektoretinogramme (ERG) aufgezeichnet. Da diese Untersuchungsmethode bzw. elektrophysiologische Ableitungen an einzelnen Photorezeptorzellen in der kultivierten Mausretina nicht, oder nur sehr schwierig durchzuführen sind, wurden zur Überprüfung der physiologischen Aktivität der Photorezeptoren in der Retinakultur, lichtabhängige Proteintranslokationen analysiert. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die vom Lichtzustand abhängigen Verteilungen der Signaltransduktionskomponenten Transducin und Arrestin in der Mausretina *ex vivo* untersucht und mit der *in vivo*-Situation verglichen. Diese lichtabhängigen molekularen Bewegungen wurde ebenfalls in einer Guanylylzyklase knock-out Maus *in vivo* herangezogen, um die wiederhergestellte Aktivität von Photorezeptorzellen nach Transfektion der Guanylylzyklase zu verifizieren (Haire *et al.*, 2006). Die Translokationen von Arrestin und Transducin werden somit als „Marker“ für die Funktionalität der Phototransduktion in Photorezeptorzellen angesehen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass die für lebende Tiere beschriebenen Translokationen von Arrestin und Transducin (Broekhuysse *et al.*, 1985; Brann & Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan & McGinnis, 1988), auch in der kultivierten adulten Retina stattfinden (Reidel *et al.*, 2006). Die Prozesse

der Adaptationen, beziehungsweise subzellulären Verteilungen der Proteine, zeigen Endpunkte, die nicht von den *in vivo* beobachteten zu unterscheiden sind. Diese Überprüfungen lichtabhängiger molekularer Bewegungen in Photorezeptorzellen *ex vivo*, weisen daraufhin, dass es sich bei der organotypischen Kultur adulter Mausretina um ein weiterhin physiologisch aktives Gewebe handelt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte und beschriebene Retinakultur von adulten Mäusen stellt somit eine neue experimentelle Grundlage dar, photorezeptorspezifische Fragestellungen, wie die bisher nicht näher untersuchbaren Phänomene der lichtabhängigen Translokationen, mit einer neuen Zugänglichkeit unter gleichzeitiger Funktionserhaltung der Photorezeptorzellen zu studieren. Die Ergebnisse zur Behandlung der organotypischen Retinakultur mit das Cytoskelett beeinflussenden Substanzen zeigen darüber hinaus, dass pharmakologische Applikationen in der Retinakultur in Konzentrationen wirken können, wie sie auch erprobt in Zellkulturexperimenten wirksam sind (Pisano *et al.*, 2000). In ähnlichen Experimenten an Kaulquappen des Krallenfrosches, musste zur nachweisbaren Wirksamkeit von Pharmakologischen Stoffen mit weitaus höheren Konzentrationen gearbeitet werden (Peterson *et al.*, 2005). Durch die Verwendung der organotypischen Retinakultur kann folglich auf die Belastung von lebenden Organismen mit Substanzen in schädigenden Konzentrationen verzichtet werden.

4.1.1 Beitrag der Retinakulturtechnik zum Ersatz und der Reduktion von Tierversuchen, sowie zur Verminderung von Schmerzen und Leiden bei Versuchstieren

Bisherige Systeme zur Analyse von Photorezeptorzellen *ex vivo* basierten entweder auf Photorezeptoren aus dissoziierten Retinae, die allerdings ihre Kompartimentierung in Innen- und Außensegment in Zellkultur verloren, oder embryonalen Retinae, die keine vollständige Entwicklung (z.B. keine Außensegmente) der Photorezeptorzellen in Gewebekultur erlangten. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte organotypische Retinakultur aus juvenilen bis adulten Stadien von Wirbeltieren stellt, abgesehen von *in vivo*-Experimenten, die einzige Möglichkeit zur Analyse von voll differenzierten Photorezeptorzellen in ihrem natürlichen zellulären Umfeld dar. Die adulte organotypische Retinakultur ist daher die einzige experimentelle Alternative zu Tierversuchen in der Analyse von zellbiologischen und molekularen Prozessen in und an der intakten Photorezeptorzelle. Dabei zeigt sich die organotypische Retinakultur aus adulten Mäusen, als ein vitales System mit geringer Anzahl

an apoptotischen Zellen. Der positive Nachweis lichtabhängiger molekularer Translokation in Photorezeptorzellen der Retinakultur verweist zudem auf einen, der mit der *in vivo*-Situation vergleichbaren physiologischen Zustand. Im Gegensatz zum intakten Auge *in vivo*, erweist sich die Retinakultur als leicht zugängliches System zur Untersuchung des Einflusses von pharmakologischen Substanzen auf retinale Zellen und deren physiologische Prozesse. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits die erfolgreiche Anwendung von pharmakologischen Substanzen in grundlegenden zellbiologischen Experimenten an Photorezeptorzellen gezeigt werden. Damit kann die organotypische Retinakultur auch zur Erprobung therapeutischer Pharmaka wertvolle Erkenntnisse zur Wirkungsweise auf Photorezeptorzellen liefern und damit eine Reihe von Tierversuchen unnötig machen. In einem experimentellen Ausblick der vorliegenden Arbeit konnten erste Belege erbracht werden, dass die Retinakultur auch zur Einbringung genetischen Materials in retinale Zellen dienen kann und somit für Gentransfers zur Grundlagenforschung, sowie auch für grundlegende Gentherapieevaluationen an Photorezeptorzellen geeignet ist. Ähnliche Experimente unter Verwendung der auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit an der organotypischen Retinakultur angewandten Elektroporationstechnik, wurden auch schon am lebenden Tier (*in vivo*) durchgeführt (Matsuda & Cepko, 2004). Dabei wurden die Gentransfers in retinale Zellen durch subretinale Injektion in Verbindung mit Elektroporation erreicht. Die Arbeit mit der organotypischen Retinakultur hingegen kann solche Experimente am lebenden Tier ersetzen und damit, das Leiden und Schmerzen von Tieren, hervorgerufen durch Injektionen und die elektrische Behandlung, vermeiden. In der Retinakultur können verschieden Methoden des Gentransfers vergleichend und reproduzierbar angewandt werden, sowie Strategien zu gentherapeutischen Maßnahmen evaluiert werden. Die Retinakulturtechnik kann damit, neben ihren Vorteilen in Handhabung und Zugänglichkeit für Photorezeptorzellen, einen erheblichen Beitrag als Alternative bzw. zur Reduktion von Tierversuchen leisten.

4.2 Lichtabhängige Translokationen von Transducin und Arrestin in Photorezeptorzellen

Zur Adaptation des Auges an verschiedene Helligkeiten existiert eine Vielzahl von Adaptationsprozessen, von denen einige bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben wurden. Neben diesen, wird auch die lichtabhängige Translokation von Proteinen der visuellen Signalkaskade diskutiert, im Dienste einer langzeitlichen Anpassung auf Ebene der Verteilung dieser Proteine in Kompartimenten der Photorezeptorzelle zu stehen (Burns & Arshavsky, 2005). Bisher konnte bei Wirbeltieren eine lichtabhängig Translokation von Proteinen in Photorezeptorzellen für Arrestin, Transducin und Recoverin nachgewiesen werden (Broekhuysen *et al.*, 1985; Brann & Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan & McGinnis, 1988; Strissel *et al.*, 2005). In helladaptierten Photorezeptorzellen befindet sich Arrestin im Außensegment und im dunkeladaptierten im Innensegment. Transducin und Recoverin hingegen sind im Dunkeln im Außensegment und im Hellen im Innensegment der Photorezeptoren lokalisiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin untersucht. Dabei konnten die lichtabhängigen Translokationen der beiden Proteine auch in den Photorezeptorzellen der organotypischen Retinakultur bestätigt werden. In physiologischer Hinsicht dienen die lichtabhängigen Konzentrationsänderungen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorkompartimenten wohl einerseits der Verstärkung des Signals bei geringer Lichtintensität, als auch andererseits einer effektiven Abschaltung der Kaskade bei hoher Lichtintensität (Elias *et al.*, 2004). Eine solche Adaptation würde dem Schutz der Photorezeptorzellen vor schädlichen Lichtmengen, als auch der Erhaltung der Sensitivität bei verschiedenen Intensitäten dienen. Obwohl die Verbindung der lichtabhängigen Proteinverteilungen mit physiologischer Adaptation der Photorezeptorzellen offensichtlich erscheinen, konnte der experimentelle Beweis dafür noch nicht in letzter Konsequenz erbracht werden (Strissel *et al.*, 2004). Eine direkte Korrelation von Translokation und physiologischer Auswirkung konnte bisher nur für Transducin durch lichtabhängige Lokalisation dieses Proteins in Photorezeptorzellen nach elektroretinographischen Messungen nachgewiesen werden (Sokolov *et al.*, 2002). Da es sich bei den Translokationen von Arrestin und Transducin um physiologische Antworten auf unterschiedliche Lichtintensitäten handelt, spricht das Auftreten dieser molekularen Bewegungen in den Photorezeptorzellen der organotypischen Retinakultur, wie sie in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnten, für eine erhaltene Funktionalität *ex vivo*.

Abgesehen von den funktionellen Überlegungen, wird die Frage nach der zellulären Bewerkstelligung dieser lichtabhängigen molekularen Bewegungen gestellt. Obgleich das

Phänomen bereits vor ca. 20 Jahren beobachtet wurde (Broekhuysen *et al.*, 1985; Brann & Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan & McGinnis, 1988), konnten die zellulären Mechanismen, die Grundlage dieser Translokationen zwischen dem Innensegment und Außensegment sind, nach wie vor nicht aufgeklärt werden, bzw. konnte noch keine umfassende Theorie für die reversiblen und gegensätzlich ablaufenden Translokationen aufgestellt werden. In diesem Zusammenhang werden sowohl aktive, mit Motorproteinen assoziierte Transportvorgänge, als auch passive, der Diffusion und Kompartimentbindung unterliegende Mechanismen diskutiert (zusammengefasst in Strissel *et al.*, 2004). Um einen Hinweis auf die beteiligten Prinzipien zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Notwendigkeit von Cytoskelettelementen für die molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen der organotypischen Retinakultur überprüft. Dabei wurde eine Abhängigkeit der mit der Dunkeladaptation verbundenen Translokationen von Aktinfilamenten als auch Mikrotubuli festgestellt. Von der Aufklärung der Prinzipien hinter den Proteinbewegungen in der Photorezeptorzelle erhofft man sich neue Erkenntnisse zur funktionellen Kompartimentierung von Proteinen in Zellen überhaupt (Calvert *et al.*, 2006). Die genannten Translokationsphänomene wurden in jüngerer Zeit auch auf die Geschwindigkeiten dieser molekularen Bewegungen während der Dunkel-, bzw. Helladaptation untersucht. Dabei erhoffte man sich über die gemessenen Kinetiken, Aufschlüsse zu den beteiligten Mechanismen zu erhalten. In solchen Untersuchungen wurden immunhistochemische (Peterson *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2004) als auch proteinbiochemische Methoden (Sokolov *et al.*, 2002; Strissel *et al.*, 2006) angewandt. Dabei entstanden leicht abweichende Ergebnisse für die gemessenen Geschwindigkeiten der molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin. Dies könnte zum einen an unterschiedlichen Empfindlichkeiten der eingesetzten Methoden, als auch an leichten Unterschieden in den Photorezeptorzellen der untersuchten Tiere (Maus, Ratte, Krallenfrosch) liegen. Trotz dieser im Detail abweichenden Ergebnisse, stimmen die Arbeiten überein, dass die mit der Helladaptation verbundenen Translokationen von Arrestin und Transducin schneller ablaufen, als die während der Dunkeladaptation auftretenden. Dies gibt einen Hinweis auf vielleicht unterschiedliche Prinzipien hinter den mit der Dunkeladaptation, zu den mit Helladaptation verbundenen molekularen Bewegungen. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen durch eine Cytoskelettabhängigkeit der Translokationen von Arrestin und Transducin vornehmlich während der Dunkeladaptation auf unterschiedliche Prozesse im Hellen und Dunkeln hin. In einer kürzlich erschienen Arbeit, wurde versucht sich dem Phänomen der molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin unter Annahme und Berücksichtigung

der Diffusionskräfte in Photorezeptorzellkompartimenten mit Hilfe eines mathematischen Modells zu nähern (Calvert *et al.*, 2006). Dabei geht man von einer in verschiedener Hinsicht idealisierten Photorezeptorzelle aus, in der die Geschwindigkeit der genannten Translokationsprozesse vor allem von der Größe der Kompartimente und der darin enthaltenen Widerstände abhängig ist. Dieses Modell unter Annahme diffusionsabhängiger Translokationen kann allerdings nicht den Umstand erklären, dass während der Helladaptation die molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin in und aus beiden Hauptkompartimenten der Photorezeptorzellen schneller ablaufen, als während der Dunkeladaptation. Da doch die Widerstände für Hin- und Rückbewegung, beispielsweise durch das mit Disks dicht gepackte Außensegment gleich sein sollten. Welche Transportmechanismen für solch unterschiedliche Geschwindigkeiten im selben Kompartiment verantwortlich sein könnten, gilt es noch zu klären.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese offenen Fragen durch ein neu etabliertes System zur zellbiologischen Analyse von Photorezeptorzellen, der organotypischen Kultur adulter Retinae, experimentell angegangen. In den initialen Studien dieser Arbeit konnte die Eignung der Gewebekultur für lichtabhängige Untersuchungen an Photorezeptorzellen durch, die auch *ex vivo* stattfindenden Translokationen der genannten Proteine, gezeigt werden. Nun sollte unter Zuhilfenahme externer Beeinflussung versucht werden diese Translokationen in der Photorezeptorzelle näher zu analysieren. Dabei bietet sich die Retinakultur an, um bereits allgemein anerkannte Zellkulturtechniken auch zur Manipulation von Photorezeptorzellen anzuwenden. Auf der Suche nach den Prinzipien und den molekularen Mechanismen hinter den lichtabhängigen Bewegungen von Arrestin und Transducin, werden passive Translokationen auf Grundlage der Diffusion, als auch aktive Transporte mit der Hilfe von Motorproteinen diskutiert (Nair *et al.*, 2005a; Calvert *et al.*, 2006; Marszalek *et al.*, 2000; McGinnis *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2005). Das Zellskelett stellt die „Straßen“ dar, die von Motorproteinen zum Transport von Proteinen, Proteinkomplexen oder Vesikeln genutzt werden. Zur Untersuchung der Theorie eines aktiven Transports, wurde die Notwendigkeit von Zellskelettelementen für die Bewegungen von Arrestin und Transducin in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Ergebnisse dazu sollen im folgenden diskutiert werden. Es sei noch vorangestellt, dass Motorproteine für ein Zellskelettelement und auch die Richtung des Transportes spezifisch sind (Welte, 2004). Deswegen ist bei einem möglichen aktiven Transport davon auszugehen, dass für Hin- und Rücktransport desselben Proteins durch die gesamte Photorezeptorzelle unterschiedliche Motoren, oder auch Mechanismen verantwortlich sein sollten.

4.2.1 Die Translokationen von Arrestin und Transducin während der Dunkeladaptation in Photorezeptorzellen sind vom Cytoskelett abhängig

Trotz der lange Zeit bekannten lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen (Broekhuysse *et al.*, 1985; Brann & Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan & McGinnis, 1988), konnten die zugrunde liegenden molekularen Prozesse und Mechanismen dieser Bewegungen noch nicht entschlüsselt werden. In diesem Zusammenhang wurden bereits aktive als auch passive Bewegungen dieser an der Signaltransduktion beteiligten Proteine diskutiert (Marszalek *et al.*, 2000; McGinnis *et al.*, 2002; Strissel *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2005a; Calvert *et al.*, 2006). Um einen Hinweis auf die beteiligte Mechanismen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit vom Cytoskelett der lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen untersucht. Dies wurde erst möglich durch die Zugänglichkeit von Photorezeptorzellen in der organotypischen Kultur adulter Retinae. Dabei wurden das Zellskelett beeinflussende Substanzen in der Kultur zur Destabilisation von Aktinfilamenten und Mikrotubuli eingesetzt und anschließend die lichtabhängigen Verteilungen von Arrestin und Transducin beobachtet.

Zunächst soll hierzu auf die Abhängigkeit dieser Translokationen von Aktinfilamenten, durch deren Destabilisation mit Cytochalasin D eingegangen werden. Voraussetzend dafür wurde die Wirkung von Cytochalasin D (Casella *et al.*, 1981; Schliwa, 1982), auf Aktinfilamente in Photorezeptorzellen in der vorliegenden Arbeit überprüft. Cytochalasin D wurde bereits vielfach in Studien zur Analyse von F-Aktin-assoziierten Zellfunktionen, speziell auch in Photorezeptorzellen angewandt (O'Connor & Burnside, 1981; Williams *et al.*, 1988; Vaughan & Fisher, 1989; Vaughan *et al.*, 1989). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass vor allem die Aktinfilamente in den Innensegmenten der Photorezeptorzellen durch Cytochalasin D destabilisiert wurden, aber F-Aktin in unzugänglichen bzw. starren Strukturen, wie der *Membrana limitans externa* erhalten blieb. Dies bedeutet, dass nach der Behandlung der Photorezeptorzellen mit Cytochalasin D ein Teil des F-Aktins nicht mehr für zelluläre Funktionen zur Verfügung steht. In den so behandelten Retinae zeigte sich eine unbeeinflusste Translokation von Arrestin und Transducin während der Helladaptation der Photorezeptorzellen. Dies weist darauf hin, dass es sich bei diesen beiden molekularen Bewegungen, von Arrestin ins Außensegment und Transducin ins Innensegment, um von Cytochalasin D-destabilisierbaren Aktinfilamenten unabhängige Prozesse handelt. Bei umgekehrter Versuchsanordnung, sprich der Analyse der

mit der Dunkeladaptation assoziierten Translokationen, sind unter Cytochalasin D-Einfluss die Bewegungen beider Proteine unterbunden. Diese Resultate zeigen eine Beteiligung von F-Aktin an der Translokation von Arrestin in das Innen- und der von Transducin in das Außensegment der Photorezeptorzelle. Dabei könnten Aktinfilamente als Transportwege für Myosine, als auch in direkter Interaktion in einer Art „Tretmühlen“-Effekt diese Transporte gewährleisten. Eine direkte Bindung von Arrestin oder Transducin an Aktinfilamente konnte jedoch bisher noch nicht gezeigt werden.

In einer vergleichbaren Studie an *Xenopus laevis* wurde ebenfalls die Beteiligung des Aktincytoskeletts an den Translokation von Arrestin und Transducin unter Einsatz von Cytochalasin D (Peterson *et al.*, 2005) untersucht. Dabei wurden durch die systemische Applikation von Cytochalasin D, die Aktinfilamente in den Photorezeptorzellen von Kaulquappen destabilisiert. In den so behandelten Kaulquappen von *Xenopus* konnte nach Destabilisierung des F-Aktins durch Cytochalasin D, während der Dunkeladaptation eine beeinträchtigte Translokation von Transducin in das Außensegment festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Resultat, das in der organotypischen Retinakultur von Mäusen gewonnen wurde. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit ebenso eine Beeinträchtigung der Arrestin Translokation unter F-Aktin-Destabilisation festgestellt werden. Dabei unterblieben nach dem Einsatz des Zellgiftes in den Photorezeptorzellen kultivierter Retinae die Arrestin und Transducin Translokationen während der Dunkeladaptation. Diese zu *Xenopus* leicht unterschiedlichen Befunde könnten zum einen das Resultat unterschiedlicher zellulärer Strukturen in Photorezeptorzellen von *Xenopus* und Maus sein. Zum anderen, könnten auch abweichende experimentelle Bedingungen einen Unterschied in der Wirksamkeit der eingesetzten Cytoskelett-beinflussenden Substanzen ausmachen.

In den an Kaulquappen durchgeführten Experimenten, wurde Cytochalasin D systemisch appliziert, das heißt die Substanz wurde dem Wasser, in dem die Tiere gehalten wurden, zugesetzt (Peterson *et al.*, 2005). Allerdings ist bei dieser Art der Verabreichung schwierig zu bestimmen, in welcher Konzentration tatsächlich das Cytochalasin D in den Photorezeptorzellen wirken kann. Weiterhin können, durch die Wirkung von Cytochalasin D auf andere Zellsysteme und Gewebe des behandelten Organismus, auch sekundäre Effekte, z.B. auf Akkomodation oder Irisbewegungen (Wiederholt *et al.*, 1997), nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die das Cytoskelett beeinflussenden Substanzen direkt in das Nährmedium der organotypischen Retinakultur appliziert. Hierbei kann der Einfluss auf weitere Gewebe selbstverständlich ausgeschlossen werden. Weiterhin können in

der Retinakultur die Photorezeptorzellen sehr viel unmittelbarer von der applizierten Substanz erreicht werden, da diese hier dem Medium exponiert vorliegen. Hierbei kann also nahe dem, in Zellkulturen erprobten, Optimum der Wirksamkeit der eingesetzten Substanz gearbeitet werden. Die hierzu notwendigen Konzentrationen sind dabei, um Größenordnungen geringer, als bei systemischer Applikation, die zudem einen Tod der Versuchstiere zur Folge hatte (Peterson *et al.*, 2005).

Wie bereits angedeutet, könnten unterschiedliche Ergebnisse zur Notwendigkeit von Cytoskelettelementen für die Translokationen von Arrestin und Transducin, auch auf einer unterschiedlichen zellulären Struktur und Morphologie von Photorezeptorzellen des *Xenopus* und der Maus basieren. Obwohl Photorezeptorzellen von Amphibien und Säugetieren einen im Wesentlichen übereinstimmenden Bauplan aufweisen, gibt es doch gruppenspezifische Unterschiede in den Dimensionen und dem subzellulären Aufbau von Kompartimenten. So sind die Photorezeptoren der Amphibien größer und zeigen einen etwa zehnfach größeren Durchmesser im Vergleich mit Säugerphotorezeptoren. Allerdings ist das Photorezeptorcilium, das die Kompartimente Innen- und Außensegment miteinander verbindet in der amphibischen Photorezeptorzelle kürzer als in Photorezeptoren der Säugetiere. Solche Unterschiede in den Dimensionen der Photorezeptorkompartimente haben wohl auch eine Bedeutung für die unterschiedlichen Arrangements von Cytoskelettelementen und auch unterschiedliche Bedingungen für Diffusionsvorgänge in den verschiedenen Photorezeptortypen. Beispielsweise existieren in den Einschnürungen der *Xenopus* Außensegmente Mikrotubulibündel (Eckmiller, 2000), die so nicht in den Außensegmenten von Säugerphotorezeptoren zu finden sind. Zurück zu den Ergebnissen der beeinträchtigten Translokationen von Arrestin und Transducin in Cytochalsin D-behandelten dunkeladaptierenden Photorezeptorzellen stellt sich nun die Frage, welche Rolle das Aktincytoskelett bei den Translokationen spielen könnte. Ein möglicher Mechanismus unter Beteiligung des Aktincytoskeletts liegt in der typischen, dynamischen Instabilität des Aktinnetzwerks. Darunter versteht man das unterschiedlich schnelle Wachstum an den beiden Enden des Aktinfilaments, das in einer Art Tretmühleneffekt das „Wandern“ des Filaments bedingt (Bonder *et al.*, 1983; Theriot, 1997). Bei einer möglichen direkten oder indirekten Assoziation von Arrestin oder Transducin mit F-Aktin, könnten diese über einen solchen Mechanismus transportiert werden. Allerdings konnten bisher keinerlei direkte Interaktionen von F- oder G-Aktin mit Arrestin oder Transducin nachgewiesen werden.

Die typischerweise mit dem Aktincytoskelett verbundenen Motorproteine in der Zelle, sind die Myosine. Die molekularen Motorproteine der Myosingruppe bewegen sich entlang

der Aktinfilamente zum Transport von Zellbestandteilen und auch im Dienste der Ausrichtung und Bewegung von Aktinfilamenten in der (neuronalen) Zelle (Brown & Bridgman, 2004). In Photorezeptorzellen von *Drosophila* konnte eine Beteiligung eines Myosins, des unkonventionellen Myosin III (NINAC) an der Translokation von visuellem Arrestin 2 (Lee & Montell, 2004), als auch dem visuellen G(q)-alpha-Protein (Cronin *et al.*, 2004), über die Aktinfilamente in den Microvilli der Rhabdomere beschrieben werden. In der Vertebratenphotorezeptorzelle ist Myosin III im Innensegment und vor allem den Krönchenfortsätzen (*Calicae*) der Photorezeptorzellen lokalisiert (Dosé *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse verweisen auf eine weitere Möglichkeit in der Arrestin- und Transducintranslokation, den aktiven Transport. Hierbei werden Proteine als Fracht über (Aktine)-assoziierte Motorproteine in Zellkompartimente gebracht. Die Familie der Myosine ist die typische mit Aktinfilamenten verbundene Motorproteinklasse aus der einige auch in Photorezeptorzellen exprimiert werden, wie z.B. Myosin II, IIIa und VIIa (Williams & Roberts, 1992; Dosé & Burnside, 2002; El Amraoui *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die Myosine, Myosin II und VIIa in die Translokationen von Arrestin und Transducin involviert sind. Das konventionelle, nicht-muskuläre Myosin der Klasse II, konnte in elektronenmikroskopischen Studien im apikalen Bereich des Verbindungsciliums der Photorezeptorzelle lokalisiert werden (Williams & Roberts, 1992; Williams *et al.*, 1992). Mit der Hilfe eines für Myosin II spezifischen Inhibitors, sollte nun die Beteiligung von nicht-muskulärem Myosin II an der lichtabhängigen Translokation von Transducin untersucht werden. Dazu konnte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der organotypischen Retinakultur keine Beeinträchtigung der Translokation von Transducin nach Myosin II-Inhibition festgestellt werden. Die lichtabhängige molekulare Bewegung von Transducin fand auch in der mit dem Hemmstoff behandelten Retina statt.

Nach dem gezeigt werden konnte, dass Myosin II an der Translokationen von Transducin unbeteiligt zu sein scheint, sollte nun ein weiteres prominentes Myosin in Photorezeptorzellen, Myosin VIIa auf eine mögliche Rolle bei den Translokationen überprüft werden. Myosin VIIa konnte bereits als mitverantwortlich für den ciliären Transport von Opsin ins Außensegment der Photorezeptorzelle ermittelt werden (Liu *et al.*, 1999; Wolfrum & Schmitt, 2000). Zur Untersuchung der möglichen Funktion von Myosin VIIa bei lichtabhängigen molekularen Bewegungen in der Photorezeptorzelle, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Myosin VIIa defizienten Mausmutante analysiert, die so genannte *shaker-1*-Maus (Gibson *et al.*, 1995). Hierbei wurden Adaptationsexperimente mit *shaker-1*-Mäusen durchgeführt, um die Notwendigkeit von funktionellem Myosin VIIa für die

Translokation von Arrestin als auch von Transducin zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Experimentreihe zeigen, dass auch Myosin VIIa nicht unmittelbar an den lichtabhängigen Translokationen der beiden Proteine beteiligt ist. In den Analysen der *shaker-1*-Retinae konnte kein qualitativer Unterschied in der Verteilung von Arrestin und Transducin nach Hell-, wie auch Dunkeladaptationen im Vergleich zur Wildtypretina festgestellt werden. Aufgrund der dabei gewonnenen Ergebnisse für die beiden untersuchten Myosine, konnte die Frage nach einem aktiven Transport der Signaltransduktionskomponenten Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen, für die hier betrachteten Myosine nicht beantwortet werden.

Dies könnte bedeuten, dass Myosine nicht beteiligt sind, aber auch dass möglicherweise ein in dieser Arbeit bisher nicht in Betracht gezogenes Myosin verantwortlich für den Transport ist. Bislang konnte in Photorezeptorzellen die Expression von drei weiteren unkonventionellen Myosinen nachgewiesen werden. Dazu gehört das bereits angesprochene Myosin IIIa, welches sowohl in Photorezeptorzellen des *Xenopus* (Lin-Jones *et al.*, 2004), der Maus (Walsh *et al.*, 2002) und des Felsenbarsches (Dosé *et al.*, 2003) nachgewiesen werden konnte. Von Myosin IIIa ist neben seiner Motoraktivität auch eine Funktion als Kinase bekannt. In den Invertebraten, *Drosophila* (Lee & Montell, 2004), als auch *Limulus* (Battelle, 2002), wurde eine Beteiligung von Myosin III (bei *Drosophila* auch NINAC genannt) an Adaptationsprozessen der Photorezeptorzellen aufgezeigt. Allerdings konnte bislang keine Motoraktivität für Myosin III in Invertebraten nachgewiesen werden (Dosé *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu konnte in einer transgenen Expressionsstudie von Myosin IIIa in *Xenopus* eine Verlängerung der *Calicae*-Strukturen im apicalen Bereich der Photorezeptoraußensegmente beobachtet werden. Dabei erhöhte sich die Anzahl von Aktinbündeln in diesen *Calycaes*. Dies lässt darauf schließen, dass Myosin IIIa eher eine strukturgebende, als eine intersegmentale Transportfunktion in Photorezeptorzellen besitzt (Lin-Jones *et al.*, 2004; Strissel *et al.*, 2004). Durch diese spezifische Lokalisation und beobachtete Funktion von Myosin III ist dessen Beteiligung an den in dieser Arbeit untersuchten Translokationen von Signaltransduktionskomponenten kaum denkbar. Ein weiteres Myosin, das in der Retina und den Photorezeptorzellen gefunden werden konnte, ist Myosin Va. Myosin Va konnte dabei in den plexiformen Schichten und speziell in den Photorezeptorzellen an den Synapsen und im Innensegment lokalisiert werden (Schlamp & Williams, 1996). Ebenso ist das, sich zur „üblichen“ Bewegungsrichtung „marschierende“ Myosin VI in Photorezeptoren der Maus im Innensegment und an den Synapsen lokalisiert (Kitamoto *et al.*, 2005). Bei für Myosin Va („dilute Serie“), als auch Myosin VI defizienten

Mäusen (*Snell's waltzer*), zeigen sich keine morphologischen Veränderungen im Aufbau der Retina, und es kommt auch bei älteren Tieren nicht zu retinalen Degenerationen. Allerdings konnte für beide Myosinmutanten eine physiologische Veränderung im Elektroretinogramm (ERG) aufgenommen werden (Libby *et al.*, 2004; Kitamoto *et al.*, 2005), die auf deren funktionelle Rolle an der Photorezeptorzellsynapse schließen lassen.

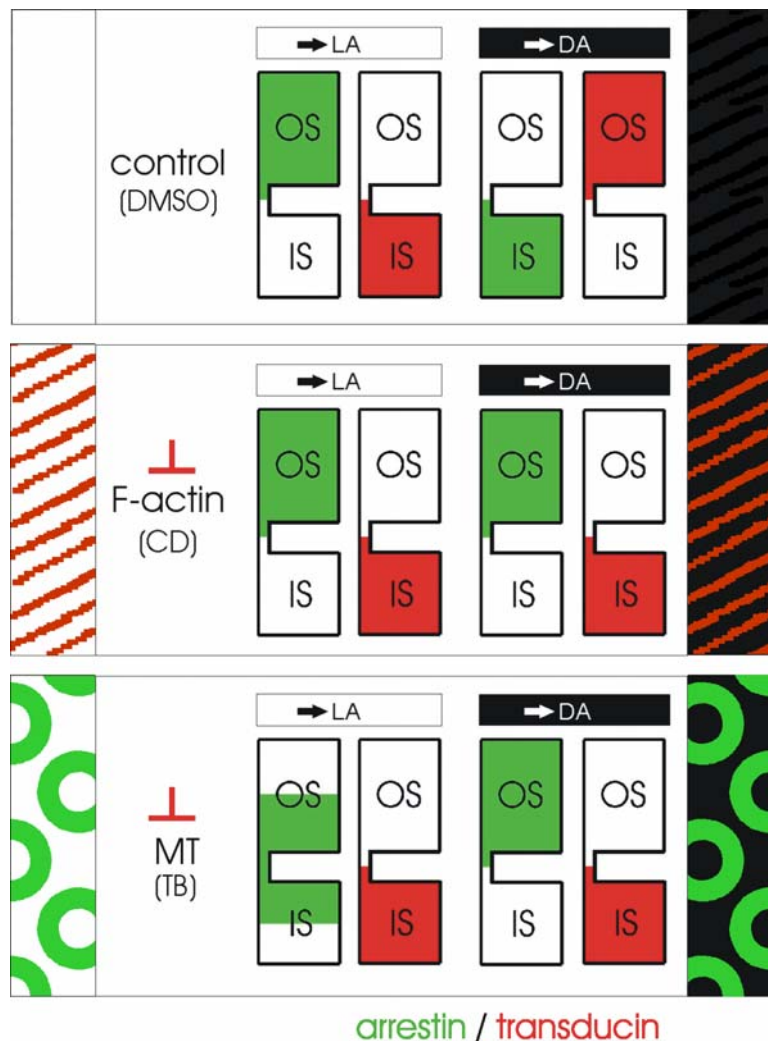


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Verteilung von Arrestin und Transducin in stark vereinfachten Photorezeptorzellen bei verschiedenen Adaptationszuständen, sowie Cytoskelettbeeinflussungen. Die mit der Dunkeladaptation verbundenen Translokationen von Arrestin und Transducin sind unter Destabilisation von Aktinfilamenten, als auch Mikrotubuli unterbunden. Außerdem, ist die Translokation von Arrestin im Hellen in das Außensegment der Photorezeptorzelle bei Mikrotubulidestabilisation beeinträchtigt (nähere Erläuterungen im Text). ->LA = zuvor dunkel- und anschließend helladaptierte Retinakultur, ->DA = zuvor hell- und anschließend dunkeladaptierte Retinakultur, OS = Außensegment, IS = Innensegment, CD = Cytochalasin D-Behandlung, TB = Thiabendazol-Behandlung, MT = Mikrotubuli.

In diesen jeweiligen, für Myosin Va und VI defizienten Tieren, konnten Reduktionen von bis zu 25% in der A-Welle, die für die Summenableitung der Photorezeptorzellen steht, bei niedrigen Lichtintensitäten festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass

Myosin Va und Myosin VI an der Dunkeladaptation von Photorezeptorzellen beteiligt sind. Ob allerdings diese mögliche Beteiligung in Zusammenhang mit den Translokationen von Arrestin und Transducin in dunkeladaptierenden Photorezeptorzellen steht, müsste noch überprüft werden. Dabei könnten diese sich gegenläufig bewegenden Motorproteine, für den gegensätzlichen Transport von Arrestin und Transducin während der Dunkeladaptation verantwortlich sein. Aufschluss zu einer solchen Hypothese könnten Experimente liefern, in denen lichtabhängige Translokationen in den Myosin Va und VI defizienten Tieren überprüft werden, ähnlich den Experimenten, wie sie bereits in der vorliegenden Arbeit zu Myosin VIIa durchgeführt wurden. Die erhaltenen Ergebnisse zur Notwendigkeit von Aktinfilamenten für die Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen, sowie die nachfolgend diskutierte Notwendigkeit von Mikrotubuli für diese Prozesse, sind in Abbildung 29 in einer Übersicht zusammengefasst.

Nach der Analyse der lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin bei destabilisierten Aktinfilamenten, wurde anschließend auch die Notwendigkeit von Mikrotubuli für genannte Prozesse untersucht. Voraussetzung für solche Experimente war, wie schon in den vorherigen Untersuchungen zu Aktinfilamenten, der Nachweis von Destabilisation der Mikrotubuli, hier durch Thiabendazol (Pisano *et al.*, 2000), in der organotypischen Retinakultur. Die Destabilisierbarkeit von Mikrotubuli in Photorezeptorzellen durch das Zellgift Thiabendazol, konnte bereits in Photorezeptorzellen von *Xenopus*-Kaulquappen nachgewiesen werden (Peterson *et al.*, 2005). Dabei scheint es wichtig zu sein eine Substanz wie Thiabendazol zu verwenden, die speziell die acetylierten Mikrotubuli angreifen kann (Pisano *et al.*, 2000), wie sie auch in der Photorezeptorzelle vorkommen (Sale *et al.*, 1988; Arikawa & Williams, 1993). Andere Mikrotubuli destabilisierend Agenzien, wie Nocodazol, scheinen hingegen nicht in der Lage zu sein, bestimmte, für die Zellfunktion wichtige, Mikrotubuli in Photorezeptorzellen zu beeinflussen (Vaughan *et al.*, 1989).

In der vorliegenden Arbeit konnte, durch immunhistochemische Analysen auf licht- wie auch elektronenmikroskopischem Niveau, ein Abbau der Mikrotubuli vor allem in den Innen- und Außensegmenten der Photorezeptorzellen gezeigt werden. Die axonemalen Mikrotubuli des Verbindungsciliums konnten allerdings durch Thiabendazol nicht vollständig destabilisiert werden, welches durch eine erhalten gebliebene Markierung von Tubulin entlang des Ciliums auch nach Behandlung mit Thiabendazol deutlich wurde. Ähnliche Ergebnisse zu einer Erhaltung des Mikrotubuli-Cytoskeletts im Verbindungscilium, konnte

auch in einer Studie an Photorezeptorzellen von Kaulquappen nach Thiabendazol-Behandlung festgestellt werden (Peterson *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde in zur Destabilisation von Mikrotubuli behandelten Retinakulturen nun die lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen verfolgt. Dazu wurden jene molekularen Bewegungen zunächst während der Helladaptation untersucht. Es stellte sich heraus, dass wie schon in der Helladaptation der F-Aktin-destabilisierten Retinakultur zuvor, kein gravierender Unterschied zur unbehandelten Kontrolle feststellbar war. Nur in der Translokation des Arrestins in das Außensegment der Photorezeptorzellen ergab sich ein Unterschied zur Kontrolle. Der überwiegende Anteil des Arrestins verließ hierbei nicht vollständig das Innensegment und „füllte“ auch nicht gänzlich das Außensegment. Hierbei sei erwähnt, dass bei allen Adaptationsexperimenten stets der Endzustand, nach der in der Literatur beschriebenen Translokationszeit (Sokolov *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2004; Strissel *et al.*, 2006) betrachtet wurde. Dieser unvollständige, intermediäre Translokationszustand könnte zum einen das Resultat einer verzögerten Translokation sein, aber auch einen Zustand der Translokationsunterbrechung, bei fehlenden Mikrotubuli, beschreiben. Gegen erstere Hypothese sprechen jüngere Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Wolfrum, die den gleichen unvollständigen Translokationszustand auch nach sehr viel längerer Belichtungszeit (>3h) zeigen. Dieser „intermediäre“ Helladaptationszustand konnte ebenfalls in den Photorezeptorzellen von Kaulquappen des *Xenopus laevis* unter Thiabendazoleinfluss gezeigt werden (Peterson *et al.*, 2005). Dabei konnte eine Verlangsamung in der Bewegung von Arrestin ins Außensegment der Photorezeptorzellen gezeigt werden. In diesen Experimenten an Kaulquappen translocierte Arrestin erst nach einer Belichtungszeit von über einer Stunde, jedoch mit einer sehr viel basaleren Verteilung, in das Außensegment der *Xenopus*-Photorezeptoren. Dieser Unterschied in den beobachteten Beeinträchtigungen der Translokation von Arrestin im Hellen unter Thiabendazoleinfluss, könnte auf die abweichende Morphologie der Photorezeptorzellen zwischen Amphib und Säugetier zurückzuführen sein. In der mit einem relativ kurzen Cilium und weitaus größeren Segmentdurchmessern ausgestatteten Amphibienphotorezeptorzelle, bestehen weniger Hindernisse für eine Diffusion von Molekülen durch die Zelle. Hierin könnte bei einem „Ausfall“ von Transportmechanismen, eine weniger gehinderte Diffusion von Arrestin ins Außensegment, im Gegensatz zur schmalen Säugetierphotorezeptorzelle, begünstigt sein.

Im Vergleich zur üblich vorzufindenden Zellarchitektur entspringen in der Vertebratenphotorezeptorzelle die Mikrotubuli nicht in Kernnähe, sondern am Basalkörper, also im apikalen Bereich des Innensegments. Auf dem Wege vom basalen Teil des

Innensegmentes bis in das apikale Außensegment, findet also eine Umkehrung in der Orientierung der Mikrotubuli statt (Troutt & Burnside, 1988). Hierbei kommen die positiven Enden der Mikrotubuli in Kernnähe, als auch im Außensegment zu liegen. Mikrotubuli-assoziierte Transporte durch die gesamte Photorezeptorzelle würden demnach bedingen, dass ein Wechsel des Motorproteins (Welte, 2004), beziehungsweise des Mechanismus oder Transportweges in der Nähe des Basalkörpers erfolgen muss. Bei der Frage nach den Mechanismen eines Mikrotubuli assoziierten Transports gilt es diese Besonderheit in der Architektur der Photorezeptorzelle zu beachten. Ferner ist einzubeziehen, welche besonderen Mikrotubuli, z.B. durch posttranslational modifiziertes Tubulin aufgebaute (Pagh-Roehl *et al.*, 1991), durch die Behandlung mit Thiabendazol von Destabilisation betroffen sind und auch welche nicht (Quinlan *et al.*, 1980; Pisano *et al.*, 2000). Wie schon zuvor erwähnt, ist Thiabendazole in der Lage, im Gegensatz zu anderen Mikrotubuli-destabilisierenden Substanzen, wie Colchicin oder Nocodazol, speziell die acetylierten Mikrotubuli (Quinlan *et al.*, 1980; Pisano *et al.*, 2000), wie sie auch in der Photorezeptorzelle vorkommen (Sale *et al.*, 1988; Pagh-Roehl *et al.*, 1991), zu destabilisieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen allerdings, dass unter Einsatz von Thiabendazol vor allem die acetylierten Mikrotubuli in Innen- und Außensegment, aber nicht die des Verbindungsciliums der Photorezeptorzelle beeinflusst wurden. Die axonemalen Mikrotubuli des Verbindungsciliums sind durch weitere posttranskriptionale Modifikationen (Detyrosinierung, Glutamylierung), als auch durch Proteinkomplexe in Verbindung mit der Membran stabilisiert (Horst *et al.*, 1987; Muresan & Besharse, 1994). Proteine solcher Mikrotubuli-assoziiierter Komplexe sind beispielsweise die Proteine MAP oder TAU (Hirokawa, 1994; Mandelkow & Mandelkow, 1995), sowie die mit Centrosomen und Cilien assoziierten Centrine (Salisbury, 1995). Des Weiteren werden auch Gerüstproteine, wie das Usher 1G-Genprodukt SANS diskutiert, Proteinkomplexe an Mikrotubuli zu binden (Reiners *et al.*, 2006).

Nach der Behandlung von Photorezeptorzellen mit Thiabendazol, stehen also bestimmte Untergruppen von Mikrotubuli weiterhin für Transportvorgänge zur Verfügung. Dies sind vor allem die Mikrotubuli des Verbindungsciliums, die nicht, oder nur in geringem Maße durch Thiabendazol destabilisiert werden konnten. Auch in Untersuchungen anderer, konnten durch Thiabendazolbehandlung die Mikrotubuli im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen nicht stark beeinflusst werden (Peterson *et al.*, 2005).

Tabelle 6: Ausgewählte Arbeiten und deren Ergebnisse im Kontext des aktiven oder passiven Transports von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen. Rho* = lichtaktiviertes Rhodopsin, Rho*-P-P = doppelt phosphoryliertes, lichtaktiviertes Rhodopsin, ATP = Adenosintriphosphat, GTP = Guanosintriphosphat, F-Aktin = Aktinfilamente, MT = Mikrotubuli.

Analysesystem	Dunkeladaptation abhängig von		Helladaptation abhängig von		Publikation
	Arrestin	Transducin	Arrestin	Transducin	
Augenbecherkultur (Maus)	Rho*-P-P	kein ATP benötigt	MT	ATP benötigt	Nair <i>et al.</i> , 2005A
transgene Maus		GTPase-Aktivität		keine GTPase-Aktivität	Kerov <i>et al.</i> , 2005
transgene Maus			kein Rho-P-P, aber Rho*		Mendez <i>et al.</i> , 2003
transgene Maus			Kinesin II (MT)		Marszalek <i>et al.</i> , 2000
Krallenfrosch	MT				McGinnis <i>et al.</i> , 2002
Krallenfrosch (transgen)	MT	F-Aktin	MT, teilweise		Peterson <i>et al.</i> , 2005
Retinakultur (Maus)	MT, F-Aktin	MT, F-Aktin	MT, teilweise		vorliegende Arbeit

Diese axonemalen Mikrotubuli könnten also an der unvollständigen Translokation von Arrestin in Thiabendazol-behandelten Photorezeptorzellen beteiligt sein. In einer Hypothese dazu wäre folgendes Szenario vorstellbar: Die Diffusion von Arrestin bis zum apikalen Bereich des Innensegmentes und ein anschließender Mikrotubuli basierender Transport durch das Cilium in den basalen Bereich des Außensegmentes, in dem ein weiter apikaler Transport unter der Thiabendazolbehandlung ausbleibt. In den Experimenten zu den mit Dunkeladaptation verbundenen Bewegungen von Arrestin und Transducin, konnten die Bewegungen beider Proteine nicht mehr festgestellt werden. Während der Dunkeladaptation scheinen also intakte Mikrotubuli für die Translokationen von Arrestin und Transducin notwendig zu sein. Die unterbundene Translokation von Arrestin in das Innensegment von Photorezeptorzellen durch Thiabendazol, konnte ebenfalls in *Xenopus*-Kaulquappen festgestellt werden (Peterson *et al.*, 2005). Obwohl eine direkte Interaktion von Arrestin mit Mikrotubuli bisher nur *in vitro* gezeigt werden konnte (Nair *et al.*, 2004), wird diese Affinität zu Mikrotubuli, als die treibende Kraft bei der Translokation von Arrestin ins Innensegment diskutiert (Nair *et al.*, 2005a). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit würden eine solche Hypothese bestätigen. Fällt der „Magnet“ Mikrotubuli im Innensegment bei Thiabendazoldestabilisation aus verbleibt Arrestin im Außensegment der Photorezeptorzelle. Gegen die vorgenannte Hypothese spricht allerdings, dass sich die Lokalisationsmuster von Arrestin und Mikrotubuli im Innensegment der Photorezeptorzelle keineswegs decken, siehe

(McGinnis *et al.*, 2002; Peterson *et al.*, 2003; Peet *et al.*, 2004), oder auch in den Ergebnisse dieser Arbeit (Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 21). Zudem befinden sich auch im Außensegment der Photorezeptorzelle Mikrotubuli, die besonders prominent auftretend bei Amphibien nachgewiesen wurden (Eckmiller, 2000), die demnach Arrestin im Dunkeln auch im Außensegment binden müssten. Die Ergebnisse der gegenwärtigen Arbeit weisen allerdings vielmehr darauf hin, dass gerade auch Mikrotubuli im Außensegment der Photorezeptorzellen für die Translokation des Arrestins in das Innensegment notwendig sind. Gegen eingangs erwähnte Hypothese von Nair und Mitarbeitern spricht zudem, dass die Translokation von Arrestin im Hellen unter Auflösung der Mikrotubulibindestellen sogar verstärkt sein müsste, was in den Beobachtungen dieser Arbeit, sowie denen von (Peterson *et al.*, 2005) aber nicht festzustellen war. Vielmehr war diese Bewegung von Arrestin sogar verlangsamt oder gestört. Zur besseren Übersichtlichkeit der in Zusammenhang mit einem aktiven oder passiven Transport von Arrestin und Transducin diskutierten und zuvor bereits beschriebenen Faktoren in der Vertebratenphotorezeptorzelle, sind die Ergebnisse ausgewählter relevanter Arbeiten in Tabelle 6 zusammengefasst.

4.2.2 Mechanismen der lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen

Neben den im vorherigen besprochenen im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen Abhängigkeiten der Translokationen von Arrestin und Transducin vom Cytoskelett, wurden und werden weitere Faktoren im Zusammenhang mit möglichen Mechanismen der Translokationen diskutiert. Hierbei stehen neben den „Wegen“ der Translokationen, auch deren „Schalter“ und regulatorischen Elemente im Vordergrund, die weitere Hinweise zu den Mechanismen der Bewegungen liefern können. Im Fokus solcher Untersuchungen steht beispielsweise inwiefern die Aktivierung der visuellen Signaltransduktionskaskade für die molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen notwendig ist. Dazu weisen neue Ergebnisse aus der Diplomarbeit von Tobias Goldmann (Goldmann, 2006) und aus einem Tagungsbeitrag von Wilda Orisme (Orisme & Smith, 2006) darauf hin, dass weitere Signalwege unabhängig von der visuellen Signaltransduktion eine Rolle bei der Translokation, zumindest von Arrestin, in Photorezeptorzellen spielen. Dazu wurde in diesen Untersuchungen Phorbol ester (PMA), ein Stimulator der Proteinkinase C (PKC), in der organotypischen Retinakultur, sowie an Kaulquappen von *Xenopus laevis* angewandt. Die Proteinkinase C ist ein in den Zelltypen der Retina ubiquitär exprimiertes Enzym, welches

durch Phosphorylierung verschiedene zelluläre Prozesse reguliert. Die in den Außensegmenten der Photorezeptorzelle lokalisierten Isoformen der PKC werden dabei Ca^{2+} abhängig aktiviert (Wood *et al.*, 1997). In Photorezeptoren von Kaulquappen konnte allein durch die Stimulation der Phospholipase C (PLC), einem der PKC vorgeschalteten Enzyms gezeigt werden (Orisme & Smith, 2006), dass die Translokation von Arrestin in das Außensegment im völligen Dunkeln auslösbar ist. Zusätzlich demonstrieren die Daten der Diplomarbeit von Tobias Goldmann, dass durch die Stimulation mit PMA eine Translokation von Arrestin in das Außensegment in Photorezeptorzellen kultivierter, dunkeladaptierter Mausretinae stattfinden kann (Goldmann, 2006). In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass die PKC neben der Rhodopsinkinase an der Phosphorylierung von Rhodopsin beteiligt ist (Udovichenko *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 2003). Diese Phosphorylierung des Rezeptors durch die PKC könnte für eine Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin mitverantwortlich sein. Gerade die Phosphorylierung von Rhodopsin durch die PKC, spielt eine zentrale Rolle in der visuellen Signaltransduktion von Invertebraten und könnte somit auch in Vertebraten an visuellen Prozessen beteiligt sein. In einer aktuellen Studie konnte Invertebraten-ähnliche visuelle Signaltransduktion auch in Zellen der Vertebraten- genauer gesagt der Hühnerretina nachgewiesen werden (Contin *et al.*, 2006).

Für die Bewegung des Arrestins in das Außensegment der Photorezeptorzelle werden passive, aber auch aktive Transporte diskutiert (siehe auch Tabelle 6). In Zusammenhang mit einem mit den Mikrotubuli assoziierten aktiven Transport, wurde der sich zum Plus-Ende bewegende Motor, Kinesin II vorgeschlagen (Marszalek *et al.*, 2000). Kinesin-II ist ein heterotrimeres Kinesin, das sich aus zwei verschiedenen Motor-Domänen-tragenden Peptiden der KIF3-Familie (KIF3A und KIF3B oder KIF3C) und einem dritten nicht-Motorprotein (KAP3) zusammensetzt (Cole *et al.*, 1993; Scholey, 1996; Whitehead *et al.*, 1999). In der vorgenannten Arbeit konnte eine unübliche Verteilung von Arrestin nicht aber von Transducin in Photorezeptorinnensegmenten einer KIF3A defizienten Maus beobachtet werden. Da Kinesin II ein bekannter Motor des Opsintransportes in Photorezeptorzellen ist (Williams, 2002), könnte die Mislokalisierung von Arrestin unter dem Funktionsverlust der Kinesin II-Untereinheit auch auf einer Interaktion mit mislokalisiertem Opsin beruhen. Der direkte Transport von Arrestin über Kinesin II in der Photorezeptorzelle konnte also noch nicht nachgewiesen werden. Ein solcher Transport über Kinesin II könnte außerdem allenfalls Bewegungen von der Basis des Ciliums bis in das Außensegment der Photorezeptoren beschreiben, nicht aber die vorausgehende, von der Basis des Innensegmentes zur Basis des

Verbindungsciliums. Ferner kann vor allem die entgegengesetzte Translokation von Arrestin bei Dunkelheit ins Innensegment der Photorezeptorzelle mit Kinesin II nicht erklärt werden.

Auch für Transducin wurde bereits eine Hypothese aufgestellt, nach der dessen Transport durch eine Bindung an Opsin bewerkstelligt werden könnte (Deretic & Papermaster, 1991; Morel *et al.*, 2000). Dieser Theorie kann ebenso wenig eine auch umgekehrt stattfindende Translokation von Transducin während der Helladaptation erklären, da Opsin in der gesunden Photorezeptorzelle nur unidirektional vom Innen- in das Außensegment transportiert wird (Sung & Tai, 2000). Demnach wäre es ebenso vorstellbar, dass aktive und passive Prozesse an den Translokationen von Arrestin und Transducin in unterschiedliche „Richtungen“ beteiligt sind. Für Transducin als $\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimer konnte eine starke Bindung an die Photorezeptormembranen gezeigt werden, wohingegen die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten nach Aktivierung durch photoaktiviertes Rhodopsin an Affinität zur Membran verlieren (Kuhn, 1981). In der vorgenannten Arbeit werden weitere Argumente für die Hypothese geliefert, dass die Bewegung der Transducinuntereinheiten aus den Photorezeptoraußensegmenten ein Resultat der cytoplasmatischen Diffusion ist. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in diese Hypothese einfügen. So konnte hier gezeigt werden, dass die Bewegung von Transducin vom Außensegment in das Innensegment auch nach der Destabilisation der Cytoskelettelemente F-Aktin und Mikrotubuli unbeeinträchtigt ist. Dieser Befund spricht für eine Diffusion von Transducin während der Helladaptation. Im Gegensatz dazu sind aber beide Cytoskelettelemente während der Dunkeladaptation notwendig. Dies lässt entweder auf die Beteiligung von aktiven Transportvorgängen, oder eine direkte Bindung für Arrestin und Transducin an Cytoskelettelemente schließen (Abb. 29).

Ein weiteres Argument für die Diversität in den Transportmechanismen während Hell- und Dunkeladaptation sind die unterschiedlichen Kinetiken. Die Rückkehr des Hauptanteils des Transducins ins Außensegment der Photorezeptorzelle während der Dunkeladaptation (ca. 150-300 Min.), ist sehr viel langsamer als dessen Bewegung aus dem Außensegment während der Helladaptation (ca. 5 Min.) (Sokolov *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2004). Dabei geht man von ca. 100 Transducinmolekülen pro Sekunde für neusynthetisiertes Transducin auf dem Weg in das Außensegment, aber von ca. 5000 Transducinmolekülen pro Sekunde beim umgekehrten Weg in das Innensegment aus (Sokolov *et al.*, 2002). Ist diese Translokationsgeschwindigkeit im Dunkeln mit gemessenen Geschwindigkeiten für aktive Proteintransporte in Photorezeptorzellen vergleichbar? In einer Studie zum Opsintransport ins Außensegment, wurde auch dessen Geschwindigkeit in Abhängigkeit der täglichen Erneuerung der

Diskmembranen berechnet. Bei 87 gebildeten Disks pro Tag und ca. 20 000 Opsinen pro μm^2 Disk, ergibt sich eine notwendige Transportgeschwindigkeit durch das Verbindungscilium von ca. 72 Opsinen pro Sekunde (Liu *et al.*, 1999). Bei einer damals angenommenen Geschwindigkeit von Myosin VIIa mit 500 nm/s (ermittelt für Myosin V (Cheney *et al.*, 1993; Wolenski *et al.*, 1995)) könnten 144 Opsine/ μm^2 ciliäre Plasmamembran diese Anforderung erfüllen. Bei ähnlichen Berechnungen zu Transducin gilt es allerdings einzubeziehen, dass Transducin nicht nur an den täglich neu gebildeten Disks, sondern an den Disks des gesamten Außensegmentes benötigt wird. Bei einem Verhältnis von Rhodopsinen zu Transducin von zwölf zu eins in Photorezeptorstäbchen, würden ca. 2000 Transducinmoleküle pro μm^2 Disk benötigt (Tsang *et al.*, 1998). Bei ca. 700 Disks pro Photorezeptorzelle mit einer Gesamtoberfläche von 2600 μm^2 (Mayhew & Astle, 1997), werden ca. 5,2 Millionen Transducinmoleküle im Außensegment benötigt. Wenn ca. 80% des Transducins translociert werden, also 20% stets im Außensegment verbleiben (Sokolov *et al.*, 2002), macht das 4,16 Millionen Transducinmoleküle die sich im Dunkeln in das Außensegment bewegen. Bei einer Zeitspanne dafür von drei bis vier Stunden (Sokolov *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2004), müssten pro Sekunde ca. 310 Transducin Moleküle pro Sekunde in das Außensegment gelangen. Transducin wird nach elektronenmikroskopischen Lokalisationen im Cilium der Photorezeptorzelle (Abb. 31), im Inneren des ciliären Axonems und wohl nicht in der ciliären Membran translociert (Pulvermüller *et al.*, 2002). Dabei könnte der Widerstand im Inneren des Axonems für die Translokationsgeschwindigkeit des Transducins ins Außensegment durch Proteininteraktionen, mit beispielsweise Centrinen, eine Rolle spielen. Zusammenfassend, können weder ein aktiver Transport, noch Diffusion von Transducin in das Außensegment ausgeschlossen werden.

In den Untersuchungen von Sokolov und Mitarbeitern ist man auch der Frage nachgegangen, ob Transducin als Heterotrimer oder dessen Untereinheiten unabhängig von einander translociert werden. Die gemessenen Kinetiken ergeben eine ähnliche Geschwindigkeit bei der Translokation beider Untereinheiten (α und $\beta\gamma$) in das Außensegment, aber eine 3-fach höhere für $G\alpha_t$ zu $G\beta\gamma_t$ in das Innensegment der Photorezeptorzelle (Sokolov *et al.*, 2002). Dies ist ein Hinweis für eine getrennte Translokation der Transducinuntereinheiten während der Helladaptation. In einer anderen Studie konnte anhand von Photorezeptorzellen einer für $G\alpha_t$ defizienten Maus gezeigt werden, dass $G\beta\gamma_t$ gleichmäßig verteilt über die Kompartimente der Photorezeptorzellen in Abwesenheit von $G\alpha_t$ vorliegt (Zhang *et al.*, 2003). Diese Daten hingegen weisen darauf hin, dass Transducin als Heterotrimer translociert werden könnte. Vorstellbar wäre aber auch, dass

die Translokation der α -Untereinheit eine, dem Gradienten des $G\alpha_t$ folgende Translokation der $\beta\gamma$ -Untereinheit nachschiebt, welches wiederum den unterschiedlichen gemessenen Geschwindigkeiten (Sokolov *et al.*, 2002) entspräche. Unter Einbeziehung der gewonnenen Daten dieser beiden und weiterer Untersuchungen, wäre auch die Translokation des Heterotrimeren in eine Richtung (ins Außensegment) und die getrennte Translokation der Untereinheiten in die andere (ins Innensegment) möglich. Für diese Hypothese sprechen ferner Daten zu Phosducin. Phosducin ist ein Photorezeptor-spezifisches Protein, das mit $G\beta\gamma_t$ interagiert und dessen Affinität zur Plasmamembran herabsetzt (Lee *et al.*, 1984; Yoshida *et al.*, 1994; Gaudet *et al.*, 1996). Während der Helladaptation, nicht aber der Dunkeladaptation bindet Phosducin an $G\beta\gamma_t$ und erhöht dessen Löslichkeit (Sokolov *et al.*, 2004). In Photorezeptorzellen einer für Phosducin defizienten Mausmutante war die lichtabhängige Translokation der $\beta\gamma$ -Untereinheit von Transducin stärker beeinträchtigt, als die der α -Untereinheit. Dies weist auf eine getrennte Translokation von $\beta\gamma$ - und α -Untereinheit des Transducins hin. Phosducin könnte damit im Hellen das erneute Bilden von Heterotrimeren von Transducin unterbinden (Sokolov *et al.*, 2004).

In einer bereits zuvor erwähnten Arbeit (Zhang *et al.*, 2003) konnte die Unabhängigkeit der Transducintranslokation vom Funktionsvermögen des Arrestins nachgewiesen werden. Umgekehrt konnte die Arrestintranslokation auch in Transducin defizienten Tieren, sowie unter Defizienz der Rhodopsinkinase, beziehungsweise nicht-phosphorylierbarem Rhodopsin nachgewiesen werden (Mendez *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse zeigen zusammen die Unabhängigkeit der Arrestin Translokation von der visuellen Signaltransduktionskaskade, welches die bereits angesprochenen Hinweise zur Beteiligung weiterer Signalwege verstärkt. In der Untersuchung solcher Signalwege konnte durch Stimulation im Dunkeln eine Translokation des Arrestins, der Helladaptation gleichend, ausgelöst werden (Orisme & Smith, 2006; Goldmann, 2006). Zu Beginn dieser weiteren Signalwege steht jedoch ebenso das licht-aktivierbare Rhodopsin, da Arrestin in Mäusen mit Defekt in der Retinal-Regeneration (RPE65 K.o.) nicht mehr in das Außensegment translociert wird (Mendez *et al.*, 2003). Ob dadurch weitere von Transducin unabhängige G-Protein-vermittelte Signalwege eine Rolle spielen musste bislang noch offen bleiben. Auch durch diese Daten häufen sich also die Hinweise auf die Beteiligung verschiedener unabhängiger Mechanismen an den reversiblen lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen. Dabei entsprechen die Kinetiken der mit der Helladaptation verbundenen Translokationen eher einer auf Diffusion basierenden molekularen Bewegung, wobei die mit der Dunkeladaptation assoziierten

Translokationsgeschwindigkeiten im Bereich aktiver Proteintransporte in Photorezeptorzellen liegen (Calvert *et al.*, 2006).

Die Vielfältigkeit der in Tabelle 6 zusammengefassten Ergebnisse, die bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert wurden zeigen, dass die Frage nach passivem oder aktivem Transport von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen noch nicht abschließend beantwortet werden konnte. Abgesehen von den bisher diskutierten Faktoren zur Translokation des Transducins in Photorezeptorzellen, könnte auch ein weiterer Interaktionspartner, die Centrine (besonders Centrin 1 und 2) dabei eine Rolle spielen. Centrine sind Cytoskelett-assoziierte, Calcium-bindende Proteine am Basalkörper und im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass Centrine mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit des Transducins *in vitro* in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise interagieren (Pulvermüller *et al.*, 2002). Man nimmt an, dass Centrine an der Regulation von molekularen Bewegungen des Transducins durch das Verbindungscilium beteiligt sind. Hierbei könnten Centrine filamentöse Strukturen ausbilden, wie sie schon in anderen Zelltypen nachgewiesen wurden (Vigues *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006), die eine Art veränderliches „molekulares Sieb“ für translocierende Proteine darstellen (Giebl *et al.*, 2004). Diese Hypothese korreliert mit den Ergebnissen anderer Autoren. In der α -Transducin defizienten Photorezeptorzelle können β - und γ -Transducinuntereinheiten nicht mehr translocieren (Zhang *et al.*, 2003). In einer solchen ohne aktivierbares α -Transducin, in der visuellen Signaltransduktion „abgeschalteten“ Photorezeptorzelle, könnte der ständige Einstrom von Ca^{2+} eine Interaktion von Centrin mit $\beta\gamma$ -Transducin begünstigen und somit für die unterbundene Translokation des $\beta\gamma$ -Transducins in der genannten α -Transducinmutante mitverantwortlich sein. Somit könnten Centrine, auch durch ihre spezifische Lokalisation im Verbindungscilium der Photorezeptorzelle, eine Rolle als Calcium-abhängige, sprich Adaptations-sensitive „Gate keeper“ der Transducintranslokation spielen (Giebl *et al.*, 2006).

4.2.3 Hypothese zur lichtabhängigen Translokation von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen

Wie im vorherigen Abschnitt ausführlich beschrieben, wurden bereits vielerlei Faktoren in Zusammenhang mit den lichtabhängigen Translokationen von Proteinen in Photorezeptorzellen untersucht. In der Vielschichtigkeit und zuweilen Widersprüchlichkeit der Ergebnisse zeigt sich, dass es zur Erklärung dieser Translokationsphänomene nicht ausreichend ist, eine auf einem einzelnen Mechanismus beruhende Theorie zugrunde zu legen. Vielmehr scheint es wahrscheinlich, dass verschiedene Mechanismen an den molekularen Bewegungen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen beteiligt sind. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Anlass zur Annahme, dass sowohl aktive, wie auch passive Translokationsmechanismen für einzelne Bewegungen der genannten Proteine verantwortlich sind. Diese Annahme stützt sich auf die unterschiedliche Notwendigkeit von Cytoskelettelementen für die mit der Adaptation assoziierten Bewegungen. Für die Translokationen von Arrestin und Transducin im Dunkeln sind sowohl Aktinfilamente als auch Mikrotubuli in der Photorezeptorzelle notwendig, was auf aktive Transporte schließen lässt (Abb. 30 B und D). Diese Ergebnisse korrelieren mit Kinetiken einer langsam ablaufenden Translokation für beide Moleküle während der Dunkeladaptation, die mit Geschwindigkeiten bekannter aktiver Transportvorgänge vergleichbar sind (Liu *et al.*, 1999).

Im Gegensatz dazu laufen die Bewegungen von Arrestin und Transducin in der Helladaptation sehr viel schneller ab, welches charakteristisch für der Diffusion unterliegende molekulare Bewegungen ist (Calvert *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Einsatz Cytoskelett-destabilisierender Substanzen gezeigt werden, dass für die „schnelle“ Translokation des Transducins während der Helladaptation weder F-Aktin noch Mikrotubuli notwendig sind (Abb. 30 C). Dabei musste allerdings die Frage nach dem Bindepartner des Transducins während der Helladaptation im Innensegment noch offen bleiben. In diesem Zusammenhang wird das Protein LGN (Leu-Gly-Asn repeat-enriched) diskutiert, welches in den Innensegmenten, sowie der äußeren plexiformen Schicht der Retina lokalisiert ist (Nair *et al.*, 2005b). Dieses als Regulator der G-Proteinaktivität bekannte LGN, könnte durch seine Interaktion mit α -Transducin an dessen Translokation im Innensegment beteiligt sein (Kerov *et al.*, 2005b). In einer weitergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass die GTPase-Aktivität von α -Transducin für dessen Bewegung aus dem Innensegment in das Außensegment der Photorezeptorzelle wichtig ist (Kerov *et al.*, 2005a). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Translokation des Transducins in das Außensegment, im Gegensatz

zu der des Arrestins (Zhang *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2003), mit dem visuellen Signalweg verbunden ist.

Die gesammelten Daten verschiedenster Untersuchungen zur Translokation der Untereinheiten von Transducin in Photorezeptorzellen, wie Geschwindigkeit, gegenseitiger Abhängigkeit, Affinität zur Membran, GTPase-Aktivität und weitere, lassen vermuten, dass es α -Transducin ist, an dem die Translokationsprozesse ansetzen. Dabei könnte α -Transducin mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit als Trimer in das Außensegment translociert werden (Zhang *et al.*, 2003). Umgekehrt, sprechen Daten auch für die getrennte Bewegung des α -Transducins in das Innensegment, der die $\beta\gamma$ -Untereinheit nachfolgt (Sokolov *et al.*, 2002). Da diese Unterschiede nicht Gegenstand der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit waren, sind die G_T -Untereinheiten nicht in der schematischen Hypothese zur Translokation (Abb. 30) berücksichtigt, und Transducin hier nur als Trimer betrachtet worden. Auch im Falle des Arrestins läuft die mit der Helladaptation verbundene Translokation sehr viel schneller ab, als die während der Dunkeladaptation stattfindende. In den Experimenten unter Destabilisation der Aktinfilamente in der vorliegenden Arbeit, zeigte sich dabei kein Einfluss auf die Translokation des Arrestins ins Außensegment (Abb. 29 B, Abb. 30 A). Bei Destabilisation der Mikrotubuli allerdings, ergab sich eine unvollständige Translokation des Arrestins vom Innen- ins Außensegment der Photorezeptorzellen (Abb. 29 C). Welche Untergruppen von Mikrotubuli in der Photorezeptorzelle könnten nun für die Translokation des Arrestins notwendig sein und wenn zerstört, diese intermediäre Lokalisation verursachen? Für die Translokation von Arrestin innerhalb des Innensegmentes scheinen dabei keine Mikrotubuli nötig zu sein, da Arrestin in Thiabendazol-behandelten Photorezeptorzellen weiterhin in den apikalen Bereich des Innensegmentes gelangte. Über die Passage des Verbindungsciliums kann dabei keine Aussage getroffen werden, da die Mikrotubuli hier in den durchgeführten Experimenten nicht beeinflussbar waren. Arrestin gelangt dessen ungeachtet in den basalen Bereich des Außensegmentes unter Thiabendazolbehandlung, konnte aber nicht weiter apikal im Außensegment detektiert werden, was auf die Notwendigkeit von intakten Mikrotubuli als Fortsätze des Axonems im Außensegment schließen lässt (Abb. 30 A). Nach dieser Hypothese wären also beide diskutierten Prinzipien der Translokation auch in einer Bewegungsrichtung des Arrestins, aber in verschiedenen Kompartimenten der Photorezeptorzellen beteiligt.

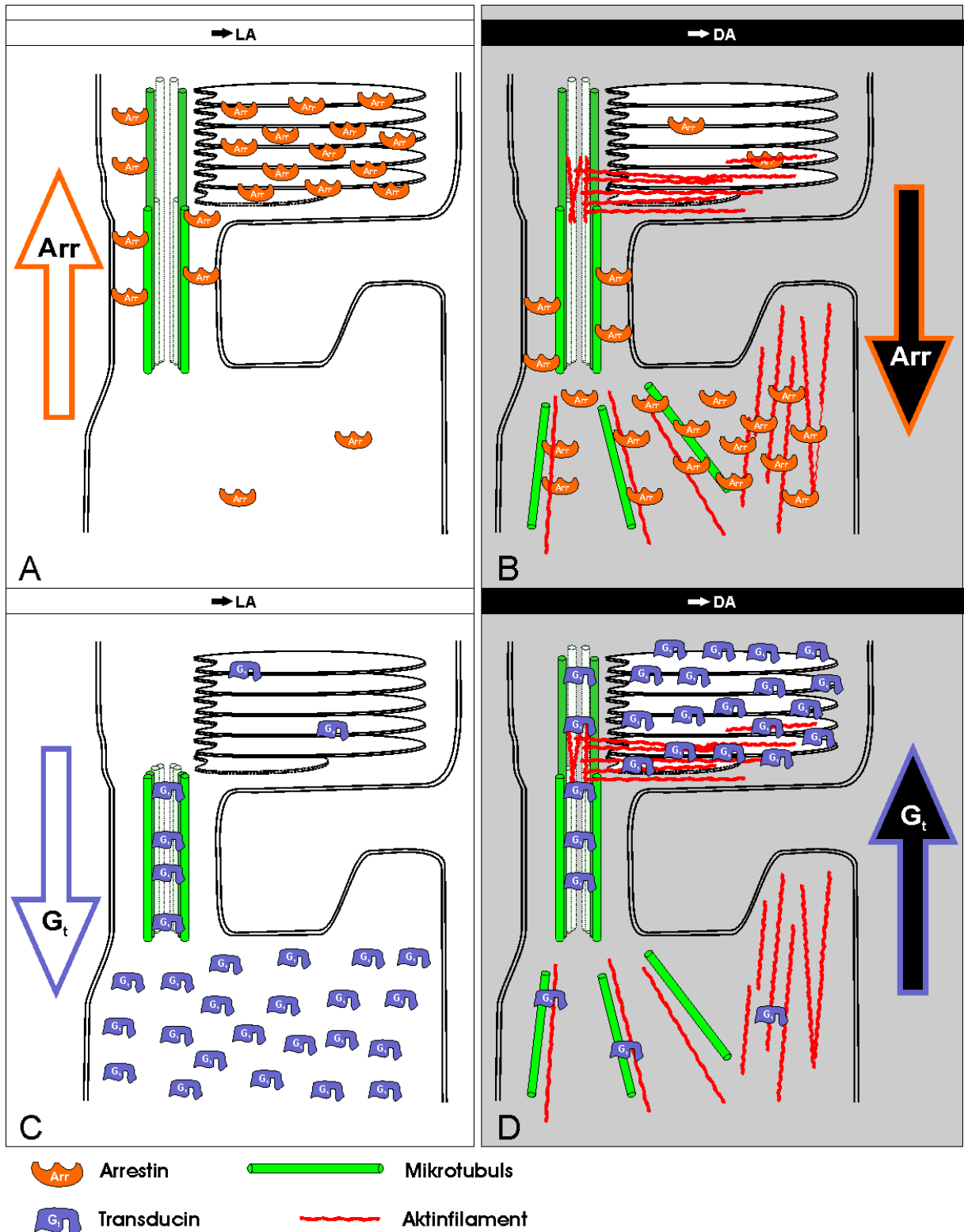


Abbildung 30: Schematische Darstellung hell- bzw. dunkeladaptierter Photorezeptorzellen. Berücksichtigt sind die Verteilungen von Arrestin (Arr) und Transducin (G_t) nach vollständiger Adaptation, sowie die beteiligten Cytoskelettelemente. Dabei sind nur die Cytoskelettelemente der Photorezeptorellen eingezeichnet, die für die jeweilige Translokation notwendig sind. Da die stabilisierten Mikrotubuli des Verbindungsciliums nicht durch die Mikrotubulidroge zerstört werden konnten, sind diese in jedem Teilschaubild eingezeichnet. Schwarz ausgefüllte Pfeile stehen für die Translokationsrichtung des entsprechenden Proteins während der Dunkeladaptation (DA), weiße ausgefüllte, für die Translokationsrichtung des entsprechenden Proteins während der Helladaptation (LA).

Neben den bereits besprochenen Anhaltspunkten zur Existenz unterschiedlicher Mechanismen für die gegensätzlichen Translokationen von Arrestin und Transducin, geben die subzellulären Lokalisationen der beiden Proteine im Verbindungscilium Anlass. Erste Experimente zur elektronenmikroskopischen Lokalisation von Arrestin und Transducin im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen mit Hilfe der Immunogoldmarkierung, geben einen Hinweis darauf, dass die beiden Proteine in unterschiedlichen Subkompartimenten des Ciliums anzutreffen sind. Das Verbindungscilium der Photorezeptorzelle beinhaltet verschiedene Subkompartimente, die im Dienste unterschiedlicher Transportvorgänge und Unterfunktionen in der Photorezeptorzelle stehen (Roepman & Wolfrum, 2007). In solchen Subkompartimenten konnte Arrestin vornehmlich außen, zwischen dem Axonem und der ciliären Membran und Transducin vornehmlich innerhalb des Axonems lokalisiert werden (Abb. 31). In Querschnitten der Verbindungscilien von Photorezeptorzellen werden diese hauptsächlichsten Verteilungen, von Transducin im Lumen des Ciliums und Arrestin zwischen Axonem und ciliärer Membran, besonders deutlich (Abb. 31 D und E). Diese Lokalisation von Arrestin an der ciliären Membran lässt die Möglichkeit eines Transports von Arrestin über das bereits angesprochene KIF3A durch das Verbindungscilium zu (Marszalek *et al.*, 2000), da das am intraflagellaren Transport (IFT) beteiligte KIF3A und auch weitere IFT-Proteine in diesem Subkompartiment gefunden werden konnten (Pazour *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2003). Ferner wurden in Querschnitten des Ciliums die Markierungshäufigkeiten in den Subkompartimenten für die beiden Proteine bestimmt und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 31 G). Danach ergibt sich eine häufigere Lokalisation von Arrestin außerhalb des Axonems, sowie eine größere Häufigkeit für Transducin innerhalb des Axonems (Pulvermüller *et al.*, 2002). In der genannten Arbeit von Pulvermüller und Mitarbeitern, konnte auf der Innenseite der axonemalen Mikrotubuli ebenfalls Centrin lokalisiert werden. Durch diese Kolokalisation mit Transducin, rückt eine mögliche regulatorische Bedeutung des Centrins in der Translokation von Transducin weiter in den Fordergrund (Pulvermüller *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004; Gießl *et al.*, 2006). Für eine zweifelsfreie Aussage mit statistischer Signifikanz, müssten allerdings noch mehr Cilienquerschnitte bezüglich der genannten Lokalisationen betrachtet und ausgewertet werden. Die beobachteten unterschiedlichen subkompartimentellen Lokalisationen sind in den schematischen Teilabbildungen (Abb. 31 C u. F) veranschaulicht und auch bereits in der Darstellung zur Hypothese (Abb. 30) berücksichtigt. Diese ersten Hinweise auf unterschiedliche Lokalisation von Arrestin und Transducin im Verbindungscilium, geben einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung unterschiedlicher Mechanismen für die Bewegung beider Proteine durch das Cilium. Da sich

Arrestin und Transducin während der Lichtadaptation in unterschiedliche Richtungen durch die Photorezeptorzelle bewegen, macht eine getrennte Lokalisation und somit räumliche Trennung der Translokationsprozesse in der Passage des Ciliums Sinn.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwar eine direkte Beteiligung aktiver Transporte von Arrestin und Transducin nicht nachgewiesen werden, aber zumindest die teilweise Abhängigkeit deren Translokationen vom Cytoskelett. Da innerhalb und außerhalb des Ciliums unterschiedliche Cytoskelett-assoziierte Proteine im Dienste des intersegmentellen Transportes arbeiten (Scholey & Anderson, 2006), ist bei eventuell aktiven Transporten von Arrestin und Transducin durch das Cilium, von der Beteiligung unterschiedlicher Mechanismen auszugehen. Die Assoziation, zumindest des Arrestins, zum Axonem, wird neben seiner unvollständigen Translokation unter Mikrotubulidestabilisation im Hellen, auch durch seine subzelluläre Lokalisation im dunkeladaptierten Außensegment deutlich. Mit der Hilfe von Immunogoldmarkierungen an Schnitten von dunkeladaptierten Photorezeptorzellen des Krallenfrosches, konnte eine Lokalisation von Arrestin mit den Ausläufern des ciliären Axonems im Außensegment weiter verfolgt werden. Zur zügigen, für die Adaptation notwendigen Distribution des Arrestins in und aus dem Außensegment, über dessen gesamte Länge, könnte dieser „Kanal“ den das Axonem im dicht mit Disks gepackten Außensegment der Photorezeptorzelle darstellt, notwendig sein.

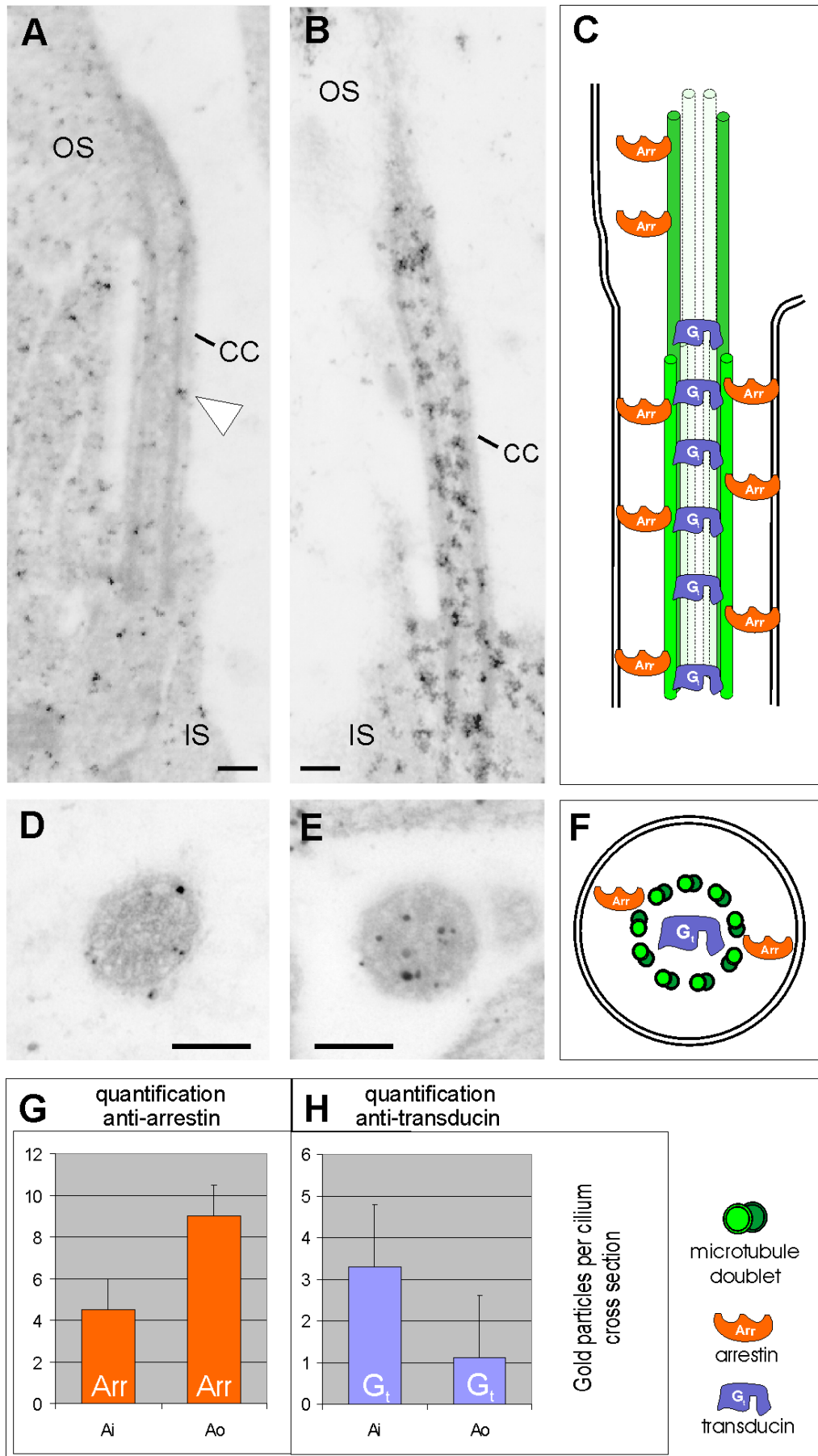


Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Analyse mit Hilfe von Immunogoldmarkierung, zur Bestimmung der Verteilung von Arrestin und Transducin in Subkompartimenten des Verbindungscilium.

A: Immunogoldmarkierung von Arrestin (anti-Arrestin 5C6.47) am Ultradünnlängsschnitt durch das Verbindungscilium (CC) einer Photorezeptorzelle in der Rattenretina. Arrestin konnte durch Immunogoldmarkierung vornehmlich zwischen Axonem und der ciliären Membran des Verbindungsciliums lokalisiert werden (siehe Pfeilspitze). **B:** Immunogoldmarkierung von Transducin (anti- γ -Transducin, P19) am Ultradünnlängsschnitt durch das Verbindungscilium (CC) einer Photorezeptorzelle in der Rattenretina. Transducin konnte durch Immunogoldmarkierung vornehmlich im inneren des Axonems im Verbindungsciliums lokalisiert werden. **C:** Schematische Darstellung des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen im Längsschnitt mit repräsentativer Lokalisation von Arrestin und Transducin. **D:** Immunogoldmarkierung von Arrestin (anti-Arrestin 5C6.47) am Ultradünnquerschnitt durch das Verbindungscilium (CC) einer Photorezeptorzelle in der Mausretina. Arrestin konnte durch Immunogoldmarkierung vornehmlich zwischen Axonem und der ciliären Membran des Verbindungsciliums lokalisiert werden. **E:** Immunogoldmarkierung von Transducin (anti- α -Transducin, A4) am Ultradünnquerschnitt durch das Verbindungscilium (CC) einer Photorezeptorzelle in der Rattenretina. Transducin konnte durch Immunogoldmarkierung vornehmlich im inneren des Axonems im Verbindungsciliums lokalisiert werden. **F:** Schematische Darstellung des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen im Querschnitt mit repräsentativer Lokalisation von Arrestin und Transducin. **G:** Quantifikationen silberverstärkter Goldpartikel Immunomarkierung von Anti-Arrestin von 7 Querschnitten von Verbindungscilien. Das Histogramm zeigt die durchschnittliche Goldpartikelanzahl/Querschnitt. Bei der Quantifikation zeigt Anti-Arrestin eine Anhäufung der Goldpartikel außerhalb des Axonems. **H:** Quantifikationen silberverstärkter Goldpartikel Immunomarkierung von Anti-G α t von 20 Querschnitten eines Verbindungsciliums. Das Histogramm zeigt die durchschnittliche Goldpartikelanzahl/Querschnitt. Bei der Quantifikation zeigt Anti-G α t eine Anhäufung der Goldpartikel an der inneren Oberfläche der axonemalen Mikrotubuli-Paarringe. Somit sind Arrestin und Transducin in unterschiedlichen Subkompartimenten des Verbindungsciliums lokalisiert. Abkürzungen der subciliären Kompartimente: Ai = Innenseite des Axonems; Ao = Cilienmembran und Außenseite des Axonems. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (Abb. (F) und (H) verändert nach Pulvermüller *et al.*, 2002). Außensegment = OS, Verbindungscilium = CC, Innensegment = IS, Größenbalken: 120 nm.

4.3 Ausblicke auf weitere Untersuchungen

Die organotypische Retinakultur konnte durch verschiedene, in der vorliegenden Arbeit beschriebene Experimente, als ein geeignetes System zur Analyse von physiologischen Prozessen und zellbiologischen Mechanismen in Photorezeptorzellen etabliert werden. Mit Hilfe dieser Retinakulturtechnik konnten die lichtabhängigen Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen unter Verwendung zellbiologischer Methoden hinsichtlich derer intrazellulären Bewegungsmechanismen untersucht werden. Darin konnte eine Abhängigkeit von Aktinfilamenten, als auch Mikrotubuli während der Dunkeladaptation von Photorezeptorzellen nachgewiesen werden. Allerdings musste hierbei bisher offen bleiben von welchen aktiven Transportvorgängen die genannten Translokationen abhängig sind. In diesem Zusammenhang konnte die Beteiligung zweier Aktin-assoziiierter Motorproteine in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden. Allerdings bleibt die Frage nach der Rolle weiterer in der Photorezeptorzelle vorkommender Motorproteine in Verbindung mit F-Aktin als auch Mikrotubuli weiterhin offen. Für die Analyse der Rolle von Motorproteinen aus den Familien der Myosine, als auch Dyneine und Kinesine könnte der Einsatz weiterer Inhibitoren liefern. Leider stand und stehen für die Vielzahl an unterschiedlichen Motorproteinen zurzeit keine spezifischen Hemmstoffe zur Verfügung. In zukünftigen Experimenten könnte der Einsatz universeller Inhibitoren, die eine Vielzahl

verschiedener Motorproteine hemmen, neue Erkenntnisse liefern. Anschließend kann dann bei einer eventuellen Identifikation einer Gruppe von Motoren, versucht werden, durch spezifischere Inhibitoren einzelne Motorproteine zu bestimmen. Durch den Nachweis der Notwendigkeit beider genannten Cytoskelettelemente für die Translokationen von Arrestin und Transducin in dunkeladaptierten Photorezeptorzellen, könnte also auch die Möglichkeit des Zusammenspiels beziehungsweise des „Hand in Hand-Arbeitens“ verschiedener Motorproteine bestehen. Auch hierbei könnte die organotypische Retinakultur ein lohnenswertes Untersuchungsobjekt darstellen, in der ein unvollständiger Transport durch die Beeinflussung eines, von mehreren beteiligten Motorproteinen in Photorezeptorzellen nachgewiesen werden könnte. Dass solche unvollständigen Translokationen in Photorezeptorzellen der Retinakultur nachweisbar sind, zeigte bereits das Experiment in der vorliegenden Arbeit unter Beeinflussung der Mikrotubuli während der lichtabhängigen Bewegung des Arrestins. Andererseits können aber auch weitere Prozesse ohne Beteiligung von Motorproteinen in Verbindung mit den Translokationen von Arrestin und Transducin in Photorezeptorzellen der Retinakultur untersucht werden, wie bereits durch die lichtunabhängige Auslösung der Arrestintranslokation gezeigt werden konnte (Goldmann, 2006). Hierbei könnte durch die Verwendung von Stimulatoren wie auch Inhibitoren spezifischer Enzyme, der von der visuellen Transduktion unabhängige Signalweg zur Translokation des Arrestins im Hellen aufgeklärt werden. Sowie die visuelle Signaltransduktion über das G-Protein Transducin, das Paradebeispiel eines G-Proteingekoppelten Rezeptorsignalwegs geworden ist, könnte auch die lichtabhängige Translokation von Komponenten der Signaltransduktionskaskade in Photorezeptorzellen Aufschluss darüber geben, wie einzelne Proteine in Zellen generell kompartimentiert werden. Für solche und weitere Studien an Photorezeptorzellen bietet sich die organotypische Kultur adulter Retinae, als nahezu einziges zugängliches Analysesystem für voll entwickelte Photorezeptorzellen an.

4.3.1 Gentransfers in die organotypische Retinakultur

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste Belege erarbeitet werden, dass es möglich ist, Zellen der kultivierten Retina zu transfizieren, das heißt, extern eingebrachte Genkonstrukte zur Expression zu bringen. Dabei konnte man mit der Hilfe unterschiedlicher Methoden verschiedene Zelltypen der Retina erreichen. Die Experimente zur Transfektion der organotypischen Retinkultur haben gezeigt, dass es durch Elektroporation, als auch mit ballistischer Transfektion möglich ist Gentransfers in Zellen der Retinakultur durchzuführen. Dabei kann gerade die Technik unter Verwendung der Gene Gun™ es ermöglichen, Zellen in

der Retina zur Expression eines Genkonstruktes zu transfizieren, die für herkömmliche experimentelle Ansätze (Lipofektion, Elektroporation usw.) unerreichbar sind. Durch die Optimierung der Transfektionsverfahren und den Einsatz von zellspezifischen Promotoren kann dieses zielgerichtete Transfizieren in weiteren Vorhaben verbessert werden. Durch Expression von transfizierten Genkonstrukten in Photorezeptorzellen, soll die organotypische Retinakultur das Studium Photorezeptor-spezifischer Funktionen von Proteinen ermöglichen. In zukünftigen experimentellen Ansätzen, soll die Retinakultur auch im Sinne einer Erprobung von gentherapeutischen Strategien genutzt werden. Der Vorteil in der Anwendung der Retinakultur liegt hier zum einen, in einer im Vergleich zum abgeschlossenen Auge sehr viel besseren Zugänglichkeit. Zum anderen können hier neu erstellte Konstrukte umgehend an den tatsächlichen Zielzellen des therapeutischen Ansatzes erprobt werden. Weiterhin kann die Retinakultur dazu dienen die Anzahl von Tierversuchen zu reduzieren. An der Retinakultur können genetische Konstrukte auf ihre grundsätzliche Eignung hin überprüft werden, bevor diese dann in tatsächlichen Gentherapieansätzen im lebenden Tier eingesetzt werden. Für diese Untersuchungen sollen Retinae von Tiermodellen verwendet werden, die, zu beim Menschen auftretenden Krankheiten, homologe Mutationen tragen. In aktuellen Experimenten an der in dieser Arbeit beschriebenen Retinakultur, werden gerade rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) evaluiert, die ein effizientes Einbringen von genetischem Material gewährleisten, sprich als „Shuttle-System“ zur Transfektion von Photorezeptorzellen dienen können (Batten *et al.*, 2005; Glushakova *et al.*, 2006). Dazu wurde die „gesunde Sequenz“, des beim Usher-Syndrom 1 C mutierten Genabschnitts in einen solchen Adeno-assoziierten Virus kloniert. Dieser Virus soll nun zur Transfektion von Photorezeptorzellen in der Retinakultur eingesetzt und die Expression des therapeutischen Genproduktes, beziehungsweise der Phänotyp vor einem dafür defizienten Hintergrund analysiert werden. Solche rAAV-Systeme wurden bereits in klinischen Gentherapiestudien der Phase II erfolgreich eingesetzt und bieten daher auch nach einer Erprobung in der Retinakultur eine Möglichkeit zum tatsächlichen direkten therapeutischen Einsatz im lebenden Organismus.

5 Zusammenfassung

Photorezeptorzellen der Vertebraten sind hoch spezialisierte, visuell sensorische Neurone in der Retina, die die Lichtinformation in ein neuronales Signal umwandeln. Durch ihre Einbindung in die Retina im Gesamtorgan Auge, sind Photorezeptorzellen im Organismus für zellbiologische Analysen, wie beispielsweise unter Einsatz pharmakologischer Substanzen, nur schwer zugänglich. Demgegenüber ist bei der Nutzung von Zellkulturtechniken eine Beeinflussung oder externe Manipulation von Zellen mit geringem Aufwand möglich. Bei Etablierungsversuchen von Primärkulturen von Photorezeptorzellen zeigte sich jedoch, dass diese rasch ihre spezifische Kompartimentierung und das damit verbundene (lichtsensitive) Funktionsvermögen verlieren.

Eine Alternative zur Einzelzellkultur bietet die Kultivierung der Retina als organotypisches Gewebe, in der, durch den überlebenswichtigen Kontakt der retinalen Zellen zu einander, deren Morphologie und Funktionsvermögen erhalten bleibt. In der vorliegenden Arbeit konnte durch Optimierung der Kultivierungstechnik erstmals die adulte Retina für mehrere Tage intakt kultiviert und deren Vitalität und physiologische Aktivität nachgewiesen werden.

Nach dem Nachweis der Eignung der organotypischen Retinakultur, stand diese nun für zellbiologische Analysen von Photorezeptorzellen zur Verfügung. Die Langzeitadaptation von Photorezeptorzellen geht einher mit der Translokation der Proteine Arrestin und Transducin. Doch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser lichtabhängigen molekularen Bewegungen bislang noch nicht verstanden. Im Kontext der Diskussion um Diffusion oder aktivem Transport der genannten Translokationen, wurden in der vorliegenden Arbeit Experimente zur Abhängigkeit vom Cytoskelett durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die gegensätzlichen Translokationen von Arrestin und Transducin während der Dunkeladaptation vom Aktin-, als auch Mikrotubulicytoskelett abhängig sind. Demgegenüber sind es die während der Helladaptation stattfindenden Translokationen nicht. Diese Befunde verweisen damit auf unterschiedliche Mechanismen für die untersuchten molekularen Bewegungen während der Dunkel- und Helladaptation, und das im Falle des Arrestins auch verschiedenen Mechanismen zusammen oder in einer Abfolge für die Bewegung durch verschiedene Zellkompartimente notwendig sind. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit die Eignung der Retinakulturtechnik für Gentransfers in retinale Zellen mittels verschiedener Methoden gezeigt werden.

Die organotypische Gewebekultur der adulten Retina erweist sich als ein Analysesystem mit dem zellbiologische Untersuchungen an ausdifferenzierten

Photorezeptorzellen durchgeführt werden können, die im lebenden Tier, bzw. der Zellkultur nicht möglich sind. Erfolgreiche Pharmakologische Beeinflussung, sowie Gentransfer in Zellen der Retinakultur prädestinieren die Retinakultur für zellbiologische und Proteinfunktionsanalysen. Dabei kann sie ferner als Modellsystem zur Evaluation von Therapiestrategien zu Retinadystrophien dienen und das ohne, oder zumindest in einer Reduktion von Tierversuchen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams RA, Liu X, Williams DS, Newton AC (2003) Differential spatial and temporal phosphorylation of the visual receptor, rhodopsin, at two primary phosphorylation sites in mice exposed to light. *Biochem. J.* 374:537-543
- Albertini S (1990) Analysis of nine known or suspected spindle poisons for mitotic chromosome malsegregation using *Saccharomyces cerevisiae* D61.M. *Mutagenesis* 5:453-459
- Applebury ML, Hargrave PA (1986) Molecular biology of the visual pigments. *Vision Res.* 26:1881-1895
- Arikawa K, Williams DS (1993) Acetylated alpha-tubulin in the connecting cilium of developing rat photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34:2145-2149
- Arshavsky VY (2002) Rhodopsin phosphorylation: from terminating single photon responses to photoreceptor dark adaptation. *Trends Neurosci.* 25:124-126
- Arshavsky VY (2003) Protein translocation in photoreceptor light adaptation: a common theme in vertebrate and invertebrate vision. *Sci. STKE.* 2003:E43
- Bahner M, Frechter S, Da Silva N, Minke B, Paulsen R, Huber A (2002) Light-regulated subcellular translocation of *Drosophila* TRPL channels induces long-term adaptation and modifies the light-induced current. *Neuron* 34:83-93
- Bahner M, Sander P, Paulsen R, Huber A (2000) The visual G protein of fly photoreceptors interacts with the PDZ domain assembled INAD signaling complex via direct binding of activated Galpha(q) to phospholipase cbeta. *J. Biol. Chem.* 275:2901-2904
- Baker SA, Freeman K, Luby-Phelps K, Pazour GJ, Besharse JC (2003) IFT20 links kinesin II with a mammalian intraflagellar transport complex that is conserved in motile flagella and sensory cilia. *J. Biol. Chem.* 278:34211-34218
- Barden JA, Miki M, Hambly BD, Dos Remedios CG (1987) Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *Eur. J. Biochem.* 162:583-588
- Baron AT, Salisbury JL (1988) Identification and localization of a novel, cytoskeletal, centrosome-associated protein in PtK2 cells. *J. Cell Biol.* 107:2669-2678
- Battelle BA (2002) Circadian efferent input to *Limulus* eyes: anatomy, circuitry, and impact. *Microsc. Res. Tech.* 58:345-355
- Batten ML, Imanishi Y, Tu DC, Doan T, Zhu L, Pang J, Glushakova L, Moise AR, Baehr W, Van Gelder RN, Hauswirth WW, Rieke F, Palczewski K (2005) Pharmacological and rAAV gene therapy rescue of visual functions in a blind mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS. Med.* 2:e333
- Beazley LD, Perry VH, Baker B, Darby JE (1987) An investigation into the role of ganglion cells in the regulation of division and death of other retinal cells. *Brain Res.* 430:169-184

- Bemelmans AP, Kostic C, Crippa SV, Hauswirth WW, Lem J, Munier FL, Seeliger MW, Wenzel A, Arsenijevic Y (2006) Lentiviral gene transfer of RPE65 rescues survival and function of cones in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS. Med.* 3:e347
- Besharse JC, Horst CJ (1990) The photoreceptor connecting cilium - a model for the transition zone. In: Bloodgood RA (ed) *Ciliary and flagellar membranes* Plenum, New York, pp 389-417
- Binder LI, Rosenbaum JL (1978) The in vitro assembly of flagellar outer doublet tubulin. *J. Cell Biol.* 79:500-515
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523
- Bluemink JG (1978) Use of cytochalasins in the study of amphibian development. *Front Biol.* 46:113-142
- Bok D (1993) The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J. Cell Sci. Suppl* 17:189-195
- Bonder EM, Fishkind DJ, Mooseker MS (1983) Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell* 34:491-501
- Borwein B (1985) Scanning electron microscopy in retinal research. *Scan Electron Microsc.* 279-301
- Brann MR, Cohen LV (1987) Diurnal expression of transducin mRNA and translocation of transducin in rods of rat retina. *Science* 235:585-587
- Broekhuysen RM, Tolhuizen EF, Janssen AP, Winkens HJ (1985) Light induced shift and binding of S-antigen in retinal rods. *Curr. Eye Res.* 4:613-618
- Brown ME, Bridgman PC (2004) Myosin function in nervous and sensory systems. *J. Neurobiol.* 58:118-130
- Burkholder JK, Decker J, Yang NS (1993) Rapid transgene expression in lymphocyte and macrophage primary cultures after particle bombardment-mediated gene transfer. *J. Immunol. Methods* 165:149-156
- Burns ME, Arshavsky VY (2005) Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* 48:387-401
- Burnside B (1978) Thin (actin) and thick (myosinlike) filaments in cone contraction in the teleost retina. *J. Cell Biol.* 78:227-246
- Caffé AR, Ahuja P, Holmqvist B, Azadi S, Forsell J, Holmqvist I, Soderpalm AK, van Veen T (2001a) Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium. *J. Chem. Neuroanat.* 22:263-273
- Caffé AR, Soderpalm AK, Holmqvist I, van Veen T (2001b) A combination of CNTF and BDNF rescues rd photoreceptors but changes rod differentiation in the presence of RPE in retinal explants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42:275-282

- Caffé AR, Visser H, Jansen HG, Sanyal S (1989) Histotypic differentiation of neonatal mouse retina in organ culture. *Curr. Eye Res.* 8:1083-1092
- Calvert PD, Strissel KJ, Schiesser WE, Pugh EN, Jr., Arshavsky VY (2006) Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors. *Trends Cell Biol.* 16:560-568
- Caruso G, Bisegna P, Shen L, Andreucci D, Hamm HE, DiBenedetto E (2006) Modeling the role of incisures in vertebrate phototransduction. *Biophys. J.* 91:1192-1212
- Casella JF, Flanagan MD, Lin S (1981) Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* 293:302-305
- Chaitin MH, Burnside B (1989) Actin filament polarity at the site of rod outer segment disk morphogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:2461-2469
- Chaitin MH, Schneider BG, Hall MO, Papermaster DS (1984) Actin in the photoreceptor connecting cilium: immunocytochemical localization to the site of outer segment disk formation. *J. Cell Biol.* 99:239-247
- Chalfie M, Thomson JN (1982) Structural and functional diversity in the neuronal microtubules of *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 93:15-23
- Chen J, Simon MI, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM (1999) Increased susceptibility to light damage in an arrestin knockout mouse model of Oguchi disease (stationary night blindness). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:2978-2982
- Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, Forscher P, Larson RE, Mooseker MS (1993) Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75:13-23
- Cole DG, Chinn SW, Wedaman KP, Hall K, Vuong T, Scholey JM (1993) Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs. *Nature* 366:268-270
- Contin MA, Verra DM, Guido ME (2006) An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. *FASEB J.*
- Cooper JA (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105:1473-1478
- Cronin MA, Diao F, Tsunoda S (2004) Light-dependent subcellular translocation of Gq{alpha} in *Drosophila* photoreceptors is facilitated by the photoreceptor-specific myosin III NINAC. *J. Cell Sci.* 117:4797-4806
- Danscher G (1981) Histochemical demonstration of heavy metals: A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochem.* 71:1-16
- Denisov IG, Grinkova YV, Lazarides AA, Sligar SG (2004) Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* 126:3477-3487

- Deretic D (2004) From the golgi to the rod outer segment: formation, movement, docking and fusion of rhodopsin transport carriers. In: Williams DS (ed) *Photoreceptor Cell Biology and Inherited Retinal Degeneration*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp 29-64
- Deretic D, Papermaster DS (1991) Polarized sorting of rhodopsin on post-Golgi membranes in frog retinal photoreceptor cells. *J. Cell Biol.* 113:1281-1293
- Devary O, Heichal O, Blumenfeld A, Cassel D, Suss E, Barash S, Rubinstein CT, Minke B, Selinger Z (1987) Coupling of photoexcited rhodopsin to inositol phospholipid hydrolysis in fly photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:6939-6943
- Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83:433-473
- Dosé A, Lin-Jones J, Burnside B (2004) Myosin III in Photoreceptors: What Does It Do? In: Williams DS (ed) *Cell Biology and Related Disease of the Outer Retina Cell Biology and Related Disease of the Outer Retina*, Singapore, pp 133-162
- Dosé AC, Burnside B (2002) A class III myosin expressed in the retina is a potential candidate for Bardet-Biedl syndrome. *Genomics* 79:621-624
- Dosé AC, Hillman DW, Wong C, Sohlberg L, Lin-Jones J, Burnside B (2003) Myo3A, one of two class III myosin genes expressed in vertebrate retina, is localized to the calycal processes of rod and cone photoreceptors and is expressed in the sacculus. *Mol. Biol. Cell* 14:1058-1073
- Downing KH, Nogales E (1998) Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:16-22
- Eckmiller MS (2000) Microtubules in a rod-specific cytoskeleton associated with outer segment incisures. *Vis. Neurosci.* 17:711-722
- El Amraoui A, Sahly I, Picaud S, Sahel J, Abitbol M, Petit C (1996) Human Usher 1B/mouse shaker-1: the retinal phenotype discrepancy explained by the presence/absence of myosin VIIA in the photoreceptor cells. *Hum. Mol. Genet.* 5:1171-1178
- Eldred WD, Zucker C, Karten HJ, Yazulla S (1983) Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 31:285-292
- Elias R, Sezate S, Cao W, McGinnis J (2004) Temporal kinetics of the light/dark translocation and compartmentation of arrestin and alpha-transducin in mouse photoreceptor cells. *Molecular Vision* 10:672-681
- Engelsberg K, Ehinger B, Wasselius J, Johansson K (2004) Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 242:229-239
- Evans JP, Schultz RM, Kopf GS (1995) Identification and localization of integrin subunits in oocytes and eggs of the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 40:211-220

- Fain GL (2006) Why photoreceptors die (and why they don't). *Bioessays* 28:344-354
- Fain GL, Lisman JE (1993) Photoreceptor degeneration in vitamin A deprivation and retinitis pigmentosa: the equivalent light hypothesis. *Exp. Eye Res.* 57:335-340
- Fain GL, Lisman JE (1999) Light, Ca²⁺, and photoreceptor death: new evidence for the equivalent-light hypothesis from arrestin knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:2770-2772
- Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y (2001) Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev.* 81:117-151
- Fintz AC, Audo I, Hicks D, Mohand-Said S, Leveillard T, Sahel J (2003) Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:818-825
- Frank DJ, Noguchi T, Miller KG (2004) Myosin VI: a structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:189-194
- Frechter S, Minke B (2006) Light-regulated translocation of signaling proteins in *Drosophila* photoreceptors. *J. Physiol Paris* 99:133-139
- Gaudet R, Bohm A, Sigler PB (1996) Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin. *Cell* 87:577-588
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493-501
- Germer A, Kuhnel K, Grosche J, Friedrich A, Wolburg H, Price J, Reichenbach A, Mack AF (1997) Development of the neonatal rabbit retina in organ culture. 1. Comparison with histogenesis in vivo, and the effect of a gliotoxin (alpha-aminoadipic acid). *Anat. Embryol. (Berl)* 196:67-79
- Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Brown KA, Antonio M, Beisel KW, Steel KP, Brown SD (1995) A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature* 374:62-64
- Gießl A (2004) Molekulare Charakterisierung der Centrin-Isoformen in der Retina von Säugetieren. Dissertation Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Gießl A, Trojan P, Pulvermüller A, Wolfrum U (2004) Centrins, potential regulators of transducin translocation in photoreceptor cells. In: Williams DS (ed) *Cell Biology and Related Disease of the Outer Retina*. World Scientific Publishing Company Pte Ltd, Singapore, pp 195-222
- Gießl A, Trojan P, Rausch S, Pulvermüller A, Wolfrum U (2006) Centrins, gatekeepers for the light-dependent translocation of transducin through the photoreceptor cell connecting cilium. *Vision Res.* 46:4502-4509

- Glushakova LG, Timmers AM, Issa TM, Cortez NG, Pang J, Teusner JT, Hauswirth WW (2006) Does recombinant adeno-associated virus-vectored proximal region of mouse rhodopsin promoter support only rod-type specific expression in vivo? *Mol. Vis.* 12:298-309
- Goldmann T (2006) Die adulte organotypische Retinakultur als Analysesystem für retinale Zellbiologie und Gentransferstrategien. Diplomarbeit Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Goldstein LS, Yang Z (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:39-71
- Goodson HV, Valetti C, Kreis TE (1997) Motors and membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:18-28
- Gorodovikova EN, Senin II, Philippov PP (1994) Calcium-sensitive control of rhodopsin phosphorylation in the reconstituted system consisting of photoreceptor membranes, rhodopsin kinase and recoverin. *FEBS Lett.* 353:171-172
- Haidle AM, Myers AG (2004) An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:12048-12053
- Haimo LT, Rosenbaum JL (1981) Cilia, flagella, and microtubules. *J. Cell Biol.* 91:125s-130s
- Haire SE, Pang J, Boye SL, Sokal I, Craft CM, Palczewski K, Hauswirth WW, Semple-Rowland SL (2006) Light-Driven Cone Arrestin Translocation in Cones of Postnatal Guanylate Cyclase-1 Knockout Mouse Retina Treated with AAV-GC1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47:3745-3753
- Hardie R (2002) Adaptation through translocation. *Neuron* 34:3-5
- Hardie RC (2001) Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 204:3403-3409
- Hardie RC (2003) Phototransduction: shedding light on translocation. *Curr. Biol.* 13:R775-R777
- Hardie RC, Minke B (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 8:643-651
- Heck M, Hofmann KP (2001) Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *J. Biol. Chem.* 276:10000-10009
- Heiduschka P, Fischer D, Thanos S (2004) [Neuroprotection and regeneration after traumatic lesion of the optic nerve]. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 221:684-701
- Hild W, Callas G (1967) The behavior of retinal tissue in vitro, light and electron microscopic observations. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 80:1-21
- Hirokawa N (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:74-81

- Hong DH, Pawlyk B, Sokolov M, Strissel KJ, Yang J, Tulloch B, Wright AF, Arshavsky VY, Li T (2003) RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:2413-2421
- Horst CJ, Forestner DM, Besharse JC (1987) Cytoskeletal-membrane interactions: a stable interaction between cell surface glycoconjugates and doublet microtubules of the photoreceptor connecting cilium. *J. Cell Biol.* 105:2973-2987
- Horst CJ, Johnson LV, Besharse JC (1990) Transmembrane assemblage of the photoreceptor connecting cilium and motile cilium transition zone contain a common immunologic epitope. *Cell Motil. Cytoskeleton* 17:329-344
- Inoue A, Saito J, Ikebe R, Ikebe M (2002) Myosin IXb is a single-headed minus-end-directed processive motor. *Nat. Cell Biol.* 4:302-306
- Itabashi T, Mikami K, Asai H (2003) Characterization of the spasmin 1 gene in *Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe (protozoa, ciliophora) and its relation to other spasmins and centrins. *Res. Microbiol.* 154:361-367
- Kalhammer G, Bahler M (2000) Unconventional myosins. *Essays Biochem.* 35:33-42
- Kaplan MW, Iwata RT, Sears RC (1987) Lengths of immunolabeled ciliary microtubules in frog photoreceptor outer segments. *Exp. Eye Res.* 44:623-632
- Kerov VS, Chen D, Moussaif M, Chen YJ, Chen CK, Artemyev NO (2005a) Transducin activation state controls its light-dependent translocation in rod photoreceptors. *J. Biol. Chem.*
- Kerov VS, Natochin M, Artemyev NO (2005b) Interaction of transducin-alpha with LGN, a G-protein modulator expressed in photoreceptor cells. *Mol. Cell Neurosci.* 28:485-495
- Kiselev A, Socolich M, Vinos J, Hardy RW, Zuker CS, Ranganathan R (2000) A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*. *Neuron* 28:139-152
- Kitamoto J, Libby RT, Gibbs D, Steel KP, Williams DS (2005) Myosin VI is required for normal retinal function. *Exp. Eye Res.* 81:116-120
- Kosloff M, Elia N, Joel-Almagor T, Timberg R, Zars TD, Hyde DR, Minke B, Selinger Z (2003) Regulation of light-dependent Gqalpha translocation and morphological changes in fly photoreceptors. *EMBO J.* 22:459-468
- Kress GJ, Reynolds IJ (2005) Dopaminergic neurotoxins require excitotoxic stimulation in organotypic cultures. *Neurobiol. Dis.* 20:639-645
- Kuhn H (1981) Interactions of rod cell proteins with the disc membrane: influence of light, ionic strength, and nucleotides. *Curr. Top. Membr. Transp.*
- LaVail MM (1971) Formation of extracellular nuclear masses in organotypic cultures of rat retina. *Dev. Biol.* 26:346-352
- Lawen A (2003) Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 25:888-896

- Lee RH, Brown BM, Lolley RN (1984) Light-induced dephosphorylation of a 33K protein in rod outer segments of rat retina. *Biochemistry* 23:1972-1977
- Lee SJ, Montell C (2004) Light-dependent translocation of visual arrestin regulated by the NINAC myosin III. *Neuron* 43:95-103
- Lee TK, McTaggart KE, Sieving PA, Heckenlively JR, Levin AV, Greenberg J, Weleber RG, Tong PY, Anhalt EF, Powell BR, MacDonald IM (2003) Clinical diagnoses that overlap with choroideremia. *Can. J. Ophthalmol.* 38:364-372
- Lee YJ, Dobbs MB, Verardi ML, Hyde DR (1990) *dgg*: a drosophila gene encoding a visual system-specific G alpha molecule. *Neuron* 5:889-898
- Leveillard T, Mohand-Said S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clerin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, Dolle P, Poch O, Lambrou G, Sahel JA (2004) Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat. Genet.* 36:755-759
- Levy YY, Lai EY, Remillard SP, Heintzelman MB, Fulton C (1996) Centrin is a conserved protein that forms diverse associations with centrioles and MTOCs in *Naegleria* and other organisms. *Cell Motil. Cytoskeleton* 33:298-323
- Li S, Sandercock AM, Conduit P, Robinson CV, Williams RL, Kilmartin JV (2006) Structural role of Sfilp-centrin filaments in budding yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* 173:867-877
- Libby RT, Lillo C, Kitamoto J, Williams DS, Steel KP (2004) Myosin Va is required for normal photoreceptor synaptic activity. *J. Cell Sci.* 117:4509-4515
- Lin-Jones J, Parker E, Wu M, Dosé A, Burnside B (2004) Myosin 3A transgene expression produces abnormal actin filament bundles in transgenic *Xenopus laevis* rod photoreceptors. *J. Cell Sci.* 117:5825-5834
- Liu X, Udovichenko IP, Brown SD, Steel KP, Williams DS (1999) Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J. Neurosci.* 19:6267-6274
- Liu X, Vansant G, Udovichenko IP, Wolfrum U, Williams DS (1997) Myosin VIIa, the product of the Usher 1B syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 37:240-252
- Liu XZ, Hope C, Walsh J, Newton V, Ke XM, Liang CY, Xu LR, Zhou JM, Trump D, Steel KP, Bunday S, Brown SD (1998) Mutations in the myosin VIIA gene cause a wide phenotypic spectrum, including atypical Usher syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 63:909-912
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J (2004) *Molecular cell biology*/Harvey Lodish. W. H. Freeman and Company,
- Lucas DR, Trowell OA (1958) In vitro culture of the eye and the retina of the mouse and rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 6:178-182
- Luduena RF, Roach MC (1991) Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimitotic and antimicrotubule agents. *Pharmacol. Ther.* 49:133-152

- Mandelkow E, Mandelkow EM (1995) Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:72-81
- Marco-Gomariz MA, Hurtado-Montalban N, Vidal-Sanz M, Lund RD, Villegas-Perez MP (2006) Phototoxic-induced photoreceptor degeneration causes retinal ganglion cell degeneration in pigmented rats. *J. Comp Neurol.* 498:163-179
- Marshall WF, Nonaka S (2006) Cilia: tuning in to the cell's antenna. *Curr. Biol.* 16:R604-R614
- Marszalek JR, Liu X, Roberts EA, Chui D, Marth JD, Williams DS, Goldstein LSB (2000) Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors. *Cell* 102:175-187
- Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H (1997) Target sites of anthelmintics. *Parasitology* 114 Suppl:S111-S124
- Matsuda T, Cepko CL (2004) Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:16-22
- Mayhew TM, Astle D (1997) Photoreceptor number and outer segment disk membrane surface area in the retina of the rat: stereological data for whole organ and average photoreceptor cell. *J. Neurocytol.* 26:53-61
- McGinnis JF, Matsumoto B, Whelan JP, Cao W (2002) Cytoskeleton participation in subcellular trafficking of signal transduction proteins in rod photoreceptor cells. *J Neurosci Res.* 67:290-297
- Mendez A, Burns ME, Sokal I, Dizhoor AM, Baehr W, Palczewski K, Baylor DA, Chen J (2001) Role of guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs) in setting the flash sensitivity of rod photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:9948-9953
- Mendez A, Lem J, Simon M, Chen J (2003) Light-dependent translocation of arrestin in the absence of rhodopsin phosphorylation and transducin signaling. *J. Neurosci.* 23:3124-3129
- Molday RS, Kaupp UB (2000) Ion channels of vertebrate photoreceptors. In: Stavenga DG, DeGrip WJ, Pugh EN Jr (ed) *Molecular mechanism in visual transduction* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam:143-182
- Morel V, Poschet R, Traverso V, Deretic D (2000) Towards the proteome of the rhodopsin-bearing post-Golgi compartment of retinal photoreceptor cells. *Electrophoresis* 21:3460-3469
- Moritz OL, Tam BM, Papermaster DS, Nakayama T (2001) A functional rhodopsin-green fluorescent protein fusion protein localizes correctly in transgenic *Xenopus laevis* retinal rods and is expressed in a time-dependent pattern. *J. Biol. Chem.* 276:28242-28251
- Mosinger OJ, Deckwerth TL, Knudson CM, Korsmeyer SJ (1998) Suppression of developmental retinal cell death but not of photoreceptor degeneration in Bax-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:1713-1720

- Muresan V, Besharse JC (1994) Complex intermolecular interactions maintain a stable linkage between the photoreceptor connecting cilium axoneme and plasma membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton* 28:213-230
- Musch A (2004) Microtubule organization and function in epithelial cells. *Traffic*. 5:1-9
- Nair KS, Hanson SM, Kennedy MJ, Hurley JB, Gurevich VV, Slepak VZ (2004) Direct binding of visual arrestin to microtubules determines the differential subcellular localization of its splice variants in rod photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 279:41240-41248
- Nair KS, Hanson SM, Mendez A, Gurevich EV, Kennedy MJ, Shestopalov VI, Vishnivetskiy SA, Chen J, Hurley JB, Gurevich VV, Slepak VZ (2005a) Light-dependent redistribution of arrestin in vertebrate rods is an energy-independent process governed by protein-protein interactions. *Neuron* 46:555-567
- Nair KS, Mendez A, Blumer JB, Rosenzweig DH, Slepak VZ (2005b) The presence of a Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN), a putative binding partner of transducin, in ROD photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:383-389
- O'Connell CB, Mooseker MS (2003) Native Myosin-IXb is a plus-, not a minus-end-directed motor. *Nat. Cell Biol.* 5:171-172
- O'Connor P, Burnside B (1981) Actin-dependent cell elongation in teleost retinal rods: requirement for actin filament assembly. *J. Cell Biol.* 89:517-524
- Offermanns S (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 83:101-130
- Ogilvie JM (2001) Photoreceptor rescue in an organotypic model of retinal degeneration. *Prog. Brain Res.* 131:641-648
- Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM, Fleming TT (1999) A reliable method for organ culture of neonatal mouse retina with long-term survival. *J. Neurosci. Methods* 87:57-65
- Oliver G, Gruss P (1997) Current views on eye development. *Trends Neurosci.* 20:415-421
- Orisme W, Smith WC (2006) Arrestin migrates to the rod outer segments in response to m-3MFBS an activator of Phospholipase C. *Rhodopsin Advances and Perspectives Tenth Annual Vision Research Conference*
- Pagh-Roehl K, Wang E, Burnside B (1991) Posttranslational modifications of tubulin in teleost photoreceptor cytoskeletons. *Cell Mol. Neurobiol.* 11:593-610
- Palczewski K, Polans AS, Baehr W, Ames JB (2000) Ca²⁺-binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *Bioessays* 22:337-350
- Papermaster DS (2002) The birth and death of photoreceptors: the Friedenwald Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:1300-1309
- Papermaster DS, Schneider BG, DeFoe D, Besharse JC (1986) Biosynthesis and vectorial transport of opsin on vesicles in retinal rod photoreceptors. *J. Histochem. Cytochem.* 34:5-16

- Pavlidis M, Fischer D, Thanos S (2000) Photoreceptor degeneration in the RCS rat attenuates dendritic transport and axonal regeneration of ganglion cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:2318-2328
- Pazour GJ, Baker SA, Deane JA, Cole DG, Dickert BL, Rosenbaum JL, Witman GB, Besharse JC (2002) The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J. Cell Biol.* 157:103-113
- Pazour GJ, Rosenbaum JL (2002) Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol.* 12:551-555
- Peet JA, Bragin A, Calvert PD, Nikonov SS, Mani S, Zhao X, Besharse JC, Pierce EA, Knox BE, Pugh EN, Jr. (2004) Quantification of the cytoplasmic spaces of living cells with EGFP reveals arrestin-EGFP to be in disequilibrium in dark adapted rod photoreceptors. *J. Cell Sci.* 117:3049-3059
- Perez-Leon J, Frech MJ, Schroder JE, Fischer F, Kneussel M, Wassle H, Backus KH (2003) Spontaneous synaptic activity in an organotypic culture of the mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:1376-1387
- Peterson JJ, Orisme W, Fellows J, McDowell JH, Shelamer CL, Dugger DR, Smith WC (2005) A role for cytoskeletal elements in the light-driven translocation of proteins in rod photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:3988-3998
- Peterson JJ, Tam BM, Moritz OL, Shelamer CL, Dugger DR, McDowell JH, Hargrave PA, Papermaster DS, Smith WC (2003) Arrestin migrates in photoreceptors in response to light: a study of arrestin localization using an arrestin-GFP fusion protein in transgenic frogs. *Exp. Eye Res.* 76:553-563
- Philp NJ, Chang W, Long K (1987) Light-stimulated protein movement in rod photoreceptor cells of the rat retina. *FEBS Lett.* 225:127-132
- Pignatelli V, Strettoi E (2004) Bipolar cells of the mouse retina: a gene gun, morphological study. *J. Comp Neurol.* 476:254-266
- Pisano C, Battistoni A, Antoccia A, Degrassi F, Tanzarella C (2000) Changes in microtubule organization after exposure to a benzimidazole derivative in Chinese hamster cells. *Mutagenesis* 15:507-515
- Pugh EN Jr, Lamb T (2000) Phototransducin in vertebrate rods and cones: Molecular mechanism of amplification, recovery and light adaptation. In: Stavenga DG, DeGrip WJ, Pugh EN Jr (ed) *Molecular mechanism in visual transduction* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam:183-255
- Pulvermüller A, Gießl A, Heck M, Wottrich R, Schmitt A, Ernst OP, Choe HW, Hofmann KP, Wolfrum U (2002) Calcium-dependent assembly of centrin-G-protein complex in photoreceptor cells. *Molecular and Cellular Biology* 22:2194-2203
- Quinlan RA, Pogson CI, Gull K (1980) The influence of the microtubule inhibitor, methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) on nuclear division and the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 46:341-352

- Rattner A, Sun H, Nathans J (1999) Molecular genetics of human retinal disease. *Annu. Rev. Genet.* 33:89-131
- Rebrik TI, Kotelnikova EA, Korenbrot JI (2000) Time course and Ca(2+) dependence of sensitivity modulation in cyclic GMP-gated currents of intact cone photoreceptors. *J. Gen. Physiol* 116:521-534
- Reidel B, Orisme W, Goldmann T, Smith WC, Wolfrum U (2006) Photoreceptor vitality in organotypic cultures of mature vertebrate retinas validated by light-dependent molecular movements. *Vision Res.* 46:4464-4471
- Reiners J, Nagel-Wolfrum K, Jürgens K, Märker T, Wolfrum U (2006) Molecular basis of human Usher syndrome - Deciphering the meshes of the Usher protein network provides insights into the pathomechanisms of Usher disease -. *Exp Eye Res.* 83:97-119
- Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I (2004) A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J. Mol. Graph. Model.* 23:275-284
- Roepman R, Wolfrum U (2007) Protein networks and complexes in photoreceptor cilia. In: Faupel M and Bertrand E (ed) *Subcellular Fractionation and Proteomics*, Springer, Hamburg (eingereicht)
- Rohlich P (1975) The sensory cilium of retinal rods is analogous to the transitional zone of motile cilia. *Cell Tissue Res.* 161:421-430
- Roizenblatt R, Weiland JD, Carcieri S, Qiu G, Behrend M, Humayun MS, Chow RH (2006) Nanobiolistic delivery of indicators to the living mouse retina. *J. Neurosci. Methods* 153:154-161
- Roof DJ, Heth CA (1988) Expression of transducin in retinal rod photoreceptor outer segments. *Science* 241:845-847
- Sale WS, Besharse JC, Piperno G (1988) Distribution of acetylated alpha-tubulin in retina and in vitro-assembled microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton* 9:243-253
- Salisbury JL (1995) Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opinion Cell Biol.* 7:39-45
- Salisbury JL, Floyd GL (1978) Calcium-induced contraction of the rhizoplast of a quadriflagellate green algae. *Science* 202:975-976
- Sampath P, Pollard TD (1991) Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry* 30:1973-1980
- Sassoe-Pognetto M, Feigenspan A, Bormann J, Wässle H (1996) Synaptic organization of an organotypic slice culture of the mammalian retina. *Vis. Neurosci.* 13:759-771
- Schlamp CL, Williams DS (1996) Myosin V in the retina: localization in the rod photoreceptor synapse. *Exp. Eye Res.* 63:613-619
- Schliwa M (1982) Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J. Cell Biol.* 92:79-91

- Schmitt A, Wolfrum U (2001) Identification of novel molecular components of the photoreceptor connecting cilium by immunoscreens. *Exp. Eye Res.* 73:837-849
- Scholey JM (1996) Kinesin-II, a membrane traffic motor in axons, axonemes, and spindles. *J. Cell Biol.* 133:1-4
- Scholey JM, Anderson KV (2006) Intraflagellar transport and cilium-based signaling. *Cell* 125:439-442
- Sidman RL (1963) Organ-culture analysis of inherited retinal degeneration in rodents. *Natl. Cancer Inst. Monogr* 11:227-246
- Singla V, Reiter JF (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313:629-633
- Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12:112-120
- Sokolov M, Lyubarsky AL, Strissel KJ, Savchenko AB, Govardovskii VI, Pugh EN, Jr., Arshavsky VY (2002) Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. *Neuron* 34:95-106
- Sokolov M, Strissel KJ, Leskov IB, Michaud NA, Govardovskii VI, Arshavsky VY (2004) Phosducin facilitates light-driven transducin translocation in rod photoreceptors. Evidence from the phosducin knockout mouse. *J. Biol. Chem.* 279:19149-19156
- Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ (2003) Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* 299:1743-1747
- Strangeways TSP, Fell HB (1926) Experimental studies on the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vitro. II. The development of the isolated early embryonic eye of the fowl when cultivated in vitro. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 100:273-283
- Strelkov SV, Herrmann H, Aebi U (2003) Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25:243-251
- Strissel KJ, Lishko PV, Trieu LH, Kennedy MJ, Hurley JB, Arshavsky VY (2005) Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 280:29250-29255
- Strissel KJ, Sokolov M, Arshavsky VY (2004) Light-Dependent Translocation of Signaling Proteins in Vertebrate and Invertebrate Photoreceptors. In: Williams DS (ed) *Cell Biology and Related Disease of the Outer Retina* World Scientific Publishing Company Pte Ltd, Singapore, pp 163-194
- Strissel KJ, Sokolov M, Trieu LH, Arshavsky VY (2006) Arrestin translocation is induced at a critical threshold of visual signaling and is superstoichiometric to bleached rhodopsin. *J. Neurosci.* 26:1146-1153

- Sung CH, Tai AW (2000) Rhodopsin trafficking and its role in retinal dystrophies. *Int. Rev. Cytol.* 195:215-267
- Tai AW, Chuang JZ, Bode C, Wolfrum U, Sung CH (1999) Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 97:877-887
- Tamai M, Takahashi J, Noji T, Mizuno K (1978) Development of photoreceptor cells in vitro: influence and phagocytic activity of homo- and heterogenic pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* 26:581-590
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-154
- Terakita A, Takahama H, Tamotsu S, Suzuki T, Hariyama T, Tsukahara Y (1996) Light-modulated subcellular localization of the alpha- subunit of CTP-binding protein Gq in crayfish photoreceptors. *Visual Neurosci.* 13:539-547
- Terakita A, Yamashita T, Tachibanaki S, Shichida Y (1998) Selective activation of G-protein subtypes by vertebrate and invertebrate rhodopsins. *FEBS Lett.* 439:110-114
- Theriot JA (1997) Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 136:1165-1168
- Trojan P, Rausch S, Wünschig D, Giebl A, Tissen M, Klemm C, Krause E, Klumpp S, Pulvermüller A, Wolfrum U (2007) Light-dependent CKII-mediated phosphorylation regulates centrin-G-protein complex formation in retinal photoreceptor cells. (in Vorb.)
- Troutt LL, Burnside B (1988) Microtubule polarity and distribution in teleost photoreceptors. *J. Neurosci.* 8:2371-2380
- Tsang SH, Burns ME, Calvert PD, Gouras P, Baylor DA, Goff SP, Arshavsky VY (1998) Role for the target enzyme in deactivation of photoreceptor G protein in vivo. *Science* 282:117-121
- Udovichenko IP, Newton AC, Williams DS (1997) Contribution of protein kinase C to the phosphorylation of rhodopsin in intact retinas. *J. Biol. Chem.* 272:7952-7959
- Vaney DI (1984) 'Coronate' amacrine cells in the rabbit retina have the 'starburst' dendritic morphology. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 220:501-508
- Vaney DI (1986) Morphological identification of serotonin-accumulating neurons in the living retina. *Science* 233:444-446
- Vaughan DK, Fisher SK (1989) Cytochalasin D disrupts outer segment disc morphogenesis in situ in rabbit retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:339-342
- Vaughan DK, Fisher SK, Bernstein SA, Hale IL, Linberg KA, Matsumoto B (1989) Evidence that microtubules do not mediate opsin vesicle transport in photoreceptors. *J. Cell Biol.* 109:3053-3062

- Vigues B, Blanchard MP, Bouchard P (1999) Centrin-like filaments in the cytopharyngeal apparatus of the ciliates *Nassula* and *Furgasonia*: evidence for a relationship with microtubular structures. *Cell Motil. Cytoskeleton* 43:72-81
- Wade RH, Hyman AA (1997) Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:12-17
- Wallin M, Friden B, Billger M (1988) Studies of the interaction of chemicals with microtubule assembly in vitro can be used as an assay for detection of cytotoxic chemicals and possible inducers of aneuploidy. *Mutat. Res.* 201:303-311
- Walsh T, Walsh V, Vreugde S, Hertzano R, Shahin H, Haika S, Lee MK, Kanaan M, King MC, Avraham KB (2002) From flies' eyes to our ears: mutations in a human class III myosin cause progressive nonsyndromic hearing loss DFNB30. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:7518-7523
- Wang DY, Chan WM, Tam PO, Baum L, Lam DS, Chong KK, Fan BJ, Pang CP (2005) Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clin. Chim. Acta* 351:5-16
- Wells AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401:505-508
- Welte MA (2004) Bidirectional transport along microtubules. *Curr. Biol.* 14:R525-R537
- Wen GY, Soifer D, Wisniewski HM (1982) The doublet microtubules of rods of the rabbit retina. *Anat. Embryol. (Berl)* 165:315-328
- Whelan JP, McGinnis JF (1988) Light-dependent subcellular movement of photoreceptor proteins. *J. Neurosci. Res.* 20:263-270
- Whitehead JL, Wang SY, Bost-Usinger L, Hoang E, Frazer KA, Burnside B (1999) Photoreceptor localization of the KIF3A and KIF3B subunits of the heterotrimeric microtubule motor kinesin II in vertebrate retina. *Exp. Eye Res.* 69:491-503
- Wiederholt M, Dorschner N, Groth J (1997) Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 211:153-160
- Williams DS (2002) Transport to the photoreceptor outer segment by myosin VIIa and kinesin II. *Vision Res.* 42:455-462
- Williams DS, Hallett MA, Arikawa K (1992) Association of myosin with the connecting cilium of rod photoreceptors. *J Cell Sci.* 103 (Pt 1):183-190
- Williams DS, Linberg KA, Fisher SK (1990) Shedding of cone photoreceptor disk membranes in lizard eyecups maintained in vitro. *Exp. Eye Res.* 50:231-233
- Williams DS, Linberg KA, Vaughan DK, Fariss RN, Fisher SK (1988) Disruption of microfilament organization and deregulation of disk membrane morphogenesis by cytochalasin D in rod and cone photoreceptors. *J. Comp Neurol.* 272:161-176

- Williams DS, Roberts EA (1992) Modification of the daily photoreceptor membrane shedding response in vitro by antioxidants. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33:3005-3008
- Wodnicka M, Pierzchalska M, Bereiter-Hahn J, Kajstura J (1992) Comparative study on effects of cytochalasins B and D on F-actin content in different cell lines and different culture conditions. *Folia Histochem. Cytobiol.* 30:107-111
- Wolenski JS, Cheney RE, Mooseker MS, Forscher P (1995) In vitro motility of immunoadsorbed brain myosin-V using a *Limulus* acrosomal process and optical tweezer-based assay. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 4):1489-1496
- Wolfrum U (1995) Centrin in the photoreceptor cells of mammalian retinae. *Cell Motil. Cytoskeleton* 32:55-64
- Wolfrum U (2003) Die Rolle der Apoptose bei Netzhautdegenerationen. *Medgen* 15:124-128
- Wolfrum U, Giebl A, Pulvermüller A (2002) Centrins, a novel group of Ca²⁺-binding proteins in vertebrate photoreceptor cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 514:155-178
- Wolfrum U, Liu X, Schmitt A, Udovichenko IP, Williams DS (1998) Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli. *Cell Motil. Cytoskeleton* 40:261-271
- Wolfrum U, Schmitt A (2000) Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 46:95-107
- Wood JP, McCord RJ, Osborne NN (1997) Retinal protein kinase C. *Neurochem. Int.* 30:119-136
- Woodford BJ, Blanks JC (1989) Localization of actin and tubulin in developing and adult mammalian photoreceptors. *Cell Tissue Res.* 256:495-505
- Xu XZ, Moebius F, Gill DL, Montell C (2001) Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:10692-10697
- Yahara I, Harada F, Sekita S, Yoshihira K, Natori S (1982) Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro. *J. Cell Biol.* 92:69-78
- Yoshida T, Willardson BM, Wilkins JF, Jensen GJ, Thornton BD, Bitensky MW (1994) The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 269:24050-24057
- Zhang H, Huang W, Zhang H, Zhu X, Craft CM, Baehr W, Chen CK (2003) Light-dependent redistribution of visual arrestins and transducin subunits in mice with defective phototransduction. *Mol. Vis.* 9:231-237

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

Im Folgenden sind im Text häufig verwendete Abkürzungen nochmals alphabetisch aufgelistet. Zusätzlich wurden in diese Liste allgemein gebräuchliche Abkürzungen von Einheiten und Chemikalien aufgenommen, die nicht im Text definiert wurden.

°C	Grad Celsius
µg, µl, µm, µM	Mikrogramm, Mikroliter, Mikrometer, Mikromolar
Arr	Arrestin
ATP	Adenosin Triphosphat
CC	Verbindungscilium, engl. „ <i>connecting cilium</i> “
CDH23	Cadherin 23 (USH1D)
cGMP/5'GMP	cyclisches Guanosin Monophosphat / 5' Guanosin Monophosphat
DA	Dunkeladaptiert, engl. „ <i>dark adapted</i> “
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol, blau fluoreszierende Kernfärbung
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DIV	Tage in Kultur, engl. „ <i>days in vitro</i> “
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium, Medium der Retinakultur
DMSO	Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel für Chemikalien
eGFP	grün fluoreszierendes Protein, engl. „ <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> “
g	Gramm
g	relative Erdbeschleunigung
GC	Ganglienzellschicht, engl. „ <i>ganglion cells</i> “
GDP/GTP	Guanosin Diphosphat / Guanosin Triphosphat
G _t	Transducin, G-Protein in der visuellen Signaltransduktion
h	Stunde
HAM's F12	Nährzusatz für Zellkulturmedien, ursprünglich zum Wachstum von <u>Hamster</u> Ovarienzellen entwickelt
INL	Innere Körnerschicht, engl. „ <i>inner nuclear layer</i> “

IS	Innensegment, engl. „ <i>inner segment</i> “
IPL	Innere plexiforme Schicht, engl. „ <i>inner plexiform layer</i> “
LA	Helladaptiert, engl. „ <i>light adapted</i> “
LB-Medium	Anzuchtmedium für Bakterienkulturen, engl. „ <i>lysogeny broth</i> “
OD	Optische Dichte
ONL	Äußere Körenerschicht, engl. „ <i>outer nuclear layer</i> “
OS	Außensegment, engl. „ <i>outer segment</i> “
OPL	Äußere plexiforme Schicht, engl. „ <i>outer plexiform layer</i> “
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl. „ <i>phosphate buffer saline</i> “
PCDH15	Protocadherin 15 (USH1F)
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbolester, engl. „ <i>phorbol myristate acetate</i> “
PN	Post natal
psi	Druckeinheit, engl. „ <i>pounds per square inch</i> “
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RHO	Rhodopsin
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. „ <i>rounds per minute</i> “
RP	Retinitis pigmentosa; Degeneration der Photorezeptorzellen
RPE	retinales Pigmentepithel
<i>shaker-1</i>	Mus musculus SH1/LeJ-Myo7a ^{4626S} B, Shaker-1-Maus mit Myosin VIIa-Defekt
TRP(L)	“Transient receptor potential (like)”
TUNEL	“Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein dUTP Nick End Labeling“
USH	Usher Syndrom
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Im Labor etablierte Wildtyp-Maus: Mus musculus C57 BL/6J
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen

7.2 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Reinhardt-Boris Reidel
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum /Ort: 31. Oktober 1975 in Mainz
Adresse: Ostdeutsche Str. 26, 55232 Alzey

Schulbildung:

1982 – 1986 Grundschule: St. Marien Schule Alzey
1986 – 1995 Gymnasium: Elisabeth-Langgässer-Gymnasium, Alzey
Juni 1995 Abitur
Okt. 1995 – Sept. 1996 Zivildienst: im Krankenhaus des „Deutschen Roten Kreuzes“, Alzey

Hochschulbildung:

WS 1996/97 Beginn des Studiums im Fachbereich Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Nov. 1998 Vordiplom
1998 bis 2001 Hauptstudium mit Schwerpunkten Zoologie, Botanik und Immunologie
Mai 2001 Diplomprüfungen
Juni 2001 bis März 2002 Diplomarbeit am Institut für Zoologie, Abt. I: Zell- und Matrixbiologie der Johannes Gutenberg-Universität bei Prof. Dr. U. Wolfrum
Aug. 2002 bis Jan. 2007 Promotion im Institut für Zoologie, Abt. I: Zell- und Matrixbiologie der Johannes Gutenberg-Universität bei Prof. Dr. U. Wolfrum

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, den2006

.....

Boris Reidel