

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Morphologische und quantitative Untersuchungen
synaptischer Körperchen in Retina und Zirbeldrüse
von Säugetieren und Mensch**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
für das Gesamtfach Anatomie

dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Dr. med. Holger Jastrow

aus Frankfurt am Main

Mainz, 2007

Die dieser Habilitationsschrift zugrunde liegenden Untersuchungen wurden im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Johannes Gutenberg-Universität, Becherweg 13, 55128 Mainz durchgeführt.

Einige Befunde dieser Originalarbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften publiziert:

1.) Jastrow H, von Mach M-A, Vollrath L (1997a)

The shape of synaptic ribbons in the rat pineal gland.

Cell and Tissue Research 287 (2): 255-261.

2.) Jastrow H, von Mach M-A, Vollrath L (1997b)

Adaptation of the disector method to rare small organelles in TEM sections exemplified by counting synaptic bodies in the rat pineal gland.

Journal of Anatomy 191 (2): 399-405.

3.) Jastrow H, Schmanke D, Weinert J, Jendrysiak U, Vollrath L (1997)

Changes in the three dimensional structure of synaptic ribbons in the pineal gland of the guinea-pig caused by constant light.

in: H.-W. Korf and K.-H. Usadel (Eds.):

Neuroendocrinology Retrospect and Perspectives

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 367-373. (Buchbeitrag)

4.) Jastrow H, Schmanke D, Weinert J (2004)

Bizarre alterations of the morphology of pineal synaptic bodies under constant light and an evaluation of suitable 3D-reconstruction software.

Micron 35 (8): 655-670.

5.) Jastrow H, Koulen P, Altroock WD, Kröger S (2006)

Identification of a b-Dystroglycan immunoreactive subcompartment in photoreceptor terminals.

Investigative Ophthalmology and Visual Science 47 (1): 17-24.

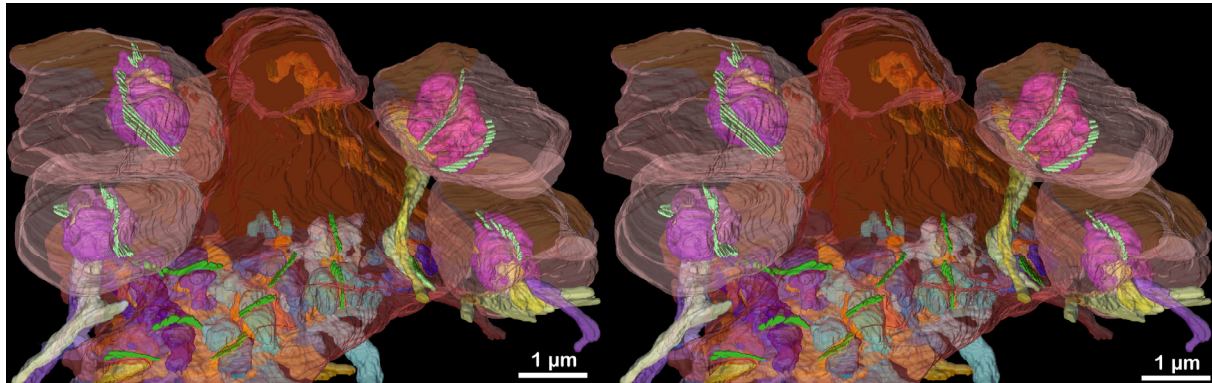
6.) Jastrow H, Racke J (2007)

Analysis of synaptic bodies in the Sprague-Dawley rat pineal gland under extreme photoperiods.

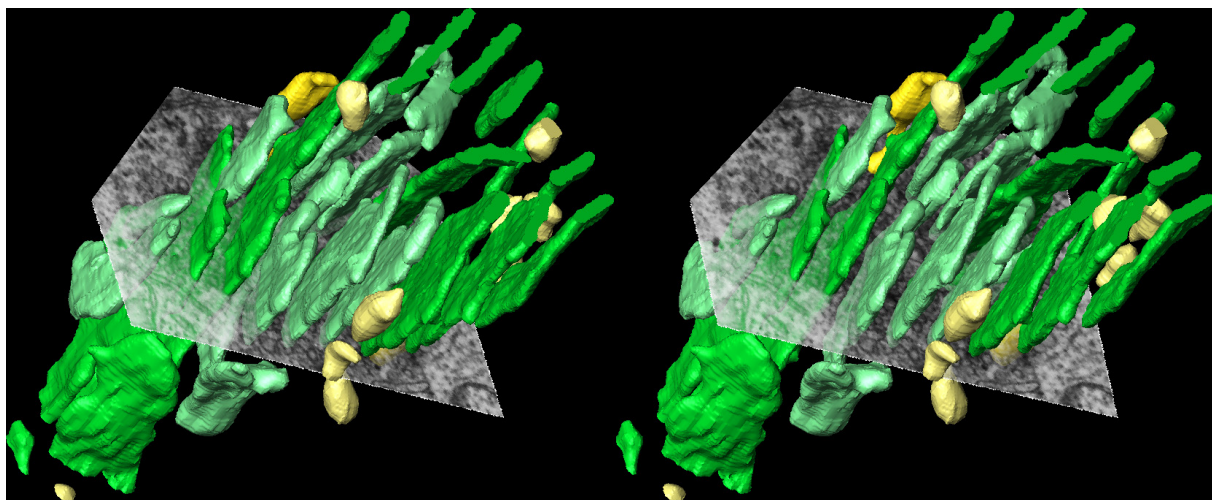
Micron 38 (3): 237-251.

Für mein Projekt "Dreidimensionale Rekonstruktion synaptischer Organellen der menschlichen Retina", welches ich im Rahmen der Untersuchungen für diese Habilitationsschrift durchführte erhielt ich eine Förderung in Höhe von 11.355 € aus einem begutachteten Forschungsförderungsfond der Universität Mainz.

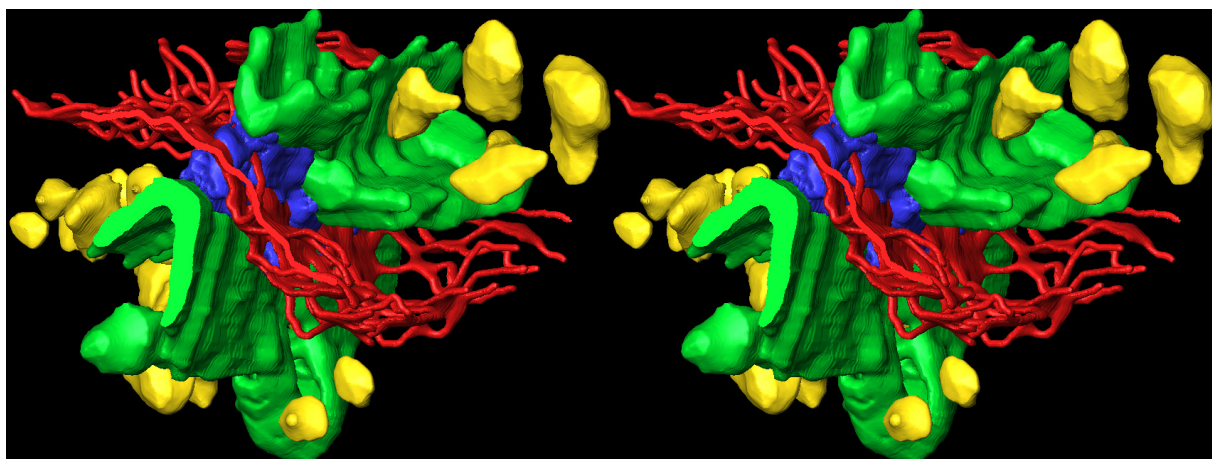
Ist es nicht faszinierend, die morphologischen Grundlagen des Sehens zu betrachten?



Sich von der "Schönheit" wenig bekannter Zellorganellen bezaubern zu lassen,



die auch in der Zirbeldrüse vorkommen und hier unter Dauerlicht sehr bizarr werden,



und auch in quantitativer Hinsicht Näheres über ihre Dynamik zu erfahren?

Animationen dieser Rekonstruktionen finden sich im Verzeichnis "Animationen" unter 01.avi, 02.avi und 03.avi

Inhaltsverzeichnis

	Abschnitte	Seite(n)
	Vorbemerkungen	1
	Verwendete Abkürzungen	2
1.	Einleitung	3 - 14
a	Morphologie synaptischer Körperchen (SK)	3 - 8
b	Untersuchte Organe	8 - 10
c	Dynamik synaptischer Körperchen	10 - 11
d	Dreidimensionale Rekonstruktionen	11 - 12
e	Ziele der selbst durchgeführten Untersuchungen	12 - 14
2.	Material und Methoden	15 - 25
a	Material	15 - 17
b	Methoden	17 - 25
1	Organkulturen	17
2	Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie	18
3	Bildaquisition	18
4	Dreidimensionale Rekonstruktion	19 - 20
5	Bidirektionale Disektorzählungen	21 - 23
6	Immunhistochemie und -elektronenmikroskopie	24 - 25
3.	Ergebnisse	25 - 74
a	Morphologische Untersuchungen	25 - 71
1	Zirbeldrüse	25 - 31
	1 Ratte	25 - 26
	2 Hühnchen	26
	3 Meerschweinchen	26 - 31
2	Retina	32 - 68
	1 Einfluß der Ca ⁺⁺ -Konzentration auf Profile synaptischer Körperchen	32 - 35
	1 Ratten (Untersuchung Js)	32 - 33
	2 BALB/c Mäuse (Untersuchung Jb)	34 - 35
	2 Verteilung von beta-Dystroglykan und Bassoon in der Retina	36 - 40
	3 Rekonstruktionen synaptischer Körperchen bei BALB/c Mäusen	40 - 49
	4 Rekonstruktionen ektopischer SK bei Maus und Ratte	50 - 54
	5 Rekonstruktionen synaptischer Körperchen beim Menschen	55 - 71
	1 Stäbchen	56 - 61
	2 Zapfen	61 - 68
	3 Bipolarzellen	68 - 71

Inhaltsverzeichnis

	Abschnitte	Seite(n)
3.b	Quantitative Analysen (nur Zirbeldrüse)	71 - 75
1	Pilotuntersuchungen	71 - 72
2	Entwicklung einer Zählmethode für seltene Ultrastrukturen	72
3	Analyse von SK der Rattenzirbeldrüse unter extremen Photoperioden	72 - 74
4.	Diskussion	75 - 132
a	Morphologische Untersuchungen	75 - 107
1	Zirbeldrüse	75 - 80
	1 Ratte	75 - 77
	2 Meerschweinchen: Entstehung kugeliger, klumpiger + bizarrer SK durch Dauerlicht	77 - 80
2	Retina	80 - 107
	1 Profilzählungen	80 - 81
	2 Auftreten synaptischer Körperchen in der Ontogenese	81 - 83
	3 Ribbonsynapsen in Stäbchen	83 - 91
	4 Ribbonsynapsen in Zapfen	91 - 101
	5 synaptische Körperchen in Bipolarzellen	101 - 107
	1 SK in Bipolarzellaxonen	102 - 104
	2 SK in Bipolarzeldendriten (ektopische SK)	104 - 105
	6 Gendefekte, pathologische- und Altersveränderungen	105 - 107
b	Quantitative Untersuchungen synaptischer Körperchen	107 - 118
1	Pilotuntersuchungen	108
2	theoretische Überlegungen zu Profillängen, Oberflächen und Volumina von SK	108 - 112
3	Disektor	112 - 113
4	Vergleich der erhobenen quantitativen Daten mit anderen Untersuchungen	113 - 115
5	Chronobiologie und Lichtwirkung auf synaptische Körperchen	115 - 118
c	Funktionelle Bedeutung von Dystroglykan an Ribbonsynapsen	118 - 121
d	Molekulare Komponenten von SK	121 - 123
e	Funktionelle Aspekte	123 - 133
1	synaptische Körperchen	123 - 126
2	Ribbonsynapsen	126 - 133
5.	Zusammenfassung	133 - 136
6.	Perspektive	137
7.	Literaturverzeichnis	138 - 157
8.	Abbildungsverzeichnis	158 - 159
9.	Animationsverzeichnis	160 - 161
10.	Danksagungen	162

Vorbemerkungen

Da sich die dreidimensionale (3D) Struktur synaptischer Körperchen am deutlichsten in Stereobildern und -animationen erkennen läßt, werden im Folgenden viele solcher Abbildungen gezeigt. Um den 3D-Effekt zu sehen, bitte so akkommodieren, daß das linke Auge nur die linke Bildhälfte, das rechte nur die rechte sieht. Alle zitierten Animationen finden sich auf dem beiliegenden Datenträger im Verzeichnis "Animationen". Zur Erleichterung der Zuordnung entsprechen die Namen der Animationen den Bildnummern (so heißt z.B. zu Abb. 7 die Animation 7.avi).

Daten einiger hier geschilderter Untersuchungen wurden von Doktoranden, die ich betreute, im Rahmen ihrer Dissertationen teils mit mir gemeinsam und teils eigenständig erhoben: die in Jastrow & Racke (2007) publizierte Disektorzählungen der Rattenzirbel-drüse von cand. med. Jörg Racke. Viele Originalfotos der Retina von BALB/c Mäusen wurden von Dr. med. Georgios Kolios aufgenommen. Den Großteil der Rekonstruktionen dieser Untersuchungen erstellte ich mit ihm gemeinsam. Da ein Teil der in seiner in der finalen Phase völlig eigenständig abgeschlossenen Dissertation dargestellten Ergebnisse von Befunden an Originaldaten abwich, erfolgte eine gründliche Revision, bevor diese in vorliegende Schrift aufgenommen wurden.

Präparate von BALB/c Mäusen und einiger Ratten wurden mir von Dr. Isabella Spiwox-Becker im Rahmen mehrerer Kooperationen zur 3D-Visualisierung synaptischer Körperchen zur Verfügung gestellt.

Um eventuelle Copyrightprobleme zu vermeiden, werden in vorliegender Arbeit keine Abbildungen der Originalpublikationen, sondern aus den dabei gewonnenen Datensätzen neu generierte Rekonstruktionsbilder bzw. andere Originalaufnahmen gezeigt.

Verwendete Abkürzungen

Abb.	= Abbildung(en)
ad(s)	= arciform density(ies)(elektronendichte Membranverankerung von SK in der Retina)
BALB/c	= Inzuchtstamm von Albinomäusen
BDG	= Betadystroglykan (β -Dystroglykan)
Ca ⁺⁺	= Kalziumionen
D	= Stunden in Dunkelheit
DGC	= Dystroglykankomplex
DZ	= Disektor Zählungen (mit der Disektormethode gewonnene Zählergebnisse)
eSK	= ektopische synaptische Körperchen (SK in Bipolarzellendendriten)
ELKS	= eukaryotic protein kinase like kinase (ein Protein der aktiven Zone)
ER	= endoplasmatisches Retikulum (schlauchförmiges intrazelluläres Netzwerk)
GABA	= gamma-amino-Buttersäure (γ -amino-Buttersäure; inhibitorischer Neurotransmitter)
IPS	= innere plexiforme Schicht der Retina (Netzhaut)
L	= Stunden unter Licht
LD 12:12	= Photoperiode mit 12 Stunden Licht gefolgt von 12 Stunden Dunkelheit
Min	= Minuten
ms	= Millisekunden
ÄPS	= äußere plexiforme Schicht der Retina (Netzhaut)
o.g.	= oben genannt
PZ	= Profilzählungen (Zählergebnisse der Profilzählungen von SK)
SD-Ratten	= Sprague-Dawley Ratten (Stamm von Albinoratten)
Sek	= Sekunden
SK	= synaptische Körperchen ("synaptic ribbons")
vSNAREs	= vesicular soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (Rezeptorproteine der Vesikelmembran)
tSNAREs	= target soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (Rezeptorproteine der Zellmembran)
SFM	= Standardfehler des Mittelwertes
SSL	= Scheitel-Steiß-Länge
TEM	= Transmissionselektronenmikroskop

1. Einleitung

Ein funktionelles Verständnis von Strukturen setzt die genaue Kenntnis ihrer Morphologie, ihrer Lagebeziehungen zueinander und zu Nachbarstrukturen sowie ihrer Quantität und deren Dynamik voraus. Im Rahmen dieses Habilitationsprojektes wurden synaptische Körperchen durch dreidimensionale Rekonstruktion bei verschiedenen Säugerspezies (siehe Material) sowohl in der Netzhaut (Retina) als auch in der Zirbeldrüse (Glandula pinealis) visualisiert, um ihre genaue Form, Lage, Größe und Dynamik unter Normal- und experimentellen Bedingungen zu erfassen. Aufwendige quantitative Untersuchungen, in deren Rahmen eine valide Methode zur Quantifizierung der Organellen entwickelt wurde, die Immunhistochemie und -elektronenmikroskopie lieferten weitere Befunde, die in zahlreichen Arbeiten, Vorträgen und Postern diskutiert und funktionell bewertet wurden.

1a Morphologie und Vorkommen synaptischer Körperchen

Synaptische Körperchen (SK) bestehen aus einer elektronendichten Proteinstruktur, an die über feine Proteinärmchen viele synaptische Vesikel mit Durchmessern von 30 - 40 nm gebunden sind. Sie treten oft in Form synaptischer Bänder auf, daher der in der Fachliteratur etablierte englische Begriff "synaptic ribbons". SK liegen präsynaptisch nahe an der Zellmembran. Lediglich die unter Lichtbedingungen bei einigen Spezies in Zirbeldrüsenparenchymzellen (Pinealozysten) sowie in Stäbchen auftretenden kugelförmigen oder klumpigen Organellen können auch weiter entfernt von der Zellmembran liegen (Vollrath et al. 1989; Jastrow et al. 2004). Plattenförmige SK sind in der Retina gebunden an ein präsynaptisch verankertes elektronendichtes Material, die arciform density (ad; Ladman 1958). Diese sieht wie eine gebogene Rinne aus, welche ca. 50 nm weit und ca. 20 nm dick ist, und nur in Stäbchen und Zapfenterminalen vorliegt (Gustavus et al. 2001; Jastrow et al. 2004). In Bipolarzellen und Pinealozysten gibt es auch elektronendichtes Material, das die SK an der Membran verankert, es ist aber hier nur schwach bis oft gar nicht ausgebildet und erscheint dreidimensional wie langgezogene gebogene Quader.

SK wurden 1953 von Sjöstrand in Terminalen der Photorezeptoren der Retina entdeckt (Sjöstrand 1953a, b). Man findet sie in Synapsen mit hohem Vesikelumsatz und hohen Entladungsfrequenzen in Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen) und nachgeschalteten Bipolarzellen der Retina (Sjöstrand 1953a, b, 1958, 1974, 1976; DeRobertis & Franchi 1956; Ladman 1958; Fine 1962; Dowling & Boycott 1966; Gray & Pease 1971; McLaughlin & Boykins 1977; Vollrath et al. 1989; Vollrath & Spiwoks-Becker 1996), in Hörrezeptorzellen des Innenohrs (innere und äußere Haarzellen; hier oft auch kugelförmige oder irregulär geformte, klumpige, aber membranverankerte SK; Smith & Sjöstrand 1961; Thorn et al. 1972; Sobkowicz et al. 1982; Roberts et al. 1990; Siegel 1990; Fuchs et al. 2003; Keen & Hudspeth 2006; Moser et al. 2006; Nouvain et al. 2006; Ruel et al. 2007), in Rezeptorzellen der Gleichgewichtsorgane (Macula sacculi und utriculi; Ross 2000) sowie in der Crista ampullaris: flaschenförmige Typ 1- und zylindrische Typ 2 Haarzellen (Fernandez et al. 1988; Goldberg et al. 1990; Lysankowski & Goldberg 1997; Moser et al. 2006), im Seitenlinienorgan (Trujillo-Cenóz 1961; Baretts & Szabo 1962; Jørgensen & Flock 1973; Sato

& Kawakami 1976), in elektrosensorischen Organen (Mullinger 1969; Szabo & Wersäll 1970; Szamier & Wachtel 1970; Fields & Ellisman 1985; Fields et al. 1987), in Zellen des parathympanischen Organs (Giannessi & Ruffoli 1996), aber auch in den melatoninbildenden Parenchymzellen der Zirbeldrüse (Vollrath 1981; Pinealozyten; Bhatnagar 1994; Jastrow & Racke 2007). SK binden über feine Proteinbrücken glutamathaltige Neurotransmittervesikel und ändern in Retina und Zirbeldrüse ihre Größe und Gestalt licht-, tageszeit- und reizabhängig (Vollrath 1981, Vollrath & Spiwox-Becker 1996; Adly et al. 1999, Spiwox-Becker et al. 2004). Zum Teil binden einzelne Vesikel noch andere Vesikel in ihrer Nachbarschaft, die etwas weiter vom elektronendichten Zentrum der SK entfernt sind (Vollrath et al. 1989, Spiwox-Becker 1995).

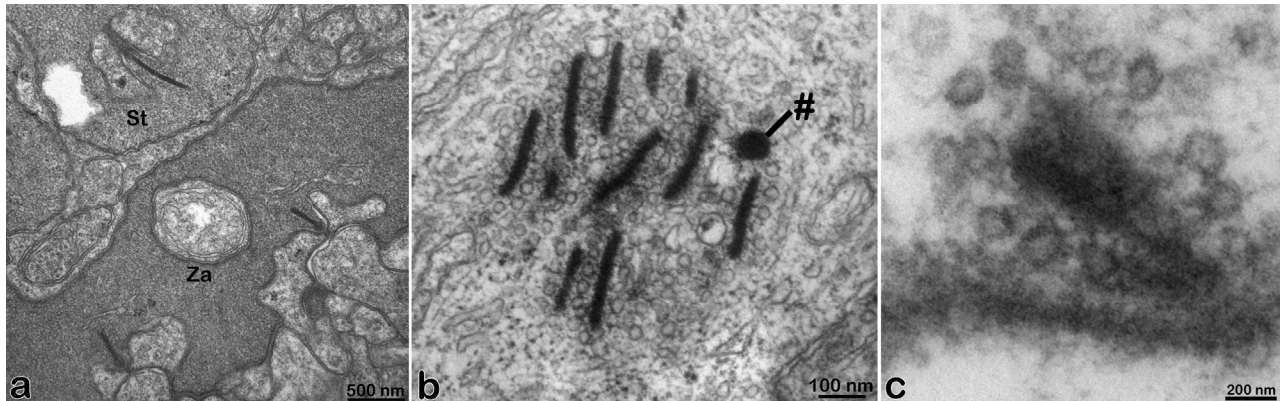


Abb. 1 Transmissionselektronenmikroskopische Originalabbildungen, die elektronendichte Profile synaptischer Körperchen an verschiedenen Lokalisationen zeigen: **a** menschliche Retina: Stäbchen- (St), und Zapfenterminalschnitt (Za), **b** Pinealozyt mit zusätzlich einem runden SK Profil (#), **c** innere Haarzelle (**b**, **c**: Meerschweinchen).

Die im elektronenmikroskopischen Bild erkennbaren Profile synaptischer Körperchen sind in der Regel stabförmig, um 200 nm lang und ca. 35 nm breit. Dies gilt für SK in Pinealozyten der Sprague-Dawley Ratte (Maitra et al. 1986, Jastrow & Racke 2007). In der Retina fanden Spiwox-Becker et al. (2004) unter Lichtbedingungen durchschnittliche Profillängen stabförmiger SK von 176 ± 8 nm. Unter Dunkelbedingungen lagen ca. 20 % längere Profile (226 ± 7 nm) vor, nach 4-tägiger Dauerdunkelheit ca. 30 % längere (243 ± 8 nm). Ähnliche Längenzunahmen wurden auch von Adly et al. (1999) beschrieben. In elektronenmikroskopischen Schnitten gemessene Profillängen sind Strecken innerhalb der dreidimensional meist bogen-, band- oder plattenförmigen SK, die in Relation zu deren Größe bzw. Oberfläche stehen (siehe Diskussion 4b2: Seite 108). Profile irregulärer, klumpiger oder kugelförmiger SK sind nur unter bestimmten Versuchsbedingungen von relevanter Häufigkeit und haben in den Originalschnitten ovale bis kreisförmige (Abb. 1b) bzw. bizarre Profile.

Dreidimensionale Rekonstruktionen ganzer SK zeigen in der Zirbeldrüse meist platten- oder bandförmige Gebilde (Jastrow et al. 1997a, 2004), die eine konstante Dicke von 35 nm und zwei große parallele, flache Hauptflächen aufweisen (Jastrow & Racke 2007; Abb. 2, 3; Animationen 2.avi, 3.avi; siehe Ergebnisse 3b3: Seite 72).

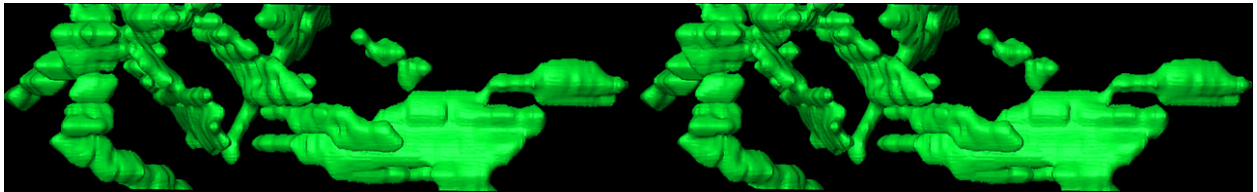


Abb. 2 Stereobild dreidimensional rekonstruierter synaptischer Körperchen in einem Feld (Pinealozyt, SD-Ratte; (Animation dieser Rekonstruktion: 2.avi).

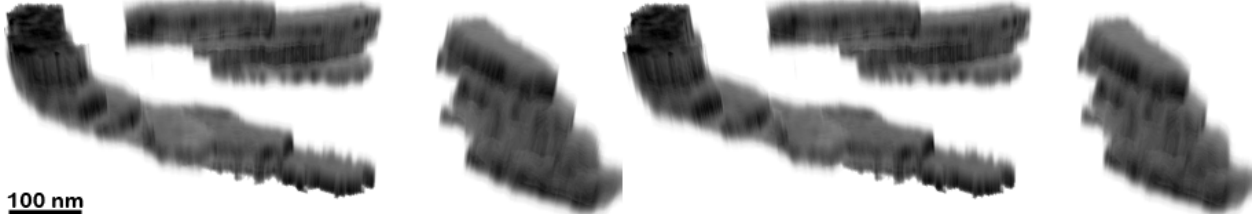


Abb. 3 Stereovisualisation zweier plattenförmiger und eines bandförmigen SK eines SD-Rattenepinephalocyten in den Originalgrauwerten (Animation dieser Rekonstruktion: 3.avi).

Sofern die Länge zu Breite Relation der Hauptoberflächen der SK zwischen 1:1 und 1:3 lag, wurden diese als plattenförmig bezeichnet, war sie größer, als bandförmig (Jastrow & Racke 2007). SK sind oft zusätzlich in weiteren Ebenen leicht gedreht oder gebogen. Die meist kleineren plattenförmigen Strukturen waren in Serienschnitten etwas häufiger als die bandförmigen. Unter Dauerlichtbedingungen fanden sich auch irreguläre klumpenförmige Körperchen, stark gebogene Platten, rinnenförmige und kugelförmige SK. Oft lagen dabei bizarr gebogene große SK an den Zellmembranen benachbarter Pinealozyten einander gegenüber (Abb. 4, 03, MS2,3,5,6; Animationen 4.avi, 03.avi, MS3.avi & MS3a.avi, MS5.avi; MS5a.avi & MS5b.avi). Neben vereinzelt SK kamen meist Felder mit über 20 dieser Strukturen vor (Vollrath 1986; Jastrow et al. 1997c, d; Jastrow et al. 2004).

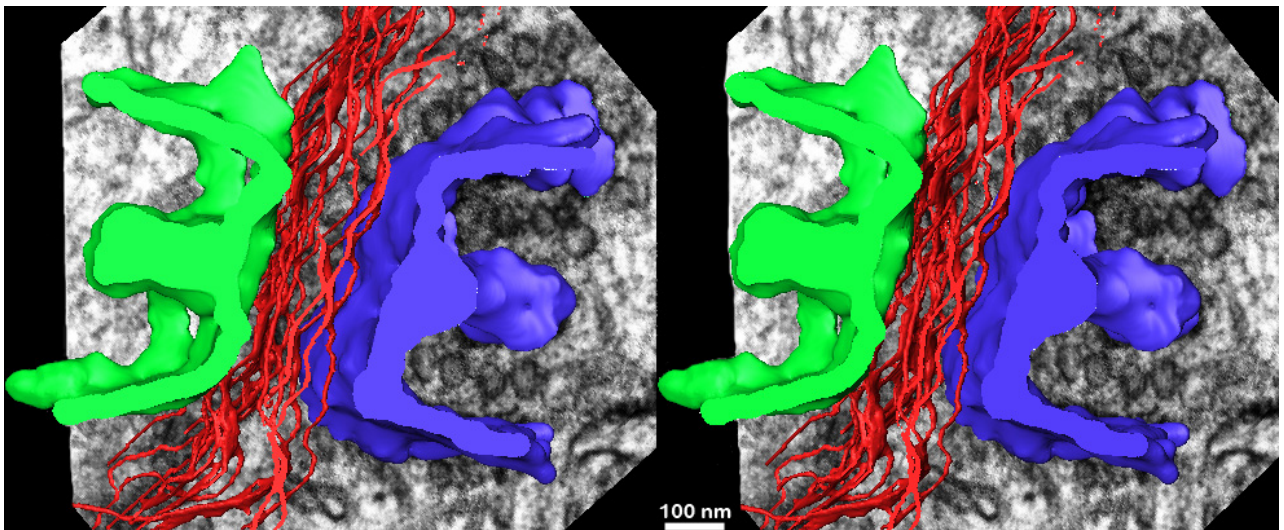


Abb. 4 Zwei sehr bizarre SK (grün bzw. blau), die sich an den Zellmembranen (rot) zweier benachbarter Pinealozyten gegenüber liegen. Sie stammen von einem 8 Wochen unter Dauerlicht gehaltenen Meerschweinchen (Animation dieser Rekonstruktion: 4.avi).

In der Retina sind synaptische Körperchen oft bogenartig in Stäbchenterminals meist boomerang- bis hufeisenförmige Gebilde, die eine konstante Dicke von 35 nm haben. Ihre großen seitlichen parallel zueinander stehenden Oberflächen sind entlang der Längsachse der Organellen in der Regel zusätzlich leicht verdreht oder verbogen (Abb. 5, Homo6-11, Disk3; Animationen 5.avi, Homo6.avi, Homo7.avi, Homo8.avi, Homo9.avi, Homo10.avi).

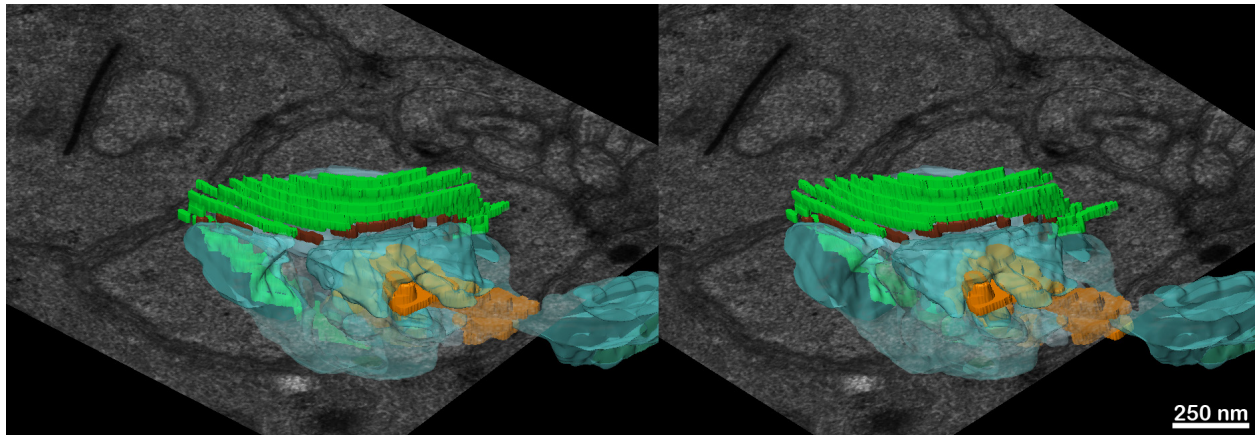


Abb. 5 Stereobild einer menschlichen Stäbchensynapse mit einem in mehreren Ebenen gebogenen, C-förmigen synaptischen Körperchen (grün), seiner arciform density (braun), die der Verankerung an der Zellmembran dient, Horizontalzellfortsätzen (blau) und Bipolarzellendendriten (orange; Animation dieser Rekonstruktion: 5.avi).

In den Terminalen von Zapfenzellen der Netzhaut gibt es mehrere unterschiedliche Formen von SK. Die Organellen können platten- oder scheibenförmig aussehen, die meisten sind aber Bänder mit nur leichten Biegungen oder Verdrehungen (Abb. 6a, Homo13,14,16-19, Disk4,5 und zugehörige Animationen). Beim Menschen überwiegen bandförmige SK, die in der Längsebene leicht gekrümmt sind (Jastrow et al. 2007). Einige Zapfen-SK sind bei BALB/c Mäusen deutlich größer als in Stäbchen, manche mehrere Mikrometer lang. Wenige mehrfach gebogene und verdrehte, lange SK sind an 2-3 unterschiedlichen Synapsen beteiligt (Abb. 6b, Animation 6.avi).

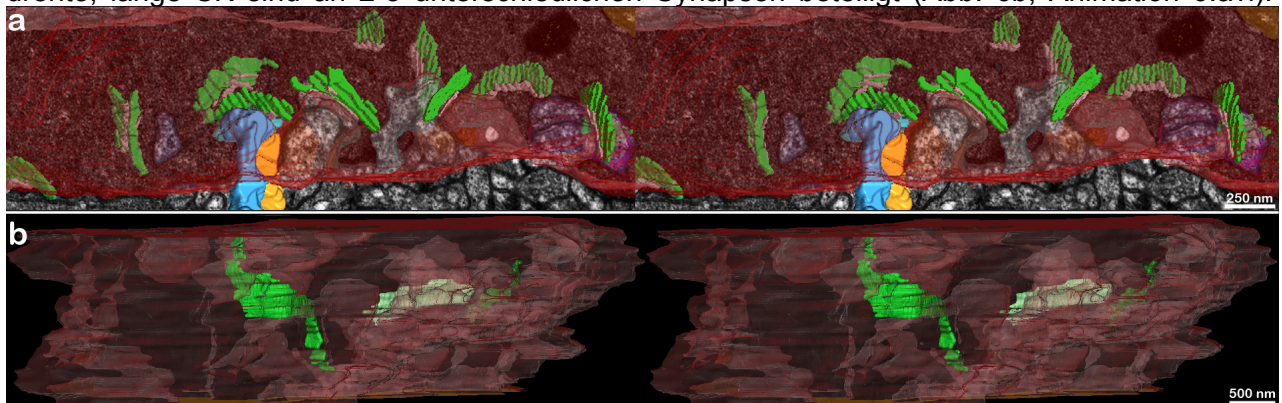


Abb. 6 Beim Menschen **a** sind die bandförmigen SK (grün) in Zapfen kürzer und kleiner als bei BALB/c Mäusen **b** (unterschiedliche Maßstäbe!). Das große spiralförmig gewundene SK (links in **b**) ist an zwei verschiedenen Synapsen des Zapfenterritoriums (rötlich) beteiligt. Die beiden anderen SK sind kleiner und weniger stark gedreht. In **a** ist ein Bipolarzellendendrit (gelb) und ein Horizontalzellfortsatz (blau) mit dargestellt (Animationen: 6.avi & 6a.avi).

Abb.7 zeigt ein partiell rekonstruiertes Zapfen- neben 4 komplett erfaßten Stäbchenterminalen des Menschen.

Unter Lichtgabe bilden sich klumpige Verdichtungen an den SK, ferner treten kugelförmige SK ohne Beziehung zur Zellmembran treten auf. Da Kalziumkanäle in den Phototransduktionsprozeß involviert sind, wurde durch die Beurteilung von Profilen von SK in organkultivierten Retinae von Ratten und BALB/c Mäusen die in vitro Wirkung von Ca^{++} auf helladaptierte Retinae und die in vitro Wirkung des Kalziumantagonisten Nifedipin untersucht. Die massivsten Veränderungen von SK in der Retina fanden sich jedoch bei der Rekonstruktion eines Stäbchenterminals einer von Spiwoks-Becker et al. 2004 unter Ca^{++} -Entzug organkultivierten Retina einer BALB/c Maus.

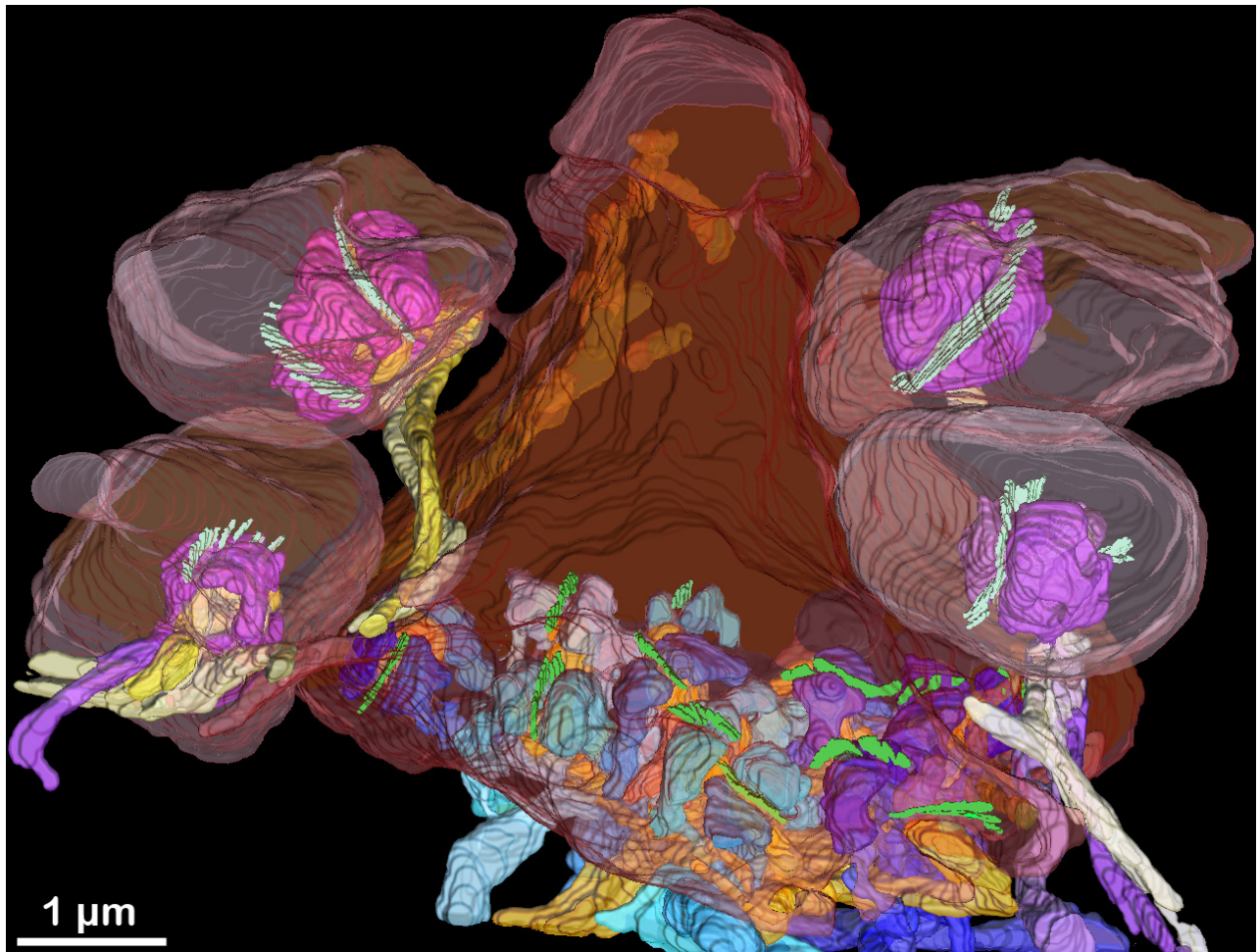


Abb. 7 Rekonstruktion von 4 Stäbchenterminals und eines partiell erfassten Zapfenpedikels der menschlichen Retina inklusive der Darstellung aller postsynaptischen Elemente von Ribbonsynapsen. ■, ■ = Stäbchen bzw. Zapfen SK; ■, ■ = Horizontalzellfortsätze; ■, ■ = Bipolarzellendriten (Animation dieser Rekonstruktion: 01.avi).

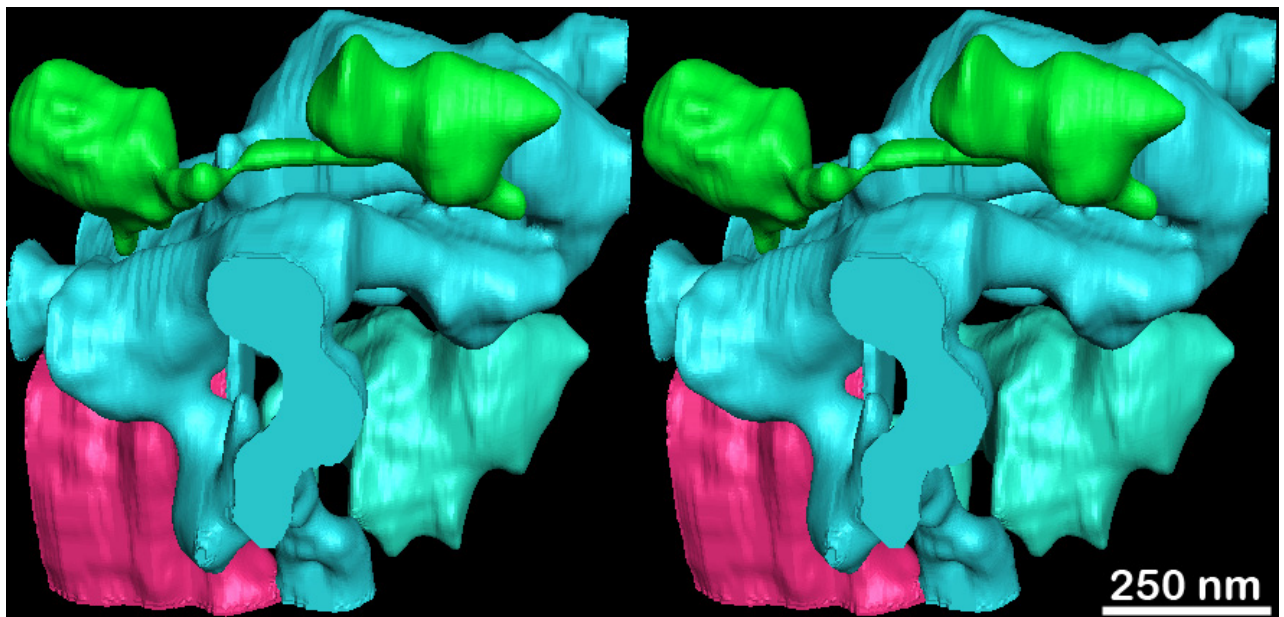


Abb. 8 An einem nur noch dünnen Zwischenstück hängen bei dem grün dargestellten SK zwei große rundliche Auftreibungen. Solch massive Veränderungen der Morphologie finden sich nur unter Kalziumentzug (Stäbchenterminal; BALB/c Maus). Die beiden zu der Synapse gehörenden Horizontalzellfortsätze sind bläulich dargestellt, der Bipolarzellendrit rot (Animation dieser Rekonstruktion: 8.avi; vergleiche auch Abb. BALB2).

Wie Abb. 8 zeigt, lagen hier massive Verklumpungen an beiden Enden eines im mittleren Bereich drastisch verschmälerten SK vor. Zusätzlich fanden sich hier große kugelförmige bis klumpige SK (nicht gezeigt).

Während in Zapfenbipolarzellen kleine, meist plattenförmige SK mit maximalen Durchmessern bis 250 nm anzutreffen sind (Abb. 9), treten in den Bipolarzellen von Stäbchen deutlich größere, leicht gebogene scheiben- bis plattenförmige oder lange bandartige SK mit maximalen Längen nur selten über 1 μm auf (Abb. 10).

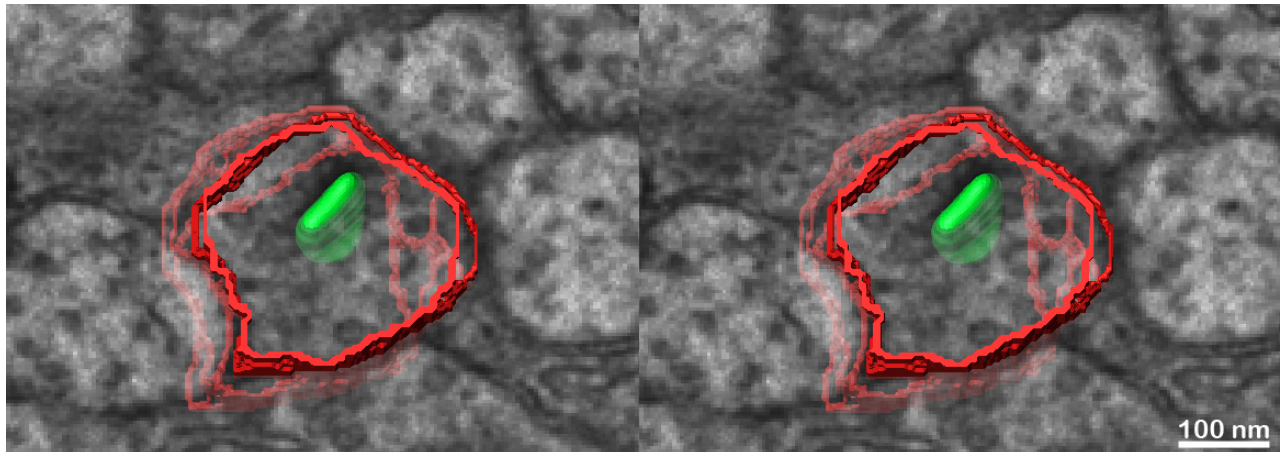


Abb. 9 Kleines plattenförmiges SK in einem Axon einer Zapfenbipolarzelle einer SD-Ratte. Die Verankerung des grün markierten SK erfolgt über feine Fortsätze zu einem kleinen elektronendichten Plaque an der präsynaptischen Zellmembran (rot; Animation dieser Rekonstruktion: 9.avi; vergleiche auch IPS1.avi).

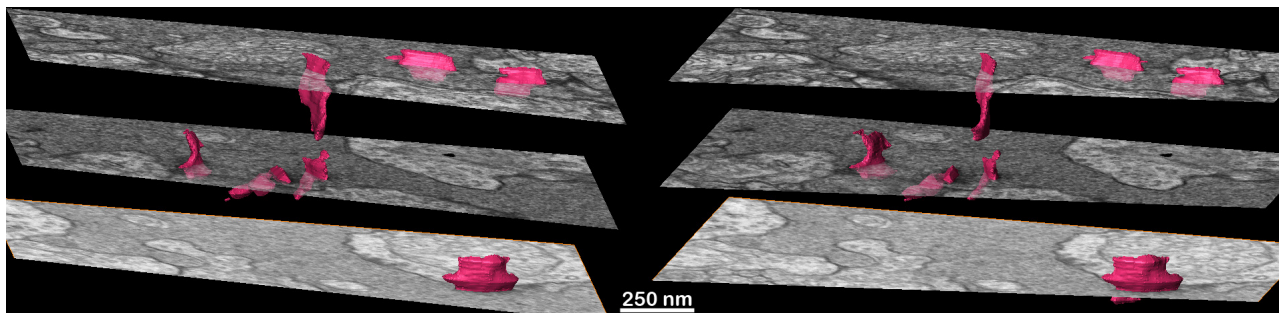
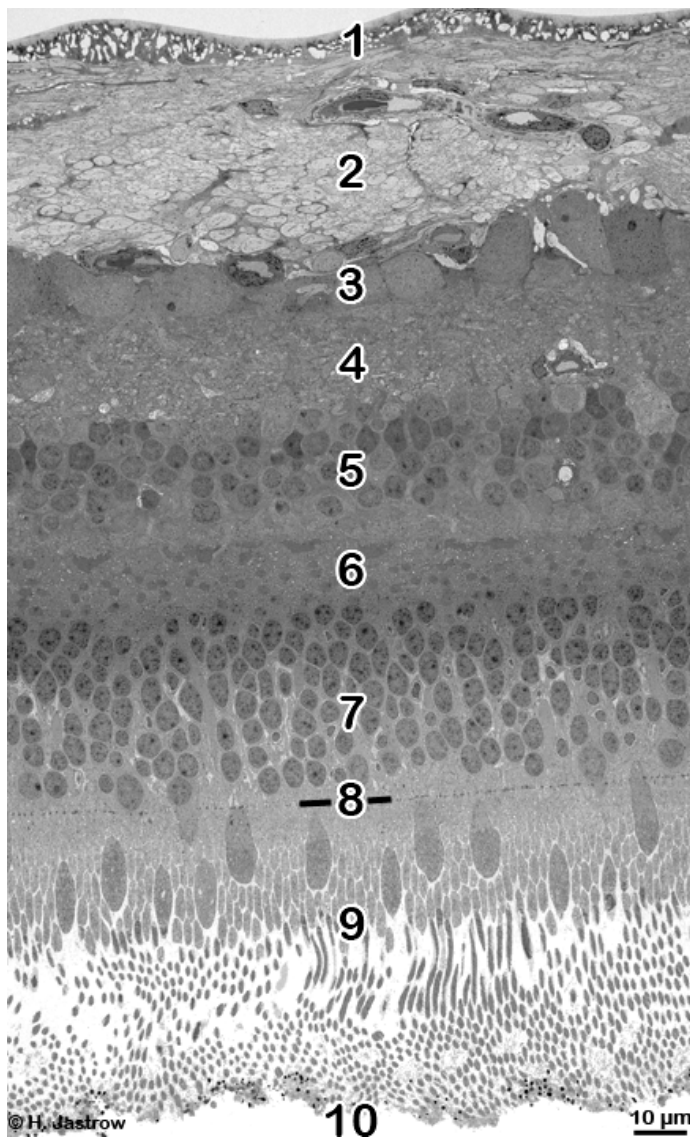


Abb. 10 Die hier rot dargestellten SK von Stäbchenbipolarzellaxonen einer SD-Ratte sind leicht gebogene Platten und deutlich größer als das in Abb. 8 gezeigte SK einer Zapfenbipolarzelle desselben Tieres (Animation dieser Rekonstruktion: 10.avi; vergleiche auch IPS2.avi).

1b Untersuchte Organe

Die **Netzhaut** (Retina) ist ein nach peripher verlagerter Teil des Zwischenhirns und das wichtigste Sinnesorgan des Menschen und der meisten Tiere und hat mehrschichtigen Aufbau (Abb. 11), der vielfach detailliert beschrieben wurde (Missotten 1964, 1965a; Dowling 1970; 1987; Rodieck 1973, 1988; Wässle & Boycott 1991; Kolb 1994; im Internet: webvision.med.utah.edu; www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMHRetina.html).

Die in dieser Arbeit untersuchten Ribbonsynapsen befinden sich 1. zwischen den Rezeptoren (Stäbchen für Hell/Dunkel Wahrnehmung und Zapfen für das Farbsehen) und den ihnen nachgeschalteten zweiten Neuronen (Bipolarzellen) in der äußeren plexiformen Schicht und 2. zwischen den Bipolarzellen und den amakrinen Zellen sowie den Ganglienzellen, deren Fortsätze sich letztlich zum Sehnerven bündeln.

**Abb. 11**

Menschliche Retina mit den Schichten gemäß dem Weg des eintreffenden Lichts (von oben nach unten):

1. Innere Grenzmembran; folgt auf den Glaskörper
2. Nervenfaserschicht
3. Ganglienzellschicht
4. Innere plexiforme Schicht; hier liegen die Ribbonsynapsen der Bipolarzellterminalen
5. Innere Körnerschicht mit den Perikarya von Stäbchen- und Zapfenbipolarzellen, amakrinen Zellen und Horizontalzellen
6. Äußere plexiforme Schicht mit Ribbonsynapsen in den Terminalen der Photorezeptoren (Stäbchen & Zapfen)
7. Äußere Körnerschicht mit Zellkernen der Stäbchen & Zapfen
8. Äußere Grenzschicht (Gürteldesmosomen)
9. Schicht der Stäbchen & Zapfen, die die Innen- & Außenglieder der Photorezeptoren darstellen
10. Pigmentepithel (Zellkörper hier abgerissen)

Die **Zirbeldrüse** (Pinealorgan, Epiphysis cerebri, Corpus pineale) gehört zum Epithalamus und ist eine Ausstülpung des Zwischenhirns. Sie ist ein neuroendokrines Organ, dessen wichtigstes Hormon das mit einem charakteristischen zirkadianen Rhythmus ausgeschüttete Melatonin ist, das insbesondere beim Schlaf-Wachrhythmus und anderen diurnalen Rhythmen eine Rolle spielt (Reiter 1980, 1981, 1991, 1993; Stehle et al. 2002; Simonneaux & Ribelayga 2003; Pévet et al. 2006; Ackermann & Stehle 2006). Die Zirbeldrüse ist in allen Vertebraten ein wesentlicher Bestandteil der biologischen Uhr (Korf 1994; Korf & Stehle 2002) und dient der photoneuroendokrinen Transduktion: lichtabhängige neuronale Inputs führen via komplexe Transkriptions-, Translations- und Posttranslationale Mechanismen zur Bildung von Melatonin (Korf et al. 1996; Korf & Stehle 2002). Die Bildung des Hormons erfolgt in den Parenchymzellen (Pinealozyten), die auch die häufigsten Zellen der Zirbeldrüse sind (Abb. 12). Bei Vertebraten finden sich 3 Hauptkategorien dieser Zellen: echte pineale Photorezeptoren mit den Photorezeptoren der Retina ähnlichen Außensegmenten (z.B. bei Eidechsen; Korf 1976), modifizierte Photorezeptoren mit rudimentären Außensegmenten (bei Sauropsiden) und Pinealozyten sensu stricto ohne Außensegmente (Säu-

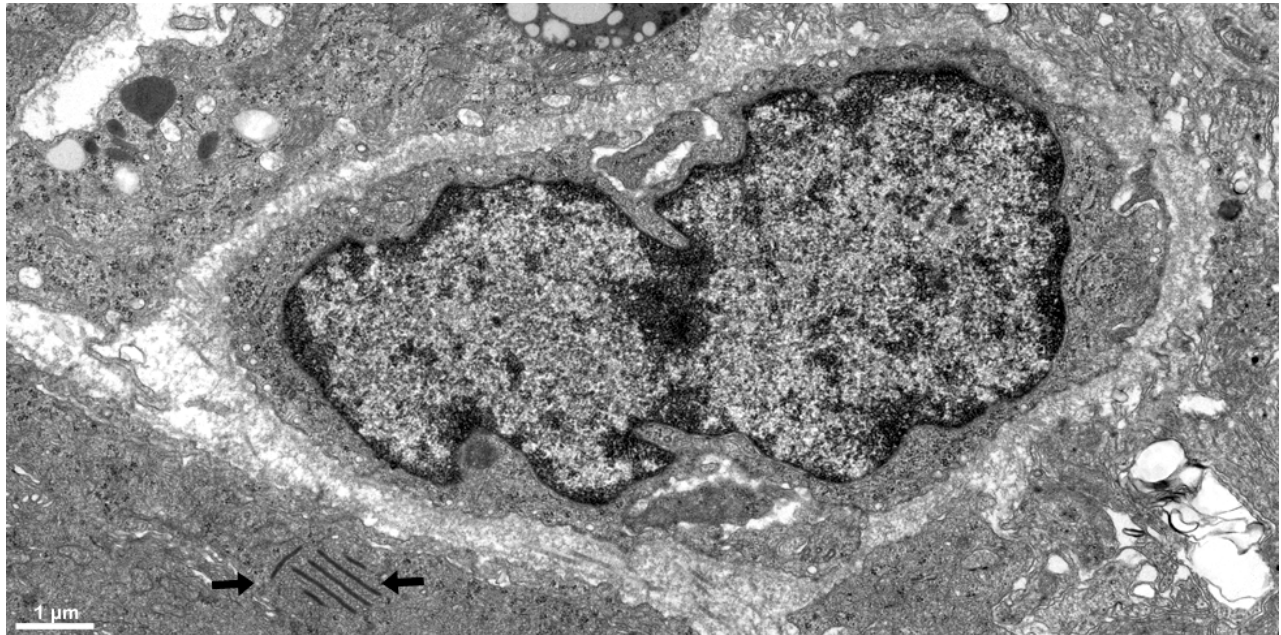


Abb. 12 In einem der hier gezeigten Pinealozyten der Meerschweinchenzirkeldrüse ist ein Feld mit Profilen von 6 synaptischen Körperchen zu erkennen (Pfeile).

getiere; Korf 2000). In ihnen finden sich synaptische Körperchen meist nahe der Zellmembran (Reviews: McNulty & Fox 1992; Bhatnagar 1994). Detaillierte Informationen über die Zirbeldrüse finden sich in: Bargmann (1943); Oksche (1965); Wartenberg (1968); Wurtmann et al. (1968); Kappers (1976); Relkin (1976); Pévet 1977; Reiter (1977); Vollrath (1981); Korf & Wicht (1991, 1992); Maronde & Stehle (2007).

1c Dynamik synaptischer Körperchen

Morphologische und quantitative Untersuchungen zeigen, daß SK keine statischen, sondern dynamische Organellen sind, die in der Retina und der Zirbeldrüse von Licht und Dunkelheit beeinflusst werden, aber auch tageszeitlichen Veränderungen unterliegen (Vollrath 1981; Spiwox-Becker 1995, Vollrath & Spiwox-Becker 1996; Adly et al. 1999, Spiwox-Becker et al. 2004; Jastrow et al. 2004; Jastrow & Racke 2007).

Die Befunde sind jedoch nicht einheitlich. So schildern Adly et al. (1999) bei über 24 Stunden laufenden Untersuchungen von BALB/c Mäusen tageszeit- und lichtabhängige Veränderungen von SK-Profilen: stabförmige Profile waren in der Dunkelphase länger, runde und keulenförmige Profile waren 3 Stunden nach Beginn der Lichtphase am häufigsten. Diese Befunde wurden von Spiwox-Becker et al. (2004) bestätigt: große glatte SK in der Dunkelphase gaben über Vorwölbungen während der Lichtphase Material ab und wurden kleiner. Die Veränderungen waren licht-, aber nicht tageszeitabhängig. Andererseits fanden Rao-Mirotnik et al. (1995) beim Vergleich beider Augen einer adulten Katze, von denen eines zugeklebt wurde, außer einer leichten durchschnittlichen Verkürzung keine relevanten Unterschiede in Form, Volumen und Oberfläche rekonstruierter Stäbchen-SK.

Wie in Jastrow & Racke (2007) zusammengefaßt, unterliegt auch in Pinealozyten der Ratte die Zahl und Größe synaptischer Körperchen einer ca. 24 Stunden Rhythmik (Vollrath 1973; Kurumado & Mori 1977, 1980; McNulty et al. 1985, 1987; Riemann et al. 1990). Außerdem wurden jahreszeitliche Schwankungen beschrieben (Karasek et al. 1988a; Martínez-Soriano et al. 1992). Das Licht, bzw. die Photoperiode verursacht funktionelle und ultrastrukturelle Veränderungen in Pinealozyten (Karasek 1981, Martínez-Soriano et al. 2002). Aber auch hier gibt es widersprüchliche Befunde. So z.B. fanden unter Dauerlicht in Rattenpinealozyten King & Dougherty (1982) die Zahl von SK Profilen stark reduziert (Dauerdunkelheit erhöht sie), während Vollrath & Maitra (1986) einen starken Anstieg nachwiesen. Letztgenannte Arbeit zeigte SK-Profilzahlen betreffend in der Reaktion auf Dauerlicht auch deutliche Speziesunterschiede auf: bei Meerschweinchen, Kaninchen, Haselmaus und Ratte eine klare Zunahme, bei syrischen Hamstern jedoch eine starke Abnahme. Solche Speziesunterschiede in der Reaktion der Organellen auf Licht bestehen auch in morphologischer Hinsicht: bei Meerschweinchen bewirkte Dauerlicht massive Strukturveränderungen von SK (siehe Ergebnisse 3a13: Seite 26), die für Ratten nicht beschrieben wurden (Vollrath & Maitra 1986). Wie schnell der Einfluß von Licht auf SK in Pinealozyten ist, belegen Karasek et al. (1988b), die schon nach kurzen Lichtpulsen in der Nacht eine Abnahme von SK Profilen nachwiesen.

Die Transmission der Lichtinformation zur Zirbeldrüse erfolgt von der Retina via Hypothalamus (Nucleus suprachiasmaticus und paraventricularis) - Nucleus thoracicus dorsalis - Neurone der oberen Halsgrenzstrangganglien. Letztere entsenden sympathische Axone zur Innervation der Drüse. Der Nucleus suprachiasmaticus nimmt dabei als Steuerungsorgan für zirkadiane Prozesse eine Schlüsselrolle der biologischen Uhr ein (Reuss 1993; Aronson et al. 1993). Außerdem gibt es noch zentralnervöse Inputs (Wurtman et al. 1967; Reviews: Korf & Møller 1984; Reuss 1996, 2003). Der wichtigste Steuerungsfaktor ist die adrenerge Innervation, die ab dem 8ten bis 10ten Tag nach der Geburt etabliert wird (Machado et al. 1968, Kurumado & Mori, 1980) und im Kontext mit der Reifung des retinalen Photorezeptorsystems gesehen werden muß, welches bei Ratten ab dem 12ten postnatalen Tag morphologisch und physiologisch ausgereift ist (Weidmann & Kuwabara 1968). In der Meerschweinchenzirbeldrüse wurden SK ab dem 42. postkoitalen Tag nachgewiesen, die denen adulter Tiere glichen (Luo et al. 1990).

1d Dreidimensionale (3D) Rekonstruktionen

Zum Beginn des Habilitationsprojektes waren nur wenige Abbildungen einfacher Rekonstruktionen von SK publiziert. Diese basierten entweder auf handgefertigten Modellen aus aufeinander geklebten orientierten Profilen (Sjöstrand 1958, 1974, 1976; Allen 1969; Foos 1969; Sobkowicz et al. 1982; McNulty et al. 1986; Rao-Mirotnik et al. 1995) oder auf mit Hilfe von Computern generierten Überlagerungen farbcodierter Strukturprofile (McCartney & Dickson 1977, 1985; Robertson & Dickson 1987; Sanyal et al. 1992; Merchan-Perez & Liberman 1996). Sjöstrand (1958, 1974, 1976) dessen Untersuchungen sich auf die Darstellung der Terminalen von Photorezeptoren der Kaninchenretina und deren Verschaltung konzentrierten, baute riesige Modelle,

stellte aber nur wenige band- bis plattenförmige in ein bis zwei Ebenen gebogene SK in Zeichnungen dar. Foos et al. (1969) zeichneter nur ein ungewöhnlich großes plattenförmiges SK einer Bipolarzelle der menschlichen Netzhaut. Die einfachen digitalen Übereinanderprojektionen von Profilen weniger SK von McCartney & Dickson (1985) demonstrierten in 2 Abbildungen 2 c-förmig gebogene Strukturen in Stäbchen und 5 bizarre SK in einem Zapfenterminal von Meerschweinchen. Rao-Mirotnik et al. (1995) zeigten drei Abbildungen eines Tonmodells und Zeichnungen von 6 großen hufeisenförmigen SK, von denen eines etwa in der Mitte gebrochen war, in Stäbchenterminalen einer Katze, die von digitalisierten übereinandergelagerten Acetatplatten mit abgezeichneten SK Profilen gewonnen wurden. Auch Spiwox-Becker (1995) zeichnete hufeisenförmige und bizarr geformte SK in Stäbchenterminalen der Rinderretina, die auf übereinandergelagerten Profilzeichnungen basierten. Sanyal et al. (1992) zeigten als erste komplett am PC generierte 3D-Rekonstruktionen einer normalen und einer atypischen Stäbchensynapse mit SK und postsynaptischen Elementen in jeweils 3 unterschiedlichen Ansichten bei Mauschimären, wobei die normale Synapse in etwa der hier gezeigten Abb. BALB15 (Seite 49) glich. Umfangreicher waren die 2003 von Migdale et al. aus orientierten digitalisierten Serienschritten generierten 3D-Rekonstruktionen von 32 Stäbchen Ribbonsynapsen bei Affen, Katzen und dem Menschen. Hierbei wurden die bogenförmigen SK nur durch die orientierte Abbildung ihrer Profile in Stereobildern gezeigt (detaillierte Befunde siehe Diskussion 4a23: Seite 83).

In der Zirbeldrüse wurden vor den hier dargestellten Untersuchungen nur wenige SK rekonstruiert, so ein mit Hilfe übereinandergelagerter Kunststoffplatten visualisiertes Feld plattenförmiger SK in Pinealozyten des Rhesusaffen (McNulty et al. 1986) und ein gebogenes bandförmiges, sowie ein hufeisenförmiges SK der Hühnchenzirbeldrüse (Robertson & Dickson 1987).

Sobkowicz et al. (1982) untersuchten organkultivierte Haarzellen des Corti-Organs bei Mäusen und publizierten Wachsmodele und Zeichnungen rekonstruierter, bizarr gebogener plattenförmiger, sowie rundlicher und irregulärer synaptischer Körperchen. Ähnliche Befunde wurden von Lenzi und Mitarbeitern 1999 an sacculären Haarzellen durch qualitativ hochwertige elektronentomographische Rekonstruktionen erhoben. Die Übertragung dieser Methode auf größere bandförmige SK wäre außerordentlich schwierig, da die erforderlichen Schnitte von erheblicher Schnittdicke sein müßten und mehrere davon in Serie untersucht und die 3D-Datenobjekte anschließend paßgenau zusammengefügt werden müßten. Daher wurde bei den hier durchgeführten Untersuchungen die Rekonstruktion von SK unter Verwendung 50 nm dicker Serienschritte realisiert.

1e Ziele der selbst durchgeführten Untersuchungen

Zum Verständnis der Vorgänge an mit synaptischen Körperchen (SK) ausgestatteten Synapsen, zu denen neben den Hochgeschwindigkeitssynapsen der am Sehvorgang beteiligten Photorezeptoren auch die deutlich langsameren der Zirbeldrüse zählen, ist es notwendig, die hierfür essentiellen morphologischen Grundlagen genau zu kennen und aktivitätsabhängige Veränderungen richtig zu erfassen. So sollten im Rahmen dieses Projekts die genaue 3D-Struktur von SK

und deren räumliche Organisation in Synapsen der Retina und Zirbeldrüse unter diversen Licht-Dunkelbedingungen einen Einblick in die funktionelle Morphologie der Zellorganellen geben. Konkret wurden zunächst mögliche Formen von SK anhand von Profillängenmessungen auf Serienschritten der Rattenzirbeldrüse um 12.00 und 24.00 Uhr aufgezeigt (Jastrow et al. 1997a), bizarr veränderte SK der Meerschweinchenzirbeldrüse unter Normalbedingungen (Jastrow et al. 1996a, 1997g) und Dauerlicht rekonstruiert (Jastrow et al. 1997c, d, 2004), SK unter verschiedenen Licht-Dunkel Bedingungen der Retina von Ratten und BALB/c Mäusen 3D visualisiert (Jastrow et al. 2000; Gustavus et al. 2003; Jastrow 2004; Jastrow et al. 2005) und erstmalig 3D-rekonstruierte SK in Pinealozyten der Sprague-Dawley Ratte demonstriert (Jastrow & Racke 2007). Die Rekonstruktion von SK der menschlichen Retina in Zapfen ist in dieser Schrift erstmals publiziert. Ferner werden benachbarte Stäbchen und erstmals auch mehrere SK von Bipolarzellen gezeigt, die bisher nur in einem Vortrag vorgestellt wurden (Jastrow et al. 2007).

Ferner galt es, dynamische Veränderungen der SK in der Zirbeldrüse auch in quantitativer Hinsicht durch Bestimmung ihrer Zahl in einem definierten Volumen sinnvoll zu erfassen (Hainz et al. 1997; Jastrow et al. 1996b, 1997b, e, f, 1998, - & Racke 2007). Die allgemein etablierte Methode ist die der Auszählung von Profilen in einer Fläche auf einem einzigen Schnitt (Profilzählungen = PZ), um Doppelzählungen zu vermeiden. Sie liefert jedoch nur unzureichende und nicht immer korrekte Resultate (Jastrow & Racke 2007), zumal die ausgezählten Flächen von $1.470 \mu\text{m}^2$ (Karassek et al. 1982) bis $65.630 \mu\text{m}^2$ (Jastrow et al. 1997b) variierten und manche Autoren auch nur sog. "Ribbonfelder" zählten, d.h. einzelne oder Gruppen dicht beieinander liegender SK gleichermaßen als ein Feld erfaßten, um gebogene SK nicht doppelt zu zählen. Das grundlegende Problem der Methode ist jedoch, daß ihre Ergebnisse durch die Form und Größe der SK beeinflusst werden: viele sehr kleine SK können zu gleicher oder gar niedrigerer Profilzahl führen wie wenige deutlich größere. Die in Jastrow und Racke (2007) veröffentlichte Tabelle faßt alle verfügbaren publizierten quantitativen Daten für die Sprague-Dawley Ratte zusammen und zeigt für nahezu identische Versuchsbedingungen oft erhebliche Abweichungen, wie sie auch in den zusammenfassenden Tabellen von McNulty & Fox (1992) und Bhatnagar (1994) auffallen. Aus diesem Grund wurde eine neue Methode entwickelt (Jastrow et al. 1996b, 1997b), die eine Modifikation der von Sterio (1984) eingeführten und von Gundersen et al. (1986, 1988) weiterentwickelten bidirektionalen Disektor Zählmethode darstellt. Diese gestattet es, im Gegensatz zur klassischen Disektormethode, auch seltene kleine Strukturen wie die SK unabhängig von Ihren Dimensionen oder ihrer räumlichen Orientierung korrekt zu quantifizieren (Details siehe Methoden 2b5: Seite 21). Sie liefert statt der Profilzahl von SK in einer Fläche die validere Zahl synaptischer Körperchen in einem Volumen (Jastrow et al. 1997b, Jastrow & Racke 2007). Um die Auswertungszeit für quantitative Untersuchungen zu reduzieren, wurde untersucht, ob es mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors möglich ist, die Ergebnisse der sehr viel aufwendigeren Disektormethode aus PZ Werten für Tiere identisch behandelte Gruppen zu bestimmen, wenn man nur bei einem oder zwei Tieren Disektorzählungen durchführt, die dabei bestimmten Fakto-

ren auf die anderen Tiere der Gruppe anwendet und hierbei die ebenfalls ermittelten durchschnittlichen SK Profillängen berücksichtigt (Jastrow & Racke 2007).

Ergänzt wurden die Untersuchungen durch einen immunfluoreszenzmikroskopischen und 3D-immunelektronenmikroskopischen Nachweis von beta-Dystroglykan im Bereich von Ribbonsynapsen an Zapfen des Hühnchens, um zu zeigen, daß Ribbonsynapsen assoziierte Vorgänge auch einen Bezug zu klinisch relevanten Erkrankungen haben (Jastrow et al. 2006). So gehen Muskeldystrophien neben ihrer typischen myasthenischen Symptomatik, die sich aus der progressiven Degeneration der Skelettmuskulatur ergibt, auch mit gestörten synaptischen Transmissionsvorgängen im ZNS und speziell in der Retina einher, die sich elektroretinographisch nachweisen lassen (Cibis et al. 1993, Fitzgerald et al. 1994). Bei den meisten Muskeldystrophien findet sich, genetisch bedingt, ein veränderter Dystrophin-assoziiierter Glykoproteinkomplex (DGC; Pillers et al. 1999). Dieser dient in der Skelettmuskulatur als Verankerungsstelle für viele Proteine, die in der Signaltransduktion eine Rolle spielen. Eine ähnliche Funktion wird auch für das ZNS postuliert. Ein Beispiel hierfür sind die Synapsen zwischen den Photorezeptorterminalen und ihren nachgeschalteten Zellen in der äußeren plexiformen Schicht der Retina (Blank et al. 1999, Pillers et al. 1999). Die genaue Lokalisation des DGC in dieser Region war noch nicht bekannt und kontroverse Befunde lagen bezüglich seiner Verteilung vor (Drenckhahn et al. 1996; Blank et al. 1997, Schmitz & Drenckhahn 1997). Deshalb wurde in Jastrow et al. (2006) neben dem lichtmikroskopischen Nachweis mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz, eine exakte Lokalisation von β -Dystroglykan, welches die zentrale Komponente des DGC darstellt (Ibraghimov-Beskrovnaya et al. 1992) anhand von 3D-Rekonstruktion immunelektronenmikroskopisch markierter Serienschnitte exemplarisch an Zapfenterminalen von Hühnchen bestimmt. Bei den zugehörigen Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde zusätzlich das präsynaptische Zytomatrixprotein Bassoon, welches SK an der Zellmembran verankert (tom Dieck et al. 2005, Haverkamp & Wässle 2000) nachgewiesen.

2. Material und Methoden

2a Material

Die folgende Tabelle listet die in den Publikationen und weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Habilitationsschrift verwendeten Tiere auf. Alle erhielten Futter und Wasser ad libitum. Sie wurden in handelsüblichen Laborkäfigen im Tierstall des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter folgenden Bedingungen gehalten: 50 % Luftfeuchtigkeit, Raumtemperatur $20 \pm 1^\circ\text{C}$, Licht durch weiße Neonröhren (Osram L 65/25, in der Regel 50-200 Lux am Käfigboden). Die Tierhaltung entsprach in allen Fällen den Richtlinien zur artgerechten Haltung von Versuchstieren der Universität Mainz und folgte den geltenden deutschen Vorschriften (Tierschutzgesetz vom 25.5.1998).

Tierart (Stamm)	Alter bzw. Gewicht	m/w	L/D	L an	†	Fläche	[n]	Quelle / Versuch	
Ratte (Sprague-Dawley)	2 Monate	m	12:12	07.00	12.00		6	Jastrow et al. 1997a, e, f	
	2 Monate	m	12:12	07.00	24.00		5		
	2 Monate	m	12:12	07.00	12.00	65.630	1	Jastrow et al. 1996b, 1997b, f	
	9 Wochen	m	12:12	06.00	09.00		5	Js Versuch; Material von Dr. I. Spiwoks-Becker	
	9 Wochen	m	12:12	06.00	09.00	OK1	5		
	9 Wochen	m	12:12	06.00	21.00		5		
	9 Wochen	m	12:12	06.00	21.00	OK2	5		
		8 Wochen	m+w	4:20	06.00	09.30		5	Material von Dr. I. Spiwoks-Becker
Ratte (Sprague-Dawley) Gruppe	1	150-180g	m+w	4:20	05.30	09.00	22.184 [#]	6	Jastrow & Racke 2007
	2	150-180g	m+w	4:20	05.30	13.15	21.472 [#]	6	
	3	150-180g	m+w	4:20	16.30	09.30	20.801 [#]	6	
	4	150-180g	m+w	20:4	14.30	10.00	21.759 [#]	6	
	5	150-180g	m+w	20:4	14.30	14.15	21.557 [#]	6	
	6	150-180g	m+w	20:4	01.30	10.30	20.717 [#]	6	
Hühnchen (white leg-horn)	3 Wochen	m	12:12	06.00	12.00	ca.20.000 [#]	6	Jastrow et al. 1997e; 1998; Hainz et al. 1997	
	3 Wochen	m	12:12	06.00	24.00	ca.20.000 [#]	6		
	3 Wochen	m	12:12	06.00	12.00	ca.20.000 [#]	6		
	3 Wochen	m	12:12	06.00	24.00	ca.20.000 [#]	6		
	1 Tag	m	12:12	07:00	09.00		3	Jastrow et al. 2006	
	adult	m	12:12	07:00	14.00		1		

Legende siehe folgende Seite!

Tierart (Stamm)	Alter/Gewicht	m/w	L/D	L an	†	Fläche	[n]	Quelle/Versuch	
Maus (BALB/c)	9 Wochen	m	12:12	06.00	05.45		2	Jastrow et al. 2000, 2005; Gustavus et al. 2001, 2003; Kolios 2006; Material von Dr. I. Spiwoкс-Becker	
	9 Wochen	m	12:12	06.00	08.10		4		
	9 Wochen	m	12:12	06.00	08.45		2		
	9 Wochen	m	12:12	06.00	17.00		5		
	9 Wochen	m	12:12	06.00	09.00		5	Jb Versuch; Material von Dr. I. Spiwoкс-Becker	
	9 Wochen	m	12:12	06.00	09.00	OK1	5		
	9 Wochen	m	12:12	06.00	21.00		5		
	9 Wochen	m	12:12	06.00	21.00	OK3	5		
	9 Wochen	m	12:12	06.00	22.00		OK2	1	Spiwoкс-Becker et al. 2004, 2007
	6 Wochen	m	DD*	-	10.00		2		
Meerschweinchen (Pirbright white)	adult	m	12:12	06.00	12:00		1	Jastrow et al. 1996a, 1997c, d, g, 2004; Material von Vollrath 1986	
	adult	m	12:12	06.00	24:00		1		
	adult	m	4ML	-	12:00		3		
	785 ± 56g	m	8WL	-	10.00	45.676	5	Larisch 1989	
	350	m	70dDD	-	11.00		1	Vollrath & Huss 1973	
	370g	m	12:12	05.00	10.30	14.632	1	Peschke et al. 1996	
Kaninchen	3640g	m	12:12	07.00	17.00	17.678	1	Martínez-Soriano et al. 1984	
Mensch	62 Jahre	m					1	Jastrow & Meissner 2006; Jastrow et al. 2007	
	60 Jahre	m					1		
	81 Jahre	m					1		

g = Gewicht in Gramm; m = männliche Tiere; w = weibliche Tiere;

L/D = Verhältnis von Licht- zu Dunkelstunden; Lan = Licht an um ... Uhr;

† = Zeitpunkt der Tötung; Fläche = ausgezählte Gewebsfläche pro Tier in μm^2 ;

[n] = Zahl der Tiere; 4ML / 8WL = 4 Monate / 8 Wochen Dauerlicht;

70dDD = 70 Tage Dauerdunkelheit;

DD* = die Tiere wurden seit Geburt unter Dauerdunkelheit gehalten

OK1 = Organkultur mit Licht + 1 μM Ca^{++} -Ionophor und 1 mM CaCl_2 ;

OK2 = Organkultur in Dunkelheit + 1 mM Ca^{++} -Blocker EGTA;

OK3 = 30 Min. Organkultur in Dunkelheit + 100 μM Ca^{++} -Blocker Nifedipin;

= Mittelwert der tatsächlich ausgezählten Flächen bei Disektorzählungen.

Herkunft der Tiere:

Die Sprague-Dawley Ratten stammten aus der institutseigenen oder der Tierzucht der Universität Mainz. Die albinotischen BALB/c Mäuse wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen, BRD), die Meerschweinchen und Kaninchen von Charles-River (Hannover, BRD) geliefert.

Die Hühnchen aus Jastrow et al. (2006) wurden von einer lokalen Hühnerfarm bezogen, die aus Jastrow et al. 1997e; 1998 und Hainz et al. 1997 stammten aus der Hühnerzuchtanlage von LGL (Schaafheim, BRD).

Das menschliche Material wurde im ersten Fall freundlicherweise von Herrn OA Prof. Dr. med. B. Stoffelns (Universitätsaugenklinik Mainz) mit Zustimmung des 62-jährigen Patienten zur Verfügung gestellt. Der Patient mußte sich wegen eines malignen Aderhautmelanoms einer Bulbektomie unterziehen. Das Material wurde aus der tumorfreien Hälfte des Augapfels gewonnen und konnte bereits ca. 4 Min. nach Extirpation fixiert werden. Analysiert wurden 10 Areale in 55 lückenlosen Serienschnitten mit einer Dicke von 50 nm.

Die beiden übrigen menschlichen Präparate wurden aus für Cornealtransplantationen verwendeten Bulbi von Multiorganspendern gewonnen und freundlicherweise von OA Prof. Dr. med. N. Ardjomand bzw. Prof. Dr. rer. nat. E. Haller-Schober (beide Universitätsaugenklinik, Graz, Österreich) zur Verfügung gestellt. Da hier die Fixierung erst 4 bzw. 14 Stunden post mortem erfolgte, war die Gewebserhaltung für die Anfertigung von Rekonstruktionen zu schlecht, dennoch konnten einzelne Ribbonsynapsen für vergleichende Betrachtungen genutzt werden.

2b Methoden

Die Tiere wurden mit Äther tief narkotisiert und durch Genickbruch (Jastrow & Racke 2007) in den übrigen Fällen durch Dekapitation mit Hilfe einer Guillotine getötet. Bei den Versuchen unter Dunkelbedingungen erfolgte die Gewebspräparation unter gedimmtem Rotlicht. Sämtliches untersuchtes Gewebe wurde direkt nach der Tötung der Tiere gewonnen und so rasch wie möglich in das Fixativ bzw. bei einigen Versuchen in Organkulturschalen eingebracht.

2b1 Organkulturen

Der innere Flüssigkeitsraum kleiner Plastikculturschalen (Falcon Nr. 3037, Becton Dickinson, Heidelberg, BRD) wurde mit Nährmedium, der äußere mit destilliertem Wasser gefüllt. Die entnommenen Gewebstücke wurden auf sterilisierten Kaffeefiltern (Autoklav, 30 Min., 100°C) auf das Nährmedium gelegt, wobei auf die vollständige Benetzung der Filter mit Medium geachtet wurde. Das Einbringen der um Mitternacht entnommenen Organe erfolgte unter schwachem Rotlicht. Die Drüsen wurden für 12 Stunden in einem dunklen Brutschrank kultiviert (Temperatur: 37°C, O₂-Konzentration: 95 %, CO₂-Konzentration: 5 %). Das die Organe umgebende Kulturmedium bestand bei der Hühnchenuntersuchung (Jastrow et al. 1998) aus: 4 ml modifiziertem McCoy's 5a Nährmedium (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) + 25 mM HEPES-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) mit L-Glutamin + 0,5 ml Schweineserum + 0,5 ml Hühnerserum und 50 µl Streptomycin-Penicillin. Bei den übrigen Versuchen wurde 1,5 ml BGJb-Nährmedium (Invitrogen, Karlsruhe,

BRD) mit 0,1 mg/ml Ascorbinsäure, 1 mg/ml Rinderserumalbumin V, 2 mM Glutamin und 50 µl Streptomycin-Penicillin verwendet.

Das Material der Untersuchungen Js (Rattenretina) und Jb (Retina BALB/c Maus) stammte von Dr. I. Spiwoks-Becker. Nach 30-minütiger Organkultur wurde das Material sofort fixiert. Bei Jb wurde einer Organkultur unter Licht 1 µM Ca^{++} -Ionophor A23187 und 1 mM CaCl_2 hinzugegeben (Details in Spiwoks-Becker et al. 2004) und einer Dunkelkultur 100 µM Nifedipin. Bei Js wurde analog verfahren, jedoch 1 mM EGTA (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, BRD) zum Ca^{++} -Entzug verwendet.

2b2 Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie

Die Fixierung erfolgte in einer modifizierten Lösung nach Karnovsky (1965) mit 2 % Paraformaldehyd und 2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Phosphatpuffer (Sörensen), pH 7,4 für 24 Stunden bei 4°C. Das Fixativ wurde 3 x 15 Min. in 0,1 M Na-Phosphatpuffer mit 0,1 M Saccharose ausgewaschen. Anschließend wurde das Gewebe 90 Min. in 2 %-igen gepuffertem Osmiumtetroxid bei pH 7,4 inkubiert und darauf 3 x 15 Min. in 0,1 M Na-Phosphatpuffer ausgewaschen. Die Entwässerung erfolgte 2 x 15 Min. in 50 % Aceton. Darauf folgte die Blockkontrastierung über Nacht mit 70 % Aceton + 0,5 % Uranylacetat + 1 % Phosphowolframsäure bei 4° C. Die Entwässerung wurde durchgeführt mit 2 x 15 Min. 80 % Aceton, 2 x 15 Min. 90 % Aceton, 2 x 15 Min. 96 % Aceton und 3 x 20 Min. 100 % Aceton. Nach 2 x 15 Min. Propylenoxyd wurden die Gewebsblöcke 30 Min. in 2 : 1 Propylenoxyd : Epon[®] (Serva, Heidelberg, BRD) Mischung, 30 Min. 1 : 1 Propylenoxyd : Epon Mischung und 30 Min. 1 : 2 Propylenoxyd : Epon Mischung eingebracht um über Nacht bei 4° C in reiner Eponlösung zu verbleiben. Nach der Ausbettung in frische Eponlösung wurden die Blöcke ca. 48 Stunden bei 65° C im Brutschrank polymerisiert. Zur schnelleren Orientierung wurden die ausgehärteten Blöcke an einer Seite spitz zugeschnitten oder so getrimmt, daß die Orientierung mit bloßem Auge erkennbar war. Bei einigen Versuchen wurde auch bereits eingebettetes Material aus früheren Studien am Institut verwendet, um unnötige Schlachtungen zu vermeiden. Auf einem Reichert Ultratome III wurden die Serienschritte mit Diatome Ultra 45° (Diatome AG, Biel, Schweiz) Diamantmessern mit einer konstanten Dicke von 50 nm geschnitten. Die Schnitte wurden auf mit Formvar bedeckte Kupfer-Einlochnetze orientiert mit einer Wimper aufgebracht. Die Nachkontrastierung erfolgte für 10 Min. in einer Lösung von 8 % Uranylacetat in destilliertem Wasser und anschließend für 5 Min. in einer Lösung von 0,7 % Bleicitrat + 0,9 % Natriumcitrat nach Reynolds (1963). Nach Trocknung wurden die Schnitte transmissionselektronenmikroskopisch untersucht. Hierfür wurde bis Januar 2000 ein Zeiss EM 10c, danach ein LEO 906E[®] verwendet (Hersteller beider Geräte: Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD).

2b3 Bildaquisition

Für die Rekonstruktionen wurden lückenlose Serien von Schnitten der Retina bzw. der Zirbeldrüse untersucht. Bis Januar 2000 wurden Bilder synaptischer Körperchen (SK) bei 12.000- bis 25.000-facher Vergrößerung auf Negativplatten fotografiert. Die entwickelten Fotoabzüge wurden mit Hilfe eines HP ScanJet[®] 4c Scanners (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, Ca., USA) mit

einer Auflösung von 600 dpi digitalisiert. In einer ersten Untersuchung (Jastrow et al. 1997a) wurden die Längen stabförmiger Profile von SK bei SD-Ratten gemessen. Dabei wurde mit einem Schnitt in der Mitte einer lückenlosen Serie begonnen und so lange gemessen, bis ein verfolgtes SK nicht mehr angeschnitten war oder der erste bzw. letzte Schnitt der Serie erreicht war. Die Längenmessung erfolgte über einen mit Hilfe eines Spiegels auf den Sichtschirm projizierten feinen Lichtpunkt, der von einer speziellen "Maus" erzeugt wurde. Diese gehörte zu einem PC basierten Morphometriesystem (IDMS System Rev. 2.01, IMA GmbH, Dortmund, BRD), welches die Mausverschiebungen nach entsprechender Kalibrierung in Längen umrechnete. Die zu einem SK gehörenden Profile wurden ihrer Reihenfolge entsprechend untereinander unter Berücksichtigung der Schnittdicke angeordnet, einmal linksbündig, einmal zentriert und ferner an einer im Winkel von 45° verlaufenden Linie, da die o.g. Software keine echte Überlagerung der Schnitte ermöglichte. Die Enden der Profile wurden verbunden und die Flächen der so gewonnenen Areale mit dem IDMS vermessen.

2b4 Dreidimensionale (3D) Rekonstruktion

Nach der Anschaffung des LEO TEM 906E (1/2000) wurden SK mit Hilfe einer 14Bit Slow Scan CCD Kamera (Proscan®, Scheuring, BRD) und einem mit einer Matrox® Millennium 400G Framegrabber Karte ausgestatteten PC mit der Analysis 3.2® Software (Soft Imaging Systems, Münster, BRD) digital dokumentiert. Ferner wurden Übersichten in niedrigeren Vergrößerungen aufgenommen. Für die Rekonstruktion synaptischer Organellen wurde auf einem Schnitt aus der Mitte einer Serie begonnen und eine Stelle bzw. mehrere Stellen mit deutlich erkennbaren Profilen oder einem Feld mit mehreren SK gesucht. Die gewählten Areale wurden in den vorangehenden bzw. folgenden Nachbarschnitten verfolgt, so lange bis entweder das Ende der Serie erreicht war oder das Profil verschwunden war. Die dabei gewonnenen digitalisierten Schnitte wurden in 3D-Volumendatensätze überführt. Mit Hilfe geeigneter Software, anfangs einem in der Programmiersprache IDL® (Creaso, Gilching, BRD) mit Hilfe von Herrn Dirk Schmanke selbst geschriebenen Tool (Abb. Met1), dann mit Adobe® Photoshop® 7.0 bzw. CS (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA), Amira® 3.11 bzw. 4.0 und 4.11 (Mercury Computer Systems, Chelmsford, Ma, USA) erfolgte die Überlagerung der Serienschnitte und deren Ausrichtung (Alignment). Die Software für die eigentliche 3D-Rekonstruktion hat sich im Laufe der Untersuchungen rapide weiter entwickelt. Anfangs (Jastrow et al. 1996a, 1997c, d, g), wurde mit dem neurochirurgischen Operationsplanungssystem (NeurOPS, ConVis GmbH & Co KG, Mainz, BRD) dann mit VoxelCruncher 3.0 bis 5.01, und zwei Segmentierungstools (ConVis GmbH & Co KG, Mainz, BRD) gearbeitet; seit 6/2000 mit der Software Amira® 3.11, 4.0 bzw. 4.11. In diesen Programmen wurden mit Hilfe definierter Grauwertbereiche ganze SK oder andere Strukturen wie Zellmembranen, Mitochondrien, elektronendichte Verankerungen von SK oder postsynaptische Fortsätze segmentiert und als farbig codierte Voxelobjekte zusammengefaßt. Dies geschah entweder durch manuelles Nachzeichnen der Konturen oder durch ein Schwellenwert basiertes Keimzellwachstum, bei dem benachbarte Voxel ähnlicher Grauwerte zu einem Startvoxel addiert wurden. Bei einigen Voxelobjekten (z.B. Oberflächen synaptischer Terminale) wurde in Amira eine optisch angenehmere ge-

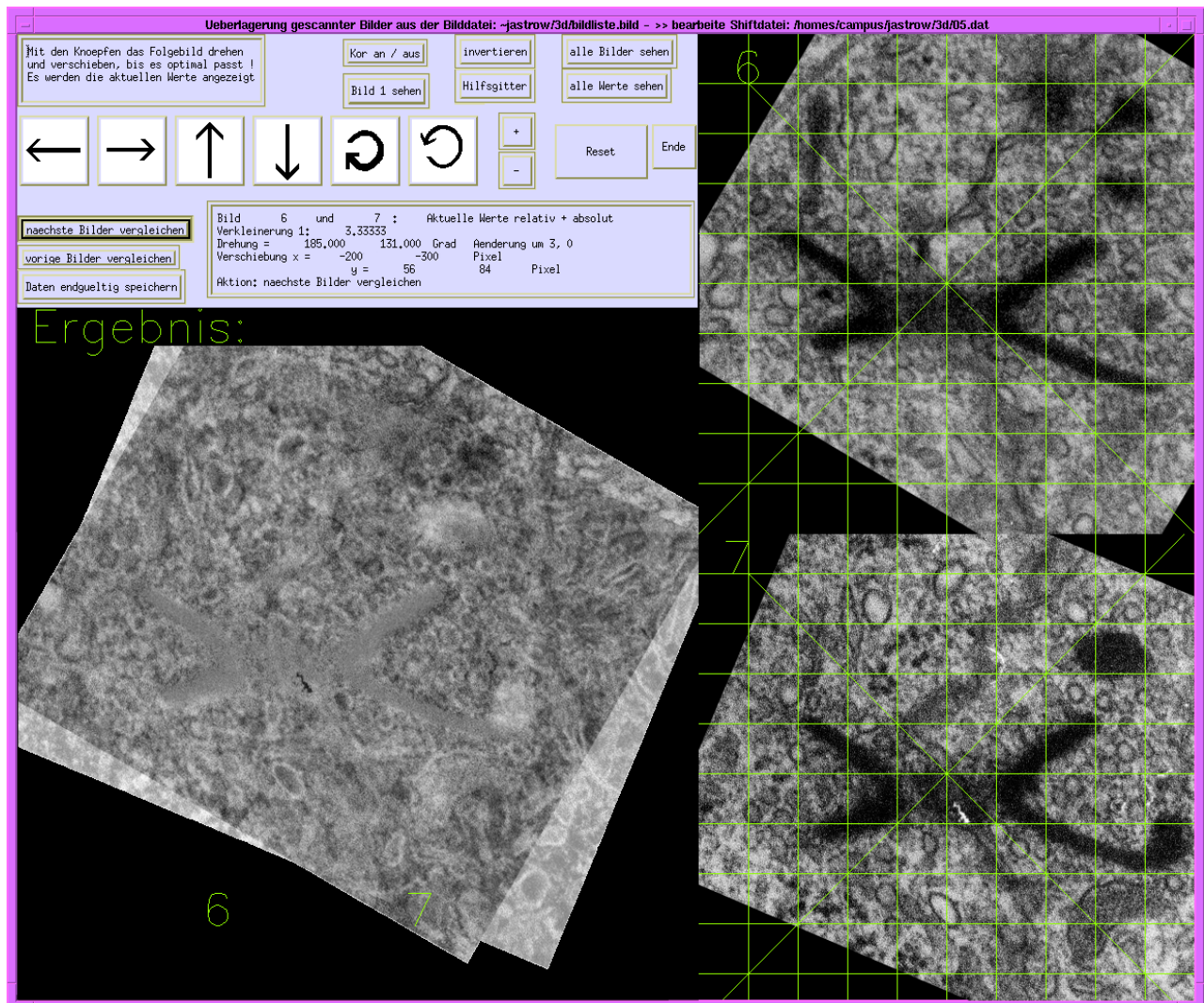


Abb. Met1 Monitorschnappschuß des selbst programmierten IDL[®] Tools zur Überlagerung von Schnitten. Durch Klicken der Knöpfe mit den Pfeilen kann der Folgeschnitt gegenüber dem ersten verschoben bzw. gedreht werden. Das Resultat wird sowohl in den Gitternetzen als auch als Überlagerung beider Schnitte angezeigt, wobei der Folgeschnitt invertiert dargestellt ist.

glättete Darstellung durch Interpolation gewählt, bei anderen wurden die Kanten zwischen den Schnittebenen mit Absicht erhalten, da hierdurch die Schnittdicke (50 nm) quasi als Maßstab erhalten blieb.

Die SK wurden sowohl als Einzelstrukturen als auch in Form gruppierter Objekte dargestellt, um die topographischen Beziehungen zueinander sowie die genaue Lage insbesondere zur Zellmembran zu erfassen. In der Retina wurde die Lage in Bipolar- und Horizontalzellfortsätzen sowie die Terminalen der Stäbchen und Zapfen visualisiert. Dabei wurden die Voxelobjekte in einem virtuellen dreidimensionalen Raum dargestellt, aus dem mit Hilfe einer virtuellen Kamera beliebige Ansichten in Form von Einzel- oder Stereobildern gespeichert wurden. Durch gezielt programmierte Drehung in verschiedenen Orientierungen und selektives Sichtbarmachen einzelner oder mehrerer Objekte wurden Sequenzen von Einzelbildern gewonnen, aus denen mit Hilfe der Videogenerierungssoftware AnimationShop[™] 3.04 (Jasc[®], Eden Prairie, Mn, USA) Animationen in publizierbarer Qualität generiert wurden.

2b5 Bidirektionale Disektorzählungen

Die hier geschilderte, selbst entwickelte Modifikation der Disektor Methode wurde in Jastrow et al. 1996b und -1997b vorgestellt und in folgenden späteren Arbeiten angewendet: Hainz et al. 1997; Hainz 2003; Jastrow et al. 1997e, f, - 1998. Bei den quantitativen Untersuchungen wurden Serien mit 15 bis 24 Schnitten untersucht. Auf zwei benachbarten Schnitten aus der Mitte der Serie wurden gleichzeitig Zählungen der Profile synaptischer Körperchen in definierten Flächen bei der Einzelschnitte (Profilzählungen = PZ) und Disektorzählungen (DZ) in denselben Arealen bei Vergrößerungen von 20.000 (Zeiss TEM 10C) bzw. 21.560 x (LEO TEM 906E) durchgeführt. Dabei definierte sich die Größe der Areale durch die Gesamtlänge der auf beiden Folgeschnitten unbeschädigten Kantenabschnitte und 7,00 μm (Durchmesser des kreisrunden Sichttellers des älteren Elektronenmikroskops bei der o.g. Vergrößerung). Die Vermessung des Areals erfolgte bei 400-facher Vergrößerung durch die Messung der Längen unbeschädigter Kanten auf beiden Schnitten, der Mittelwert wurde dann mit 7,00 μm multipliziert. Da der Mittelwert der Kantenlängenmessungen auf beiden Schnitten nie mehr als 4 % von den Einzelwerten abwich, konnten alle unbeschädigten Kanten ausgezählt werden. Die Methode wird in Abb. Met2 und ihrer Legende erklärt.

Bei dem TEM 906E wurde ein etwas größeres Areal als der Sichtteller untersucht und, wenn ein Profil weiter entfernt von der Schnittkante auftrat, mit Hilfe von Analysis 3.2 gemessen, ob das Profil 7 μm oder weniger vom Rand entfernt war. Grundsätzlich werden bei Disektorzählungen nur die Profile gezählt, die nur auf einem der Schnitte vorhanden sind, im Zählbereich liegen oder über diesen hinaus in die Sicherheitszone reichen, sofern sie keine Ausschlußlinie berühren. Verschiedene Möglichkeiten zur Lage von Profilen und deren Wertung werden in Abb. Met3 und Tabelle 1 erklärt. In den seltenen Fällen, in denen die Gesamtgröße aller auswertbaren Areale in einem Schnittpaar deutlich unter 20.000 μm^2 lag, wurde im Abstand von über 5 μm (deutlich größer als die maximale Dimension eines SK der Rattenzirbedrüse) ein weiteres Schnittpaar analysiert. Falls sich in Feldern mehrere Profile dicht beieinander fanden, wurden diese auf Nachbarschnitten so lange verfolgt, bis sicher war, welche zu gleichen (gebogenen) SK gehörten. Die Zählergebnisse wurden für eine Standardfläche 20.000 μm^2 für PZ bzw. für ein Volumen von 1.000 μm^3 (Standardfläche x 50 nm Schnittdicke) angegeben. Die in Jastrow & Racke (2007) gewonnenen Zahlenwerte für SK, SK-Profile und die zugehörigen Längen wurden als Durchschnittswerte mit Standardabweichung angegeben.

Es wurde getestet, ob es mit hinreichender Zuverlässigkeit möglich ist, in einer Gruppe von identisch behandelten Tieren für nur ein oder zwei Tiere Disektorzählungen durchzuführen und den Umrechnungsfaktor von PZ zu DZ für alle anderen Tiere anzuwenden. Dabei wurden die prozentuale und zahlenmäßige Abweichung von den mit der Disektormethode tatsächlich erhobenen zu den errechneten Werten für alle möglichen Kombinationen bestimmt (Jastrow & Racke 2007). Der Mittelwert und die prozentuale Abweichung aller Fehler wurde errechnet. Ferner wurde getestet, ob die auftretenden Fehler unter Berücksichtigung der gemessenen durchschnittlichen Profillänge reduziert werden könnten. Die in allen Fällen über -50 bis über +150 Prozent reichen

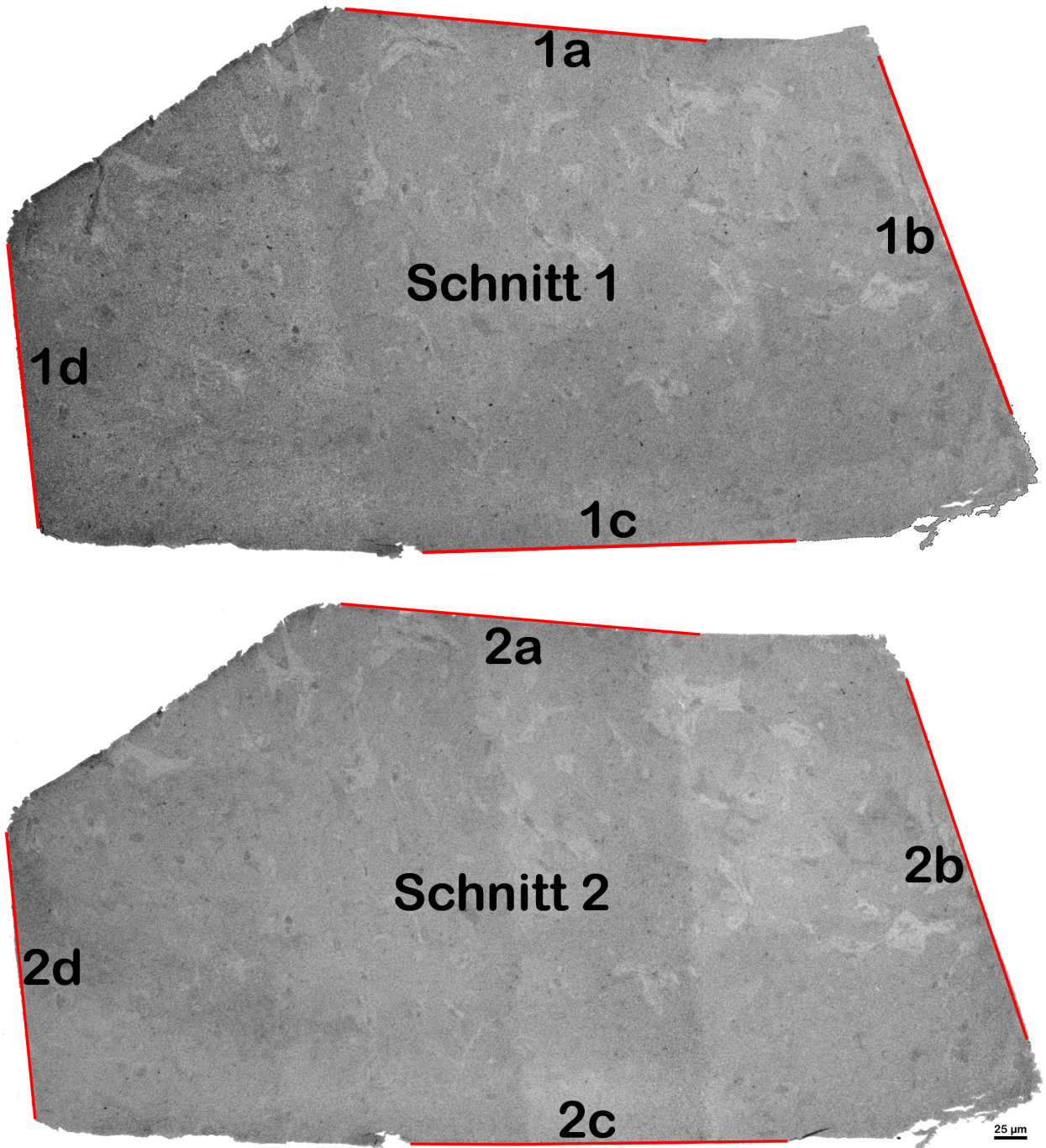


Abb. Met2 Das Prinzip der entwickelten Modifikation der Disektor Zählmethode. Zunächst wurden die Längen unbeschädigter, gerader Abschnitte der Ränder zweier Nachbarschnitte (rote Markierung) aus der Mitte einer Schnittserie bei 400-facher Vergrößerung vermessen. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Untersuchung der hier als 1c und 2c markierten Bereiche:

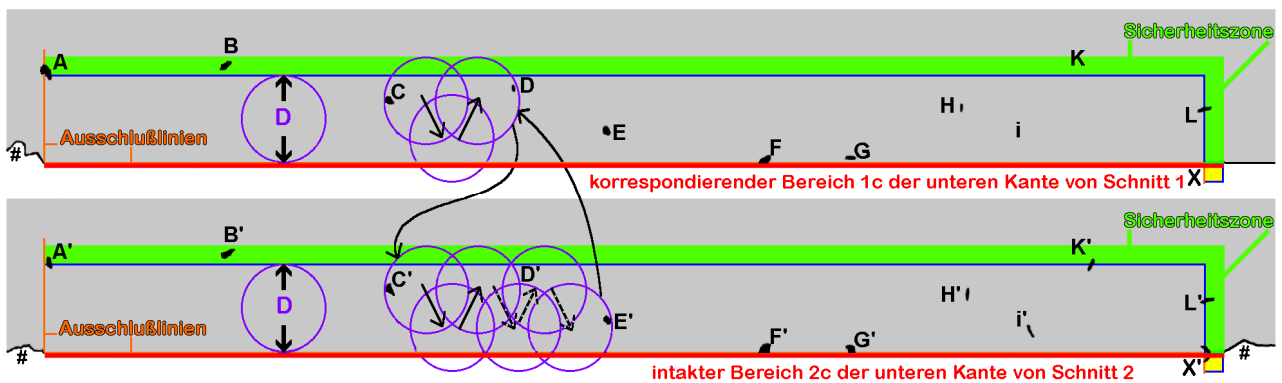


Abb. Met3 (Legende umseitig!)

Abb. Met3 Die Dimensionen der Areale, in denen die Auszählung erfolgte, wurde definiert durch den Durchmesser **D** des runden Sichtschirms (violette Kreise) bei 20.000-facher Vergrößerung (7 µm) und die Länge der auf beiden Schnitten intakten Bereiche an den Schnittkanten (abzüglich rechts der hier grün markierten Sicherheitszone, deren Länge etwas größer ist als ein maximal möglicher Durchmesser eines SK, d.h. 2,5 µm in der Rattenzirkeldrüse). Die Pfeile zeigen die Verschiebung des Sichtschirms bei der Untersuchung. Angenommen das SK Profil **C** war das letzte auf beiden Schnitten gefundene, so wird der Schnitt 1 entlang seiner Kante nach rechts schräg nach oben und unten verschoben, so daß das Areal zwischen der Schnittkante und der unteren Grenze der Sicherheitszone lückenlos analysiert wird. Wenn hier das Profil **D** gefunden wird, folgt die Untersuchung des korrespondierenden Areals auf Schnitt 2, beginnend ab der Stelle, wo **C'** erkennbar war. Da im vorliegenden Fall kein Profil **D'** vorhanden ist, wird die Untersuchung bis zum nächsten erkennbaren Profil (**E'**) fortgeführt. Dann wird die Zählung auf Schnitt 1 von der Stelle, an der **D** auftrat, fortgeführt, bis dort das korrespondierende Profil **E** auftritt. In dieser Weise wird verfahren, bis rechts die Sicherheitszone erreicht ist. Die hier gezeichneten Profile werden gezählt, wie in **Tabelle 1** gezeigt: Profil **A** auf Schnitt 1 reicht vom ausgewerteten Areal (**aA**) durch die Sicherheitszone hindurch und überschreitet die linke Ausschlußlinie, weshalb es nicht gezählt wird. Profil **A'** auf Schnitt 2 reicht von aA ein Stück in die Sicherheitszone, erreicht aber nicht die Ausschlußlinie, daher wird es bei PZ berücksichtigt. Die Profile **B** und **B'** werden nicht gezählt, weil sie beide nicht in aA, sondern nur in der Sicherheitszone liegen. Die Profile **C** und **C'**, **E** und **E'** sowie **H** und **H'** werden auf beiden Schnitten nur mit PZ gezählt. Profil **D** wird sowohl bei der konventionellen Zählung (PZ) als auch bei der Disektorzählung (DZ) gezählt, da **D'** fehlt. Die Profile **F**, **F'** und **G'** werden nicht gezählt, da sie die Schnittkante erreichen, die eine Ausschlußlinie ist. Profil **G** wird nur auf Schnitt 1 mit PZ gezählt. Da das SK **i** auf Schnitt 1 noch nicht angeschnitten ist, (kein Profil **i**) wird sein Anschnitt **i'** auf Schnitt 2 mit PZ und DZ gezählt. Gleiches gilt für das Profil **K'**, welches im Gegensatz zu **i'** noch in die Sicherheitszone hineinreicht. Die in die Sicherheitszone hineinreichenden Profile **L** und **L'** werden auf beiden Schnitten mit PZ erfaßt. Ein Profil **X'** ist ein Stück weit in der Sicherheitszone zu sehen, der nicht mehr erkennbare, da abgeschnittene Teil des Profils, der im gelb markierten, tatsächlich nicht vorhandenen Gebiet die Ausschlußlinie erreicht, würde bei dieser Modifikation der Disektor Methode fälschlicherweise in PZ und in DZ gezählt werden. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines stark genug (> 180°) gekrümmten Profils in diesem sehr kleinen Bereich ist nur von theoretischem Interesse und geringer als der maximale Profildurchmesser² / Zählfläche x Wahrscheinlichkeit des Auftretens stark genug gekrümmter Profile - somit praktisch Null. In allen durchgeführten Disektoruntersuchungen trat kein einziges Profil in dem relevanten Bereich auf. In der Diskussion (4b3: Seite 112) wird gezeigt, wie der theoretische Fehler behoben werden kann. # = beschädigte Schnittkanten.

Tabelle 3.1 Zusammenfassung der Zählergebnisse für die in Abb. Met3 gezeigten Profile:

		Profile:												
Methode	Schnitt	AA'	BB'	CC'	DD'	EE'	FF'	GG'	HH'	ii'	KK'	LL'	XX'	Σ
PZ	1	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	6
	2	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	8
DZ	1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	3

den Abweichungen wurden als inakzeptabel hoch eingestuft (Jastrow & Racke 2007).

Für die statistische Auswertung wurde SigmaStat 2.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Zur Analyse der PZ und DZ Werte dienten: one way Anova zum Vergleich individueller Gruppen, all pairwise multiple comparison procedures (Fisher LSD Methode, Tukey Test) oder ungepaarte T-Tests. Zur Analyse der Profillängen wurden Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks bzw. ungepaarte T-Tests angewendet. P-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant angesehen.

2b6 Immunhistochemie und -elektronenmikroskopie

Antikörper

In Jastrow et al. (2006) wurden folgende Antikörper verwendet: monoklonaler Maus anti- β -Dystroglykan Antikörper (43DAG/8D5; Novocastra, UK), spezifisch für Dystroglykan in Western Blot, Licht- und Elektronenmikroskopie, kreuzreagiert mit Mensch, Maus, Ratte, Rind und Hühnchen (Koulen et al. 1998; Blank et al. 2002); Schaf anti- β -Dystroglykan Serum zur Kontrolle der Dystroglykan Markierung; zwei polyklonale Kaninchen anti-Bassoon Antiseren, die verschiedene Epitope erkennen und beide identische Markierungen von Ribbonsynapsen in Hühnchen Photorezeptoren lieferten (rb-anti-sap7f und Kaninchen anti-bassoon BSN1; Dick et al. 2003).

Procedere

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Augäpfel nach Eröffnung entlang der Ora serata 10 Min. bei Raumtemperatur mit 4 %-igem Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer (PB; pH 7,4) fixiert. Die Netzhäute wurden je eine Stunde in 10-, 20- und anschließend über Nacht in 30 %-iger Saccharoselösung in PB gefriereschützt. Stücke der zentralen Areale wurden in Gefriermedium (OCT, Reichert-Jung, Bensheim, BRD) eingebettet und mit einem Kryostaten vertikal in 12 μ m Dicke geschnitten, auf Gelatine-beschichteten Objektträgern aufgezogen und 15 Min. luftgetrocknet und dann bei -20°C gelagert. Nach Blockierung mit 1 % Rinderserumalbumin und 0,05 % Triton-X-100 in PB wurden die Schnitte über Nacht mit den Primärantikörpern bei 4°C inkubiert. Nach weiterer Inkubation mit Alexa488 bzw. Alexa594 Fluorochrom (Molecular Probes, Eugene, Or., USA) konjugierten Ziegen-anti-Kaninchen bzw. Ziegen-anti-Maus Sekundärantikörpern wurden die Schnitte mit einem Leitz DMRA Fluoreszenzmikroskop untersucht. Durch geeignete Filter jeweils für eines der Fluorochrome wurden die Schnitte mit einer Digitalkamera (DX 200; Leica, Solms, BRD) digitalisiert. Die Nachbearbeitung erfolgte mit Photoshop[®] 5.5 (Adobe Systems Inc., San Jose, Ca, USA). Die nur mit dem Sekundärantikörper inkubierten Kontrollschnitte zeigten, wie auch die nur mit einem der Primärantikörper inkubierten Schnitte, keine spezifischen Signale. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung der Dystroglykanverteilung in Photorezeptorterminalen wurden hinter der Sehnervenpapille gelegene Stücke der zentralen Retina von einem 1 Tag alten Hühnchen präpariert und inkubiert, wie in Blank et al. (1997) beschrieben: die Augäpfel wurden in 4 % Paraformaldehyd und 0,05 % Glutaraldehyd in PB für 10 Min. und danach für 40 Min. in 4 % Paraformaldehyd allein fixiert. Die Kryoprotektion der herausgeschnittenen Retina erfolgte in 10-, 20- dann 30 %-iger Saccharose-lösung. Nach mehrfachem Schockgefrieren und Wiederauftauen zur besseren Antikörperpenetration und Waschen in PB wurden kleine Netzhautstückchen in Agar eingebettet und 60 μ m dick vertikal mit einem Vibratome (Vibratome 1000; The Vibratome Company, St. Louis, Mo., USA) geschnitten. Die Schnitte wurden in kaltem PB gesammelt und für die Pre-embedding Immunelektronenmikroskopie 2 Stunden in 10 %-igem Ziegennormalserum geblockt, bevor die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper (43DAG/8D5) für 4 Tage bei 4°C erfolgte. Nach mehrfachem Waschen in PB wurde die Immunmarkierung mit einem biotinylierten Ziegen anti-Maus IgG (1:100 verdünnt; Vector Laboratories, Burlingame, Ca., USA) und einem Peroxidase-basierten enzymatischen Detektionssystem (Vector Elite ABC Kit; Vector Laboratories) sichtbar gemacht. Auf mehrfaches Wa-

schen in PB und in 0,05 M Tris-HCl (pH 7,6) folgte 10 Min. Vorinkubation in 3,3'-Diaminobenzidin (DAB; 0,05 % in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6) und dann die Reaktion mit einer 0,05 %-igen DAB Lösung, die 0,01 % H₂O₂ enthielt. Die Reaktion wurde durch Waschen der Schnitte mit Tris-HCl gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4), dann 2 Stunden bei 4°C in 2,5 %-igem Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer und schließlich über Nacht mit Cacodylatpuffer bei 4°C gewaschen. Nach weiteren Waschungen in destilliertem Wasser wurde das DAB Reaktionsprodukt silberverstärkt und mit Goldchlorid behandelt, wie in Sassoé-Pognetto et al. (1994) beschrieben. Die Schnitte wurden mit 0,05 %-igem OsO₄ in Cacodylat Puffer für 30 Min. postfixiert, dehydriert in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 - 100 %) gefolgt von Propylenoxid, und dann in einem Epoxidharz (EPON 812; Serva, Heidelberg, BRD) flach eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit einem auf 60 nm eingestellten Ultramikrotom geschnitten und wie oben beschrieben nachkontrastiert. Kontrollschnitte wurden in gleicher Weise gefertigt, wobei der Primärantikörper ausgelassen wurde. Sie zeigten keine spezifische Goldmarkierung. Insgesamt wurden vier verschiedene Zapfenterminale aus einer Serie von 27 Folgeschnitten rekonstruiert, segmentiert und visualisiert. Da die sehr komplexe Anordnung der Zellfortsätze wegen Überlagerungen nur schwer erkennbar ist, wurden für die 3D-Abbildungen und Animationen repräsentative Ausschnitte gewählt.

3. Ergebnisse

3a Morphologische Untersuchungen

3a1 Zirbeldrüse (*Glandula pinealis*)

3a11 Ratte (Jastrow et al. 1997a)

In elektronenmikroskopischen Schnitten der Zirbeldrüse von Sprague-Dawley Ratten fanden sich Profile synaptischer Körperchen (SK) bevorzugt im weniger elektronendichten Pinealozyten. Sie lagen meist an oder nahe der Zellmembran und kamen vorwiegend einzeln oder als in etwa parallel orientierte Paare vor. Gelegentlich traten Felder mit bis zu 8 Profilen auf, von denen dann die meisten keine Beziehung zur Zellmembran hatten. Die meisten Profile erschienen als relativ gerade Stäbe mit Längen von 50 bis zu 720 nm Länge. Die mit den damals zur Verfügung stehenden einfachen Mitteln möglichen Bestimmungen der Oberfläche und des Volumens sowie der Form von SK anhand von Profillängenmessungen an lückenlosen Serienschnitten zeigten um Mitternacht deutlich größere Flächen als mittags: 0,041 (12.00) bzw. 0,0501 μm^2 (24.00). Dies läßt sich schon optisch in den Abb. 2a & b in Jastrow et al. (1997a) erkennen. Da die verwendete Software keine echte Überlagerung der Profile ermöglichte wurden verschiedene Arten der Anordnung der Profillängen untereinander getestet, die aber keine relevanten Unterschiede der sich ergebenden Flächen zeigten (Abb. 1 in Jastrow et al. 1997a). Die Oberfläche vergrößerte sich von Mittag bis Mitternacht um 19,3 %. Da die plattenförmigen SK eine konstante Dicke von 35

nm haben, lässt sich daraus ein durchschnittliches Volumen von $1,47 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ für 12.00 und von $1,75 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ für Mitternacht mit einer Zunahme von $0,28 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ (entspricht 19,3 %) errechnen. Die Profillängen selbst nahmen um 27,6 % von $145 \pm 4 \text{ nm}$ (12.00; $n = 368$) auf $185 \pm 6 \text{ nm}$ (24.00; $n = 368$) zu. Die meisten der untersuchten SK waren Platten, deren große in etwa rechteckige Oberflächen ca. $300 \times 150 \text{ nm}$ maßen (Breite zu Höhe Verhältnisse zwischen 1:1 bis ca. 1:5) und unregelmäßig begrenzt waren. Einige SK erschienen leicht C-förmig gebogen und in 2 Fällen fanden sich Poren mit Durchmessern von 40 bzw. 70 nm. Daneben lagen einige längere, bandförmige SK vor. Die praktisch nicht vorhandenen runden Profile von SK wurden in dieser Studie nicht betrachtet. Weitere morphologische Befunde zur Rattenzirbeldrüse wurden im Rahmen der primär quantitativen Analyse von Racke & Jastrow 2007 erhoben und werden dort vorgestellt (Ergebnisse 3b3: Seite 72).

3a12 Hühnchen

Mehrere SK wurden aus Serienschnitten von Hühnchenzirbeldrüsen des Materials für das Poster Hainz et al. (1997) rekonstruiert. Die Abb. Huhn und die dazugehörigen Animationen Huhn.avi und Huhn1.avi zeigen exemplarisch die Rekonstruktion eines Feldes mit naheliegenden weiteren SK in Pinealozyten eines um 24.00 getöteten Hühnchens. SK waren platten- bis bandförmige, relativ wenig gebogene Strukturen. Diese waren größtenteils über feine Proteinbrücken an kleinen elektronendichten Plaques an der Zellmembran verankert und standen zum Teil annähernd parallel zueinander. Weitere Rekonstruktionen und Analysen anderer Serienschnitte zeigten keine deutlichen Abweichungen von bei der Ratte erhobenen Befunden.

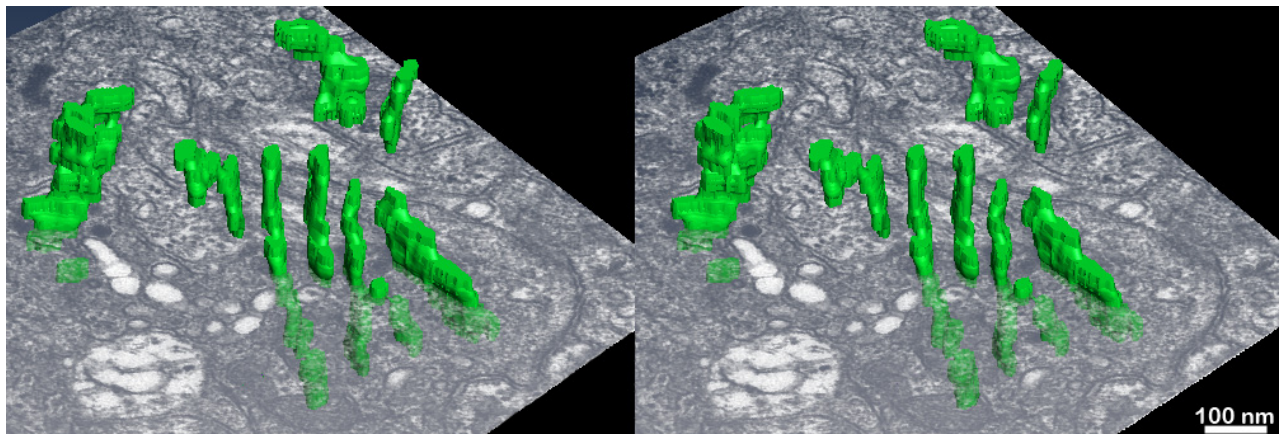


Abb. Huhn Band- bzw. plattenförmige SK in einem Feld in Pinealozyten eines um Mitternacht getöteten Hühnchens und benachbarte morphologisch ähnliche SK (Animationen dieser Rekonstruktion: Huhn.avi & Huhn1.avi).

3a13 Meerschweinchen

Mit Hilfe einer mit Dirk Schmanke gemeinsam in der Interactive Data Language (IDL[®]) geschriebenen Software und dem Visualisierungstool (NeurOPS) rekonstruierte Serienschnitte der Meerschweinchenzirbeldrüse von zeigten verschieden große meist plattenförmige synaptische Körperchen sowie einige klumpen- bis kugelförmige Strukturen (Jastrow et al. 1996a, 1997g, 2004).

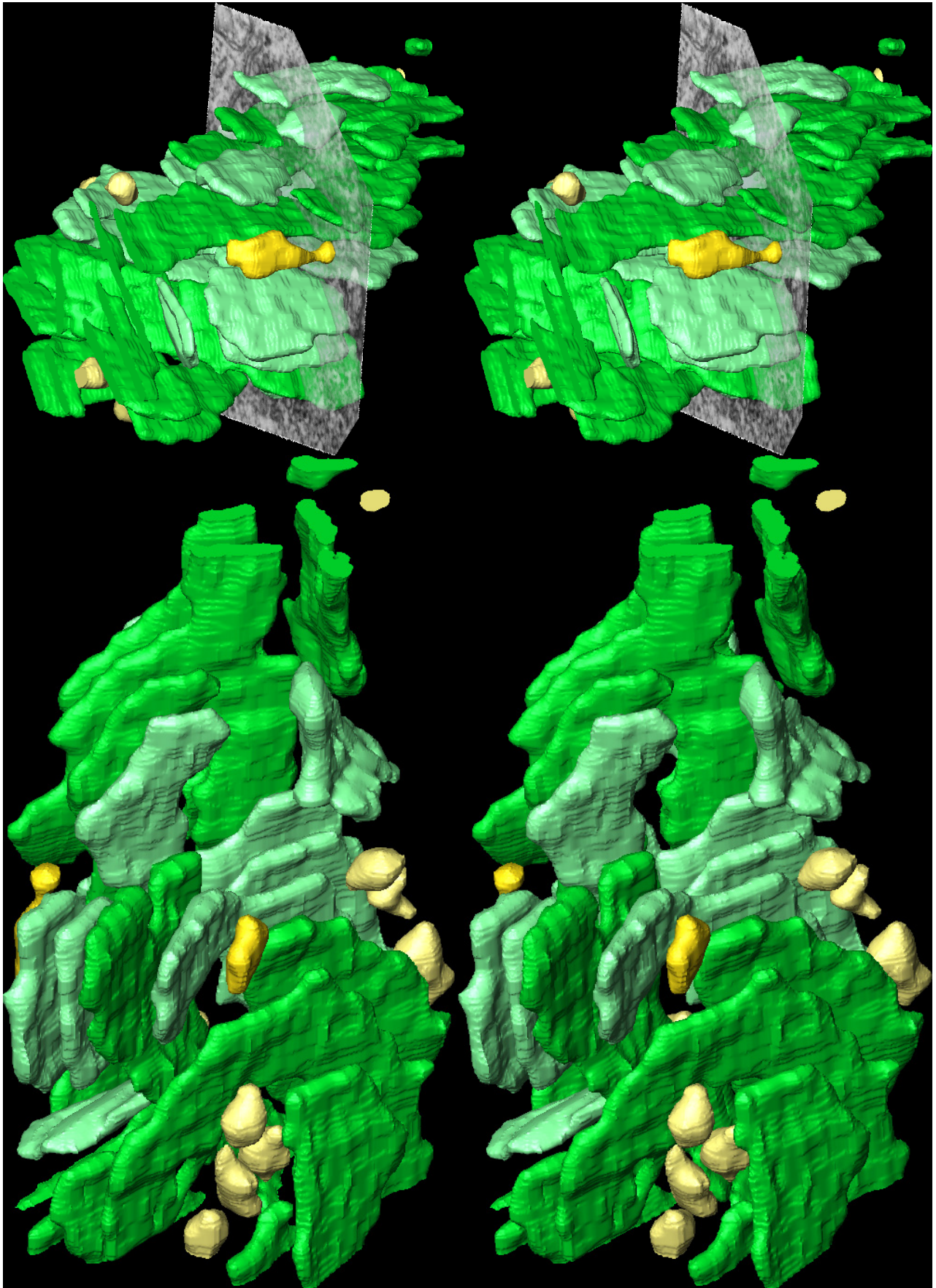


Abb. MS1 Großes Feld mit mehreren parallelen plattenförmigen synaptischen Körperchen bzw. Bändern (komplett im Datensatz enthaltene in hellgrün, sonst dunkelgrün) sowie kugelförmigen (hellgelb) bzw. klumpigen SK (dunkelgelb; Animationen dieser Rekonstruktion: MS1.avi; MS1a.avi & 02.avi).

Bei den Kontrolltieren (eines um 12.00 nach 6 Stunden Licht, eines um 24.00 nach 6 Stunden Dunkelheit getötet) wurden zunächst jeweils über 50 Profile von SK untersucht. Diese lagen in

hellen und dunklen Pinealocyten meist nahe von Zellmembranen, waren in ~75 % stabförmig, in ~15 % irregulär begrenzt und in unter 10 % kreisförmig. Bei genau senkrecht angeschnittenen SK ließ sich eine pentalamelläre Substruktur erkennen, die auf reguläre Polymerisation der Untereinheiten hindeutet. Diese war in verdickten Bereichen, irregulär begrenzten oder runden Anschnitten nicht sichtbar. Zehn verschiedene Felder von SK wurden in Serienschnitten verfolgt und die 3 jeweils größten dreidimensional rekonstruiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß alle stabförmigen Profile von plattenförmigen, teils geraden teils, leicht gebogenen oder verdrehten SK stammten, einige waren auch lange Bänder, die vom ersten bis letzten Schnitt reichten. Das Breite zu Länge Verhältnis lag meist zwischen 1:2 und 1:5, tatsächlich rechteckige Platten lagen nicht vor. Einige erschienen c-förmig in einer Ebene gebogen. Runde Profile stammten von ei- bis kugelförmigen SK, irreguläre Profile von bizarren klumpenförmigen, die hier erstmals rekonstruiert wurden. Ferner fanden sich sehr kleine Fragmente von SK, die nur auf einem Schnitt angeschnitten waren. SK lagen stets gruppiert in Feldern, wobei mindestens ein plattenförmiges mit einem einer ad analogen elektronendichten Plaque an der Zellmembran über feines elektronendichtes Material verbunden war. Typischerweise lagen 2 bis 9 plattenförmige SK in 100 - 150 nm Abstand parallel zueinander. Solche Gruppen umfaßten 4 bis über 40 verschiedene SK. Größere (siehe Abb. MS1; Animationen MS1.avi; MS1a.avi & 02.avi) hatten üblicherweise mehrere verschiedene Gruppen paralleler Platten und zufällig herumgruppierte irreguläre bzw. kugelige SK. Felder, die nur aus platten- bzw. bandförmigen SK bestanden, wurden nicht angetroffen.

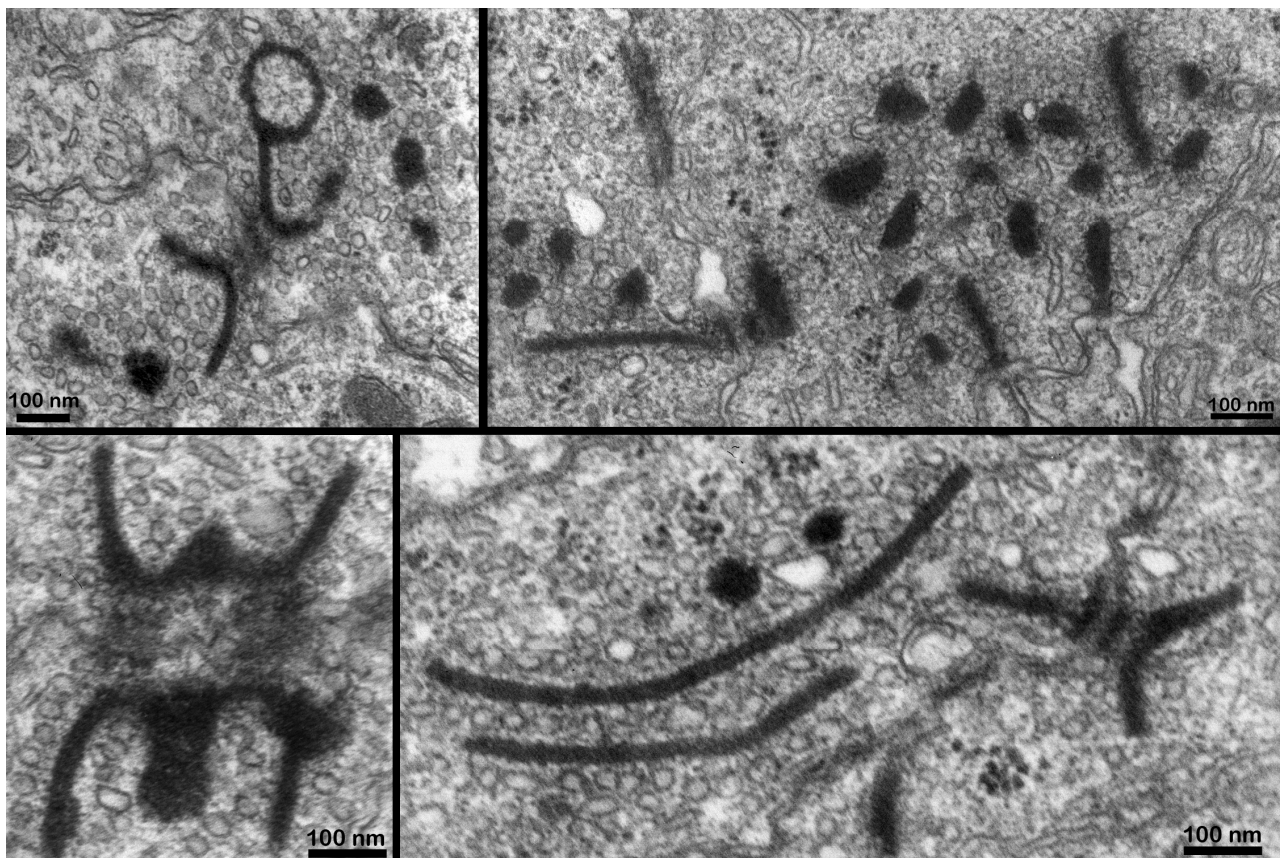


Abb. MS2 Vier verschiedene gepaarte Felder synaptischer Körperchen in Pinealocyten bei 4 Monaten bzw. 8 Wochen unter Dauerlicht gehaltenen Meerschweinchen. Die äußerst bizarren Profile (besonders links) sind ein klarer Indikator für ungewöhnliche dreidimensionale Erscheinungsformen synaptischer Körperchen.

Solche, die lediglich kugelige bzw. klumpige SK zeigten, konnten nur bei den 8 Wochen-, bzw. 4 Monate unter Dauerlicht gehaltenen Tieren beobachtet werden (Jastrow et al. 1997c, d, 2004). Bei diesen zeigte sich schon bei der zunächst erfolgten Betrachtung von Profilen eine deutliche Zunahme auch größerer irregulärer Gebilde. Hierbei machten unter Normalbedingungen nie vorhandene, von Vollrath & Huss (1973) entdeckte, gepaarte Felder synaptischer Körperchen über 25 % aller angeschnittenen Felder aus. Die Abbildung MS2 zeigt einige davon mit besonders bizarren Anschnitten von SK, wie sie in keiner anderen Untersuchung je gefunden wurden. Für die vorliegende Habilitationsschrift wurden aus mehreren Originaldatensätzen zur Erreichung besserer Qualität und der Möglichkeit von Stereovisualisationen fünf verschiedene Felder bizarrer SK erneut rekonstruiert (Abb. MS3-6; Animationen 03.avi, MS3.avi, MS3a.avi, MS4.avi, MS4a.avi, MS5.avi; MS5a.avi, MS5b.avi). Neben rinnenförmigen ungewöhnlich stark gebogenen Organellen fanden sich hierbei viele klumpige Gebilde und nur ausnahmsweise echt kugelförmige oder plattenförmige SK. Einige zeigten in ihrem Inneren sogar Zytoplasmainschlüsse (Abb. MS5; Animationen MS5a.avi, MS5b.avi). Während die klumpigen SK

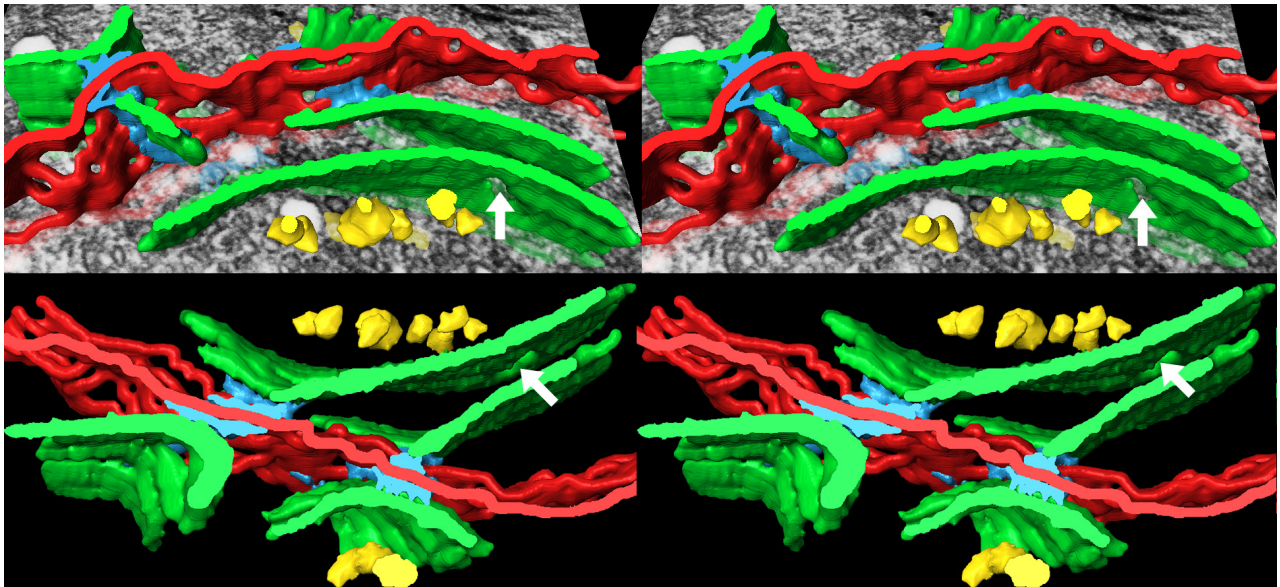


Abb. MS3 Visualisierung des doppelten gepaarten Feldes, dessen Profile in der vorangehenden Abbildung rechts unten gezeigt wurden. Hinter der membranabgewandten Seite der gebogenen, großen plattenförmigen SK (grün) sind eine Reihe klumpiger kleinerer SK (gelb) erkennbar. Die größte Platte weist ein Loch auf (Pfeil). Die blau markierten arciform densities jeweils zweier Felder liegen einander direkt gegenüber an den Membranen, die den rot markierten Interzellularraum abgrenzen (Animationen dieser Rekonstruktion: MS3.avi & MS3a.avi).

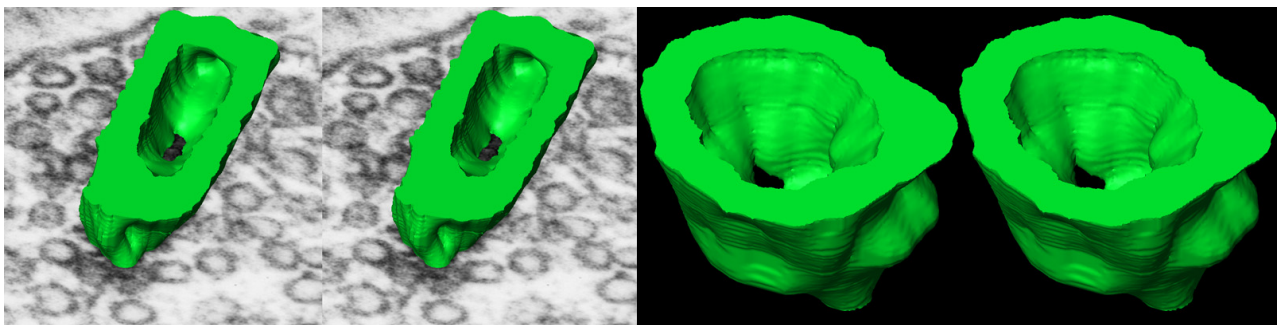


Abb. MS4 Trogförmiges bzw. kelchförmiges SK als Beispiele für die ungewöhnlichen Formen synaptischer Körperchen unter Dauerlicht (Animationen dieser Rekonstruktionen: MS4.avi & MS4a.avi).

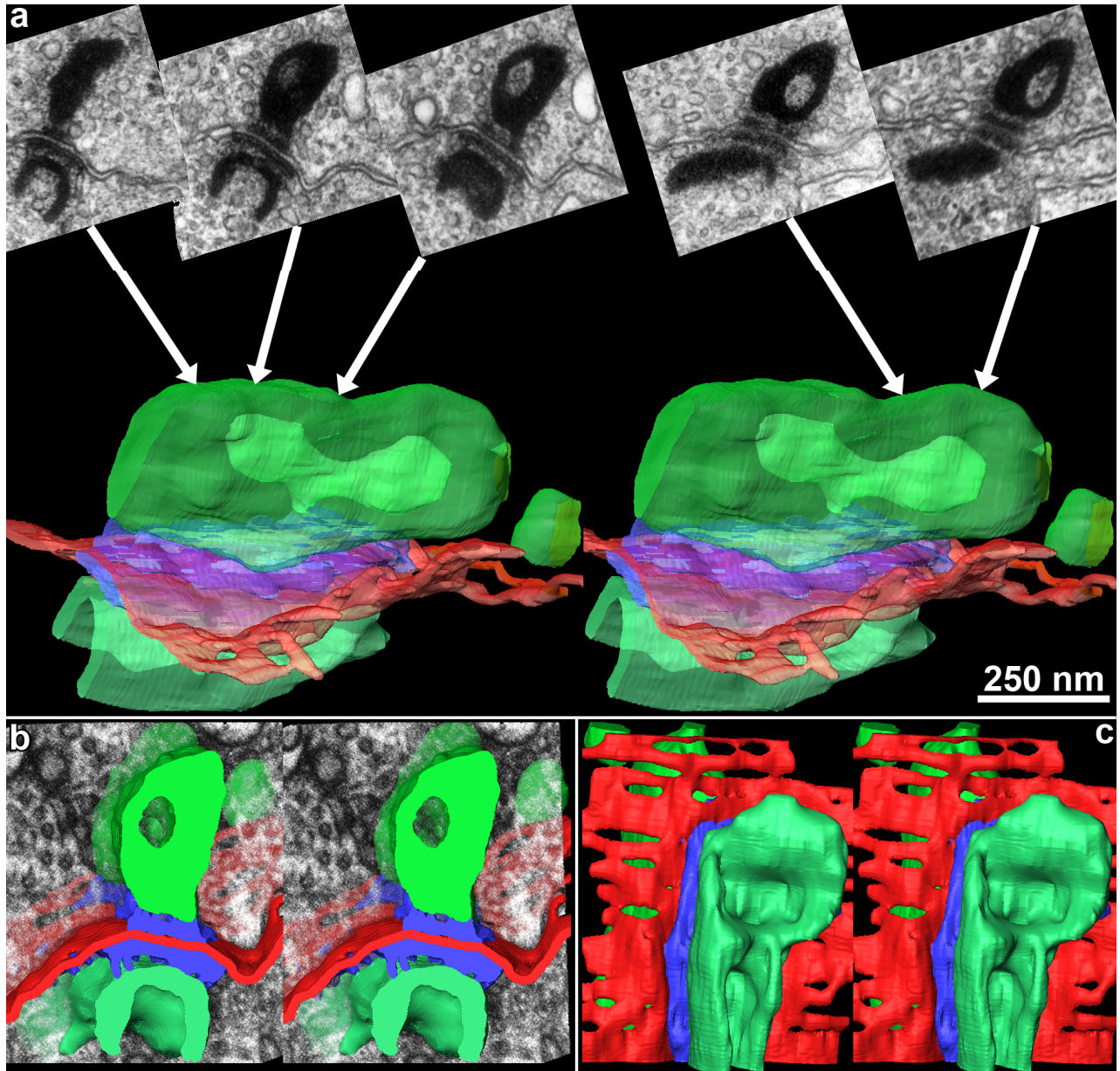


Abb. MS5 Wie in der semitransparenten Ansicht **a** und der aufgeschnittenen Rekonstruktion **b** zu sehen, besitzt das obere sehr dicke SK einen mit Zytoplasma gefüllten inneren Hohlraum (heller grüner Bereich). Das untere SK ist eine stark gebogene Rinne mit einer zentralen und einer terminalen Verdickung **c**. Das gepaarte Feld wurde in benachbarten Pinealozyten eines 4 Monate unter Dauerlicht gehaltenen Meerschweinchens gefunden. SK grün, ad blau, Interzellularraum rot (Animationen dieser Rekonstruktion: MS5.avi; MS5a.avi & MS5b.avi).

nie an der Zellmembran verankert waren, fanden sich die U-; V- oder bizarr rinnenförmigen Gebilde immer an einer ad, also membranverankert. Sie zeigten stets an mehreren Stellen, bevorzugt an ihren Enden Auftreibungen, die auf An- bzw. Abbauvorgänge hinweisen. Die unter normalen Bedingungen typische pentalamelläre Struktur konnte nur in wenigen kleinen Bereichen (50 - 150 nm) der massiv veränderten SK (Abb. MS4 - 6) und in den ungewöhnlich großen verbogenen aber noch plattenförmigen SK gefunden werden, welche zum Teil Löcher aufwiesen (Abb. MS3), die unter Normalbedingungen nicht beobachtet wurden. Eine Abgabe von klumpig organisiertem SK Material aus den massiv veränderten aber auch aus den großen plattenförmigen SK ist wahrscheinlich, da sich solches stets nur auf deren membranabgewandter Seite fand (Abb. MS3, 6; Animationen 03.avi, MS3.avi, MS3a.avi). Eine klare Zunahme von klumpigen und

kugelförmigen SK konnte im Vergleich zu den beiden unter normalen Lichtbedingungen gehaltenen Tieren jedoch nicht gefunden werden (Jastrow et al. 2004). Felder von parallel zueinander stehenden Platten waren praktisch gar nicht vorhanden. Wie die Rekonstruktionen verdeutlichen, waren die Membranverankerungen bei gepaarten Feldern ziemlich genau einander gegenüber positioniert (Abb. MS 2, 3, 5; Animationen 03.avi; MS5.avi; MS5a.avi, MS5b.avi). Die ads befestigten die bizarr verbogenen SK nicht, wie sonst üblich, an einer Endkante an der Zellmembran, sondern im mittleren Bereich (siehe Abb. MS3, 5, 6, Disk2: Seite 80). Die massiv veränderten SK waren auch deutlich größer, als unter Normalbedingungen betrachtete Organellen. Da unter letzteren auch praktisch keine gepaarten Felder anzutreffen waren, muß die Bildung dieser Felder neu erfolgt und eindeutig eine Reaktion auf das Dauerlicht sein. Vermutlich entstehen die ungewöhnlich großen Platten oder bizarren SK durch Verschmelzung einzelner SKs (siehe Abb. Disk1: Seite 78 und Diskussion 4a12: Seite 77). Dies könnte auch erklären, weshalb die Zahl an einzelnen SKs in Feldern unter Dauerlicht auch deutlich geringer als unter Normalbedingungen ist.

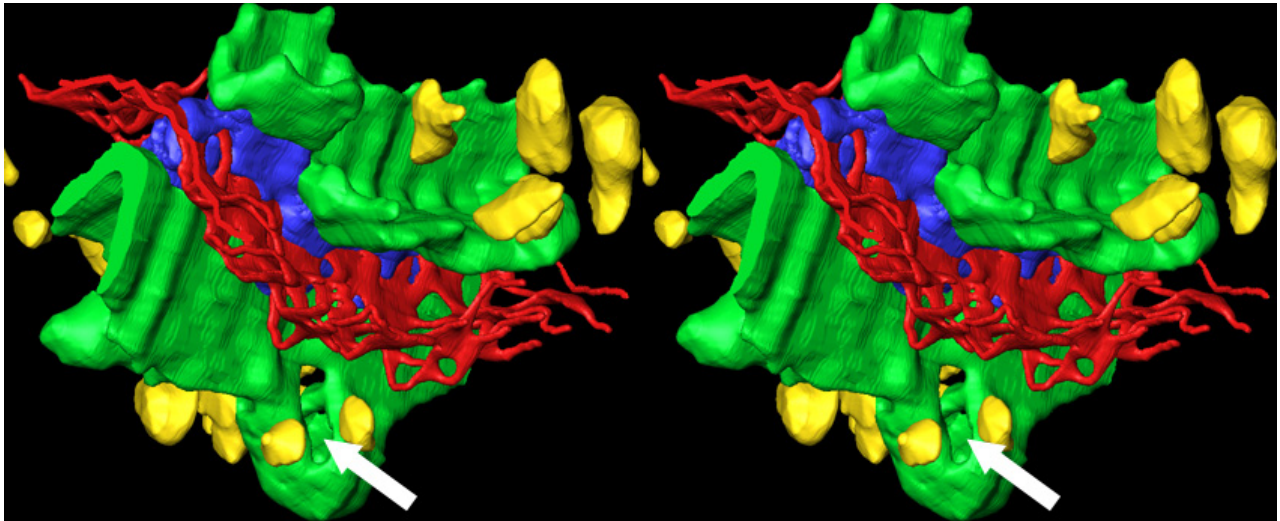


Abb. MS6 Gepaartes Feld mit rinnenförmigen SK (grün), die teils massiv aufgetrieben sind, wie schon die Profilansicht in Abb. MS2 links oben vermuten läßt. Eine zentrale Auftreibung ist innen hohl und hat freie Verbindung zu umgebendem Zytoplasma (Pfeil). Auf der membranabgewandten Seite der beiden großen SK sind viele klumpenförmige kleinere (gelb) zu erkennen (ad blau, Interzellularraum rot; 4 Monate unter Dauerlicht gehaltenes Meerschweinchen; Animation dieser Rekonstruktion: 03.avi).

Serienschnittanalysen von SK einer untersuchten Zirbeldrüse eines 70 Tage unter Dauerdunkelheit gehaltenen Tieres zeigten keine wesentlichen Unterschiede zu den beiden Normaltieren, wie dies auch von Vollrath & Huss (1973) beschrieben wurde.

3a2 Netzhaut (Retina)

3a21 Einfluß der Ca^{++} -Konzentration auf Profile synaptischer Körperchen

1 Ratten (Untersuchung Js)

Die in Zapfen vorhandenen Profile synaptischer Körperchen (SK) der Retina von SD-Ratten wiesen unter verschiedenen Bedingungen in 30-minütiger Organkultur in keinem Fall irgendwelche Auffälligkeiten auf, d.h. sie waren stabförmig wie auch bei unter Normalbedingungen (LD 12:12) gehaltenen, direkt getöteten Tieren. SK Profile in Stäbchenterminalen (siehe Tabelle Js) zeigten unter 400 Lux Lichtbedingungen (Lichtkontrolle) durchschnittlich 75 % reguläre Anschnitte der Organellen, d.h. stabförmige Profile, wie sie auch für in vivo Bedingungen typisch sind (Abb. Js1-1). Nur bei einem Tier (Js15) waren auffällig mehr dicke Anschnitte (Abb. Js1-2) zu sehen. Solche dicken Profile wurden von Spiwox-Becker et al. (2004) als Kultureffekt beschrieben und sind damit nicht als atypisch (auf dynamische Veränderungen an SK hinweisend) anzusehen. Mit unter 5 % waren keulenförmige SK-Profile (Abb. Js1-5) selten. Irregulär begrenzte Profile klumpiger SK (Abb. Js1-4) machten ca. 4 % und rundliche Anschnitte kugelliger SK (Spheres; Abb. Js1-3) nur knapp über 2 % aller Profile aus, während kurze stumpfförmige Profile (Abb. Js1-6) gar nicht vorkamen (Details in Tabelle Js). Unter Licht kultivierte Retinae, die durch Gabe von Ca^{++} und eines Ionophors, um dessen intrazelluläre Konzentration zu erhöhen, in "chemische Dunkelheit" versetzt wurden, zeigten in Bezug auf die quantitativen Ergebnisse keine deutliche Veränderung. Unter Dunkelheit kultivierte Retinae ließen nur unbedeutend weniger normale und etwas mehr dicke sowie keulenförmige Anschnitte von SK erkennen. Unter Ca^{++} -Entzug bei Dunkelkultur fand sich eine starke Abnahme normaler Profile bei Zunahme von keulenförmigen, rundlichen und stumpfartigen Profilen. Aufgrund des "Ausreißers" (Js5) wurde bei der Kruskal-Wallis "one way analysis of variance on ranks" eine statistische Signifikanz jedoch knapp verfehlt ($P = 0,068$). Faßt man die atypischen Profile zusammen (keulenförmige, runde + klumpige) und setzt diese in Relation zu normalen, so fand sich nur unter Dunkelkultur und Ca^{++} -Entzug mit 47,56 % veränderten SK eine deutliche Veränderung, die im Vergleich zur Ionophor Gabe mit $P < 0,022$ und zur Lichtkontrolle mit $P < 0,039$ statistisch signifikant war. Im Vergleich zur Dunkelkontrolle wurde das Signifikanzniveau verfehlt ($P > 0,068$). So kann festgestellt werden, daß die Untersuchung darauf hinweist, daß Ca^{++} -Entzug zu verstärkter Depolymerisation von SK führt, was in einem Anstieg veränderter Profile resultiert. Ca^{++} -Gabe zeigte keinen Effekt auf die SK-Morphologie ($P > 0,99$).

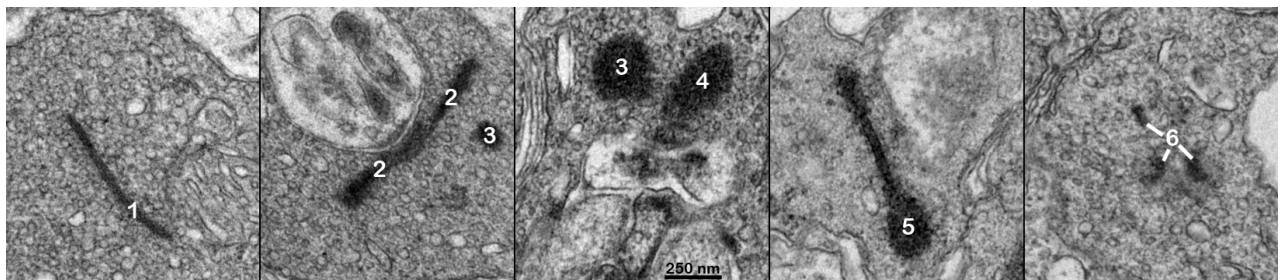


Abb. Js1 Beispiele für die verschiedenen Arten von Profilen synaptischer Körperchen: **1** normales, leicht gebogenes stabförmiges-; **2** dickes-; **3** rundes-; **4** klumpiges-; **5** keulenförmiges Profil; **6** drei stumpfartige Profile. Atypische Profile, die auf Veränderungen an SK hindeuten, sind **3**, **4** und **5**, während dickere Profile **2** als Organkultureffekt anzusehen sind (Spiwox-Becker et al. 2004). Die in der Mitte angegebene Vergrößerung gilt für alle Bilder.

Tabelle Js: Quantitative Auswertung von jeweils über 50 nacheinander angetroffenen Profilen synaptischer Körperchen in Stäbchenterminalen zufällig ausgewählter, 30 Minuten organokultivierter Retinae von Ratten unter verschiedenen Bedingungen.

Licht Kontrolle (400 Lux)								
Tiere	normal	dick	Keule	rund	Klumpen	Stumpf	n [100%]	atypisch
Js 3	90,16	3,28	1,64	0,00	4,92	0,00	61	6,56%
Js 8	72,13	9,84	8,20	1,64	8,20	0,00	61	18,03%
Js11	80,00	10,00	6,25	3,75	0,00	0,00	80	10,00%
Js15	67,82	24,14	3,45	0,00	4,60	0,00	87	8,05%
Js19	80,49	3,66	4,88	6,10	4,88	0,00	82	15,85%
Ø	77,63	10,78	4,85	2,43	4,31	0,00	371	11,59%

Licht + 1µM Ca⁺⁺-Ionophor A23187 + 1 mM CaCl₂ (Licht + "chemische Dunkelheit")								
Tiere	normal	dick	Keule	rund	Klumpen	Stumpf	n [100%]	atypisch
Js 1	90,63	0,00	6,25	3,13	0,00	0,00	64	9,38%
Js 6	81,01	7,59	2,53	5,06	2,53	1,27	79	10,26%
Js 7	75,41	18,03	1,64	1,64	3,28	0,00	61	6,56%
Js13	84,69	10,20	2,04	2,04	1,02	0,00	98	5,10%
Js17	70,27	13,51	4,05	0,00	12,16	0,00	74	16,22%
Ø	80,59	9,84	3,19	2,39	3,72	0,27	376	9,33%

Dunkel Kontrolle								
Tiere	normal	dick	Keule	rund	Klumpen	Stumpf	n [100%]	atypisch
Js 4	90,00	6,67	3,33	0,00	0,00	0,00	60	3,33%
Js 9	81,58	9,21	5,26	0,00	3,95	0,00	76	9,21%
Js12	63,86	18,07	9,64	0,00	8,43	0,00	83	18,07%
Js14	69,70	15,15	9,09	3,03	3,03	0,00	66	15,15%
Js18	52,63	25,00	13,16	5,26	3,95	0,00	76	22,37%
Ø	70,64	15,24	8,31	1,66	4,16	0,00	361	14,13%

Dunkel + 1mM Ca⁺⁺-Blocker EGTA (Dunkelheit + "chemisches Licht")								
Tiere	normal	dick	Keule	rund	Klumpen	Stumpf	n [100%]	atypisch
Js 2	59,57	14,18	10,64	6,38	6,38	2,84	141	24,09%
Js 5	74,55*	21,82	0,00*	1,82*	1,82*	0,00	55	3,64%*
Js10	16,39	6,56	40,98	18,03	11,48	6,56	61	75,44%
Js16	30,77	20,00	26,15	15,38	7,69	0,00	65	49,23%
Js20	45,45	31,82	10,23	3,41	5,68	3,41	88	20,00%
Ø	47,56	18,78	16,10	8,29	6,59	2,68	410	31,83%

Zahlen in Spalten 1-6 geben Prozentwerte an

Klassifikation der Profilmorphologie (siehe Abb. Js1):

normal: stabförmig, bis zu 40 nm breit

dick: stabförmig, aber über 40 nm bis 80 nm breit

Keule: stabförmig mit rundlicher Auftreibung am Ende

rund: rundlich bis oval

Klumpen: über 80 nm breit, unregelmäßig begrenzt

Stumpf: stabförmig, Länge unter 60 nm

atypisch: prozentualer Anteil aller atypischen Profile (keulenförmige + runde + klumpige) bezogen auf die Gesamtzahl abzüglich der Stümpfe

n [100%]: Gesamtsumme aller Profile, die 100 % entspricht

Ø: Durchschnittswert für alle Tiere einer Gruppe

* Diese mehrfach an den Originalbildern überprüften Daten sind als "Ausreißer" zu betrachten

2 BALB/c Mäuse (Untersuchung Jb)

Diese Untersuchung an BALB/c Mäusen ähnelt der vorangegangenen (Js) sowie Experimenten von Spiwox-Becker et al. (2004), unterscheidet sich allerdings durch die Applikation des Kalziumantagonisten Nifedipin anstelle von Ca^{++} -bindendem EGTA und bei Js zusätzlich der anderen Tierspezies. Interessanterweise fanden sich im Experiment Jb klumpige Veränderungen von SK auch in einigen der betrachteten Anschnitte von Zapfenterminalen (Abb. Jb1). Auffällig waren außerdem einige ungewöhnlich große rundliche SK-Profile (Abb. Jb2), wie sie im vorangehend geschilderten Versuch nicht beobachtet wurden.

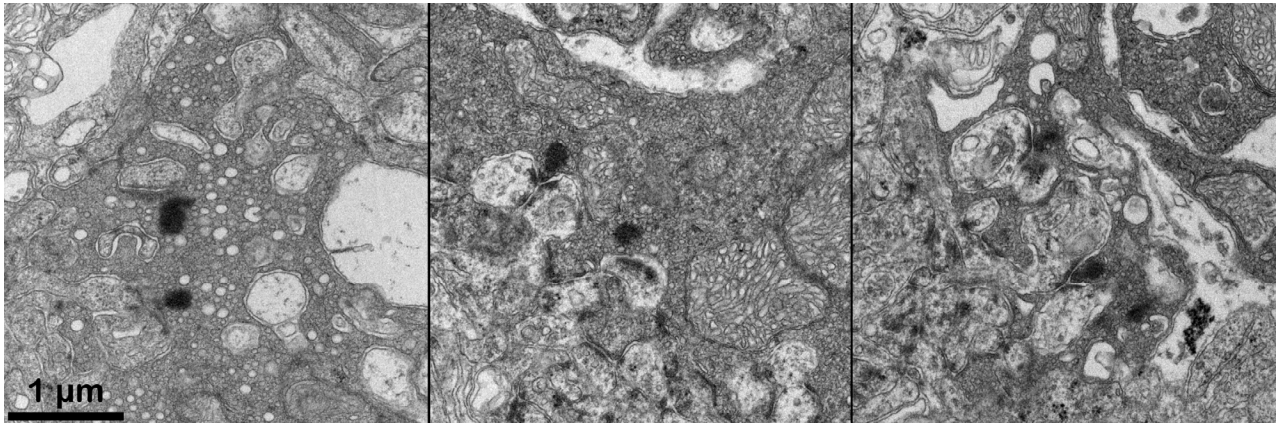


Abb. Jb1 Beispiele klumpiger bzw. keulenartiger Profile synaptischer Körperchen in Zapfenedikeln verschiedener Tiere (Jb5 & 11; Maßstab gilt für alle Bilder)

In den Stäbchenterminalen lagen unter allen Bedingungen durchschnittlich über 34 bis über 77 % atypische Profile vor, die auf Verdickungen und Abspaltungen von kugel- oder klumpenförmigem Material hinweisen. Unter Lichtbedingungen konnte kein klarer Effekt der Kalziumgabe nachgewiesen werden ($P > 0,62$). Unter Organkultur in Dunkelheit hatte die Gabe des Kalziumantagonisten Nifedipin keine signifikante Auswirkung auf Profile synaptischer Körperchen ($P > 0,57$). Jedoch zeigte die Lichtkontrolle signifikant ($P < 0,036$) mehr veränderte SK als die Dunkelkontrolle und im Vergleich zum "chemischen Licht" bei Dunkelkultur lagen noch signifikanter ($P < 0,003$)

mehr atypische Profile vor.

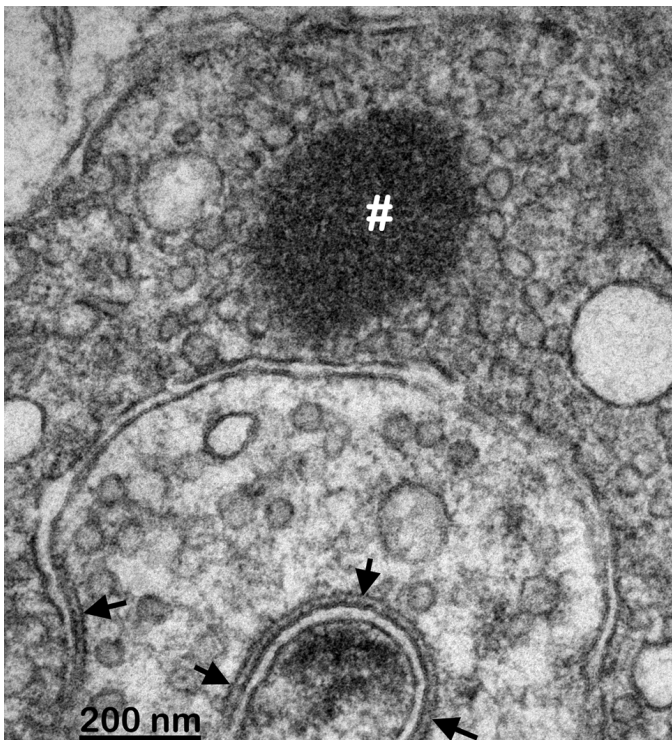


Abb. Jb2 Ein ungewöhnlich großes, rundliches Profil eines synaptischen Körperchens in einem Stäbchenterminal einer BALB/c Maus (Jb9). Interessant sind auch die in kurzem Abstand an der Zellmembran fixierten dreidimensional vermutlich plattenförmigen präsynaptischen Verdichtungen (Pfeile) des hier angeschnittenen Horizontalzellfortsatzes (vgl. Abb. von Brandon & Lam 1983 und Linberg & Fisher 1988).

Tabelle Jb: Quantitative Auswertung von jeweils über 50 nacheinander angetroffenen Profilen synaptischer Körperchen in Stäbchenterminals zufällig ausgewählter 30 Min. organkultivierter Retinae von BALB/c Mäusen unter den genannten Bedingungen.

Licht Kontrolle (400 Lux)								
Tiere	normal	dick	Keule	rund	Klumpen	Stumpf	n [100%]	atypisch
Jb 1	24,14	3,45	10,34	25,86	24,14	12,07	58	68,63%
Jb 4	1,69	11,86	13,56	28,81	32,20	11,86	59	84,62%
Jb10	1,72	6,90	24,14	37,93	25,86	3,45	58	91,07%
Jb11	2,00	12,00	32,00	26,00	12,00	16,00	50	83,33%
Jb14	25,68	4,05	17,57	25,68	10,81	16,22	74	64,52%
Ø	12,04	7,36	19,06	28,76	20,74	12,04	299	77,95%

Licht + 1µM Ca⁺⁺-Ionophor A23187 + 1 mM CaCl₂ (Licht + "chemische Dunkelheit")								
Tiere	normal	dick	Keule	rund	Klumpen	Stumpf	n [100%]	atypisch
Jb 2	10,17	6,78	3,39	61,02	15,25	3,39	59	82,46%
Jb 7	32,53	4,82	14,46	27,71	9,64	10,84	83	58,11%
Jb 9	5,36	3,57	26,79	35,71	19,64	8,93	56	90,20%
Jb16	60,26	6,41	14,10	5,13	7,69	6,41	78	28,77%
Jb19	15,38	7,69	15,38	33,85	6,15	21,54	65	70,59%
Ø	27,27	5,87	14,66	30,79	11,14	10,26	341	63,07%

Dunkel Kontrolle								
Tiere	normal	dick	Keule	rund	Klumpen	Stumpf	n [100%]	atypisch
Jb 3	41,79	17,91	16,42	2,99	8,96	11,94	67	32,20%
Jb 5	33,87	27,42	24,19	1,61	8,06	4,84	62	35,59%
Jb13	26,15	16,92	47,69	6,15	1,54	1,54	65	56,25%
Jb15	25,71	14,29	38,57	2,86	10,00	8,57	70	56,25%
Jb17	23,08	16,92	40,00	3,08	10,77	6,15	65	57,38%
Ø	30,09	18,54	33,43	3,34	7,90	6,69	329	47,88%

Dunkel + 100 µM Ca⁺⁺-Blocker Nifedipin (Dunkelheit + "chemisches Licht")								
Tiere	normal	dick	Keule	rund	Klumpen	Stumpf	n [100%]	atypisch
Jb 6	43,28	25,37	7,46	5,97	10,45	7,46	67	25,81%
Jb 8	50,00	9,72	19,44	1,39	12,50	6,94	72	35,82%
Jb12	45,16	11,29	20,97	11,29	4,84	6,45	62	39,66%
Jb18	32,47	12,99	38,96	2,60	7,79	5,19	77	52,05%
Jb20	64,94	15,58	3,90	6,49	6,49	2,60	77	17,33%
Ø	47,32	14,93	18,31	5,35	8,45	5,63	355	34,03%

Legende siehe Tabelle Js!

3a22. Verteilung von beta-Dystroglykan (BDG) und Bassoon in der Retina (Jastrow et al. 2006)
In der Retina adulter und 1 Tag alter Hühnchen zeigte sich bei den immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen Bassoon (rb-antisap7f; grüner Kanal) punktförmig verteilt in zwei breiten Streifen der inneren und einem schmalen Areal der äußeren plexiformen Schicht. Diese Befunde waren den von Brandstätter et al. (1999) bei der Ratte demonstrierten sehr ähnlich. Die gleichzeitige BDG (mAb 43DAG/8D5; roter Kanal) Markierung zeigte zum einen 4 µm lange sichelförmige Banden, die näher an der inneren Körnerschicht lokalisiert waren und, wie in Blank et al. (1997, 1999) dargestellt, den Zapfenterminalen entsprechen, zum anderen punktförmige, etwas näher an der äußeren Körnerschicht gelegene Markierungen, die Stäbchenterminale darstellen (Blank et al. 1997, 1999). Die innere plexiforme Schicht zeigte interessanterweise kein spezifisches Labelling, was darauf hindeutet, daß BDG nicht an den Ribbonsynapsen der Bipolarzellen konzentriert ist. Die beiden Fluorochrome erschienen in Übersichtsvergrößerungen im Bereich der Photorezeptorterminalen zwar sehr nahe beieinander, waren aber nicht kolokalisiert wie Abb. BDG1 zeigt. Die Bassoon Immunoreaktivität lag in einzeln betrachteten Terminalen stets weiter außen, die BDG Markierung mehr innen. Dies deutet darauf hin, daß BDG nicht direkt an der

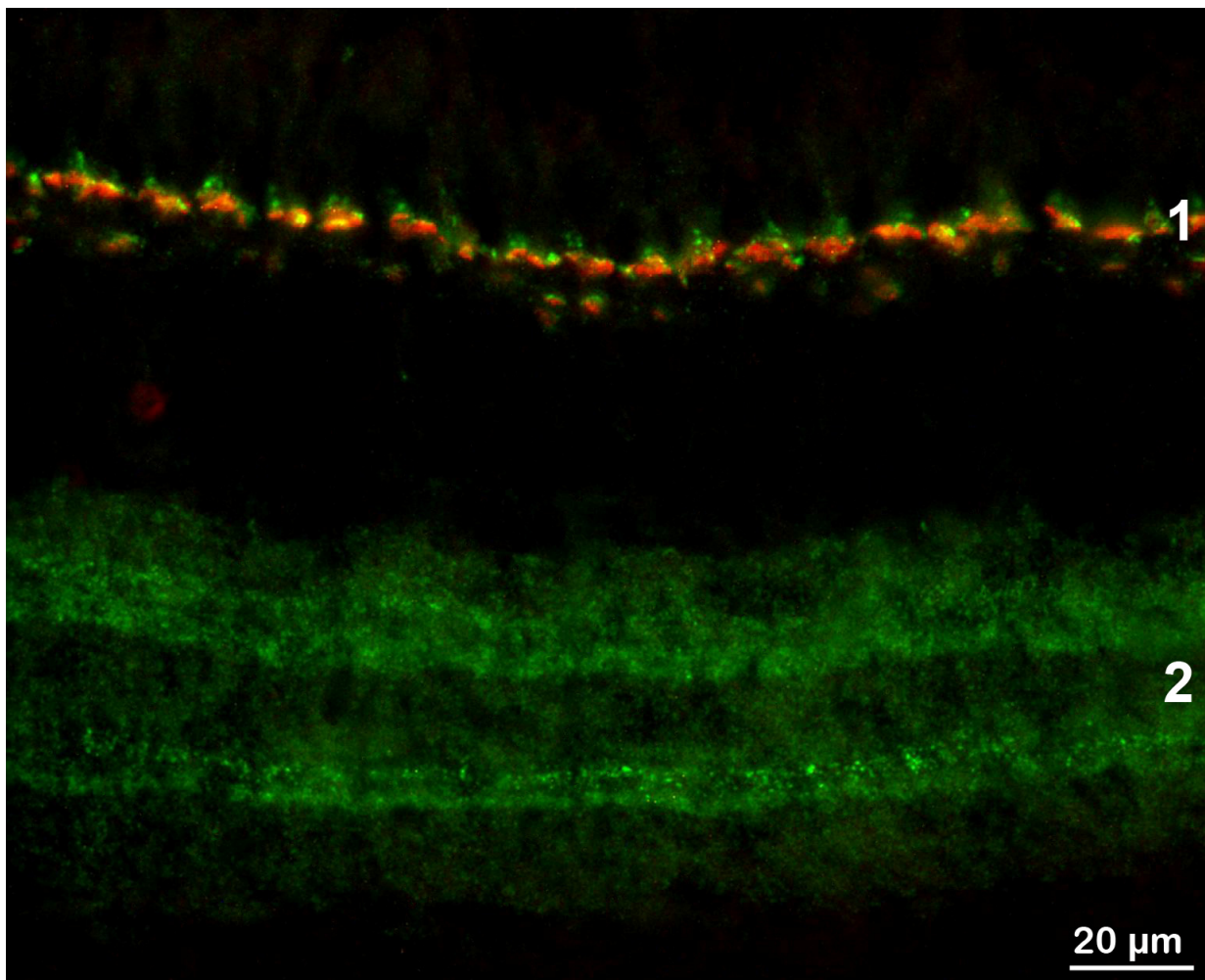


Abb. BDG1 Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Retina eines Hühnchens nach Markierung mit Anti- β -Dystroglykan Antikörper (rot) und Kaninchen Anti-Bassoon Antiserum (grün). Die rote Markierung ist praktisch ausschließlich in einem engen Bereich der äußeren plexiformen Schicht (1) zu finden, der den Photorezeptorterminalen entspricht. Hier zeigt sie eine kaum überlappende Markierung mit dem Bassoon Antikörper. Letzterer markiert zusätzlich zwei

streifige Bereiche der inneren plexiformen Schicht (2), in denen sich Ribbonsynapsen konzentrieren.

Verankerungsregion synaptischer Körperchen vorkommt. Bei höherer Vergrößerung erschien die punktförmige Bassoon Markierung zum Teil bogenförmig angeordnet, entsprechend dem Verlauf von arciform densities, welche die Anheftungsstellen der SK an der Zellmembran darstellen. Die BDG Verteilung war diffuser und erschien zwischen den Bassoon Pünktchen. Kaum fand sich eine überlappende Markierung beider Proteine. Ferner waren beide nicht direkt an der aktiven synaptischen Zone lokalisiert. Die immunelektronenmikroskopische Markierung einer Retina mit dem 43DAG/8D5 - BDG Antikörper eines 1 Tag alten Hühnchens zeigte Goldpartikel an der präsynaptischen Membran von Zapfen. Diese fanden sich clusterartig im perisynaptischen Bereich, konzentriert an seitlichen Bereichen und den Spitzen fingerartiger Fortsätze (Abb. BDG2, 3).

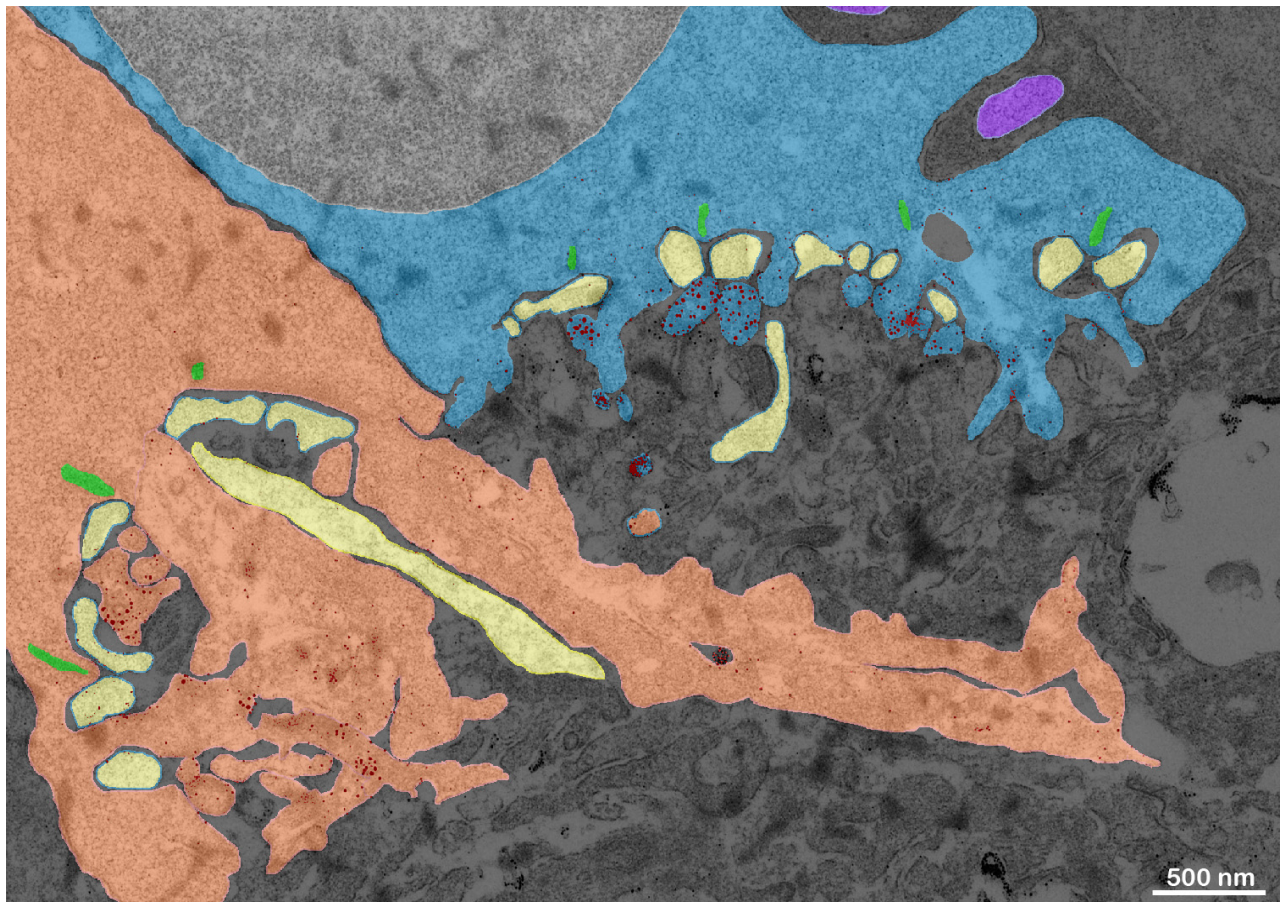


Abb. BDG2 Segmentierte Zapfenterminalen (Doppelzapfen orange und blau, Blauzapfen violett) eines 1 Tag alten Hühnchens nach Immunogoldmarkierung mit Anti-BDG Antikörper (rot). Während die gelb markierten Horizontalzellfortsätze und die hier nicht hervorgehobenen Bipolarzellendendriten keine Markierung zeigen, findet sich in fingerförmigen Ausläufern der Zapfenendkolben ein deutliches Labelling (synaptische Körperchen grün).

Genau betrachtet lag der Großteil der BDG Markierung hier im Zytoplasma der Fortsätze oder knapp unterhalb deren Zellmembran. Gelegentlich fanden sich auch direkt am Plasmalemm Goldpartikel (Abb. BDG2-4). Eindeutige Markierungen waren aber weder in der aktiven Zone präsent, noch an den SK und auch nicht im Bereich der postsynaptischen Horizontal- oder Bipolarzellfortsätze, wie auch die 3D-Rekonstruktionen und die daraus generierten Abbildungen [BDG 6,7] und Animationen belegen. Gelegentlich fanden sich im Interzellularraum zwischen Rezeptorterminalen und Bipolar- bzw. Horizontalzellfortsätzen Markierungen, die am ehesten auf eine Herausdiffusion des Reaktionsproduktes der Meerrettichperoxidase zurückzuführen ist. Zwei der re-

konstruierten Zapfenterminals zeigten einander gegenüberstehende Oberflächen im Sinne eines Zwillings terminals (Rot-empfindlicher Doppelzapfen). Sie wiesen 14 bzw. 10 SK in dem in der Schnittserie enthaltenen Bereich auf. Ein weiteres auf 24 Schnitten zumeist nur inkomplett angebrochenes Terminal gehörte aufgrund seiner Größe, Form und dem Fehlen von Telodendrien vermutlich zum Typ der S-Zapfen. Alle Zapfen bildeten eine Großzahl von anfangs dickeren, dann meist fingerförmigen Fortsätzen aus, die oft zur Zelle zurückliefen. Andere, meist dünne, Fortsätze erstreckten sich von den Doppelzapfen aus über viele Mikrometer weit in verschiedene Richtungen tief in die äußere plexiforme Schicht hinein. Viele Fortsätze spalteten sich in zwei oder mehrere kleinere auf, die zum einen direkt senkrecht weiterzogen, zum anderen sich krümmten und dann parallel zum Zapfenterminal verliefen. Die synaptischen Invaginationen, an deren Spitzen präsynaptisch die SK zu finden waren, reichten 1 - 2 μm in die Zapfenendkolben hinein und beinhalteten in der Regel 2 Horizontalzellfortsätze und 1 bis 2, selten 3 Dendriten invaginierender

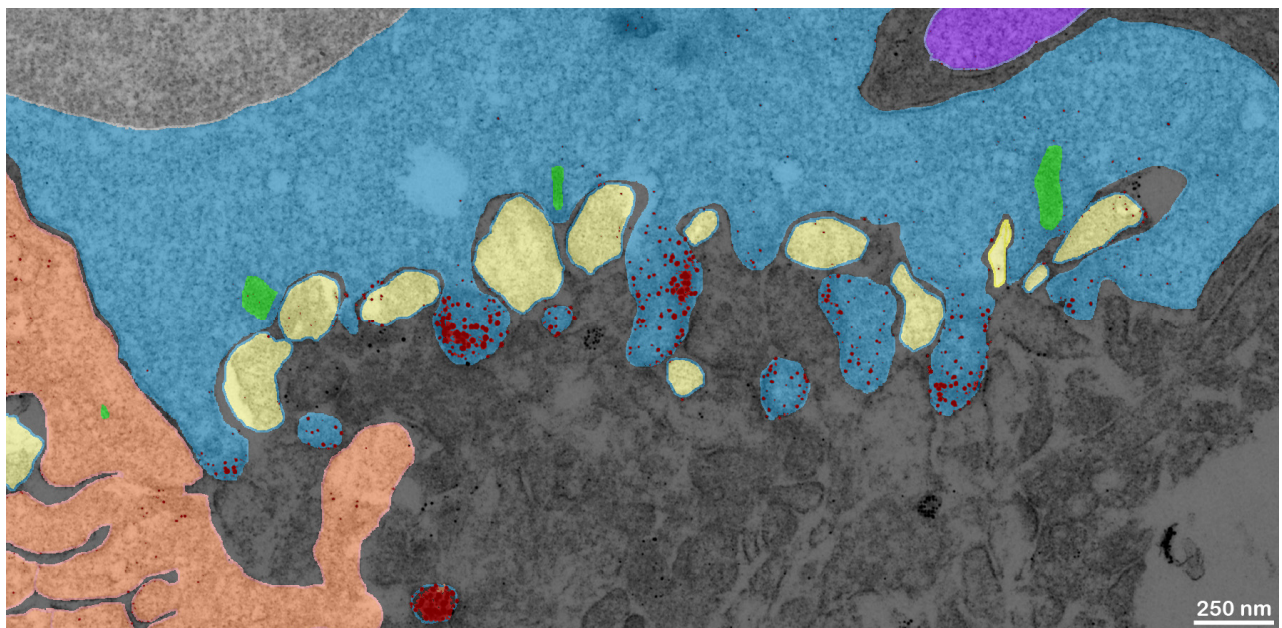


Abb. BDG3 Tiefer gelegenes Detail der segmentierten Doppelzapfenterminals, welches die im lateralen Bereich der Fortsätze konzentrierte Immunreaktivität (rot) dokumentiert.

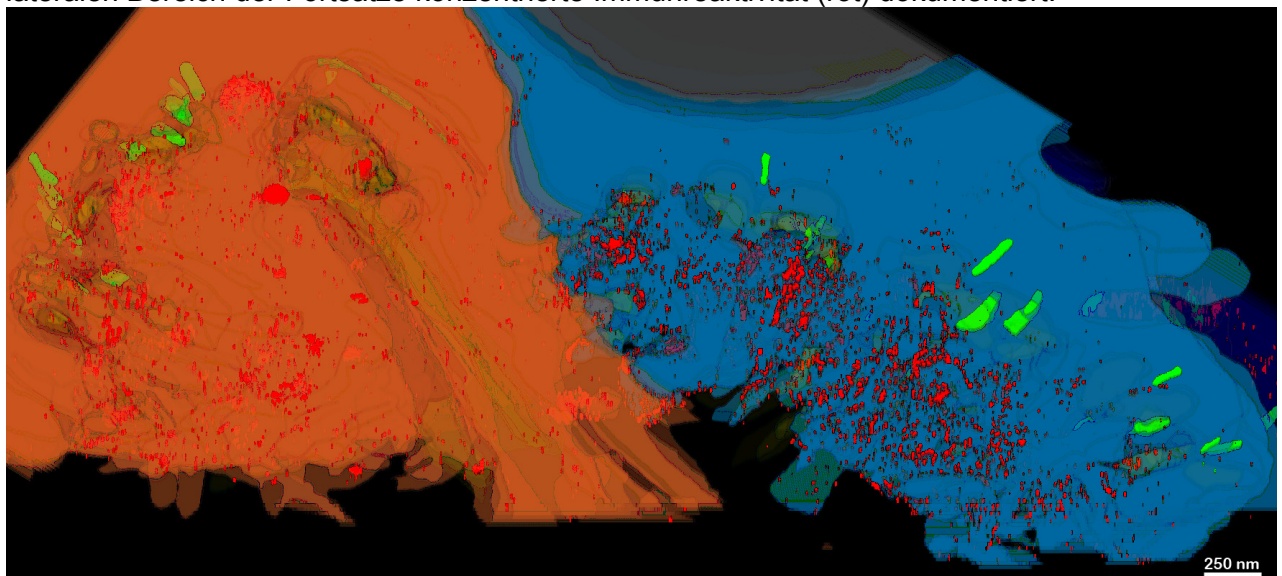


Abb. BDG4 Dieses Bild einer einfachen dreidimensionalen Rekonstruktion verdeutlicht in der Übersicht die wolkenartige Verteilung des Beta-Dystroglykans im perisynaptischen Bereich (Farben wie in den vorangehenden Abbildungen, jedoch Horizontalzellfortsätze nicht markiert).

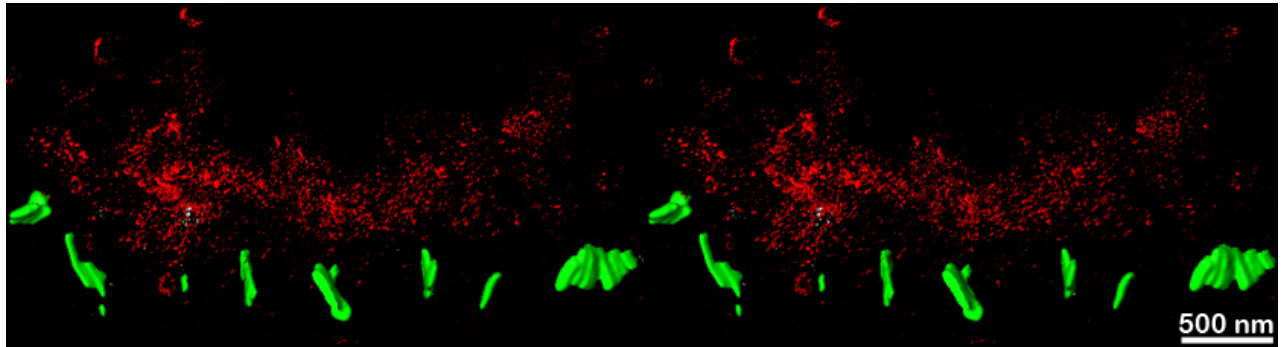


Abb. BDG5 Während sich an den platten- bis bandförmigen synaptischen Körperchen (grün) keine Immunogoldmarkierung (rot) findet, imponiert sie unterhalb des synaptischen Endkolbens eines Zapfens wolkenförmig, wie dieses Stereobild und die zugehörige Animation BDG5.avi zeigen.

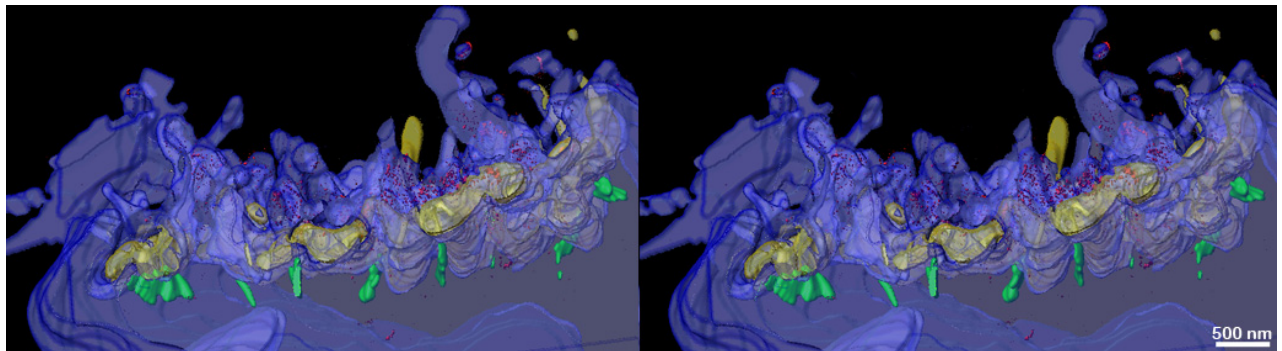


Abb. BDG6 Blick von der Gegenseite auf den vorher gezeigten Bereich. Das Stereobild demonstriert eine große Zahl der irregulären, fingerförmigen Ausläufer des einen Doppelzapfens (blau). Besonders starke Markierung erscheint in den abgelenkten, kurzen, parallel zur Endkolbenbasis gelegenen Fortsätzen (Animation dieser Rekonstruktion: BDG6.avi).

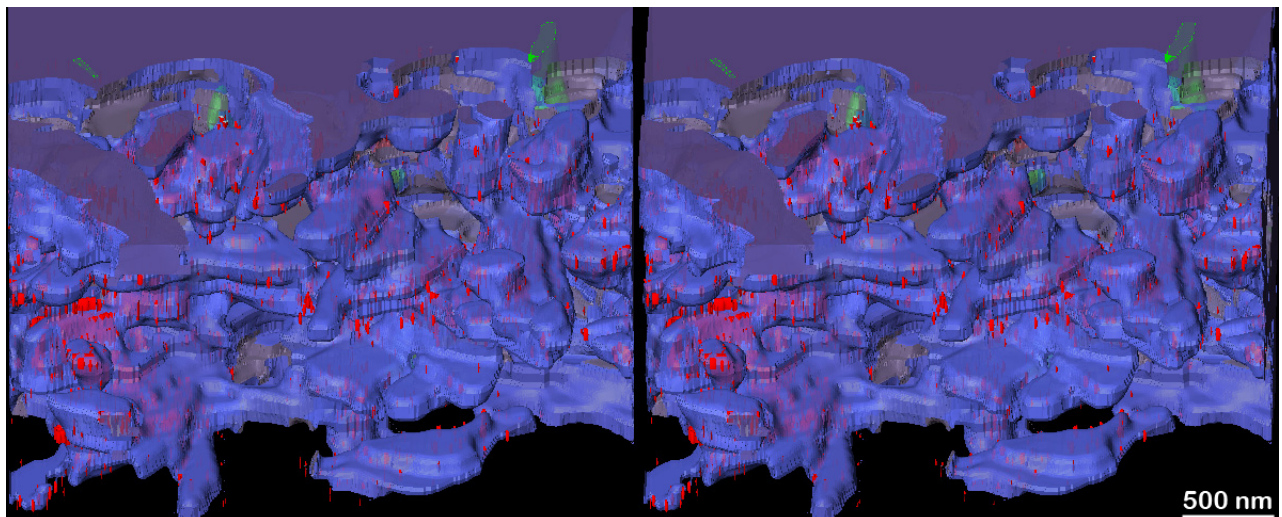


Abb. BDG7 Blick von schräg unten auf unregelmäßig angeordnete Fortsätze eines Doppelzapfens (blau), von denen viele eine starke Immunogoldmarkierung zeigen (rot). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde hier auf die Darstellung der ebenfalls vorhandenen Horizontal- und Bipolarzellfortsätze verzichtet (Animation dieser Rekonstruktion: BDG7.avi).

ON-Bipolarzellen. Aufgrund der sehr komplexen Morphologie wurden kleinere Details bzw. einzelne Ribbonsynapsen für sich analysiert. Es fand sich nur ausnahmsweise eine (wahrscheinlich unspezifische) Markierung innerhalb der Einstülpungen, ähnlich verhielt es sich innerhalb und an der Membran von Horizontal- und Bipolarzellen. Spezifischer BDG Nachweis war vor allem an dünnen rekurrenten Zapfenfortsätzen, einige hundert Nanometer nach deren Abgang aus dem Endkolben in den Bereichen zu finden, in welchen sie unterhalb der Auftreibungen von Horizon-

talzellfortsätzen lagen. Dieser Bereich entspricht der perisynaptischen Randzone. Wie Abb. BDG5, 6 und Animationen BDG5 & BDG6.avi belegen, ist nur ganz ausnahmsweise eine Immunogoldmarkierung in der Nähe von SK zu finden. Die hier erkennbare wolkige Verteilung der immunologischen Markierung ist gut mit den fluoreszenzmikroskopischen Wolken in Einklang zu bringen. Neben den im Rahmen der vorliegenden Habilitationsschrift neu generierten Animationen finden sich die zu Jastrow et al. (2006) gehörenden im Internet (siehe <http://www.staff.uni-mainz.de/jastrow/dystro/>).

3a23 Rekonstruktionen synaptischer Körperchen bei BALB/c Mäusen

Vergleichende 3D-Rekonstruktionen von 22 Schnittserien der Retinae von BALB/c Mäusen unter LD 12:12 (Licht an: 06.00) Bedingungen (Jastrow et al. 2005; Kolios 2006) zeigten meist synaptische Körperchen mit boomerang-artigen elektronendichtem Zentrum in Stäbchen und gelegentlich auch in Zapfen. Die beiden parallel liegenden, großen, flachen Hauptoberflächen standen in einem Abstand von 35 nm zueinander. Sie banden, wie auch die kleinen unregelmäßig gebogenen Seitenflächen, über feine Proteinbrücken glutamathaltige Vesikel. Meist standen die an ihrer langen Unterkante über feine Stiele an der arciform density verankerten Organellen zwischen 2 Horizontalzellfortsätzen relativ senkrecht zur Zellmembran. Die SK von Zapfen waren zumeist dünne bandartige Strukturen, manche davon in sich verdreht, manche auch C- oder S-förmig gebogen. Jedes Zapfenterminal wies mehrere SK auf. Das vermutlich zu zwei Dritteln erfaßte Terminal der längsten Schnittserie zeigte auf 35 Serienschnitten 7 verschiedene SK. In einigen Fällen waren Zapfen-SK größere, teils nur leicht gebogene, plattenförmige Strukturen. Öfter lagen längere gebogene und teils auch verdrehte bandförmige elektronendichte Strukturen vor. Klumpige oder kugelförmige SK waren in Zapfen nicht erkennbar. Die scheibchen- oder platten-, gelegentlich auch bandförmigen deutlich kleineren SK der Bipolarzellen in der inneren plexiformen Schicht zeigten, wie auch Zapfen-SK keine auffälligen Veränderungen unter den im Abschnitt Material genannten Lichtbedingungen. Anders verhielt es sich mit den SK in den Stäbchenterminalen. Am Ende der Dunkelphase und im ersten Viertel der Lichtphase getötete Tiere zeigten boomerang-artige, C- bis seltener hufeisenförmige, leicht in den anderen räumlichen Ebenen gebogene Organellen, die gelegentlich kleine Auftreibungen hatten. Die Größe und die Zahl solcher Auftreibungen, die besonders zwischen der Mitte und den Enden der Organellen auftraten, nahmen gegen Ende der Lichtphase, d.h. nach 11 Stunden Licht, zu. In einigen Fällen fanden sich auch zwei größere Auftreibungen an einem einzigen SK. Zusätzlich erschienen klumpige bis kugelförmige Gebilde, die keine Verbindung mehr zur Zellmembran hatten wie alle zuvor erwähnten SK. Noch auffälligere Veränderungen fanden sich in Retinae, die aus einer Organkultur mit deutlich reduziertem Kalziumionengehalt (EGTA im Medium; Material aus Spiwoks-Becker et al. 2004) stammten. Hier lagen praktisch keine "normalen" SK mehr vor. Neben einer Reihe von Kugeln oder Klumpen von Vesikeln umgebenen elektronendichten Materials, die keine erkennbare Beziehung zur Zellmembran hatten, waren die allermeisten SK an den Enden extrem rundlich aufgetrieben. Die Abb. 8 und BALB1, 2 und die zugehörigen Animationen

BALB2.avi & 8.avi zeigen dies deutlich. Im mittleren Bereich waren die noch an der Membran liegendebliebenen Organellen sehr stark ausgedünnt.

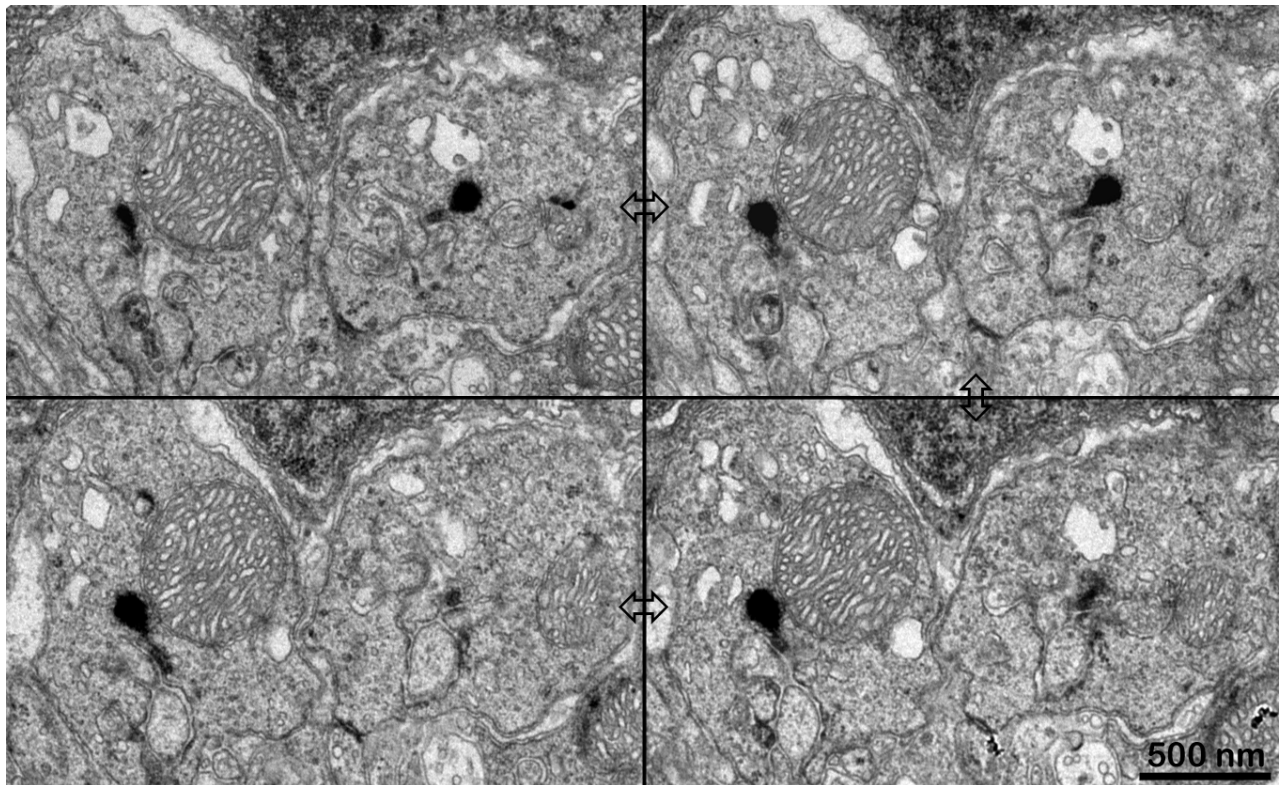


Abb. BALB1 Serienschritte zweier Stäbchenterminals einer unter Kalziumentzug kultivierten BALB/c Maus Retina, bei denen sich die massiven, rundlichen Auftreibungen an den kaum noch erkennbaren Resten der SK finden, die immer noch an der Membran verankert sind (unpublizierte Serienschritte von Spiwox-Becker).

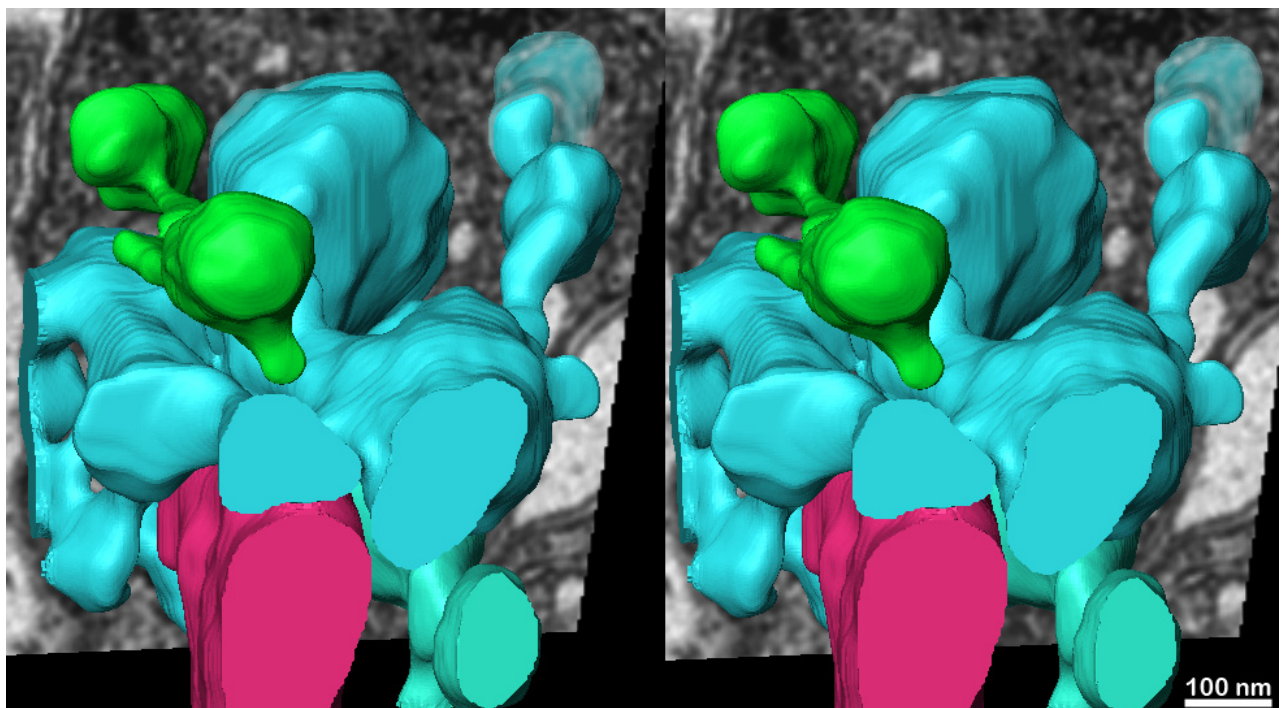


Abb. BALB2 In diesem Stäbchenterminal einer BALB/c Maus hängen zwei massive, unregelmäßige, rundliche Auftreibungen nur noch über ein kurzes, dünnes Zwischenstück bei dem hier grün dargestellten SK zusammen. Derart deutliche Veränderungen wurden nur unter Kalziumentzug beobachtet (L:D =12:12; L von 6.00-18.00; vergleiche Abb. 8; Animationen dieser Rekonstruktion: BALB2.avi & 8.avi).

Die im Rahmen der Erstellung der vorliegenden Schrift durchgeführte gründliche Revision und partiell notwendige Korrektur der von Jastrow et al. (2005) sowie Kolios (2006) erhobenen Befunde anhand der Originaldatensätze ergab im Detail folgende Befunde (geordnet nach Tötungszeitpunkten):

1. Tötung um 05.45, d.h. nach 11¾ Stunden Dunkelheit

Zehn rekonstruierte Stäbchenterminale zeigten 11 (3 komplett, 8 partiell erfaßte) überwiegend C-förmige, wenig gedrehte SK ohne Auftreibungen oder nennenswerte Krümmungen (Abb. BALB3), die alle an arciform densities (ads) verankert waren. In einer größeren Synapse fanden sich zwei C-förmig gebogene plattenartige SK. In einem rekonstruierten Zapfenterminal fanden sich 7 (davon 5 komplette) bandförmige SK, die meist nur leichte Krümmungen oder Drehungen aufwiesen. In einem Fall lag ein über 1,5 µm großes einmal um 90 Grad verdrehtes und mehrfach stark

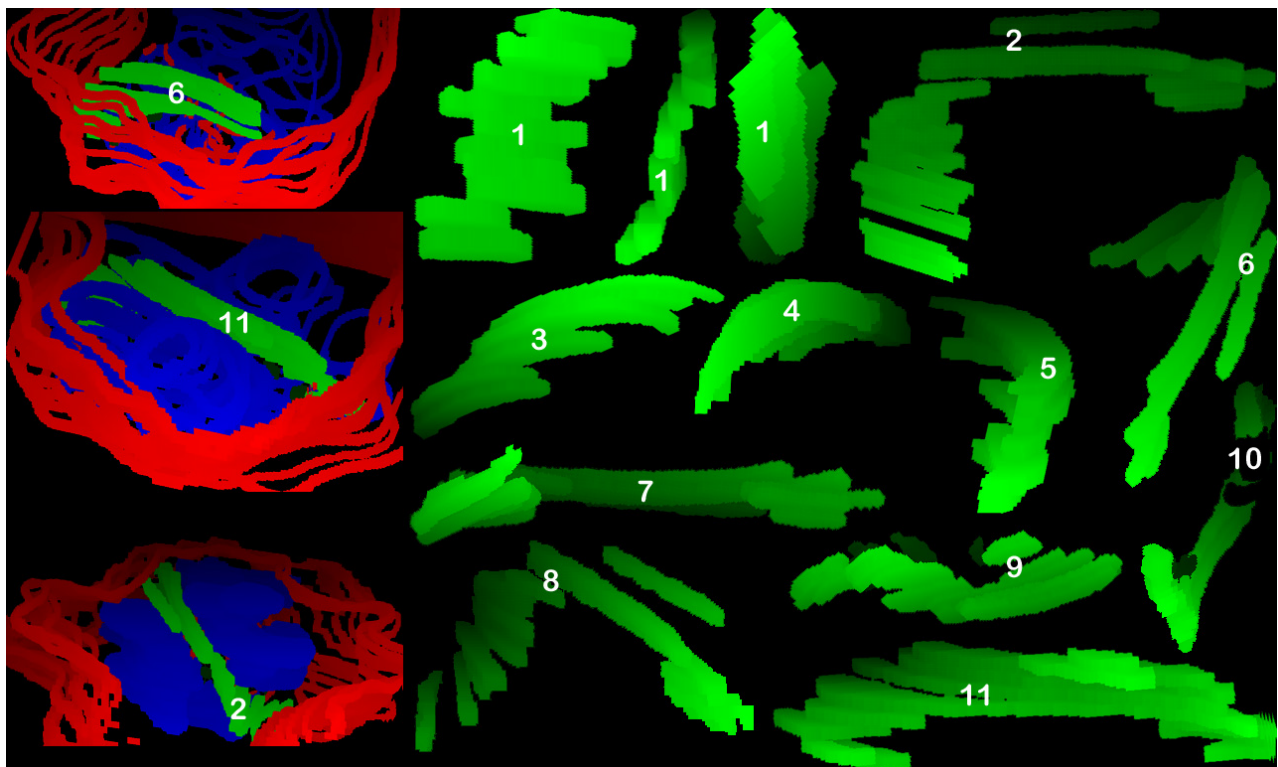


Abb. BALB3 Während das erste (1) der 11 aus Stäbchenterminalen rekonstruierten synaptischen Körperchen (SK) bandförmig erscheint, sind die übrigen eher C-förmige, teils leicht verdrehte Organellen. An drei Beispielen wird ihre Lage zwischen Horizontalzellfortsätzen (blau) bzw. zur äußeren Membran des Terminals (rot) verdeutlicht (um 5.45 getötete BALB/c Mäuse).

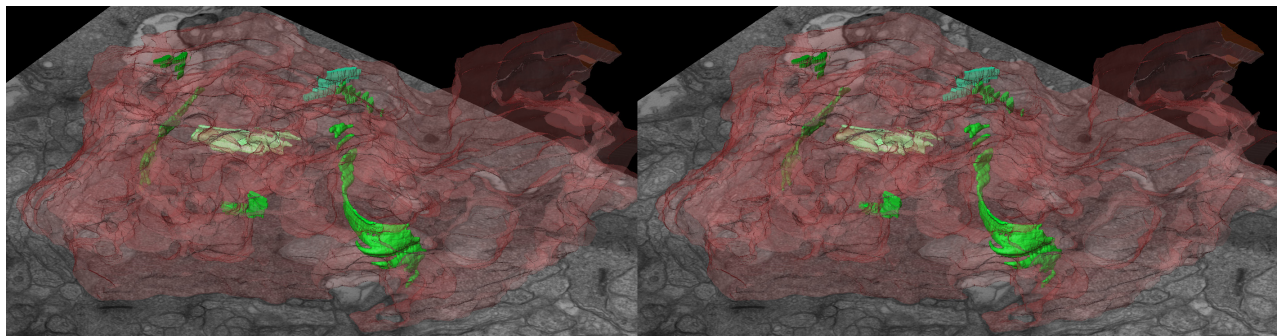


Abb. BALB4 Diese Stereorekonstruktion der SK eines Zapfenterminals einer um 5.45 getöteten BALB/c Maus zeigt rechts der Mitte ein auffällig großes, mehrfach gebogenes bandförmiges SK, welches an 4 verschiedenen Synapsen beteiligt ist (Animation dieser Rekonstruktion: BALB4.avi; - eines Ausschnittes: 6a.avi).

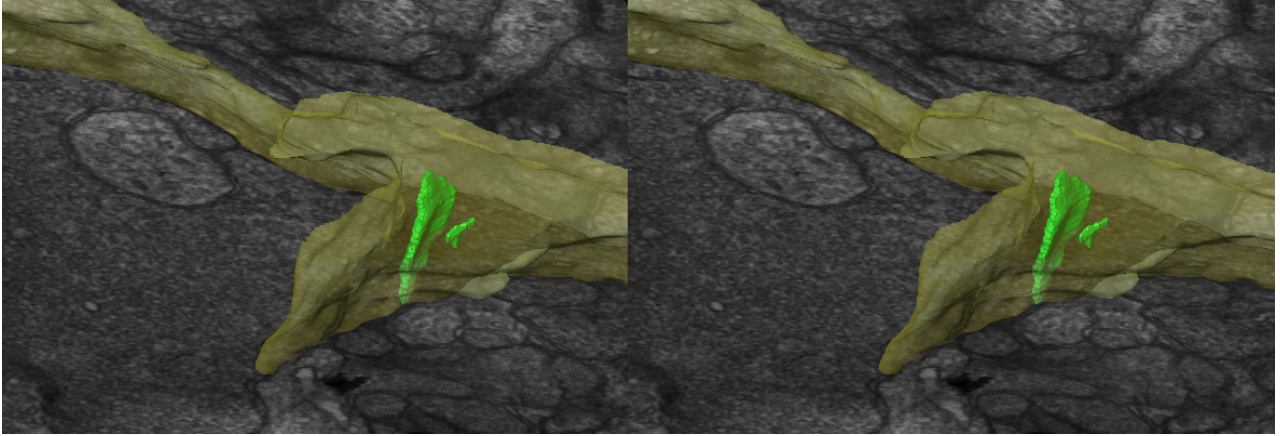


Abb. BALB5 Dieses Stereobild demonstriert die Lage der beiden ektopischen, d.h. an untypischer Stelle gelegenen SK (grün) in einem Bipolarzellendriten (gelb), der sich seitlich an einem Zapfenterminal weiter verzweigte und in einem Stäbchenendkolben endete (hier nicht erkennbar; Animation dieser Rekonstruktion: BALB5.avi).

gebogenes SK vor, welches an 4 verschiedenen Synapsen beteiligt war (Abb. BALB4; Animationen BALB4.avi & 6a.avi). Außen angelagert an das Zapfenterminal lagen in einem langen, ca. 250 nm durchmessenden, sich gabelnden Bipolarzellendriten 2 kleine plattenförmige ektopische SK (Abb. BALB5; Animation BALB5.avi). Eine Platte war ca. 400 x 300 x 35 nm groß. Im Abstand von ca. 75 nm dazu stand in einem Winkel von ca. 40 Grad die zweite deutlich kleinere

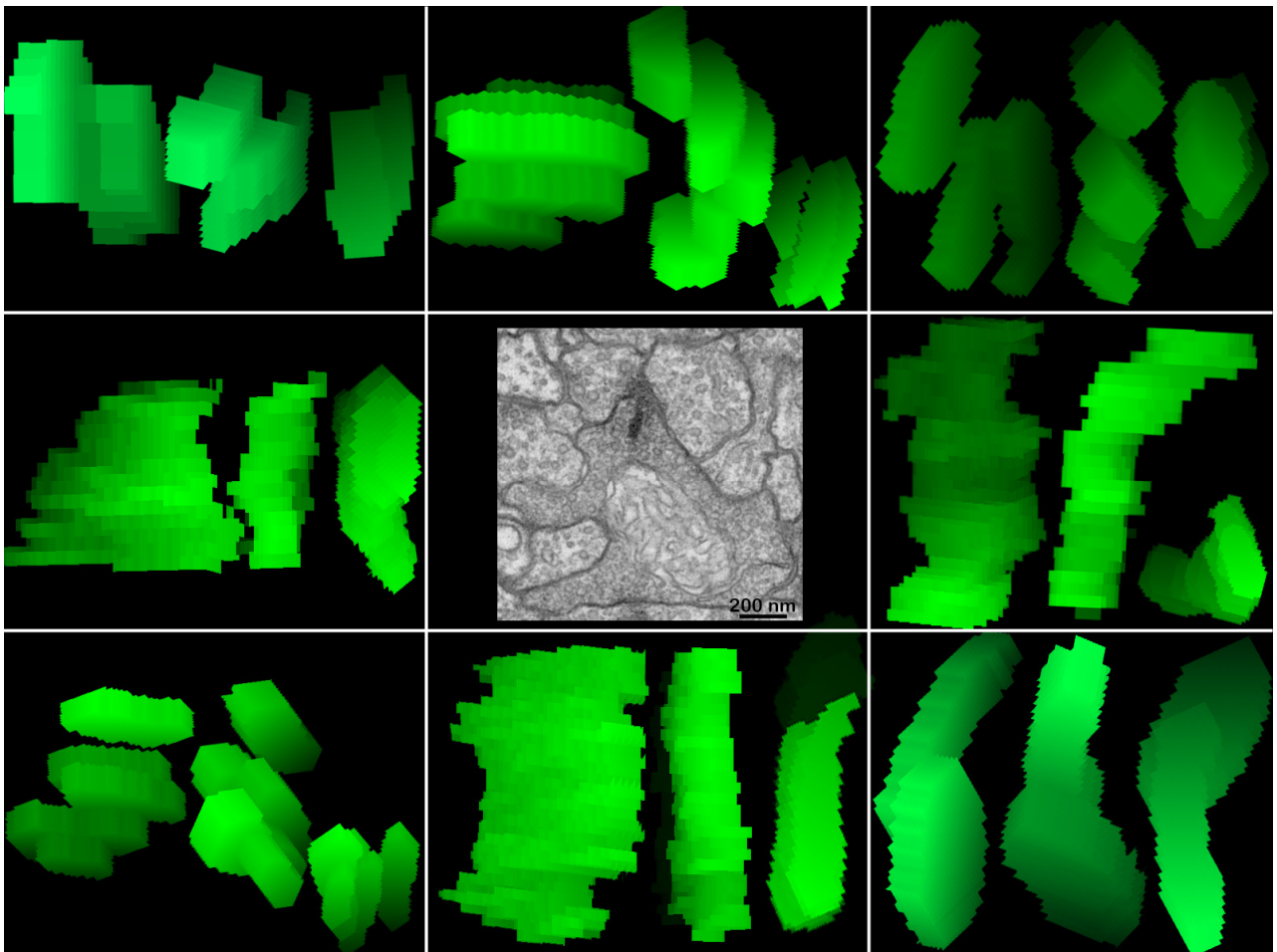


Abb. BALB6 Acht der insgesamt 9 plattenförmigen SK von Stäbchenbipolarzellen der um 5.45 getöteten BALB/c Mäuse in jeweils 3 verschiedenen Ansichten und ein Originalfoto, welches die typische Lage der SK-Profile in den Serienschritten zeigt: präsynaptisch an einer kleinen Membranverdichtung verankert, gegenüber eines Fortsatzes einer amakrinen Zelle und eines Ganglienzellendriten.

(ca. 100 x 80 x 30 nm) Platte. Alle 9 komplett erfaßten Stäbchenbipolarzell-SK waren an den Zellmembranen verankerte Platten (Abb. BALB6).

2. Tötung um 8.10, ab 8.00 für 10 Min. Dunkelheit

In 16 Stäbchenterminalen wurden 24 SK rekonstruiert, dabei wurden 9 komplett und 15 partiell erfaßt. Über 50 % der C-, U- oder bandförmigen SK in Stäbchen zeigten ein bis zwei Auftreibungen bevorzugt im seitlichen Bereich, aber auch an den Enden (Abb. BALB7; Animationen BALB7.avi & BALB7a.avi). Die Organellen waren mehr verdreht und gekrümmt als um 05.45 und alle an ads verankert, ausgenommen 5 kugel- bis klumpenförmige Strukturen ohne Beziehung zur Zellmembran, die sich in der Nähe der anderen SK fanden. In einem Zapfenterminal waren 3 partiell erfaßte C- bis S-förmig gekrümmte, bandförmige SK deutlich größer als Stäbchen-SK. Eines war an zwei unterschiedlichen Synapsen beteiligt. Auftreibungen, klumpige oder kugelförmige SK waren in diesem Zapfenterminal nicht erkennbar. In einer Bipolarzelle der inneren plexiformen Schicht wurde ein plattenförmiges, schräg an der Membran verankertes ca. 300 x 170 x 35 nm großes SK rekonstruiert.

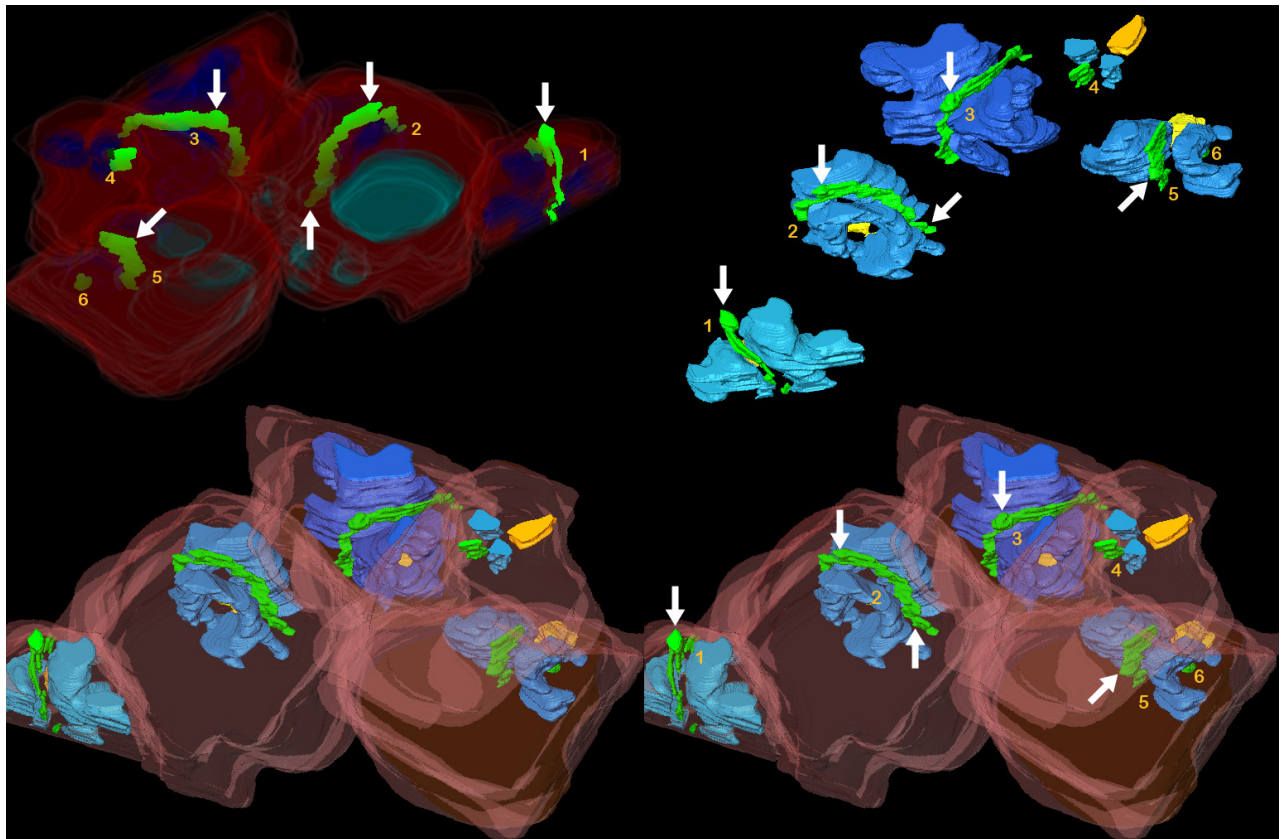


Abb. BALB7 Sechs SK in 5 Stäbchenterminalen einer BALB/c Maus, die um 8.10 Uhr nach 10 Min. Dunkelheit getötet wurde. Die Pfeile markieren Stellen, an denen sich Auftreibungen der ansonsten 35 nm dicken, C- artig gebogenen, bandförmigen Organellen finden. Das mit 6 bezeichnete SK ist kugelförmig, d.h. ein sphere, welches im Gegensatz zu den übrigen SK keine Verankerung an der Zellmembran und keine Beziehung zu Horizontalzellfortsätzen (blau) hat. SK 4 und 5 waren nicht komplett im Datensatz enthalten. In den neu gerenderten Ansichten (oben rechts; Stereobild unten) sind zusätzlich Bipolarzeldendriten gelb markiert (Animationen dieser Rekonstruktionen: BALB7.avi & BALB7a.avi).

3. Tötung um 8.45, d.h. nach 2¾ Stunden Licht

Zehn SK (5 komplette, 5 partielle) wurden in 8 Stäbchenterminalen visualisiert, darunter gab es nur ein kugelförmiges SK (Sphere). Auch die Zahl an Auftreibungen (an nur 4 SK vorhanden; Abb. BALB8a) war geringer als unter den vorangehend geschilderten Bedingungen. Eine W- und eine S-Form fielen bei den von der Grundform bandartigen SK auf. Einzelne der Organellen waren etwas stärker verdreht; tatsächlich signifikante Unterschiede zu der vorangehende untersuchten Gruppe von Tieren (2.) ließen sich jedoch nicht feststellen. Eine ca. 350 x 250 x 35 nm große membranverankerte Platte fand sich in einem rekonstruierten Stäbchenbipolarzellfortsatz in der inneren plexiformen Schicht (Abb. BALB8).

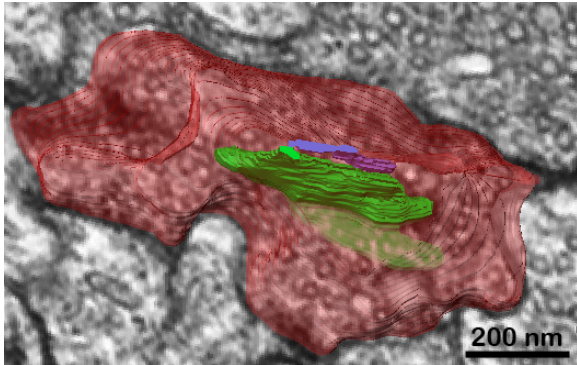


Abb. BALB8 verbogenes plattenförmiges SK (grün) in einem Bipolarzellterminal (rot) einer um 8.45 getöteten BALB/c Maus, das an einem, einer ad analogen, Membranplaque (blau) verankert ist (Animation dieser Rekonstruktion: BALB8.avi).

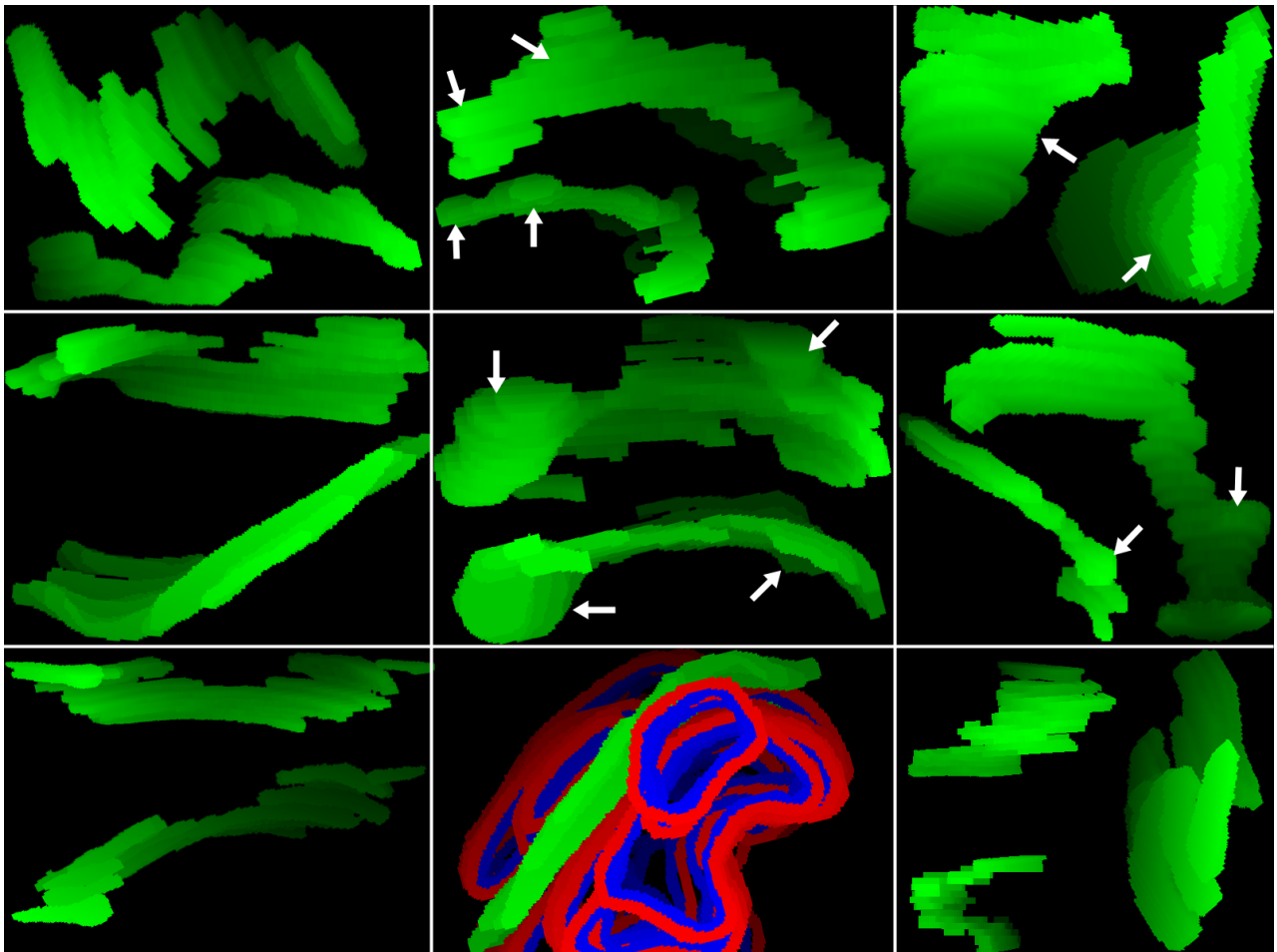


Abb. BALB8a Die 9 nicht kugelförmigen SK aus allen rekonstruierten Stäbchenterminalen von 2 BALB/c Mäusen, die um 8.45 getötet wurden, zumeist aus mehreren unterschiedlichen Perspektiven betrachtet. Die Auftreibungen der ansonsten 35 nm dicken, bandförmigen, zum Teil in mehreren Ebenen gebogenen Organellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Unten mittig ein SK in Beziehung zur Zellmembran (rot) und invaginierten Horizontalzellausläufern (blau).

4. Tötung um 17.00, d.h. nach 11 Stunden Licht

In 11 Stäbchenterminalen wurden 11 SK (3 komplette, 8 partielle) rekonstruiert, dabei fanden sich in 6 Fällen kleinere Auftreibungen (nur in einem Fall zwei an einem SK) am Ende oder lateral an den oberen Kanten der Organellen. Der mittlere Bereich von 5 der in einem Fall stark, sonst nur wenig verdrehten und meist nur wenig gekrümmten SK war deutlich verdünnt (Abb. BALB9). Diese Beobachtung konnte bei den anderen Versuchsbedingungen nicht gemacht werden.

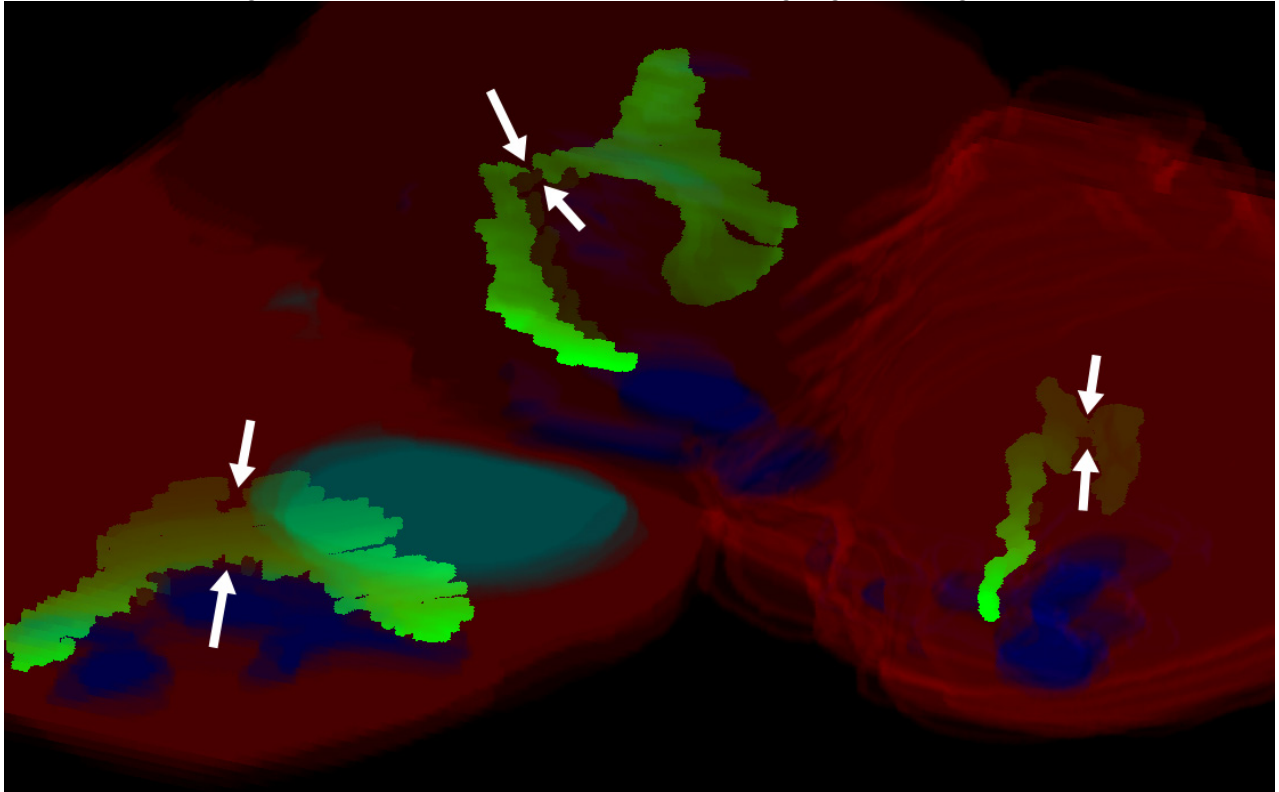


Abb. BALB9 Die drei hier visualisierten gebogenen bandförmigen SK von um 17.00 nach 11 Stunden Licht getöteten BALB/c Mäusen zeigten in ihrem mittleren Bereich deutliche Einschnürungen. Das obere SK ist in dieser Region zusätzlich um ca. 90 Grad verdreht (Zellmembran und Zytoplasma der Stäbchenterminalen rot, Horizontalzellfortsätze blau).

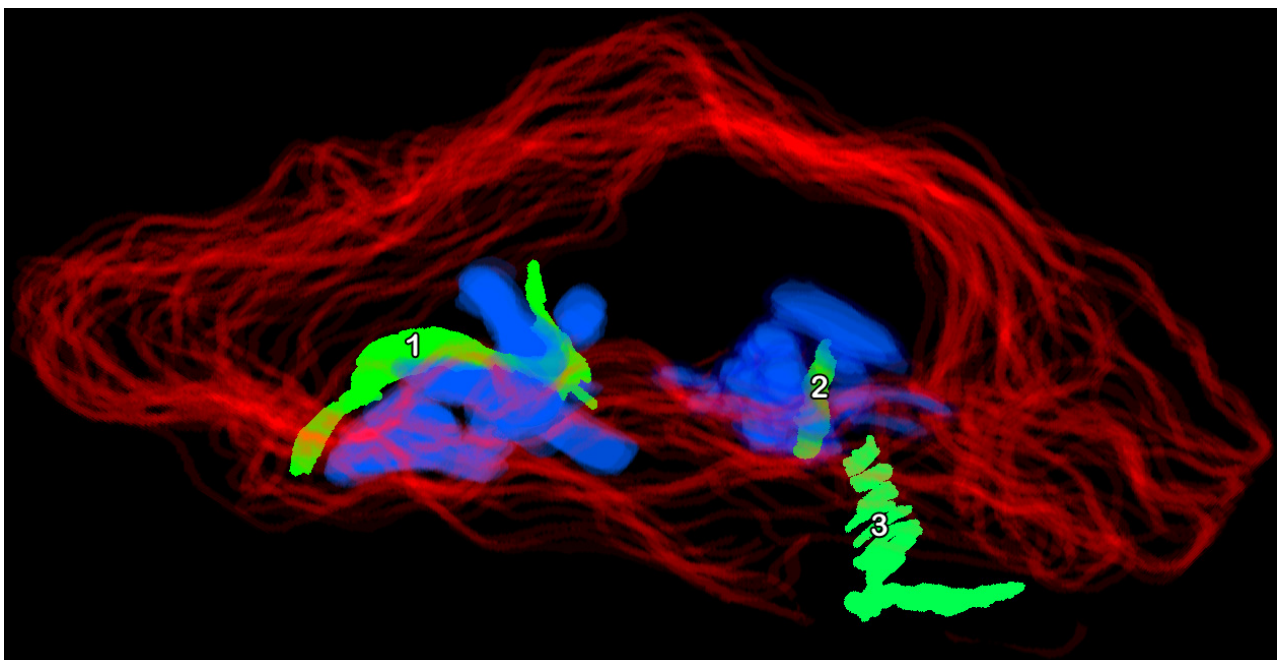


Abb. BALB10 Dieses Zapfenterminal enthält 3 bandförmige SK, von denen 1 und 3 an jeweils einer Stelle stark verbogen sind (Außenmembran des Terminals rot, Horizontalzellfortsätze blau).

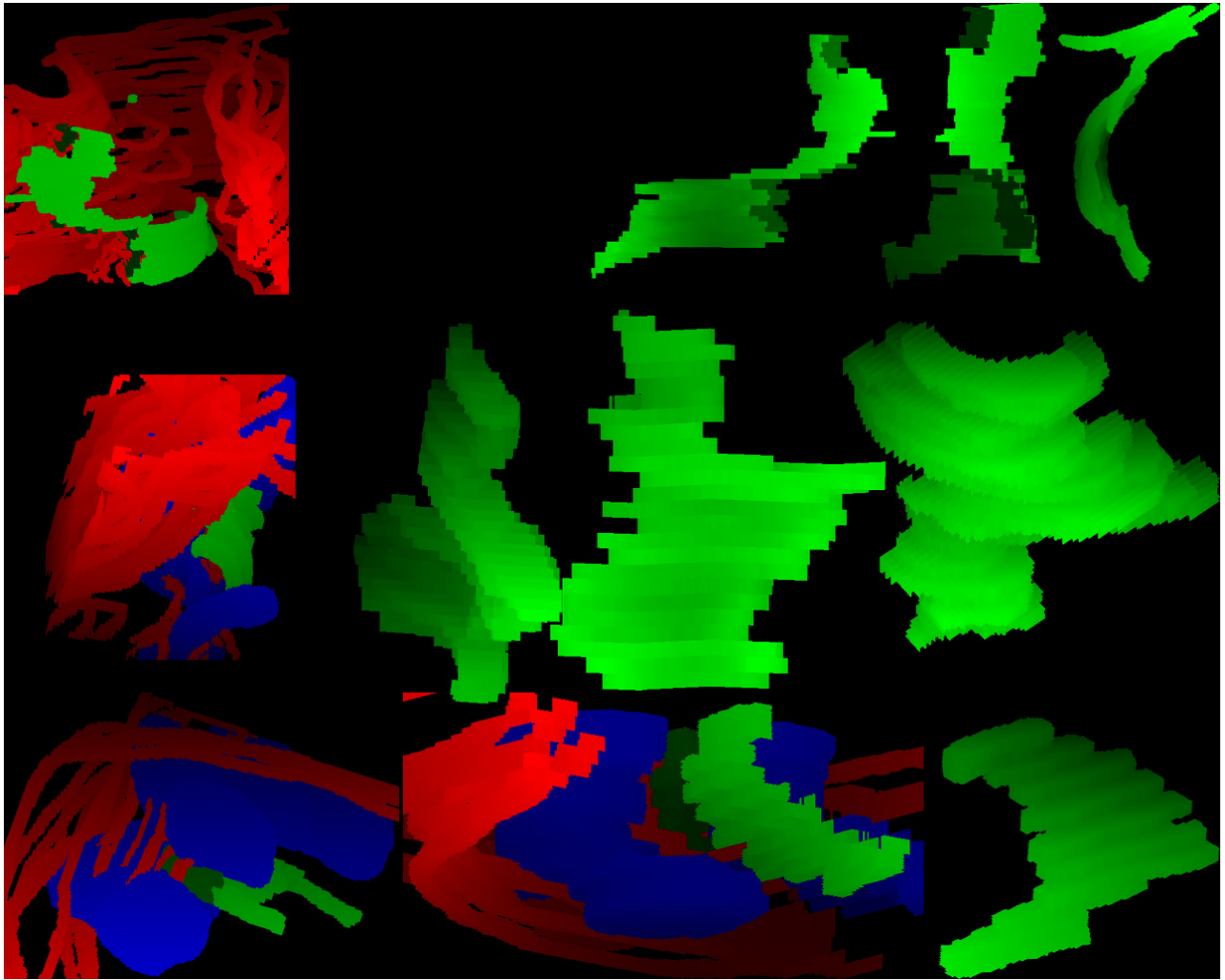


Abb. BALB11 Darstellung dreier SK aus Zapfenterminals von verschiedenen Blickwinkeln her betrachtet und in Relation zur Außenmembran des Terminals (rot) sowie zu Horizontalzellfortsätzen (blau).

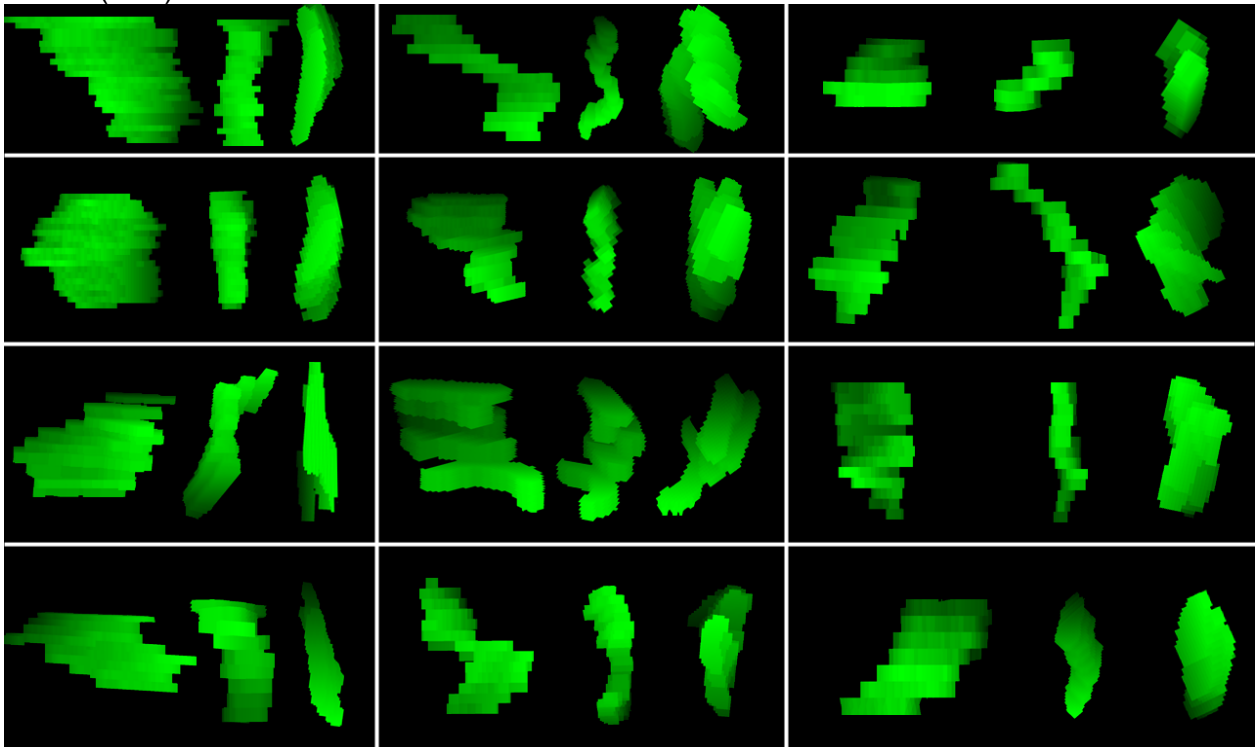


Abb. BALB12 Zwölf der insgesamt 13 aus Bipolarzellaxonen rekonstruierten SK in jeweils 3 unterschiedlichen Ansichten. Die platten- bis bandartigen Organellen hatten eine konstante Dicke von 35 nm und waren meist nicht stärker verdreht.

Kugel- oder klumpenförmige Strukturen lagen nicht vor. Die 4 SK in 2 partiell im Datensatz enthaltenen Zapfenterminalen waren deutlich größer als die SK in Stäbchen. Sie waren an 2 bis 3 unterschiedlichen Synapsen beteiligt, deutlich größer als Stäbchen-SK, weshalb nur eines komplett in den Serienschnitten enthalten war. Zapfen-SK zeigten im Gegensatz zu Stäbchen-SK keine Auftreibungen und waren von der Form her lange Bänder oder größere Platten, die in Teilbereichen stark verbogen waren. Eines imponierte wie zwei große seitlich aneinanderhängende C-artig gebogene Platten (Abb. BALB 10,11). Die meisten der 13 SK, die in Axonen von Stäbchenbipolarzellen rekonstruiert wurden, waren Platten oder kurze Bänder (Abb. BALB12), die eher schräg oder schief als senkrecht an der Zellmembran verankert waren (Abb. BALB13).

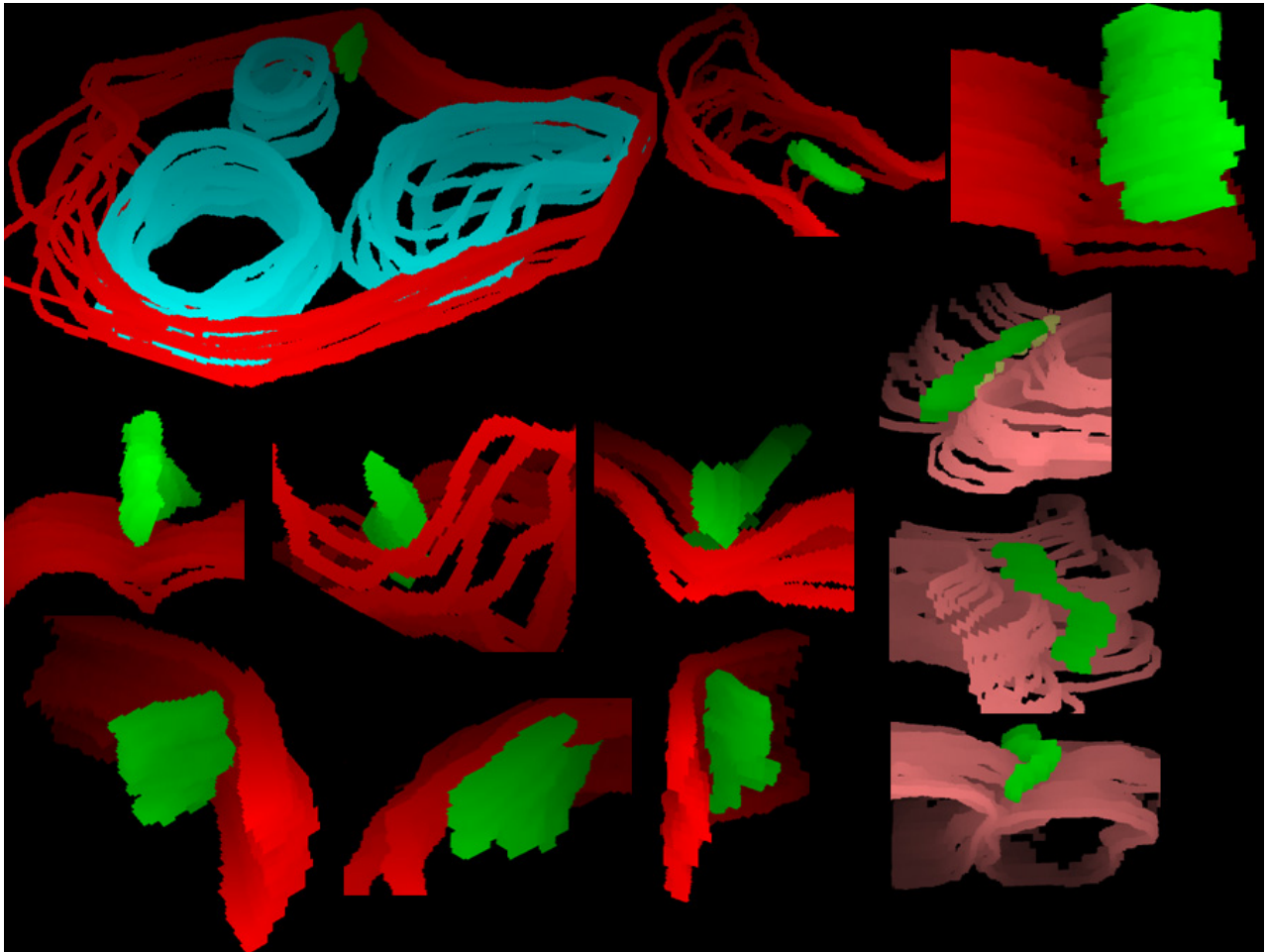


Abb. BALB13 Alle SK (grün) in den Axonen von Stäbchenbipolarzellen waren zumindest über kurze Distanz an der (hier rot markierten) Zellmembran verankert, einige standen nahezu senkrecht darauf, andere drehten sich im weiteren Verlauf zur Seite oder zogen gar, wie unten mittig zu sehen, in etwa parallel dazu. SK lagen meist an der präsynaptischen Seite gegenüber der Grenze zwischen einem Ganglienzelldendriten und dem Fortsatz einer amakrinen Zelle (beide postsynaptische Elemente rechts in rosa dargestellt). Eine Beziehung zu Mitochondrien (cyan) war nicht erkennbar.

5. Tötung um 22.00, d.h. 4 Stunden nach Licht aus

Bei der Rekonstruktion von 12 kompletten und einem inkompletten SK in 8 Stäbchenterminalen fanden sich folgende Morphologien der Organellen: 7 C-förmig gebogene Bänder mit leichter Krümmung, 2 Klumpen (maximaler Durchmesser ca. 150 nm), 2 rechteckige bis längliche Platten, eine V Form mit starker Krümmung und eine kleine Kugel (Durchmesser 90 nm). Nur an 3 der band- bzw. plattenförmigen SK fanden sich kleinere Auftreibungen, einmal paramedian und

am Ende (= 2) Auftreibungen, 1 C mit kleiner paramedianer Auftreibung und 1 C mit größerer paramedianer Auftreibung; ferner gab es leichte Drehungen bis 25 Grad (selten mehr; Abb. BALB14). Eine Synapse wies 3 morphologisch verschiedene SK (Abb. BALB15: C-artig gebogenes Band, Platte + Klumpen) auf, zwei andere zeigten zwei 2 SK (C + kleine Kugel bzw. C + längliche Platte). In zwei Bipolarzellfortsätzen der inneren plexiformen Schicht fanden sich wie bei den anderen Versuchsbedingungen auch kleine plattenförmige, an der Zellmembran verankerte SK.

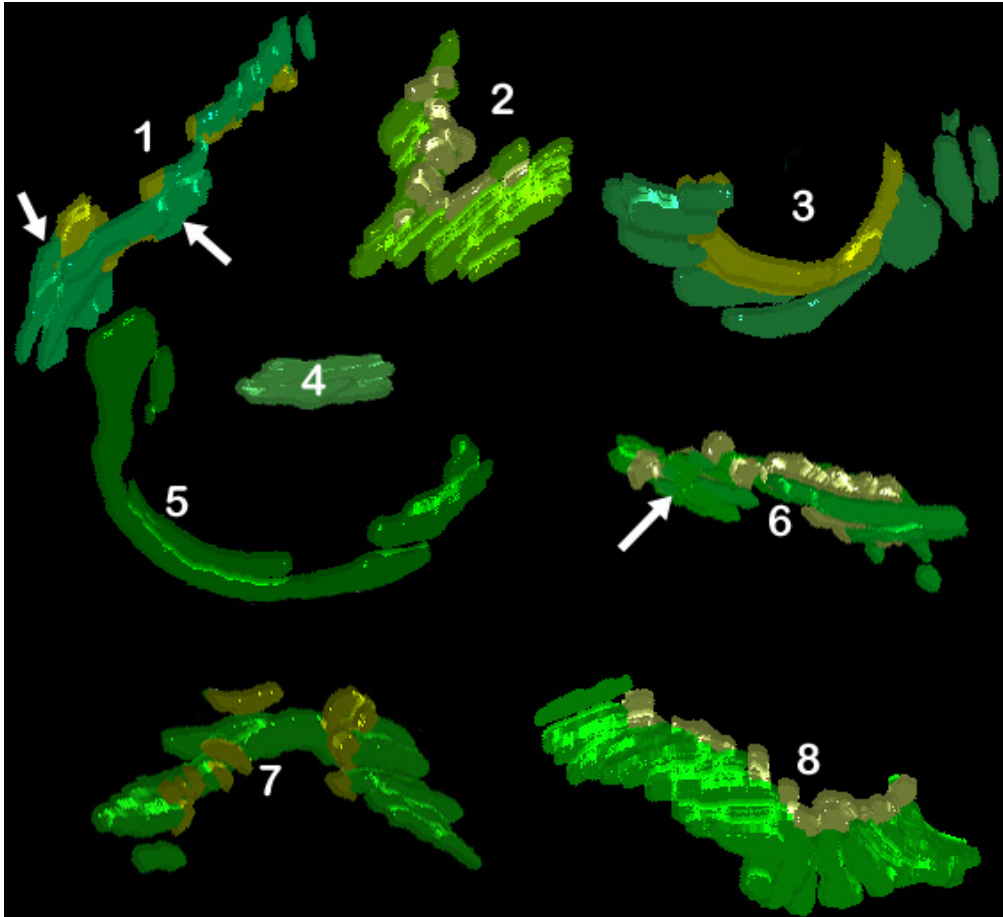


Abb. BALB14 Acht verschiedene band- oder plattenförmige SK (grün) einer um 22.00 getöteten BALB/c Maus, die an den 3 mit Pfeilen markierten Stellen Auftreibungen aufwiesen. Die dicke Endauftreibung von 1 war innen hohl, d.h. hatte einen kleinen zentralen Zytoplasmeeinschluß; 4 ist eine kleine längliche Platte (einige ads sind bräunlich dargestellt).

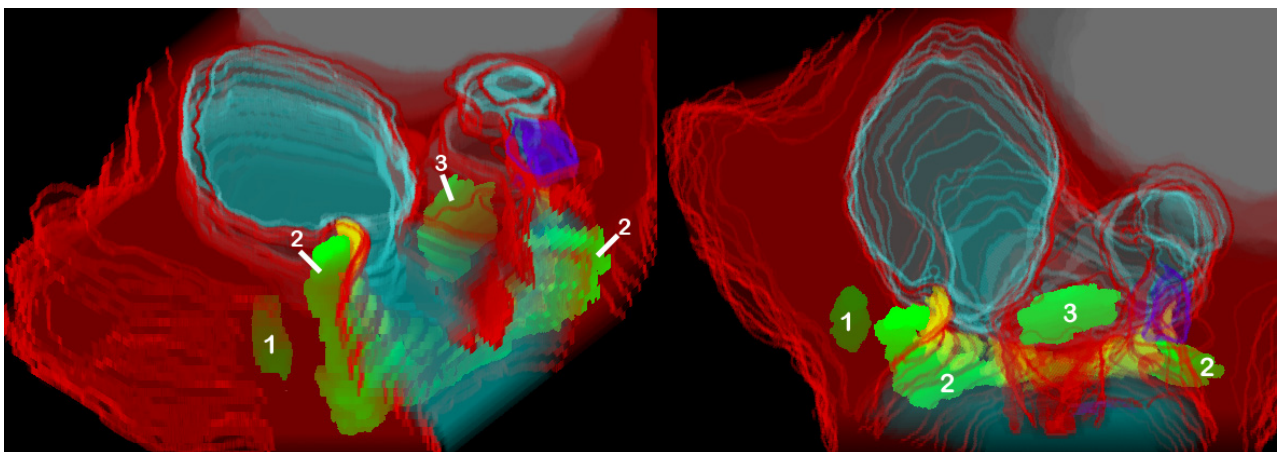


Abb. BALB15 Zwei verschiedene Ansichten einer Ribbonsynapse in einem Stäbchenterminal einer um 22.00 getöteten BALB/c Maus mit 3 morphologisch unterschiedlichen SK (grün): ein klumpiges SK (1) ohne Beziehung zur Zellmembran (rot), ein C-förmig gebogenes Band (2) und eine gerade rechteckige Platte (3); Horizontalzellfortsätze blau, Bipolarzellendrit violett, Zellkern grau.

3a24. Rekonstruktionen ektopischer synaptischer Körperchen bei Maus und Ratte

Im Zuge einer Kooperation mit Dr. Spiwoks-Becker wurden erstmals auch ektopische synaptische Körperchen (eSK) dreidimensional rekonstruiert (Spiwoks-Becker et al. 2007). Darunter versteht man SK, die sich nicht an den üblichen Lokalisationen, d.h. in Photorezeptorterminalen oder in Bipolarzellaxonen der Retina finden. Bei Ratten fanden sich eSK nur ca. 30 Min. vor Beginn der Dunkelphase unter verschiedenen Photoperioden (LD 4:20; LD 12:12; LD 20:4). Die folgenden Aussagen basieren auf meiner Analyse von 40 verschiedenen eSK auf genau orientiert übereinandergelagerten und größtenteils auch dreidimensional rekonstruierten Serienschritten. Ca. 2-5 % der Bipolarzellendriten zeigten eSK im Bereich von knapp unterhalb ihres Eintritts in

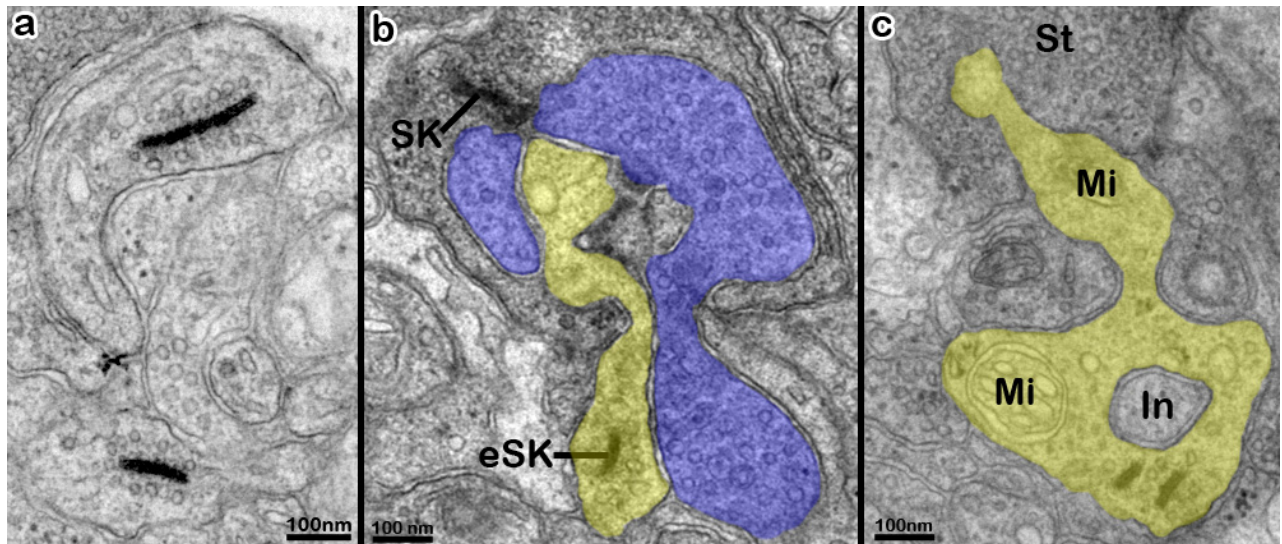


Abb. Ekt1 Ektopische synaptische Körperchen (eSK) in der Rattenretina: **a** 2 eSK in zwei nahe beieinander lokalisierten Kollateralen eines Stäbchenbipolarzellendriten; **b** die zentrale Lage in der Ribbonsynapse identifiziert den ein eSK-haltigen Zellfortsatz (gelb) eindeutig als Bipolarzellendriten; **c** zwei parallel zueinander gelegene eSK in einem gelb markierten Bipolarzellendriten, der auch 2 Mitochondrien (Mi) und eine Invagination (In) eines anderen Zellfortsatzes zeigt.

das Stäbchenterminal (Abb. Ekt1b) bis weiter davor in der äußeren plexiformen Schicht (Abb. Ekt2a, b). Eine Verfolgung dieser Fortsätze bis zum Abgang aus dem Perikaryon war aufgrund des weit nach lateral reichenden Verlaufs zwar unmöglich, aber da sich in über 50 Prozent der Fälle die Endigung im Zentrum von Stäbchenribbonsynapsen eindeutig erkennen ließ (Abb. Ekt1b) und sie in keinem Horizontalzellfortsatz erkennbar waren, ist sicher, daß eSK ausschließlich in invaginierenden ON-Stäbchenbipolarzellendriten lokalisiert sind. Gelegentlich lagen mehrere eSK in Kollateralen desselben Fortsatzes (Abb. Ekt1a), aber im Gegensatz zu den Befunden bei BALB/c Mäusen, nie in dem in Stäbchenternale invaginierten Bereich. Eine direkte Verbindung, d.h. Verankerung von eSK an der Zellmembran, wie es für SK in Stäbchen, Zapfen und meist auch in Bipolarzellaxonen typisch ist, war nie vorhanden. Allerdings fanden sich in über 20 Prozent der Fälle tubuläre Schläuche (Abb. Ekt2a), die von einer schmalen, der Zellmembran zugewandten Seite eines SK bis an diese heranreichten bzw. aus ihr ähnlich einer sehr langen, teils sogar verzweigten Caveole hervorgingen (Abb. Disk9, Ekt3; Animationen Ekt3.avi, Disk9.avi). Die Grundform der eSK war die einer leicht gebogenen Platte, deren Größe zwischen 100 x 50 bis zu 350 x 250 nm lag, durchschnittlich bei ca. 185 x 90 nm. Der Vesikelbesatz der eSK war etwas bis

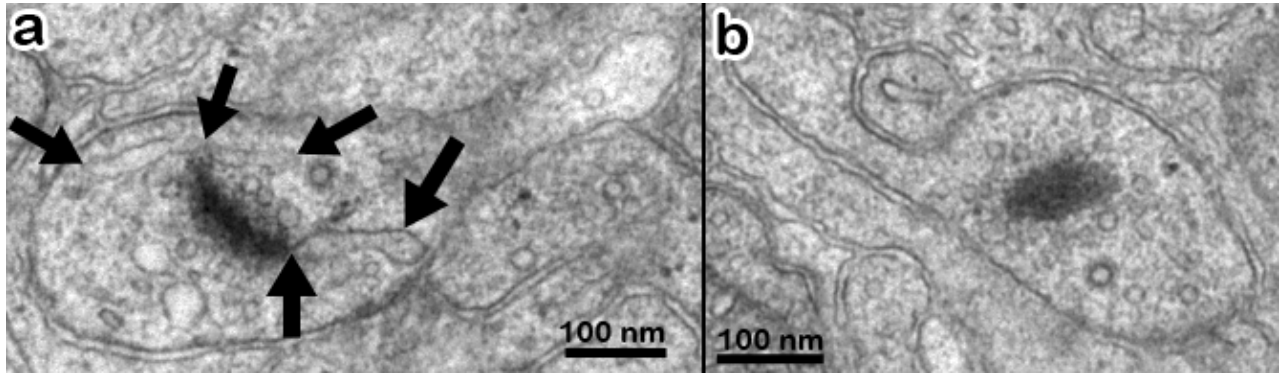


Abb. Ekt2 **a** Vermutlich aus konfluierenden Vesikeln entstandene Tubuli (Pfeile) die an ein ektopisches SK gebunden sind und rechts bis an die Zellmembran eines Bipolarzellendriten heranreichen; **b** Dieses sagittal getroffene eSK, welches auf den beiden Nachbarschnitten nicht mehr angeschnitten war, zeigt, daß die kleine Organelle die Form einer rundlich begrenzten Platte hat.

deutlich geringer als der der SK in den benachbarten Stäbchenterminalen. In einigen Fällen war der Anschnitt der Profile senkrecht, wobei sich der für SK typische pentalamelläre Aufbau erkennen ließ (z.B. Abb. Ekt1c) und die Dicke der Platten mit 35 nm vermessen wurde. Nur in wenigen Fällen erschienen die Profile wenig breiter (bis 45 nm). In drei Fällen lagen 2 eSK in unmittelbarer Nähe zueinander (< 500 nm entfernt) im selben Fortsatz, davon zweimal parallel zueinander (Abb. Ekt1c). Von insgesamt 40 auf orientierten Serienschnitten verfolgten und zum Teil rekonstruierten eSK waren 32 zentral im Fortsatz gelegen, 3 parazentral, eines verlief quer durch fast den gesamten Fortsatzdurchmesser und nur eines war sehr dicht an der Membran lokalisiert. In 7 Fällen waren Mikrotubuli weniger als 50 nm von einem eSK entfernt. In 6 Fällen waren auffällig große Vesikel mit Durchmessern über 200 nm mit einem eSK verknüpft und in 13 Fällen war ein dünner tubulärer Schlauch mit einem eSK verbunden, der wie vorangehend geschildert, in 6 Fällen eine caveoläre Verbindung zur Zellmembran hatte. In 11 Fällen ließ sich der eSK-haltige Fortsatz ins invaginierte Zentrum einer Stäbchenribbonsynapse verfolgen. In 11 weiteren Fällen war nur ein lateraler Kontakt am Stäbchenterminal vorhanden. In 10 Fällen war beides nachweisbar. Dreimal waren Kollateralen eines eSK-aufweisenden Dendriten zu 2 oder mehreren verschiedenen Stäbchenendkolben zu beobachten. Zweimal fand sich eine Invagination eines anderen Zellfortsatzes in einem eSR-haltigen Bipolarzellendriten.

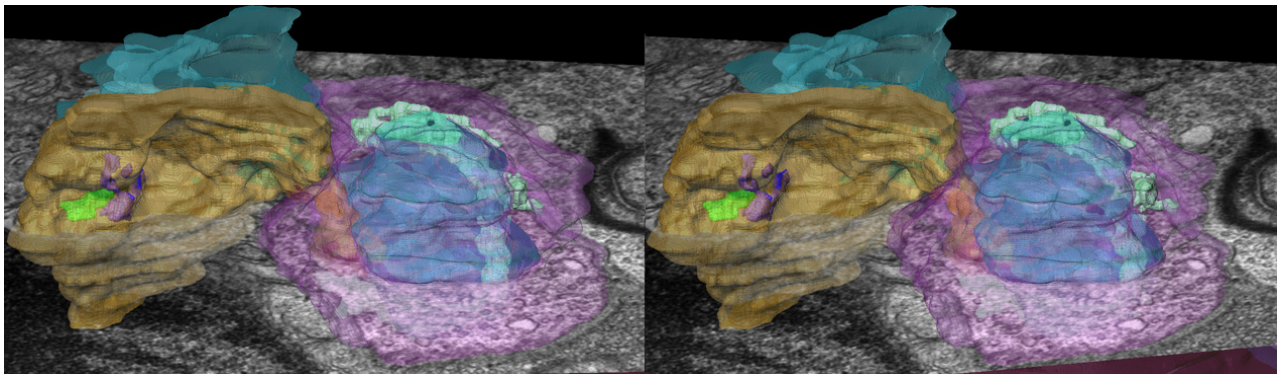


Abb. Ekt3 plattenförmiges eSK (grün) in einem Bipolarzellendriten (orange) der Rattenretina, der in das Zentrum einer Ribbonsynapse eines Stäbchenterminals (rosa) eintritt. Neben 2 blau markierten Horizontalzellfortsätzen sind das SK des Stäbchens (hellgrün) und verzweigte Tubuli erkennbar (violett), die an einer Stelle direkt mit dem eSK verknüpft sind (Animation dieser Rekonstruktion: Ekt3.avi).

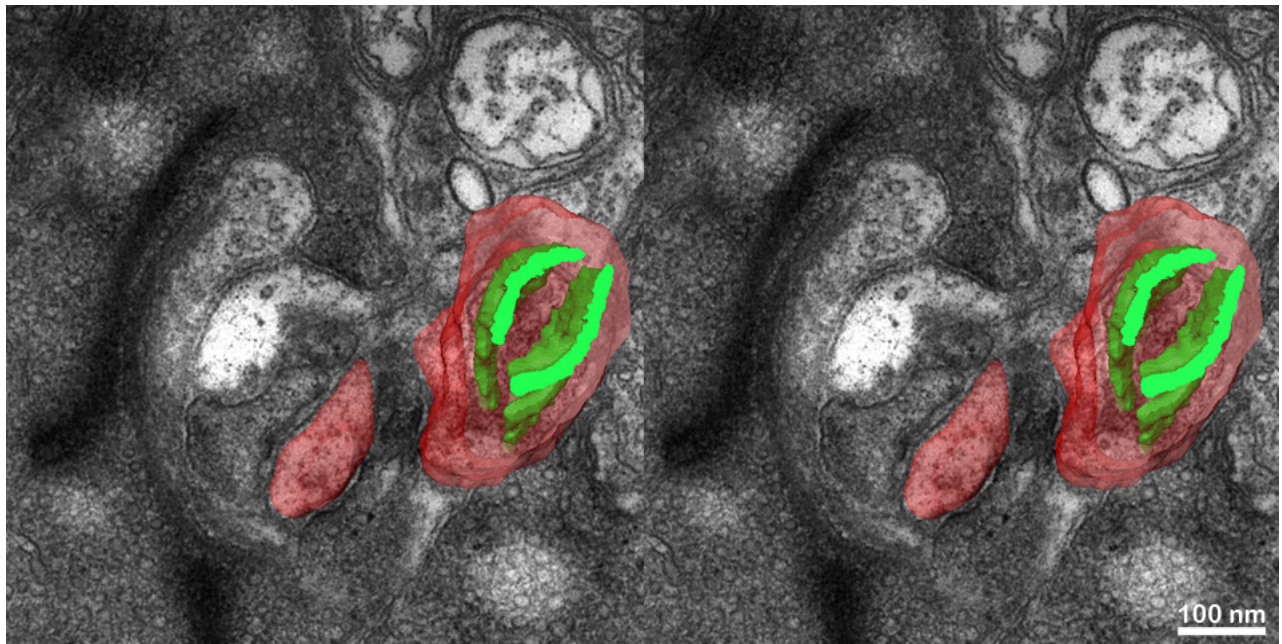


Abb. Ekt4 Stäbchenterminal einer BALB/c Maus mit 2 ungefähr spiegelbildlichen eSK (grün), die leicht gebogene C-förmige Platten sind und sich in einem Stäbchenbipolarzellendriten (rot) befinden, der (unterhalb der gezeigten Schnittebene) in ein Stäbchenterminal hineinzieht (Animation dieser Rekonstruktion: Ekt4.avi).

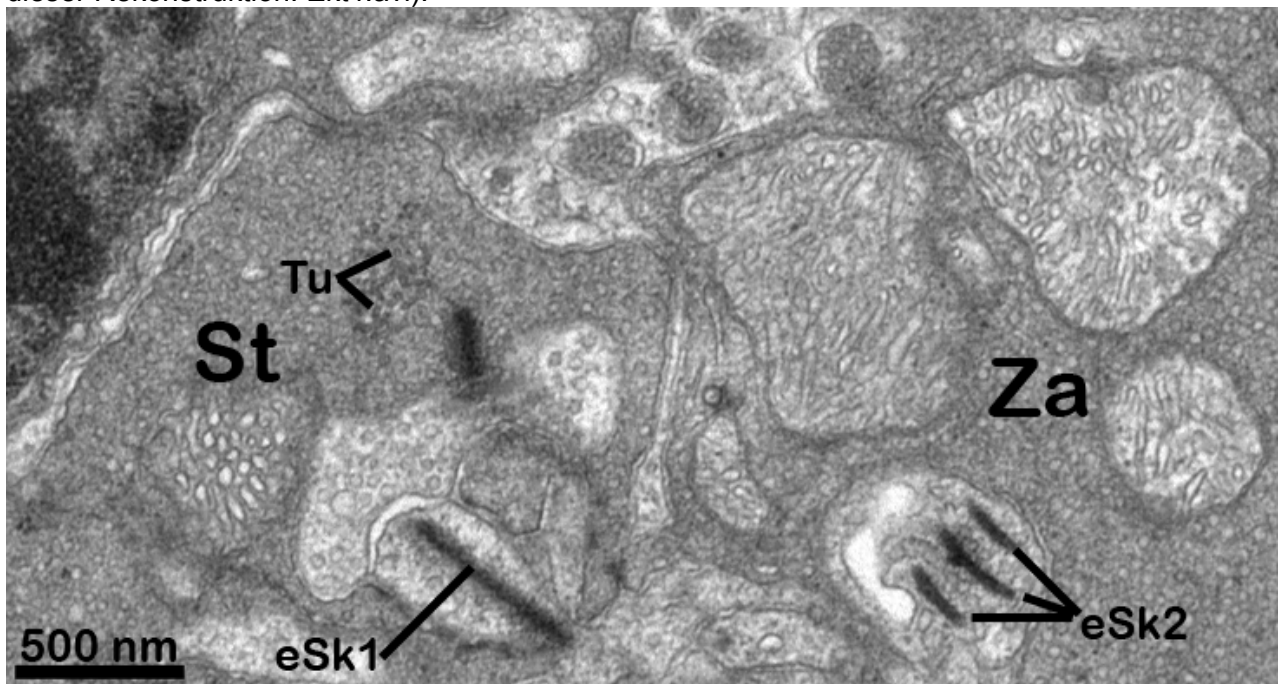


Abb. Ekt5 Stäbchenterminal (St; BALB/c Maus) mit einem großen ektopischen SK (eSK1) welches sich im Bereich der Invagination der Ribbonsynapse zeigt. In diesem ungewöhnlichen Schnitt ist ferner ein Feld von Vesikeln zu erkennen, die zu kleinen Tubuli (Tu) konfluieren. Außerdem zeigt sich ein mit 3 parallel stehenden Profilen ektopischer SK (eSK2) ausgestatteter invaginierter Dendrit einer Zapfenbipolarzelle, der schon im Bereich der Invagination in sein zugehöriges Zapfenterminal (Za) angeschnitten ist.

Bei BALB/c Mäusen fanden sich bei seit Geburt 6 Wochen unter Dauerdunkelheit gehaltenen Tieren auch eSK. Generell ähnelten sie in ihrer Form (gebogene Platten, selten 2 oder mehrere in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander, Abb. BALB5, Ekt4) denen der Ratte, waren ebenfalls nie membranverankert und lagen üblicherweise im zentralen Bereich von Bipolarzellendriten. Im

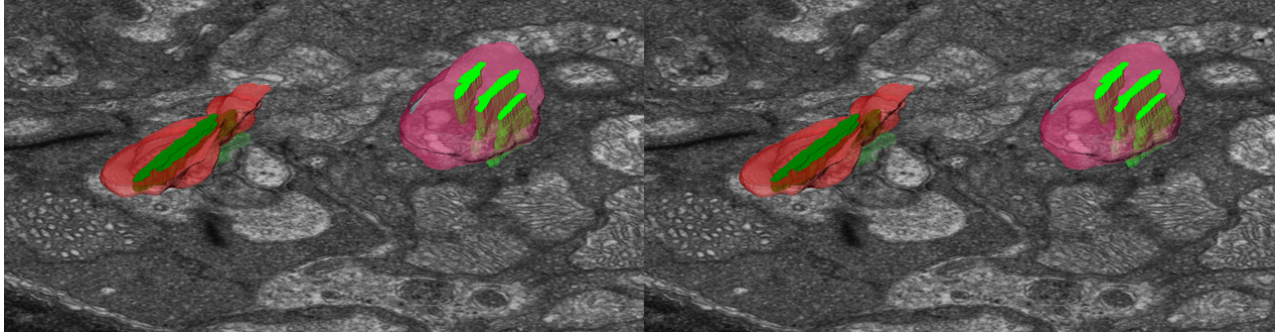


Abb. Ekt6 Stereobild der 3D-Rekonstruktion der in Abb. Ekt5 gezeigten Ribbonsynapsen. Links Stäbchenbipolarzeldendrit (rot) mit einem großen eSK (dunkelgrün) im invaginierten Bereich, rechts Zapfenterminal mit einem Zapfenbipolarzeldendriten (rosa), der 3 parallel zueinander stehende plattenförmige eSK (hellgrün) im invaginierten Bereich enthält (Animation dieser Rekonstruktion: Ekt6.avi).

Gegensatz zu den Ratten Befunden waren einige eSK auch im invaginierten Bereich von Ribbonsynapsen zu finden (Abb. Ekt5, 6; Animation Ekt6.avi) und einige waren innen hohle klumpenförmige Organellen (Abb. Ekt7; Animationen Ekt7.avi & Ekt7a.avi). Ferner traten hier selten sogar in Zapfenbipolarzeldendriten eSK mit bis zu 3 parallel stehenden Einzelplatten (Abb. Ekt5-7) auf.

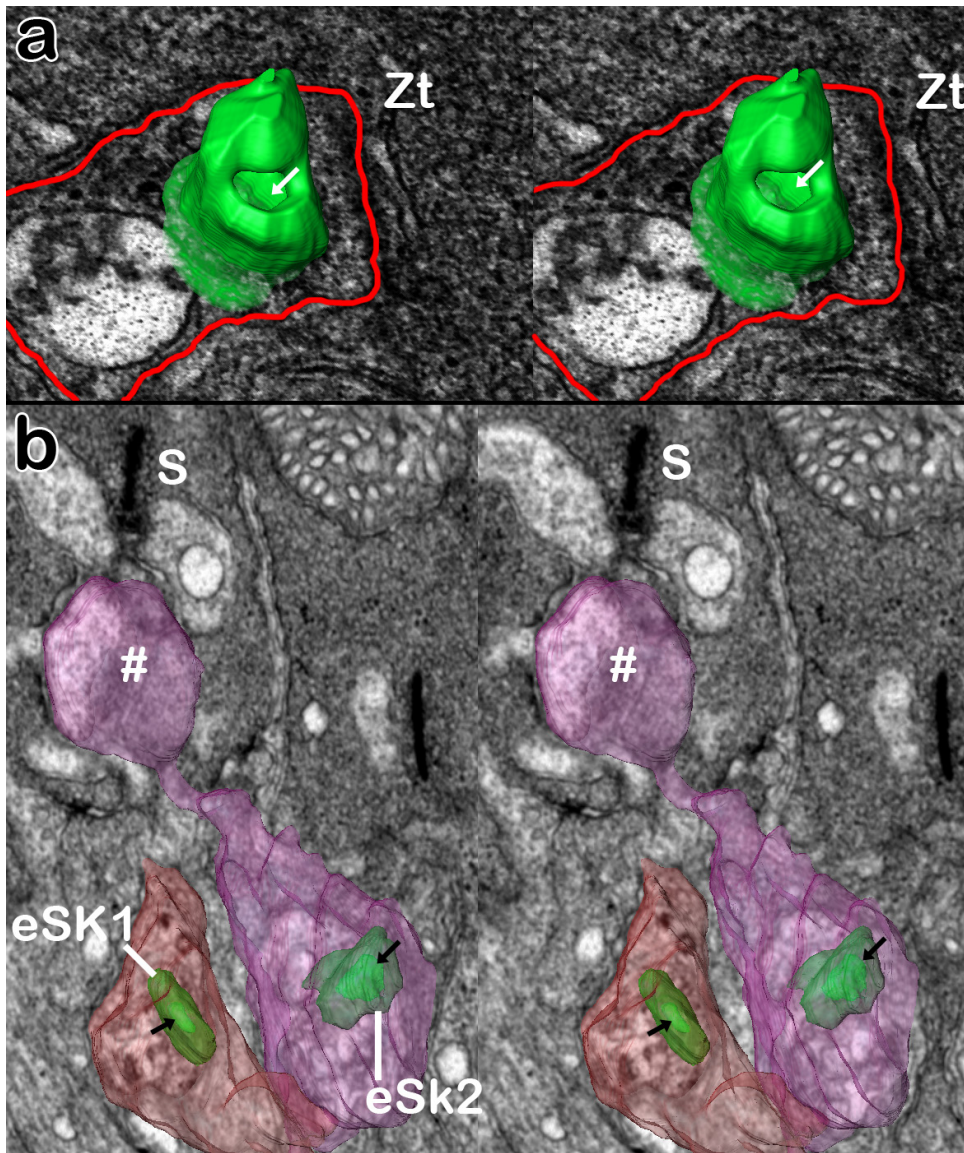


Abb. Ekt7 Klumpige eSK: **a** mit offenen Hohlraum im Inneren (weißer Pfeil) in einer Zapfenbipolarzelle (rot umrandet) am Beginn der Invagination in ein Zapfenterminal (Zt) und in **b** in Stäbchenbipolarzeldendriten. Die inneren Hohlräume (schwarze Pfeile) sind bei eSK1 geschlossen und bei eSK2 nach außen offen. Der Stäbchenendkolben (S) in den der zu eSK2 gehörige Dendrit eintritt, um sich terminal zu erweitern (#), ist ebenfalls dargestellt

(Animationen dieser Stereorekonstruktionen: Ekt7.avi & Ekt7a.avi)

Synaptische Körperchen in den in der inneren plexiformen Schicht (IPS) lokalisierten Axonen von Stäbchen- bzw. Zapfenbipolarzellen wurden zum Vergleich mit den eSK der Dendriten solcher Zellen bei unter LD 20:4 gehaltenen Ratten rekonstruiert. Zapfenbipolarzellaxone zeigen nur im Bereich der oberen IPS einige wenige, sehr kleine stets plattenförmige SK, die ca. 150 x 80 x 35 nm groß und wenig oder gar nicht verbogen oder verdreht waren (Abb. IPS1, 8; Animation IPS3.avi). Sie waren, wie auch die meisten SK von Stäbchenbipolarzellen, an einer leistenförmigen Plaque an der Zellmembran verankert. In Stäbchenbipolarzellen erschienen rekonstruierte SK deutlich größer, teils verdreht oder gebogen oder auch bandförmig. Einige lagen zum Teil in Feldern beieinander (Abb. 10; IPS2, 9; Animationen 10.avi, IPS2.avi), jedoch nicht so eng, wie dies z.B. in der Meerschweinchenzirbeldrüse der Fall war. Die Mehrzahl waren aber einzeln liegende platten- bis bandförmige Organellen, deren Größe geringer war als die von SK in Photorezeptorterminals.

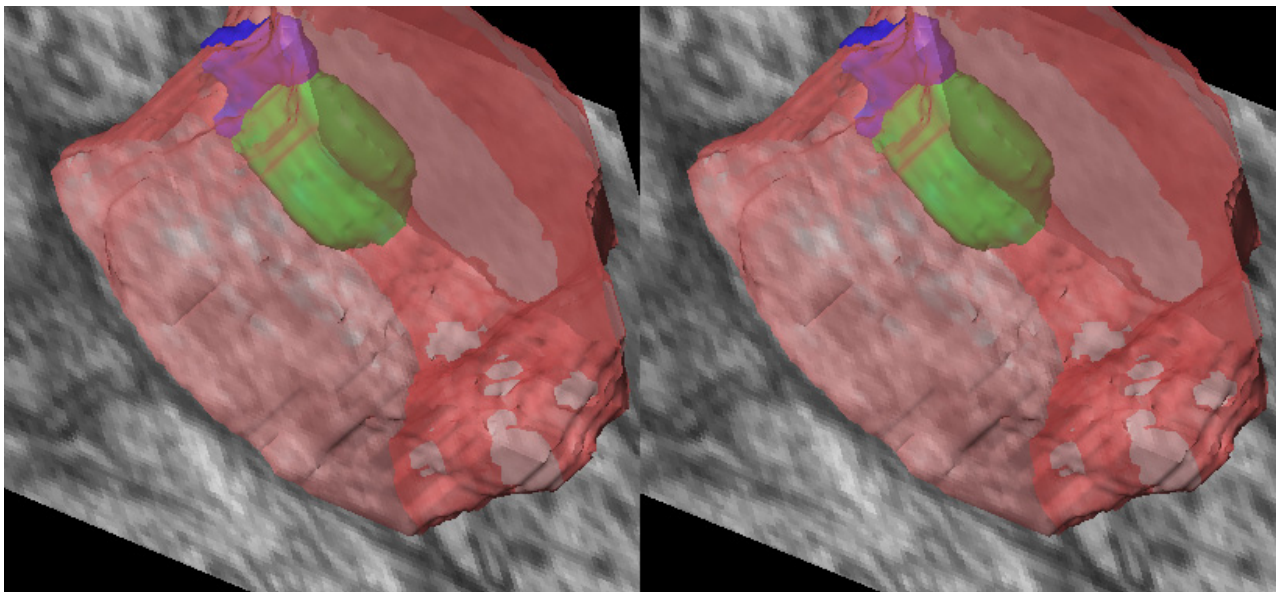


Abb. IPS1 Ca. 200 x 100 x 35 nm kleines plattenförmiges SK (grün) eines Zapfenbipolarzellaxons (rot) in der oberen IPS einer SD-Ratte, welches an einem leistenförmigen Plaque (blau) der Zellmembran verankert ist (vgl. auch Abb. 8; (Animation dieser Rekonstruktion: IPS1.avi).

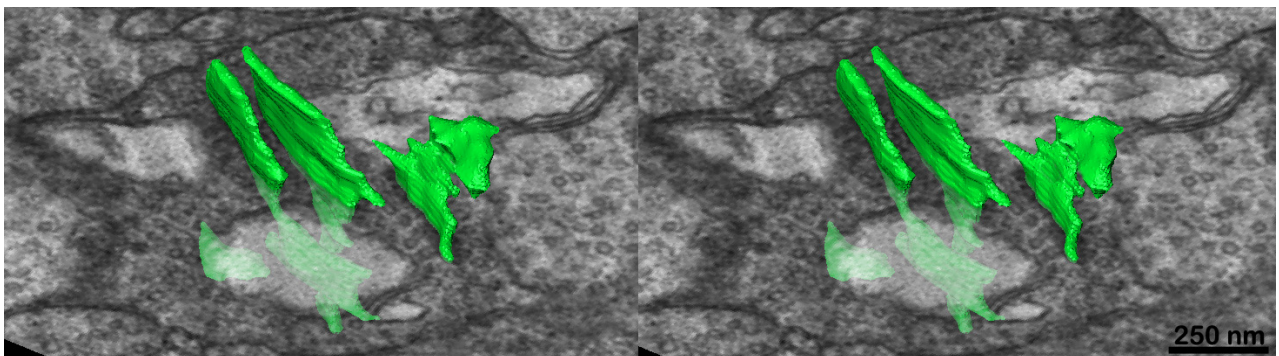


Abb. IPS2 Mehrere in einem Feld gelegene plattenförmige SK (grün) mit zum Teil bizarren Rändern in einem Stäbchenbipolarzellaxon der unteren IPS. Alle SK waren an der Zellmembran verankert (nicht dargestellt; vgl. auch Abb. 10; und Animationen 10.avi & IPS2.avi).

3a25. Rekonstruktionen synaptischer Körperchen beim Menschen

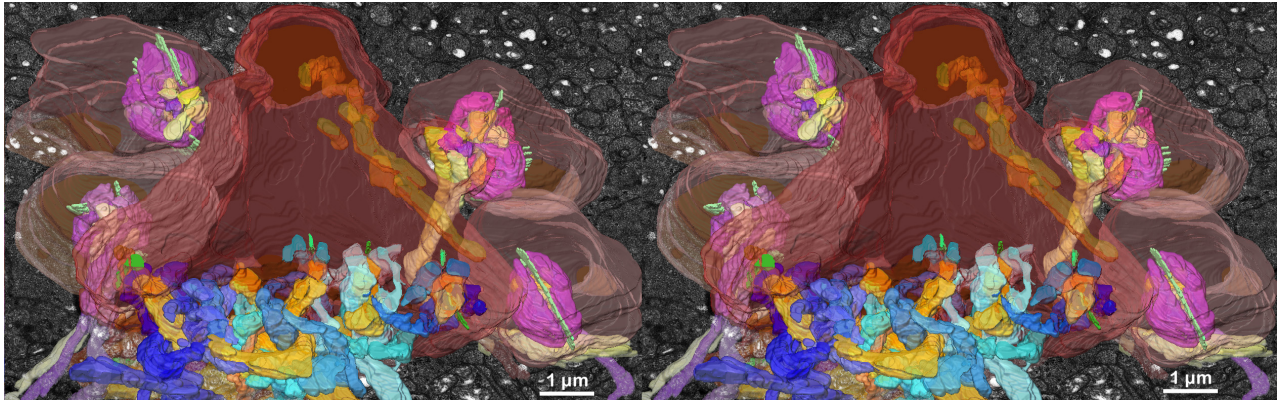


Abb. Homo1 Stereobild aus der äußeren plexiformen Schicht einer menschlichen Retina mit rekonstruierten Terminalen der ersten Neuronen der Sehbahn. Während die Stäbchenterminals mit ihren Ribbonsynapsen (lateral) vollständig im Datensatz enthalten sind, ist nur ein Teil des deutlich größeren Zapfenpedikels in der Mitte zu erkennen (Farbcodierungen siehe Abb. Homo3). Interessanterweise sind alle im Zapfenpedikel enthaltenen Mitochondrien (gelb markiert) nur in einem schmalen Bereich, rechts nahe dessen Außenmembran lokalisiert (Animationen dieser Rekonstruktion: Homo1.avi & 01.avi).

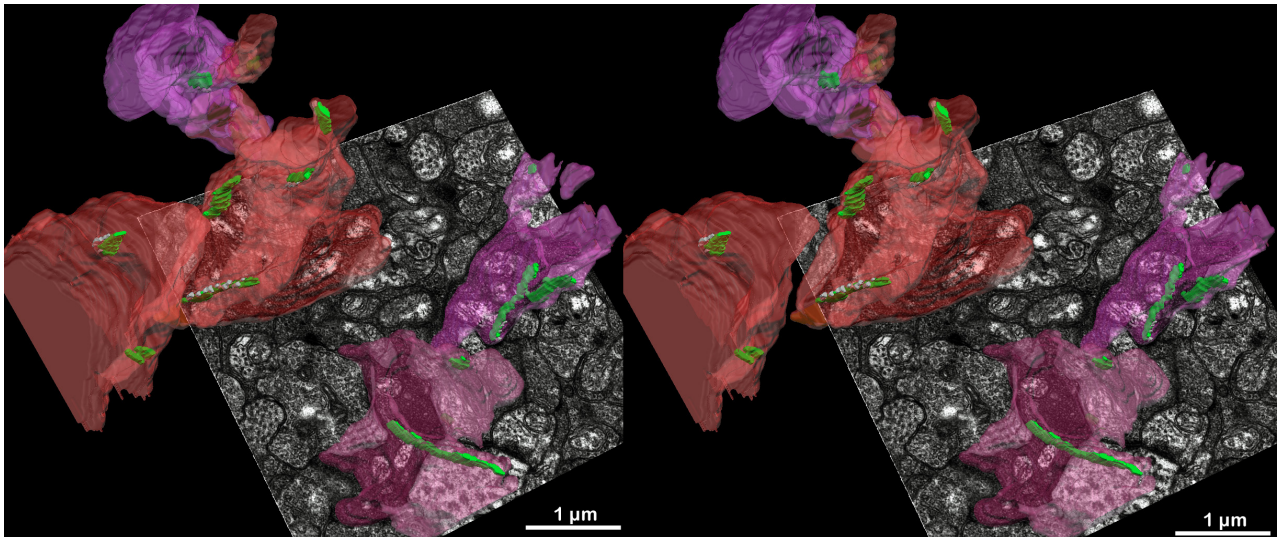


Abb. Homo2 Stereobild von rekonstruierten Axonen (rötlich bis violett) von Stäbchenbipolarzellen in der inneren plexiformen Schicht einer menschlichen Retina mit synaptischen Körperchen (grün), die zum Teil an einem grau dargestellten Membranplaque befestigt waren (Animation dieser Rekonstruktion: Homo2.avi).

Untersucht wurden Ribbonsynapsen in der äußeren (Abb. Homo1, 3-19; Animationen 01.avi, Homo1.avi) und inneren plexiformen Schicht (Abb. Homo2, 20-24; Animation Homo2.avi) von nicht zentralen Stücken der Retina, die in zwei Fällen von Multiorganspendern stammten und in einem Fall direkt nach der E nukleation eines Augapfels gewonnen wurden (siehe Material 2a: Seite 15). In den ersten beiden Fällen waren die elektronendichten synaptischen Körperchen zwar noch erkennbar, aber die postsynaptischen Elemente und die Mitochondrien der Stäbchen und Zapfenterminals wie auch der Bipolarzellfortsätze erschienen stark aufgebläht und zeigten kaum noch Innenstrukturen, zudem fanden sich viele Löcher im Gewebe, deshalb wurden die hierbei gewonnenen Gewebsblöcke nicht für Rekonstruktionen, sondern nur zum Vergleich verwendet. Im Gegensatz dazu war die Gewebserhaltung des intraoperativ gewonnenen Materials sehr gut. Die Rekonstruktionen erfolgten unter Verwendung der in Abb. Homo3 dargestellten Farbcodierungen.

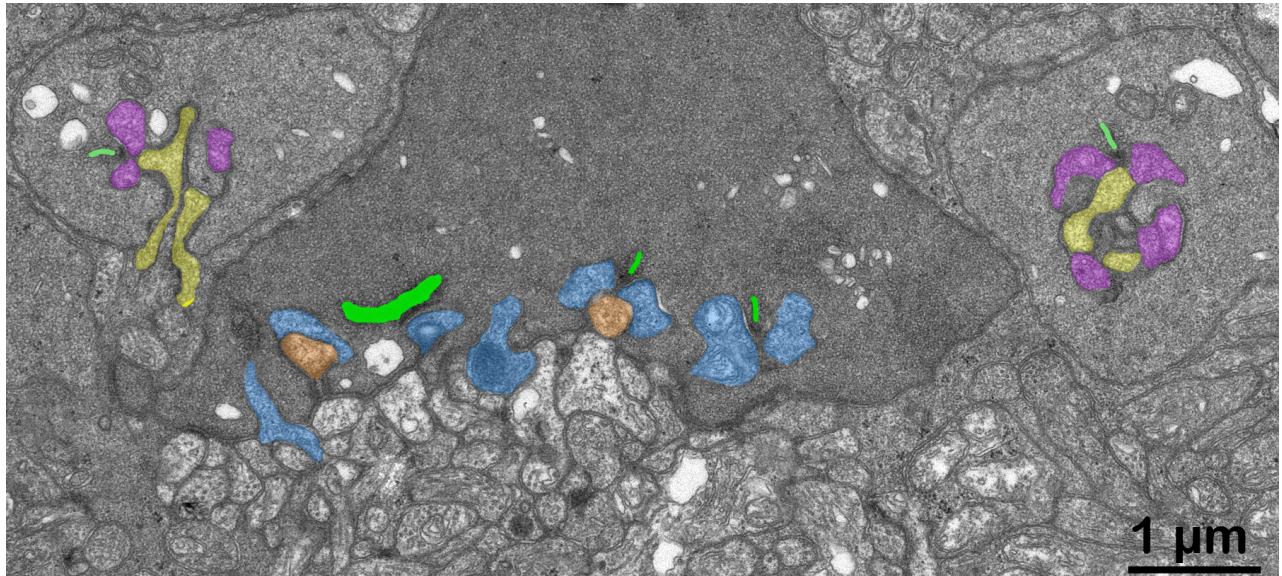


Abb. Homo3 Schnitt durch die menschliche Retina im Bereich der oberen äußeren plexiformen Schicht mit einem Zapfenterminal (medial) und 2 Stäbchenterminalen (lateral) mit den Farbcodierungen der prä- und postsynaptischen Elemente, die in den Rekonstruktionen verwendet wurden:

Stäbchen: ■ = synaptische Körperchen (SK); ■ = arciform density (ad);
■ = Horizontalzellfortsätze (ho); ■ = Bipolarzellendriten (bi);
Zapfen: ■ = SK; ■ = ad; ■ = ho; ■ = bi.

3a251 Synaptische Körperchen in Stäbchen

In 6 rekonstruierten kompletten Stäbchenterminalen lagen SK im Bereich von Protrusionen der präsynaptischen Zellmembran in die zwischen 2 Horizontalzellendauftreibungen entstehende Rinne hinein. Die insgesamt 1-3 SK waren von der Grundform her bandförmig und folgten dem

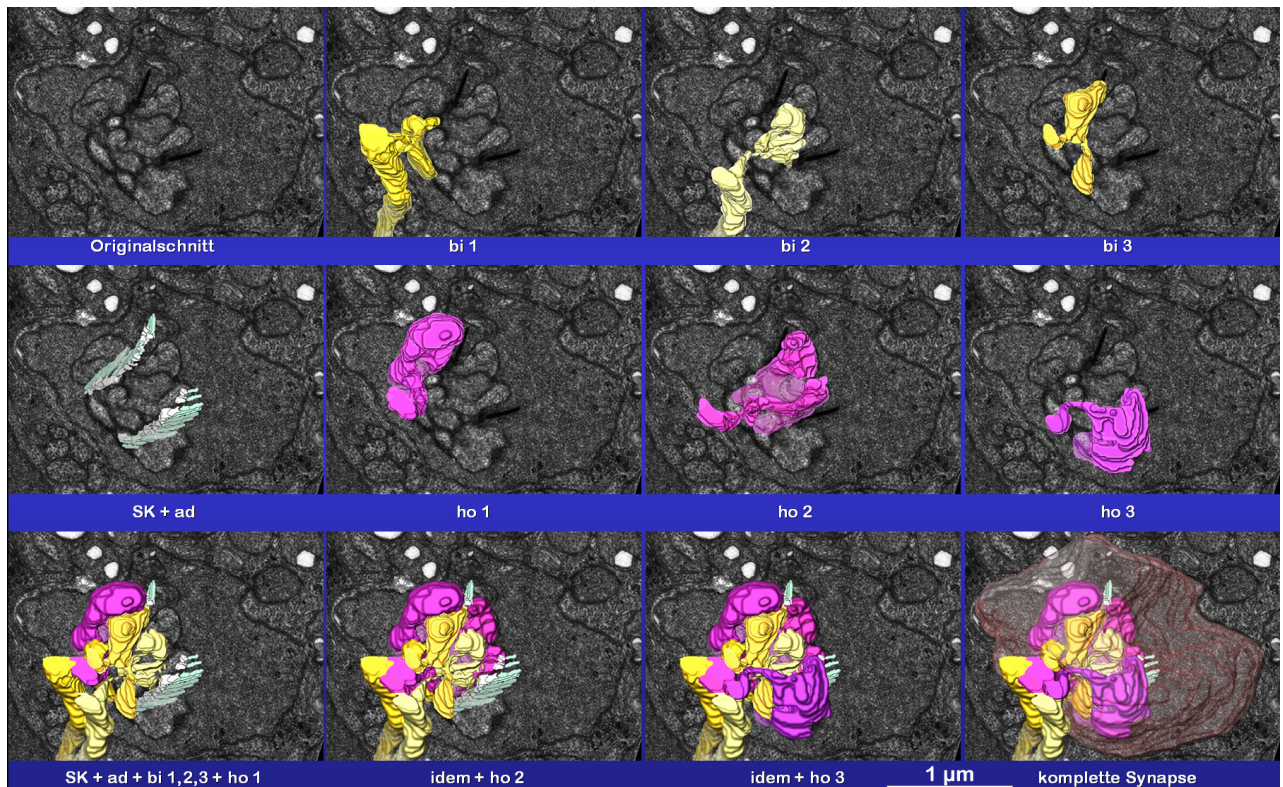


Abb. Homo4 Darstellung der Komponenten der Ribbonsynapse eines Stäbchenterminals mit 2 synaptischen Körperchen (SK), die über ihre arciform densities (ad) an der präsynaptischen Membran verankert sind, 3 verschiedenen, im Inneren gelegenen, verzweigten Bipolarzellendriten (bi) und 3 außen angelagerten Horizontalzellfortsätzen (ho). Die Animation Homo4.avi zeigt die Komponenten dieser Synapse noch deutlicher.

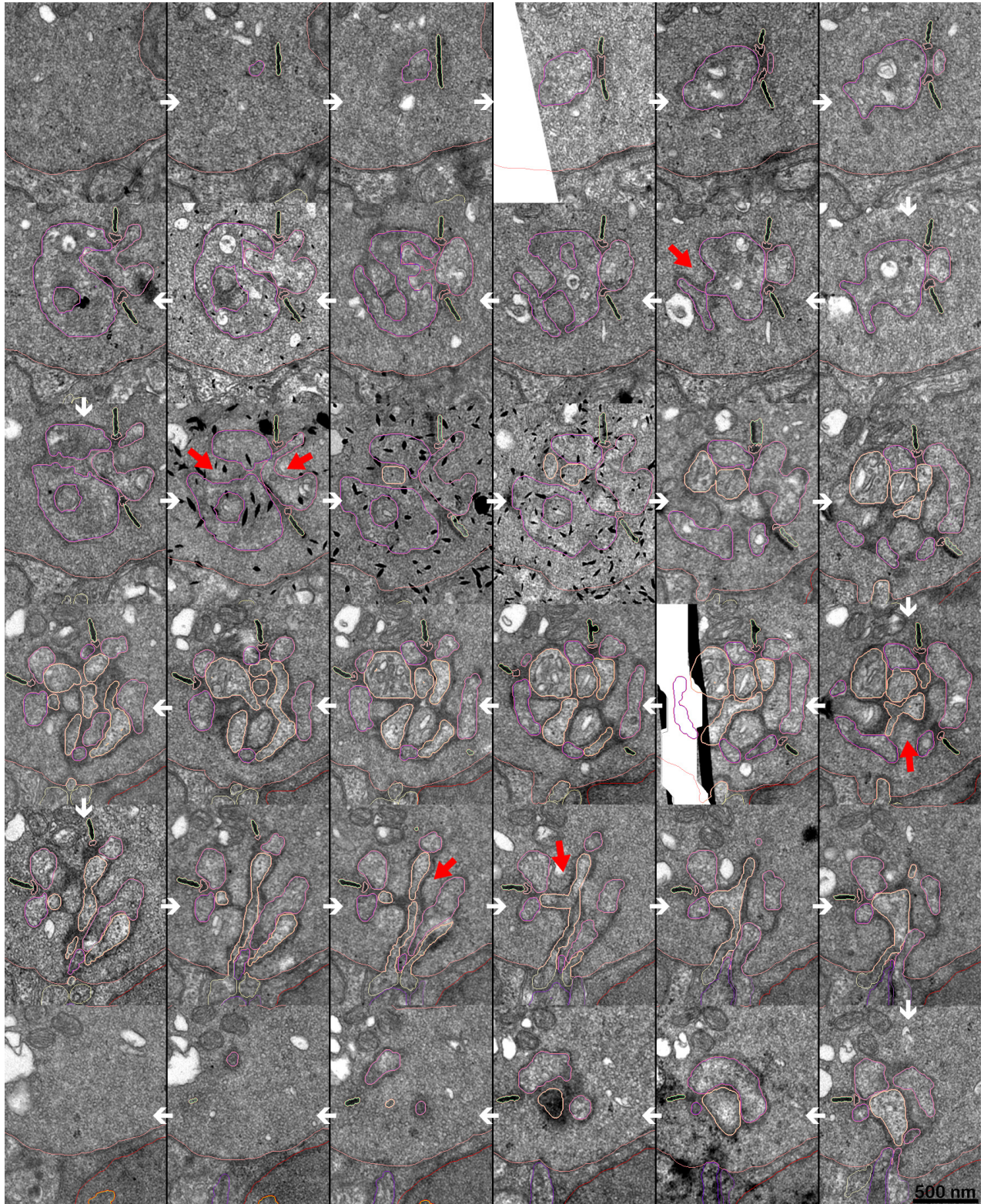


Abb. Homo5 Original Serienschritte durch ein komplettes Stäbchenterminal mit Markierung der Profile von SK, ad, der mehr zentral gelegenen Bipolarzeldendriten und eher außen lokalisierten Horizontalzellfortsätze. An vielen Stellen lassen sich in den Synapsenkomplex reichende, kurze, teils verzweigte, fingerförmige Fortsätze des Stäbchens selbst erkennen (einige durch rote Pfeile markiert; weiße Pfeile verdeutlichen die Schnittfolge; übrige Farben s. Abb. Homo3; Animation dieser Serienschritte: Homo5.avi).

Verlauf der Membran über einige hundert Nanometer, da sie in ihrem mittleren Bereich an jeweils einer eigenen bogenförmigen Verdichtung (arciform density; ad) an dieser verankert waren. Über feine Proteinärmchen waren meist einige hundert Neurotransmittervesikel am elektronendichten Material der Organellen befestigt. Ähnliche feine Proteinbrücken sorgten auch für die Anbindung

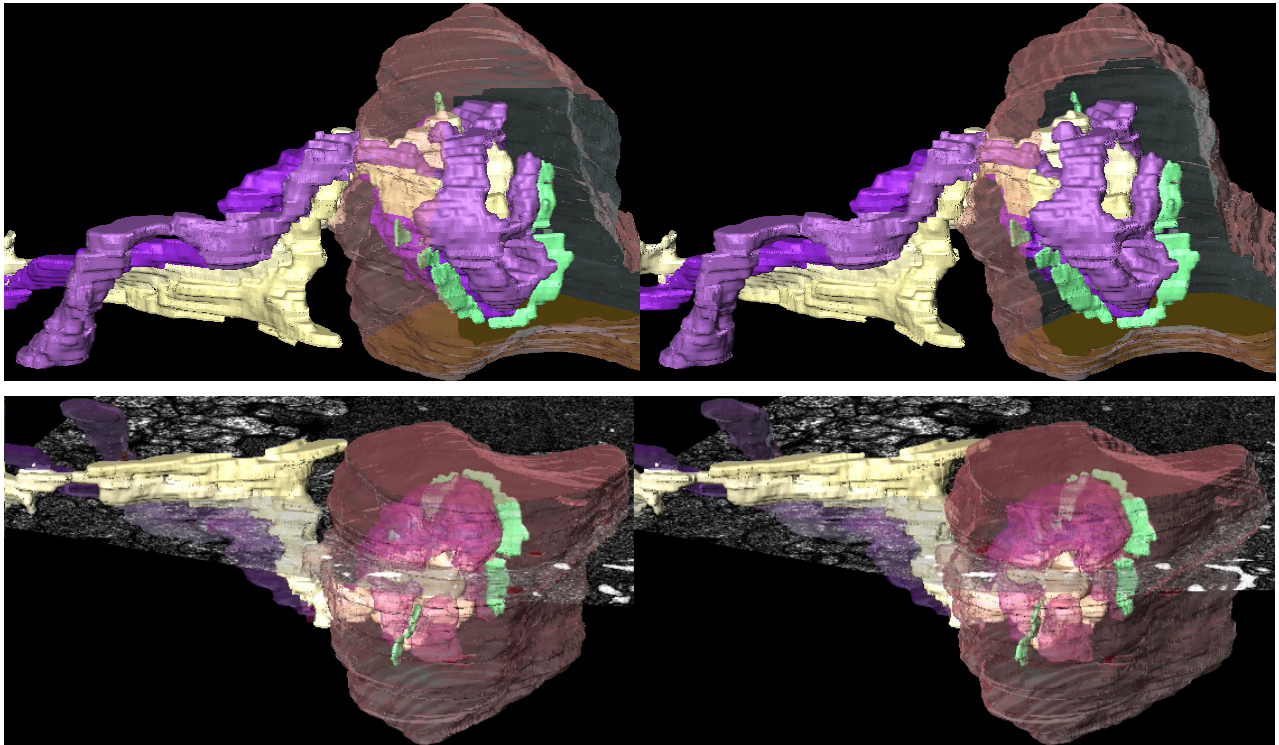


Abb. Homo6 Diese Ribbonsynapse eines Stäbchens enthält 2 synaptische Körperchen (grün), die beide C-artig gebogene Bänder sind, 2 Horizontalzellfortsätze (violett) und 2 zentral gelegene Bipolarzellendriten (gelb), die an einer dünnen "Pore" in das Terminal (rot/grau markiert) eintreten (Animation dieser Rekonstruktion: Homo6.avi).

der SK an die elektronendichten Plaques (ad) an der Zellmembran. Wie Abb. Homo4-10, Disk3 und die zugehörigen Animationen zeigen, entstehen die Stäbchenribbonsynapsen durch meist über 2,5 μm tiefe Einstülpungen der postsynaptischen Elemente. Diese treten an einem dünnen Hilus mit nur ca. 200 nm Durchmesser in das Stäbchenterminal ein und verzweigen sich dann unregelmäßig. Hierbei kommen die 1-4 Bipolarzellendriten im Zentrum der komplexen Synapse zu liegen, während sich die 1 bis 3 Horizontalzellfortsätze außen herum anlagern (Abb. Homo4; Animation Homo4.avi). Zusätzlich verknäulen sich kurze fingerförmige Ausstülpungen der präsynaptischen Membran mit den invaginierten Elementen, wie die Serienschritte in Abb. Homo5 bzw. Animation Homo5.avi zeigen. Die SK liegen stets außen und werden beidseits lateral von

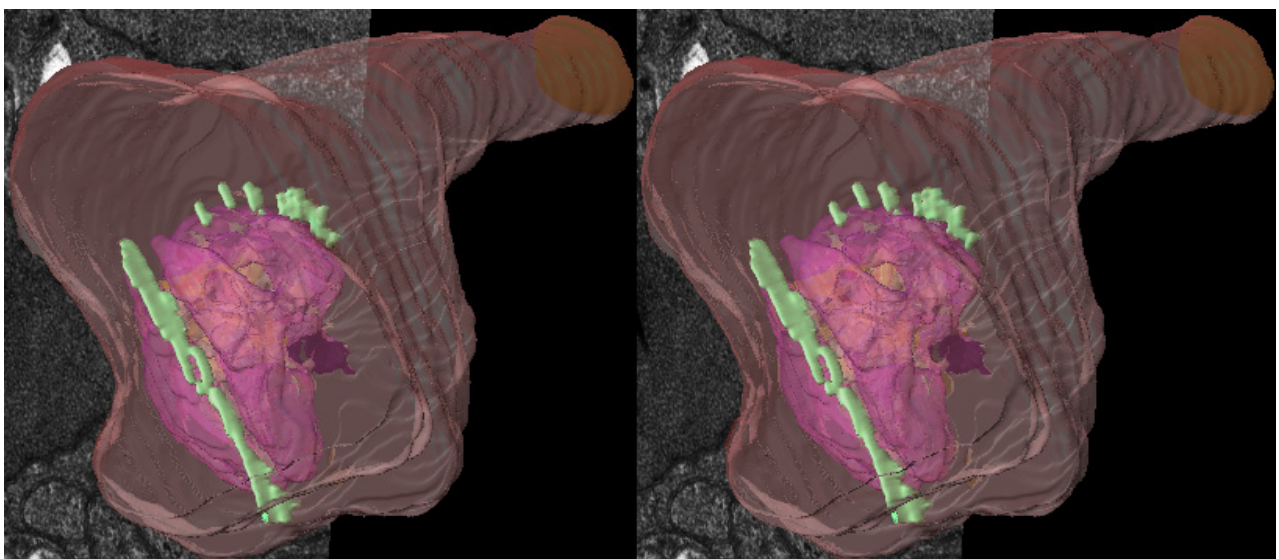


Abb. Homo7 Stäbchenterminal mit 2 SK, einem Horizontalzellfortsatz und 3 zentralen Bipolarzellendriten (Animation dieser Rekonstruktion: Homo7.avi).

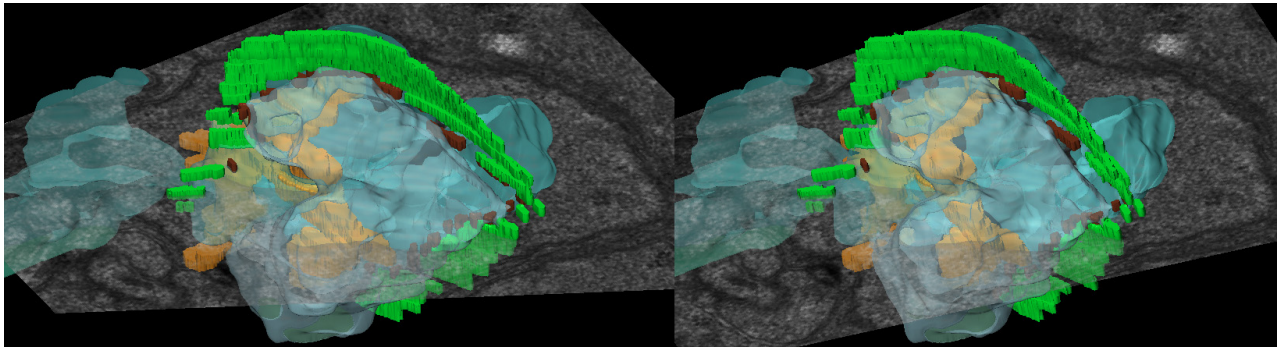


Abb. Homo8 Eine Stäbchenribbonsynapse mit einem sehr langen gebogenen C-förmigen synaptischen Körperchen, welches zudem leicht verdreht ist. An der hier gezeigten Synapse sind 3 Horizontalzellfortsätze, aber nur 1 Bipolarzellendrit beteiligt (Animation dieser Rekonstruktion: 5.avi & Homo8.avi).

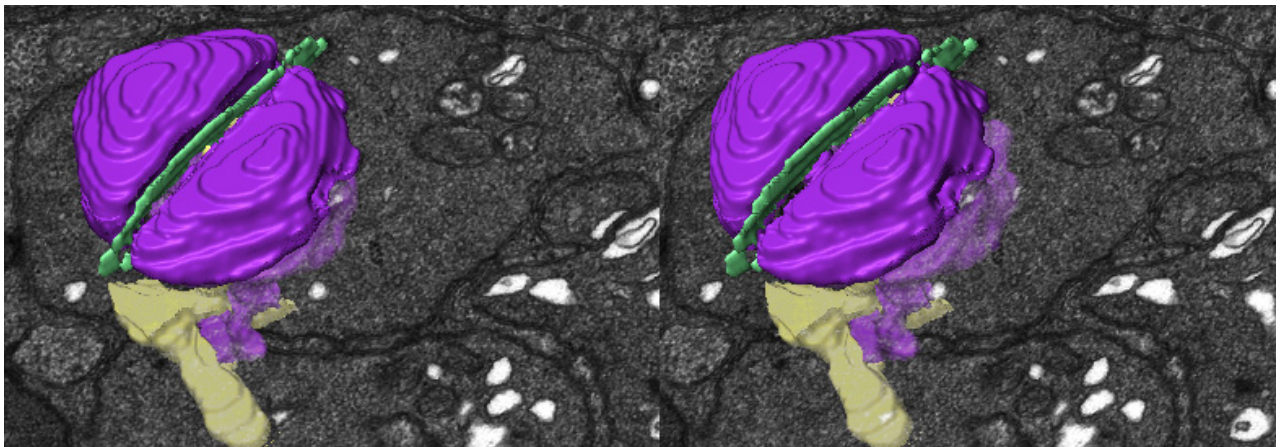


Abb. Homo9 Bei dieser von "oben" betrachteten Ribbonsynapse erkennt man lateral eines großen SK mit C-Verbiegung zwei terminal aufgetriebene Endigungen, die von ein- und demselben Horizontalzellfortsatz stammen. Ein weiteres SK, welches in ähnlicher Weise praktisch in ein Horizontalzellbutton eingesenkt ist, kann in dieser Ansicht nicht erkannt werden; ebenso verhält es sich mit den 3 zentralen Bipolarzellendriten dieser Synapse, die auch in Abb. Disk3a dargestellt ist (Animation dieser Rekonstruktion: Homo9.avi).

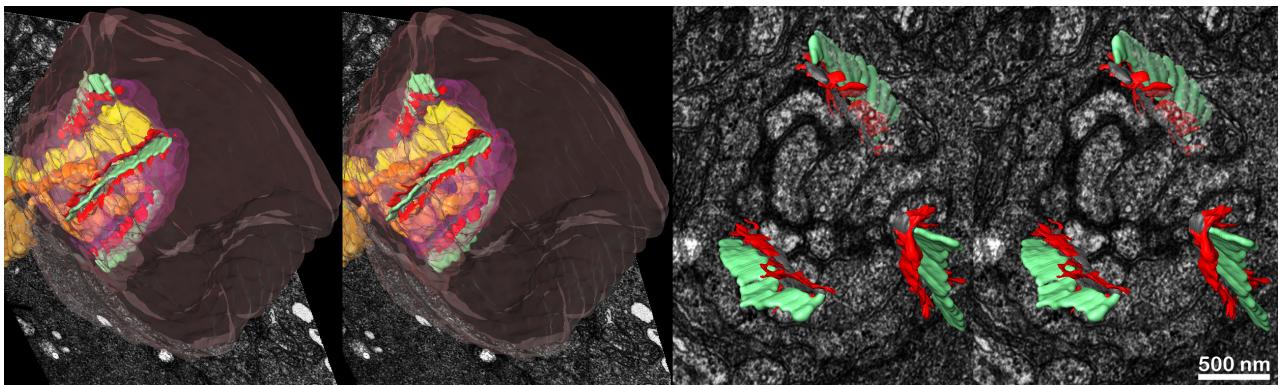


Abb. Homo10 In dieser Stäbchensynapse finden sich neben 3 kürzeren, bandförmigen SK 3 (grün) dazwischen liegende Horizontalzellprozesse (violett) und 4 zentrale Bipolarzellendriten (gelb - orange), deren Verdünnung im Bereich des Hilus links gut erkennbar ist. Außerdem ist hier die aktive Zone in Rot mit dargestellt. Rechts sind die 3 SK mit ihren ads (grau) und ihren aktiven Zonen, die die Form von gebogenen Rinnen haben, in anderem Blickwinkel visualisiert. (Animationen dieser Rekonstruktion: Homo10.avi&Homo10a.avi).

Horizontalzellfortsätzen umgeben. Letztere können auch nur Kollateralen eines einzigen Horizontalzellfortsatzes sein, stammen aber meist von 2 unterschiedlichen Ausläufern solcher Zellen. Etwas tiefer in der Synapse liegen die Terminalen der Bipolarzellendriten ungefähr zentral

unterhalb der ad und der sich berührenden Horizontalzellendigungen. Hierbei gehörten zu einem SK nur eine oder zwei dieser Endigungen. Das SK mit den assoziierten, ebengenannten Nachbarstrukturen und der in Fortsetzung der ad nach lateral oben reichenden aktiven Zone bildet eine Ribbonsynapse, die funktionelle Grundeinheit eines Stäbchenterminals. Menschliche Stäbchenterminale zeigen meist 2, seltener eine und nur ausnahmsweise 3 solcher Grundeinheiten. Die aktive Zone (Abb. Homo10, Animation Homo10.avi & Homo10a.avi; vgl. auch Abb. Disk 3c und Animation Disk3c.avi) ist der funktionell wesentliche Bereich der Ribbonsynapse, da hier die Exozytose der glutamathaltigen zuvor an die SK gebundenen Vesikel stattfindet. Die Abbildungen Homo6-10, die zugehörigen Animationen und Animation 01.avi zeigen die Pleomorphie der Ribbonsynapsen menschlicher Stäbchen auf. Die Morphologie der rekonstruierten SK ist in Abbildung Homo11 mit Standardprojektionen dargestellt. Meistens handelt es sich um Bänder (ribbons), die nur in einigen Fällen stärker verdreht oder gebogen sind. Allen gemeinsam sind die konstante Dicke von 35 nm und die damit verbundene Parallelität der beiden großen Hauptflächen. Aus den 3D Rekonstruktionen und den orientierten Darstellungen der SK lässt sich die

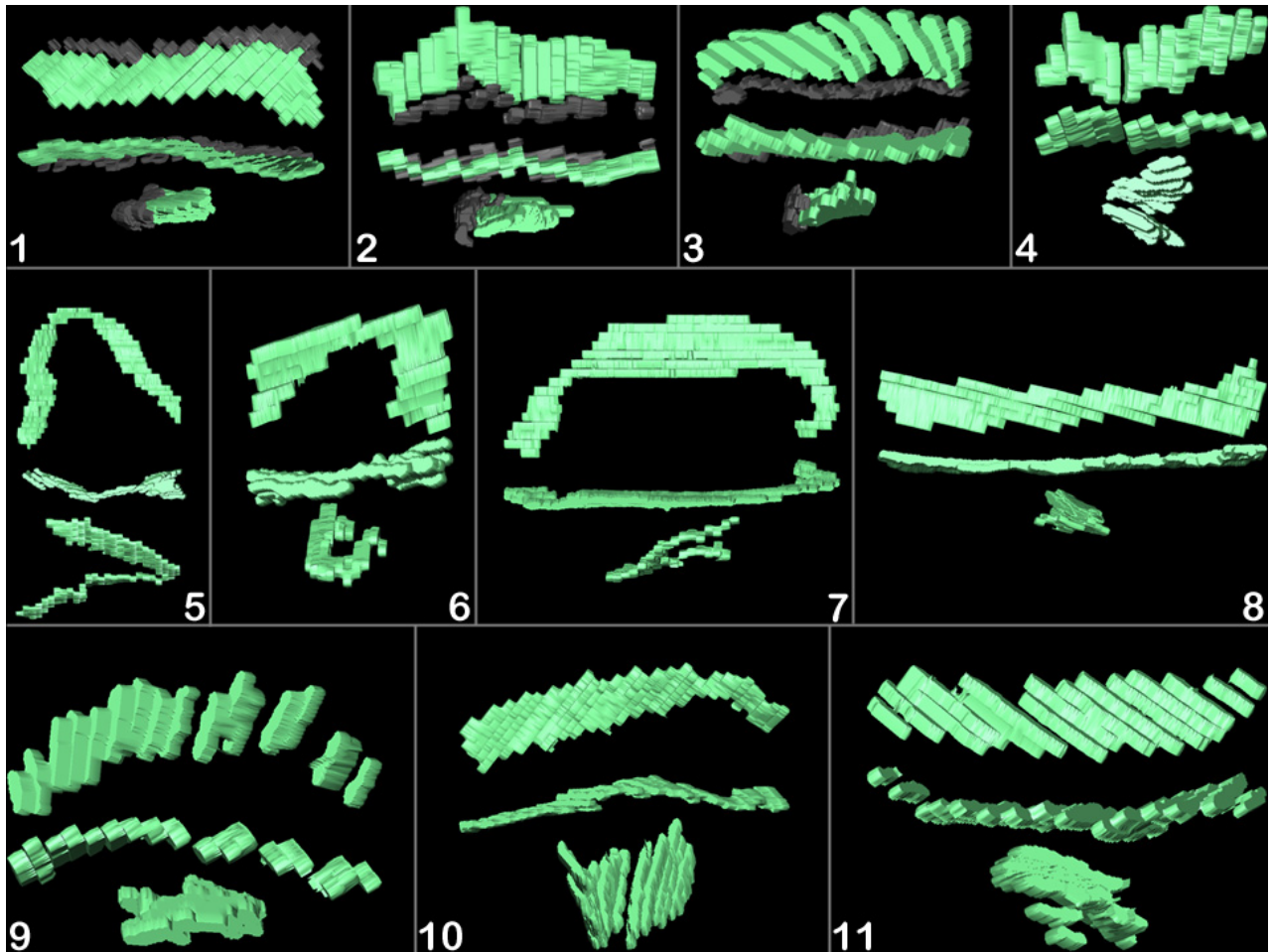


Abb. Homo11 Standardisierte Darstellung von 11 verschiedenen Stäbchen SK. Die oben dargestellte sagittale Ansicht ist diejenige, bei der die maximale Oberfläche zu erkennen ist, die in der Mitte gezeigte transversale Ansicht ist der um 90 Grad verdrehte Blick von oben auf das SK und die Darstellung unten die um 90 Grad seitlich verdrehte frontale Ansicht. Während die meisten SK längliche, wenig gekrümmte oder verdrehte Bänder, also "echte ribbons" sind, erscheinen 6 und 7 als C- bis U-förmige Objekte, während 9 in etwa eine Boomerang Form hat und 5 eine relativ dünne Spitze mit sehr starker Abknickung in mehreren Ebenen aufweist. Die ungeglätteten Oberflächen erhalten die Größeninformation, denn eine Stufe entspricht immer der Schnittdicke von 50 nm. Bei 1-3 ist zusätzlich noch die zugehörige arciform density grau dargestellt.

die Länge der ihnen zugehörigen aktiven Zonen bestimmen. Sie beträgt für Synapse 1 mit 1 SK $2,8 \mu\text{m}$; Synapse 2 mit 2 SK $2,2 + 0,7 = 2,9 \mu\text{m}$; Synapse 3 mit 2 SK $2,0 + 0,9 = 2,9 \mu\text{m}$; Synapse 4 mit 2 SK $1,0 + 1,8 = 2,8 \mu\text{m}$; Synapse 5 mit 2 SK $1,5 + 1,3 = 2,8 \mu\text{m}$ und Synapse 6 mit 3 SK $1,1 + 1,0 + 0,7 = 2,8 \mu\text{m}$. Damit beträgt sie durchschnittlich $2,83 \mu\text{m}$ pro Terminal bei erstaunlich geringer Abweichung. Sie verteilt sich aber auf 1 bis 3 SK-assoziierte Bereiche des Synapsenkomplexes.

3a252 Synaptische Körperchen in Zapfen

Aufgrund der Tatsache, daß die im Datensatz vorhandenen Zapfenterminalen nicht parallel zu ihrer Basis, sondern ungefähr senkrecht dazu angeschnitten waren, und der Durchmesser einer Zapfenbasis ca. $8 \mu\text{m}$ (Ahnelt et al. 1990) beträgt, war in den 55 Serienschnitten keiner der 3 rekonstruierten Zapfenpedikel komplett enthalten. Die Ansicht der Oberfläche rekonstruierter Pedikel (Abb. Homo12) verdeutlicht, daß die darin über $1 \mu\text{m}$ einer Zapfenbasis vorhanden waren. Wie in den Abbildungen Seite 0, Abb.7, Homo1,10,12 und zugehörigen Animationen verdeutlicht, finden sich in den zentralen Einsenkungen der 3 rekonstruierten Zapfenterminalen jeweils 12 verschiedene Ribbonsynapsen, die auch als Triaden bezeichnet werden, da sich hier üblicherweise neben zwei seitlichen Horizontalzellfortsätzen nur ein zentraler Bipolarzellendrit findet (s. unten, Abb. Homo13; Animationen 01.avi, Homo13.avi; Homo13a.avi). Da die rekonstruierten Gewebsblöcke aber nur zwischen der Hälfte bis zu einem Viertel eines kompletten Zapfenpedikels erfaßt haben, kann man die Gesamtzahl für ein komplettes Terminal hochrechnen (s. Diskussion 4a24: Seite 91). Bei verschiedenen Tierspezies lassen sich die Zapfentypen experimentell bestimmen und dann morphologisch sicher zuordnen, was beim Menschen nur für die

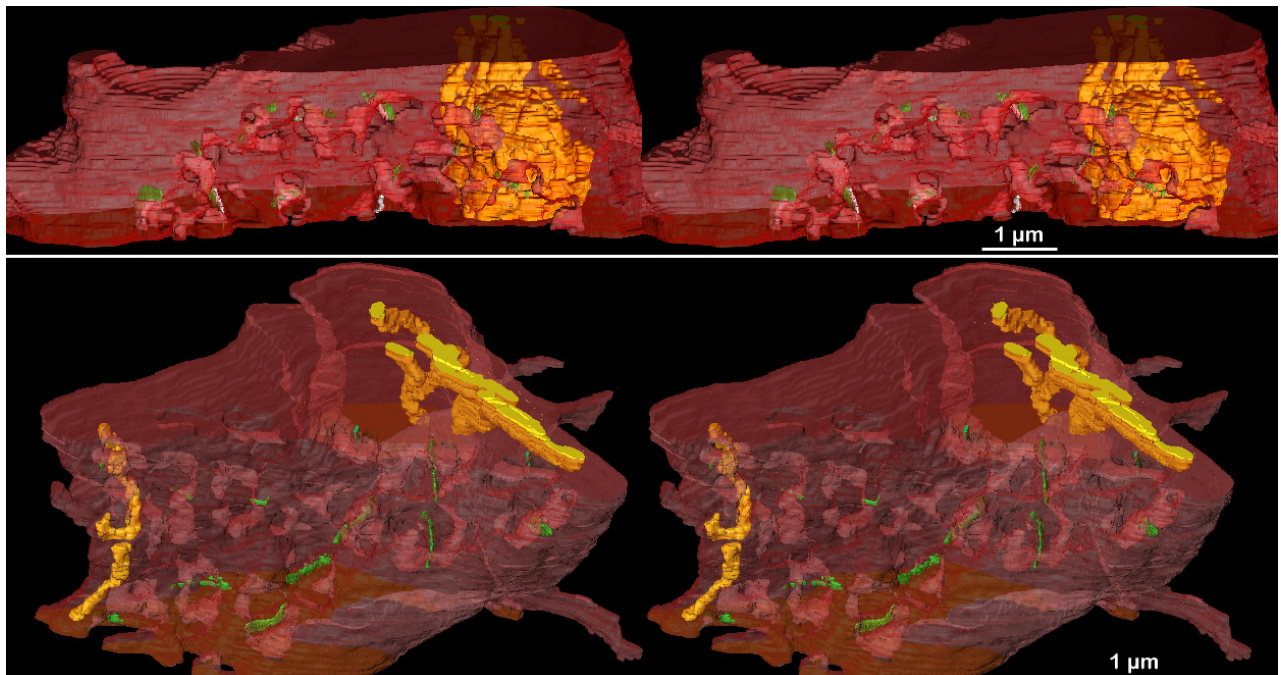


Abb. Homo12 Nur im Zentrum der beiden hier stereorekonstruierten Zapfenterminalen finden sich Ribbonsynapsen. Die Abbildungen zeigen auch eine seltsame Anhäufung aller Mitochondrien (gelb) in einem riesigen Konglomerat auf einer Seite im oberen und in 2 lateralen Bereichen im unteren Terminal. Außer den Mitochondrien finden sich unzählige Neurotransmittervesikel im Zytoplasma, von denen nur ein sehr geringer Teil an die synaptischen Körperchen (grün) gebunden ist. Das untere Bild zeigt auch einige dünne basolaterale Fortsätze des Zapfenterminals.

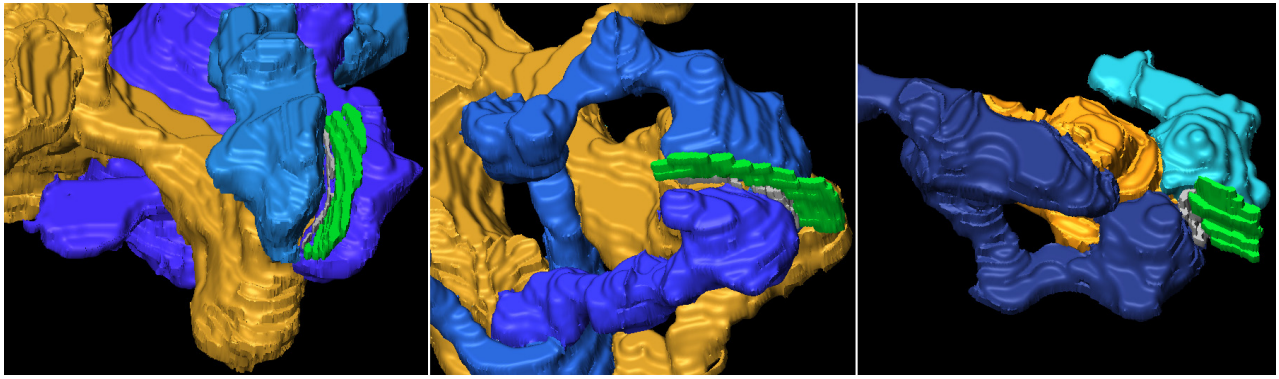


Abb. Homo13 Drei typische Ribbonsynapsen von oberhalb von jeweils einer in einen Zapfenpedikel invaginierten Triade. Die band- oder plattenförmigen an ads verankerten SK liegen oberhalb eines massiv dilatierten Bipolarzeldendriten terminals und flankierenden, am Ende rundlich aufgetriebenen Horizontalzellfortsätzen (Farben siehe Abb. Homo3; Animationen: Homo13.avi & Homo13a.avi).

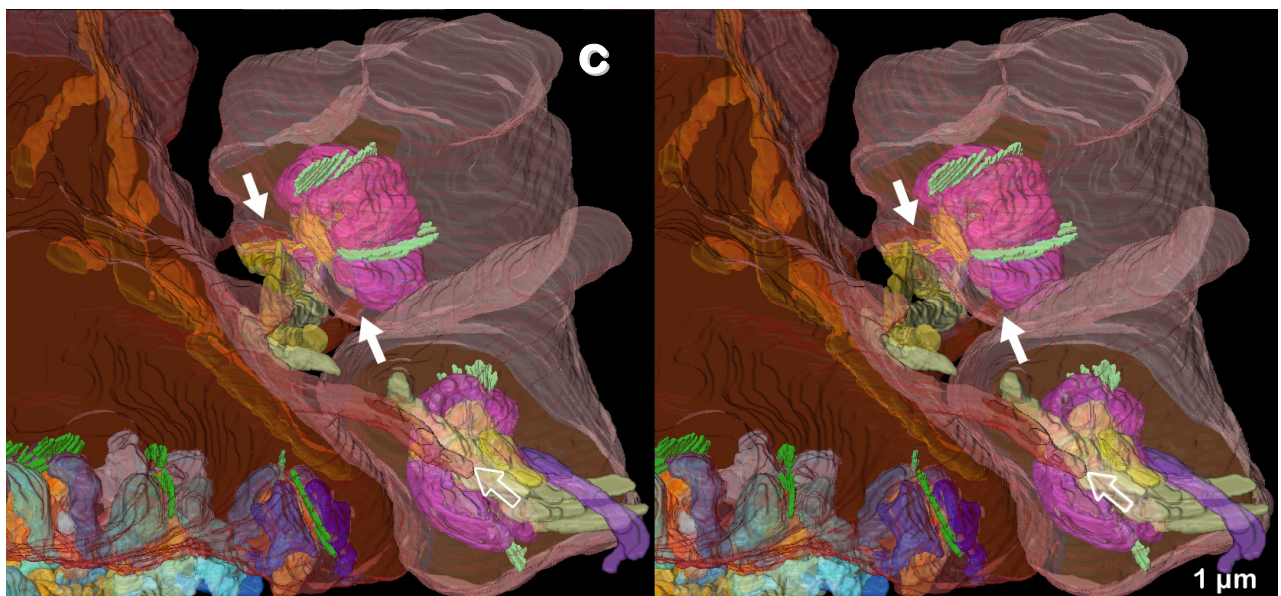
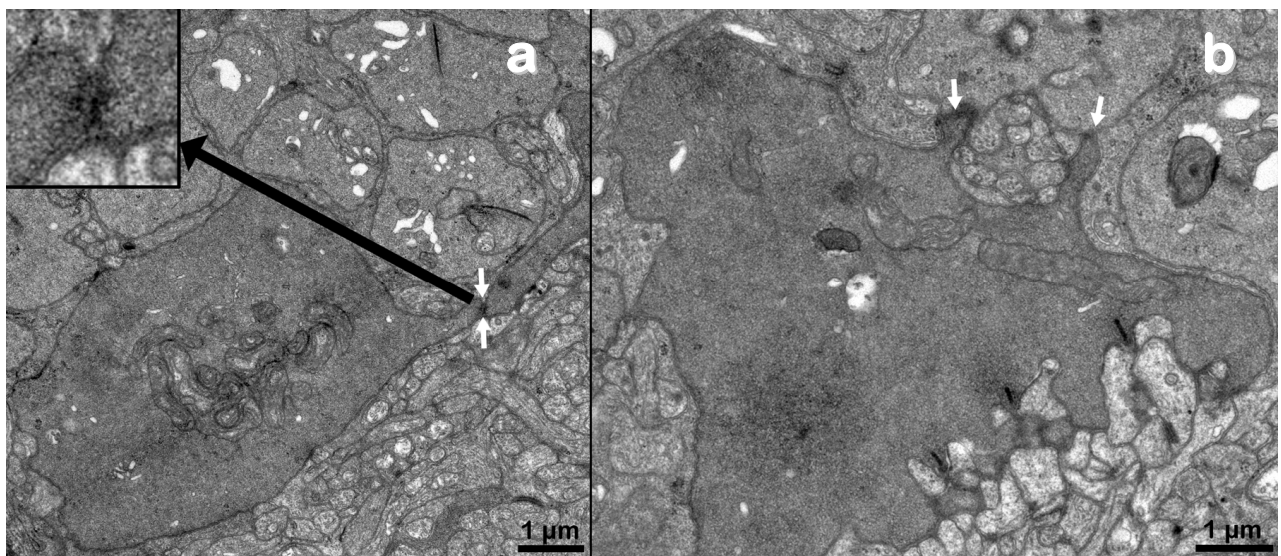


Abb. Homo14 Darstellung von Fortsätzen von Zapfenterminalen: **a** Originalfoto eines Ausläufers zu einem ähnlichen Fortsatz eines benachbarten Zapfenpedikels. Im Bereich des Kontakts (Pfeile) sind beidseits intrazellulär feine Verdichtungen sichtbar (siehe Detail oben links). **b** An einem anderen Zapfen bilden sich weiter oben im Terminalbereich zwei kleine dünnere Ausläufer, die, wie auch in der zugehörigen Stereorekonstruktionsabbildung **c** erkennbar, ein benachbartes Stäbchenterminal basal in einiger Entfernung von Hilus kontaktieren (massive Pfeile). Der leere Pfeil zeigt einen weiteren dieser Fortsätze auf, der zu einer andern Stäbchenzelle außerhalb des visualisierten Bereichs zieht (Animation dieser Rekonstruktion: Homo14.avi).

kleineren und deutlich fortsatzärmeren Blauzapfen möglich ist. Anhand der hier vorliegenden rein ultrastrukturellen Befunde kann nur festgestellt werden, daß die im Rahmen dieser Habilitation untersuchten Pedikel von Rot- oder Grünzapfen stammen, die keine wirklich deutlichen morphologischen Unterschiede zeigen (siehe Diskussion).

Im Bereich der Zapfenbasis zeigten die 3 rekonstruierten Exemplare mehrere, einige 3-10µm lange, nach basolateral reichende, ca. 150 nm durchmessende Fortsätze, die mit analogen Fortsätzen benachbarter Zapfenterminale (siehe Abbildung Homo14a) in Kontakt traten. Ferner fanden sich bei 2 der Zapfenterminalen mehrere dünnere Zellfortsätze, die weiter oberhalb zu Endkolben benachbarter Stäbchenzellen zogen, um hier in 100 bis 500 nm Abstand zum Hilus basal zu terminieren. Die Animation Homo14.avi sowie Abb. Homo14b, c zeigen ein Beispiel für solche lateralen Fortsätze. Im Bereich der lateralen Zapfen-Stäbchen bzw. der basolateralen Zapfen-Zapfen Verknüpfungen waren einander gegenüberliegende intrazelluläre Verdichtungen erkenn-

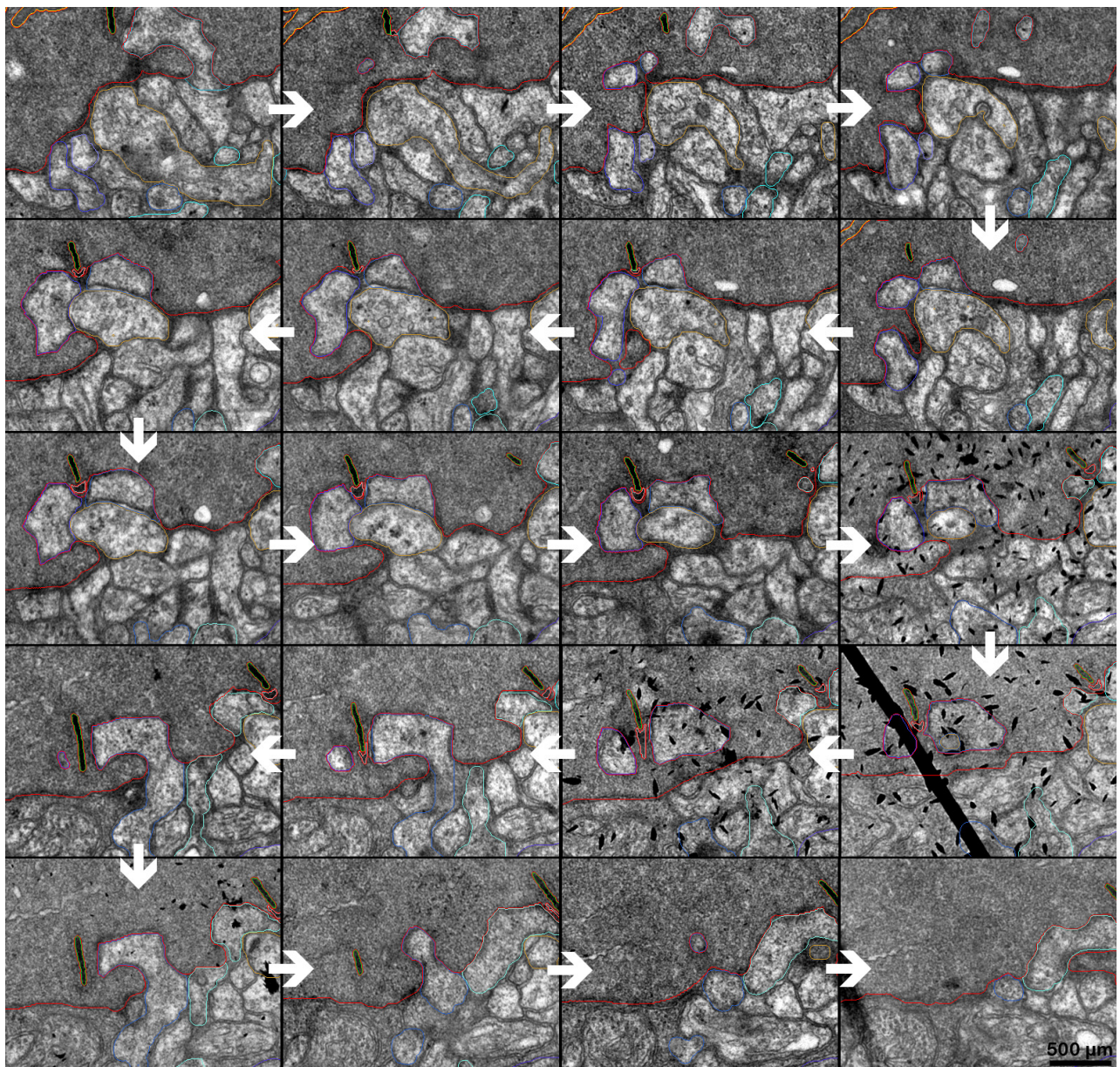


Abb. Homo15 Original Serienschritte durch eine Triade eines Zapfenterminals mit farblicher Markierung von SK, ad, der seitlich gelegenen Horizontalzellfortsätze und des zentralen Zapfenbipolarzellendriten (Farben wie in Abb. Homo3). Die invaginierten Fortsätze sind alle terminal dilatiert (Animation der Serienschritte: Homo15.avi).

bar. Die feinen Gap-junctions, die in solchen Kontaktbereichen nachgewiesen wurden (Cohen 1965; Baylor et al. 1971; Raviola & Gilula 1973; Tsukamoto et al. 1992; siehe Diskussion Seite 94) waren nur andeutungsweise bis gar nicht sichtbar.

Betrachtet man die Zapfenribbonsynapsen für sich, so läßt sich folgender generelle Aufbau feststellen: Die von der Grundform her bandartigen synaptischen Körperchen sind stets an einer, gelegentlich zwei (Abb. Homo16-2) verschiedenen, bogenförmigen Membranplaque (arciform density; ad) über feine Proteinärmchen befestigt. Die Form der SK folgt dem Verlauf der Zellmembran aufgrund dieser Befestigung über längere Abschnitte. Die SK werden seitlich nahezu komplett von Horizontalzellfortsätzen flankiert, die nur in wenigen Fällen aus einem einzigen Fortsatzursprung hervorgingen. Die aktiven Zonen erstrecken sich beidseits lateral der ad entlang der Zellmembran und haben nur 50 - 150 nm Abstand zu den flachen Hauptoberflächen der SK, was funktionell relevant ist. Die postsynaptischen Elemente sind die beiden ein SK flankierenden Fortsätze von Horizontalzellen, die im Gegensatz zu den Stäbchenhorizontalzellfortsätzen meist von etwas seitlich her, aber ohne Verknäuelungen relativ gerade in den Zapfen vordringen und an ihren Ende in der Regel mehrere hundert Nanometer durchmessende rundliche Auftreibungen zeigen (Abb. Homo13, 17). Der meist singuläre Bipolarzellfortsatz dringt fast immer gerade bis knapp unterhalb der Spitze der ad in den Zapfenpedikel vor. In vielen Bereichen verbleibt er unterhalb der Berührungsfläche, welche die beiden Zapfenhorizontalzellendigungen miteinander ausbilden, also ein Stück unterhalb der ad und der Basis des SK. Im terminalen Bereich, ab der Invaginationsstelle in einen Zapfen, sind die Dendriten der Zapfenbipolarzellen massiv verdickt (Abb. Homo 13, 15). Die postsynaptischen Elemente sind ca. 1,5 µm tief in das Zapfenterminal invaginiert und nicht so bizarr umeinander geschlungen, wie es bei Stäbchenterminalen der Fall ist. An einigen Zapfenbipolarzellterminalen finden sich im Sinne konfluierender Synapsen 2 verschiedene SK mit ihren zugehörigen Horizontalzellfortsätzen (Abb. Homo 16-1, 17, Disk5; Animationen Homo16.avi, Homo17.avi, Disk5.avi). Diese erscheinen in den Rekonstruktionen oft



Abb. Homo16 Diese Rekonstruktion von Ribbonsynapsen eines menschlichen Zapfenterminals zeigt 12 bandförmige synaptische Körperchen und zwei gelegentlich auftretende besondere Befunde: Im Areal **1** liegen 2 SK praktisch hintereinander gereiht an ein und demselben Bipolarzellendriten, haben aber verschiedene (eigene) Horizontalzellfortsätze. In der Region **2** erstreckt sich ein langes, schwach gebogenes Band über 2 verschiedene Synapsen, wo es Beziehung zu zwei verschiedenen Horizontalzellpaaren und 2 unterschiedlichen nachgeschalteten Bipolarzellendriten hat (Farbcodierungen s. Abb. Homo3; Animation dieser Rekonstruktion: Homo16.avi).

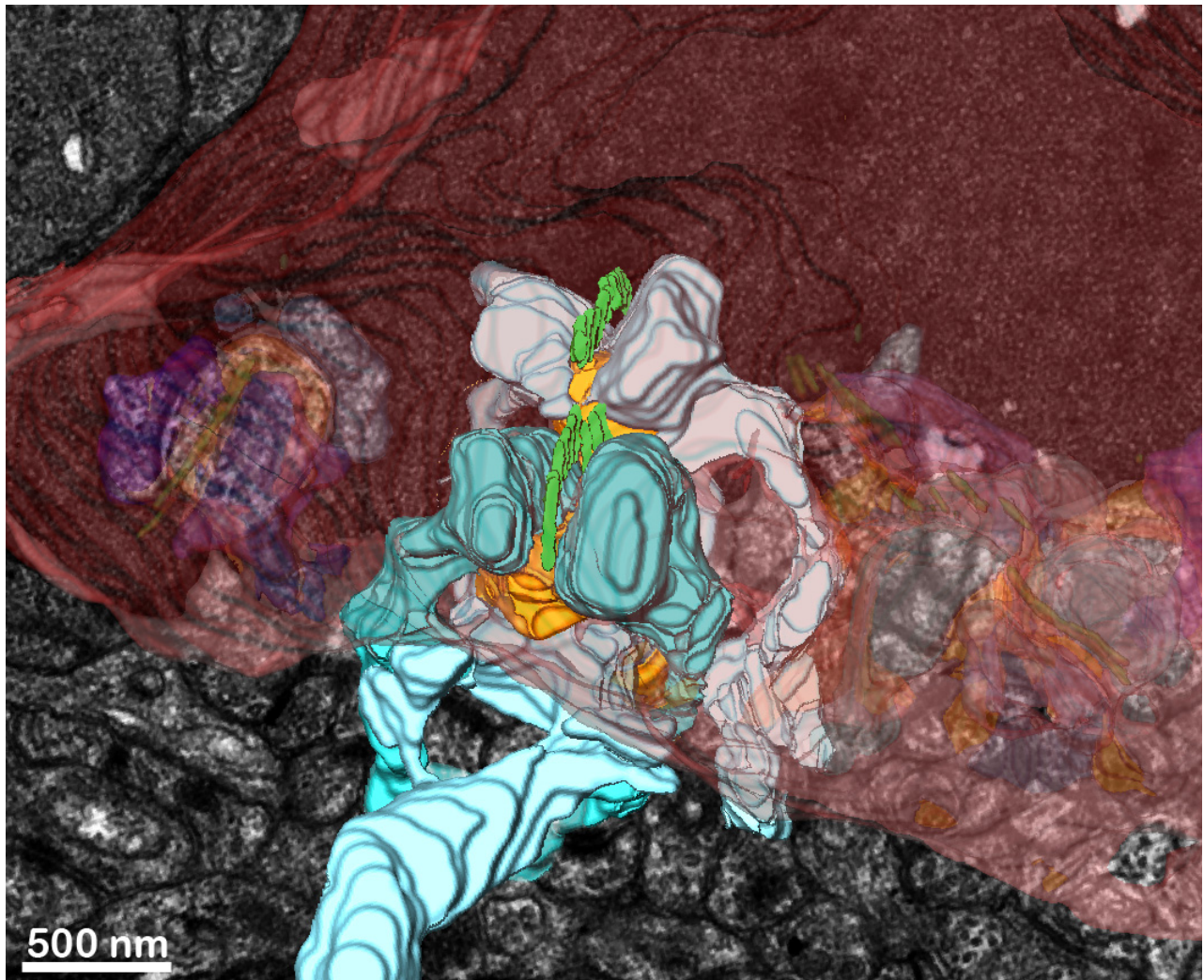


Abb. Homo17 Zwei in Reihe stehende SK, die zu einem terminal massiv aufgetriebenen gemeinsamen darunterliegenden Bipolarzellendriten (gelb) gehören und jeweils von 2 verschiedenen Horizontalzellfortsätzen (blau) flankiert sind (Animation dieser Rekonstruktion: Homo17.avi).

gerade hintereinander, stehen also praktisch in Reihe. In einem Fall fanden sich sogar drei solcher aufgereihter SK. In vier Fällen erstreckten sich größere bandförmige SK über zwei verschiedene Synapsen (Abb. Homo16-2), wo sie jeweils über eine ad verankert waren. Zu diesen SK gehörten 4, in einem Fall sogar 5 verschiedene Horizontalzellfortsätze. In manchen Fällen lagen SK so nahe beieinander, daß zwischen ihnen nur ein gemeinsamer Horizontalzellfortsatz zu finden war (Abb. Homo 18).

Die meisten der rekonstruierten synaptischen Körperchen in Zapfen (Abb. Homo 19a-c) waren von der Grundform her Bänder, einige kürzere Platten (Länge zu Breite kleiner 3:1). In der Mehrzahl der Fälle waren sie nur leicht verkrümmt und kaum verdreht. Die C- bis zu boomerangförmigen Organellen waren nicht so stark gebogen wie es bei Stäbchen der Fall war (vgl. Abb. Homo11). Durchschnittlich waren die hier erstmals beim Menschen rekonstruierten Zapfen-SK kleiner und deutlich weniger in sich verdreht als SK von Stäbchen.

Die Länge der aktiven Zonen rekonstruierter Zapfenribbonsynapsen ist aus der Tabelle Za ersichtlich und beträgt bei den komplett erfaßten Synapsen zwischen 0,5 und 1,1 μm , durchschnittlich $0,75 \pm 0,15 \mu\text{m}$.

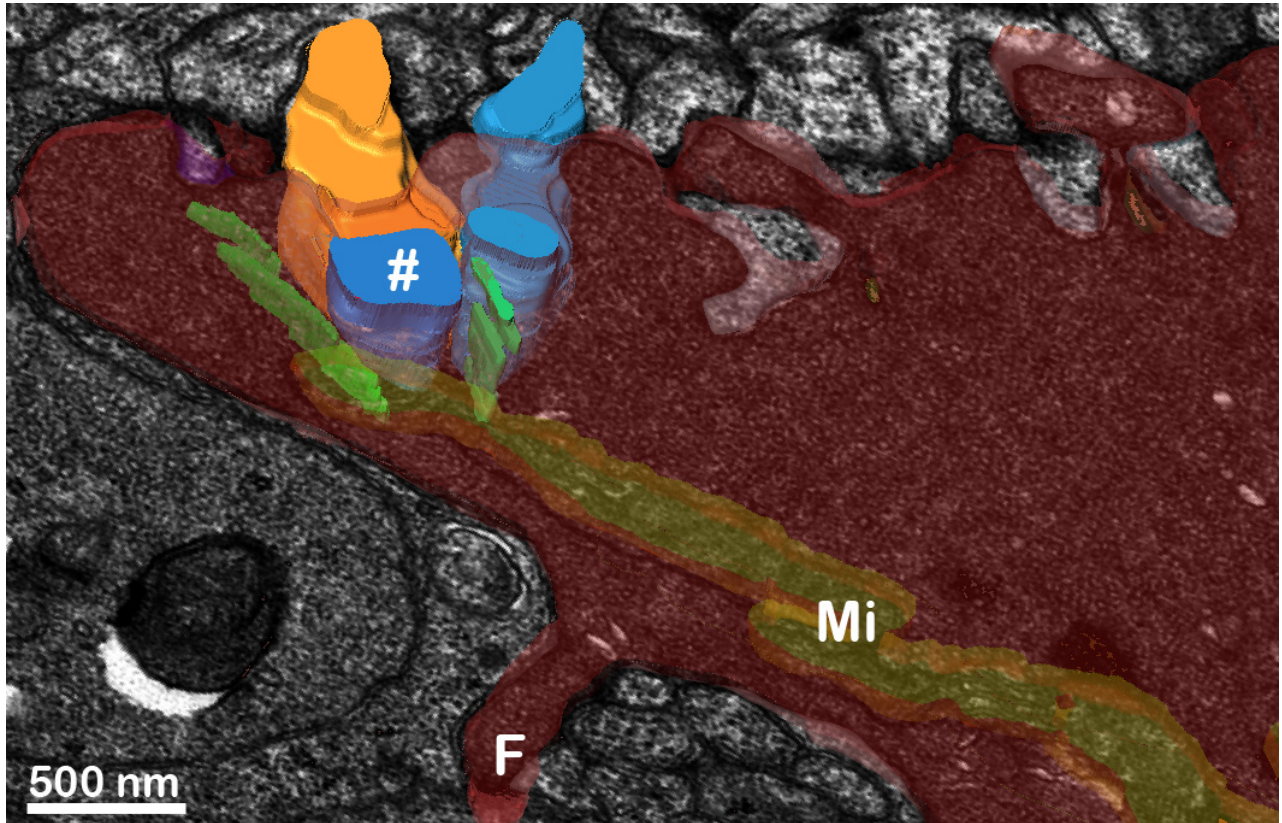
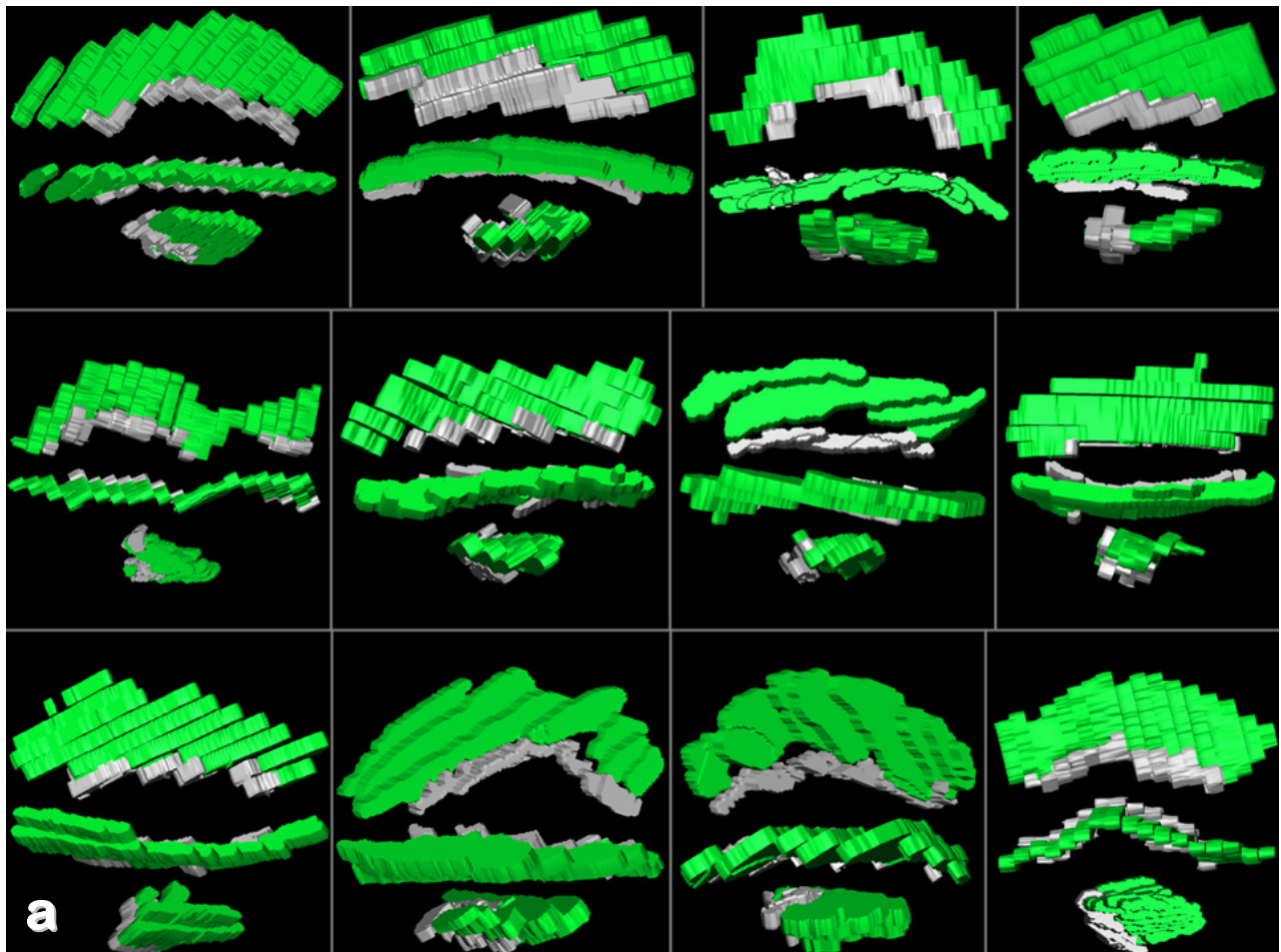


Abb. Homo18 Zwei in etwa parallel stehende SK sind präsynaptisch zu einem gemeinsamen Bipolarzeldendriten und schließen zwischen sich einen gemeinsamen Horizontalzellfortsatz (#) ein (Farben siehe Abb. Homo3). Ferner sind einige nahe der Zellmembran im Zapfenterminal gelegene Mitochondrienkonglomerate (Mi) und ein dünner seitlicher Zapfenfortsatz zur erkennen, der zu einem Stäbchenterminal führt.



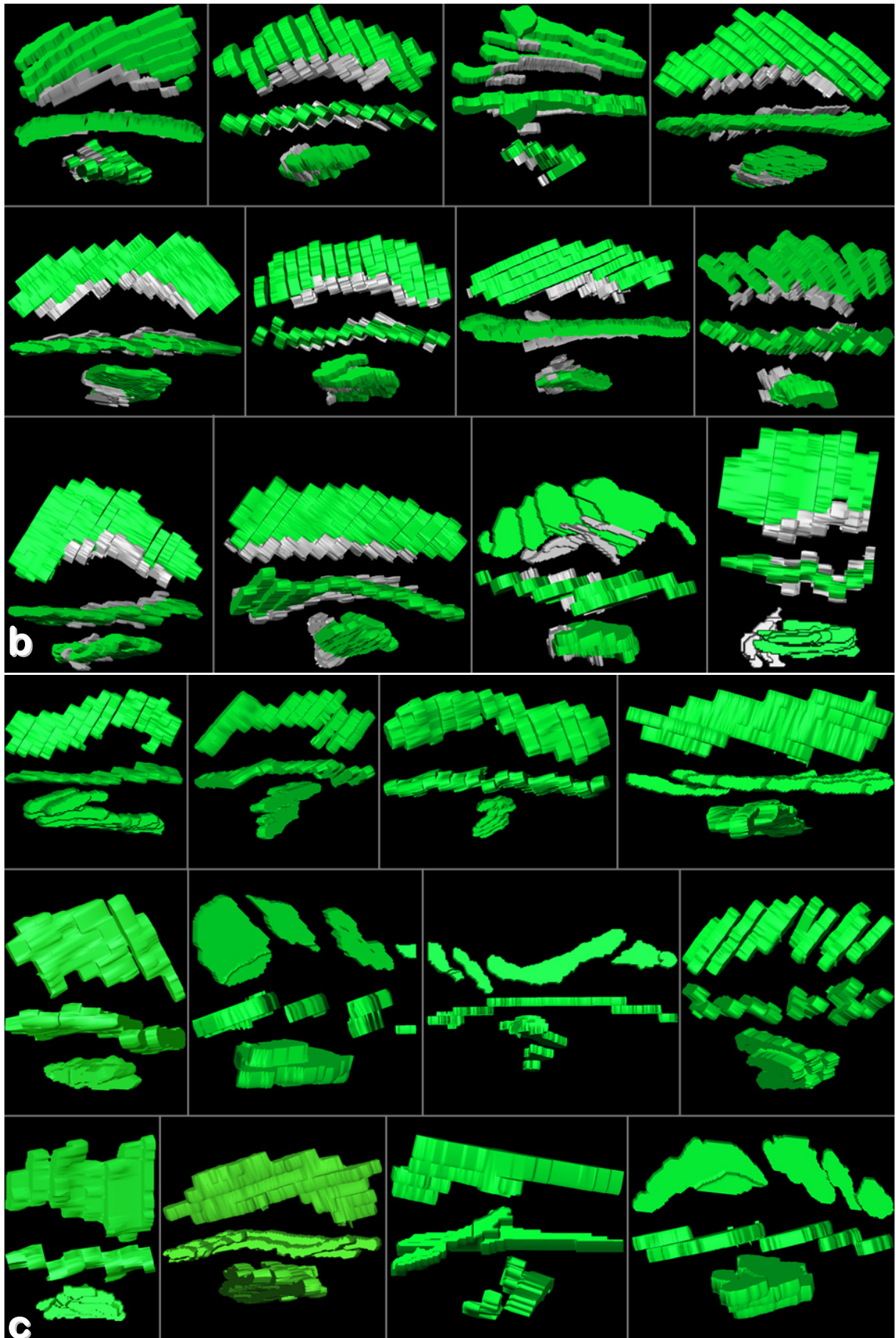


Abb. Homo19a-c Standardisierte Darstellung (vgl. Abb. Homo11) aller rekonstruierten SK in den 3 verschiedenen Zapfenpedikeln (**a**, **b**, **c**). Die band- bis plattenförmigen Organellen sind fast gar nicht verdreht und nur zum Teil ein wenig gekrümmt (eine Stufe der ungeglätteten Oberflächen entspricht der Schnittdicke von 50 nm). In den Abbildungen **a** und **b** sind die zugehörigen arciform densities grau dargestellt.

Tabelle Za: Länge der aktiven Zonen rekonstruierter Zapfenribbonsynapsen (Angaben in μm)

Terminal	ermittelte Längen:				Durchschnitt	Gesamtlänge
1 (Abb. 19a)	0,7	0,9	0,7	0,55	0,81	>9,70
	1,1	0,8	0,8	0,75		
	0,8	0,95	0,9	0,75		
2 (Abb. 19b)	0,8	0,65	0,75	0,75	0,67	>8,05
	0,9	0,65	0,5	0,6		
	0,55	0,75	0,65	0,5		
3 (Abb. 19c)	0,7	0,65	0,75	0,65	0,62	>7,45
	0,45	0,5	1,0*	0,6		
	0,4	0,7	0,55	0,5		

Gesamtdurchschnitt: 0,70 ohne inkomplette SK: 0,745

Standardabweichung: 0,16 ohne inkomplette SK: 0,146

Gelb unterlegt: Hier sind die aktiven Zonen nicht komplett im Datensatz enthalten

* Das zugehörige SK war an 2 nicht zusammenhängenden Triaden beteiligt, die beide eine 0,5 μm lange aktive Zone aufwiesen

Die Gesamtlängen sind Mindestwerte, da die Zapfenpedikel in den Datensätzen nicht komplett erfaßt wurden

3a253 Synaptische Körperchen in Bipolarzellen

Neben den ersten Neuronen der Sehbahn (Stäbchen und Zapfen) enthalten auch die ihnen nachgeschalteten Bipolarzellen synaptische Körperchen. Typischerweise findet man diese in deren Axonen an Synapsen zu Ganglienzellendriten, an denen in der Regel auch ein Fortsatz einer amakrinen Zelle beteiligt ist, im Bereich der inneren plexiformen Schicht (Abb. Homo2, 20). Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmals synaptische Körperchen in menschlichen Bipolarzellendriten in der unteren äußeren plexiformen Schicht, die als ektopische SK zu bezeichnen sind (Abb. Homo 21). Diese dreidimensional betrachteten kleinen Platten waren nicht an der Zellmembran verankert und leicht gebogen.

Morphologisch konnten die Fortsätze der verschiedenen Bipolarzellarten nicht voneinander unterschieden werden, da der in den Serienschnitten erfaßte Bereich hier für zuverlässige Aussagen nicht ausreichte und die Rekonstruktion der SK primäres Ziel der Untersuchung war. Nur selten und lediglich im oberen Bereich der inneren plexiformen Schicht fanden sich wenige auffällig kurze Profile SK in von Zapfenbipolarzellen, die dreidimensional zu sehr kleinen plattenförmigen SK gehörten.

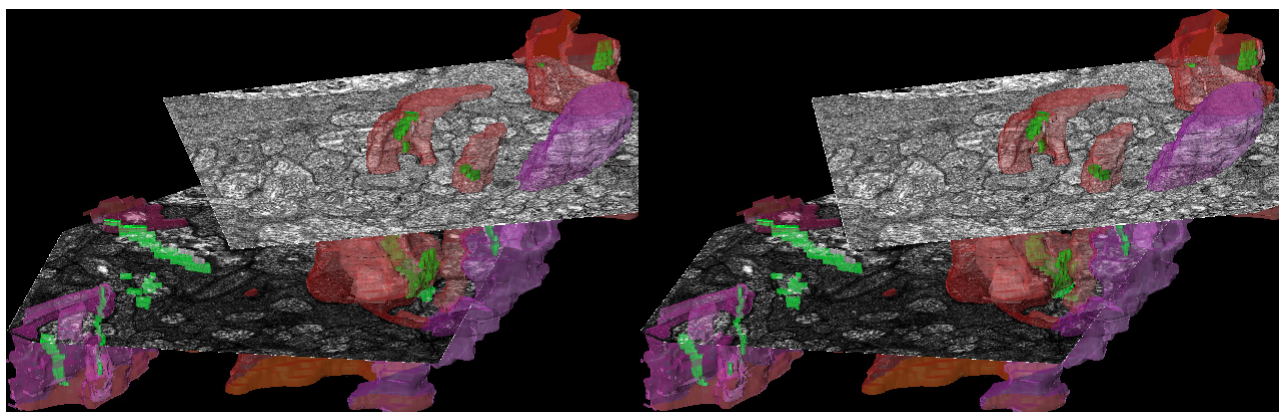


Abb. Homo20 Synaptische Körperchen (grün) in Axonen verschiedener Bipolarzellen (rot-violett) im Bereich der inneren plexiformen Schicht der menschlichen Retina (Animation dieser Rekonstruktion: Homo20.avi).

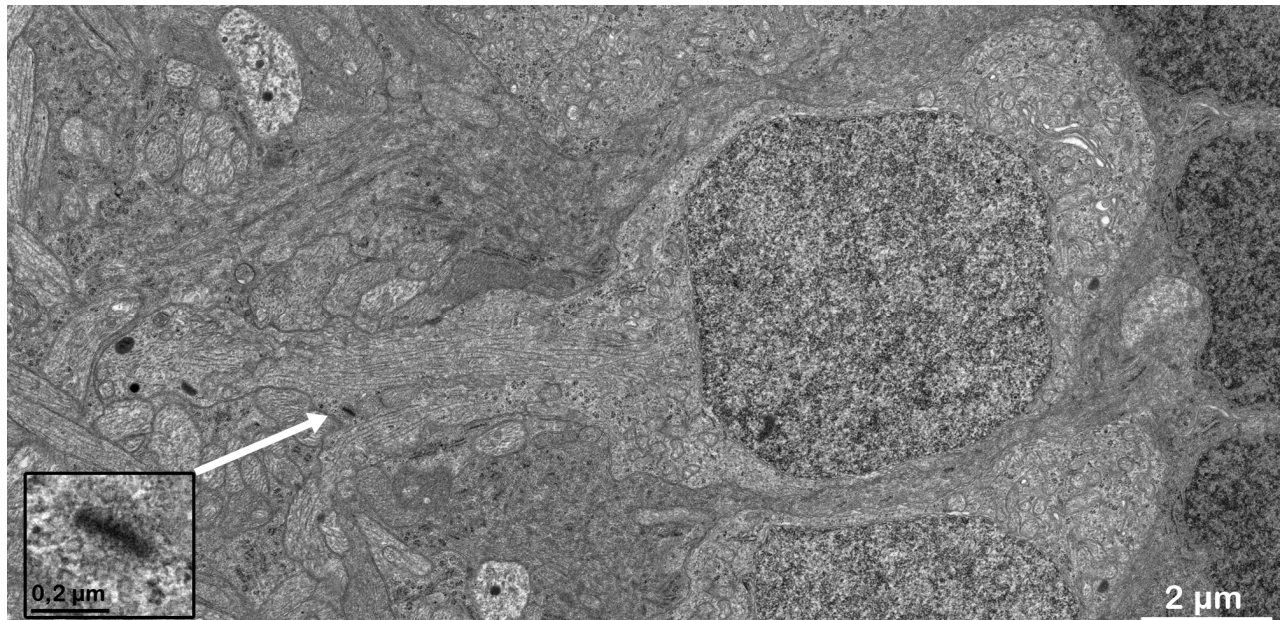


Abb. Homo21 Im Bereich der Aufzweigung des Dendriten dieser Zapfenbipolarzelle findet sich das Profil eines ektopischen synaptischen Körperchens (Pfeil), welches unten links herausvergrößert ist.

Die Synapsen der Bipolarzellaxone sind flach bis auf eine kleine leistenartige zentrale Anhebung in deren Mitte, an der entlang einer länglichen elektronendichten Membranplaque über feine Proteinbrücken stets nur ein einziges SK verankert ist. Dieses befindet sich im Bipolarzellaxoplasma gegenüber den Zellgrenzen des zugehörigen Fortsatzes einer amakrinen Zelle und eines nachgeschalteten Ganglienzellendriten (Abb. Homo 22; Animation Homo22.avi). Bei einigen SK läßt sich der elektronendichte Membranplaque nicht sicher erkennen, in manchen Fällen ist er nur über ein kurzes Stück nachzuweisen. Auch in Bipolarzellaxonen bestehen SK aus zwei parallel zueinander stehenden Hauptflächen, die einen Abstand von 35 nm zueinander haben und deren Seiten sehr unregelmäßig begrenzt sind. Die meisten der SK in Bipolarzellaxonen sind lange schmale dünne Bänder. Daneben treten auch sehr kleine, nur auf 2 oder 3 Schnitten erfassbare Platten mit Dimensionen von etwa 250 x 150 x 35 nm auf (Abb. Homo23; Animationen

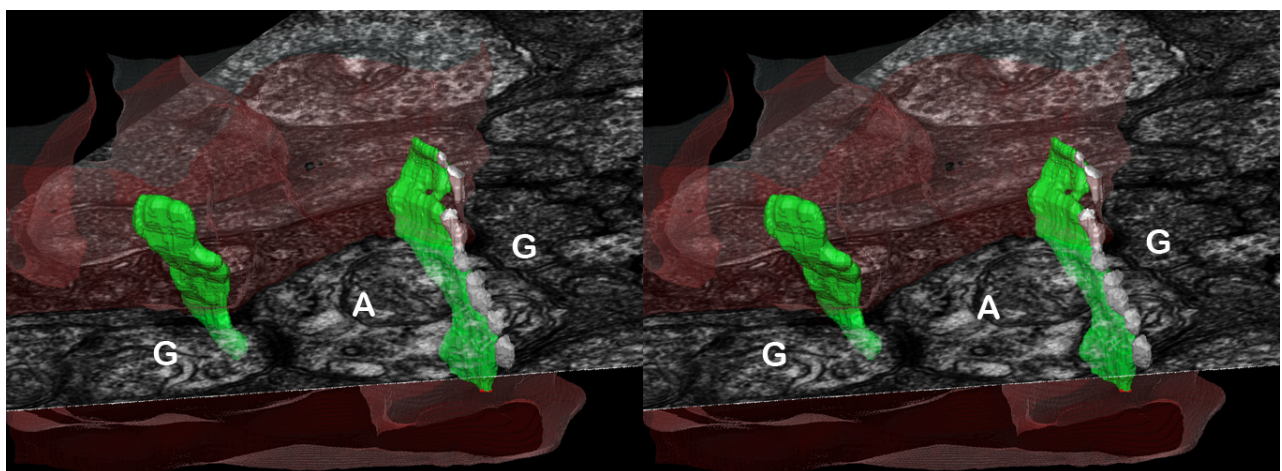


Abb. Homo22 Stereobild zweier bandförmiger SK (grün) einer Stäbchenbipolarzelle (rot) im Bereich der unteren inneren plexiformen Schicht der menschlichen Retina. Die SK liegen im Bereich einer kleinen leistenförmigen Ausstülpung der Zellmembran, eines ist hier über eine längliche elektronendichte Membranplaque (grau) verankert. In Fortsetzung dazu finden sich die Zellgrenzen zwischen den nachgeschalteten Ganglienzellendriten (G) und einem Fortsatz einer amakrinen Zelle (A; Animation dieser Rekonstruktion: Homo22.avi).

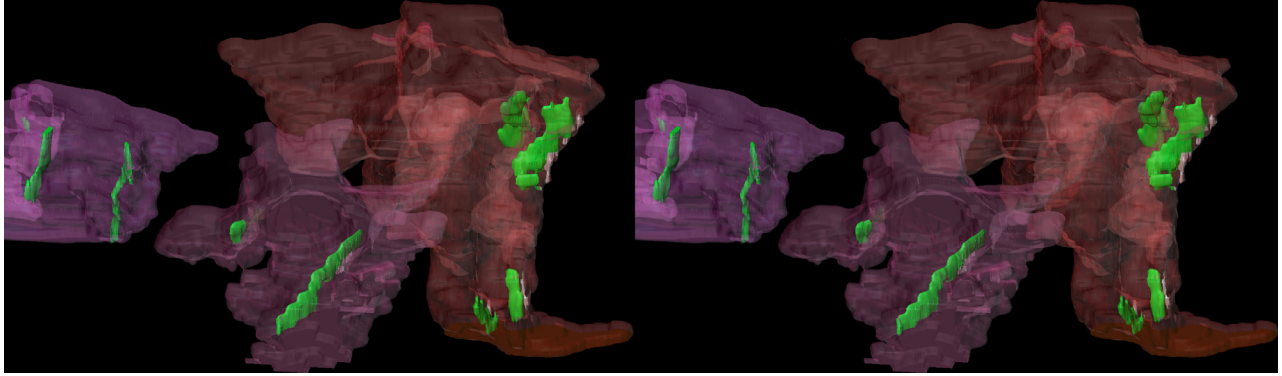


Abb. Homo23 Dieses Stereobild der inneren plexiformen Schicht im Bereich nahe der Ganglienzellen zeigt verschiedene Formen rekonstruierter SK: neben langen, dünnen Bändern kommen etwas größere und recht kleine Platten vor (SK grün; Bipolarzellen rot bis violett; Animation dieser Rekonstruktion: Homo23.avi).

Homo2.avi, Homo23.avi), wie sie in Stäbchen oder Zapfenterminalen nie vorliegen. Ferner kommen Zwischenformen vor (Abb. Homo23, 24). In dem untersuchten Material waren alle SK zumindest in einem Originalanschnitt, meist aber auf mehreren Serienschnitten hintereinander an der Zellmembran fixiert, d.h. es lagen keine freien SK vor. In manchen Abschnitten fanden sich mehrere SK in Nachbarschaft, dabei betrug der Abstand zwischen den einzelnen Organellen aber stets mindestens 500 nm, was bedeutet, daß es keine echten Felder von SK gab. Auch

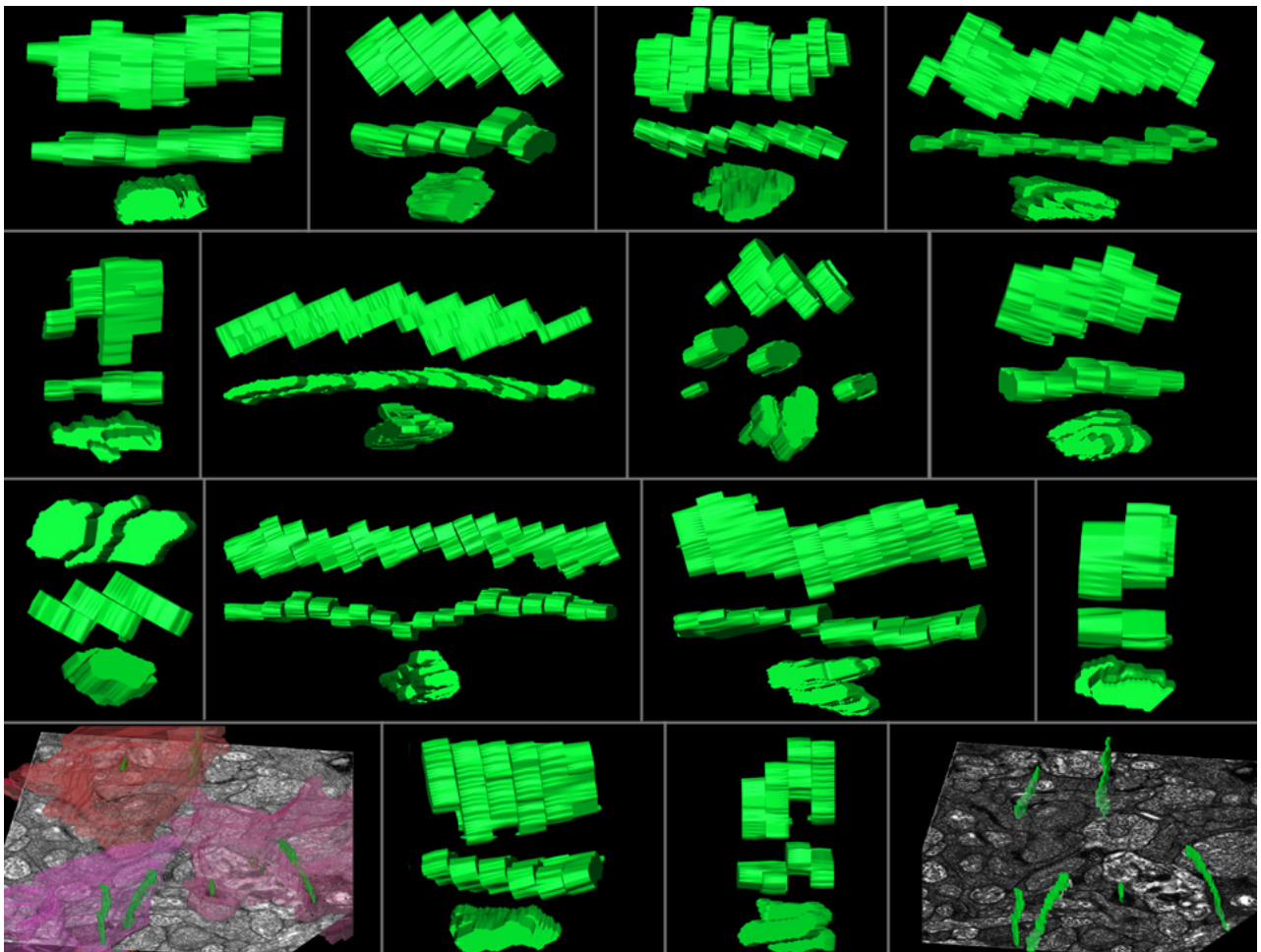


Abb. Homo24 Die 14 hier in den Standardansichten (vgl. Abb. Homo 11) dargestellten synaptischen Körperchen von Stäbchenbipolarzellen sind bandförmig bzw. kleinere oder größere Platten ohne besondere Verdrehungen oder Verbiegungen. Auffällig sind 4 besonders kleine Platten, die nur in 2 - 4 Schnitten angetroffen wurden, da derart kleine plattenförmige SK in Terminalen der Photorezeptoren nicht vorkommen.

waren hier sehr viel weniger Transmittervesikel in der Nachbarschaft der SK vorhanden als es in den Terminalen der Stäbchen oder Zapfen der Fall war. Der Abstand der SK zu den zugehörigen aktiven Zonen der Ribbonsynapsen war größer als bei den Photorezeptorterminalen.

3b Quantitative Analysen

3b1 Pilotuntersuchungen

Im Zuge der Entwicklung einer Disektor Zählmethode für SK in Rattenpinealozyten wurden folgende erste, bisher nicht publizierte Daten erhoben:

Bei um 17.00 getöteten, unter LD = 12:12 gehaltenen Kaninchen (Kontrolltier aus Martínez-Soriano 1984) wurde eine Gesamtfläche von 17.678 μm^2 ausgezählt (ausgewertetes Gesamtvolumen: 1.768 μm^3):

Art der SK	PZ	n/20.000 μm^2	DZ	n/1.000 μm^3
plattenförmig	60	67,9	28	15,8
irregulär	54	61,1	16	9,0
kugelig	58	65,6	36	20,4

PZ = Profilzahl von SK in der Gesamtfläche

DZ = mit der Disektormethode ermittelte Zahl von SK im Gesamtvolumen

Unter LD = 12:12 gehaltene Meerschweinchen, die um 9.00 getötet wurden (Kontrolltier aus Peschke et al. 1996) zeigten in der ausgezählten Gesamtfläche von 14.632 μm^2 (ausgewertetes Gesamtvolumen: 1.463 μm^3):

Art der SK	PZ	n/20.000 μm^2	DZ	n/1.000 μm^3
plattenförmig	284	388,2	68	46,5
irregulär	106	144,9	26	17,8
kugelig	96	131,2	48	32,8

Folgende Ergebnisse wurden von 8 Wochen unter Dauerlicht gehaltenen Meerschweinchen (aus Larisch 1989) gewonnen:

Zählmethode	Art der SK	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Gesamt
PZ	plattenförmig	96,9	292,3	173,0	57,7	122,9	Ø: 129,2
	irregulär	98,8	70,6	62,9	18,3	36,9	Ø: 70,1
	kugelig	184,1	312,5	292,4	123,2	307,3	Ø: 218,9
Gesamtfläche (μm^2)		20.854	5.952	6.360	7.628	4.882	Σ: 45.676
DZ	plattenförmig	32,6	47,0	31,4	23,6	8,2	Ø: 30,2
	irregulär	24,9	16,8	9,4	10,5	12,3	Ø: 17,9
	kugelig	73,8	144,5	157,2	70,8	192,5	Ø: 106,8
Gesamtvolumen (μm^3)		2.085	595	636	763	488	Σ: 4.567

PZ = Profilzahl von SK umgerechnet auf die Standardfläche von 20.000 μm^2

DZ = mit der Disektormethode ermittelte SK-Zahl bezogen auf das Standardvolumen (1.000 μm^3)
 Ø = Durchschnitt aller Tiere unter Berücksichtigung der Größen der jeweils ausgezählten Areale bzw. Volumina

Die fünf unter Dauerlicht gehaltenen Meerschweinchen zeigten im Vergleich zum Tagtier nur noch ein Drittel (33,3 %) an Profilen plattenförmiger synaptischer Körperchen (SK), die Hälfte (48,3 %) an Profilen irregulärer SK, aber fast doppelt (166,9 %) so viele Profile kugelförmiger SK. Betrachtet man die Disektorwerte, so finden sich 64,9 % plattenförmiger SK, gleichviele irreguläre (100,7 %), aber ganz deutlich mehr kugelförmige (325,6 %).

Es wurden deutliche Längenzunahmen und Formveränderungen der Profile von SK bei den Dauerlichttieren beobachtet.

Wenn man den Faktor bestimmt, mit dem die Ergebnisse der mit dem Disektor bestimmten Werte multipliziert werden müssen, um die Werte der Profilzählungen zu erhalten, ergibt sich für die 8 Wochen unter Dauerlicht gehaltenen Meerschweinchen folgende Tabelle:

Faktor	Art der SK	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	Gesamt	SFM
in 1/ μ m	plattenförmig	2,97	6,22	5,51	2,44	14,99	4,28	5,05
	irregulär	3,97	4,20	6,69	1,74	3,00	3,91	1,83
	kugelig	2,49	2,16	1,86	1,74	1,60	2,05	0,36

Gesamt = Durchschnitt aller Tiere unter Berücksichtigung der Größen der jeweils ausgezählten Areale bzw. Volumina; SFM = Standardfehler des Mittelwerts

Die Ergebnisse von PZ und DZ sowie die ermittelten Faktoren demonstrieren erhebliche Schwankungsbreiten, insbesondere bei den Tieren, bei denen relativ geringe Gewebsvolumina untersucht wurden (siehe Diskussion).

3b2 Entwicklung einer validen Zählmethode für seltene Ultrastrukturen

Im Vordergrund dieser Untersuchungen (Jastrow et al. 1996b; Jastrow et al. 1997b) stand die Entwicklung einer Methode, die eine von Form und Größe unabhängige Aussage über die Häufigkeit synaptischer Körperchen in einem Gewebsvolumen machen kann. Diese ist in Methoden unter (2b5: Seite 21-23) beschrieben und wird in der Diskussion (4b3: Seite 112) kritisch betrachtet, deshalb werden hier nur die quantitativen Ergebnisse dargestellt.

Eine um 12.00 getötete, zwei Monate alte Ratte, die unter LD = 12:12 gehalten wurde, zeigte in den entlang der Schnittkanten untersuchten Arealen von insgesamt 65.630 μm^2 79 stabförmige, 9 irregulär begrenzte und 2 rundliche Profile synaptischer Körperchen pro 20.000 μm^2 . Die Profile waren sehr uneinheitlich im Gewebe verteilt, lagen teils einzeln, teils in Paaren und selten in Feldern beieinander. Die Disektorzählung, welche in einem Gewebsvolumen von 3.281,5 μm^3 (65.630 μm^2 x Schnittdicke von 50 nm) erfolgte, erbrachte Werte von 25 band- bis plattenförmigen-, 6 irregulär begrenzten-, klumpigen und 2 kugelförmigen SK. Die Relationen der verschiedenen dreidimensionalen Organellenformen zu ihren Profilen waren stark von der Morphologie abhängig. Sie betragen: Kugeln zu runde Profile = 1 zu 1; irreguläre, klumpige SK zu irregulären Profilen = 1 zu 1,5 bzw. platten- bis bandförmige SK zu stabförmigen Profilen = 1 zu 3,16.

3b3 Analyse von SK in der Rattenzirbeldrüse unter extremen Photoperioden (Jastrow & Racke 2007)

Allgemeine Beobachtungen

Die Ultrastruktur der untersuchten Rattenzirbeldrüsen zeigte keine wesentlichen Unterschiede zu den in der Literatur beschriebenen Verhältnissen (Wolfe 1965; Karasek 1981; Vollrath 1981; Calvo & Boya 1984; Nowicki et al. 2002). Synaptische Körperchen fanden sich in über 70 Prozent der Fälle in kurzem Abstand zur Zellmembran (<100 nm), wo sie häufig über feines elektronendichtes Material an leistenförmigen Membranplaques verankert waren. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals dreidimensional rekonstruierten Organellen waren lange, leicht gebogene,

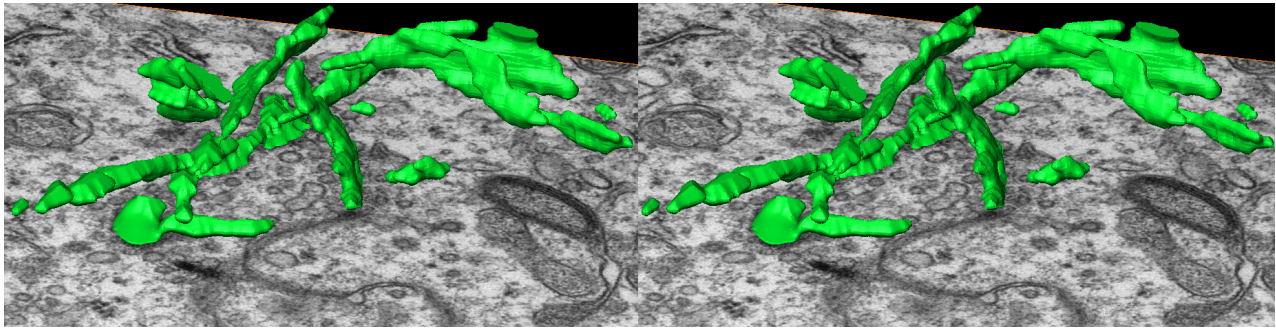


Abb. Rat1 Feld synaptischer Körperchen eines Rattenpinealozyten mit langen band- und plattenförmigen Organellen, die leicht verbogen und gedreht sind (Animationen dieser Rekonstruktion: 2.avi & Rat1.avi).

gelegentlich zusätzlich schwach verdrehte Bänder oder Platten (Abb. Rat1, 2, Animationen 2.avi, Rat1.avi, Rat2.avi, Rat2a.avi). Über 90 Prozent der insgesamt 2.828 untersuchten Profile waren stabförmig und ließen sich im Falle weiterer Verfolgung nur auf 2 - 4 Nachbarschnitten wiederfinden. Sie hätten bei der Rekonstruktion plattenförmige Organellen ergeben.

Unter den extremen Lichtbedingungen der Studie (20 Stunden Licht bzw. Dunkelheit) wurden nur 4 kleine irreguläre Profile und keine rundlichen gefunden. Bei direkt senkrechten Anschnitten war der typische pentalamelläre Aufbau der SK zu erkennen (Abb. Rat2; Animation Rat2.avi). Hier wurde die genaue Dicke der SK von 35 nm gemessen. In allen ausgewerteten Schnittserien waren SK sehr inhomogen im Gewebe verteilt: teils lagen sie in Gruppen von bis zu 10 Profilen in wenigen Quadratmikrometern eng beieinander, teils zeigten Areale von über 2.000 μm^2 kein einziges Profil. Einige Tiere hatten besonders viele Felder, andere nicht, wobei keine klare Beziehung zu den unterschiedlichen Versuchsbedingungen erkennbar war. Die Ergebnisse der Quantifizierung von SK (Disektor Zählergebnisse; **DZ**) und ihren Profilen (Einzelschnittprofilzählungen; **PZ**) sind in Tabelle Rat 1 wiedergegeben:

Tabelle Rat1: Zählergebnisse als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts

Gruppen & Bedingungen	Zahl der SK	Profilzahl	Länge in nm
L 4 D 20			
1: † 0 D, d.h. † 4 L	9,34 ± 1,85	32,32 ± 6,23	187,11 ± 38,29
2: † 4 D	11,34 ± 7,83	42,48 ± 23,65	206,41 ± 30,46
3: † 13 D	11,28 ± 3,19	37,20 ± 7,20	199,56 ± 16,30
Zusammenfassung von 1-3	10,65 ± 4,79	37,37 ± 14,47	197,69 ± 29,15
L 20 D 4			
4: † 0 D, d.h. † 20 L	11,30 ± 6,22	51,74 ± 25,35	237,31 ± 53,67
5: † 4 D	13,20 ± 3,81	47,78 ± 18,82	207,89 ± 39,64
6: † 9 L*	18,88 ± 6,51	71,08 ± 22,79	231,34 ± 45,10
Zusammenfassung von 4-6	14,46 ± 6,25	56,87 ± 23,57	225,52 ± 45,59

L = Stunden unter Licht; D = Stunden in Dunkelheit; † = getötet nach ...;

Zahl der SK = Disektorzählergebnis bezogen auf das Standardvolumen von 1.000 μm^3 ;

Profilzahl = Zahl der Profile von SK bezogen auf die Standardfläche von 20.000 μm^2 ;

* Tötung dieses Tieres 13 Stunden nach Beginn der Dunkelphase, da diese jedoch nur 4 Stunden dauerte, entspricht dies 9 Stunden nach Licht an.

Von allen Ergebnissen waren nur wenige statistisch signifikant unterschiedlich: Gruppe 6 zu 1 ($P = 0,002$ bei PZ; $P = 0,006$ bei DZ) sowie 6 zu 3 ($P = 0,006$ bei PZ; $P = 0,028$ bei DZ). Gruppe 1 hatte gerade signifikant ($P = 0,050$) weniger SK als Gruppe 5 bei DZ, wobei die PZ mit

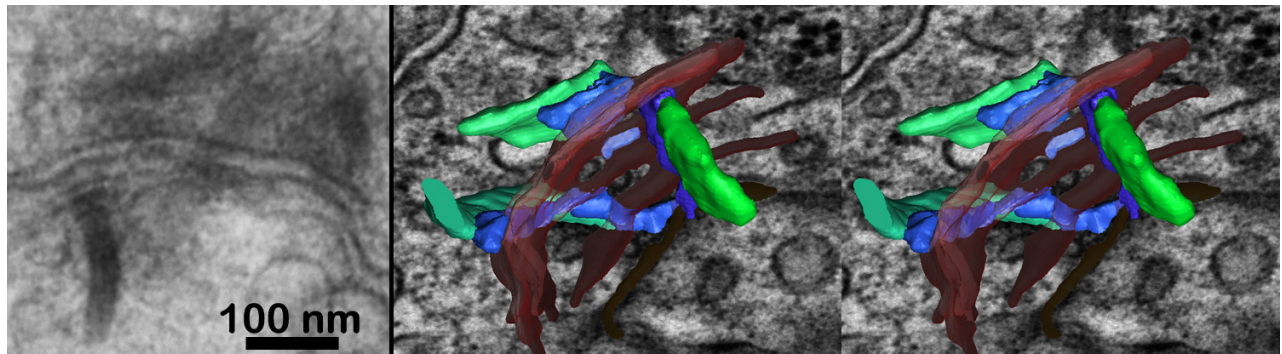


Abb. Rat2 Zwei plattenförmige und ein bandförmiges SK in einer transparenten Rekonstruktion, die so gedreht wurde, daß die pentalamelläre Struktur des unteren SK erkennbar ist (links) bzw. Stereovisualisation derselben Organellen (rechts). Die SK (grün) sind an elektronendichten Plaques (blau) an den Zellmembranen (braun) verankert (Animationen dieser Rekonstruktionen: Rat2.avi & Rat2a.avi).

$P = 0,085$ insignifikant war. Bei der Zusammenfassung aller Gruppen unter denselben Lichtbedingungen ohne Berücksichtigung des Tötungszeitpunktes waren unter LD 20:4 Bedingungen signifikant mehr Profile vorhanden ($P = 0,023$ [Anova]; $P = 0,005$ [Fisher LSD Methode]). Jedoch belegte der Tukey Test, daß diese Unterschiede nur durch die sehr deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen 6 und 2 bedingt waren. Die DZ waren nicht signifikant unterschiedlich ($P = 0,065$ [Anova]).

Die Länge vermessener Profile von SK (Tabelle Rat1) zeigte insgesamt keine statistisch signifikanten Unterschiede ($P = 0,237$; Kruskal-Wallis) für die durchschnittlichen Längen. Der T-Test demonstrierte eine signifikante ($P = 0,036$) Längenzunahme für LD = 20:4 gegenüber 4:20 Bedingungen, wenn alle Gruppen zusammengefaßt wurden (1-3 zu 4-6). Unter Berücksichtigung aller Einzelwerte nimmt die Länge der Profile unter LD 20:4 Bedingungen mit $P < 0,001$ deutlich signifikant zu. Ferner war eine signifikante nächtliche Abnahme unter LD = 20:4 ($P < 0,007$; Gruppe 4 zu 5) erkennbar. Wenn Tiere 4 Stunden nach Beginn der Lichtphase getötet wurden, waren die Profile von SK unter LD = 20:4 signifikant länger als unter 4:20 Bedingungen ($P = 0,047$; Gruppe 2 zu 5). Sie waren signifikant länger nach der längsten Licht- im Vergleich zur längsten Dunkelperiode ($P < 0,001$; Gruppe 3 zu 4) auch am Ende der Lichtphase wenn LD = 4:20 und 20:4 verglichen werden ($P < 0,001$; Gruppe 1 zu 4).

Würde man einen Faktor bestimmen, indem man bei einem Tier einer Gruppe ermittelte PZ und DZ durcheinander teilte und diesen auf die PZ der übrigen Tiere anwendete, so könnte man sich zeitaufwändige DZ für diese Tiere sparen, würde aber einen Fehler von einer 67,4 %-igen Unter- bis zu einer 159,9 %-igen Überschätzung machen. Dies wurde durch Errechnung aller möglichen Kombinationen für alle Gruppen und anschließendem Vergleich der Abweichungen zu den tatsächlich durchgeführten DZ gefunden. Die Standardabweichung der einzelnen Gruppen reicht von 9,98 bis zu 48,9 Prozent des echten DZ. Würde man bei solchen Vorgehen zusätzlich die ermittelten durchschnittlichen Profillängen einbeziehen und den Faktor (= DZ mal Länge dividiert durch PZ) in analoger Weise auf die Werte anwenden, betrüge die Fehlschätzung -60,4 bis +139,6 Prozent und die Standardabweichung läge immer noch bei 14,6 bis 35,5 Prozent für die einzelnen Versuchsgruppen.

4 Diskussion

4a Morphologie synaptischer Körperchen

Synaptische Körperchen können eine Reihe verschiedener dreidimensionaler Erscheinungsformen haben. Publiziert wurden bisher nur einige Abbildungen rekonstruierter Organellen (siehe Einleitung). Im Folgenden werden nach der Lokalisation geordnet die eigenen und von anderen Autoren erhobenen morphologischen Befunde verglichen und diskutiert.

4a1 Zirbeldrüse (*Glandula pinealis*)

1 Ratte

Die Untersuchung von Serienschnitten der Rattenzirbeldrüse (Jastrow et al. 1997a) konnte auch schon ohne tatsächliche 3D Rekonstruktion wesentliche Befunde bezüglich der Morphologie von SK erheben und bestätigt Resultate von King & Dougherty (1982a) und McNulty & Fox (1992), die auf Grundlage sagittal angeschnittener SK eine plattenförmige Grundstruktur für die meisten SK postulierten. Rundliche, auf klumpen- oder kugelförmige SK hindeutende Profile waren praktisch nicht vorhanden. Die ermittelten Höhe zu Breite Relationen von 1:1 bis 1:5 erinnern auch an die für Goldfischzirbeldrüsen ermittelten Werte von 2:5 bis 4:5 (McNulty 1980). Die band-, platten- bis scheibenförmige Grundform von SK scheint nicht für alle Spezies zu gelten. So zeigten Goniometer-untersuchungen dicker Schnitte wenig Veränderungen stabförmiger Profile, weshalb Theron et al. (1981) beim Affen die Existenz auch echter stabförmiger SK postulierten. Diese soll nur bei einzeln liegenden SK vorkommen, während in Feldern ovale Platten zu finden sind. Sogar die Existenz von Löchern in plattenförmigen SK und ihre unregelmäßige Begrenzung nach seitlich ließ sich mit der einfachen Methode nachweisen. Die, wie die spätere Untersuchung (Jastrow & Racke 2007) zeigte, zusätzlich vorhandenen Verdrehungen und Biegungen der Organellen ließen sich damit jedoch nicht erfassen.

Die ermittelten Oberflächen von SK sind aufgrund der angewandten Methode zwar nicht ganz exakt, da die vor dem ersten und nach dem letzten Profil fehlenden Flächen und die seitlichen nicht objektiv erfaßt und die Drehungen nicht berücksichtigt werden, aber durchaus geeignet, um Vergleiche und hinreichend aussagekräftige Ergebnisse zu liefern. Eine genaue Bestimmung der Oberfläche von SK würde äußerst aufwendige tomographische Rekonstruktionen einer hinreichenden Zahl von SK erfordern, wobei der Aufwand in keinem sinnvollen Verhältnis zum Ergebnis stünde. Die gefundene Oberflächen- und Volumenzunahme von SK um 19,3 % um Mitternacht kann ca. ein Drittel der Zunahme von SK Profilen bei Zählungen in definierten Arealen hervorrufen. Daher sollte an Stelle dieser seit Jahrzehnten etablierten Methode zur Quantifizierung von SK (Profilzählungen in definierten Arealen; Review: McNulty & Fox 1992) eine Strukturgrößen unabhängige gewählt werden, wie sie in Jastrow et al. (1997b) vorgeschlagen wurde. Die Größenzunahme erfolgt höchstwahrscheinlich über ein Anlagern von SK-Material seitlich an die unregelmäßigen Ränder der Platten, die aus globulären Untereinheiten bestehen (Usukura & Yamada 1987; Diskussion 4d: Seite 121). Die Bestimmung der Oberfläche der 35 nm dicken SK an die die glutamathaltigen Neurotransmittervesikel gebunden werden ist von funktioneller Rele-

vanz, weil hier die festgehaltenen Vesikel auf die Ausschleusung vorbereitet (vesicle priming; Prescott & Zenisek 2005) und in der Nähe der Membran gehalten werden, an der die meisten SK befestigt sind. Größere Oberfläche könnte längere "Ruhezzeiten" für die Vesikel bedeuten, in denen sie höhere Konzentrationen von Transmitter bzw. von den elektronendichten Arealen gelieferte Substanzen aufnehmen könnten (Osborn & Thornhill 1972; zu Funktionen von SK siehe Diskussion 4e: Seite 124). Die 27,6 prozentige Zunahme der Länge von SK Profilen um Mitternacht korreliert gut mit den ebenfalls an SD-Ratten erhobenen Befunden von Riemann (1990; 31 %) und Spiwoks-Becker (1995; 20,7 %). Beim chinesischen Hamster *Phodopus sungorus* (Matsushima et al. 1983) fanden sich mit 66 % und beim Goldfisch mit 73 % sogar noch deutlichere Längenzunahmen von SK Profilen (bezüglich der Interpretation solcher Längenmessungen siehe Diskussion 4b2 Seite 108).

Im Rahmen verschiedener Untersuchungen (Jastrow et al. 1996b, 1997a, f; Hainz et al. 1997) wurden in der Rattenzirbeldrüse synaptische Körperchen (bevorzugt in Feldern liegende) zu verschiedenen Zeitpunkten des Hell-Dunkel Zyklus rekonstruiert, um Aussagen über deren Morphologie machen zu können. Hierbei und bei der Auswertung von Profilen auf Serienschnitten (Jastrow et al. 1997a) wurden abgesehen von einer unter länger dauernder Dunkelheit beobachteten Größenzunahme der Organellen keine relevanten Unterschiede gefunden. Bei der Ratte lagen die SK seltener so ordentlich parallel zueinander angeordnet, waren in Feldern weniger zahlreich und auch nicht ganz so groß, was durch ihre geringere Breite bedingt ist, wie dies in der Zirbeldrüse von Meerschweinchen (Luo et al. 1990; Jastrow et al. 2004) oder Rhesusaffen (McNulty et al. 1986) der Fall war. Von der Grundform her waren sie leicht gebogene Platten oder Bänder, deren durchschnittliche Größe bei 300x150x35 nm liegt (Jastrow et al. 1997b). Die beiden in einem Abstand von 35 nm parallel zueinander stehenden Hauptoberflächen zeigten in der Rattenzirbeldrüse weder um 12.00 noch um 24.00 Verdickungen oder Vorwölbungen (Jastrow et al. 1997b), auch nicht bei den extremen Lichtbedingungen, unter denen die Tiere in Jastrow & Racke (2007) gehalten wurden. Die meisten SK lagen nahe der Zellmembran und waren über eine Länge von 50 - 150 nm über feines elektronendichtes Material mit elektronendichten, direkt an der Zellmembran lokalisierten Plaques verbunden (Abb. Rat2). Diese Plaques sind den rinnenförmigen Verdichtungen (arciform densities; Ladman 1958) retinaler Ribbonsynapsen analog, erschienen aber in Pinealozyten aller untersuchten Spezies dreidimensional als kurze bandförmige Strukturen. Vermutlich kontrolliert hier auch das Protein Bassoon die Anlagerung der SK an das Plasmalemm, wie dies für die Netzhaut gezeigt wurde (Dick et al. 2001, 2003).

Untersuchungen an in vitro gehaltenen Rattenpinealozyten (Karasek & Vollrath 1982; Vollrath et al. 1985; McNulty et al. 1989) zeigten neben überwiegend stabförmigen auch einige runde Profile von SK, die auf kugelförmige Organellen hindeuten. Sehr wenige solcher Profile wurden auch bei dem um 12.00 getöteten, unter LD = 12:12 gehaltenen Tagtier gefunden (Jastrow et al. 1997b) und von Spiwoks-Becker (1995) in geringer Zahl bei anderen Tagtieren angetroffen. Im Gegensatz dazu wurden bei der Disektor Studie unter extremen Lichtbedingungen (Jastrow & Racke 2007) überhaupt keine tatsächlich runden SK Profile entdeckt. Dies mag an diesen Bedingungen

oder den anders gewählten Tötungszeitpunkten liegen und paßt auch dazu, daß keine Auftreibungen an SK vorlagen, die auf Abgabe bzw. Andocken von Material hindeuten. Veränderungen dieser Art wurden in Verbindung mit runden Profilen von Spiwoks-Becker (1995) am häufigsten unter experimentellen Organkulturbedingungen gefunden. Im Gegensatz dazu fanden sich in der Meerschweinchenzirbeldrüse schon unter normalen (LD = 12:12) Bedingungen bei um 12.00 bzw. 24.00 sowie unter Dauerdunkelheit getöteten Tieren eine Reihe runder, aber auch klumpiger Strukturen, die auf Auf- bzw. Abbauvorgänge von SK hinweisen (Jastrow et al. 1997c, 2004). Irreguläre, klumpige und ringförmige Profile von SK wurden auch bei unter mehrtägiger Dauerdunkelheit gehaltenen chinesischen Hamstern deutlich häufiger als unter LD = 12:12 Bedingungen gefunden (Sakai et al. 1986).

2 Meerschweinchen: Entstehung kugeliger, klumpiger und bizarrer SK durch Dauerlicht

Die Untersuchung des Einflusses von Dauerlicht auf Pinealozyten des Meerschweinchens war auf die dreidimensionale Form ganzer synaptischer Körperchen fokussiert. Daten bezüglich der Morphologie, Ultrastruktur und quantitative Untersuchungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurden bis dato nur an Profilen von SK erhoben (Banks et al. 1985; Jung & Vollrath 1982; Huang & Taugner 1984; Khaledpour & Vollrath 1987; Lues 1971; McNeill & Whitehead 1979; Schneider et al. 1981; Vollrath 1973, 1975, 1981, 1986; Vollrath & Huss 1973; Vollrath & Howe 1976; Vollrath et al. 1983). Im Vergleich zu den geraden in etwa rechteckigen Platten, die McNulty et al. (1986) aus Rhesusaffenpinealozyten rekonstruierten, zeigten die in der vorliegenden Arbeit unter Normalbedingungen (LD 12:12) gefundenen SK bizarre Ränder und Abknickungen, womit sie zum Teil eher den halbmondförmigen von Robertson & Dickson (1987) visualisierten Organellen in der Hühnchenzirbeldrüse glichen. Gebogene Platten sind auch für die Retina typisch, treten hier aber praktisch nie in Feldern auf (Rao-Mirotnik 1995; Spiwoks-Becker 1995; Spiwoks-Becker et al. 2004). Leicht verdrehte plattenförmige SK wurden von Sobkowicz et al. (1982, 1986) auch bei rekonstruierten Ribbonsynapsen des Corti-Organs der Maus gefunden. Dort fanden die Autoren auch klumpige SK, die denen in Jastrow et al. (2004) erstmals in der Zirbeldrüse rekonstruierten ähnelten. Während in der Meerschweinchenzirbeldrüse nur relativ wenige kleinere kugelige SK vorlagen, sind kugelförmige SKs mit Durchmessern von über 100 nm eher typisch für Sinneszellen des Corti-Organs (Liberman et al. 1990), des Labyrinths (Lenzi et al. 1999, 2002, Goldberg et al. 1990; Review: Moser et al. 2006), des Seitenlinienorgans (Sato & Kawakami 1976) und für elektrische Organe (Fields & Ellisman 1985; Fields et al. 1987). Bei den kugelförmigen SK könnte es sich einerseits um Vorläufer von SK handeln, die sich schneller und daher nicht so regulär polymerisiert aus den an SK beteiligten Proteinen durch Aggregation entwickelt haben (Jastrow et al. 2004), oder um Stadien des Abbaus plattenförmiger SK wie Schmitz und Drenckhahn (1993) postulierten. Ovoide oder kugelige SK bieten bei einer relativ geringen Oberfläche nur wenigen Vesikeln die Möglichkeit zur Bindung und könnten daher, insbesondere, wenn sie groß sind, eine geeignete Speicherform von SK Material darstellen (Spiwoks-Becker et al. 2004). Wenn dieses benötigt wird, können sich hieraus wieder Platten formieren, die bei relativ geringer SK Substanz eine maximal große Bindungsoberfläche zeigen.

Umgekehrt können, wenn solche Bindung nicht notwendig ist, durch Abschnürung von Material wieder Kugeln entstehen. Wie von Adly et al. (1999) und Spiwoks-Becker et al. (2004) in der Retina gezeigt, treten diese Veränderungen schon nach nur wenigen Minuten dauernder Licht- bzw. Dunkelexposition auf.

Möglicherweise werden Proteine, die für die reguläre Polymerisation der zum Großteil aus RIBEYE bestehenden SK (siehe Diskussion 4d: Seite 121) benötigt werden, unter Dauerlichtbedingungen nicht in ausreichender Menge synthetisiert. Die klumpigen, membranfernen, kleineren SK könnten Überreste von desorganisierten ehemaligen Platten sein, die dann an die großen membranverankerten SK andocken und mit diesen verschmelzen. Das würde auch die beachtliche Volumenzunahme der großen SK erklären können. Durch das Verschmelzen von mehreren Platten könnte auch erklärt werden, weshalb die Zahl an SK in Feldern unter Dauerlicht deutlich geringer ist als unter Normalbedingungen und wie es zu Zytoplasmaeinschlüssen in breiten, dicken SK kommt (Abb. MS5, Disk 1): verknüpfen sich mehrere eng beieinander liegende Platten an ihren Rändern, ohne sich mit ihren großen flachen Oberflächen direkt parallel aneinander zu lagern, wird das dazwischenliegende Zytoplasma eingeschlossen. Aus der Tatsache, daß solche Einschlüsse möglich sind, läßt sich folgern, daß das Ribbonmaterial eine stabile, selbst für Flüssigkeiten undurchlässige Struktur ist. Die Aggregation von RIBEYE Makromolekülen ist folglich in gewisser Weise organisiert und unflexibel. Würden sich die Proteine wie Öltropfen miteinander nicht nur verbinden, sondern dabei auch vermischen können, so würde alles nicht dazugehörige Material herausgedrängt und ein homogenes Ganzes entstehen. Auch die Formierung der rechteckigen Struktur (Abb. MS4) wäre gut durch eine Aneinanderlagerung mehrerer Platten zu erklären (Jastrow et al. 2004). Unter normalen Bedingungen zeigen SK eine typische pentalamelläre Struktur (Abb. Disk 8), die bei den bizarren SK der Dauerlichttiere nur noch in wenigen kleinen Bereichen erhalten war. In den angrenzenden verdickten Bereichen, in denen auch starke Krümmungen von bis zu 90° auftreten, ist die molekulare Organisation der SK verändert, eventuell sind hier, wie oben vermutet, auch noch unbekannte, für die für die reguläre Polymerisation von SK relevante Proteine nicht ausreichend vorhanden.

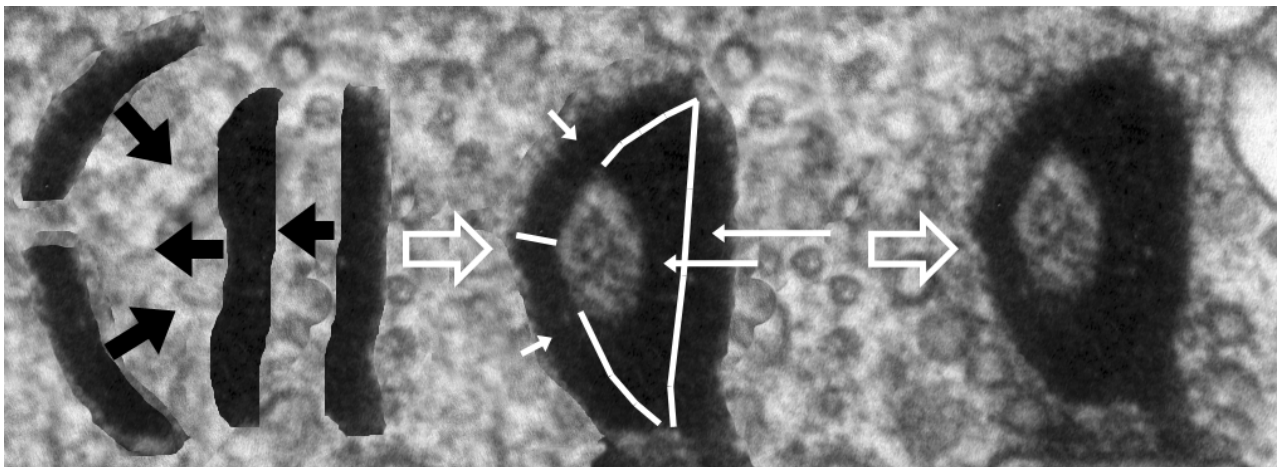


Abb. Disk1 Sehr wahrscheinlich entstehen große SK mit Zytoplasmaeinschlüssen durch Aneinanderlagerung einzelner plattenförmiger SK. Bei der Aggregation und der anschließenden Verschmelzung der am Ende der Pfeile gezeigten SK verbleibt in deren Mitte Zytoplasma, wodurch das rechts gezeigte Profil erklärbar ist.

Regulär aufgebaute Platten mit einer glatten Oberfläche ermöglichen den schnellstmöglichen, da direkten Transport von Vesikeln zur Zellmembran (Jastrow et al. 1997c), zumal die an den membranabgewandten Seiten der U- oder V-förmigen SK gebundenen Vesikel die Zellmembran nur erreichen könnten, wenn sie auf die Gegenseite hinüberwanderten. Eine Verlagerung von Vesikeln entlang der SK im Sinne der von (Bunt 1971) zuerst postulierten Förderbandhypothese wird bei solchen U- bzw. V-förmigen Organellen äußerst unwahrscheinlich, müßte doch von der zentralen Vertiefung über den Rand der SK hinweg ein sinnvoll gerichteter Vesikeltransport zur Gegenseite erfolgen. Plausibler ist, insbesondere für die unter Dauerlicht gefundenen stark veränderten SK, eine Funktion als Vesikelspeicher. In Analogie zur Retina, bei der gezeigt wurde, daß die Feuerrate unter Lichtbedingungen reduziert ist (Juusola et al. 1996, Wagner 1997), ist davon auszugehen, daß Pinealozyten bei unter Dauerlicht gehaltenen Tieren ebenfalls weniger aktiv sind. Dies läßt sich auch daraus folgern, daß Lichtstimulation zu einem Abfall der Pinealozytenaktivität führt (Taylor & Wilson 1970; Reuss 1987).

Dauerlicht führt zu erheblichem physiologischem Stress (Cruz et al. 2003) und verändert auch die Morphologie von Pinealozyten (Kus et al. 2004), und wie von Vollrath & Huss (1973), Vollrath (1986) sowie hier gezeigt, massiven Veränderungen von SK. Die Tatsache, daß die gepaarten Felder von SK nur unter Dauerlicht auftraten, hat sicherlich einen physiologischen Grund. Vollrath & Huss (1973) sahen darin eine bidirektionale Kommunikationsverbindung von Zirbeldrüsenparenchymzellen. Außer einer lokalen Stimulation, auf die eine schnellstmögliche Reaktion praktisch von derselben Stelle aus durch das gegenüberliegende gepaarte Feld erfolgen kann, ist es auch möglich, daß gepaarte Felder entstehen, weil so der Verlust des bei der Reizübertragung freigesetzten Glutamats (Redecker & Veh 1994) minimiert werden kann. So könnte Glutamat auf beiden Seiten des Interzellularraums durch Endozytose bzw. hier auch vermutlich vorhandene Glutamattransporter gleich am Ort der Freisetzung wieder eingefangen werden. Dies könnte für Zirbeldrüsenparenchymzellen wichtig sein, da sie nicht, wie etwa Photorezeptorterminalen der Retina, über riesige Mengen freier Transmittervesikel verfügen (Jastrow et al. 2004). In Zapfen- und Stäbchentterminalen wurde ein solches Recycling durch den Nachweis des exzitatorischen Aminosäuretransporters EAAT5 bereits belegt (Wersinger et al. 2006).

In der Retina von Mäusen führt Dauerlicht zu einer starken Zunahme von kugelförmigen SK und keulenförmigen Profilen, die auf lokale Verdickungen von SK hindeuten (Spiwox-Becker et al. 2004). Felder von SK oder so bizarr veränderte Profile wie in der Meerschweinchenzirbeldrüse lagen jedoch nie vor. In der Retina sowie in der Zirbeldrüse bei nicht in Feldern liegenden SK unter normalen Lichtbedingungen ist stets nur die basale lange Endkante eines plattenförmigen SK an Plaques (bzw. der ad in der Retina) der Zellmembran über elektronendichtes Material befestigt. Im Gegensatz zu dieser allgemein üblichen Membranverankerung, die unter Dauerlichtbedingungen in der Meerschweinchenzirbeldrüse nur selten zu finden ist, sind es hier mittennahe Bereiche der platten-, rinnen- oder U-förmigen SK, die im Bereich ihrer stärksten Biegung eine relativ breite Membranverankerung aufweisen. Das hat zur Folge, daß in solchen Fällen von der

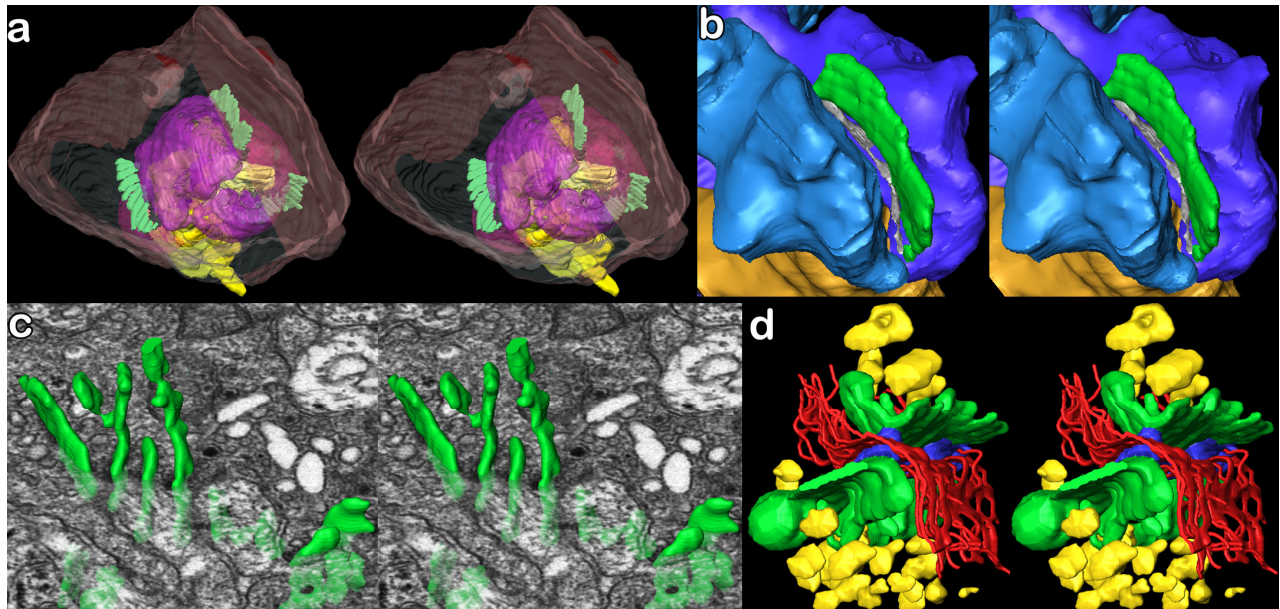


Abb. Disk2 Während im gesamten untersuchten Nicht-Dauerlichtmaterial z.B. bei Stäbchen (a) bzw. Zapfen (b) der menschlichen Retina und der Hühnchenzirkeldrüse (c) stets nur eine lange Kante eines synaptischen Körperchens an der Zellmembran befestigt ist, sind die rinnenförmigen Pinealozyten SK unter Dauerlicht gehaltener Meerschweinchen (d) im Bereich ihrer stärksten Biegung membranverankert (dunkelblau; Animationen a: Homo10.avi, c: Huhn.avi, d: 03.avi).

Verankerung aus in zwei mindestens 90 Grad zueinander stehenden Richtungen SK Material membranverankert wird (Abb. Disk2-d). Das hat wiederum zur Folge, daß nur die an der membran nahen Seite der SK gelegenen Vesikel schnell zur nahen aktiven Zone der Synapse abgegeben werden können. Im Gegensatz dazu stehen die band- bis plattenförmigen SK an anderen Lokalisationen ungefähr senkrecht zur Zellmembran und können so von beiden Seiten her ihre Vesikel gleichschnell für die Exozytose freigeben, was sicher wesentlich effektiver ist.

Während die Retina von BALB/c Mäusen stets SK zeigte, konnte in Zirbeldrüsen dieser gen-defekten Albinomaus kein einziges SK gefunden werden (Satoh & Vollrath 1988). Dies belegt klar, daß man von der Morphologie von SK in Photorezeptoren keine Rückschlüsse auf etwaige Befunde im Pinealorgan ziehen kann.

4a2 Netzhaut (Retina)

4a21 Profilzählungen

Während generelle Verdickungen synaptischer Körperchen ein Organkultureffekt sind (Spiwox-Becker et al. 2004), belegen partielle Verdickungen, die zu keulenförmigen Profilen führen, morphologische Veränderungen durch Abgabe bzw. Aufnahme von SK Material, welches sich in Form von nicht mehr an die Zellmembran gebundenen Kugeln oder Klumpen von den membranständigen SK ablöst bzw. wieder damit verschmilzt. Aus diesem Grund wurden keulenförmige, runde und klumpige Profile bei den Auswertungen als "atypisch" zusammengefaßt und ihr prozentualer Anteil an den beurteilbaren Profilen bestimmt. Da kurze Stümpfe von SK praktisch keine Aussage über die Organellen erlauben, wurden sie bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt und nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen (Versuche Js & Jb) bezüglich der Veränderung von SK-Profilen organkultivierter Retinae von Ratten bzw. BALB/c Mäusen unter Ca^{++} -Gabe bzw. -Entzug zeigten keinen so klaren Einfluß von Ca^{++} auf die Morphologie von SK wie Spiwox-Becker et al. (2004) und umfangreiche noch unpublizierte Befunde von Spiwox-Becker et al. Unter Licht organkultivierte, chemisch in Dunkelheit versetzte Retinae wiesen in den Untersuchungen Js & Jb nur insignifikant weniger atypische SK-Profile auf. Analog behandelte BALB/c Mäuse von Spiwox-Becker et al. (2004) zeigten aber einen signifikanten Abfall kugel- und keulenförmiger Profile. Ein Ca^{++} -Anstieg könnte somit weniger starke Auswirkungen haben als der Ca^{++} -Entzug, denn unter letztgenannter Bedingung konnten die o.g. Untersuchungen von Spiwox-Becker et al. einen noch deutlicher signifikanten Anstieg atypischer Profile unter ebenfalls mit EGTA organkultivierten Retinae der BALB/c Maus belegen. Während in der Untersuchung Js bei der Ratte durch einen "Ausreißer" in der chemischen Lichtgruppe die Signifikanz für die Zunahme atypischer SK knapp verfehlt wurde, zeigte der Versuch Jb einen insignifikanten Abfall statt Anstieg atypischer SK. Dies ist am ehesten durch die Verwendung des L-Typ Ca^{++} -Kanalblockers zu erklären, da Nifedipin nur ca. 30 Prozent des Effektes des direkten Ca^{++} -Fängers EGTA erreicht, was für Veränderungen von SK wahrscheinlich noch nicht ausreicht. Die deutlich umfangreicheren Experimente von Spiwox-Becker et al. (s. oben) liefern, verglichen mit Js & Jb zuverlässigere Aussagen, zumal in der vorliegenden Studie bei den Kontrolltieren im Vergleich zur Literatur (z.B. Adly et al. 1999; Spiwox-Becker et al. 2004) schon eine "zu hohe" Zahl veränderter SK vorlag. In conclusionem ist die Morphologie von SK wahrscheinlich von der Ca^{++} -Konzentration abhängig, wobei dies bei BALB/c Mäusen deutlicher als bei Ratten ausgeprägt ist, wie auch die Tatsache zeigt, daß nur in BALB/c Mauszapfenterminalen veränderte SK nachweisbar waren (Abb. Jb1).

Da ein Profil durch einen zufälligen Anschnitt eines ganzen SK entsteht, ist auch bei Beurteilung von 50 - 100 Profilen verschiedener SK unter gleichen Versuchsbedingungen keine valide morphologische Beurteilung möglich (siehe Diskussion 4b2: Seite 108). Wenn z.B. eine 150 nm durchmessende Verdickung an nur einer Stelle eines auf 12 Serienschnitten getroffenen SK vorliegt, so ist sie nur auf 2 - 3 Schnitten erkennbar, auf 9 - 10 Schnitten erscheinen aber normale Profile. Das war z.B. bei der Rekonstruktion von SK bei BALB/c Mäusen unter verschiedenen Licht/Dunkel Bedingungen oft zu beobachten. Hierdurch kommt es zu einer Unterschätzung veränderter SK. Da im Rahmen dieses Projektes die Morphologie ganzer SK korrekt und dreidimensional erfaßt werden sollte, wurde auf weiteren Auswertungen von Profilanschnitten verzichtet.

4a22 Auftreten synaptischer Körperchen in der Ontogenese

Da die erste Entstehung von SK in frühen Entwicklungsstadien eindeutig die bei deren Neusynthese ablaufenden Vorgänge aufzeigt, werden hier entsprechende Befunde kurz zusammengefaßt. In menschlichen Zapfenterminalen finden sich vesikelumgebene SK ab der 12. Woche (83 mm Scheitel-Steiß-Länge = SSL) neben vielen Polyribosomen kernnah im Zytoplasma; einige aber schon an der noch nicht eingestülpten Zellmembran gegenüber eines postsynaptischen Fortsatzes (Hollenberg & Spira 1973; Spira & Hollenberg 1973). Beim Meerschweinchen lagen

einige der SK paranukleär, andere tiefer gruppiert im Zytoplasma (nur bei Zapfen), und eine Reihe war offensichtlich an der Zellmembran entstanden. In allen Fällen ließ sich in der Nähe eine synaptische Spindel, bestehend aus einem 130 nm durchmessenden Bündel aggregierter Filamente erkennen (Spira 1975). Erst am 43. Tag erschienen an bzw. nahe den Zellmembranen erste SK in Meerschweinchenbipolarzellaxonen der IPS (Spira 1975). Erste, in Zapfenterminale invaginierende Fortsätze demonstrierten Hollenberg & Spira (1973) bzw. Spira & Hollenberg (1973) in der 15. Woche (120 mm SSL), einem Zeitpunkt, zu dem sie außer auswachsenden Zilien noch keine Anzeichen von Außengliedern der Sinneszellen erkannten. Dies bedeutet, die Ribbonsynapsen sind schon ausgebildet, bevor die Sinneszellen ihre Funktion aufnehmen können. In Stäbchen fanden Hollenberg & Spira (1973) SK ab der 18. Woche (156 mm SSL). Yamada & Ishikawa (1965) erwähnen das Auftreten von SK erst ab der 27. Woche, dem Zeitpunkt, zu dem die Bildung von Außensegmenten beginnt.

Bei *Macaca mulatta* fanden Smelser et al. (1974) erste SK ab dem 76. Tag in Bipolarzellaxonen und Zapfenterminalen. Viele der als etwas dicker beschriebenen Organellen hatten noch kaum angedockte Vesikel und lagen ungeordnet im Zytoplasma. Invaginationen oder gar Triaden waren noch nicht ausgebildet und lediglich ein Zilium am Apex der Zapfen erkennbar. In Stäbchen konnten SK erst ab dem 92. Tag gefunden werden, wobei einige davon bereits an ads verankert waren. Sie lagen an der schon erste Invaginationen zeigenden Zellmembran. Andere erschienen nahe der Kernmembran bei elektronendichten Golgi-Apparat-assoziierten Vesikeln (dense bodies), woraus die Autoren schlossen, SK würden daraus hervorgehen und zur Membran wandern, wonach sich die Triaden formen sollten. In Anbetracht der enormen Größe der abgebildeten dense bodies im Vergleich zu SK und fehlender, beweisender Originalabbildungen von Zwischenstufen ist diese Hypothese jedoch unwahrscheinlich.

Genauere Informationen und eine Abbildung zur Entstehung von SK lieferten Weidmann & Kuwabara (1968, 1969), die bei der Ratte im Verlauf des 6. postnatalen Tages im basalen Bereich der Photorezeptoren Aggregationen feingranulären elektronendichten Materials (kleine unscharf begrenzte rundliche Profile) beobachteten, an welches sich Vesikel anlagerten, wie dies auch von Hermes et al. (1992) für den 4. bis 6. Tag bei Wistar-Ratten beschrieben wurde. Anfangs waren bei der letztgenannten Untersuchung nur 30 % der noch meist rundlichen SK über Vesikel an der Zellmembran befestigt, da arciform densities erst ab dem 7. Tag nachweisbar waren. Weidmann & Kuwabara (1969) zeigten, daß am 6. Tag in nur wenigen Stunden dieses Material aggregierte und am Ende dieses Tages typische SK in Stäbchen- und Zapfenterminalen formte. Von etwa diesem Zeitpunkt an fanden auch Hermes et al. (1992) einen 60-fachen, signifikanten Anstieg typischer stäbchenförmiger SK Profile sowie eine 180-fache Zunahme intermediärer- und eine 75-fache Zunahme rundlicher SK-Profile. Ab dem 15. Tag waren deutliche Profilhöhe- und Profillängenunterschiede zwischen um 11.00 und um 23.00 getöteten Tieren nachweisbar, während unter Dauerdunkelheit gehaltene diese nicht zeigten. Interessanterweise beobachteten Weidmann & Kuwabara (1969) die Entstehung von SK in Bipolarzellaxonen der inneren plexiformen Schicht erst 2 Tage später, d.h. ab dem 8. Tag. Photorezeptoraußenglieder

bildeten sich in der Zeit vom 7. bis 10. Tag, ihre korrekte Ausrichtung war am 14. Tag abgeschlossen; erste Retinogramme konnten Weidmann & Kuwabara (1969) ab dem 11. Tag ableiten; ab dem 14. Tag waren diese mit denen adulter Tiere identisch.

Ähnliche Beobachtungen bei der Entwicklung der Mausretina schildert Olney (1968), der ab dem 2. postnatalen Tag neben reichlich Polyribosomen perinukleär kleine vesikelassoziierte elektrodichte Strukturen fand, die bis zum 6. bis maximal 12. Tag zur Basis der Rezeptortermine wanderten und dort ab dem 7. Tag Synapsen ausbildeten. Ab dem 10. Tag wies er typische invaginierte Synapsen bei Stäbchen und Zapfen nach. In Bipolarzellaxonen fand er ab dem 11. Tag erste und ab dem 14. Tag reichlich SK, die in loco entstanden waren. Beim Kaninchen fanden McArdle et al. (1977) SK am Tag der Geburt in retinalen Photorezeptoren oberhalb oder in der Nähe der basalen Zellmembran, am 3. Tag lagerten sie sich hier dieser gegenüber 1 bis 2 postsynaptischen Fortsätzen an, ab dem 6. Tag zeigten sich 3 postsynaptische Fortsätze, die zunehmend invaginierten. In Bipolarzellen konnten sie SK erst ab dem 9. postnatalen Tag in der oberen inneren plexiformen Schicht (IPS) entdecken; Stunden später lagerten sich diese der Membran an, zeigten mehr gebundene Vesikel und erschienen auch in der unteren IPS.

Zusammenfassend legen die eben geschilderten Befunde eine Bildung von SK durch kleinste, elektronenmikroskopisch nicht mehr erkennbare Untereinheiten nahe, die sich im Zytoplasma der Zellen aggregieren, dann regulär polymerisieren und vermutlich, sobald Verankerungsproteine wie Bassoon in ausreichender Menge vorhanden sind, an die Membran wandern, um dort befestigt zu werden. Da mittlerweile die molekularen Komponenten von SK bekannt sind (siehe Diskussion 4d Seite 121), ist die in älteren Arbeiten (De Robertis & Franchi 1956; Spadaro et al. 1978) postulierte Entstehung von SK durch Invagination präsynaptischer Membranen widerlegt.

4a23 Ribbonsynapsen in Stäbchen

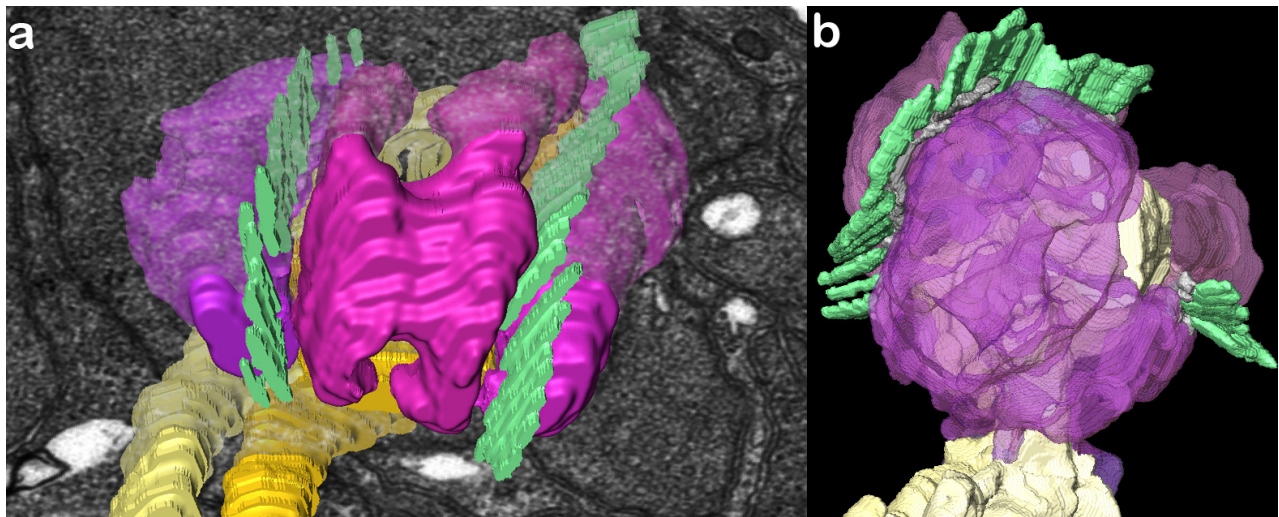


Abb. Disk3 Synapsen zweier menschlicher Stäbchenendkolben mit 2 SK, 2 Bipolarzellendriten und aufgetriebenen Terminalen dreier (a) bzw. zweier (b) verschiedener Horizontalzellen, von denen sich bei a das mittlere so teilt, daß es an beiden Ribbonsynapsen ein laterales Element bildet. a: An der Basis beider SK denke man sich rinnenförmige ads darüber in den Gräben zwischen Horizontalzellfortsätzen und SK die funktionell wichtigen aktiven Zonen (die beiden letztgenannten Strukturen sind der Übersicht halber hier nicht, aber in Abb. Disk 3c dargestellt). b: hier sind die ads grau visualisiert, die aktiven Zonen jedoch nicht; letztere schließen sich direkt an den Seitenkanten der ads an; Farben wie in Abb. Homo3; Animation von b: Disk3.avi).

Beim Menschen und Säugetieren sind die Axone von Stäbchen terminal kolbenartig verdickt. Im basalen Bereich an einem unter 200 nm durchmessenden rundlich Hilus treten invaginierte Fortsätze der an den Ribbonsynapsen beteiligten Fortsätze ein (Abb. Disk3; Animationen Homo 4.avi, 5.avi, 6.avi, 9.avi, 10.avi, Disk3.avi). Ferner finden sich noch eine Reihe basaler Kontakte in der Nähe dieser Öffnung, so auch Fortsätze von Zapfen, während der nicht basale Teil des Terminals von Fortsätzen von Müller Gliazellen, wie u.a. von Cohen (1965) geschildert, umgeben ist. Während das für die vorliegende Schrift untersuchte menschliche Material 1-3 SK zeigte, lag unter Dunkelbedingungen in den allermeisten Fällen bei den BALB/c Mäusen und Ratten (abgesehen von den Organkulturbefunden der Versuche Js und Jb) nur ein einziges SK in einem Stäbchenterminal vor. SK waren in einer rinnenartigen Ausstülpung der Stäbchenterminale stets zwischen stark aufgetriebenen Horizontalzellendigungen zu finden, wobei es sich in Übereinstimmung mit Linberg & Fisher (1988) um präsynaptische, also axonale Fortsätze handelte. Meist gehörten letztere zu zwei verschiedenen Horizontalzellen, in einigen Fällen gingen sie aber auch nur aus einem, terminal geteilten Fortsatz hervor. SK waren basal an einer langen, nicht unterbrochenen arciform density (ad) befestigt. Zwischen den invaginierten Fortsätzen von Horizontal- und Bipolarzellen finden sich ein bis fünf vom Stäbchenterminal selbst ausgehende fingerförmige in Richtung Synapsenzentrum ziehende Fortsätze, bzw. Divertikel (Abb. Homo5; Animation Homo5.avi), die die Kontaktflächen insbesondere zu den Bipolarzellendriten hin vergrößern und auch ein Membranreservoir für die Exozytose darstellen. Solche Fortsätze wurden auch von Missotten (1965a) und Linberg & Fisher (1988) beim Menschen, von Rao-Mirotnik et al. (1995) bei Katzen und von Evans (1966) bei anderen Vertebraten gefunden. Missotten (1965, - et al. 1963) fand in ca. 5 Prozent untersuchter menschlicher Stäbchenterminale noch einen dritten Fortsatztyp, der mit großen Endaufreibungen tief invaginierte. Er zeigte multivesikuläre Körperchen, Lysosomen, unzählige synaptische Vesikel und hatte keine klare Beziehung zu SK. Eine Verfolgung zu den Ursprungszellen gelang Missotten nicht.

Im Bereich von Stäbchenterminalen unterscheidet Sjöstrand (1998a,b) insgesamt 7 verschiedene Einzelsynapsenarten: 1. die Septumsynapse (eigentliche Ribbonsynapse zu der das SK gehört) mit der aktiven Zone, 2. die "end chamber" Synapse an der lateralen Spitze der Horizontalzellfortsätze, 3. die Horizontalzell-Horizontalzellsynapse, die direkt unter der ad gelegen ist zwischen den Fortsätzen der großen und kleinen Horizontalzelle, 4. die Horizontalzell-Bipolarzellsynapse, 5. eine direkte Stäbchen-Bipolarzellsynapse unterhalb der Endaufreibung der Stäbchenbipolarzelle, 6. die Zapfen-Stäbchensynapse außerhalb der Invagination und 7. eine Zapfen-Bipolarzellsynapse auch außerhalb der Invagination; Abb. siehe Sjöstrand 1998b, Fig. 37).

Migdale et al. (2003) publizierten komplett am PC generierte 3D-Rekonstruktionen von Stäbchen Ribbonsynapsen bei Affen, Katzen und Mensch. In den 32 untersuchten Stäbchenterminalen fand sich stets eine Invagination postsynaptischer Elemente, die oft als Triade auftraten, d.h. zwei laterale Horizontalzellaxone (Kolb 1970; Mariani 1983a) und ein zentraler Bipolarzellendrit. In seltenen Fällen kann ein zentrales Element einer Stäbchenribbonsynapse auch ein Dendrit einer bplexiformen Zelle sein (Mariani 1982, 1983b). Jede Ribbonsynapse zeigte 1-2, beim Affen

auch einmal 3 SK, wobei jedes SK durch 1-2 ads an der präsynaptischen Membran verankert war. Andere Autoren erhoben in Stäbchen der Katze ähnliche Befunde: Boycott & Kolb (1973a) 1-2 SK pro Terminal; Smith et al. (1986) stets 2 SK und 2 synaptische Zonen; 1-2 SK, 2 bis selten 3 Horizontalzellaxonterminale und 2 zentrale Bipolarzellendriten in der Area centralis (Kolb 1974, 1977). Ontogenetische Unterschiede in der numerischen Dichte und Zahl von SK in Stäbchenterminalen der Area centralis der Katze fand Rapaport (1989) mit einem Maximum vom 68. - 76. postkoitalen Tag. Während dieser Periode waren 2-3 SK pro Terminal üblich, während adulte Tiere nur selten mehr als 1 SK aufwiesen. Rao-Mirotnik et al. (1995) rekonstruierten Ribbonsynapsen von 13 hell- und 13 dunkeladaptierten Katzenretinae und schilderten dabei stets Tetraden mit 2 Bipolarzellendriten und 2 Horizontalzellfortsätzen. In 95 % von 335 Synapsen fanden sie 1 und in 5 % 2 bogenförmige SK, die eine Gesamtlänge von $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ und eine durchschnittliche Oberfläche von $0,77 \pm 0,15 \mu\text{m}^2$ pro Seite hatten, womit die Autoren Platz für ca. 640 Vesikel auf der Oberfläche eines SK errechneten. In den Synapsen mit 2 SK erschienen diese wie ein in zwei Stücke gebrochenes SK, zumal die Fragmente unmittelbar in Fortsetzung hintereinander lagen. Sie waren einzeln gesehen kürzer als komplette SK und boten zusammengenommen nur unbedeutend mehr Vesikeln (660) Platz zur Bindung. Die Länge der aktiven Zonen gaben Rao-Mirotnik et al. (1995) mit $2,14 \pm 0,19$ bei dunkeladaptierten und $2,52 \pm 0,27 \mu\text{m}$ bei helladaptierten Stäbchenterminalen an. Im Vergleich dazu war bei den in vorliegender Arbeit untersuchten menschlichen Stäbchenribbonsynapsen pro Stäbchenendkolben die summierte Länge der aktiven Zonen (Abb. Disk3c) etwas länger (Durchschnitt: $2,83 \mu\text{m}$; siehe Ergebnisse 3a251: Seite 61). Beim Meerschweinchen ist sie bei einer SK Oberfläche von $0,5 \mu\text{m}^2$ ca. $2,5 \mu\text{m}$ lang (Sjöstrand 1958); beim Affen $2,4 \mu\text{m}$ bei $1,07 \mu\text{m}^2$ SK Oberfläche (Rao-Mirotnik et al. 1995). Die im Rahmen des hier dargestellten Projektes rekonstruierten Stäbchenribbonsynapsen zeigten 1-3 SK, in der überwiegenden Zahl der Fälle aber nur 2 SK, wie es auch von Dieterich & Rohen (1970) für den Menschen beschrieben wurde; Missotten postulierte hier ein oder mehrere bandförmige SK (1960a) bzw. halbmondförmige Scheiben (1965a). Linberg & Fischer (1988) fanden bei ihren Serienschmittanalysen von 21 menschlichen Stäbchenterminalen 18 mal 2 und 3-mal ein SK, 1-2 Horizontalzellfortsätze und nur 1 oder 2 Bipolarzellendriten. Diese vergleichsweise niedrige Zahl könnte dadurch bedingt sein, daß Linberg & Fischer (1988) deutlich dickere (80 nm) Schnitte untersuchten, was gerade im Bereich des Terminaleintritts, in dem die Fortsätze nur ca. 30 nm Durchmesser haben, Probleme bereitet haben könnte. Migdale et al. (2003) schildern Inter- und Intraspeziesvariationen für die dreidimensionale Form insbesondere der 2-4 Horizontalzellfortsätze und 1-3 Bipolarzellendriten. Dazu passen auch die Angaben von Missotten et al. (1963), die in 41 Stäbchenterminalen nicht zentraler menschlicher Retinae 2 - 7 (meist 4 - 5) invaginierte Fortsätze fanden, wobei nicht zwischen Bipolar- und Horizontalzellfortsätzen unterschieden wurde. Fünfzig später untersuchte Stäbchenterminale des Menschen zeigten 1 - 4 (Missotten 1965b) bzw. 1-5 Bipolarzellendriten und 2-3 Horizontalzellfortsätze (Missotten 1965a).

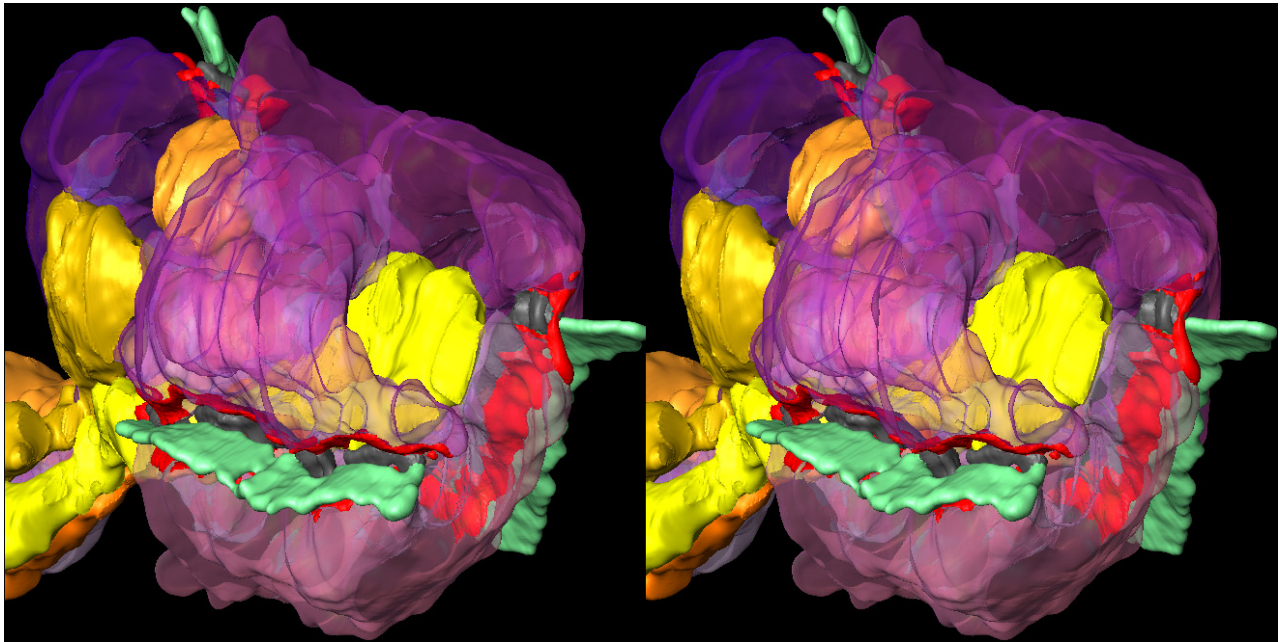


Abb. Disk3c In diesen 3 Ribbonsynapsen eines Stäbchenterminals sind die aktiven Zonen (rot) als verbogene Rinnen lateral den ads (grau) und basolateral der SK (grün) erkennbar. Die 4 im Zentrum der Invagination liegenden Bipolarzeldendriten (gelb-orange) werden nach Außen hin nur inkomplett von 3 Horizontalzellfortsätzen (violett) bedeckt, die sich terminal flächig erweitern und zwischen sich Rinnen ausbilden, in welche die Synapsen eingesenkt sind (Animation dieser Rekonstruktion: Disk3c.avi; vgl. Abb. Homo10 und zugehörige Animationen).

Rao-Mirotnik et al. (1995) sehen das Bauprinzip und die generelle Größe von Stäbchenterminalen von Maus bis Mensch als ziemlich einheitlich an. Jedoch finden sich in diversen Details speziesspezifische Abweichungen wie z.B. bis zu 3 tatsächlich verschiedene SK in menschlichen Stäbchenterminalen; die stärkere Verzweigung dieser Terminale und die deutlich tieferen Invaginationen als bei Ratte und Maus. Bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten menschlichen Material teilte sich in einigen Fällen ein einziger Horizontalzellfortsatz in zwei laterale Elemente auf, wie dies auch Cohen (1965) fand. Auch mehrere Horizontalzellfortsätze können sich in grob hufeisenförmige Lappen aufteilen, die nur in einem dünnen zentralen Bereich miteinander verbunden sind, wie es auch Missotten (1965) mit einem Tonmodell demonstrierte. Beim Kaninchen zeigen Stäbchenendkolben neben einem SK stets 2 laterale Horizontalzellfortsätze und 1-2 zentrale Dendriten, wie Sjöstrand (1958, 1970, 1974, 1989a, b) anhand einer immensen Zahl von Rekonstruktionen und Modellen demonstrierte. Ähnliche Verhältnisse im grundlegenden Aufbau von Stäbchenterminalen liegen laut Sjöstrand (1956) auch bei Flußbarsch, Frosch, Katze und Kuh vor. Spiwox-Becker (1995) fand beim Rind neben überwiegend stabförmigen Profilen von SK auch in 1-2 % der Fälle bizarre Profile, die nicht von den normalerweise hufeisenartig gebogenen, flachen SK stammen konnten. Solche Profile waren unscharf konturiert, oft flächig zum Teil X-förmig oder vogelschwingenartig gebogen. Die Auswertung von Profilen ergab üblicherweise nur ein SK pro Terminal, in 6,3 % auch 2, deren Profile dann öfters parallel nebeneinander lagen. Bei Ratten fand die Autorin in nur 0,8 % der ca. 18.000 analysierten Einzelschnitte Profile, die auf das Vorhandensein zweier verschiedener SK hindeuteten. Ein synaptischer Endkolben ist bei den Stäbchenzellen, deren Kerne die unterste Lage der äußeren Körnerschicht bilden, nicht ausgebildet, die postsynaptischen Elemente sind jedoch mit den tiefer in Endkolben gelegenen

Ribbonsynapsen identisch (Hebel 1971). Vorgenannter Autor fand in Stäbchensynapsen des Hundes Auftreibungen an stabförmigen SK Profilen, runde Profile und auch mehrfach Gruppen parallel nebeneinander gelegener Profile. Seine Abbildung (21a) weist auf Felder plattenförmiger SK hin, was im Vergleich zu anderen Spezies und dem hier untersuchten Material für normale Stäbchenterminale sehr ungewöhnlich ist.

Im Gegensatz zu Säugetieren können Amphibien deutlich mehr SK in Stäbchenterminalen aufweisen, z.B. der Salamander (*Ambystoma tigrinum*) bis zu 9, von denen selbst in dissoziierter Zellkultur noch 73 % an der Zellmembran gebunden blieben (Townes-Anderson et al. 1985). Bei Schildkröten wurden 8-9 sehr lange SK in Stäbchenterminalen gefunden (Lasansky 1971; Goede & Kolb 1994).

Bei den für diese Habilitationsschrift untersuchten Serienschritten konnten in Stäbchen von SD-Ratten bzw. BALB/c Mäusen nur selten zwei oder mehr plattenförmige SK nachgewiesen werden. Die Auswertung von jeweils über tausend Anschnitten von Stäbchenterminalen (Versuche Js/Jb) zeigte bei der Ratte in 4 Fällen, bei BALB/c Mäusen in 3 Fällen stäbchenförmige Profile, die eindeutig von zwei verschiedenen SK stammten.

Bei dem langen Einzel-SK in Abb. 5, Homo 8; Animationen 5.avi bzw. Homo8.avi war keine Unterbrechung der ad zu finden, wie Migdale et al. (2003) es für Ribbonsynapsen mit nur einem großem SK postulierten, weshalb diese Aussage relativiert werden muß. Unterbrochene ads waren auch bei den hier untersuchten Stäbchenribbonsynapsen von Nagern praktisch nie vorhanden. Migdale et al. (2003) beschrieben, daß sich lange SK in der Region, in welcher ihre ad unterbrochen ist, stark verdrehen. Solche relativ in der Mitte von SK gelegenen Regionen mit starker Richtungsänderung wurden auch bei den selbst durchgeführten Untersuchungen bei Mensch, Maus und Ratte sowie von McCartney & Dickson (1977, 1985) bei Meerschweinchenzapfen SK festgestellt. Jedoch konnte in diesen Bereichen keine Unterbrechung der ad gefunden werden. Johnson et al. (2007) fanden in 95 % der Stäbchenterminalen von C57BL/6J Mäusen nur ein, in 5 % 2 SK und meistens nur ein tubuläres Mitochondrium.

Die zumeist kolbig aufgetriebenen Terminalen von Stäbchen zeigen basal einen Hilus, durch die Horizontalzellfortsätze und Bipolarzellendriten eintreten, die an der Ribbonsynapse beteiligt sind (Missotten 1965a). Die terminal oft bizarr erweiterten bis verzweigten Horizontalzellfortsätze sind sowohl für die Ribbonsynapse selbst als auch für die Signale ableitenden Bipolarzellendriten präsynaptisch (Linberg & Fischer 1988; Nelson 1977). In seltenen Fällen weisen sie beim Menschen zylinderförmige Strukturen mit regelmäßiger, kristallgitterartiger, aber zirkulär orientierter Innenstruktur in ihrer terminalen Auftreibung auf (Craft et al. 1975; Linberg & Fisher 1998). Eine solche Struktur, deren Funktion bis heute unklar ist, wurde auch einmal in dem selbst untersuchten Material gefunden. Eine weitere Besonderheit in Horizontalzellterminalen sind gelegentlich zu beobachtende kleine synaptische Areale mit winzigen präsynaptischen Membranverdichtungen sowie seitlich zum Stäbchenterminal hin über feinste Stiele an der präsynaptischen Membran in unter 50 nm Abstand fixierte elektronendichte Platten (Abb. Jb2; Brandon & Lam 1983; Linberg &

Fisher 1988), die möglicherweise eine Speicherform von Rezeptorproteinen darstellen. Während bei Ratten und Mäusen stets nur 2 verschiedene Horizontalzellfortsätze pro Stäbchenterminal vorhanden waren, wurden in den deutlich größeren Terminalen beim Menschen bis zu 4 angetroffen.

Die Zahl der in die Stäbchen invaginierten Bipolarzellendriten lag bei den untersuchten Mäusen und Ratten zwischen 1 und 3, meist waren 2 vorhanden. Beim Menschen wurden in der vorliegenden Arbeit, wie auch bei Migdale et al. (2003), zwischen 1 und 4 dieser zentralen Elemente der Ribbonsynapsen gefunden. Übereinstimmend ist auch die Tatsache, daß diese sich oft in zwei verschiedene, nicht terminal aufgetriebene Enden teilen, wodurch sie sich von Zapfenbipolarzellterminalen unterscheiden (s. unten). Die zentralen Bipolarzellendigungen liegen immer ein Stück unterhalb der arciform density in dem Bereich, wo sich gegenüberliegende Horizontalzellterminale berühren (Missotten 1965a).

Die Konstruktion der Stäbchenribbonsynapsen ist außerdem sehr zuverlässig: Durch ihre große Oberfläche halten SK genug Vesikel bereit, um ständig Nachschub liefern zu können, und jede freie Stelle hat genug Zeit, um wiederbeladen zu werden. Funktionell wesentlich ist, daß die große postsynaptische invaginierte Oberfläche stetig von den aktiven Zonen her mit Glutamat durchströmt wird, welches dabei zuerst die wenig affinen Glutamatrezeptoren vom AMPA/Kainat Typ der Horizontalzellen (Massey 1990) erreicht, die Raviola & Gilula (1975) als Intramembranpartikel beschrieben hatten. Danach werden die schnelleren metabotropen, elektronenmikroskopisch nicht erkennbaren, aber mit der konfokalen Fluoreszenzantikörpermikroskopie im gesamten Bereich der Dendritenspitzen nachgewiesenen (Nomura et al. 1994) Glutamatrezeptoren der in Stäbchen nur geringe Oberflächen aufweisenden Bipolarzellendriten erreicht. Diese können bereits einige hundert bis zu über 1000 nm von den aktiven Zonen entfernt sein (Rao-Mirotnik et al. 1995). In der basalen Zellmembran der Photorezeptoren ist der Gruppe 3 metabotrophe Glutamatrezeptor 8 lokalisiert (Koulen et al. 1999), der als letzter erregt wird und dem Photorezeptor vermutlich negatives Feedback vermittelt. Durch ihre anatomische Konstruktion ist die Effizienz der Stäbchensynapsen so groß, daß sie praktisch die einzigen Neuronen sind, die mit einer einzigen aktiven Zone zur Signalübertragung gleich eine ganze Reihe unterschiedlicher postsynaptischer Elemente steuern können. Ein Teil des freigesetzten Glutamats wird lateral der aktiven Zonen also nach den Rezeptoren der Horizontalzellen durch Endozytose zwar wiedergewonnen, aber erst außerhalb der Invagination können es die in der Membran der Gliazellen lokalisierten schnellen Glutamatttransporter effektiv beseitigen. Zusätzlich kann die Empfindlichkeit der Bipolarzellendriten direkt durch die selbst von der Ribbonsynapse modulierten Horizontalzellfortsätze beeinflusst werden, was bei einem Nebeneinander der Synapsen nicht so effizient möglich wäre. Auch verhindern die Invaginationen der dreidimensionalen Stäbchenribbonsynapse ein sonst leicht mögliches Diffundieren von Glutamat zu benachbarten Stäbchen, wodurch das Signalrauschen vermindert wird (Rao-Mirotnik 1998).

Die Grundform der SK in Stäbchen wurde beim Kaninchen von Sjöstrand (1958) als in Direktauf-sicht U-förmig mit partiellen Verdrehungen erstbeschrieben und rekonstruiert. Gebogene flache,

bandartige bis an einen Boomerang erinnernde Formen sind sowohl beim Menschen als auch bei BALB/c Mäusen und Ratten für Stäbchen SK typisch, wie die Rekonstruktionen der vorliegenden Arbeit zeigen. Bei C57Bl(6) Mäusen schilderte Cohen (1960) plattenförmige SK in Stäbchenterminalen, er untersuchte jedoch keine Serienschritte. Dieterich und Rohen (1970) beschrieben einen vielfach gewundenen Verlauf von SK, ebenso Missotten (1960a). Spiwoks-Becker fand in Stäbchenterminalen des Rindes ein bis zwei plattenförmige SK, von denen mindestens eines an der Zellmembran verankert war, außerdem beschreibt sie bizarre X- oder krakenförmige SK. Die Dicke der Organellen ist praktisch immer konstant und beträgt 35 nm (Sjöstrand 1958; Cooper & McLaughlin 1982; Migdale et al. 2003; Jastrow & Racke 2007). Veränderungen in Form von Auftreibungen bzw. das Auftreten von klumpigen bzw. kugelförmigen SK deutet auf An- bzw. Abbauvorgänge hin, in deren Rahmen die "normalerweise" sehr regelmäßige Polymerisation der molekularen Komponenten von SK verloren geht (siehe Diskussion 4d: Seite 121).

Die im Rahmen dieses Projektes erstellten SK-Rekonstruktionen der BALB/c Maus zeigen, daß die von der Grundform her boomerang-artigen SK in Stäbchenterminalen noch in weitere Ebenen verbogen und verdreht sein können. Ferner konnte erstmals genau lokalisiert werden, wo sich die Auftreibungen bei lichtinduziertem Abbau von SK finden: in der Regel nicht genau in der Mitte, gelegentlich am Ende der Organellen, meist im intermediären zwischen diesen Bereichen gelegenen Abschnitt. Diese Auftreibungen waren verbunden mit der Abgabe von Material in Form von kugel- bis klumpenförmigen Gebilden, die sich von der funktionell relevanten aktiven Zone der Synapsen wegzubewegen schienen. In Übereinstimmung mit Adly et al (1999), Spiwoks-Becker et al. (2004) und Kolios (2006) finden alle Vorgänge, die in die Abgabe bzw. Fusion von Material involviert sind, an der konvexen Kante der Organellen statt, die zum freien Zytoplasma gerichtet und im Gegensatz zur konkaven nicht über feine Proteinärmchen an der arciform density verankert ist. Adly et al. (1999) zeigten ein zweidimensionales Schema zur Veränderung von SK Profilen während 24 Stunden bei LD 12:12, bei dem kurz nach Lichtexposition am nicht membranverankerten Profilende keulenförmige Auftreibungen erkennbar sind, die zur Abgabe von Material mit rundlichem Profil (als synaptische Kugeln bezeichnet) führen. Dabei kam es zur Verkürzung des restlichen SK Profils. Gegen Ende der Lichtphase sollte sich das in Form von Kugeln abgegebene Material wieder anlagern, wodurch in der folgenden Dunkelphase wieder längere stabförmige Profile vorliegen. Dies wurde von Spiwoks-Becker et al. (2004) bestätigt und ergänzt, die nachwiesen, daß Protrusionen und Materialabgabe ins Zytoplasma bereits 30 - 60 Min. nach Lichtbeginn auftreten und daß sich innerhalb von 30 Min. nach Ende der Lichtphase Material wieder angelagert.

Die in vorliegender Arbeit erhobenen Befunde belegen die eben beschriebenen lichtabhängigen Veränderungen dreidimensional: nach langer (1¼ Stunden) Dunkelheit fanden sich bei der um 5.45 getöteten Gruppe von BALB/c Mäusen weder Auftreibungen noch kugel- oder klumpenförmige SK. Nach ca. 2 bzw. 2½ Stunden Licht zeigten um 8.10 bzw. 8.45 getötete Tiere eine Reihe von Auftreibungen und kugel- bzw. klumpenförmige kleine SK, dabei war die 10-minütige Dunkelexposition bei der um 8.10 getöteten Gruppe noch nicht ausreichend, um diese Verände-

rungen zu beeinflussen. Nach 11 Stunden Licht fanden sich bei der um 17.00 getöteten Gruppe neben vielen Auftreibungen an SK bisher nicht beschriebene zentrale Verdünnungen derselben (Abb. BALB9). Dies kann durch die Massenreduktion der in loco verbliebenen SK nach wiederholter Materialabgabe erklärt werden. Nach 4 Stunden Dunkelheit zeigten 2 um 22.00 getöteten Tiere Dilatationen an den membrangebundenen boomerangförmigen SK und einige klumpenförmige SK. Dies deutet im oben geschilderten Kontext darauf hin, daß sich das in Form von Kugeln bzw. Klumpen unter Licht abgespaltete SK-Material nur sehr langsam wieder anlagert. Bei der Verschmelzung entstehen dann die Dilatationen und allmählich nimmt die Zahl an Kugeln und Klumpen ab. Dazu paßt auch der oben geschilderte Befund, daß die nur 10-minütige Dunkelexposition bei der um 8.10 getöteten Gruppe praktisch keinen morphologischen Effekt hatte. Diese an nur wenigen Tieren dreidimensional belegten Aussagen können jedoch nicht verallgemeinert werden, denn im Gegensatz dazu belegen von Spiwoks-Becker et al. (2004) an wesentlich mehr Tieren analysierte Profile vieler hunderter SK eine deutlich schnellere Wiederanlagerung von SK-Material.

Zweidimensionale Untersuchungen von Schnitten, auf denen nach Lichtexposition korrespondierende Veränderungen der SK Profile in Stäbchenterminalen z.B. das Auftreten von "Keulen" (entsprechen den dreidimensionalen Auftreibungen; Kuwabara & Funahashi 1976; Jansen & Sanyal 1987) und runden Profilen (entsprechen den Kugeln bzw. Klumpen) wurden bei Ratten von Vollrath et al. 1989; Hermes et al. (1992) und Lubczyk (2001) gefunden. Bei Mäusen der Pearl Mutante (C57BL/6J *pe/pe*) fanden sich nach 4-stündiger Lichtexposition ganz deutlich mehr SK-Profile mit Auftreibungen sowie rundliche Anschnitte von SK als beim Wildtyp (Williams et al. 1985). Analog reagieren die in der vorliegenden Arbeit und der ebengenannten Publikation mituntersuchten BALB/c Mäuse deutlich stärker auf Licht als "normale" pigmentierte Tiere, wie es auch Hermes et al. (1993) und Glas (2004) feststellten: sie zeigten im Verhältnis mehr verdickte, bzw. kugelig/rundliche SK als "Normaltiere". Korrespondierende Befunde wurden von Schaaf (1996), Adly et al. (1999), Lazarzik (2001), Spiwoks-Becker et al. (2004) und Glas (2004) erhoben. Glas (2004) konnte bei seinen in vitro Untersuchungen belegen, daß das Ausmaß der Verdickungen und die Zahl von gebildeten rundlichen SK Profilen lichtintensitätsabhängig sind und nicht auf einer Tagesrhythmik beruhen. Quantitative Aussagen zur Häufigkeit verschiedener Formen von SK Profilen sind in der Retina jedoch problematisch (siehe Diskussion 4b2: Seite 109), weshalb hier darauf nicht im Detail eingegangen wird. Jedoch lassen sich in Anlehnung an Spiwoks-Becker et al. (2004) aufgrund der eindeutigen von der Lichtexposition abhängigen Befunde bezüglich der Dynamik von SK in Stäbchenterminalen folgende Schlüsse ziehen: Unter Lichtexposition kommt es an üblicherweise boomerang bis hufeisenförmigen membrangebundenen SK zu lokalen Verdickungen auf der membranabgewandten Seite, meist im seitlichen oder Endbereich, die zur Abschnürung von kugel- bis klumpenförmigen SK führt. Diese entfernen sich von den dadurch kleiner werdenden verbleibenden SK. Unter Dunkelbedingungen lagern sie sich der ursprünglichen Organelle wieder an und tragen mit ihrem Material unter regelmäßiger Poly-

merisation zur Wiedervergrößerung bei. Dieses Recycling von SK Material erspart der Zelle den kompletten Abbau bzw. die Neusynthese von SK.

Die Abhängigkeit der SK-Plastizität von der Ca^{++} -Konzentration wurde an klaren Profilveränderungen von Spiwoks-Becker et al. (2004) sowie durch Untersuchungen von Schmitz et al. (1989) und Schmitz & Drenckhahn (1991) belegt. Die massiven Veränderungen, die Spiwoks-Becker et al. (2004) zeigten, wurden hier durch exemplarische Rekonstruktion einer Schnittserie einer unter EGTA organokultivierten Retina dreidimensional dargestellt (Abb. 8, BALB2; Animationen 8.avi & BALB2.avi). Sie belegen, daß von der ursprünglich gebogenen Platte nur noch eine sehr dünne Restverbindung zwischen extrem aufgetriebenen Endigungen besteht. Weniger als 10 Prozent der unter diesen Bedingungen untersuchten SK ließen noch normale SK-Profile erkennen (Spiwoks-Becker et al. 2004). Die im Vergleich zu Hell-Dunkel Zyklen deutlich stärkeren morphologischen Veränderungen legen den Schluß nahe, daß das Licht über eine Reduktion des Ca^{++} -Gehaltes die reguläre Polymerisation der molekularen Komponenten von SK in Stäbchen stört, was dann zu Vorwölbungen und Abschnürung von Material führt.

Kontakte, die Beta-Stäbchen basal am Endkolben mit Alpha-Stäbchen zeigen und die vermutlich synaptischen Charakter haben, wurden beim Meerschweinchen von Sjöstrand (1958, 1961) beschrieben, jedoch handelte es sich bei Sjöstrands β -Stäbchen um eine reduzierte Zapfenart, was Dowling & Boycott (1966) offenlegten. Sjöstrand hatte den Terminus nicht gewählt, weil Meerschweinchen keine Farbdiskrimination zeigen (Dunn 1973). Tatsächliche Kontakte direkt von Stäbchen zu Stäbchen sind bei den meisten Säugerspezies nicht zu finden (Missotten 1965a, Dowling & Boycott 1966; Mariani 1983a; Attwell 1986; Sterling 1990) und konnten auch in dem in vorliegender Arbeit untersuchten Material nicht entdeckt werden. Allerdings demonstrierten Tsukamoto et al. (2001) bei C57BL/6J Mäusen mehrere kleinste Gap-junction-haltige Kontakte zwischen einigen Stäbchen im Bereich der Terminale. Dabei kontaktierte ein Stäbchen durchschnittlich $1,6 \pm 0,9$ bis maximal 4 Nachbarstäbchen. Zapfen bilden Gap-junction-haltige (Raviola & Gilula 1973) Kontakte zum basalen Bereich von Stäbchenendkolben aus (Cohen 1964, 1965; Kolb 1977; Smith et al. 1986), wie es auch Abb. Homo14 und Animation Homo14.avi zeigen. Diese sollen das Verhältnis von Signal zu unspezifischer Hintergrundaktivität ohne Sehschärfeverlust verbessern (Dickinson-Nelson & Nelson 1980; Mariani 1983a). Die Gap-junctions enthalten Connexin 36, wie Ciolofan et al. (2007) zeigten. Dieses Connexin sowie auch Connexin 57 und Zonula occludens-1 Protein wiesen die Autoren fluoreszenzmikroskopisch auch in der Nähe von Bassoon Markierungen von Photorezeptorribbonsynapsen nach, jedoch stehen die ultrastrukturellen Nachweise dazu noch aus.

4a24 Ribbonsynapsen in Zapfen

Erste Untersuchungen von Zapfenendauffreibungen erfolgten von De Robertis & Franchi (1956) sowie Sjöstrand (1958), der sie als β -Terminale bezeichnete, meist wurden sie nur nebenbei erwähnt (Okuda 1960). Yamada et al. (1958) waren die ersten, die menschliche Retina und ihre Zapfen elektronenmikroskopisch untersuchten und Missotten (- et al. 1963, 1965a) war der erste, der sie in Serienschnitten beim Menschen analysierte. Er fand in den basal pyramidenförmig auf-

getrieben Zapfenterminalen 25 Ribbonsynapsen. Eine erste einfache Stereorekonstruktion eines Zapfenedikels einer menschlichen Retina (Keri & Ahnelt 1991) demonstrierte ein Horizontalzellterminal mit 2 invaginierten Fortsätzen, von denen einer zusätzlich einen oberflächlichen basalen Kontakt am Terminal hatte, jedoch keine SK aufwies.

Die im Zuge der hier vorgelegten Arbeit erstmals virtuell visualisierten, komplett rekonstruierten Zapfenribbonsynapsen beim Menschen zeigen nur ca. ein Drittel bis ein Viertel ganzer Zapfenedikel, da diese Dimensionen von ca. 8 μm (Ahnelt et al. 1990) haben und die analysierten 55 lückenlosen längsorientierten Serienschnitte nur eine Gewebstiefe von 2,75 μm erfassen konnten. Die Morphologie der Terminale ähnelt den 104 von Pedler & Tilly (1965) gezeichneten Serienschnitten, die eine komplette Zapfensynapse des Affen darstellen und einfachen Rekonstruktionen von Makakenzapfenterminalen (Chun et al. 1996). Zapfenedikel enthalten 4 - 6 eng beieinander gruppierte tubuläre Mitochondrien, die nicht nahe den aktiven Zonen, sondern entfernt davon liegen (Johnson et al. 2007; vorliegende Arbeit: Abb. Homo 1, Homo12, Disk4; Animationen 01.avi; Disk4.avi). Neben diesen, SK und etwas glattem ER, finden sich praktisch nur noch Unmengen von Vesikeln im leicht elektronendichten Zytoplasma von Zapfenedikeln (Abb. Homo3). Die Grundform der Ribbonsynapsen ist auch in Zapfen die Triade, d.h. zwei laterale tiefer invaginierende, terminal aufgetriebene Horizontalzellendriten (Boycott & Wässle 1999; Jastrow et al. 2007) schließen zwischen sich ein SK ein, unter dem sich, etwas tiefer, ein im Vergleich zu Stäbchen deutlich breiterer Bipolarzellfortsatz findet (Missotten 1963, 1964, 1965; Stell 1965; Dowling & Boycott 1966; Chun et al. 1996; vorliegende Arbeit). Gelegentlich sind auch 2 Bipolarzellfortsätze präsent (Mensch: Missotten 1965; Makaken: Kouyama & Marshak 1992, Calkins et al. 1996; Kaninchen: Sjöstrand 1974). Beim Kaninchen zeigten Zapfenendkolben neben den üblichen Triaden gelegentlich ein isoliertes Kollateral eines Bipolarzellendriten, das zusätzlich allein ohne Beziehung zu einer Ribbonsynapse, tief in dieses eindringt (Sjöstrand 1958, 1974, 1989). Solche isolierten Bipolarzellendriten wurden auch für den Hund beschrieben (Hebel 1971). Ein Horizontalzellfortsatz ist präsynaptisch, stammt von einer großen Horizontalzelle und soll laut Sjöstrand (1998a) die durchschnittliche Beleuchtung benachbarter Zapfen in einem Areal von

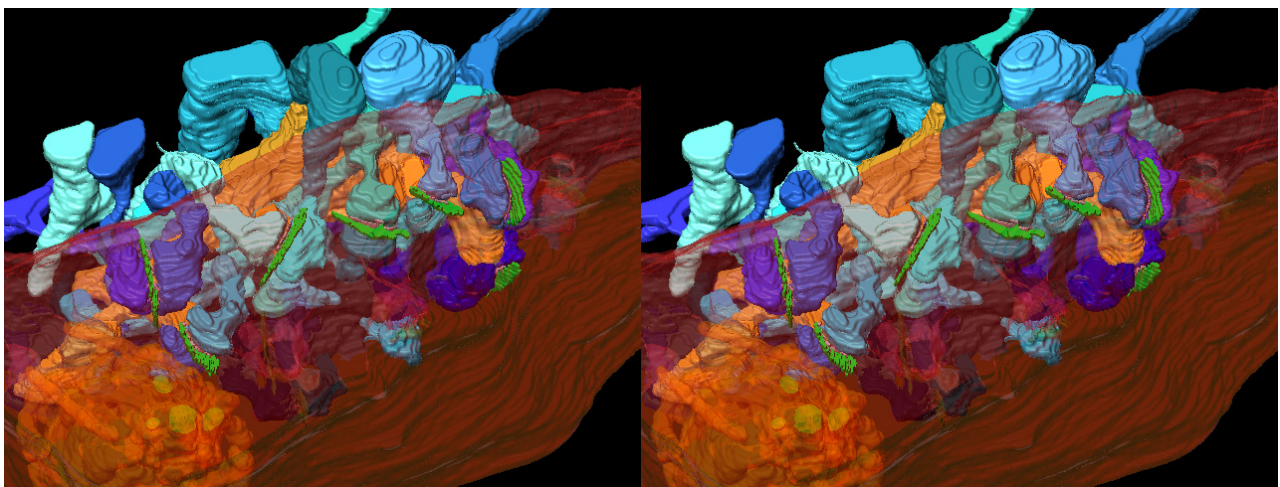


Abb. Disk4 Ribbonsynapsen eines menschlichen Zapfenterminals. Alle Mitochondrien diese Terminale finden sich eng aneinandergelagert in dem dunkelorange Konglomerat links unten (Farbcodierung s. Abb. Homo3; Animation dieser Rekonstruktion: Disk4.avi).

ca. 600 µm Durchmesser übermitteln. In seiner minutiösen Rekonstruktion eines Zapfenterminals des Kaninchens stellte Sjöstrand (1974) fest, daß ein Horizontalzellaxon sich in eine Reihe von Terminalen aufteilt, die in verschiedenen Triaden enden. Auch in dem für vorliegende Arbeit rekonstruierten menschlichen Material war dies in vielen Fällen zu beobachten. Zwischen den beiden Spitzen der lateralen Elemente in der Mitte unterhalb eines SK findet sich im Interzellularraum elektronendichtes Material (Lasansky 1972; Mariani 1983a).

Pan & Massey (2007) fanden bei Untersuchungen der Kaninchenretina netzwerkartige Verknüpfungen zwischen axonlosen, in Zapfenterminalen invaginierten Typ-A Horizontalzellen, zwischen ebenso terminierenden B-Horizontalzellendriten und außerdem von Terminalen dieses Zelltyps, die über Gap-junctions miteinander verbunden waren. Die B-Typ Axonterminale erhalten von bis zu 1.000 Stäbchenterminalen Input, wobei die Autoren aber überraschenderweise nur ein Endterminal in Stäbchen invaginiert fanden. Dabei sind die in Zapfen invaginierten Horizontalzellfortsätze meistens Dendriten (Kolb 1970; Mariani 1983a). Peichl et al. (1998) stellten klar, daß Typ B Horizontalzellen ihre Axone zu Stäbchenterminalen senden, während ihre Dendriten aus Zapfenterminalen kommen, wohingegen die "axonlosen" Typ A Horizontalzellen nur Zapfenterminalen innervieren. Wässle et al. (2000) unterschieden zwischen H1 Horizontalzellen (o.g. Typ B identisch) mit großem Soma, dicken radiären Dendriten und sehr langen Axonen, deren verzweigte Terminalen als laterale Elemente in Stäbchenribbonsynapsen enden (Kolb 1970; Boycott & Kolb 1973b; Kolb et al. 1980; Mariani 1984; Boycott et al. 1987; Dacheux & Raviola 1990) und H2 Horizontalzellen mit kleinerem Zelleib, feineren wellenförmigen Dendriten und einem nur zu Zapfen ziehenden Axon (Kolb et al. 1980; Gallego 1985, Boycott et al. 1987). Diese Zellen entsprechen dem o.g. Typ A - möglicherweise war es Peichl et al. (1998) nur nicht gelungen, das feine Axon darzustellen. Laut Peichl & Gonzalez-Soriano (1994) zeigen Ratten und Mäuse im Gegensatz zu anderen Säugetieren nur den axontragenden B-Typ von Horizontalzellen. Auf Speziesunterschiede bezüglich der Horizontalzellen deutet auch die Tatsache hin, daß Synaptoporin nur in Horizontalzellen des Kaninchens, nicht aber der Ratte nachweisbar war (Brandstätter et al. 1996). Die heterogene Verteilung des Glutamaterezeptors GluR6/7, welcher stets nur in einem einzigen Horizontalzellfortsatz in Zapfen- wie auch Stäbchenterminalen zu finden war, deutet auf einen hohen Grad unterschiedlicher Verarbeitung glutamaterger Signale in Ribbonsynapsen hin (Brandstätter et al. 1997). Während die Dichte der H1 Zellen von der Fovea (6.360/mm²) nach peripher deutlich abnahm (1.914/mm²), fand sich kaum eine Veränderung für die H2 Zellen (1.600-1.150; Wässle et al. 2000). Da das Terminal und die Zellkörper der Typ 1-Horizontalzellen 0,3 bis 1 mm voneinander entfernt sind und die Verbindung nur einen sehr geringen Durchmesser hat, postulierten Nelson (1977) und Linberg & Fisher (1988), daß diese praktisch elektrisch voneinander isoliert sind und das Terminal nur in die Signalverarbeitung von Stäbchen involviert ist. Laut Gallego (1976) soll ein solches Horizontalzellaxonterminal Signale von 350 bis 500 Zapfen integrieren. Bei Fröschen scheinen große äußere Horizontalzellen nur Blau-sensitive Stäbchen und Rot-sensitive Zapfen zu versorgen (Ogden et al. 1985). Die inhibitorischen Horizontalzellen sind GABA-erg und weisen eine Reihe synaptischer Proteine auf (Hirano et al. 2005).

Beim Rhesusaffen zeigten Boycott & Kolb (1973b), daß in der Fovea kleinere Horizontalzellen Dendriten zu 6 - 9 Zapfenterminalen senden, während in der Peripherie große Horizontalzellen bis zu 40 Zapfen erreichen. Für weitere Informationen über Horizontalzellen bei verschiedenen Spezies sei auf folgende Arbeiten verwiesen: Djamgoz et al. (1995); Pan & Massey (2007).

Bei Dowling & Boycott (1966), Chun et al. 1996 und Pedler & Tilly (1965) wurden Eintritte von Horizontal- bzw. Bipolarzellfortsätzen nie nahe dem Rand des Terminals angetroffen. Herr et al. (2003) zeigen ein Stereorekonstruktionsbild eines Blauzapfenterminals (ohne Darstellung von SK) mit Invaginationen, die zum Teil etwas weiter am Rande des Pedikels liegen als es bei den in vorliegender Arbeit gezeigten Rot- oder Grünzapfenterminals der Fall war (Abb. Homo12). In konstruierten Aufsichten waren sie bei Pedler & Tilly (1965) ungefähr ringförmig um das Zentrum gruppiert, wobei die ganz zentrale Region nur wenige eintretende Elemente zeigte. Dagegen waren sie in 10 Rekonstruktionen der Makakenretina homogen über das gesamte Terminal verteilt, wurden aber nur ein kurzes Stück in die äußere plexiforme Schicht hinein verfolgt (Chun et al. 1996). Sie verliefen dabei nie senkrecht oder gar direkt hin zu den unterhalb der Terminals gelegenen Somata in der inneren Körnerschicht. Dies gilt auch für den Menschen (Missotten et al. 1963, 1965; diese Arbeit), die Ratte (Vardi et al. 1998), BALB/c Mäuse (vorliegende Arbeit) und vermutlich für alle Säugerspezies allgemein. Ebenso verhielt es sich beim Hühnchen, bei dem 3 Zapfenterminale rekonstruiert wurden (Jastrow et al. 2006). Durch den eher horizontalen Verlauf der Fortsätze, viele Kollateralen, die hier von größeren Fortsätzen abzweigen und zahlreiche Synapsen kommt es schon in der äußeren plexiformen Schicht zu für den Sehvorgang essentiellen gegenseitigen Beeinflussungen der Prozessus verschiedener Zellen. So entsteht hier ein morphologisches Korrelat für die Erkennung eines genauen Farbtons bzw. die Kontrastverschärfung im Sinne der lateralen Inhibition, ohne daß dabei räumliche Auflösung verloren geht (Tsukamoto et al. 1992). Auch Pedler & Tilly (1965) wiesen darauf hin, daß diese Verschaltung für die gegenseitige Unterdrückung von unspezifischen Hintergrundaktivitäten benachbarter Rezeptoren verantwortlich sein könnte.

Die bei Mensch, Hühnchen und Affe gefundenen Fortsätze von Zapfen zu benachbarten Zapfen bzw. Stäbchen (z.B. erkennbar in Abb. Homo14 und Animation Homo14.avi) sind der morphologische Beleg dafür, daß sich die Rezeptorzellen zusätzlich direkt gegenseitig beeinflussen. Schon 1966 hatte Yamada Verknüpfungen von Zapfen zu Zapfen und Zapfen zu Stäbchen dokumentiert. Während in vorliegender Untersuchung Zapfen zu Zapfen Verbindungen nur in 4 Fällen in Form zweier aufeinander zulaufender Fortsätze beim Menschen erkennbar waren, fanden Missotten (1963, 1964, 1965a) bzw. Missotten et al. (1963) 6 bis 12 solcher Verknüpfungen, die Gap-junctions aufweisen (Cohen 1965; Baylor et al. 1971; Raviola & Gilula 1973; Tsukamoto et al. 1992). Schon historische lichtmikroskopische Untersuchungen von Schultze (1866) bzw. Dogiel (1892) wiesen 6 bis 12 laterale Kontakte zwischen Zapfen beim Menschen nach, die auch Uga et al. (1970) elektronenmikroskopisch bestätigten. Bei der Katze fanden Smith et al (1986) 6 - 11 basolaterale Fortsätze an Zapfen der Katze, die via Gap-junctions entsprechende Nachbarfortsätze kontaktierten. Die umfangreiche Rekonstruktion von 221 Zapfenterminals beim

Menschen von Ahnelt et al (1990) zeigt klar auf, daß Blauzapfen deutlich weniger Kontakte ausbilden, diese praktisch so gut wie nie andere Zapfenarten kontaktieren und daß Rot/Grünzapfen sehr viele Verknüpfungen mit- und untereinander zeigen (Rot-Rot; Rot-Grün, Grün-Grün) und sich damit intensiv untereinander beeinflussen. Dieterich & Rohen (1970) schildern, daß sich die langen Axone fovealer menschlicher Zapfen gabeln können, damit meinten sie die Kontakte zu benachbarten Zapfen oder Stäbchen, die zur Verbesserung der Auflösung und Kontraststeigerung dienen sollen. Beim Hund sollen jedoch laut Hebel (1971) Zapfen zu Zapfen Verbindungen sehr selten sein. In der Foveola, wo die höchste optische Auflösung erreicht wird, fanden Dickinson-Nelson & Nelson (1977) bei Rhesusaffen im Gegensatz zu weiter entfernten Regionen keine Kontakte zwischen Zapfen.

Bei dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit beim Menschen untersuchten von Zapfen zu Stäbchen ziehenden Prozess terminierten diese ein Stück weit neben der Eintrittspforte der Horizontal- bzw. Bipolarzellfortsätze in einen Stäbchenendkolben direkt an der basalen Zellmembran (Abb. Homo 14 & Animation Homo14.avi). Möglicherweise modulieren sie hier die Empfindung der Lichtintensität. Bei der Katze beschrieb Kolb (1977) 4-6 Zapfenfortsätze, die ringförmig um den Hilus eines Stäbchenterminals auftraten, wobei einige Zapfenfortsätze auch mehrere Kontakte zum selben Stäbchen herstellten. Synapsen von Zapfenfortsätzen, die an lokalen Verdickungen von ON-Bipolarzellen unterhalb deren Eintritt in ein Stäbchenterminal ausgebildet werden, vermindern die Membranpotentialänderungen dieser Dendriten, heben also die Empfindlichkeitsschwelle im Sinne einer lateralen Inhibition und sorgen damit für bessere Kontrasterkennung (Sjöstrand 1989b, 1998a). Dieser Autor fand bei Kaninchen und Meerschweinchen an jeder dieser Auftreibungen Zapfenterminals und demonstriert dies anhand von einigen Stereofotografien von Modellen der relevanten Region. Bei dem in vorliegender Arbeit betrachteten menschlichen Material wurden jedoch nur wenige solcher Kontakte gefunden.

Die invaginierenden zentralen Elemente der Ribbonsynapsen sind ON-Zapfenbipolarzellen zuzuordnen, während OFF-Bipolarzellen über basale Kontakte ihre Erregungen via Nicht-Ribbon-, sondern konventionelle chemische Synapsen erhalten (Kolb 1994; Hopkins & Boycott 1995; Calkins et al. 1996). Zuverlässige Daten diesbezüglich konnte bisher nur Sjöstrand (1998a) durch ein komplett 3D rekonstruiertes Kaninchenzapfenterminal liefern, bei dem er 19 verschiedene Neurone zeigte, die mit 60 tief invaginierten Endigungen an 16 Triaden mit 16 SK an insgesamt fast 150 Synapsen beteiligt waren. Beim Menschen schätzten Missotten et al. (1963) und Missotten (1965a) die Zahl nicht in das Zapfenterminal eintretender Kontakte für die periphere menschliche Retina auf ca. 500. Diese stammen zum großen Teil von OFF-Bipolarzellen (Dowling & Boycott 1966; Kolb et al 1969; Chun et al. 1996; Hsu et al. 1998) ansonsten sind sie Kollaterale in das Terminal eintretender Bipolarzellen. Für die Zapfenterminals der menschlichen Fovea gaben Dieterich & Rohen (1970) insgesamt nur 80 Kontakte mit Fortsätzen anderer Zellen an. Diese Zahl ist vermutlich zu gering, da sie allein die Zahl der Triaden in diesen Zapfenterminals schon mit 20 schätzten.

Bei den Rekonstruktionen von Zapfenterminalen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß der überwiegende Teil der invaginierten (ON) Bipolarzellfortsätze aus nur einem einzigen verzweigten Dendritenstamm einer Bipolarzelle hervorging (Abb. Disk 5; Animation Disk5.avi), während die übrigen wenigen Dendriten, soweit verfolgbar, aus anderen Bipolarzellen hervorgingen. Einfache Tonmodelle von Missotten (1965a) belegen ebenfalls, daß eine Reihe von zentralen Elementen in verschiedenen Triaden eines Zapfenterminals aus einem einzigen Dendriten einer Bipolarzelle hervorgeht. Ein von diesem Autor rekonstruierter Horizontalzellfortsatz hat, wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, ebenfalls mehrere Kollateralen, die an unterschiedlichen Triaden beteiligt sind. Außerdem bilden Horizontalzellen in der menschlichen Retina einen (Villegas 1961) bzw. 3 verschiedene Plexus aus (Pan & Massey 2007). Ahnelt und Kolb (1994) zeigten, daß an Rot und Grünzapfen hauptsächlich Dendriten von H1 und H3 Horizontalzellen und nur sehr selten von H2 Horizontalzellen terminierten, während Blauzapfen exklusiv laterale Triadenelemente von H2 Horizontalzellen und deutlich kleinere SK aufwiesen. Längenmessungen von SK zeigten, daß längere SK häufiger mit H1 und H3 Lateralelementen assoziiert waren, während kürzere SK bei H2 Lateralelementen lagen: von H1 kontaktierte SK hatten eine durchschnittliche Länge von 575 nm (n=3.058); H2 kontaktierte SK eine Durchschnittslänge von 420 nm (n=166). Oft fanden sich neben der zentralen Invagination auch weitere Anlagerungen desselben Bipolarzeldendriten weiter lateral und basal an das Zapfenterminal. Dies wurde von Lasansky (1972) als distale Verbindung bezeichnet. Dies stimmt mit Befunden der Makakenretina überein, wo nur 1-4 invaginierende Bipolarzellen im Sinne einer Divergenz ON-Signale aus Zapfenfortsätzen weiterleiten, wobei in der Regel eine den ganz überwiegenden Teil der invaginierten Fortsätze stellt (Kouyama & Marshak 1992).

Allgemein gilt, daß "midget-ON" Bipolarzellen über einen in sehr viele invaginierende Terminalen verzweigten Dendritenbaum Signale nur eines Zapfen erhalten (Missotten 1965a; Dowling & Boycott 1966; Kolb 1970; Herr et al 1995), während dessen übrige invaginierte Bipolarzeldendriten von "diffuse ON" Bipolarzellen stammen, die zusätzlich Input einer Reihe anderer Kollaterale aus weiteren Zapfenterminalen im Sinne einer Signalkonvergenz erhalten (Boycott & Dowling 1969; Mariani 1981; Boycott & Wässle 1991; Calkins et al. 1996). Laut Grünert et al. (1994) leitet jeder Zapfen Signale an wenigstens einen Vertreter einer der verschiedenen Bipolarzellklassen weiter. Dies mag für periphere Retinaabschnitte zutreffen. In der Makakenfovea ist jedoch jeder Rot- und Grünzapfen nur für eine innere und eine äußere Zwergbipolarzelle präsynaptisch, während den Blauzapfen 2-4 Blauzapfen-On-Zwergbipolarzellen nachgeschaltet sind (Ahmad et al. 2003; Schein et al. 2004). Dabei erhalten die bis zu 4 Bipolarzellen ungleichmäßig Input über 1-16 Ribbonsynapsen. Dagegen bildet ein solche Bipolarzelle durchschnittlich 16,8 zentrale Dendriten in den beiden von ihr kontaktierten Blauzapfenpedikeln (Schein et al. 2004). Bezüglich der Charakterisierung unterschiedlicher Zapfenbipolarzellen und ihrer Verschaltung, die im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen nicht betrachtet wurden, sei auf folgende Literatur verwiesen: Boycott & Wässle (1991); Kouyama & Marshak (1992); Calkins et al. (1994); Grünert et al. (1994); Calkins et al. (1996); Hopkins & Boycott (1997).

Das von Pedler & Tilly (1965) untersuchte komplette Zapfenterminal des Rhesusaffen enthielt 38 verschiedene C-förmig gekrümmte bis relativ gerade verlaufende bandförmige SK. Diese wurden zwar nicht rekonstruiert, jedoch gestattet die Analyse der Zeichnungen diesen Schluß. Die in den 3 für vorliegende Schrift rekonstruierten Zapfenterminals des Menschen jeweils 12 SK passen in diese Größenordnung, da hier nur ca. ein Drittel eines kompletten Pedikels angetroffen wurde. Für komplette Rot- bzw. Grünzapfen der Peripherie der menschlichen Retina läßt sich daraus eine Zahl von ca. 35 SK errechnen, ein Wert, der gut zu den in Tabelle Disk 1 aus der Literatur aufgelisteten quantitativen Angaben für SK in Zapfen verschiedener Spezies paßt.

Tabelle Disk1: Zahl synaptischer Körperchen in Zapfenterminals

Spezies	Ort	Rot	Grün	Blau	Quelle
Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Foveola	10 (postuliert)*			Hopkins & Boycott 1997
	Fovea	12 (geschätzt)*			Dowling 1965
	"zentral"	17 Rot / Grün (1)*			Villegas 1964
	6 mm #	19,68±4,8 (205)*		19,13±5,1 (16)	Ahnelt et al. 1990
	peripher	25 (10)*			Missotten 1965b
		ca. 35 (3)*			vorliegende Arbeit
36*			Boycott & Dowling 1969		
Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	Fovea	16-20 (17)	18-20 (6)	22(4)	Esfahani et al. 1993
	peripher	38,6±2,5 (60)*			Hopkins & Boycott 1997
		38 (1) Rot oder Grün*			Pedler & Tilly 1965
Javaneraffe (<i>Macaca fascicularis</i>)	Fovea	19,8±1,3 (4)			Calkins et al. 1996
				22-23 SK (4)	Schein et al. 2004
		21,4±1,6 (25)*			Chun et al. 1996
	480-640 µm #	17-20 (8)*		21 - 23 (6)	Herr et al. 2003
		18,2 (39)*		22,3 (4)	Klug et al. 2003
	peripher	41,8±3 (14)*			Chun et al. 1996
Grüne Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	Foveola	14 (postuliert)*			Hopkins & Boycott 1997
	7 mm #	26,7 (3)*			Boycott & Hopkins 1993
	6 mm #	27,4±3,5 (23)*			Hopkins & Boycott 1997
Rind (<i>Bos taurus</i>)	peripher	>10 (1; maximale Zahl auf einem Schnitt)			Spiwox-Becker 1995
Katze (<i>Felis domestica</i>)	"zentral"	10-12*			Kolb 1977
	peripher	27 (7)*			Stevens et al. 1984
Kaninchen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	peripher	10 - 20*			Sjöstrand 1989a
		15 (1)*			Sjöstrand 1974
		16 (1)*			Sjöstrand 1998a
Maus (<i>Mus musculus</i>) C57BL/6J Stamm	peripher	6-14*			Johnson et al. 2007
		10 ± 1.6 (2)*			Tsukamoto et al. 2001
		8-10*			Balkema 1991
Maus BALB/c Stamm	?	10-12 Rot oder Grün (1)*			vorliegende Arbeit
Rotwangenschmuckschildkröte (<i>Pseudemys scripta elegans</i>)	?	Rot Doppelzapfen: 8-12	10-12	Blauzapfen: 10 UV-Zapfen: 5	Goede & Kolb 1994
Schildkröte (??)		12*			Lasansky 1972
Hühnchen (<i>Gallus gallus</i>)	peripher	Rot-Doppelzapfen 35 (2)			vorliegende Arbeit

* Typen nicht differenziert; (...) Zahl untersuchter Zapfenpedikel [falls angegeben]

Abstand von der Mitte der Fovea ?? Spezies in der Quelle nicht angegeben

Wie Chun et al. (1996) demonstrieren, gibt es erhebliche, von der Exzentrizität der Untersuchungsstelle abhängige Unterschiede in der Quantität von SK. Die Tabelle Disk 1 verdeutlicht dies spezieübergreifend: in den größeren Zapfenpedikeln der Peripherie liegen deutlich mehr SK vor als in fovealen. Gleiches gilt auch für die invaginierten Triaden: so fanden Chun et al. (1996) foveanah durchschnittlich 18 invaginierte Bipolarzellendriten in 21 Triaden, peripher aber 91 in im Mittel 42 Triaden. Aus der Tatsache, daß bei weniger als 1,9 mm Abstandsunterschied von der Foveamitte nach außen hin eine etwa zweifache Zunahme von SK resultiert, vermuteten Hopkins & Boycott (1997) eine Zahl von durchschnittlich nur 10 SK in Zapfen der Foveola beim Menschen bzw. 14 bei *Cercopithecus aethiops*. Herr et al. (2003) entdeckten bei Blauzapfen 7 sehr lange SK, die zwei getrennte Triaden versorgten. Solche als "double ribbons" bezeichneten sehr langen SK konnten sie bei Rot- oder Grün Zapfenterminalen nicht nachweisen. Beim Menschen ließen sie sich jedoch zumindest in einem Fall nachweisen: Abb. Homo16 und Animation Homo16.avi der vorliegenden Arbeit demonstrieren ein solch langes SK eines Rot oder Grünzapfens. Rao-Mirotnik et al. (1995) beschreiben die SK in Zapfenterminalen der Katze als ziemlich gerade und deutlich länger als in Stäbchen; einige können an sogar bis zu 5 verschiedenen Triaden beteiligt sein.

Beim Menschen sind 3 verschiedene Zapfenarten mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima des spezifischen Sehpigments bekannt: Rot (L-Zapfen) 570, Grün (M-Zapfen) 535 und Blau (S-Zapfen) 440 nm (Mariani 1983a). S-Zapfen sind kleiner und bilden nur sehr wenige Fortsätze aus, wodurch sie sich von den beiden anderen Zapfenarten unterscheiden lassen (Ahnelt et al. 1990; Ahnelt & Kolb 1994, 2000). L- und M-Zapfen lassen sich bei Säugern anhand solcher morphologischen Kriterien jedoch nicht voneinander differenzieren (Marc & Sperling 1977; Ahnelt et al. 1987; 1990; Szél et al. 1988; Esfahani et al. 1993; Goede et al. 1993; Goede & Kolb 1994; Kolb et al. 1997; Ahnelt & Kolb 2000). Hierfür ist ein Nachweis des für sie spezifischen Opsins notwendig (Smallwood et al. 2003; Wachtler et al. 2007) oder man muß wie Esfahani et al. (1993) in sehr langen Schnittserien ihre Verknüpfungen mit spezifischen Bipolar- und deren nachgeschalteten Ganglienzellen sicher verfolgen können. Dagegen ließen sich bei der Schildkröte *Pseudemys scripta elegans* morphologisch verschiedene Zapfenarten nachweisen (Kolb & Jones 1982). Goede & Kolb (1995) rekonstruierten die Formen ganzer Zapfenterminalen für alle fünf Zapfensorten dieser Schildkrötenart, jedoch ohne dabei invaginierende Fortsätze oder SK darzustellen.

Bei den im Rahmen vorliegender Arbeit rekonstruierten Zapfenpedikeln handelt es sich am ehesten um 2 L- und 1 M-Zapfenterminal, da in der menschlichen Retina das Verhältnis von L:M:S Zapfen ca. 10:5:1 beträgt (Roorda & Williams 1999). Allerdings gibt es bei der Verteilung der Zapfentypen in der menschlichen Retina auch Unterschiede in Abhängigkeit zu Exzentrizität wie Ahnelt et al. (1987) für Blauzapfen zeigte. Auch wurden bei älteren Rhesusaffen deutliche Unterschiede in der Verteilung und Zahl von S-Zapfen zwischen weiblichen und männlichen Tieren gefunden (de Monasterio et al. 1985). Ähnliches gilt auch für die Maus (Haverkamp et al. 2005).

Laut Esfahani et al. (1993) gibt es keine relevanten Unterschiede in der Zahl (siehe Tabelle Disk 1) und Länge von SK zwischen den verschiedenen Zapfenarten bei Makaken: SK waren flache Rechtecke mit basalen Andocklängen von 0,1 - 1,3 μm an die Zellmembran und einer Höhe von ca. 0,3 μm , wobei die SK in den S-Zapfen durchschnittlich kleiner erschienen. Nach Hsu et al. (1998) soll die Zahl der SK in Zapfen dem Querdurchmesser ihrer Axone direkt proportional sein. Beim Vergleich der Primatenretina mit den im Rahmen dieses Habilitationsprojektes untersuchten Nagernetzhäuten ist zu berücksichtigen, daß diese nachtaktiven Tiere, wie die Ratte nur ca. 1 (Szél et al. 1993; Spiwoks-Becker 1995) bis 1,5 % (LaVail 1976) Zapfen aufweisen. Die Quantität von SK in Zapfenterminalen ist bei BALB/c Mäusen geringer. So zeigte der am komplettesten (zu ca. zwei Dritteln) erfaßte Zapfenpedikel eines im Rahmen des hier vorgestellten Projektes um 5.45 getöteten Tieres 7 SK, woraus sich eine Gesamtzahl von 10 bis 12 SK pro Zapfenterminal errechnen läßt. Hierzu passen die in Tabelle Disk 1 angegebenen Werte anderer Autoren. In den rot empfindlichen Doppelzapfenterminalen des in Jastrow et al. (2006) untersuchten Hühnchens fanden sich 14 bzw. 10 SK, da hier aber vermutlich nur ca. ein Drittel der gesamten Pedikel in den Serienschnitten erfaßt war, erscheint eine Zahl von ca. 35 SK hierfür realistisch. Der teils mitangeschnittene vermutliche Blauzapfen war für quantitative Angaben zu inkomplett enthalten. In allen visualisierten menschlichen Zapfen wurden mehrere Synapsen gefunden, bei denen hintereinander in einer Reihe 2 SK an einem einzigen zentralen Bipolarzellfortsatz lagen, die lateral von 2 verschiedenen Paaren von Horizontalzellfortsätzen begrenzt wurden (Abb. Homo 16, 17, Disk5; Animationen Homo16.avi, Homo17.avi, Disk5.avi). Solche komplexeren Synapsen hatte auch Missotten (1964, 1965a) beim Menschen gefunden. Gleiches gilt für Rhesusaffen, wie sich in mehreren Fällen anhand der Schnittzeichnungen von Pedler & Tilly (1965) nachvollziehen läßt, und Makaken (Kouyama & Marshak 1992; Chun et al. 1996). Nebeneinander stehende Konstellationen, bei denen SK zwischen Horizontalzellfortsätzen lagen, die an verschiedene Bipolarzellen assoziiert waren, woraus eine parallele Reihe invaginierter Fortsätze resultiert, wurden gelegentlich beim Menschen (Abb. Homo 18; Missotten 1965a) und bei Kaninchen gefunden Sjöstrand (1974). Das Gros der Zapfenribbonsynapsen zeigte jedoch keine geordnete Topographie von Triaden zueinander, die eine gegenseitige Beeinflussung benachbarter Einzelsynapsen wahrscheinlich macht.

Betrachtet man die dreidimensionale Form rekonstruierter SK in Zapfen, so fanden sich beim Menschen nur in der Längsachse leicht gebogene boomerang-artige Bänder, gelegentlich Platten. Die Organellen hatten stets zwei exakt parallele im Abstand von 35 nm (= Dicke) stehende Hauptoberflächen und unregelmäßige Ränder. Ihre maximale Länge variierte zwischen 600 und etwas über 1.000 nm, ihre Höhe zwischen 200 und leicht über 500 nm, wie man aus der Abbildung Homo19 ersehen kann. Eine ähnliche Morphologie läßt sich auch aus der gezeichneten Schnittserie von Pedler & Tilly (1965) für den Rhesusaffen ableiten. Hier, wie auch beim Menschen und Makaken (Chun et al. 1996), standen nur wenige SK in Beziehung zu zwei verschiedenen Synapsen. Ahnelt et al (1990) fanden in menschlichen Zapfenterminalen SK von 200 - 700 nm Länge, wobei aber auch sehr lange vorkamen, die an 2 oder gar 3 verschiedenen Triaden be-

teilt waren. Die SK in S-Zapfen waren durchschnittlich signifikant kürzer und lagen auch signifikant dichter beieinander ($1,3 \text{ SK}/\mu\text{m}^2$ gegenüber $0,5 \text{ SK}/\mu\text{m}^2$ in L/M-Zapfen). Auch deshalb passen die im Rahmen dieser Arbeit rekonstruierten menschlichen Zapfen-SK zu L- bzw. M-Zapfen. Die nur 5 von McCartney & Dickson (1985) in einem Zapfenterminal des Meerschweinchens rekonstruierten SK waren leicht gedrehte C-förmig gebogene, band- bis plattenförmige Organellen. Im Gegensatz zu Stäbchen-SK ließen sich unter den in Ergebnissen (4a23) genannten Bedingungen bei der BALB/c Mäusen, selbst unter Ca^{++} -Entzug keine morphologischen Veränderungen von Zapfen-SK feststellen. Von der Grundform her zeigten sich Zapfen-SK hier bandförmig (selten lagen Platten vor), einige waren aber bedeutend länger (über $2 \mu\text{m}$) als bei Affe oder Mensch. Während sie bei den letztgenannten Spezies eher kleiner als Stäbchen SK erschienen (Missotten 1964; vorliegende Arbeit), waren sie bei BALB/c Mäusen durchschnittlich wesentlich größer, dafür aber deutlich weniger (nur ca. 10 bis 25 SK) in Zapfenterminalen. Die drei längsten der rekonstruierten Bänder, von denen ein Beispiel in Abb. 6b und BALB4 und den Animationen 6a.avi & BALB4.avi gezeigt ist, hatten nicht nur in einer, sondern in zwei Ebenen stärkere Verbiegungen und waren mit 3 unterschiedlichen Ribbonsynapsen assoziiert. Von den übrigen analysierten SK waren deutlich mehr an zwei benachbarten Synapsen beteiligt als bei Affe oder Mensch. Im Gegensatz dazu fand Balkema (1991), allerdings bei einem anderen Mäusestamm, durch B16 Antigen Markierung fluoreszenzmikroskopisch SK in Zapfen, die deutlich kleiner und weniger stark gebogen waren als SK in darüberliegenden Stäbchenterminalen. Die von Vardi et al. (1998) bei der Ratte rekonstruierten, nur in vereinfachter Aufsicht gezeichneten Zapfen-SK waren zumeist lange bis extrem lange Bänder, die in vielen Fällen an mehreren Synapsen beteiligt waren und ein bis mehrere Krümmungen bzw. Biegungen aufwiesen. Daneben fanden sich einige deutlich kürzere, vermutlich dann breitere plattenförmige SK. Beim Hühnchen (Jastrow et al. 2006) waren die 25 rekonstruierten SK von drei Zapfenterminalen ebenfalls bandförmig mit leichter C-Krümmung in der Hauptachse und in der Größe den menschlichen ähnlich (Abb. BDG5, 6 und Animationen BDG5.avi & BDG6.avi). Nur ein besonders langes war mit zwei verschiedenen Ribbonsynapsen assoziiert.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß foveanah 10-20, peripher 30-40 synaptische Körperchen in Zapfenterminalen zumeist nur in einer Ebene gekrümmte Bänder oder Platten sind, die gelegentlich an zwei selten mehr unterschiedlichen Ribbonsynapsen beteiligt sein können. Sie sind speziesabhängig kürzer oder länger als Stäbchen-SK und genau mittig zwischen großen Endaufreibungen von Horizontalzellfortsätzen gelegen und stehen mittig meistens genau im rechtem Winkel auf dem als arciform density bezeichneten Plaque der Zellmembran, an dem sie über feines elektronendichtes Material verankert sind. Durch diese Topographie liegt ein Großteil der an die SK gebundenen glutamathaltigen (Massey & Maguire 1995) Vesikel nur wenige Nanometer von der für die Reizübertragung relevanten aktiven Zone der Synapsen entfernt, wodurch eine ultraschnelle Freisetzung ermöglicht wird. Das freigesetzte Glutamat wirkt an verschiedenen Rezeptoren sowohl an direkt benachbarten Horizontalzellfortsätzen als auch an den etwas weiter entfernten ON-Bipolarzellen; diesbezüglich sei auf die instruktive Schemazeichnung

in Vardi et al. (1998) verwiesen. Hier an der ersten Synapse beginnen die neuronalen Schaltkreise für das räumliche und das Farbsehen Calkins & Sterling (1999). Erwähnt sei noch, daß Stevens et al. (1984) in der Retina der Katze zeigten, daß ein Großteil von SK innerhalb ringförmig angeordneter quergestreifter Fibrillen, die wie Wurzelfasern aussahen, lagen. Solche Fibrillen wurden auch bei Mensch und anderen Säugern gefunden; die Autoren vermuteten, sie könnten aktive kontraktile Elemente sein, die die Form von Zapfenterminalen unter Dunkelbedingungen verändern.

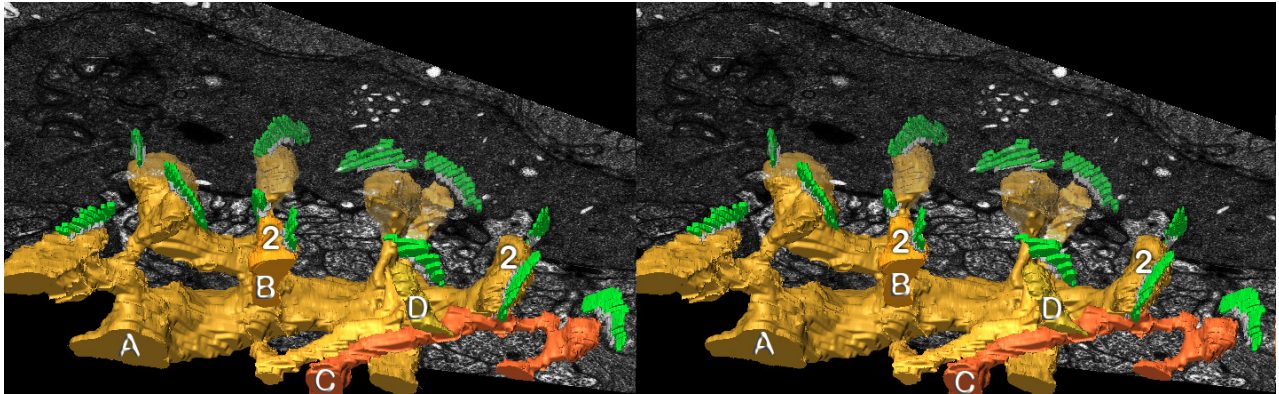


Abb. Disk5 Dendriten verschiedener Bipolarzellen (A-D) können sich, wie bei A erkennbar, stark verzweigen und zentrale Elemente vieler verschiedener Triaden bilden. Zu den mit 2 markierten Dendritenendigungen gehören jeweils zwei verschiedene in Reihe liegende SK. Die die SK lateral flankierenden Horizontalzellfortsätze sind hier nicht dargestellt (Farben wie in Abb. Homo 3; Animation dieser Rekonstruktion: Disk5.avi).

4a25 Synaptische Körperchen in Bipolarzellen

In der Säugerretina gibt es in der Regel 10 morphologisch verschiedene Bipolarzellarten, von denen eine Reihe schon früh lichtmikroskopisch beschrieben wurde (Cajal 1892; Dogiel 1884,1891; Polyak 1941). Durch 3D Rekonstruktionen (z.B. Missotten 1965a, Allen 1966; Cohen & Sterling 1990a, b), insbesondere aber die von Stell (1965) etablierte Golgi-Präparationsmethode, welche licht- und elektronenmikroskopische Anfärbung einzelner Zellen ermöglicht, wurde die Bipolarzellmorphologie in vielen Arbeiten erschlossen (Boycott & Dowling 1969; Famiglietti 1981; Kolb et al. 1981; Mariani 1983a; Nelson & Kolb 1983; McGuire et al. 1984; Quesada et al. 1988; Rodieck 1988; Cohen & Sterling 1990a,b; Boycott & Wässle 1991; Euler & Wässle 1995; Euler et al. 1996). Besonders anschauliche Rekonstruktionen finden sich in Ahnelt et al. (1990); Klug et al. (2003) und Herr et al. (2003). Dabei gibt es Speziesunterschiede, z.B. sind beim Rhesusaffen kleine (midget) Bipolarzellen vorhanden, die der Katze oder Ratte fehlen (Boycott & Kolb 1973a; Nelson & Kolb 1983; Boycott & Wässle 1999). Ein umfassender Speziesvergleich findet sich in Famiglietti (1981). Stäbchenbipolarzellen sind exklusiv mit Stäbchen verbunden (Boycott & Kolb 1973a; Boycott & Wässle 1999), während die übrigen Zapfenbipolarzellen nach ihrer Gesamtmorphologie, insbesondere der Ausdehnung und Verzweigung von Dendriten und Axonen klassifiziert werden. Auch immunhistochemisch lassen sich die Bipolarzellen voneinander differenzieren (Haverkamp & Wässle 2000; Haverkamp et al. 2003a, b), die sich auch durch unterschiedliche Glutamatrezeptorausstattung unterscheiden (Haverkamp et al. 2003). Befunde von Hack et al. (1999) zeigten, daß zumindest bei Maus und Ratte auch OFF-Zapfen Bipolarzellen über ionotrope AMPA Glutamatrezeptoren Signale von Stäbchen erhalten

und weiterleiten. Generell terminieren die bei Licht hyperpolarisierenden OFF-Bipolarzellen in den oberen beiden Lagen der inneren plexiformen Schicht, während sich die bei Licht depolarisierenden ON-Bipolarzellen in den unteren 3 Schichten verzweigen, um dort Synapsen auszubilden. Man unterscheidet invaginierende, d.h. zentrale Elemente in Zapfentriaden bildende, und flache Zwerg- "midget"- sowie 6 verschiedene, zu mehreren Zapfenterminalen ziehende, diffuse, und eine S-Zapfen spezifische Bipolarzellart (Details in Mariani 1983a; Boycott & Kolb 1973a; Boycott & Wässle 1991; Boycott & Hopkins 1991; Euler & Wässle 1995; Boycott & Wässle 1999; Haverkamp et al. 2005). Eine Bipolarzellart scheint nur für die Blauwahrnehmung zuständig zu sein (Mariani 1983b). Während die diffusen Bipolarzellen Typ 1-3 nur flache Kontakte zu mehreren Zapfen ausbilden, zeigen die Typen 4 - 6 an verschiedenen Zapfen 4 - 8 invaginierende Dendriten (Boycott & Wässle 1999). Bipolarzellen nutzen den exzitatorischen Transmitter Glutamat, der an Ribbonsynapsen ausgeschüttet wird, enthalten aber auch inhibitorisches Glyzin, welches sie über Gap-junctions von Stäbchen-Amakrinzellen erhalten (Vaney et al. 1998).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Rekonstruktionen von SK in Bipolarzellen wurden zu kleine Ausschnitte (hauptsächlich Terminalen der mittleren und unteren, einige wenige der oberen inneren plexiformen Schicht) der Zellen visualisiert, um eine sichere Zuordnung von untersuchten SK zu den einzelnen Bipolarzelltypen machen zu können. Eine sichere Unterscheidung der Bipolarzellarten ist konventionell elektronenmikroskopisch auch nur mit extrem langen Schnittserien möglich. Abgesehen von den Stäbchenbipolarzellen mit ihrem typischen subaxolemmalen netzartigen System tubulärer Kaveolae, lassen sich die einzelnen Arten nicht sicher unterscheiden, sofern sie nicht nahezu komplett erfaßt sind (Missotten 1965).

4a251 SK in Bipolarzellaxonen

In Bipolarzellaxonen der inneren plexiformen Schicht (IPS) finden sich SK nur in den Kontaktzonen ihrer Terminalen, also den Synapsen des zweiten Neurons der Sehbahn. Sie liegen in der Regel senkrecht zur Zellmembran präsynaptisch zu einem Ganglienzellendriten und dem Fortsatz einer amakrinen Zelle (Dowling & Boycott 1965, 1966; Dubin 1970). Gelegentlich fanden sich bei BALB/c Mäusen und dem Menschen bei zwei nahe beieinander liegenden SK postsynaptisch zwei Ganglienzellfortsätze, zwischen denen ein Fortsatz einer amakrinen Zelle lag. Auch bildete häufig bei einer Dyade der amakrine Fortsatz nahe der Ribbonsynapse eine konventionelle Synapse aus, bei welcher der Bipolarzellfortsatz das postsynaptische Element war (reziproke Synapse), wie dies auch von Hebel (1971) beim Hund und Dowling & Boycott (1966) sowie Dubin (1970) bei Mensch und Affen beschrieben wurde. Speziesübergreifend sind SK in Bipolarzellen deutlich kleiner als in Photorezeptoren (Missotten 1960a,b; Cohen 1961; Kidd 1961, 1962; Fine 1963; Missotten 1965a; Allen 1966; Dubin 1970; Rodieck 1988; Vollrath et al. 1989) Wie auch die vorliegende Arbeit zeigt, sind sie in Zapfenbipolarzellen beim Menschen, bei BALB/c Mäusen und Ratten stets sehr kleine, kaum gebogene Platten mit Dimensionen um 150 x 70 x 35 nm und nur relativ selten anzutreffen. Die Stäbchenbipolarzellen des Menschen besitzen entweder längere bandförmige Organellen geringer Höhe oder kleine Platten (250 x 150 x 35 nm; Abb. Homo 20, 22, 23, 24; Animationen Homo 20.avi, Homo 22.avi & Homo 23.avi). Allen (1966)

beschreibt diese als in verschiedenen Ebenen leicht gebogenen diskusartige Platten einer Größe von ca. 100 x 150 bis 150 x 350 nm bei einer Dicke von 24-27 nm (bei einer Fixierung mit OsO₄ und Vestopal Einbettung). In diesem Zusammenhang ist die von Foos et al. (1969) rekonstruierte, mit zwei Löchern ausgestattete Platte als außergewöhnlich groß und keinesfalls typisch einzustufen. Dubin (1970), der Mensch, Affe, Katze, Ratte, Kaninchen, Erdhörnchen, Frosch und Taube untersuchte, fand nur in wenigen Fällen multiple SK, die über 250 nm Länge hatten. Ferner bestimmte er die Längen von Ribbonsynapsen, die beim Menschen meist zwischen 50 und 250 (im Mittel 166±14) nm lagen und stets kleiner als konventionelle Synapsen waren. Die Länge von SK gab er für alle untersuchten Spezies mit 140 - 210 nm an, wobei nur der Frosch etwa halb so große SK zeigte. Von der Fovea zur Peripherie hin fand er eine Abnahme der Dichte von Bipolarzellribbonsynapsen bei Makaken, die auch in unterschiedlicher Höhe der IPS erheblich variierte. Ferner fand Dubin (1970) Fortsätze von Amakrinzellen, die postsynaptisch für zwei verschiedene SK waren, wobei diese in einem oder in zwei verschiedenen Bipolarzellterminalen lokalisiert lagen. Bei Ratten und BALB/c Mäusen sind die rekonstruierten SK in Stäbchenbipolarzellen im Gegensatz zu den Befunden beim Menschen nicht immer an die Zellmembran gebunden (ca. 20 % liegen über 200 nm davon entfernt; Jastrow et al. 2005) und etwas größere, teils stärker verbogene Platten. Weitere bandförmige SK ähnelten denen beim Menschen. Gefrierbruchuntersuchungen von SK von Bipolarzellterminalen von Makaken und Kaninchen zeigten rechteckige Platten, die ca. 200 nm lang und 100 nm breit waren und rechtwinklig zur Kante der Synapse standen, an der sie meistens über eine rudimentäre ad befestigt waren, während in wenigen Synapsen mit nur einem postsynaptischen Ganglienzellendriten das SK schräg zur Membran lag (Raviola & Raviola 1982). Im Bereich der äußeren Kurven des Terminals fanden die Autoren Klathrin überzogene Endozytosevesikel. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Spiwoks-Becker et al. 2004; Kolios 2006), bei denen mehr Stäbchen- als Zapfenbipolarzellen analysiert wurden, waren auch bei den in im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SK in Bipolarzellaxonen keine morphologischen Veränderungen unter verschiedenen Hell/Dunkel Bedingungen auffällig. Interessant ist auch die Tatsache, daß der Abstand der SK zu den zugehörigen aktiven Zonen der Synapsen deutlich größer ist als in Photorezeptorterminalen. Dies paßt zu einer bei Säugern etwas geringeren physiologischen Aktivität der zweiten Synapsen der Sehbahn (Sterling & Matthews 2005). Eine präsynaptische Aggregation des metabotropen Glutamatrezeptors R7 findet sich in Rattenbipolarzellterminalen interessanterweise nur in einer Hälfte der aktiven Zone gegenüber nur eines postsynaptischen Fortsatzes, so daß vermutlich die Glutamatfreisetzung für die beiden postsynaptischen Neurone unterschiedlich ist (Brandstätter et al. 1996). In den vielfach untersuchten großen Bipolarzellterminalen des Goldfisches haben die 31-75 ungefähr kugelförmigen SK Durchmesser von 133±4 nm, ein Volumen von 764.000 nm³ und bestehen aus ~ 4000 RIBEYE-Molekülen (Zenisek et al. 2004). In einem komplett rekonstruierten Terminal fanden die Autoren 68 SK, von denen 21 in 8 Feldern aus 2 bis 5 Organellen gruppiert waren. In 30 solcher Terminalen zählten Zenisek et al. (2003) deutlich weniger 25,4±6,5 SK, darunter zeigten die Terminale mit Durchmessern über 9 µm mehr SK (35,7±5,6).

In ihrem Review geben Sterling & Matthews (2005) für Säugerbipolarzellterminalen allgemein eine Zahl von 30-40 SK an. Bei vielen Serienschchnittuntersuchungen zur Klassifikation von Bipolarzellen wurden deren Terminale im Bezug auf SK nicht näher betrachtet. Deshalb sind zelltypspezifische quantitative Angaben über die SK-Zahl rar: eine flache menschliche Zwergzapfenbipolarzelle besaß 30 SK, wobei mehrere solcher Zellen 55 bis 85 Ribbonsynapsen zu einer einzigen nachgeschalteten kleinen Ganglienzelle ausbilden (Kolb & Dekorver 1991); eine bei *Macaca fascicularis* von Klug et al. (2003) rekonstruierte OFF-S-Zapfenbipolarzelle zeigte 15 SK. Bei derselben Spezies fanden Calkins & Sterling (2007) in komplett rekonstruierten diffusen Bipolarzellen, deren Dendriten L-, M- und S-Zapfen basal kontaktierten, beim Typ 2 45 bzw. 54 SK und beim Typ 3 63 bzw. 70 SK, wobei im Bereich der Terminale allein DB2 Zellen 48 ± 4 SK ($n=11$) und DB2 Zellen 69 ± 5 SK ($n=8$) aufwiesen. Rattenstäbchenbipolarzellen besaßen 36 ± 5 SK ($n=23$; Singer et al. 2004); 3 Stäbchenbipolarzellen von C57BL/6J Mäusen hatten 43 ± 1 SK, 3 invaginierende B1 OFF-Bipolarzellen 135 ± 3 SK, 3 B2 OFF-Bipolarzellen, die Stäbchen und Zapfeninput erhalten, 44 ± 3 SK und eine B ON-Bipolarzelle 72 SK (Tsukamoto et al. 2001). Cohen & Sterling (1990a) stellten bei ihren 3D Rekonstruktionen und Serienschchnittanalysen der Katzenretina fest, daß Bipolarzellterminalen 35-105 SK aufweisen, wobei die Zahlen in jedem Subtyp für sich betrachtet nur wenig schwankten: Bipolarzellen vom Typ 1 zeigten 105 ($n=2$); Typ 2 78-82 ($n=2$); Typ 3 47-48 ($n=2$); Typ 4 60-73 ($n=2$); Typ 5 (S-Zapfenbipolarzelle) 35 ($n=1$) SK. Interessanterweise besaßen die Terminale von OFF-Bipolarzellen (Typen 1, 2 und 4) mehr SK als die von ON-Bipolarzellen. Eine von Midorikawa et al. (2007) rekonstruierte Mb1 Goldfischbipolarzelle zeigte 81 SK-assoziierte Synapsen neben 83 konventionellen Synapsen in ihrem Terminal.

4a252 SK in Bipolarzellendriten (ektopische SK)

In Bipolarzellendriten würde man die üblicherweise präsynaptischen Organellen nicht erwarten, da sie dort aber ebenfalls vorkommen, werden sie hier als ektopische synaptische Körperchen (eSK) bezeichnet. Nach ihrer Entdeckung (Missotten 1965a; Kolb 1977) wurden sie systematisch und quantitativ erst von Spiwoks-Becker et al. (2000) untersucht und im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit Spiwoks-Becker erstmals 3D-rekonstruiert. Hierbei und durch Serienschchnittanalysen konnte bei Ratten und BALB/c Mäusen eindeutig gezeigt werden, daß sie in Stäbchen- und eher bei BALB/c Mäusen als bei Ratten auch in Zapfenbipolarzellendriten vorkommen (Spiwoks-Becker et al. 2007). Bei den Ratten fanden sich unter verschiedenen LD Bedingungen eSK nur ca. 30 Min. vor Beginn der Dunkelphase. Die eSK unterschieden sich von SK in Axonen von Bipolarzellen derselben Tiere in der inneren plexiformen Schicht nicht nur durch ihre Lokalisation, sondern auch dadurch, daß sie nie an der Zellmembran verankert waren, deutlich weniger Vesikel banden, durchschnittlich ca. 30 - 50 Prozent kleiner waren und in einigen Fällen dünne tubuläre Kanäle zeigten. Diese zogen selten gerade von einem Ende solcher SK zur Zellmembran. Die in Abb. Disk9 und der Animation Disk9.avi gezeigte Rekonstruktion verdeutlicht, daß es sich dabei um ein verzweigt tubuläres System handelt, welches Zeichen einer "compound" Endo- oder Exozytose (siehe Diskussion 4e1-4: Seite 124) sein könnte.

Die rekonstruierten eSK waren relativ kleine Platten, solche mit kugelförmigen Profilen, wie in Spiwoks-Becker et al. (2000) für 3-4 % der Zapfenpedikel beschrieben, lagen in dem für vorliegende Arbeit untersuchten Material nicht vor, dafür fanden sich bei BALB/c Mäusen, die 6 Wochen post partum getötet wurden, ohne je Licht gesehen zu haben, gelegentlich innen hohle klumpenförmige eSK (Abb. Ekt7; Animationen Ekt7.avi & Ekt7a.avi; Spiwoks-Becker et al. 2007), die aus verschmolzenen Platten entstanden sein könnten.

Bei der Untersuchung der menschlichen Retina konnten eSK ebenfalls nachgewiesen werden. Sie lagen hier einige Mikrometer unterhalb der Ribbonsynapsen an der Grenze der inneren Körner- zur äußeren plexiformen Schicht (Abb. Homo 22) im noch dicken Bereich des Dendritenstamms einer Bipolarzelle. Bei BALB/c Mäusen finden sich eSK besonders unter hoher Lichtintensität (10.000 Lux), nur in der Nähe von Zapfenterminalen in organellenarmen Fortsätzen, außerdem wurden sie bei lichtadaptierten Rinderretinae entdeckt, jedoch nie im Inneren von Zapfentriaden (Spiwoks-Becker 1995, -et al. 2000). Die Autoren wie auch Kolb (1977) ordneten die eSK Bipolarzellendriten zu. Kolb & West (1977) schildern ihre Präsenz auch in einer flachen invertierten Zapfenbipolarzelle und konnten aber kein Terminal dazu nachweisen. Funktionell postulierten Spiwoks-Becker et al. (2000) ein Feedback von eSK tragenden Zapfenfortsätzen während der Lichtexposition über ein bisher unbekanntes Verschaltungsprinzip, da SK üblicherweise nur präsynaptisch auftreten. Da die in vorliegender Arbeit durchgeführten Serienschmittanalysen fast ausschließlich von Stäbchenbipolarzellendriten aber auch eSK direkt in Invaginationen (= ON-Bipolarzellen; Abb. Ekt5, 6) und nie klar erkennbare postsynaptische Verdichtungen an eSK benachbarten Membranen erkennbar waren, ist es möglich, daß eSK dazu dienen, über die Ausbildung tubulärer Netzwerke als eine Art "compound Endozytose" extrazelluläre Flüssigkeit bzw. das darin enthaltene Glutamat aufzunehmen. Dies könnte auch erklären, warum die eSK nicht an die Zellmembran gebunden sind und hätte eine antagonistische Wirkung zur zugehörigen Photorezeptorribbonsynapse.

4a26 Gendefekte, pathologische und Altersveränderungen

Die neuronale Plastizität der Retina läßt sich durch einige Erkrankungen und die dabei auftretenden kompensatorischen Mechanismen belegen. So z.B. bei der durch Dauerlicht bewirkten Degeneration vor allem der Stäbchen bei Albino-Ratten und -Mäusen (LaVail 1976). Beim Vergleich von Retinae älterer und junger Menschen fanden Eliasieh et al. (2007) 27 % weniger Photorezeptoren in der zentralen und 7 % weniger in der peripheren Retina. In foveafernen Bereichen der Retinae älterer Menschen wurden viele dendritische Fasern von Stäbchen- und ON-Zapfen Bipolarzellen sowie von benachbarten Horizontalzellfortsätzen in der äußeren Körnerschicht gefunden (Eliasieh et al. 2007). Leider wurde keine elektronenmikroskopische Untersuchung abgeschlossen, bei der eventuell hier kompensatorisch neu auftretende Ribbonsynapsen hätten nachgewiesen werden können. Solche Kompensationen wurden bei Maus-Chimären mit genetischem Defekt (rds-Maus), der zur progressiven Degeneration führt, in Form multipler SK in überlebenden Stäbchenterminalen gefunden und auch dreidimensional an Beispielen rekonstruiert (Sanyal

et al. 1992; Jansen et al. 1997). Hier bei fanden die Autoren multiple SK und vermehrte postsynaptische Elemente in den noch erhaltenen Stäbchensynapsen betroffener Regionen.

Neben an Mitochondrienaußenmembranen angelagerten sakkulären Membranschläuchen fanden Kuwabara & Funahashi (1976) bei Charles River CD-Albinoratten unter 500 cd starker Beleuchtung bevorzugt an den SK Profilenden noduläre Auftreibungen und ab 24-stündiger Exposition erste Degenerationen kompletter Stäbchenterminale. Bei extremem Licht (2.200 Lux) ausgesetzten BALB/c Mäusen vergrößerten sich die bereits vorhandenen postsynaptischen Fortsätze und zeigten mehrere Endauftreibungen. Dabei bildeten sich statt der üblichen singulären doppelte bis dreifache Ribbonsynapseneinheiten in den Endkolben der noch erhaltenen Stäbchen aus, die beispielhaft auch 3D-rekonstruiert wurden (Jansen et al. 1997). Bei Mäusen des nob (no b-wave Stammes, dem im Elektroretinogramm die B Welle fehlt) kommt es zu angeborener Nachtblindheit. Bayley & Morgans (2007) untersuchten solche Tiere und fanden hier in der inneren Körnerschicht bei Normaltieren nicht auftretende Ribbonsynapsen mit rundlich klumpigen SK, die durch RIBEYE-Immunofluoreszenzmarkierung und elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden, und abnormal hierher eingewachsenen Bipolar- bzw. Horizontalzellfortsätzen. Durch das Einsprossen ihrer Dendriten in Zapfenterminalen können Stäbchenbipolarzellen bei genetisch bedingten stäbchenspezifisch degenerativen Erkrankungen den Ausfall der Stäbchenterminalen teilweise kompensieren, wie von Peng et al. (2000) gezeigt wurde. Haverkamp et al. (2006) demonstrierten, daß Zapfenbipolarzellen in *CNGA3*^{-/-} Mäusen, bei denen die Zapfen spezifisch ausfallen, kompensatorisch ektopische Synapsen an Stäbchenterminalen ausbilden, was bei *CNGA3*^{-/-} *Rho*^{-/-} Mäusen, deren Stäbchen auch afunktionell sind, nicht der Fall war. Außerdem fanden die Autoren das Gegenphänomen bei *Rho*^{-/-} Mäusen mit funktionslosen Stäbchen: hier bildeten Stäbchenbipolarzellen Kontakte zu den funktionellen Zapfenterminalen aus. Dies war bei *CNGA3*^{-/-} *Rho*^{-/-} Mäusen deren Zapfen ebenfalls afunktionell sind, nicht zu beobachten. Hieraus läßt sich folgern, daß ektopische Synapsen nur an funktionierenden Photorezeptoren auftreten und sich Input "beraubte" Bipolarzellen neuen Input suchen (Haverkamp et al. 2006).

Interessanterweise wurde ein ähnliches Auswachsen von Fortsätzen auch bei der experimentellen Netzhautablösung (Lewis et al. 1998) und der Retinitis pigmentosa beobachtet (Li et al. 1995). Bei der artifiziellen Netzhautanlösung fanden sich Ribbonsynapsen im Bereich der äußeren Körnerschicht (Lewis et al. 1998). Bei der Retinitis pigmentosa kommt es außerdem im Krankheitsverlauf neben Veränderungen an Außen- und Innensegmenten zum Auftreten welliger 12nm dicker Intermediärfilamente in Zapfenterminalen. Es finden sich perinukleär SK und Vesikel sind im Zapfenterminal nur noch an SK erkennbar. Die Morphologie der Ribbonsynapsen selbst scheint unbeeinträchtigt zu bleiben (Szamier & Berson 1977) bis es im weiteren Krankheitsverlauf zum kompletten Verlust aller Stäbchen kommt (Szamier & Berson 1977). Während des Winterschlafs fanden Remé & Young (1977) bei Erdhörnchen große Aggregationen verkleinerter SK in Zapfenterminalen, die bis zu 5,5 µm oberhalb der Triaden lokalisiert waren. Diese erinnern an die großen Felder von SK der Meerschweinchenzirbeldrüse, zeigten aber nicht die dort oft angetroffene, ziemlich exakt parallele Anordnung von Untergruppen. Da nach Ende des Winter-

schlafs diese Akkumulationen von SK verschwanden, sind sie als Speicherform für SK Material anzusehen.

Stäbchenterminalen, die über Drusen (extrazellulären Ablagerungen zwischen Pigmentepithelzellen und der Bruch'schen Membran) lokalisiert sind, zeigten in Serienschchnittanalysen von Johnson et al. (2005) keine SK während über Drusen lokalisierte Zapfenterminalen kaum noch Invaginationen und weniger bis keine SK mehr erkennen ließen. Bei $CNGA3^{-/-}Rho^{-/-}$ Mäusen, die ab dem 3. postnatalen Monat progressive Photorezeptordegeneration zeigen, fanden Claes et al. (2004) bei den im Vergleich zum Wildtyp wenigen noch vorhandenen Stäbchenterminalen in über 45 % der Fälle zwei oder mehr SK (Wildtyp nur 4 %), außerdem eine erhebliche Zunahme postsynaptischer Elemente und eine Änderung der Morphologie der anfangs hufeisenförmigen SK zu ringartigen und schließlich nur noch vereinzelt kleinen klumpigen Strukturen. In Bipolarzellterminalen traten degenerative Veränderungen an SK und Ribbonsynapsen der erst ab dem 9. postnatalen Monat auf.

4b quantitative Untersuchungen synaptischer Körperchen

Die Plastizität synaptischer Körperchen erstreckt sich auf Veränderungen in Zahl, Größe, Form, Gruppierungsanordnung und Lokalisation, wobei Tages- und jahreszeitliche Rhythmen, insbesondere aber der Einfluß von Licht- und Dunkelheit eine Rolle spielen (Review: Vollrath & Spiwoks-Becker 1996).

Um für retinale SK sinnvolle, vergleichbare quantitative Aussagen zu machen, müssen einige Parameter beachtet werden, da diese im Gegensatz zur Zirbeldrüse, die zumindest bei Säugern einen relativ homogenen Aufbau hat, eine klare Schichtung und besonders foveanah topographische Unterschiede aufweist. Während Stäbchen meist 1-2 SK besitzen, liegen bei Zapfen oben beschriebene foveanähe- und speziesabhängige Unterschiede vor. Für vergleichbare wissenschaftliche Aussagen müssen korrespondierende Areale über die gesamte zu vermessende Anschnittslänge in gleicher Orientierung geschnitten werden, was diffizil ist, und die Größe des ausgewerteten Areals oder besser noch Gewebsvolumens muß angegeben und ausreichend groß sein. Neben der Schnittdicke müssen die Exzentrizität, Spezies, und Fixierungs- bzw. Einbettungsbedingungen bekannt und vergleichbar sein. Außerdem muß zwischen Stäbchen- und Zapfenterminalen unterschieden werden. Bei quantitativen Vergleichen sollte eine hohe SK-Zahl an möglichst vielen Tieren aus gleichbehandelten Gruppen in vergleichbar großen Arealen untersucht werden und idealerweise eine Disektormethode angewendet werden. Für Profillängenmessungen sollte zusätzlich eine exakte (zuvor geeichte) Messung zu Grunde liegen. Leider sind in vielen Arbeiten diese Bedingungen nicht oder nur unzureichend erfüllt, was den Ergebnisvergleich erschwert.

In Bipolarzellen korreliert die Zahl von SK mit der Komplexität der Verschaltung und ist für die Nachverarbeitung der Signale von Bedeutung. In der Zirbeldrüse dürfte die Zahl von SK, besonders membrangebundener, Einflüsse auf Zellaktivität, interne Regelkreise und Melatoninproduktion haben. Zusammen mit der Oberfläche ist die Zahl der SK für die Menge an Transmittervesi-

keln, die für eine Signaltransduktion zur Verfügung stehen mit entscheidend, da in dieser endokrinen Drüse außer den an SK gebundenen nur wenige Vesikel zu Verfügung stehen.

4b1 Pilotuntersuchungen

Die Ergebnisse der in dieser Schrift vorgestellten Pilotuntersuchungen zeigten sehr drastische Unterschiede zwischen den Disektorwerten für ganze synaptische Körperchen (SK) und deren Profilizahl. Dies liegt an der Form der Organellen, die die Ergebnisse der etablierten Profilizahlmethode ganz wesentlich beeinflusst. So liefern z.B. beim Meerschweinchen sehr große Platten, Bänder bzw. irreguläre SK über doppelt so viele Profilanschnitte wie die kugelförmige SK. Betrachtet man die Relationen der Ergebnisse für verschiedene Tiere einer gleich behandelten Gruppe, so finden sich sehr deutliche Unterschiede insbesondere, wenn relativ geringe Gewebsvolumina untersucht wurden, daher wurde für nachfolgende Disektoruntersuchungen ein Richtwert von mindestens $1.000 \mu\text{m}^3$ Gewebe festgelegt. Dies läßt sich mit einem Schnittpaar bei Schnitten in üblicher Größe in der Regel erreichen, wenn alle auf beiden Schnitten unbeschädigten Kantenabschnitte ausgezählt werden. Ferner wurden in Folgeuntersuchungen immer zusätzlich Profillängen gemessen, um SK-Größenveränderungen zu erfassen.

4b2 Theoretische Überlegungen zu Profillängen, Oberflächen und Volumina von SK

Da SK mit größerem Volumen bei konstanter Dicke auch größere Oberflächen haben, können diese entsprechend mehr Vesikel binden, was funktionell relevant und neben den Lagebeziehungen dieser Vesikel zur aktiven Zone der eigentlich interessierende Parameter ist. Unter der Annahme SK seien im Gewebe zufällig orientiert, kann man bei konstanter Dicke regulär polymerisierter SK vermuten, daß, wenn die durchschnittliche Länge von Profilen einer ausreichenden SK-Zahl gemessen wird, diese vom durchschnittlichen Volumen derselben abhängig ist. Um dies mathematisch zu erfassen, erscheint folgender von Prof. Dr. Müller-Stach (FB Mathematik, J. Gutenberg-Universität Mainz) vorgeschlagene Ansatz sinnvoll: vereinfacht man die Form von SK zu Quadern, deren Abmessungen a (Höhe), b (Breite) und c (Dicke) sind, wobei c der einheitlichen Dicke von SK (35 nm) entspricht, so resultiert ein Volumen von $a \times b \times 35 \text{ nm}$. Nimmt man an, daß c im Vergleich zu a und b klein ist und $b = \lambda \times a$ gilt, wobei λ durch ein festes Seitenverhältnis der Höhe zur Breite von SK definiert wird (z.B. 1 zu 3), so kann man räumliche Schnitte durch Geradenschnitte in einem ebenen Modell ersetzen (s. unten). Zur weiteren Vereinfachung werden nur Schnitte durch den Ursprung betrachtet. Das Volumen ist durch $V = \lambda \times a^2 \times 35 \text{ nm}$ gegeben, also ist \sqrt{V} proportional zur Länge eines räumlichen Schnitts. Die Oberfläche des Quaders läßt sich dann durch $2 \times (a \times b + a \times c + b \times c) = 2 \times \lambda \times a^2 + 2 \times 35 \text{ nm} \times a \times (\lambda + 1)$ errechnen. Betrachtet man die SK wegen ihrer konstanten Dicke als vereinfachtes ebenes Modell in Form eines Rechtecks mit den Seitenlängen a (Höhe) und $\lambda \times a$ (Breite), wobei als Seitenverhältnisse Werte von 1 bis 6 angenommen werden, wodurch die Größe von λ bestimmt wird, so ist der Flächeninhalt des Rechtecks $A = \lambda \times a^2$. Legt man nun den Mittelpunkt des Rechtecks in ein Koordinatensystem achsenparallel dazu und betrachtet alle Geraden durch den Ursprung mit dem Steigungswinkel φ (von der X-Achse aus gemessen, siehe Abb. Disk6), so ist die Länge

des Schnittes einer gemessenen Strecke innerhalb des Rechtecks (die praktisch einer Längenmessung eines zufällig im Raum orientierten SK gleichzusetzen ist) mit den Rändern des Rechtecks nach Pythagoras $L(\varphi) = \frac{\lambda a}{\cos(\varphi)}$, falls $0 \leq \varphi \leq \arctan(1/\lambda)$ und $L(\varphi) = \frac{a}{\sin(\varphi)}$.

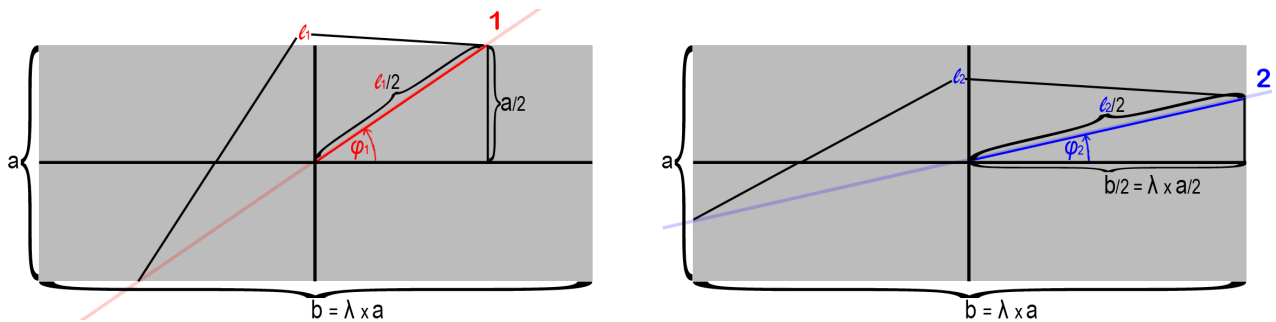


Abb. Disk6 Ein SK (grau), zum Rechteck vereinfacht, hat die Höhe a und die Breite b , welche durch ein festes Verhältnis zur Höhe vorgegeben wird, z.B. 1:3 so, daß $b = \lambda \times a$, im Beispiel $b = 3 \times a$ ist. Legt man nun einen Schnitt **1** im Winkel φ_1 , der größer als $\arctan(1/\lambda)$ Grad ist, durch das Rechteck, so erhält man ein Schnittprofil, dessen Länge l_1 ist. Die halbe Länge $l_1/2$ läßt sich nun aus dem rechtwinkligen Dreieck durch die bekannte Seitenlänge $a/2$ und den Winkel φ_1 errechnen. Sie gilt jedoch nur so lange der Schnitt **1** die Ober- und auch die Unterkante des Rechtecks trifft. Für alle Schnitte **2** mit einem Winkel φ_2 , der kleiner als $\arctan(1/\lambda)$ Grad ist, erhält man ein Schnittprofil, dessen Länge l_2 ist. Die halbe Länge $l_2/2$ läßt sich nun aus dem rechtwinkligen Dreieck durch die bekannte Seitenlänge $b/2 = \lambda \times a/2$ und den Winkel φ_2 errechnen. Auch hier gilt dies nur, solange der Schnitt **2** die rechte sowie auch die linke Seite des Rechtecks trifft.

Nimmt man nun an, daß alle Winkel gleich verteilt, d.h. die SK wirklich zufällig im Raum orientiert vorliegen, so bekommt man für die mittlere Schnittlänge (Erwartungswert)

$$l = \frac{1}{\pi/2} \int_0^{\arctan(1/\lambda)} \frac{\lambda a}{\cos(\varphi)} d\varphi + \frac{1}{\pi/2} \int_{\arctan(1/\lambda)}^{\pi/2} \frac{a}{\sin(\varphi)} d\varphi$$

Wenn man verschiedene Seitenverhältnisse einsetzt, errechnen sich hierbei folgende Werte:

SK Höhe:Breite =	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Erwartungswert l	1,1222 x a	1,5317 x a	1,7830 x a	1,9637 x a	2,1046 x a	2,2200 x a

Im Fall $\lambda = 1$ (Quadrat) bekommt man den Erwartungswert $l = 1.122 \times a$. Dies ist plausibel, da die Diagonale $\sqrt{2} \times a$ ist.

Diese Berechnung hat jedoch die Einschränkung, daß nur die Längen von Schnitten erfaßt werden, bei denen stets beide gegenüberliegende Kanten des Rechtecks getroffen werden und berücksichtigt nicht die Fälle, in denen Schnitte durch aneinander angrenzende Kanten verlaufen (vgl. Text zur Legende der Abb. Disk6).

Um herauszufinden, wieviele Längen man messen muß, damit man ein signifikantes Ergebnis erhält, wird angenommen, es seien N Stichproben genommen und mit der obigen Formel $l_1, 2, \dots, l_N$ gemessen. Nach der Chebyshevschen Ungleichung für die Wahrscheinlichkeit P , daß der

Mittelwert $l_N = \frac{l_1 + l_2 + \dots + l_N}{N}$ um mehr als ε vom Erwartungswert E abweicht erhält man

$$P([l_N - E] \leq \varepsilon) \leq \frac{Var}{N\varepsilon^2},$$

wobei Var die Varianz ist. Die Varianz kann man berechnen durch

$$\text{Var} = \frac{1}{\pi/2} \int_0^{\arctan(1/\lambda)} \left(\frac{\lambda a}{\cos(\varphi)} - \ell \right)^2 d\varphi + \frac{1}{\pi/2} \int_{\arctan(1/\lambda)}^{\pi/2} \left(\frac{a}{\sin(\varphi)} - \ell \right)^2 d\varphi \text{ und erhält als Ergebnis:}$$

SK Höhe:Breite =	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Var =	0,0139 x a ²	0,2002 x a ²	0,6405 x a ²	1,2368 x a ²	1,9369 x a ²	2,7109 x a ²

Mit $\varepsilon = \frac{5}{100} \ell$ (5 Prozent) bekommt man also die Fehlerwahrscheinlichkeit $\frac{\text{Var}}{N\varepsilon^2} = \frac{\text{Var}100^2}{N5^2\ell}$. Da

eine Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger als 5 Prozent wissenschaftlich akzeptabel ist, muß gelten

$$\frac{\text{Var}}{N\varepsilon^2} = \frac{\text{Var}100^2}{N5^2\ell} \leq 0,05; \text{ bzw. } N \geq \frac{\text{Var}100^3}{5^3\ell^2}.$$

Hierdurch läßt sich die notwendige Stichprobenzahl errechnen. Sie beträgt für

SK Höhe:Breite =	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Stichprobenzahl	89	683	1612	2566	3499	4401

Diese Berechnungen sind nur möglich, wenn man ein durchschnittliches Verhältnis von Länge zu Breite definiert, sonst kann man nicht von gemessenen Längen auf Volumina oder Oberflächen schließen. Man sollte schon unter den o.g. Vereinfachungen und Einschränkungen mindestens die angegebene Stichprobenzahl nehmen, um einen wissenschaftlich validen Wert zu bekommen. Da SK aber nie alle dieselben Höhe zu Breite Verhältnisse haben, sollte man von deren Maximum ausgehen. Da SK ferner nie tatsächlich rechtwinklige Platten, sondern meist unterschiedlich stark gebogene boomerangartige Organellen mit zusätzlichen Verdrehungen sind, wäre die Zahl der für wissenschaftlich haltbare Aussagen zu vermessenden SK unter einer Versuchsbedingung auf jeden Fall um ein mehrfaches höher festzulegen. Sie genau zu bestimmen ist praktisch unmöglich. Man müßte dazu alle möglichen SK Formen in allen realistischen Größen und jedem möglichen Raumwinkel (90 x 90 x 90 Grad in x-, y- und z-Richtung, dies sind allein schon 729.000 Möglichkeiten) virtuell generieren. Dann müßte man aus der Beziehung von deren Durchschnittsvolumen zu den Profillängen generierter zufälliger Anschnitte einen genauen Umrechnungsfaktor bestimmen.

Fazit: Wenn man Profillangemessungen von SK durchführt und dabei einigermaßen valide Ergebnisse erhalten will, sollte bei einem durchschnittlichen Höhe zu Breite Verhältnis von 1:4 und maximal 1:6 mindestens die doppelte o.g. maximale Profilzahl, also über 8.800 für eine Versuchsbedingung vorhanden sein. Selbst dann würde man bei zufälliger Orientierung der SK im Raum und zufälliger Stichprobenauswahl noch einem Fehler um 5 % machen. Wenn nicht zufällig orientierte Schnitte der Retina gemacht werden, genügt vermutlich eine geringere Zahl, da die SK zumindest ungefähr senkrecht zur Oberfläche der Retina orientiert stehen. Auf das Problem der Orientierung von SK, welches unterschiedliche Ergebnisse bei der Längenbestimmung und Beurteilung von SK zur Folge hat, wiesen schon Grün (1980) und McCartney & Dickson (1985) hin, jedoch ohne einen weitergehenden mathematischen Nachweis zu führen.

Fakt ist: die Profillängenmessungen erfassen nur den Abstand zwischen den Außengrenzen einer mehr oder weniger zufällig im Raum orientierten platten- oder bandförmigen Organelle und haben mit deren maximaler oder minimaler Ausdehnung, Länge oder Breite direkt nichts zu tun! Nur eine, wie oben gezeigt, doch sehr große Zahl von Profillängenmessungen für eine identische Versuchsbedingung erlaubt einen wissenschaftlich haltbaren Rückschluß auf die Größe oder funktionell relevante Oberfläche von SK. Zuverlässig lassen sich diese valideren Größen allein durch 3D-Rekonstruktionen mit Hilfe geeigneter Software vermessen, da hierfür die Auflösung und Präzision auch der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie nicht ausreicht. Da 3D-Rekonstruktionen aus elektronenmikroskopischen Serienschritten jedoch sehr zeitintensiv sind, konnten in der vorliegenden Arbeit nur einige SK exemplarisch für verschiedene Versuchsbedingungen untersucht werden. Wollte man hierbei aussagekräftige SK-Zahlen erreichen, würde der extreme Aufwand in keinem sinnvollen Verhältnis mehr zum Ergebnis stehen. Auf jeden Fall geben Profillängenmessungen insbesondere bei sehr hoher Zahl vermessener SK, Hinweise auf deren Größe und Oberfläche und erlauben es, ihre morphologische Dynamik zu beschreiben. Beim Vergleich solcher Werte für verschiedene experimentelle Bedingungen spielt auch die Größe des Unterschieds der Mittelwerte (neben Standardabweichung und Maximalwerten) eine wesentliche Rolle. Eingedenk der oben angestellten Überlegungen und Rechnungen erscheinen nur Studien zuverlässig, bei denen klare und deutlich signifikante Unterschiede bei präziser Schilderung der Analysebedingungen vorliegen.

Da synaptische Körperchen in der Regel erhebliche Größenunterschiede bei ein und demselben Tier aufweisen und zudem noch unterschiedlich stark gebogen und/oder verdreht sind, wie viele Abbildungen rekonstruierter SK belegen, ist eine allgemeine Beschreibung von SK unter einer Versuchsbedingung kaum sinnvoll möglich, da eine "durchschnittlich X mal Y nm mal 35 nm (wenigstens die Dicke ist üblicherweise konstant) große" Organelle bei weitem nicht alle möglichen Form- und Größenvarianten wiedergeben kann. Die Volumina dreidimensional rekonstruierter SK lassen sich über die Zählung der Voxel segmentierter bzw. rekonstruierter Organellen genau errechnen (umso genauer, je präziser die Voxelgröße bestimmt werden kann). Da die Organellen im Falle einer regelmäßigen Polymerisation ihrer Komponenten eine konstante Breite von 35 nm haben, kann so sogar relativ einfach ihre funktionell bedeutsame Oberfläche errechnet werden. Diese steht in Beziehung zu den gebundenen Vesikeln bzw. der Zahl an Vesikeln, die gebunden werden könnten. Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß nie alle SK gleichmäßig und nur selten maximal dicht mit Vesikeln besetzt sind, außerdem haben nicht alle Vesikel dieselbe Größe (manche sind bis zu 3-fach größer als andere). In der Retina, aber auch unter bestimmten Versuchsbedingungen an anderen Lokalisationen binden an Vesikel, die selbst an SK befestigt sind, noch weitere über feine Brücken elektronendichten Materials (Vollrath et al. 1989; Spiwox-Becker 1995). Außerdem ist zu beachten, daß bei starken Biegungen auf einer konkaven Seite eines SK weniger und auf seiner konvexen Seite mehr Vesikel gebunden werden können, da es hier physiologische Mindestabstände gibt. Bei parallel stehenden SK ist zu berücksichtigen, daß Vesikel, die sich mitten zwischen 2 SK befinden, in den meisten Fällen von beiden gebunden

werden, also insgesamt im Bereich der parallelen Oberflächen nur halb so viele Vesikel, dafür aber doppelt so fest gebunden werden. Auf diesem Wege kann es auch zu der exakt parallelen Ausrichtung plattenförmiger SK in Feldern kommen. Analoges gilt auch für Vesikel, die von 2 eng beieinander liegenden klumpenförmigen oder kugeligen SK beiderseits gebunden werden.

4b3 Disektor

Bei der in Methoden (5b5: Seite 21f.) und Jastrow et al. (1997b) vorgestellten bidirektionalen Disektorzählmethode ist ein theoretischer, in praxi jedoch nicht relevanter, Fehler möglich (siehe Legende Abb. Met3). Um diesen auszuschließen, ist folgende in Abb. Disk7 gezeigte Modifikation notwendig: Die untere Ausschlußlinie muß um den maximal möglichen Durchmesser eines Profils eines SK angehoben werden. Im Gegensatz zu der verwendeten, in Abb. Met3 gezeigten, Methode ist hier keine unsichere Zone mehr vorhanden. Die Anwendung der fehlerfreien Methode führt aber zu erheblicher Verkleinerung der evaluierbaren Fläche und wurde wegen des vernachlässigbaren eventuellen Fehlers (Wahrscheinlichkeit $< 1:10^6$) nicht angewendet. Im Falle deutlich häufigerer Strukturen mit stark gekrümmten Profilen, hätte sie jedoch verwendet werden müssen.

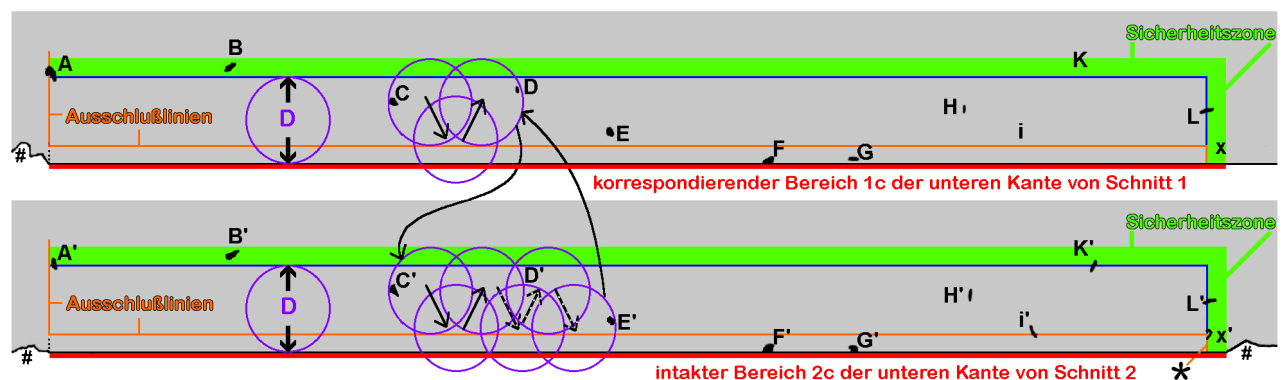


Abb. Disk7 Das Prinzip einer fehlerfreien Disektor Quantifizierung. Hierbei ist das Vorgehen abgesehen von den folgenden Abweichungen mit der in Material und Methoden beschriebenen Methode identisch: Die ausgewertete Fläche ist in beiden Schnitten um einen Streifen mit der Höhe des maximalen Profildurchmessers eines SK ($2,5 \mu\text{m}$ in der Rattenzirbeldrüse) reduziert, d.h. die untere Ausschlußlinie wird in diesem Abstand parallel zum intakten Bereich der Schnittkante verschoben. Das Partikelprofil **X'** ist komplett erkennbar und wird nicht gezählt, da es die kurze rechte Ausschlußlinie berührt (*). Die Profile **F**, **F'**, **G** und **G'** liegen außerhalb des Zählgebietes und auch **I'** wird nicht berücksichtigt, da es die untere Ausschlußlinie überschreitet. # = beschädigte Schnittkanten.

Allgemein wird davon ausgegangen, daß SK zufällig und homogen im Zirbeldrüsengewebe verteilt sind. Hierauf basieren alle bis dato durchgeführten Untersuchungen und Vergleiche. Belegt wird dies durch Befunde, bei denen Profilzahlen von SK und Feldern im proximalen, intermediären und distalen Bereich der Drüse nicht statistisch signifikant verschieden waren (SD Ratten: Kurumado & Mori 1977; Wistar-Ratten: Kosaras et al. 1983; Meerschweinchen: Vollrath 1973). Im Gegensatz dazu zeigt die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie regionale Häufungen von SK (Spiwox-Becker et al. unveröffentlicht). Auch die hier vorgestellten Ergebnisse der Disektorzählungen bei Tieren innerhalb gleichbehandelter Gruppen zeigten erhebliche Abweichungen (Hainz et al. 1997; Jastrow et al. 1997b, 1998; Hainz 2003; Jastrow & Racke 2007). Dies zeigt, daß entweder die untersuchten Gewebsareale zu klein waren, oder die für die Applikation einer

Disektorzählung (DZ) notwendige gleichmäßige Verteilung der zu untersuchenden Strukturen (Gundersen et al. 1988a, b) doch nicht gegeben war. Die inhomogene Verteilung von SK im Gewebe wird im Wesentlichen verursacht durch selten bis gar nicht auftretende Felder, in denen mehrere SK in einigen hundert Quadratnanometern dicht beieinanderliegen. So fanden sich z.B. in einer Rattenzirbeldrüse in 2 Schnittpaaren, die über 1 μm voneinander entfernt aus derselben Schnittserie stammten, signifikant verschiedene Werte bei der Profilzählung, die ebenfalls in der Disektorauswertung, wenn auch nicht mehr signifikant, verschieden waren. Wie bereits die Pilotuntersuchungen zeigten, sind Wertabweichungen für gleichbehandelte Tiere einer Gruppe um so größer je kleiner die ausgewerteten Gewebsareale sind.

Da die Durchführung von Disektor-Quantifizierungen im Vergleich zu den "klassischen" PZ in Flächen über das Vierfache an Zeit benötigt, hatten Jastrow et al. (1997b) vorgeschlagen, durch die Auszählung genügend großer Areale bzw. Volumina nur für ein Tier einer identisch behandelten Gruppe einen Faktor zu bestimmen, den man auf die Ergebnisse der deutlich schneller durchführbaren PZ der übrigen Tiere anwendet. Der Vergleich der so errechneten Werte mit den tatsächlich gezählten zeigte, besonders bei plattenförmigen SK, jedoch inakzeptabel hohe Abweichungen auch dann noch, wenn die durchschnittlichen Profillängen berücksichtigt werden. Konkret betragen die Abweichungen für die aus Jastrow & Racke (2007) auf Seite 72 zitierten Ergebnisse durchschnittlich über 25 Prozent. Bei Hainz (2003) lagen sie gemittelt um 15 %. Um wenigstens für untersuchte Gewebsareale eine zuverlässige quantitative Aussage machen zu können, muß folglich für jedes einzelne Tier, selbst innerhalb einer gleichbehandelten Gruppe, eine DZ durchgeführt werden.

Insbesondere aufgrund der größeren Felder von SK mit vielen Einzelorganellen, die ausgesprochen selten vorkommen, wären für eine tatsächlich valide Quantifizierung von SK in einer gesamten Zirbeldrüse Auszählungen entlang der Kanten von Dutzenden von Schnittpaaren erforderlich, die in systematischem Zufall aus dem Gesamtgewebe gewonnen werden müßten, um ein ausreichend großes Auswertungsvolumen zu erhalten (Jastrow et al. 1996b; -1997b,e). Dies ließe sich mit der hier vorgestellten TEM Methode praktisch nicht vernünftig realisieren. Das sinnvollste Procedere zur validen Quantifizierung von SK in der Zirbeldrüse wäre eine Markierung von SK mit Antikörpern z.B. gegen RIBEYE-A oder -B und die anschließende immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung an einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM), bei der in einem systematischem Zufallverfahren optische Disektoruntersuchungen gemäß dem von Gundersen et al. (1988b) beschriebenen Fraktionator durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang bestätigen erste LSM-Untersuchungen der Zirbeldrüse eine zum Teil unregelmäßige Verteilung von SK und zeigen eine größere Zahl von Feldern als TEM Untersuchungen dies vermuten ließen (Spiwox-Becker et al. unveröffentlicht).

4b4 Vergleich der erhobenen quantitativen Daten mit anderen Untersuchungen

Die Plastizität von SK in der Zirbeldrüse wurde zuerst von Vollrath & Huss (1973) in Pinealozyten des Meerschweinchens entdeckt. Bezüglich der Länge von Profilen synaptischer Körperchen sind folgende Daten für die Rattenzirbeldrüse bekannt: Bei unter (LD = 12:12; Licht an um 7.00)

um 01.00 getöteten Tieren betrug sie $206,5 \pm 6,8$ nm (Maitra et al. 1986); bei um 12.00 getöteten Tieren (LD = 12:12; Licht an um 6.00) $200,9 \pm 8,7$ nm (von Mach & Vollrath 2003), bei 2 Wochen jüngeren, unter gleichen Bedingungen gehaltenen Ratten 169 ± 6 (Spiwoks-Becker 1995), bzw. 145 ± 4 Nanometer (Jastrow et al. 1997a) und bei um 24.00 getöteten Tieren 204 ± 7 (Spiwoks-Becker 1995) bzw. 185 ± 6 nm (Jastrow et al. 1997a). Bei letztgenannten Untersuchungen betrug die signifikanten Längenzunahmen 23 (Spiwoks-Becker 1995) bzw. 27,6 % (Jastrow et al. 1997a). Mit Hilfe von Serienschnittanalysen wurde eine Oberflächen- und Volumenzunahme von jeweils 19,3 % errechnet (Jastrow et al. 1997a). Diese Daten gelten für unter normalen Lichtbedingungen (LD 12:12) gehaltene Tiere.

Im Gegensatz dazu stehen die Befunde von Jastrow & Racke (2007), bei denen extreme Photoperioden verwendet wurden: Eine 20-stündige Lichtexposition führte zu einer deutlich signifikanten Profillängenzunahme ($P < 0,001$) im Vergleich zu der 4-stündigen Lichtexposition bei LD 4:20 Tieren. Bei der Zusammenfassung aller LD 20:4 Gruppen zeigte sich im Vergleich zu den summierten Längenwerten der 4:20 Gruppen ebenfalls eine hochsignifikante Längenzunahme ($P < 0,001$). Eine längere Lichtexposition führte somit zu längeren SK Profilen. Für Profillängenmessungen in der Zirbeldrüse unter Dauerdunkelheit gibt es keine Literaturdaten, bei 4 Monate unter Dauerlicht gehaltenen Meerschweinchen wurde nur in der distalen und intermediären, nicht aber der weitaus größeren Hauptregion der Drüse eine signifikante Profillängenzunahme gefunden (Vollrath 1986).

Die in Jastrow & Racke (2007) publizierte Tabelle faßt alle verfügbaren bis dato publizierten Daten bezüglich der Häufigkeit synaptischer Körperchen auf die Standardfläche von $20.000 \mu\text{m}^2$ umgerechnet zusammen, die bei in vivo Material von Sprague-Dawley Ratten erhoben wurden. Einige Reviews fassen Angaben für andere Rattenstämme, Kultur- und experimentelle Bedingungen sowie für weitere Spezies zusammen (McNulty & Fox 1992; Bhatnagar 1994; Karasek & Zielinska 2000). Generell zeigten Profilzahlen von SK keine relevanten geschlechtsspezifischen oder menstruationszyklusabhängigen Unterschiede (Saidapur et al. 1990). Der Datenvergleich zeigt unter gleichen oder nahezu gleichen Bedingungen in vielen Fällen erhebliche Unterschiede. Die Schnittdicke muß bei solchen Vergleichen berücksichtigt werden, da mit zunehmender Dicke auch mehr SK angeschnitten werden. So würden z.B.: 100 Profile bei 50 nm dicken Schnitten 140 Profilen auf 70 nm dicken Schnitten entsprechen; 100 Profile auf 70 nm dicken Schnitten wären 71,4 auf 50 nm-Schnitten gleichzusetzen. Aber auch unter Berücksichtigung dieses Faktors ergibt sich keine befriedigende Übereinstimmung. Dies mag auf nicht erwähnte Bedingungen, wie z.B. oft nicht angegebene Luxzahl, die Herkunft und Zahl der Tiere im Käfig, die Temperatur, die Jahreszeit, geographische Unterschiede, aber auch individuell unterschiedliche Beurteilung durch verschiedene Untersucher bei sehr kleinen oder fraglichen Profilen oder noch andere unbekannte Faktoren zurückzuführen sein (Jastrow & Racke 2007). Ein für die Beurteilung der Validität der Untersuchungen wichtiger Aspekt ist auch die oben erwähnte nie homogene SK-Verteilung im Gewebe, die besonders bei kleinen ausgewerteten Flächen problematisch wird. Bei Disektorzählungen (DZ) werden stets mindestens zwei, in jedem Zweifelsfall noch wei-

tere Serienschritte betrachtet, dadurch ist die Wahrscheinlichkeit hierbei Profile zu übersehen geringer als bei den Profilzählungen (PZ).

In nur wenigen Studien wurden SD Ratten unter anderen als den üblichen (LD 12:12) Photoperioden gehalten. Karasek (1976) und Karasek et al. (1983) fanden bei PZ von SK unter LD 14:10 ähnliche Werte wie unter Normalverhältnissen. Unter 63 Tagen Dauerlicht stellten Vollrath & Maitra (1986) einen über 2 fachen, stark signifikanten Profilanstieg fest. Die in Jastrow & Racke (2007) erhobenen Befunde zeigten zwar mehr SK in DZ und mehr ihrer Profile bei Zusammenfassung aller Gruppen unter LD 20:4 Bedingungen, statistische Signifikanzen wurden jedoch nicht erreicht. Nächtliche Lichtexposition führte zu einer signifikanten Abnahme von SK Profilen wie auch der N-acetyltransferaseaktivität (Maitra et al. 1986). Hieraus läßt sich folgern, daß kurze Lichtexposition zwar eine Wirkung auf Profilzahlen und damit vermutlich auch auf die Gesamtzahl von SK hat, längere Haltung unter extremen Photoperioden aber keinen gesicherten Einfluß hat. Dagegen konnten Karasek et al. (1988) einen Jahresrhythmus für SK Profilzahlen in Pinealozyten von Wistar Ratten mit einem Maximum im Oktober und einem Minimum in April nachweisen. Dazu passen auch die hohen quantitativen Daten, die Jastrow et al. (1997b) bei einer um 12.00 im Oktober getöteten Ratte erhoben hatten (90 SK Profile / 20.000 μm^2 bzw. 33 SK / 1.000 μm^3). Bei unter natürlichen Lichtbedingungen in Spanien gehaltenen Wistar Ratten fanden sich in der Kurztagsperiode (Februar) signifikant mehr SK-Profile als in der Langtagsperiode (September; Cimas García et al. 1987; Martínez-Soriano et al. 1992). Bei Betrachtung verschiedener Tötungszeitpunkte waren die Unterschiede um 6.00 und 10.00 deutlich signifikanter als um 14.00 und 18.00 und um 22.00 und 24.00 nur noch insignifikant höher.

Unter den noch extremeren Bedingungen von Jastrow & Racke (2007; LD 4:20) verhielt es sich in den PZ und DZ entgegengesetzt, wobei allerdings keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Im Februar fanden sich in der Licht- wie auch der Dunkelphase signifikant mehr SK Profile als im April (Martínez-Soriano et al. 1996, 2002). Zusätzlich wurden auch signifikante Unterschiede zwischen der Voll- und Neumondphase beschrieben (Martínez-Soriano et al. 2002). Pinealozyten unter LD 16:8 bzw. 8:16 Bedingungen gehaltener Djungarischer Hamsters zeigten lediglich einen nicht signifikanten Abfall der SK Profilzahl bei den unter Kurztagsbedingungen gehaltenen Tieren; Hamster, die 67 Tagen Dauerlicht ausgesetzt waren, zeigten signifikant weniger Profile (Fechner 1986). Dies steht im Gegensatz zu dem von Vollrath & Maitra (1986) beschriebenen signifikanten Profilzahlanstieg bei dauerbelichteten SD-Ratten.

Zusammengefaßt korrelieren die Befunde der eben geschilderten Untersuchungen in einigen Fällen nicht, so daß sich keine einheitliche, klare, spezieübergreifende Aussage machen läßt, dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, daß die Zahl von Profilen synaptischer Körperchen umgekehrt proportional zur Dauer der Lichtphasen ist, wie zuerst von Vollrath (1973) für die Meerschweinchenzirbeldrüse postuliert wurde.

4b5 Chronobiologie und Lichtwirkung auf synaptische Körperchen

Die Zahl der Profile synaptischer Körperchen unterliegt in Pinealozyten einem Tag/Nacht Rhythmus (Vollrath 1973; Kurumado & Mori 1977, 1980; Cimas García et al. 1987; Spiwox-Becker 1995; Martínez-Soriano et al. 2002). Dieser etabliert sich kurz nach dem Einwachsen sympathischer Nervenfasern in die Zirbeldrüse zwischen dem 10. und 20. Tag post partum (King & Dougherty 1980) und wird im Wesentlichen durch die Photoperiode hervorgerufen. Die in Jastrow & Racke (2007) gewonnenen Daten sowohl der Profil- (PZ) als auch der Disektorquantifikation (DZ) lassen sich mit einem klaren Rhythmus jedoch nicht in Einklang bringen. Hier hätte eine Kontrollgruppe mit "normalem" Tag Nacht Zyklus (LD 12:12) hilfreich sein können, jedoch war das Ziel der Studie Unterschiede bei extrem entgegengesetzten Photoperioden herauszufinden. Die Tatsache, daß die einzigen statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 6 (LD 20:4, 9 Stunden Licht) und der Gruppe 1 (LD 4:20; 4 Stunden Licht) bzw. 3 (LD 4:20; 13 Stunden Dunkelheit) in PZ und DZ auftraten, sind schwer zu interpretieren, insbesondere, da sich das Maximum nach 9 Stunden Licht fand. Dies steht im Widerspruch zu anderen Studien. So fanden Kurumado & Mori (1977) in Pinealozyten 6 - 10 Stunden nach "Licht an" unter LD 12:12 Bedingungen signifikant weniger SK Profile, gefolgt von einem leichten Anstieg, bevor das Licht wieder ausgeschaltet wurde. Letztere ebenfalls an SD-Ratten erhobene Befunde sind analog zu Zählungen bei Meerschweinchen unter gleichen Lichtbedingungen (Vollrath 1973).

Die in Jastrow & Racke (2007) am Ende der Lichtperiode getöteten Tiere (Gruppe 4), zeigten weniger statt mehr SK und SK Profile, wenn auch kein statistisch signifikanter Unterschied vorlag ($P = 0,067$). Kurz gesagt, die erhobenen Daten sind ungewöhnlich, da sich einerseits unter Licht erst ein Anstieg, dann ein Abfall in der Zahl synaptischer Körperchen zeigte und andererseits, nur sehr wenige signifikante quantitative Änderungen in DZ und PZ vorlagen: Gruppen 1 zu 6 und 3 zu 6 neben der grenzwertigen Signifikanz in der Disektorzählung zwischen Gruppe 1 und 5 (s. Ergebnisse 3b3: Seite 72). Nur, wenn man alle Tiere unter gleicher Photoperiode zusammenfaßte, ergab sich ein signifikanter Anstieg der SK-Profile von LD 4:20 zu 20:4.

Adly et al. (1999) und Spiwox-Becker et al. (2004) zeigten, daß SK der Retina von BALB/c Mäusen nach dem Einschalten von Licht Vorwölbungen aufweisen und Material verlieren, welches sich in der Dunkelphase wieder anlagert. Bei der hier vorgestellten Untersuchung der Rattenzirbeldrüse (Jastrow & Racke 2007) fanden sich in keinem Fall Auftreibungen von SK oder Hinweise auf sich anlagerndes oder abspaltendes Material. Daraus läßt sich folgern, daß zumindest bei SK in Rattenpinealozyten Größenveränderungen auf molekularer, d.h. elektronenmikroskopisch nicht sichtbarer Ebene stattfinden. Solche Mechanismen wurden auch für SK in Meerschweinchenpinealozyten postuliert (Vollrath 1973).

Im Gegensatz zur Netzhaut sind die allermeisten SK der Zirbeldrüse bedeutend kleiner. Es ist vermutlich auch keine so schnelle Größenveränderung in Reaktion auf Lichtreize in Zirbeldrüsenparenchymzellen notwendig wie bei SK in Stäbchen- oder Zapfenterminals der Retina. Die Gabe von Dauerlicht verursacht bizarre, teils klumpige Veränderungen der Organellen in Pinealozyten des Meerschweinchens (Vollrath & Huss 1973; Vollrath 1986; Jastrow et al. 2004). Dies gilt aber nicht für SD-Ratten (Vollrath & Maitra 1986). In in vitro gehaltenen Bipolarzellen

des Goldfisches konnten Zenisek et al. (2004) zeigen, daß sich einige fluoreszenzmarkierte SK mit Geschwindigkeiten von 0,35 bis 13,5 nm/sec entlang der Zellmembran bewegten, während die meisten relativ unbeweglich erschienen, außerdem verschwanden 2 SK von der Zellmembran in Richtung Zellinneres.

Spiwoks-Becker (1995) zeigte, daß nach 6 Stunden Licht unter LD 12:12, also um 12.00 37,5 % aller SK bei SD-Rattenpinealocyten in Feldern lagen. Dies waren signifikant mehr SK als um Mitternacht (24.00). Ähnliche Befunde wurden von (Vollrath 1973) an Meerschweinchenpinealocyten erhoben. In der hier vorgestellten Untersuchung wurde aus folgenden Gründen auf Aussagen bezüglich der Felder verzichtet: 1. zu geringe Zahl für eine statistisch sinnvolle Aussage, 2. unterschiedliche Zahl von SK in den Feldern, 3. Felder die im untersuchten Material gerade beginnen, sind nicht erfaßbar. 4. Es lag keine erkennbare Korrelation zu den unterschiedlichen Versuchsbedingungen vor. Man kann bei allen bisher durchgeführten Untersuchungen davon ausgehen, daß viele in den betrachteten Schnitten einzeln liegend erscheinende SK tatsächlich zu Feldern gehörten, die sich erst hätten erkennen lassen, wenn benachbarte Serienschritte untersucht worden wären. Dasselbe gilt für gepaart liegende Profile von SK. Eine sinnvolle Analyse von SK-Feldern läßt sich lediglich durch die aufwendige Serienschrittanalyse beginnend mindestens 5 Nachbarschnitte vor und nach jedem einzelnen entdeckten Profil machen, da die Abstände zwischen SK in Feldern bis zu 250 nm betragen können. Auch die vorgestellte Untersuchung kann diese Kriterien nicht erfüllen, da lediglich bei zwei oder mehr benachbart liegenden Profilen eine Prüfung der Nachbarschnitte zur Vermeidung falscher Disektorzählungen erfolgte. Durch die Verwendung von RIBEYE Antikörpern jedoch lassen sich in Laser-Scanning-Mikroskopen fluoreszenzmikroskopisch SK sicher erkennen und beurteilen (Spiwoks-Becker et al. unveröffentlicht). Die Anwendung dieser Methode ist deutlich schneller, einfacher und sicherer zur Erfassung von Feldern von SK geeignet und macht elektronenmikroskopische Serienschrittanalysen zu den meisten Fragestellungen überflüssig.

Bei der Untersuchung von SK Zahl und Profillänge über 24 Stunden bei normalen LD 12:12 Zyklus an Meerschweinchen fanden McCartney & Dickson (1977, 1985) weder bei Stäbchen noch bei Zapfen signifikante tageszyklische Änderungen. Ein Auftreten von kugeligen SK oder Verdickungen wurde nicht beschrieben. Da die Aktivität von Ribbonsynapsen sich im Tagesverlauf aber ändert mit höherer Aktivität in Dunkelphasen (Trifonov 1968; Dowling 1974; Kaneko 1979) erklären McCartney & Dickson (1985) dies allein durch einen höheren Turnover von Vesikeln, der nicht unbedingt Größen- bzw. numerische Änderungen von SK erfordert. Bei Ratten und BALB/c Mäusen treten nur in Stäbchenterminalen während der Lichtphase neben den typischen plattenförmigen Organellen auch solche mit rundlichen Auftreibungen an den membranfernen Rändern und davon lösgelöste, nie zellmembrangebundene, ovoide bis kugelförmige SK auf (Vollrath et al. 1989; Spiwoks-Becker 1995; Adly et al. 1999; Vollrath et al. 2001; Spiwoks-Becker et al. 2004; vorliegende Arbeit). Insbesondere bei BALB/c Mäusen zeigten sich schon nach wenigen Minuten Licht erste Verdickungen an den membranabgewandten Rändern der boomerangförmigen SK und die Bildung von Kugeln / Klumpen begann (Adly et al. 1999). Als erste beschrieben Abe &

Yamamoto (1984) in Stäbchenterminalen der Frischwasserschildkröte (*Pseudemys spec.*) einen diurnalen Rhythmus von SK in der Retina. Ab 1 Stunde vor Ende der Lichtphase zerfielen plattenförmige SK in rundliche Gebilde, die Durchmesser bis zu 250 nm hatten und sich in der Dunkelphase wieder zu mehreren parallel zueinander stehenden, regulär polymerisierten Platten zusammenschlossen, von denen eine an der Membran verankert war. Ab Mitte der Lichtphase zeigten sich bis zum o.g. Zeitpunkt zunehmend aufgeweichte, irreguläre Konturen der Profile aggregierter SK, was durch zunehmende Unordnung bei der Polymerisation der Komponenten der SK zu erklären ist. Durch Applikation längerer Licht- bzw. Dunkelphasen konnten Abe & Yamamoto (1988) belegen, daß unter längerer Dunkelheit keine Hinweise auf eine Bildung von Kugeln zu finden war, während die Verlängerung der Hellphase die Wiederausbildung regulärer Plattenaggregate verhinderte und so viele kugelförmige SK neben unscharf konturierten Platten persistierten.

Unter länger anhaltender Dunkelheit nimmt laut De Robertis & Franchi (1956) der Durchmesser synaptischer Vesikel in Stäbchen- und Zapfenterminalen ab. Die von diesen Autoren ebenfalls beschriebene Zunahme von Vesikeln unter Dunkelbedingungen konnte jedoch von Mountford (1963) nicht bestätigt werden. Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß unter 48 Stunden Dunkelheit deutlich mehr Vesikel wesentlich dichter an Zapfen-SK bei Schildkröten gebunden werden als unter 48 Stunden Licht; dies war verbunden mit einer Verdoppelung der Oberfläche der in etwa rechteckigen SK (Pierantoni & McCann 1984). Die bei Profilzählungen in definierten Flächen gewonnene Zahl von Ribbonsynapsen in der Rattenretina fanden Case & Plummer (1993) mit der vierten Wurzel der Lichtintensität invers korreliert, aber positiv mit der Stärke der äußeren plexiformen Schicht. Dabei vergrößerte sich das Volumen der Photorezeptorterminalen, ohne daß ihre Zahl anstieg.

Messungen zeigten, daß bei Rind und Ratte in Stäbchenterminalen stabförmige Profile von SK deutlich länger waren als in Zapfenpedikeln; im Speziesvergleich waren dabei die Stäbchen-SK Profile beim Rind signifikant länger als die der Ratte, wobei sich bezüglich der Zapfen SK kein signifikanter Unterschied ergab (Spiwox-Becker 1995). Folglich sind die SK des Rindes auch dreidimensional größer als die der Ratte. SK Profile des Rindes nahmen von 05.00 bis 07.00 signifikant an Länge zu und verkürzten sich ab 09.00 wieder, während sie bei Ratten nachts kürzer als am Tag waren. Aufgrund der Problematik der Längenbestimmung von SK Profilen (siehe Diskussion 4b2: Seite 108) und der uneinheitlichen Literaturangaben läßt sich keine zusammenfassende allgemeine Aussage zur Größenveränderung von SK unter chronobiologischen Gesichtspunkten machen, die Einwirkungsdauer und -stärke des Lichts ist jedoch hier als der wesentliche Faktor anzunehmen, der bei Säugern praktisch nur SK in den wesentlich lichtempfindlicheren Stäbchen oder in Pinealozyten beeinflusst.

4c Funktionelle Bedeutung von Dystroglykan an Ribbonsynapsen

Viele Befunde deuten darauf hin, daß die Veränderungen im Bereich der B-Welle (Verlängerung, Amplitudenänderung, spätere Auslösung) von Elektroretinogrammen (ERG) bei Muskeldystrophiepatienten und entsprechenden Mausmodellen durch gestörte synaptische Übertragung reti-

ner Ribbonsynapsen verursacht werden (Fitzgerald et al. 1994; Kameya et al. 1997). Der Grund dafür ist wahrscheinlich, daß normalerweise an den Dystroglykankomplex (DGC) gebundene synaptische Transmissionsproteine nicht mehr richtig oder am richtigen Ort wirken können (Cibis et al. 1993; Blank et al. 1993).

Bei den im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Untersuchungen konnte erstmals die genaue Lokalisation von beta-Dystroglykan (BDG), der zentralen Komponente des Dystrophin-assoziierten Proteinkomplexes (Michele & Campbell 2003), an Ribbonsynapsen demonstriert werden. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für ein funktionell-morphologisches Verständnis der den Muskeldystrophien zu Grunde liegenden Pathophysiologie. Es konnte gezeigt werden, daß BDG ausschließlich präsynaptisch an Photorezeptorterminalen vorhanden ist und in den postsynaptischen Elementen, d.h. Horizontal- und Bipolarzellfortsätzen fehlt. BDG wurde hierbei nicht an der aktiven Zone der Ribbonsynapsen, sondern nur perisynaptisch nachgewiesen. Ferner wurde immunfluoreszenzmikroskopisch gezeigt, daß das in der SK-Verankerung relevante Bassoon (tom Dieck et al. 2005) zwar in der Nähe von BDG zu finden, aber nicht damit kolokalisiert war. Die immunelektronenmikroskopischen Befunde demonstrierten, daß BDG in Fortsätzen der Zapfenzellen oft membrannah, aber nur selten direkt dort angelagert, bevorzugt seitlich und an den Spitzen von gebeugten parallel zur Basis des Endkolbens verlaufenden Zellausläufern unterhalb der Auftreibungen von Horizontalzellfortsätzen präsent ist. Hier befindet sich die perisynaptische Zone. Eine direkte Beteiligung an der Exozytose der Vesikel dieser tonisch feuernden Synapsen ist zwar nicht gegeben, aber eine Beteiligung an anderen Prozessen, die deren Aktivität beeinflußt.

Eine Hypothese ist, daß bei Mutation des DGC andere Proteine auch nicht mehr präzise lokalisiert sind. Ein möglicher Kandidat wäre der Glutamattransporter, der nicht adäquat wirken kann, wenn er nicht *loco typico* präsent ist. Dies würde die Abschaltung der synaptischen Transmission hemmen, weil Glutamat dann länger im synaptischen Spalt verbliebe, wodurch genau die Veränderung der B-Welle verursacht würde, die bei Muskeldystrophiepatienten gezeigt wurde.

Die fluoreszenzmikroskopisch gefundene BDG-Immunreaktivität ähnelt der, die für Ratten- bzw. Mäuseretinae bisher nur in Einzelschnitten demonstriert wurde (Blank et al. 1999; Koulen et al. 1998). So ist anzunehmen, daß die hier erhobenen Befunde spezieübergreifend gelten. Die gewonnenen Ergebnisse stehen auch im Einklang mit der Expression von BDG m-RNA in Photorezeptoren (Montanaro et al. 1995), der BDG Verteilung und der Präsenz präsynaptischer Spezialisierungen in Photorezeptoren (Blank et al. 2002), der Kolokalisation von Dystroglykan mit Dystrophin und β -Dystrobrevin (Drenckhahn et al. 1996) und der nicht überlappenden Anfärbung von Dystroglykan und Synaptophysin (Drenckhahn et al. 1996). Die gefundene Verteilung steht aber im Gegensatz zu anderen Studien, die eine Anreicherung von Dystroglykan in Horizontal- und Bipolarzellfortsätzen sowie eine Assoziation von BDG mit Photorezeptorribbonsynapsen beschrieben (Koulen et al. 1998, Schmitz & Drenckhahn 1997, Drenckhahn et al. 1996), wobei methodische Fehler dies nicht erklären können, da die meisten Studien den monoklonalen 43DAG/8D5 Antikörper verwendeten, der für BDG aller Spezies spezifisch ist, und keine Anzei-

chen unspezifischer Färbungen erkennbar waren. Jedoch sind auch die in der hier vorgestellten Untersuchung verwendeten Methoden der Silberverstärkung von Immunogold markierten BDG Antikörpern valide, und die Befunde wurden an 4 Ribbonsynapsen enthaltenden Zapfenterminalen erhoben. Eine Erklärungsmöglichkeit der abweichenden Ergebnisse könnte eine speziesspezifische Verteilung sein: bei Maus, Ratte und Huhn nur perisynaptisch in Photorezeptorfortsätzen; bei Mensch, Kaninchen und Rind in Bipolar- und Horizontalzellfortsätzen. Andererseits könnte auch eine vom Tag/Nacht Zyklus abhängige Verteilung innerhalb derselben Spezies dafür verantwortlich sein, da Photorezeptorfortsätze in vielen Spezies sehr dynamische und plastische Strukturen sind, die sich lichtabhängig aus- und zurückbilden können (Brandon & Lam 1983, Cooper & McLaughlin 1982).

Darüber hinaus ist die Lokalisation von Dystroglykan auch innerhalb einer Spezies variabel so z.B. in der Maus: der *mdx3Cv* Mäusestamm mit einer Mutation im Dystrophin Gen bei gestörtem ERG zeigt eine reduzierte Immunreaktivität für BDG besonders im Bereich der aktiven Zone, während der Wildtyp bei normalen ERG eine perisynaptische Lokalisation aufweist (Blank et al. 1999). Scheinbar ist die Lokalisation des DGCs flexibel und von anderen Strukturen im Terminal abhängig. Jedoch ist sie nicht Photorezeptortyp-spezifisch, denn Zapfen dominierte Hühnchenretinae zeigen ähnliche Markierungen wie Stäbchen dominierte Ratten- und Mäusenetzhäute (Koulen et al. 1998).

Die funktionelle Bedeutung von Photorezeptorfortsätzen, die tief in die äußere plexiforme Schicht reichen (Brandon & Lam 1983, Linberg & Fisher 1988) ist unklar sowie auch die Frage, was ihre zum Teil intensive BDG Immunreaktivität zu bedeuten hat. Möglicherweise könnte der DGC hier zytomechanische Funktionen haben ähnlich wie in der Skelettmuskulatur (Campbell 1995). So könnte er durch seine Assoziation mit dem Zytoskelett die Grundlage für die o.g. Formveränderungen unter verschiedenen Lichtbedingungen bilden oder für die mechanische Stabilität des Terminals mitverantwortlich sein. Analog zur Skelettmuskulatur wäre es auch möglich, daß es als Gerüst zur Anreicherung bestimmter Proteine in speziellen Fortsatzdomänen dient (Blake & Kröger 2000).

Es ist zwar naheliegend anzunehmen, daß eine veränderte B-Welle im ERG auf einer Unterbrechung der synaptischen Übertragung von Photorezeptoren und ihren nachgeschalteten Zellen zurückzuführen ist, aber die perisynaptische Lage macht es unwahrscheinlich, daß hier die Vesikelexozytose gestört wird. Daher ist eher von einer indirekten Wirkung auf die chemische Reizübertragung auszugehen. Da viele Proteine an den DGC binden, wie z.B. die n-NOS und diverse Kinasen (Lumeng et al. 1999, Spence et al. 2004), könnte bei der Störung ihrer Bindung in bestimmten Subkompartimenten durch Fehlen des DGCs deren Funktion beeinträchtigt werden. Das würde Signaltransduktionswege unterbrechen, die dann die bekannten Formen der Muskeldystrophie hervorrufen. In Stäbchen- und Zapfenterminalen könnte analog z.B. die ähnlich wie BDG verteilte NMDA Rezeptor Untereinheit NR1C2' (Fletcher et al. 2000) vorkommen. Oder es könnten Glutamattransporter (Rauen & Kanner 1994) hier an der Plasmamembran in wohl definiertem Abstand zur aktiven Zone der Ribbonsynapse verankert sein, deren Funktionsstörung

die ERG Veränderung hervorrufen könnte, z.B. der durch Wersinger et al. (2006) in Zapfen- und Stäbchenterminalen nachgewiesene exzitatorischen Aminosäuretransporter EAAT5. Außerdem bestehen flache Kontakte zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen, die weiter außerhalb der Ribbonsynapse auch im Bereich der BDG Markierung liegen und, ebenfalls resultierend in ERG Veränderungen, bei Störungen im DGC beeinträchtigt werden könnten.

Zusammenfassend sprechen die in Jastrow et al. (2006) erhobenen Befunde für eine Verlängerung der B-Welle im ERG bei Patienten mit Muskeldystrophie und entsprechenden Mausmodellen durch eine Funktionsänderung der Photorezeptorterminalen ohne direkte Beteiligung der Bipolar- oder Horizontalzellen. Sie implizieren, daß die perisynaptische Zone um die invaginierten Fortsätze der eben genannten Zellen einen molekular spezialisierten Bereich darstellt, in dem die Reizübertragung moduliert werden kann.

4d Molekulare Komponenten von SK

Von Zenisek et al. (2004) konnte in Bipolarzellen des Goldfisches gezeigt werden, daß RIBEYE mit einem Anteil von 67 % die wesentliche Komponente von SK ist: jedes SK bestand aus ca. 4000 RIBEYE Molekülen. Diese besitzen eine SK-spezifische N-terminale A Domäne und eine C-terminale B Domäne, die mit dem Transkriptionsrepressor CtBP2 identisch ist (Schmitz et al. 2000). Wie dort beschrieben, entstehen die Organellen durch eine sehr regelmäßige Seit-an-Seit Aggregation von RIBEYE-Dimeren. Die äußeren im elektronenmikroskopischen Bild sehr elektronendichten Schichten entsprechen dabei den RIBEYE B Domänen, die weniger elektronendichten Zwischenschichten dem RIBEYE A, während der zentrale elektronendichte Bereich der Dimeruntereinheit entspricht, welche zwei RIBEYE A Moleküle miteinander verbindet. Bei regulärer Polymerisation der Komponenten synaptischer Körperchen verknüpfen sich die RIBEYE Moleküle stets in nur zwei entgegengesetzten Richtungen miteinander, wobei sie sich sehr regelmäßig seitlich aneinander lagern (Schmitz et al. 2000). Dies läßt sich im TEM als charakteristische Streifung, allerdings nur bei genau senkrecht zur Schnittebene liegenden SK Profilen erkennen (Lanzavecchia 1960; Cohen 1963) und ergibt dreidimensional einen fünfschichtigen (pentalamellären) Aufbau der plattenartigen Organellen (Abb. Disk8). Matsusaka (1967) beschreibt innerhalb der ~2,5 nm dicken elektronendichten Schichten nochmals eine Dreiteilung aus zwei dichten Außen- und einer weniger dichten Innensublamina. Die Dicke senkrecht angetroffener SK wurde in der Retina in Stäbchen, Zapfen und Bipolarzellen von Mensch und Ratte sowie in Pinealocyten von Ratte und Meerschweinchen vermessen und betrug in allen Fällen 35 nm. Diese Stärke geben auch andere Autoren für SK an: Hühnchenretinae (Matsusaka 1967); Albino-Rattenretina (Cragg 1969); Meerschweinchenretina (Sjöstrand 1958); Frosch und Schildkrötenretina (Pierantoni & McCann 1984). Dies gilt jedoch nur für die Osmiumfixierung von elektronenmikroskopischen Präparaten, während bei Verwendung von Permaganat eine Stärke von ca. 45 nm typisch ist (Pierantoni & McCann 1984).

Im ampullären Sinnesorgan Typ A beim elektrischen Fisch *Gymnarchus niloticus* fand Mullinger (1969) davon abweichend deutlich dickere (über 100 nm), plattenförmige SK, die 7 bis über 9 Lamellen aufwiesen. Die von Dunn (1973) veröffentlichte Tabelle (5) in der ein-, drei- und fünf-

fach geschichtete SK unterschieden werden, ist falsch, denn hierbei wurde nicht beachtet, daß nur genau senkrecht angetroffene SK beurteilt werden können. Inhaltlich wird sie durch eine Reihe von Originalaufnahmen, die im Zuge dieser Arbeit bei Ratte (Abb. Js1), Maus und Mensch (Abb. Disk8) gemacht wurden, eindeutig widerlegt. Jedoch finden sich in seltenen Fällen neben den pentalamellären SK auch solche mit mehr Banden in der Retina, wie dies Spiwox-Becker (1995) beim Rind beschreibt. Sie führte dies auf eine lokale Aneinanderlagerung von SK zurück. Bei den dicken und bizarren SK der Meerschweinchenzirkeldrüse unter Dauerlichtbedingungen war dies auch zu beobachten (Abb. Disk 1). Mit Hilfe der Freeze-Etching Technik untersuchte SK zeigten sehr regelmäßig parallel in Reihen angeordnete 4-6 nm

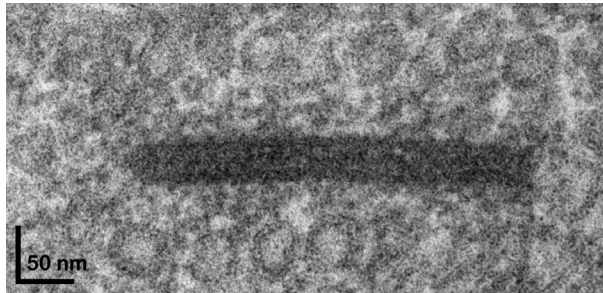


Abb. Disk8 Bei diesem genau senkrecht zur Schnittebene angetroffenen SK Profil eines menschlichen Zapfens wird die pentalamelläre Grundstruktur deutlich. Die Dicke des SK beträgt 35 nm. Die äußeren elektronendichten Schichten entsprechen den RIBEYE B Domänen, die weniger elektronendichten Zwischenschichten dem RIBEYE A, der zentrale elektronendichte Bereich der Dimeruntereinheit, welche zwei RIBEYE A Moleküle verknüpft.

durchmessende Partikel auf der Oberfläche (Fig. 3 in Usukura & Yamada 1987), von denen sich 30-50 nm lange Filamente (Durchmesser: 8-10 nm) zu gebundenen Vesikeln erstreckten (Raviola & Raviola 1982; Usukura 1989; Usukura & Yamada 1987). Diese Partikel entsprechen den Enden von RIBEYE B Molekülen.

Weitere kleinere Komponenten finden sich an die Oberfläche der SK angelagert, nachgewiesen wurden sie zumeist in der Retina. Entlang der Gesamtoberfläche, bzw. vermutlich direkt mit RIBEYE B verbunden sind: Rim1 (RAB-3 interacting molecule1; Wang et al. 1997), Caveolin-1 (Kachi et al. 2001), KIF3a (Komponente des Motorproteins von Kinesin-II; Muresan et al. 1999), ELKS (ein aktive Zone Protein; Deguchi-Tawarada et al. 2006) und Piccolo (tom Dieck et al. 2005; - & Brandstätter 2006). Im basalen, membranahen Bereich stellt das Protein Bassoon Verbindungen zu Verankerungsplaques an der Zellmembran her, die im Falle der Photorezeptor-terminalen den bogenförmigen Verdichtungen (arciform densities) entsprechen (Brandstätter et al. 1999; Haverkamp et al. 2000; Dick et al. 2001). Damit SK Komplexe korrekt aufgebaut werden können, ist eine physikalische Interaktion von Bassoon und RIBEYE notwendig, wie tom Dieck et al. (2005) zeigten. Auch Synaptojanin scheint für die Verankerung von SK eine Rolle zu spielen. So verschwanden postsynaptische Invaginationen und die SK Verankerung bei Injektion eines Morpholinos des hierfür codierenden Gens bei Zebrafischen (Lagnado 2005). Die "bulk endocytosis", bei der große Endosomen zur Wiedergewinnung von Membranmaterial gebildet werden, nimmt bei Deletion des für Synaptojanin codierenden Gens massiv zu, denn das Protein spielt auch bei der Bildung von Klathrinvesikeln eine Rolle (vanEpps et al. 2004). RIM2 (RAB-3 interacting molecule 2) und CAST („cytomatrix at the active zone associated protein“) sind an der Basis von SK nachweisbar (Deguchi-Tawarada et al. 2006). Aktuell wurde ein dem Agrin und Perlekan ähnliches "extracellular matrix-like" Protein, welches durch das geklonte Gen 'pikachurin' co-

diert wird, in der aktiven Zone bei Ribbonsynapsen nachgewiesen, bei deren Bildung es eine wichtige Rolle spielt (Furukawa et al. 2007). Einige der eben genannten Proteine sind Komponenten der für die Reizübertragung wichtigen aktiven Zone, kommen also nicht ausschließlich in SK vor (tom Dieck et al. 2005; tom Dieck & Brandstätter 2006).

In der Zirbeldrüse ist RIBEYE ebenfalls die Hauptkomponente von SK, aber auch die meisten der o.g. Proteine konnten hier nachgewiesen werden (Spiwoks-Becker et al., eingereicht). Ein monoklonaler Anti-synaptic ribbon IgM Antikörper (B16), erkennt ein Epitop, welches in SK vorhanden ist (Balkema & Dräger 1985; Balkema 1991; Bachmann & Balkema 1993; Balkema & Rizkalla 1996). Das wesentliche von B16 erkannte Epitop wurde bestimmt (⁵⁴²DTYQHPPKDS⁵⁵¹; Nguyen & Balkema 1999), konnte aber noch keinem SK-Protein zugeordnet werden. Da die B16 Markierung mit α -Aktinin in Photorezeptor Synapsen kolokalisiert, folgern Nguyen & Balkema (1999), daß das von B16 erkannte Epitop eine Rolle bei der Interaktion zwischen SK Proteinen und fokalen Adhäsionsplaques spielen könnte. Balkema & Nguyen (1999) identifizierten B16 als ein Retina spezifisches 54.000 Dalton Protein das Homologien zu Adapter Proteinen hat, die Klathrinvesikel an den Golgi-Apparat binden. Es könnte synaptische Vesikel an SK binden, womit letztere für das Vesikelrecycling nach der Exozytose zuständig sein könnten (Morgans 2000a). Bezüglich der nicht mehr zu den SK selbst gehörenden, in unmittelbarer Nähe lokalisierten an der Exozytose beteiligten Komponenten, die sich teilweise von denen konventioneller Synapsen unterscheiden, sei auf Grabs et al. (1995) und Brandstätter et al. (1996) verwiesen.

4e Funktionelle Aspekte

4e1 Synaptische Körperchen

Die genaue Funktion der SK ist trotz über 40 Jahren Forschung noch immer unbekannt. Relativ sicher ist nur, daß sie in Stäbchen und Zapfenterminalen der Retina nahe der aktiven Zone in den Prozeß der Vesikelbereitstellung und des „priming“ involviert sind (Parsons & Sterling 2003). Für die Retina und Sinnesorgane trifft die Feststellung zu, daß SK dort vorkommen, wo synaptische Exozytose durch graduierte Depolarisation hervorgerufen wird (Juusola et al. 1996; Sterling & Matthews 2005). In der Zirbeldrüse, deren Parenchymzellen keine graduierte Depolarisation zeigen (Schenda & Vollrath 1998, 2000), haben sie keine klare Beziehung zur Synthese des wesentlichen Hormons, des Melatonins. Es wird angenommen, daß sie hier der interzellulären Kommunikation dienen (Hopsu & Arstila 1965; Vollrath 1973).

Es gibt mehrere Hauptmodelle bezüglich der Funktion synaptischer Körperchen:

1. SK dienen als Förderbänder zum Transport von Neurotransmittervesikeln zur Zellmembran, um die aktiven Zonen retinaler Ribbon Synapsen damit zu versorgen (Bunt 1971; Gray & Pease 1971; Lenzi & von Gersdorff 2001). Die Arciform density soll die Vesikel von SK dann weiter zur Zellmembran leiten (Gray & Pease 1971). In diesem Zusammenhang könnten ELKS- und Piccolo für die Bindung und den Transport der Vesikel verantwortlich sein, während CAST und Bassoon eine Rolle in der Fusion und der Freisetzung von Transmittervesikeln an den nahen aktiven Zonen spielen könnten (Deguchi-Tawarada et al. 2006).

Aktuelle Arbeiten und Reviews halten ein Förderbandfunktion für unwahrscheinlich so tom Dieck & Brandstätter (2006) wegen der für einen Kinesin vermittelten Transport deutlich zu schnellen Vesikelfreisetzung, Parsons & Sterling (2003) zum einen wegen der inhomogenen, einen schnellen Transport behindernden Oberfläche, wie sie von Usukura & Yamada (1987) rasterelektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde, zum anderen, weil im Falle der Ersetzung von ATP durch ATP- γ S, welches den Kinesintransport nicht unterstützt, keine Änderungen der Vesikelfreisetzung an Bipolarzellribbonsynapsen bewirkt.

Jastrow & Racke (2007) stellten die Förderbandfunktion aufgrund morphologisch funktioneller Kriterien in Frage:

a. in Pinealozyten und Bipolarzellen ist ein Teil der SK nicht an der Zellmembran verankert, sondern liegt frei im Zytoplasma oft einige hundert Nanometer von der aktiven Zone entfernt, womit hier kein sinnvoll gerichteter Vesikeltransport möglich ist. Außerdem ist es unwahrscheinlich, daß SK Untereinheiten (RIBEYE A, B) sich gezielt in einer Richtung bewegen, d.h. am zellmembranfernen Ende der SK schnell polymerisieren und membrannah, gerade da, wo eine stabile Bindung nötig wäre, sich wieder schnell auflösen.

b. Funktionell macht ein Förderband Sinn, wenn ein ultraschneller Vesikeltransport erforderlich ist, wie in Photorezeptor Ribbonsynapsen, an anderen z.B. in Pinealozyten, deren elektrische und Neurotransmitterabgabeaktivität signifikant geringer ist (Schenda & Vollrath 1998, 2000), wäre er nicht notwendig.

Sollte es dennoch einen Vesikeltransport an der SK Oberfläche geben, so müßte dieser über Proteine erfolgen, die an der äußeren RIBEYE B Domäne gebunden sind. Wäre es möglich den Glutamatgehalt in einzelnen Vesikeln zu messen, könnte das Problem vielleicht gelöst werden, denn die am längsten gebundenen Vesikel, müßten dann nach unten transportiert worden sein und die höchste Konzentration aufweisen. Für die Neurotransmitteranreicherung verantwortlich ist dabei der vesikuläre Glutamattransporter Typ1 (Scherry et al. 2003).

Eine einleuchtendere Funktion, die den SK zugeschrieben wird, ist die als

2. Vesikelspeicher, bzw. Vesikelfalle: Wenn SK synaptische Vesikel speichern und deren Exozytose verhindern (Vollrath & Spiwox-Becker 1996), könnten diese hier "in Ruhe" Glutamat anreichern. Sie ständen dann als „readily-releasable pool“, den aktiven Zonen nahe, als schnell einsetzbare Vesikel bereit (von Gersdorff 2001; Parsons & Sterling 2003; Singer & Diamond 2006).

3. SK werden als essentiell für das Vesikelpriming, d.h. die biochemische Vorbereitung auf die Freisetzung angesehen (Prescott & Zenisek 2005). Allerdings könnten sie auch nur für das Auffangen schon geprimter Vesikel dienen, die sie aus dem großen Vesikelreservoir eines Terminals herausziehen (von Gersdorff 2001). Andere Autoren beschreiben

4. SK als Koordinatoren für multivesikuläre Transmitterfreisetzung. So postulierten Parsons & Sterling (2003) eine Funktion in der „compound exocytosis“, bei der an SK gebundene Vesikel mit nahe gelegenen Vesikeln vor oder nach deren Fusion mit der Zellmembran verschmelzen und dabei lange Schläuche ausbilden sollten. In diesem Zusammenhang fanden Singer et al. (2004) und Singer (2007) Hinweise dafür, daß die multivesikuläre Transmitterfreisetzung an

Stäbchenbipolarzellen ein wohl koordinierter Vorgang ist. Dünne zu einer „compound exocytosis“ passende Tubuli wurden gemeinsam mit Spiwox-Becker insbesondere an ektopischen SK in

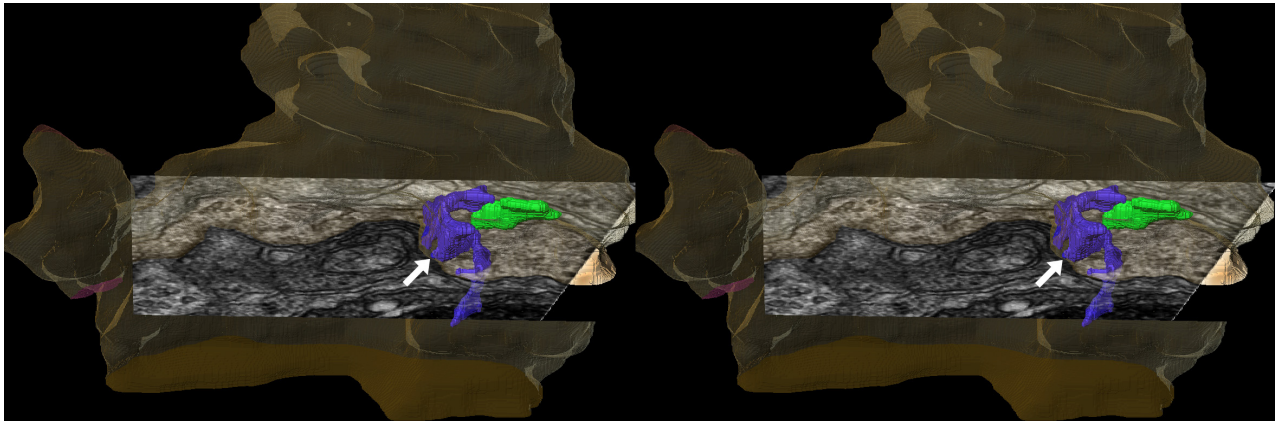


Abb. Disk9 ektopisches synaptisches Körperchen (grün) im Fortsatz einer Stäbchenbipolarzelle (braun) in der Retina einer SD-Ratte. Die blaue Struktur entspricht einem membranumgebenen schlauch- bis plattenartigen Gebilde, das aller Wahrscheinlichkeit nach aus fusionierten Vesikeln entstanden ist und an einer Stelle (Pfeil) zur Zellmembran hin offen ist. Hierbei dürfte es sich um das morphologische Korrelat einer "compound exo- oder endocytosis" handeln (Animation dieser Rekonstruktion: Disk9.avi).

Bipolarzellfortsätzen beobachtet (Spiwox-Becker et al. in Vorbereitung). Die Abbildung Disk9 und die zugehörige Animation Disk9.avi zeigen ein rekonstruiertes Konglomerat solcher Tubuli nahe eines ektopischen SK. Sonst fanden sich allerdings nur sehr gelegentlich in der Nähe von SK tubuläre Strukturen, die zu einer „compound exocytosis“ oder auch eventuell "compound endocytosis" als Vesikelquelle passen würden. In der Zirbeldrüse wurden solche schlauchförmigen Formationen nie beobachtet, was nicht überrascht, da hier die Ribbonsynapsen deutlich weniger aktiv sind als in Sinnesorganen.

5. SK halten die v-SNAREs von gebundenen Transmittervesikeln in einer "striking distance" zu den an der Zellmembran lokalisierten t-SNAREs. Die meisten zellmembrannahen Vesikel stoßen an die Zellmembran, prallen aber dann wieder ab. Nur, wenn die nötige lokale Ca^{++} -Konzentration vorhanden ist, kommt es zu einer Exozytose (von Gersdorff 2001). Da SK-nahe Transmittervesikel früher als anderswo exozytiert werden, weil in SK Nähe Ca^{++} -Kanäle aggregiert sind (s. unten) und die untersten ihrer gebundenen Vesikel in nur ca. 20 nm Abstand zur Membran stehen, sind sie so nahe, daß sich die o.g. vesikulären und membrangebundenen SNAREs berühren können, um einen gewundenen SNARE Komplex zu bilden, der die Vesikel zur Membran zieht (Zenisek et al. 2000). Sie könnten als "Sicherheitsgurte für Vesikel" dafür sorgen, daß eine kontinuierliche Exozytose an Ribbonsynapsen aufrechterhalten werden kann (von Gersdorff 2001).

6. SK positionieren freizusetzende Vesikel in der Nähe von Ca^{++} -Kanälen (Prescott & Zenisek 2005; Khimich et al. 2005; Midorikawa et al. 2007). Da Ca^{++} für die Exozytose notwendig ist, kann so schnellstmöglich auf einen Ca^{++} -Einstrom reagiert und eine hohe zeitliche Präzision bei der Übermittlung sensorischer Signale gewährleistet werden.

7. King & Dougherty (1982 a, b) postulierten SK seien an der Regulation der Zahl von β -Adrenorezeptoren der Pinealozytenzellmembran beteiligt, indem sie neu synthetisierte oder intra-

zellulär gespeicherte β -Rezeptoren, die sich in der Membran an SK-gebundener Vesikel einlagern, zur Zellmembran transportieren bzw. solche auf umgekehrtem Wege wieder vom Plasmalemm in die Zelle zurückholen. Sie schlossen dies aus der von ihnen gefundenen Korrelation der SK-Zahl mit der β -Rezeptordichte von Pinealozysten: eine Größenzunahme der SK soll so zu vermehrter Vesikelretention und damit Reduktion der Membranrezeptordichte führen. Diese Hypothese wird jedoch dadurch widerlegt, daß die maximale SK-Zahl in der Mitte der Dunkelphase zu finden ist (McNulty & Fox 1992, Bhatnagar 1994), während aber Rezeptor-Bindungsstudien zur gleichen Zeit ein Maximum zeigen (Gonzales-Brito et al. 1988). Außerdem sind unter Bedingungen, bei denen besonders viele SK-Profile vorliegen, β -Rezeptoren überempfindlich (Craft et al. 1985): Ektomie des Ganglion cervicale superius als Übermittler der sympathischen Innervation bzw. unter Dauerlicht (Vollrath & Huss 1973, Romijn 1975, Vollrath 1986, McNulty & Fox 1992).

8. Osborn & Thornhill (1972) hatten vermutet, daß SK intrazelluläre Speicher von Monoaminen sein könnten. Dies wurde aber nie bestätigt und ist sehr unwahrscheinlich.

4e2 Ribbonsynapsen

Während die Zapfen dem Farbsehen dienen (photopisches Sehen), sind die Stäbchen für die optische Wahrnehmung in der Dämmerung zuständig (skotopisches Sehen). Die Empfindlichkeit von Stäbchen ist so hoch, daß bereits ein einziges Photon wahrgenommen werden kann (Sterling et al. 1987; Rao-Mirotnik et al. 1998). Während Zapfen ca. 2000 Vesikel pro Sekunde freisetzen, was sie nur über eine hohe Ribbonsynapsenzahl erreichen können, und ein hier rezeptiertes Photosignal in ca. 2,5 ms das Terminal erreicht, werden in Stäbchenterminalen nur ca. 100 Vesikel / Sek. freigesetzt. Die Zeit, bis ein Photosignal am Terminal ankommt, beträgt ca. 5 ms (Hsu et al. 1998). Da Ribbonsynapsen unter Dunkelheit anhaltend depolarisiert sind und dabei eine konstante maximale Transmitterfreisetzung zeigen (Oikawa et al. 1959; Trifonov 1968; Dowling 1974; Kaneko 1979; Lagnado et al. 1996; Choi et al. 2005) erscheint es sinnvoll, wenn sie dann an SK mit möglichst großer Oberfläche gebunden in der Nähe der aktiven Zone gehalten werden. Dies wäre eine funktionelle Erklärung dafür, daß SK unter Dunkelbedingungen größer sind als unter Lichteinfluß. Bei der Katze ist die aktive Zone in Stäbchenterminalen ca. $2,3 \times 0,25 \mu\text{m}$ groß und bietet Andockplatz für ca. 130 Vesikel (Rao-Mirotnik et al. 1995); beim Affen mißt sie $2,4 \times 0,25 \mu\text{m}$ (Rao-Mirotnik et al. 1995) und beim Meerschweinchen $2,5 \times 0,25 \mu\text{m}$ (Sjöstrand 1974).

Bei den hier rekonstruierten 6 menschlichen Stäbchenterminalen fanden sich 1-3 aktive Zonen, da ebenso viele nicht direkt zusammenhängende SK vorhanden waren. Die summierte Länge der aktiven Zonen betrug hier $2,8 \mu\text{m}$, bei einer Breite von $0,2-0,3 \mu\text{m}$. Die durchschnittliche Länge der zu einzelnen Triaden zählenden aktiven Zonen von Zapfensynapsen betrug $0,75 \mu\text{m}$, war also ganz deutlich kleiner. Daß Licht nicht nur die Synapsenaktivität, sondern auch die Form der gesamten Synapsen beeinflusst, wurde mehrfach speziesübergreifend gezeigt, so z.B. verursachte eine nur 3-minütige Lichtexposition im Dunklen gehaltener Ratten eine Ausweitung von Photorezeptorterminalen bei gleichzeitiger Reduktion der in ihnen enthaltenen Vesikel, außerdem

nahm nach Lichtexposition die Elektronendichte postsynaptischer Fortsätze zu (Cragg 1969); in Teleostiern fanden sich fingerartige "spinules" genannte Spezialisierungen an Horizontalzellfortsätzen, die unter Dunkelbedingungen verschwanden (Raynauld et al. 1979; Wagner 1980; Behrens & Wagner 1996). Schaeffer & Raviola (1978) demonstrierten, daß Beleuchtung dunkeladaptierter Retinae von Rotaugenschildkröten zur Reduktion synaptischer Invaginationen führt, und daß Kälte das Recycling von Membranmaterial blockiert, was zur Vertiefung dieser Invaginationen führt. Dies wurde für 48-stündige Dunkelexposition in Vergleich zu 48-stündiger Hellexposition an anderen Schildkröten von Pierantoni & McCann (1984) bestätigt. Brandon & Lam (1983) demonstrierten bei dunkeladaptierten Ratten und Goldfischen fingerartige Ausstülpungen von Stäbchenterminalzytoplasma in Horizontalzellfortsätze, die sie als Membranreservoir betrachteten, welches unter Lichteinfluß zurückgewonnen wird. In der Hühnerretina fanden Cooper & McLaughlin (1982) dünne, aber tiefe Invaginationen präsynaptischer Membran lateral der in Photorezeptoren invaginierten Horizontalzellfortsätze. Diese tubulären Endosomen gaben zum Teil Klathrinvesikel ab und schienen als Vesikelquelle im Terminal zu dienen. Sie traten in Stäbchen nur am Beginn der Dunkelphase auf, während sie unter Licht verschwanden, bei Zapfen zeigten sie sich nach Beginn der Licht- wie auch der Dunkelphasen. Auch im Bereich von Bipolarzellaxonterminals treten Licht-abhängige Veränderungen auf: unter Licht fanden Behrens et al. (1998) eher rundliche, glatt begrenzte, konvexe präsynaptische Membranen, die im Bereich von SK gerade verliefen. Unter Dunkelbedingungen hatten sie eine eher irreguläre Oberfläche mit gepaarten Grübchen, die neben den Verankerungen von SK auftraten, und waren im Bereich der Verankerungen leistenartig nach außen gestülpt, was durch 3D-Rekonstruktionen der Terminaloberflächen belegt wird.

Rao-Mirotnik et al. (1995) fanden bei ihren 3D Rekonstruktionen mit Vermessung der tatsächlichen Oberflächen jedoch keine Unterschiede im Volumen, der Oberfläche oder der Form postsynaptischer Fortsätze beim Vergleich von Stäbchen der Katzenretina, wobei ein Auge belichtet, das andere vor Tötung 2 Stunden lichtdicht zugeklebt war. Lediglich Einstülpungen der basalen Stäbchenmembran waren etwas größer. An den aktiven Zonen der Ribbonsynapsen mit der Zellmembran fusionierte Transmittervesikel vergrößern deren Oberfläche und damit Invaginationen (Raviola & Gilula 1975). Dies wird durch die Wiederaufnahme von Membranmaterial etwas weiter seitlich neben den aktiven Zonen oder tiefer wieder kompensiert (Gray & Pease 1971) so, daß sich ein Gleichgewicht von Exo- und Endozytose einstellt (LoGiudice & Matthews 2007). Dieses Gleichgewicht umfaßt an Riesenbipolarzellen des Goldfischs bis zu 3.800 Vesikel, die pro Sekunde ausgeschüttet bzw. durch Membranwiederaufnahmen neu gebildet werden (Lagnado et al 1996). Die Invaginationen sollen auch eine schnelle Wegdiffusion des Glutamats verhindern (Gray & Pease 1971). So kann ein Teil des Transmitters auch bei der Endozytose wieder aufgenommen werden, was eine Neusynthese erspart und sehr effizient ist. Möglicherweise stark konzentrierte Glutamattransporter nahe am Ort der Freisetzung in der Membran des Photorezeptors könnten dies noch ergänzen. Hinweise darauf gibt der Nachweis des exzitatorischen Aminosäuretransporters EAAT5 in Zapfen- wie Stäbchen- und einigen Bipolarzellterminalen (Pow &

Barnett 2000; Pow et al. 2000; Wersinger et al. 2006), wobei jedoch eine genaue ultrastrukturelle Lokalisation nicht erfolgte. Endozytose findet in Zapfen durch Klathrin-überzogene sowie

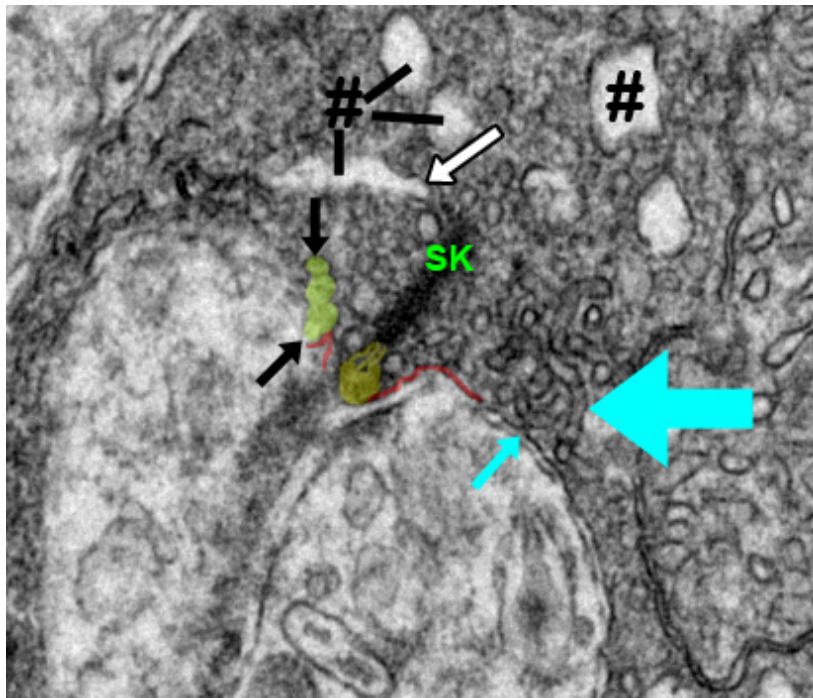


Abb. Disk10 Diese Stäbchen-ribbonsynapse (kultivierte Rattenretina, Ionophor, Ca^{++} & Lichtapplikation) zeigt neben einer vermutlichen "compound exocytosis" (hellgrün) an der linken aktiven Zone (rot) neben der rechten aktiven Zone (rot) eine zu einem kleinen Tubulus reichende Einstülpung (kleiner blauer Pfeil) und mehrere Schläuche (großer blauer Pfeil), die fusionierte Vesikel zu sein scheinen und an ihren Enden Vesikel abgeben. Die großlumigen mit # markierten Strukturen entsprechen vermutlich Endosomen, die von weiter lateral aufgenommen wurden und bereits ein Vesikel abschnüren (weißer Pfeil).

einfache Vesikel (Rea et al. 2004) in Bipolarzellen bevorzugt durch große Endosomen bzw. Invaginationen (Cooper & McLaughlin 1983) statt, wie auch durch Ferritin Markierung bestätigt wurde (Holt et al. 2004). Auch finden sich gelegentlich in Stäbchen oder Zapfenterminalen lange, sehr dünne teils konfluierende Schläuche, die höchstwahrscheinlich durch fusionierte Vesikel bei extrem schneller Wiederaufnahme hervorgerufen werden (Abb. Disk10).

Aus solchen Schläuchen bildet sich ein dichtes tubuläres Netzwerk, welches Verbindung zur Zellmembran lateral der aktiven Zone hat und beim Hühnchen wahrscheinlich an der Bildung intraterminaler multilamellärer Körperchen beteiligt ist (Matsusaka 1967). In Zapfenterminalen von unter sehr hellem Licht (500 cd) gehaltenen Albinoratten fanden Kuwabara & Funahashi (1976) ebenfalls solche Netzwerke, die sie für Vesikel-abschnürendes glattes endoplasmatisches Retikulum hielten. In Haarzellen kompensiert diese als "bulk endocytosis" beschriebene Aufnahme großer Endosomen ca. 75 % der Membranverluste durch Endozytose (Lenzi et al. 2002); vermutlich ist sie der geschwindigkeitbestimmende Schritt in Haarzellsynapsen (LoGiudice & Matthews 2007). Die "bulk endocytosis" ist weniger selektiv als die Klathrin vermittelte und tritt nur nach lang anhaltender starker Stimulation der Exozytose auf (Coggins et al. 2007). Dabei gebildete große Endosomen schnüren intrazellulär kleinere Vesikel ab und konnten auch in vorliegender Arbeit gefunden werden (Abb. Disk10), unter normalen Versuchsbedingungen jedoch sehr selten in Photorezeptorterminalen. Größere Membranschläuche, die gelegentlich an die Zellmembran heranreichten, fanden sich nur in wenigen menschlichen Bipolarzellen in mehreren hundert Nanometern Entfernung von SK. In seltenen Fällen zeigten auch Pinealozysten einige größere Endosomen, die kleinere Vesikel abschnürten. Dieterich & Rohen (1970) beobachteten neben typischen Endozytosevorgängen gelegentlich bis zu 200 nm lange, 20 nm breite Tubuli in menschlichen Stäbchenendkolben, die lateral der aktiven Zonen der Ribbonsynapsen von der Zellmemb-

ran in das Terminal eingestülpt waren. Wenige solcher Tubuli wurden gleichenorts auch in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten menschlichen Retinae gefunden. Sie wurden auch bei verschiedenen Vertebraten nachgewiesen (Yamada 1965; Matsusaka 1967; Dunn 1973). Meerretlichperoxidase-Untersuchungen belegten, daß endozytierte Vesikel schnell an SK gebunden und wieder exozytiert werden (Schacher et al. 1976; Cooper & McLaughlin 1983; Townes-Anderson et al. 1985). Von Gersdorff & Matthews (1994) demonstrierten, daß nach kurzer Stimulation exozytierte Membran in ca. 2 Sekunden wieder aufgenommen wird. Stärkere Stimulation führt zu Verzögerungen bis zu 30 Sek. und längere Stimulation zu einer in mehreren Phasen ablaufenden Wiederaufnahme von Membranmaterial (Heidelberger et al. 2002). An Goldfischbipolarzellen zeigten Hull & von Gersdorff (2004), daß die Endozytose durch den GABA bedingten lokalen Einfluß von Chloridionen im Bereich der neben der aktiven Zone gelegenen Endozytosezone zu einer Reduktion der Endozytose führt. Die GABA-erge Synapse ist reziprok: sie stammt von einer amakrinen Zelle, die postsynaptisch zu dem SK tragenden Bipolarzellterminal liegt. GABA wird auch von Horizontalzellendriten freigesetzt und wirkt mehr via Diffusionem als durch lokale Synapsen auf postsynaptische Rezeptoren im Bereich der äußeren plexiformen Schicht ein (Haverkamp et al. 2000). In Haarzellen der Maus beschrieben Beutner et al. (2001) nur unter höherer intrazellulärer Ca^{++} -Konzentration eine 300 ms dauernde schnelle, sonst eine ca. 15 Sek. dauernde langsame Endozytosephase. Auch die signifikanten Unterschiede, die Miller et al. (2001) in der Aufnahme aktivitätsabhängiger Fluoreszenzfarbstoffe in der inneren plexiformen Schicht zwischen licht- bzw. dunkeladaptierten Präparaten fanden, sind ein Hinweis auf eine Lichtabhängigkeit von Endozytosevorgängen.

Unter Dunkelheit zeigten Stäbchenendkolben eine geringere Ca^{++} -Konzentration als Zapfenpedikel, wohingegen letztere bei der Lichtadaptation deutlich schneller ihre Kalziumionen auf ein niedrigeres Niveau absenken als Stäbchenterminals (Johnson et al. 2007). Diese Autoren zeigten auf, daß metabolische Kopplung und Interaktion zwischen Mitochondrien, glattem ER, der zellmembrangebundenen Ca^{++} -ATPase, dem $Na^+ - Ca^{++}$ -Austauscher und Ca^{++} -Kanälen die ATP Produktion und Ca^{++} -Konzentration kontrollieren. Dabei benötigen Zapfen deutlich mehr Bioenergie als Stäbchen, weshalb sie höhere ATP-Konzentrationen zeigen als diese (Perkins et al. 2003, 2004; Johnson et al. 2007). In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, daß die Retina eines der Gewebe mit dem höchsten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und Energiebedarf ist (Graymore 1969).

Raviola & Raviola (1982) hatten in ihren Gefrierbruchuntersuchungen von Affenretinae 100 bis 200 9-11 nm große unter SK gelegene Partikel in der Zellmembran gefunden und postuliert, daß jedes SK an seiner Basis eine Ca^{++} -Eintrittsstelle haben müsse. Schließlich sind Kalziumionen für die Exozytose und Transmitterfreisetzung an Ribbonsynapsen essentiell und für eine ultraschnelle Aktion dieser Synapsen sind in unmittelbarer Nähe gelegene Ca^{++} -Kanäle erforderlich (Heidelberger et al. 1994). Diese wurden 2004 von Zenisek et al. in Kolokalisation mit SK und deren aktiven Zonen gefunden. Bestätigt wurde das durch aktuelle Befunde von Midorikawa et al. (2007), die die Ca^{++} -Eintrittsstellen in Goldfisch Mb1 Bipolarzellterminalen unmittelbar bei SK

lokalisierten. In der Retina handelt es sich in Stäbchen um $Ca_v1.4$ L- und in Zapfen um $Ca_v1.3$ L-Typ Kalziumkanäle (Morgans 2001; Berntson et al. 2003; Morgans et al. 2005; Cia et al. 2005; Bayley & Morgans 2007). Diese Ca^{++} -Kanäle sind sowohl strukturell als auch funktionell in einer idealen Position, um den präsynaptischen Ca^{++} -Eintritt mit der Vesikelfusion bei der Exozytose zu koordinieren (Bayley & Morgans 2007). In dieser Hinsicht sei auf die von Johnson et al. (2007) erstellten Modelle der räumlich-zeitlichen Ca^{++} -Regulation in Photorezeptorribbonsynapsen verwiesen. Hinweise, daß auch in Haarzellen der Cochlea $Ca_v1.3$ L-Typ Kalziumkanäle direkt unter SK lokalisiert sind, zeigten elektronenmikroskopisch - elektrophysiologische Untersuchungen von Roberts et al. (1990), Issa & Hudspeth (1994, 1996) und Heidelberger et al. (2005).

Preferentiell finden sich bei der Exozytose Vesikelfusionen mit der Zellmembran im Bereich der aktiven Zonen (Zenisek et al. 2000, 2003) in unmittelbarer Nähe von SK. Für eine SK-spezifische Exozytose spricht auch die Tatsache, daß die postsynaptischen Verdichtungen mit ihren Glutamatrezeptoren direkt unter oder in unmittelbarer Nähe von SK lokalisiert sind (Matsubara et al. 1996; Morigawa & Vardi 1999; Qin & Pourcho 1999; Gosh et al. 2001). Die Transfargeschwindigkeit der Vesikel zur aktiven Zone der Ribbonsynapsen soll der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Exozytose unter anhaltender Stimulation sein (Holt et al. 2004). Kinetische Vergleiche von Ribbonsynapsen mit anderen belegen deren ganz deutlich höhere Vesikelexozytoserate (Fernández-Alfonso & Ryan 2006). Dabei wird z.B. beim Hören die notwendige extrem hohe zeitliche Auflösung durch parallele Ausschüttung vieler Vesikel erreicht (Moser et al. 2006). Für Photorezeptor- und Bipolarzellribbonsynapsen stellte Singer (2007) fest, daß hier eine multivesikuläre Glutamatfreisetzung durch Sättigung postsynaptischer Rezeptoren einen Sicherheitsfaktor darstellt, der die Signaltransduktion zuverlässiger und weniger stör anfällig für kleine Freisetzungsschwankungen macht. Veränderungen der intrazellulären Verteilung der Proteinkinase C-alpha beeinflussen möglicherweise auch den Signaltransfer in Bipolarzellterminalen (Behrens et al. 2007). Die Aktivierung dieser Proteinkinase stimuliert insbesondere aber an Nicht-Ribbonsynapsen von Bipolarzellterminalen die Vesikel-exozytose wie Midorikawa et al. (2007) zeigten. Otoferlin, ein 'predicted' C2-Domänen Transmembranprotein, welches bei einer Form menschlicher Taubheit fehlt, wurde in an SK gebundenen Vesikeln von Roux et al. (2006) nachgewiesen. Dieses Protein ist für den letzten Schritt der Vesikelexozytose wichtig und möglicherweise der wesentliche Ca^{++} -Sensor, der die Membranfusion an Ribbonsynapsen innerer Haarzellen triggert.

Innerhalb der synaptischen Vesikel werden funktionell 3 verschiedene Gruppen unterschieden:

1. ein kleinerer Pool sofort zur Exozytose bereitstehender synaptischer Vesikel, der der Zahl in unterster Reihe an SK gebundener Vesikel entspricht und in weniger als 20 ms phasisch freigesetzt wird (von Gersdorff 2001; Novian et al. 2006). Singer & Diamond (2006) fanden bei Rattenstäbchenbipolarzellen einen solchen "readily releasable pool" aus 7 Vesikeln, die pro aktive Zone in ca. 4 ms freigesetzt wurden.
2. ein Pool "bereiter" Vesikel, der innerhalb von 200 ms nach 1. während der weiteren Depolarisation freigesetzt wird und dessen Größe wie Kapazitätsmessungen (Matthews 1996) an Gold-

fischbipolarzellterminalen zeigten (von Gersdorff et al. 1996) der Menge der noch an den SK verbliebenen Vesikel entspricht. Die Autoren lokalisierten auf beiden durchschnittlich 400 x 150 nm großen SK-Hauptflächen insgesamt 110 gebundene Vesikel. Bei den 45 - 65 SK, die sie pro Terminal fanden, entsprach der gesamte gebundene Pool somit ca. 6.000 Vesikeln. Nach einem "fire and reload"-Modell der Exozytose muß laut letztgenannten Autoren eine einzige membranah gelegene Vesikelbindungsstelle eines SKs 23 Fusionen pro Sekunde ermöglichen und hat 40 ms für die Wiederbesetzung mit einem neuen Vesikel zur Verfügung, um die maximale Freisetzungsrates von 500 Vesikeln pro Sekunde für jede aktive Zone zu ermöglichen. Eine sehr hohe Rate verglichen mit der konventioneller Synapsen mit ca. 20 Vesikeln / Sek.! Für Stäbchenribbonsynapsen von Säugetieren ist eine tonische Ausschüttung von wenigstens 40 Vesikeln / Sek. notwendig, um keine Bipolarzellreaktion auszulösen (Rao et al. 1994). Für eine Zapfensynapse der Schildkröte wurden 20 Quanta / aktive Zone / Sek. bestimmt (Ashmore & Copenhagen 1983), wobei Stäbchensynapsen meist nur ein großes SK, die genannte Zapfensynapse aber 20 SK aufweist.

3. ein großer hoch beweglicher Reservepool der nicht an SK gebundenen Vesikel einer Ribbonsynapse (von Gersdorff 2001; LoGiudice & Matthews 2007), der bereit steht, sofort freiwerdende Bindungsstellen an SK wieder zu besetzen.

4. In Zapfen, bei denen die Vesikel sich durch Diffusion und nicht durch Zytoskelett gebundene molekulare Motoren bewegen, liegt der Anteil der neben dem Reservepool noch übrigen kaum bis nicht beweglichen Vesikel laut Rea et al. (2004) unter 15 %.

Bezüglich detaillierter Informationen über die an der Vesikelexozytose an Ribbonsynapsen beteiligten Proteine und physiologische Hintergründe sei auf folgende Arbeiten verwiesen: Grabs et al. (1995); Heidelberger et al. (1995); Wagner (1997); Morgans 2000a, b; Sterling & Matthews (2005); tom Dieck et al. (2005); DeVries et al. (2006); Nouvain et al. (2006); tom Dieck & Brandstätter (2006); Zhou et al. 2006; Fejtova & Gundelfinger (2006) und Johnson et al. (2007).

In den Triaden bzw. Tetraden der glutamatergen (Massey 1990) Photorezeptorribbonsynapsen werden letztlich Bipolarzellendriten depolarisiert, wobei 3 Komponenten für die Stärke dieser Depolarisation entscheidend sind, die unterschiedliche Informationen liefern: Der Photorezeptor vermittelt die Intensität des von ihm selbst rezeptierten Lichts in Form graduerter elektrischer Potentiale (Schneeweis & Schnapf 1995, 1999), der Fortsatz einer großen Horizontalzelle sendet Informationen über wechselnde Helligkeit. Der Fortsatz einer kleinen Horizontalzelle informiert über die in kleinen benachbarten Netzhautarealen wahrgenommene Helligkeit (Sjöstrand 1989a). Außerdem gibt es auch Horizontalzellen, die nur von Blau-Zapfen Input erhalten (Sandmann et al. 1996).

Das in Zapfen an den aktiven Zonen von Ribbonsynapsen freigesetzte Glutamat wirkt nicht nur auf die direkt nachgeschalteten Horizontalzellendigungen, sondern in einer zweiten Stufe an den Bipolarzellendriten und im Falle von Zapfen in einer dritten Stufe, viel weiter vom Freisetzungsort entfernt, an den Kontakten, die die Dendriten der flachen Zapfenbipolarzellen basal am Zapfenterminal machen (DeVries et al. 2006). Es wirkt sogar in einer 4. Stufe noch an den auf den

ersten Blick an Desmosomen erinnernden Zell-Zell Kontakten in der oberen äußeren plexiformen Schicht unterhalb der Zapfenpedikel. Diese elektronendichten Bereiche sind vermutlich einander gegenüberliegende postsynaptische Verdichtungen eines komplexen Netzwerkes aus Transmitterzeptoren, Ankerproteinen und Zytoskelettkomponenten (Kennedy 1997; Haverkamp et al. 2000). In diesem Zusammenhang wiesen letztgenannte Autoren 3 Schichten verschiedener Glutamatrezeptoren von Photorezeptorterminalen bis in die obere äußere plexiforme Schicht nach. Ganz wesentlich für die Ribbonsynapsenfunktion ist auch die zügige Entfernung des Neurotransmitters aus den synaptischen Spalträumen. In diesem Zusammenhang sei auf die Glutamattransporter verwiesen, die in Horizontalzell-, Bipolarzell- aber auch Stäbchen- und Zapfenmembranen selbst vorkommen. Die eben geschilderte, im wörtlichen Sinne weitreichende Wirkung des Glutamats ist nur deshalb möglich, weil die erst im Plasmalemm von Müller-Gliazellfortsätzen lokalisierten Transporter, die den weitaus größten Teil des Glutamats beseitigen (Rauen & Kanner 1994; Rauen 2000; Auger & Attwell 2000), direkt unterhalb von Photorezeptorterminalen fehlen (Rauen et al. 1998; Pow & Barnett 1999).

Auf Details der Verschaltung retinaler Neurone kann im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Die teils konvergente, teils divergente Signalleitung führt von Rezeptorzellen über verschiedene Bipolarzellen zu Ganglienzellen, die letztlich die Sehinformation zum Gehirn leiten. Diese Signaltransduktion wird jedoch durch viele weitere komplexe Verknüpfungen beeinflusst wie Kontakte von Photorezeptor zu Photorezeptor, Horizontal- und Amakrinzellen, bplexiformen und interplexiformen Zellen (Kolb & West 1977; Mariani 1983a). So erfolgt schon eine erhebliche Signalvorverarbeitung innerhalb der Retina. Detailliertere Informationen dazu finden sich in umfangreicher Literatur wie z.B. Sjöstrand (1974, 1998a, b, c, d, 2001a, b, 2003a, b, 2004); Dubin (1970); Kolb et al. (1981); Peichl (1992); Wu (1994); Vaney (1994); Kolb (1994); Djamgoz et al. (1995); Hack et al. (1999); Brandstätter et al. (1997); Masland (2001), Tsukamoto et al. (2001), Schein et al. (2004); Field et al. (2005) und Calkins & Sterling (2007).

5. Zusammenfassung

Um mit sehr hoher Geschwindigkeit Sinnesreize zur Weiterverarbeitung übertragen zu können, besitzen im Ruhezustand Dauerimpulse liefernde Rezeptorzellen in Sinnesorganen, wie z.B. der Netzhaut (Retina), spezialisierte glutamaterge Synapsen, die durch präsynaptische Körperchen (**SK**) charakterisiert sind, die außerdem nur in Parenchymzellen der Zirbeldrüse vorkommen. SK binden mit hoher Affinität Neurotransmittervesikel und zeigen licht- bzw. reizabhängige morphologische Veränderungen. Sie dienen der Speicherung, eventuell auch dem Transport dieser Vesikel zum Ort der Reizübertragung, der nahen aktiven Zone der Ribbonsynapse.

Um Dynamik und Funktion der Zellorganellen zu verstehen, ist es wichtig, ihre genaue Topographie und dreidimensionale (**3D**) Struktur unter verschiedenen Bedingungen zu kennen. So wurden aus Serienschritten der Retina und Zirbeldrüse mit Hilfe geeigneter, teils selbst programmierter Software 3D-Rekonstruktionen der SK durchgeführt. Untersucht wurden die ersten und zweiten Synapsen der Sehbahn in Retinae von Mensch, Maus und Ratte, Zapfenterminale des Hühnchens und SK in Zirbeldrüsen von Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen. Analysiert wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Photoperiode oder unter experimentellen Bedingungen entnommenes Frischgewebe sowie Material aus Organkulturen. Außerdem wurden SK unter diversen Bedingungen quantifiziert, wobei eine neue Zählmethode entwickelt wurde, die auf einer Modifikation des Disektors basiert und die Quantifizierung auch anderer seltener Ultrastrukturen am Elektronenmikroskop ermöglicht. Im Gegensatz zur etablierten Zählmethode, die die Profilzahl von SK in einer definierten Fläche (**PZ**) angibt, liefert die vorgestellte Methode die aussagekräftigere Zahl der SK in definierten Volumina und hängt weder von deren Form noch Größe ab. Diverse Kalkulationen zeigten, daß eine Umrechnung von am selben Material gewonnenen PZ in validere Disektor Werte nicht präzise genug möglich ist. Um sinnvolle Aussagen zur Quantität von SK machen zu können, ist es daher erforderlich, die Methode für jedes Tier einer identisch behandelten Gruppe anzuwenden.

Es konnte gezeigt werden, daß SK eine konstante Dicke von 35 nm haben. In der Retina sind sie meist nur in einer Ebene C-förmig gebogene Bänder, weshalb sie auch als "synaptic ribbons" bezeichnet werden, oder Platten mit Breite zu Höhe Verhältnissen zwischen 6:1 bis 3:1. Die elektronendichten, unter Normalbedingungen durch regelmäßig polymerisierte Dimere des Hauptproteins RIBEYE pentalamellären SK binden über dünne Proteinbrücken glutamathaltige Neurotransmittervesikel. Ihre untere lange schmale Kante ist über feines elektronendichtes Material an einem, als arciform density (**ad**) bezeichneten Plaque der Zellmembran verankert, der die Form einer gebogenen Rinne hat. Die zumeist senkrecht darauf stehenden SK zeigen an ihrer membranfernen langen Kante zu Beginn der Lichtphase, insbesondere aber unter Dauerlicht partiell verdickte Ränder, die auf An- bzw. Abbauvorgänge hinweisen. Diese Veränderungen waren nur in Stäbchenterminalen und Pinealozyten in Ver-

bindung mit dem Auftreten kleinerer klumpiger bis kugelförmiger SK nachweisbar und zeigten sich in den Schnitten als runde oder irreguläre Profile, die dann neben den "üblichen" stabförmigen SK-Anschnitten vorlagen.

Die 3D-Rekonstruktion von Stäbchenterminalen der menschlichen Retina zeigte, daß diese entsprechend der Zahl ihrer SK 1-3 Ribbonsynapsen aufweisen. Letztere bestehen aus einem an der Zellmembran senkrecht über eine ad verankerten SK und der aktiven Zone, die einem ca. 200 nm breiten Bereich der Zellmembran in Fortsetzung der ad nach seitlich oben entspricht. Die boomerang- bis hufeisenförmigen SK haben 2 parallele flache Hauptflächen. Postsynaptisch liegen zwei Horizontalzellfortsätze, welche mit variablen Aufspaltungen von einem engen Hilus aus tief in Stäbchenendkolben invaginiert sind. Sie verbreitern sich terminal und zeigen große breite oft aufgefächerte bzw. verzweigte Auftreibungen. Die Ribbonsynapsen sind in die zwischen solchen Endauftreibungen entstehenden Rinnen eingesenkt. Unterhalb ihrer ad berühren sich die Horizontalzellterminalen. Etwas darunter enden 1-2 ca. 100 nm breite Bipolarzellendriten, die vom Zentrum der Invagination des Stäbchenterminals zum Hilus hin dünner werden, um zum Soma invaginierender ON-Bipolarzellen weiterzulaufen. Da die Zahl der in den Stäbchenendkolben eintretenden Fortsätze variabel ist, fanden sich Konstellationen von 1-3 SK, 1-3 Horizontal- und 1-4 Bipolarzellterminalen, wie sie auch in der Literatur beschrieben sind.

Drei zentrale Ausschnitte menschlicher Zapfenpedikel wurden aus lückenlosen Serienschnitten mit ihren Mitochondrien, SK und den in Form von Triaden hier invaginierenden postribbonsynaptischen Fortsätzen rekonstruiert. Der Grundbauplan der Ribbonsynapsen ist hier dem der Stäbchen ähnlich, jedoch sind die SK kürzer, die Invaginationen deutlich kleiner und nie verzweigt, die Bipolarzellendriten breiter und die Horizontalzellfortsätze terminal weniger stark und nur rundlich aufgetrieben. Zapfen-SK sind nur in einer Ebene schwach gebogene Bänder. Die gefundene Zahl von Zapfen SK paßt zu Literaturdaten, deren Zusammenfassung für Primaten foveanah 10-20 und peripher 30-40 SK zeigt. In Bipolarzellaxonen des Menschen waren SK nicht immer über leistenartige Membranplaques am Plasmalemm verankert. Die hier flachen Ribbonsynapsen zeigten kleinere bandförmige oder nur ca. 250 x 150 x 35 nm große plattenförmige SK mit etwas größerem Abstand zu den aktiven Zonen als in Photorezeptoren.

Bei BALB/c Mäusen, deren SK besonders deutlich auf Veränderungen der Photoperiode oder experimentelle Bedingungen reagieren, zeigten Rekonstruktionen von Stäbchenribbonsynapsen am Ende der Dunkelphase band- bis boomerangförmige SK und weder Klumpen noch Kugeln. Im ersten Drittel und gegen Ende der Lichtphase fanden sich jedoch ca. 20 Prozent solch veränderter SK. Gleichzeitig waren die mittleren Abschnitte vieler SK unter beiden Lichtbedingungen dünner als am Ende der Dunkelphase. Die langen, oft mehrfach gebogenen und verdrehten Zapfen-SK dieser Mäuse waren unabhängig von den Lichtbedin-

gungen oft deutlich größer als die der Stäbchen, wohingegen beim Menschen Zapfen-SK relativ gerade, bandförmige Zellorganellen geringerer Größe als in Stäbchen darstellten.

Während in Stäbchenterminalen nur ausnahmsweise mehr als ein größeres bandförmiges SK (neben eventuellen kugelförmigen) vorlag, zeigten sich in den Zapfen orts- und speziesabhängig 15 bis über 25 meist bandförmige Organellen, die in wenigen Fällen mit zwei gelegentlich sogar 3 verschiedenen Triaden aus 2 Horizontal- und einem Bipolarzellfortsatz verbunden waren. Dies ist bei BALB/c Mäusen, die weniger, aber größere Zapfen-SK zeigten, häufiger als beim Menschen.

Die SK der Bipolarzellen in der inneren plexiformen Schicht waren speziesübergreifend meist lange Bänder oder kleine Platten mit ca. 250 x 150 nm großen Hauptflächen und nur geringen Verdrehungen. Verschiedene Bipolarzelltypen haben unterschiedlich viele SK. Im Rahmen der Arbeit erstmals erstellte 3D-Rekonstruktion ektopischer synaptischer Körperchen (eSK) konnten belegen, daß diese in Bipolarzellendriten lokalisiert sind. Die kleinen, leicht gebogenen, 35 nm dicken Platten, deren große Oberflächen Dimensionen von meist nur ca. 100 x 200 nm hatten, sind praktisch nie an der Zellmembran verankert, sondern stehen in einigen Fällen über zu langen Tubuli fusionierte Vesikel mit dem Interzellularspalt in Verbindung. Dies könnte ein Hinweis auf eine "compound" Endo- oder Exozytose sein. Selten finden sich zwei, ausnahmsweise auch drei parallel zueinander angeordnete SK im Inneren der Bipolarzellendriten, meistens nahe deren Eintritt in Stäbchenendkolben. Im Gegensatz zur Ratte fanden sich eSK bei seit Geburt unter Dauerdunkelheit gehaltenen BALB/c Mäusen sogar im in Stäbchen- bzw. Zapfenterminal invaginierten Abschnitt von Bipolarzellendriten. Neben plattenförmigen SK lagen bei diesen Mäusen auch innen hohle klumpenförmige Organellen in Stäbchenbipolarzellendriten vor.

Unter Organkultur und Ca^{++} -Entzug fanden sich in Stäbchen die massivsten Veränderungen von SK, die entweder als Klumpen oder Kugeln vorlagen oder massive Protrusionen an einem kleinen plattenförmigen Abschnitt zeigten, der noch an der ad befestigt blieb. Die Befunde deuten darauf hin, daß Licht über Kalziumentzug zu Verklumpungen an SK und zur Abschnürung von klumpen- bis kugelförmigen SK Fragmenten führt.

Bei der Rekonstruktion mit anti- β -Dystroglykan Immunogold-markierter Zapfenterminalen der Hühnchenretina konnte erstmals gezeigt werden, daß sich dieses zum Dystrophin-assoziierten Glykoproteinkomplex gehörende Protein in perisynaptischen Fortsätzen der Photorezeptoren seitlich und an ihren Spitzen fand, während Horizontal- und Bipolarzellfortsätze nicht markiert waren. Dies deutet auf eine neue strukturelle oder funktionelle Domäne in Photorezeptorterminalen hin, die eine noch im Detail zu klärende Rolle bei der synaptischen Transmission spielt, da bei Mutationen im Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex eine Veränderung der synaptischen Kommunikation in der äußeren plexiformen Schicht zu beobachten ist.

In der Zirbeldrüse sind die meisten SK wenig gebogene, flache, plattenförmige Strukturen, die bei der Ratte meist ca. 300x150x35 nm groß sind. Daneben gibt es deutlich längere bandförmige Organellen und unter Normalbedingungen bei Ratte und Hühnchen praktisch keine, bei Meerschweinchen nur wenige klumpige oder kugelförmige SK. Pinealocyten der Meerschweinchenzirbeldrüse weisen üblicherweise Felder parallel gruppierter plattenförmiger synaptischer Körperchen auf. Unter Dauerlicht zeigten sich an der Membran benachbarter Zellen einander gegenüberliegende Felder stark verbogener, partiell verdickter SK, die vermutlich aus verschmolzenen Einzelplatten entstanden waren sowie deutlich mehr kugelige bzw. klumpige SK. Die Organellen nehmen nachts an Größe zu, wodurch sich ihre Oberfläche vergrößert, bei Ratten nimmt sie um 19,3 Prozent von 0,041 auf 0,0501 μm^2 zu. Da die plattenförmigen SK eine konstante Dicke von 35 nm hatten, läßt sich so ein durchschnittliches Volumen von $1,47 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ für 12.00 und von $1,75 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ für Mitternacht mit einer Zunahme von $0,28 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ (entspricht 19,3 %) errechnen. Der Vergleich von Pinealocyten-SK von unter LD 4:20 zu LD 20:4 gehaltenen Ratten zeigte unter LD 20:4 insignifikant mehr SK, die signifikant längere Profile hatten, was auf eine Größenzunahme der Organellen hindeutet. Überlegungen und mathematische Berechnungen, was Profillängenmessungen bedeuten und wieviele Profile für sinnvolle Vergleiche ausgewertet werden müßten, werden kritisch diskutiert.

Die selbst erhobenen Befunde werden im Kontext mit allen verfügbaren Literaturdaten de origine, dem Auftreten von SK in der Ontogenese sowie SK betreffenden pathologischen und Altersveränderungen betrachtet. Hierbei deutet die Analyse der Chronobiologie von SK in quantitativer und morphologischer Hinsicht auf eine Abhängigkeit von der Photoperiode bzw. Licht und Dunkelheit und nicht auf eine endogene zirkadiane Rhythmik hin.

Die oberhalb funktionell wichtiger Ca^{++} -Kanäle lokalisierten SK setzen in Photorezeptoren die Lichtinformation in exozytierte Glutamatquanten um, wobei das Glutamat an verschiedenen postsynaptischen Orten wirkt. Die zuvor nie so anschaulich durch 3D-Stereoanimationen visualisierten Befunde zeigen, daß die Morphologie von SK hier für eine maximal schnelle Freisetzung der gebundenen Transmittervesikel an in unmittelbarer Nähe gelegenen aktiven Zonen der Ribbonsynapsen optimiert ist. Der molekulare Aufbau von SK wird ultrastrukturell nachvollzogen und die Funktion der Organellen diskutiert. Diesbezüglich ist die Vesikelspeicherung erwiesen, das "Priming" für die Exozytose beinahe bewiesen, eine Koordinationsfunktion für multivesikuläre Transmitterfreisetzung ist denkbar, während eine Förderbandfunktion eher unwahrscheinlich ist. In breve haben die im Rahmen dieser Habilitation gewonnenen Erkenntnisse und entwickelten Methoden einige Beiträge zur Klärung des morphologisch funktionellen Gesamtverständnisses der Ribbonsynapsen geleistet.

6. Perspektive

Im Januar 2006 erhielt ich für mein Projekt "Dreidimensionale Rekonstruktion synaptischer Organellen der menschlichen Retina" von der Universität Mainz eine Förderung in Höhe von 11.355 €. Die in dieser Schrift vorgestellten und visualisierten Befunde der menschlichen Retina sind Ergebnisse dieses Projektes, welches durch weitere Rekonstruktionen vervollständigt werden soll. Eine Publikation über ektopische SK der Retina von BALB/c Mäusen und Ratten mit Dr. I. Spiwox-Becker ist in Arbeit. Zunächst wurden einige der hierbei erhobenen Befunde in einem Poster vorgestellt (Spiwox-Becker et al. 2007). Ferner ist die Publikation der hier vorgestellten umfassenden Untersuchungen an Retinae von BALB/c Mäusen unter diversen Licht-Dunkelbedingungen geplant.

Mit Herrn Prof. Meissner (Zoologisches Institut, Uni Mainz) besteht seit Februar 2005 eine Kooperation, bei der es um die dreidimensionale Rekonstruktion einer kaum bekannten Zellorganelle (Macrotubuli aggregati) menschlicher Horizontalzellen geht, die bereits in einem Vortrag (Jastrow & Meissner 2006) vorgestellt wurde. Eine Publikation hierzu ist in Arbeit.

7. Literaturverzeichnis

- Abe H, Yamamoto TY 1984. Diurnal changes in synaptic ribbons of rod cells of the turtle. *J Ultrastruct Res* 86: 246-251.
- Abe H, Yamamoto TY 1988. Modification of diurnal changes in the ultrastructure of synaptic ribbons of the turtle. *Tohoku J Exp Med* 156: 381-393.
- Ackermann K, Stehle JH 2006. Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantages, implications, and difficulties. *Chronobiol Int* 23: 369-379.
- Adly MA, Spiwoks-Becker I, Vollrath L 1999. Ultrastructural changes of photoreceptor synaptic ribbons in relation to time of day and illumination. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2165-2172.
- Ahmad KM, Klug K, Herr S, Sterling P, Schein S 2003. Cell density ratios in a foveal patch in macaque retina. *Vis Neurosci* 20: 189-209.
- Ahnelt PK, Kolb H 1994. Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: a Golgi-electron microscopic study of spectral connectivity. *J Comp Neurol* 343: 406-427.
- Ahnelt PK, Kolb H 2000. The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design. *Prog Ret Eye Res* 19: 711-777.
- Ahnelt PK, Kolb H, Pflug R 1987. Identification of a subtype of cone photoreceptor, likely to be blue sensitive, in the human retina. *J Comp Neurol* 255: 18-34.
- Ahnelt PK, Keri C, Kolb H 1990. Identification of pedicles of putative blue-sensitive cones in the human retina. *J Comp Neurol* 293: 39-53.
- Allen RA 1966. The retinal bipolar cells and their synapses in the inner plexiform layer. In: Straatsma BR, Allen PA, Hall MO, Crescitelli F (Ed.). *The retina: morphology, function and clinical characteristics*. Univ California Press, Los Angeles: 101-143.
- Aronson BD, Bell-Pedersen D, Block GD, Bos NPA, Dunlap JC, Eskin A, Garceau NY, Geusz ME, Johnson KA, Khalsa SBS, Koster-van Hoffen G, Koumenis C, Lee TM, LeSauter J, Lindgren KM, Liu Q, Loros JJ, Michel SH, Mirmiran M, Moore RY, Ruby NF, Silver R, Turek FW, Zatz M, Zucker I 1993. Circadian rhythms. *Brain Res Rev* 18: 315-333.
- Ashmore JF, Copenhagen D 1983. An analysis of transmission from cones to hyperpolarizing bipolar cells in the retina of the turtle. *J Physiol* 340: 569-597.
- Attwell D 1986. Ion channels and signal processing in the outer retina. *Quart J Exp Physiol* 71: 497-536.
- Auger C, Attwell D 2000. Fast removal of synaptic glutamate by postsynaptic transporters. *Neuron* 28: 547-558.
- Bachmann KM, Balkema GW 1993. Developmental expression of a synaptic ribbon antigen (B16) in mouse retina. *J Comp Neurol* 333: 109-117.
- Balkema GW 1991. A synaptic antigen (B16) is localized in retinal synaptic ribbons. *J Comp Neurol* 312: 573-583.
- Balkema GW, Dräger UC 1985. Light-dependent antibody labelling of photoreceptors. *Nature* 316: 630-633.
- Balkema GW, Rizkalla R 1996. Ultrastructural localization of a synaptic ribbon protein recognized by antibody B16. *J Neurocytol* 25: 565-571.
- Balkema GW, Nguyen 1999. Co-localization of clathrin adapter proteins with photoreceptor synaptic ribbons in the OPL of the mouse. *Soc Neurosci Abstr* 25:135.
- Banks JC, Dalgleish AE, Vollrath L 1985. Postnatal development of "synaptic" ribbons and spherules in the guinea-pig pineal gland. *Am J Anat* 173: 43-53.
- Barets A, Szabo T 1962. Appareil synaptique des cellules sensorielles de l'ampoule de Lorenzini chez la torpille, *Torpedo marmorata*. *J Microscopie* 1: 47-54.
- Bargmann W 1943. Die Epiphysis cerebri. In: v.Möllendorff W. (Ed.). *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen IV(4)*: 309-502.
- Bayley PR, Morgans CW 2007. Rod bipolar cells and horizontal cells form displaced synaptic contacts with rods in the outer nuclear layer of the *nob2* retina. *J Comp Neurol* 500: 286-298.
- Baylor DA, Fuortes MGF, O'Bryan PM 1971. Receptive fields of single cones in the retina of the turtle. *J Physiol* 214:265-294.
- Bhatnagar KP 1994. Synaptic ribbons of the mammalian pineal gland: Enigmatic organelles of poorly understood function. *Adv in Struct Biol* 3: 47-94.
- Blake DJ, Kröger S 2000. The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci* 23: 92-99.
- Blank M, Blake DJ, Kröger S 2002. Molecular diversity of the dystrophin-like protein complex in the developing and adult avian retina. *Neuroscience* 111: 259-273.

- Blank M, Koulen P, Blake DJ, Kröger S 1999. Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and mdx3Cv mouse retinae. *Eur J Neurosci* 11: 2121-2133.
- Blank M, Koulen P, Kröger S 1997. Subcellular concentration of β -dystroglycan in photoreceptors and glial cells of the chick retina. *J Comp Neurol* 389: 668-678.
- Behrens UD, Wagner H-J 1996. Adaptation-dependent changes of bipolar cell terminals in fish retina: effects on overall morphology and spinule formation in Ma and Mb bells. *Vis Res* 36: 3901-3911.
- Behrens UD, Kasten P, Wagner H-J 1998. Adaptation-dependent plasticity of rod bipolar cell axon terminal morphology in the rat retina. *Cell Tiss Res* 294: 243-251.
- Behrens UD, Borde J, Mack AF, Wagner H-J 2007. Distribution of phosphorylated protein kinase C alpha in goldfish retinal bipolar synaptic terminals: control by state of adaptation and pharmacological treatment. *Cell Tiss Res* 327: 209-220.
- Berntson A, Taylor WR, Morgans CW 2003. Molecular identity, synaptic localization, and physiology of calcium channels in retinal bipolar cells. *J Neurosci Res* 71: 146-151.
- Beutner D, Voets T, Neher E, Moser T 2001. Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron* 29: 681-690.
- Boycott BB, Dowling JE 1969. Organization of the primate retina: Light microscopy. *Philos Transact Royal Soc London B* 255: 109-184.
- Boycott BB, Kolb H 1973a. The connections between bipolar cells and photoreceptors in the retina of the domestic cat. *J Comp Neurol* 148: 91-114.
- Boycott BB, Kolb H 1973b. The horizontal cells of the rhesus monkey retina. *J Comp Neurol* 148: 115-140.
- Boycott BB, Hopkins JM 1991. Cone bipolar cells and cone synapses in the primate retina. *Vis Neurosci* 7: 49-60.
- Boycott BB, Hopkins JM 1993. Cone synapses of a flat diffuse cone bipolar cell in the primate retina. *J Neurocytol* 22: 765-778.
- Boycott BB, Wässle H 1991. Morphological classification of bipolar cells of the primate retina. *Eur J Neurosci* 3: 1069-1988.
- Boycott BB, Wässle H 1999. Parallel processing in the mammalian retina. The proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1313-1327.
- Boycott BB, Hopkins JM, Sperling HG 1987. Cone connections of the horizontal cells of the rhesus monkey's retina. *Proc Royal Soc B London* 229: 345-379.
- Brandon C, Lam DMK 1983. The ultrastructure of rat rod synaptic terminals: effects of dark-adaptation. *J Comp Neurol* 217: 167-175.
- Brandstätter JH, Koulen P, Wässle H 1997. Selective synaptic distribution of Kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina. *J Neurosci* 17: 9298-9307.
- Brandstätter JH, Löhre S, Morgans CW, Wässle H 1996. Distribution of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 370: 1-10.
- Brandstätter JH, Wässle H, Betz H, Morgans CW 1996. The plasma membrane protein SNAP-25, but not syntaxin, is present at photoreceptor and bipolar cell synapses in the retina. *Eur J Neurosci* 8: 823-828.
- Brandstätter JH, Koulen P, Kuhn R, van der Putten H, Wässle H 1996. Compartmental localization of a metabotropic glutamate receptor (mGluR7): two different active sites at a retinal synapse. *J Neurosci* 16: 4749-4756.
- Brandstätter JH, Fletcher EL, Garner CC, Gundelfinger ED, Wässle H 1999. Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *Eur J Neurosci* 11: 3683-3693.
- Bunt AH 1971. Enzymatic digestion of synaptic ribbons in amphibian retinal photoreceptors. *Brain Res* 25:571-577.
- Cajal SRY 1892. *La rétine des vertébrés*. La cellule 9: 119-125.
- Calkins DJ, Sterling P 1999. Evidence that circuits for spatial and color vision segregate at the first retinal synapse. *Neuron* 24: 313-321.
- Calkins DJ, Schein SJ, Tsukamoto Y, Sterling P 1994. M and L cones in macaque fovea connect to midget ganglion cells by different numbers of excitatory synapses. *Nature* 371: 70-72.
- Calkins DJ, Tsukamoto Y, Sterling P 1996. Foveal cones from basal as well as invaginating junctions with diffuse ON bipolar cells. *Vision Res* 36: 3373-3381.
- Calvo J, Boya J 1984. Ultrastructure of the pineal gland in the adult rat. *J Anat* 138: 405-409.

- Campbell KP 1995. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679.
- Case CP, Plummer CJ 1993. Changing the light intensity of the visual environment results in large differences in numbers of synapses and in photoreceptor size in the retina of young adult rats. *Neurosci* 55: 653-666.
- Choi S-Y, Sheng Z, Kramer RH 2005. Imaging light modulated release of synaptic vesicles in the intact retina: retinal physiology at the dawn of the post-electrode era. *Vis Res* 45: 3487-3495.
- Chun M-H, Grünert U, Martin PR, Wässle H 1996. The synaptic complex of cones in the fovea and in the periphery of the macaque monkey retina. *Vis Res* 36: 3383-3395.
- Cia D, Bordais A, Varela C, Forster V, Sahel JA, Rendon A, Picaud S 2005. Voltage-gated channels and calcium homeostasis in mammalian rod photoreceptors. *J Neurophysiol* 93: 1468-1475.
- Cibis GW, Fitzgerald KM, Harris DJ, Rothberg PG, Rupani M 1993. The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3646-3652.
- Cimas García C, Martínez-Soriano F, Ruiz-Torner A 1987. Circadian and photoperiodic correlation between number of pineal gland synaptic ribbons and serum melatonin levels in the rat. *Acta Anat* 130: 228-231.
- Ciolofan C, Lynn BD, Wellershaus K, Willecke K, Nagy JI 2007. Spatial relationships of connexin36, connexin57 and zonula occludens-1 in the outer plexiform layer of mouse retina. *Neurosci* 148: 473-488.
- Claes E, Seeliger M, Michalakis S, Biel M, Humphries P, Haverkamp S 2004. Morphological characterization of the retina of the CNGA3^{-/-}Rho^{-/-} mutant mouse lacking functional cones and rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2039-2048.
- Coggins MR, Grabner CP, Almers W, Zenisek D 2007. Stimulated Exocytosis of Endosomes in Goldfish Retinal Bipolar Neurons. *J Physiol* 584: 853-865.
- Cohen AI 1960. The ultrastructure of the rods of the mouse retina. *Am J Anat* 107: 23-48.
- Cohen AI 1961. The fine structure of the extrafoveal receptors of the Rhesus monkey. *Exp Eye Res* 1: 128-136.
- Cohen AI 1963. The fine structure of the visual receptors of the pigeon. *Exp Eye Res* 2: 88-97.
- Cohen AI 1964. The form and inter-relations of vertebrate visual receptors. In *Conference on the physiological basis for form discrimination*, Brown University: 1-7.
- Cohen AI 1965. Some electron microscopic observations on interreceptor contacts in the human and macaque retinae. *J Anat* 99: 595-610.
- Cohen ED, Sterling P 1990a. Demonstration of cell types among cone bipolar neurons of cat retina. *Phil Trans Royal Soc Lond B* 330: 305-321.
- Cohen ED, Sterling P 1990b. Convergence and divergence of cones onto bipolar cells in the central area of the cat retina. *Phil Trans Royal Soc Lond B* 330: 323-328.
- Cooper NGF, McLaughlin BJ 1982. Structural correlates of physiological activity in chick photoreceptor synaptic terminals: effects of light and dark stimulation. *J Ultrastruct Res* 79: 58-73.
- Cooper NGF, McLaughlin BJ 1983. Tracer uptake by photoreceptor synaptic terminals. I. Dark-mediated effects. *J Ultrastruct Res* 84: 252-267.
- Craft CM, Morgan WW, Jones DJ, Reiter RJ 1985. Hamster and rat pineal gland Beta-adrenoceptor characterization with iodocyanopindolol and the effect of decreased catecholamine synthesis on the receptor. *J Pineal Res* 2: 51-66.
- Craft J, Albert DM, Reid TW 1975. Ultrastructural description of a "cylinder organelle" in the outer plexiform layer of human retinas. *Invest Ophthalmol* 14: 923-927.
- Dacheux RF, Raviola E 1990. Physiology of H1 horizontal cells in the primate retina. *Proc Royal Soc B London* 239: 213-230.
- Deguchi-Tawarada M, Inoue E, Takao-Rikitsu E, Inoue M, Kitajima I, Ohtsuka T, Takai Y 2006. Active zone protein CAST is a component of conventional and ribbon synapses in mouse retina. *J Comp Neurol* 495: 480-496.
- de Monasterio FM, McCrane EP, Newlander JK, Schein SJ 1985. Density profile of blue-sensitive cones along the horizontal meridian of macaque retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 289-302.
- De Robertis E, Franchi CM 1956. Electron microscope observation on synaptic vesicles in synapses of retinal rods and cones. *J Biophys Biochem Cytol* 2: 307-318.
- DeVries SH, Li W, Saszik S 2006. Parallel processing in two transmitter microenvironments at the cone photoreceptor synapse. *Neuron* 50: 735-748.

- Dick O, Hack I, Altmann WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH 2001. Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *J Comp Neurol* 439: 224-234.
- Dick O, Dieck ST, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH 2003. The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37: 775-786.
- Dickinson-Nelson A, Nelson RF 1977. Regional variations in interreceptor contacts in primate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19(Suppl.): 71.
- Dieterich CE, Rohen JW 1970. Über die Rezeptoren der menschlichen Netzhaut. *Albr vGraefes Arch klin exp Ophthalmol* 179: 235-258.
- Djamgoz MBA, Wagner HJ, Witkovsky P 1995. Photoreceptor-horizontal cell connectivity, synaptic transmission and neuromodulation. In: Djamgoz MBA, Archer SN, Vallerger S (Ed.). *Neurobiology and clinical aspects of the outer retina*. Chapman & Hall London: 155-193.
- Dogiel AS 1884. Über die Retina des Menschen. *Internat Monatsschrift Anat Hist* 1: 11-193.
- Dogiel AS 1891. Über die nervösen Elemente in der Retina des Menschen. *Arch Mikr Anat Entwicklungsmechanik* 38: 317-344.
- Dogiel AS 1892. Über die nervösen Elemente in der Retina des Menschen. *Arch f Mikr Anat Entwicklungsmechanik* 40: 29-38.
- Dowling JE 1965. Foveal receptors of the monkey retina: fine structure. *Science* 147: 57-59.
- Dowling JE 1970. Organization of vertebrate retinas. *Invest Ophthalmol Vis Res* 9: 655-680.
- Dowling JE 1974. Synaptic arrangements in the vertebrate retina: the photoreceptor synapse. In: Bennet M (Ed.). *Synaptic transmissions and neuronal interactions*. V/L. Raven Press, New York: 87-103.
- Dowling JE 1987. *The retina. An approachable part of the brain*. Belknap Press Harvard Univ Press, Cambridge.
- Dowling JE, Boycott BB 1965. Neural connections of the primate retina. In: *The structure of the eye, II. Symposium*, Rohen JW (Ed.). Schattauer-Verlag, Stuttgart: 55-68.
- Dowling JE, Boycott BB 1966. Organization of the primate retina: Electron microscopy. *Proc. Royal Soc London B* 166: 80-111.
- Dubin MW 1970. The inner plexiform layer of the vertebrate retina: a quantitative and comparative electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* 140: 479-506.
- Dunn RF 1973. The ultrastructure of the vertebrate retina. In: Friedmann A (Ed.). *The ultrastructure of sensory organs*, North-Holland Publishing Company Amsterdam, American Elsevier New York: 153-266.
- Drenckhahn D, Holbach M, Ness W, Schmitz F, Anderson LVB 1996. Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, b-dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neuroscience* 73: 605-612.
- Eliasieh K, Liets LC, Chalupa LM 2007. Cellular reorganization in the human retina during normal aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 2824-2830.
- Esfahani P, Schein SJ, Klug K, Tsukamoto Y, Sterling P 1993. Characterization of L, M, and S cone pedicles in primate fovea. *Soc Neurosci (Abstract)* 19: 493.15.
- Euler T, Wässle H 1995. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361: 461-478.
- Euler T, Schneider H, Wässle H 1996. Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci* 16: 2934-2944.
- Evans EM 1966. On the ultrastructure of the synaptic region of visual receptors in certain vertebrates. *Zeitschr Zellforsch* 71:499-516.
- Famiglietti EV 1981. Functional architecture of cone bipolar cells in mammalian retina. *Vis Res* 21: 1559-1563.
- Fechner J 1986. Influence of photoperiod on dense-core vesicles and synaptic ribbons of pinealocytes of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Neural Transm* 67: 139-145.
- Fejtova A, Gundelfinger ED 2006. Molecular organization and assembly of the presynaptic active zone of neurotransmitter release. *Results Probl Cell Differ* 43: 49-68.
- Fernandez C, Lysakowski A, Goldberg JM 1995. Hair-cell counts and afferent innervation patterns in the cristae ampullares of the squirrel monkey with a comparison to the chinchilla. *J Neurophysiol* 73: 1253-1269.
- Fernández-Alfonso T, Ryan TA 2006. The efficiency of the synaptic vesicle cycle at central nervous system synapses. *Trends Cell Biol* 16: 413-420.

- Field GD, Sampath AP, Rieke F 2005. Retinal processing near absolute threshold: from behavior to mechanism. *Annu Rev Physiol* 67: 491-514.
- Fields RD, Ellisman MH 1985. Synaptic morphology and differences in sensitivity. *Science* 228: 197-199.
- Fields RD, Ellisman MH, Waxman SG 1987. Changes in synaptic morphology associated with presynaptic and postsynaptic activity: An in vitro study of the electrosensory organ of the thornback ray. *Synapse* 1: 335-346.
- Fine BS 1963. Synaptic lamellas in the human retina: an electron microscopic study. *J Neuropath Exper Neurol* 22: 255-262.
- Fitzgerald KM, Cibis GW, Giambone SA, Harris DJ 1994. Retinal signal transmission in Duchenne muscular dystrophy: evidence for dysfunction in the photoreceptor/depolarizing bipolar cell pathway. *J Clin Invest* 93:2425-2430
- Fletcher EL, Hack I, Brandstätter JH, Wässle H 2000. Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* 420:98-112
- Foos RY, Miyamasu W, Yamada E 1969. Tridimensional study of an anomalous synaptic ribbon in human retina. *J Ultrastruct Res* 26: 391-398.
- Fuchs PA, Glowatzki E, Moser T 2003. The afferent synapse of cochlear hair cells. *Curr Opin Neurobiol* 13: 452-458.
- Furukawa T, Sato S, Tani A, Miyata K, Koyasu T, Kondo M, Usukura J 2007. Cloning and functional analysis of Pikachurin: a novel agrin/perlecan-related protein localized at the active zone of retinal photoreceptor ribbon synapse. *Neurosci Res.* 58 (Suppl): 42.
- Gallego A 1976. Comparative study of the horizontal cells in the vertebrate retina: mammals and birds. In: Zettler F, Weiler R (Ed.). *Neural principles in vision*. Springer Verlag, Berlin: 22-62.
- Gallego A 1985. Advances in horizontal cell terminology since Cajal. In: Gallego a, Gouras P. (Ed.). *Neurocircuitry of the retina*. Elsevier, New York: 122-140.
- Giannessi F, Ruffoli R 1996. Fine structure of afferent synapses in the parathympic organ of the chicken, with special reference to the synaptic bodies. *Ann Anat* 178: 127-131.
- Goede P, Kolb H 1994. Identification of the synaptic pedicles belonging to the different spectral types of photoreceptor in the turtle retina. *Vision Res.* 34: 2801-2811.
- Goede P, Kolb H 1995. Three-dimensional reconstruction and surface rendering of the five different spectral types of cone pedicle in the turtle retina. *J Neurosci Meth* 62: 83-88.
- Goede P, Jones J, Kolb H 1993. Identification of color specific pedicles in the turtle retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (Suppl.): 1156.
- Goldberg JM, Lysakowski A, Fernandez C 1990. Morphophysiological and ultrastructural studies in mammalian cristae ampullares. *Hearing Res* 49: 89-102.
- Gonzalez-Brito A, Jones DJ, Ademe RM, Reiter RJ 1988. Characterization and measurement of [¹²⁵I]iodopindolol binding in individual rat pineal glands: existence of a 24-h rhythm in Beta-adrenergic receptor density. *Brain Res* 438: 108-114.
- Gosh KK, Haverkamp S, Wässle H 2001. Glutamate receptors in the rod pathway of the mammalian retina. *J Neurosci* 21:8636-8647.
- Grabs D, Bergmann M, Urban M, Post A, Gratzl M 1995. Rab3 proteins and SNAP-25, essential components of the exocytosis machinery in conventional synapses, are absent from ribbon synapses of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 8: 162-168.
- Gray EG, Pease HL 1971. On understanding the organization of the retinal receptor synapses. *Brain Res* 35: 1-15.
- Graymore CN 1969. General aspects of metabolism in the retina. In: Davson H (Ed.). *The eye*, Academic Press, New York, Vol1 (2nd ed.): 601-645.
- Grün G 1980. Developmental dynamic in synaptic ribbons of retinal receptor cells (*Tilapia, Xenopus*). *Cell Tiss Res* 207: 331-339.
- Grünert U, Martin PR, Wässle H 1994. Immunocytochemical Analysis of bipolar cells in the macaque monkey retina. *J Comp Neurol* 348: 607-627.
- Gundersen HJG 1986. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microscopy* 143: 3-45.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo M, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ 1988a. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 96: 379-394.

- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo M, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ 1988b. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 96: 857-881.
- Gustavus DB, Jastrow H, Bastelberger A, Menzler S, Kolios G, Vollrath L 2001. Morphologie der Arciform Density in Ribbonsynapsen der Mäuseretina. 96th Meeting of the Anatomical Society, Münster. *Ann Anat* 183 (Suppl): 97. [POSTER]
- Gustavus DB, Menzler S, Bastelberger A, Jastrow H 2003. Morphologie außergewöhnlicher Synaptic Ribbons in Ribbonsynapsen der Mäuseretina. 20th Meeting of the Anatomical Society, Würzburg. *Ann Anat* 186 (Suppl): 236-237. [POSTER]
- Hack I, Peichl L, Brandstätter JH 1999. An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 14130-14135.
- Hainz M 2003. In vivo und in vitro Untersuchungen zur Tag/Nacht-Rhythmik pinealer synaptischer Körper mittels verschiedener quantitativer Verfahren. Inauguraldissertation, Fachbereich Humanmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz: 52 pp.
- Hainz M, Jastrow H, von Mach M-A, Vollrath L 1997. Disector counting of synaptic bodies on TEM sections of the pineal gland using a correlation factor increasing effectiveness. 14th Meeting of the Anatomical Society, Würzburg. *Ann Anat* 180 (Suppl): 283-284. [POSTER]
- Haverkamp S, Wässle H 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424: 1-23.
- Haverkamp S, Grünert U, Wässle H 2000. The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron* 27: 85-95.
- Haverkamp S, Gosh KK, Hirano AA, Wässle H 2003a. Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *J Comp Neurol* 455: 463-476.
- Haverkamp S, Haeseleer F, Hendrickson A 2003b. A comparison of immunocytochemical markers to identify bipolar cell types in human and monkey retina. *Vis Neurosci* 20: 589-600.
- Haverkamp S, Wässle H, Duebel J, Kuner T, Augustine GJ, Feng G, Euler T 2005. The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. *J Neurosci* 25: 5438-5445.
- Haverkamp S, Michalakis S, Claes E, Seeliger MW, Humphries P, Biel M, Feigenspan A 2006. Synaptic plasticity in CNGA3^{-/-} mice: cone bipolar cells react on the missing cone input and form ectopic synapses with rods. *Neurosci* 26: 5248 - 5255.
- Hebel R 1971. Entwicklung und Struktur der Retina und des Tapetum lucidum des Hundes. *Ergeb Anat Entwicklungsgesch* 45: 7-92.
- Heidelberger R, Zhou ZY, Matthews G 2002. Multiple components of membrane retrieval in synaptic terminals revealed by changes in hydrostatic pressure. *J Neurophysiol* 88: 2509-2517.
- Heidelberger R, Thoreson WB, Witkovsky P 2005. Synaptic transmission at retinal ribbon synapses. *Prog Ret Eye Res* 24: 682-720.
- Heidelberger R, Heinemann C, Neher E, Matthews G 1994. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* 371: 513-515.
- Hermes B, Reuss S, Vollrath L 1992. Synaptic ribbons, spheres and intermediate structures in the developing rat retina. *Int J Devel Neurosci* 10: 215-223.
- Hermes B, Reuss S, Vollrath L 1993. Strain differences in the ratio of synaptic body types in photoreceptors of the rat retina. *Vis Res* 33: 2427-2430.
- Herr SS, Tiv N, Klug K, Schein SJ, Sterling P 1995. L and M cones in macaque monkey fovea make different numbers of synaptic contacts with OFF (but not ON) midget bipolar cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci (Suppl.)* 36: 2368.
- Herr SS, Klug K, Sterling P, Schein SJ 2003. Inner S-cone bipolar cells provide all of central elements for S-cones in macaque retina. *J Comp Neurol* 457: 185-201.
- Hirano AA, Brandstätter JH, Brecha NC 2005. Cellular distribution and subcellular localization of molecular components of vesicular transmitter release in horizontal cells of rabbit retina. *J Comp Neurol* 488: 70-81.
- Hollenberg MJ, Spira AW 1973. Human Retinal Development: Ultrastructure of the outer retina. *Am J Anat* 137: 357-386.
- Holt M, Cooke A, Neef A, Lagnado L 2004. High mobility of vesicles supports continuous exocytosis at a ribbon synapse. *Curr Biol* 14: 173-183.
- Hopkins JM, Boycott BB 1995. Synapses between cones and diffuse bipolar cells of a primate retina. *J Neurocytol* 24: 680-694.

- Hopkins JM, Boycott BB 1997. The cone synapses of cone bipolar cells of primate retina. *J Neurocytol* 26:313-325.
- Hopsu VK, Arstila AU 1965. An apparent somatosomatic structure in the pineal gland of the rat. *Exp Cell Res* 37: 484-487.
- Hsu A, Tsukamoto Y, Smith RG, Sterling P 1998. Functional architecture of primate cone and rod axons. *Vis Res* 38: 2539-2549.
- Huang S-K, Taugner R 1984. Gap junctions between guinea-pig pinealocytes. *Cell Tiss Res* 235: 137-141.
- Hull C, von Gersdorff H 2004. Fast endocytosis is inhibited by GABA-mediated chloride influx at a presynaptic terminal. *Neuron* 44: 469-482.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355: 696-702.
- Issa NP, Hudspeth AJ 1994. Clustering of Ca^{2+} channels and Ca^{2+} -activated K^+ channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7578-7582.
- Issa NP, Hudspeth AJ 1996. The entry and clearance of Ca^{2+} at individual presynaptic active zones of hair cells from the bullfrog's sacculus. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9527-9532.
- Jansen HG, Sanyal S 1987. Synaptic changes in the terminals of rod photoreceptors of albino mice after partial visual loss induced by brief exposure to constant light. *Cell Tiss Res* 250: 43-52.
- Jansen HG, Hawkins RK, Sanyal S 1997. Synaptic growth in the rod terminals of mice after partial photoreceptor cell loss: a three-dimensional ultrastructural study. *Microsc Res Tech* 36: 96-105.
- Jastrow H, Schmanke D, Weinert J, Jendrysiak U, Merle K, Vollrath L 1996a. Three dimensional reconstruction of pineal synaptic ribbons and spheres. In: Elsner N, Schnitzler H-U (Ed.). *Göttingen neurobiology report*, Thieme Verlag Vol2: 141. [POSTER]
- Jastrow H, von Mach M-A, Vollrath L 1996b. Application of the disector method to rare small particles in transmission electron microscope sections exemplified by counting synaptic organelles of the rat pineal gland. *Ann Anat* 179 (Suppl): 338. [POSTER]
- Jastrow H, von Mach M-A, Vollrath L 1997a. The shape of synaptic ribbons in the rat pineal gland. *Cell Tiss Res* 287: 255-261.
- Jastrow H, von Mach M-A, Vollrath L 1997b. Adaptation of the disector method to rare small organelles in TEM sections exemplified by counting synaptic ribbons of the rat pineal gland. *J Anat* 191: 399-405.
- Jastrow H, Schmanke D, Weinert J, Jendrysiak U, Vollrath L 1997c. Changes in the three dimensional structure of synaptic ribbons in the pineal gland of the guinea-pig caused by constant light. Ernst and Berta Scharrer Symposium, Dept Anat J. W. Goethe University Frankfurt am Main, Poster No. 19. [POSTER]
- Jastrow H, Schmanke D, Weinert J, Jendrysiak U, Vollrath L 1997d. Changes in the three dimensional structure of synaptic ribbons in the pineal gland of the guinea-pig caused by constant light. In: *Neuroendocrinology Retrospect and Perspectives*, Korf H-W & Usadel K-H (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 367-373.
- Jastrow H, von Mach M-A, Hainz M, Vollrath L 1997e. Analysis of day/night differences of pineal synaptic bodies by means of length measurement, profile and disector counts. 14th Meeting of the Anatomical Society, Würzburg. *Ann Anat* 180 (Suppl): 290-291. [POSTER]
- Jastrow H, von Mach M-A, Vollrath L 1997f. Quantifizierung synaptischer Körper mit Hilfe der Disector-Methode. Erster Mainzer Zirbeldrüsentag, Anatomisches Institut, J. Gutenberg Universität, Mainz, Präsentation Nr. 9 (1.5.1997). [VORTRAG]
- Jastrow H, Schmanke D, Weinert J, Jendrysiak U, Vollrath L 1997g. Three-dimensional reconstruction of pineal synaptic bodies. Bipartite Meeting of Anatomical Society and Polish Anatomical Society. Olztyń, Poland, Presentation No. 43 (25.5.1997). *Ann Anat* 179 (Suppl): 36. [VORTRAG]
- Jastrow H, Vollrath L 1998. Schnittbilder des Visible Human zur medizinischen Aus- und Weiterbildung: Anatomie im Internet. *Dt. Ärztebl.* 95: 1726-1727 & *Suppl Praxis Computer* 4/1998: 6-8.
- Jastrow H, Hainz M, Vollrath L 1998. Disector counts reveal changes of synaptic bodies in cultured chicken pineal glands. 15th Meeting of the Anatomical Society, Würzburg. *Ann Anat* 181 (Suppl): 269. [POSTER]

- Jastrow H, Gustavus DB, Kolios G, Vollrath L 2000. Dreidimensionale Visualisierung synaptischer Körperchen im ersten und zweiten Neuron der Sehbahn. 15th Meeting of the Anatomical Society, Würzburg. *Ann Anat* 183 (Suppl): 243. [POSTER]
- Jastrow H, Hämmerer U 2001. Elektronenmikroskopischer Atlas im Internet. *Dt Ärztebl* 98: 2290-2292 & *Suppl Praxis Computer* 5/2001: 17-20.
- Jastrow H, Vollrath L 2002. Anatomy online: Presentation of a detailed WWW atlas of human gross anatomy - reference for medical education. *Clin Anat* 15: 402-408.
- Jastrow H, Vollrath L 2003. Teaching and learning gross anatomy using modern electronic media based on the visible human project. *Clin Anat* 16: 44-54.
- Jastrow H 2004. 3D-Rekonstruktion synaptischer Körperchen der Retina. Fortbildungsveranstaltung der Universitätsaugenklinik Mainz. Präsentation Nr. 1 (30.07.2004). [VORTRAG]
- Jastrow H, Hollinderbäumer A 2004. On the use and value of new media and how medical students assess their effectiveness in learning anatomy. *Anat Rec B* 280: 20-29.
- Jastrow H, Schmanke D, Weinert J 2004. Bizarre alterations of the morphology of pineal synaptic bodies under constant light and an evaluation of suitable 3D-reconstruction software. *Micron* 35: 655-670.
- Jastrow H, Gustavus DB, Kolios G, Spiwoкс-Becker I 2005. Three-dimensional reconstruction of „synaptic ribbons“ in retinal high-output synapses under different light conditions. 100th Annual Meeting of the Anatomical Society, Leipzig. Präsentation No. 27 (12.03.2005). *Ann Anat* 187 (Suppl): 44-45. [VORTRAG]
- Jastrow H, Meissner U 2006. Macrotubuli aggregati of human horizontal cells - a strange and fairly known cell organelle. 101th Annual Meeting of the Anatomical Society, Freiburg. Präsentation No. 76 (09.04.2006). [VORTRAG]
- Jastrow H, Koulen P, Altröck WD, Kröger S 2006. Identification of a β -Dystroglycan immunoreactive subcompartment in photoreceptor terminals. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 47: 17-24.
- Jastrow H, Racke J 2007. Analysis of synaptic bodies in the Sprague-Dawley rat pineal gland under extreme photoperiods. *Micron* 38: 237-251.
- Jastrow H, Gustavus DB, Bastelberger-Gustavus A 2007. First three-dimensional reconstruction of „synaptic bodies“ in cones, rods and bipolar cells of the human retina. 102nd Annual Meeting of the Anatomical Society, Giessen. Präsentation No. 62 (2.04.2007). [VORTRAG]
- Johnson JE, Perkins GA, Giddabasappa A, Chaney S, Xiao W, White AD, Brown JM, Waggoner J, Ellisman MH, Fox DA 2007. Spatiotemporal regulation of ATP and Ca^{2+} dynamics in vertebrate rod and cone ribbon synapses. *Mol Vis* 13: 887-919.
- Johnson PT, Brown MN, Pulliam BC, Anderson DH, Johnson LV 2005. Synaptic pathology, altered gene expression, and degeneration in photoreceptors impacted by drusen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 4788-4795.
- Jørgensen JM, Flock Å 1973. The ultrastructure of lateral line sense organs in the adult salamander *Ambystoma mexicanum*. *J Neurocytol* 2: 133-142.
- Jung D, Vollrath L 1982. Structural dissimilarities in different regions of the pineal gland of the Pirbright White guinea pigs. *J Neural Transm* 54: 117-128.
- Juusola M, French AS, Uusitalo RO, Weckström M 1996. Information processing by graded-potential transmission through tonically active synapses. *Trends Neurosci* 19: 292-297.
- Kachi S, Yamazaki A, Usukura J 2001. Localization of Caveolin-1 in photoreceptor synaptic ribbons. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 42: 850-852.
- Kameya S, Araki E, Katsuki M, Mizota A, Adachi E, Nakahara K, Nonaka I, Sakuragi S, Takeda S, Nabeshima Y (1997) Dp260 disrupted mice revealed prolonged implicit time of the b-wave in ERG and loss of accumulation of beta-dystroglycan in the outer plexiform layer of the retina. *Hum Mol Gen* 6: 2195-2203.
- Kaneko A. 1979. Physiology of the retina. *Annu Rev Neurosci* 2:169-191.
- Kappers JA 1976. The mammalian pineal gland, a survey. *Acta neurochir (Wien)* 34: 109-149.
- Karasek M 1976. Quantitative changes in number of "synaptic" ribbons in rat pinealocytes after orchidectomy and in organ culture. *J Neural Transm* 38: 149-157
- Karasek M 1981. Some functional aspects of the ultrastructure of rat pinealocytes. *Endocrin Experiment* 15: 17-34.
- Karasek M, Vollrath L 1982. "synaptic" ribbons and spherules of the rat pineal gland: day/night changes in vitro? *Exp Brain Res* 46: 205-208.
- Karasek M, Zielinska A 2000. Comparative ultrastructural study of pinealocytes in eight mammalian species. *Neuroendocrinol Lett* 21: 195-202.

- Karasek M, Lewinska I, Lewinski A, Hansen JT, Reiter RJ 1982. Ultrastructure of rat pinealocytes during the last phase of pregnancy. *Cytobios* 33: 103-110.
- Karasek M, King TS, Brokaw J, Hansen JT, Petterborg LJ, Reiter RJ 1983. Inverse correlation between "synaptic" ribbon number and the density of adrenergic nerve endings in the pineal gland of various mammals. *Anat Rec* 205: 93-99.
- Karasek M, Lewinski A, Vollrath L 1988a. Precise annual changes in the numbers of "synaptic" ribbons and spherules in the rat pineal gland. *J Biol Rhythms* 3: 41-48.
- Karasek M, Marek K, Pévet R 1988b. Influence of a short light pulse at night on the ultrastructure of the rat pinealocyte: a quantitative study. *Cell Tiss Res* 254: 247-249.
- Karnovsky MJ 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137-138.
- Keen EC, Hudspeth AJ 2006. Transfer characteristics of the hair cell's afferent synapse. *Proc Nat Acad Sci USA* 103: 5537-5542.
- Kennedy MB 1997. The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci* 20: 264-268.
- Keri C, Ahnelt P 1991. A low cost computer aided design (CAD) system for 3D-reconstruction from serial sections. *J Neurosci Meth* 37: 241-250.
- Khaledpour C, Vollrath L 1987. Evidence for the presence of two 24-h rhythms 180° out of phase in the pineal gland of male Pirbright-white guinea-pigs as monitored by counting "synaptic" ribbons and spheres. *Exp Brain Res* 66: 185-190.
- Khimich D, Nouvian R, Pujol R, tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger ED, Moser T 2005. Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434: 889-894.
- Kidd M 1961. Electron microscopy of the inner plexiform layer of the retina. In: *The cytology of nervous tissue*, Taylor & Francis, London: 88-91.
- Kidd M 1962. Electron microscopy of the inner plexiform layer of the retina in the cat and the pigeon. *J Anat* 96: 179-188.
- King TS, Dougherty WJ 1980. Neonatal development of circadian rhythm in synaptic ribbon numbers in the rat pinealocyte. *Am J Anat* 157: 335-343.
- King TS, Dougherty WJ 1982a Age-related changes in the pineal "synaptic" ribbon populations in rats exposed to continuous light or darkness. *Am J Anat* 163: 169-179
- King TS, Dougherty WJ 1982b Effect of denervation on 'synaptic' ribbon populations in the rat pineal gland. *J Neurocytol* 11: 19-28
- Klug K, Herr S, Ngo IT, Sterling P, Schein SJ 2003. Macaque retina contains an S-cone OFF midget pathway. *J Neurosci* 23: 9881-9887.
- Kolb H 1970. Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. *Phil Transact Royal Soc London B* 258: 261-283.
- Kolb H 1974. The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the cat. *J Neurocytol* 6: 155-170.
- Kolb H 1977. The organization of the outer plexiform layer in the retina of the cat: electron microscopic observations. *J Neurocytol* 6: 131-153.
- Kolb H 1994. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. The proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2385-2404.
- Kolb H, West RW 1977. Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J Neurocytol* 6: 155-170.
- Kolb H, Jones J 1982. Light and electron microscopy of the photoreceptors in the retina of the red-eared slider, *Pseudemys scripta elegans*. *J Comp Neurol* 209: 331-338.
- Kolb H, Dekorver L 1991. Midget ganglion cells of the parafovea of the human retina: a study by electron microscopy and serial section reconstructions. *J Comp Neurol* 303: 617-636.
- Kolb H, Boycott BB, Dowling JE 1969. A second type of midgetbipolar cell in the primate retina. *Philosoph Transact Royal Soc London B* 255: 177-184.
- Kolb H, Mariani A, Gallego A 1980. A second type of horizontal cell in the monkey retina. *J Comp Neurol* 189: 31-44.
- Kolb H, Nelson R, Mariani A 1981. Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vis Res* 21: 1081-1114.
- Kolb H, Goede P, Roberts R, McDermott R, Gouras P 1997. The uniqueness of the S-cone pedicle in the human retina and consequences for color processing. *J Comp Neurol* 386: 443-460.

- Kolios G 2006. Dreidimensionale Rekonstruktion von synaptischen Körperchen im ersten und zweiten Neuron der Sehbahn. Inauguraldissertation, Fachbereich Humanmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz: 88 pp.
- Korf H-W 1976. Histological, Histochemical and electron microscopical studies on the nervous apparatus of the pineal organ in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Cell Tiss Res* 174: 475-497.
- Korf H-W 1994. The pineal organ as a component of the biological clock. *Ann NY Acad Sci* 719: 13-42.
- Korf H-W 2000. Evolution of melatonin-producing pinealocytes. *Adv Exp Med Biol* 3: 17-29.
- Korf H-W, Møller M 1984. The innervation of the mammalian pineal gland with special reference to central pinealopetal projections. *Pineal Res Rev* 2: 41-86.
- Korf H-W, Stehle JH 2002. The circadian system: circuits-cells-clock genes. *Cell Tiss Res* 309: 1-2.
- Korf H-W, Wicht H 1991. Das Pinealorgan der Wirbeltiere: ein Modell für Untersuchungen von Rezeptor- und Effektormechanismen in neuronalen Systemen. *Natwiss* 78: 437-444.
- Korf H-W, Wicht H 1992. Receptor and effector mechanism in the pineal organ. *Progr Brain Res* 91: 285-297.
- Korf H-W, Schomerus C, Maronde E, Stehle JH 1996. Signal transduction molecules in the rat pineal organ: Ca^{2+} , pCREB, and ICER. *Natwiss* 83: 535-543.
- Kosaras B, Welker HA, Vollrath L 1983. Pineal "synaptic" ribbons and spherules during the estrous cycle in rats. *Anat Embryol* 166: 219-227.
- Koulen P, Blank M, Kröger S 1998. Differential distribution of beta-dystroglycan in rabbit and rat retina. *J Neurosci Res* 51: 735-747.
- Koulen P, Kuhn R, Wässle H, Brandstätter JH 1999. Modulation of the intracellular calcium concentration in photoreceptor terminals by a presynaptic metabotropic glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9909-9914.
- Kouyama N, Marshak DW 1992. Bipolar cells specific for blue cones in the Macaque Retina. *J Neurosci* 12: 1233-1252.
- Kurumado K, Mori W 1977. A morphological study of the circadian cycle of the pineal gland of the rat. *Cell Tiss Res* 182: 565-568.
- Kurumado K, Mori W 1980. Pineal synaptic ribbons in blinded rats. *Cell Tiss Res* 208: 229-235.
- Kuwabara T, Funahashi M 1976. Light effect on the synaptic organ of the rat. *Invest Ophthalmol* 15: 407-411.
- Kus I, Sarsilmaz M, Ozen OA, Turkoglu AO, Pekmez H, Songur A, Kelestimur H 2004. Light and electron microscopic examination of pineal gland in rats exposed to constant light and constant darkness. *Neuroendocrinol Lett* 25: 102-108.
- Ladman AJ 1958. The fine structure of the rod-bipolar cell synapse in the retina of the albino rat. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 459-465.
- Lagnado L 2005. Ribbon synapses: anchors away for a fishy tale. *Curr Biol* 15: 102-105.
- Lagnado L, Gomis A, Job C 1996. Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. *Neuron* 17: 957-967.
- Larisch R 1989. Über den Einfluß von Dauerbelichtung auf die synaptischen Strukturen in der Meerschweinchenzirbeldrüse. Inauguraldissertation, Fachbereich Medizin, J Gutenberg-Universität, Mainz: 70 pp.
- Lasansky A 1971. Synaptic organization of cone cells in the turtle retina. *Phil Transact Royal Soc London B* 262: 365-381.
- Lasansky A 1972. Cell junctions at the outer synaptic layer of the retina. *Invest Ophthalmol* 11: 265-275.
- Lasarzik I 2001. Ultrastrukturelle Veränderungen in retinalen Ribbon-Synapsen der Albinomaus unter Lichteinfluss. Inauguraldissertation, Fachbereich Medizin, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Lanzavecchia G 1960. Ultrastruttura dei coni e dei bastoncelli nella retina di *Xenopus laevis*. *Arch Ital Anat Embriol* 65: 417-435.
- LaVail MM 1976. Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light. *Invest Ophthalmol* 15: 64-70.
- Lenzi D, von Gersdorff H 2001. Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines. *BioEssays* 23: 831-840.
- Lenzi D, Runyeon JW, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM 1999. Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J Neurosci* 19: 119-132.

- Lenzi D, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM 2002. Depolarization redistributes synaptic membrane and creates a gradient of vesicles on the synaptic body at a ribbon synapse. *Neuron* 36: 649-659.
- Lewis GP, Linberg KA, Fisher SK 1998. Neurite outgrowth from bipolar and horizontal cells after experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 424-434.
- Li ZY, Kljavin IJ, Milam AH 1995. Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. *J Neurosci* 15: 5429-5438.
- Lieberman MC, Dodds LW, Pierce S 1990. Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy [erratum in *J Comp Neurol* (1991) 304:341]. *J Comp Neurol* 301:443-460.
- Linberg KA, Fisher SK 1988. Ultrastructural evidence that horizontal cell axon terminals are pre-synaptic in the human retina. *J Comp Neurol* 268: 281-294.
- LoGiudice L, Matthews G 2007. Endocytosis at ribbon synapses. *Traffic* 8: 1123-1128.
- Lubczyk VH 2001. Über den Einfluß von Licht und Dunkelheit auf die Synaptic Ribbons der Retina von Sprague Dawley-Ratten. Inauguraldissertation, Fachbereich Medizin, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Lues G 1971. Die Feinstruktur der Zirbeldrüse normaler, trächtiger und experimentell beeinflusster Meerschweinchen. *Z Zellforsch* 114: 38-60.
- Luo ZR, Schultz RL, Whitter EF, Vollrath L 1990. Prenatal development of "synaptic ribbons" in the guinea pig pineal gland. *Am J Anat* 187: 39-54.
- Lysakowski A, Goldberg JM 1997. A regional ultrastructural analysis of the cellular and synaptic architecture in the chinchilla cristae ampullares. *J Comp Neurol* 389: 419-443.
- Machado DR, Wragg LE, Machado AB 1968. A histochemical study of sympathetic innervation and 5-hydroxytryptamine in the developing pineal body of the rat. *Brain Res* 8: 310-318.
- Maitra SK, Huesgen A, Vollrath L 1986. The effects of short pulses of light on numbers of pineal "synaptic" ribbons and serotonin N-acetyltransferase activity in male Sprague-Dawley rats. *Cell Tiss Res* 246: 133-136.
- Marc RE, Sperling HG 1977. Chromatic organization of primate cones. *Science* 196: 454-456.
- Mariani AP 1981. A diffuse, invaginating cone bipolar cell in primate retina. *J Comp Neurol* 197: 661-671.
- Mariani AP 1982. Biplexiform cells: ganglion cells of the primate retina that contact photoreceptors. *Science* 216: 1134-1136.
- Mariani AP 1983a. The neural organization of the outer plexiform layer of the primate retina. *Internat Rev Cytol* 86: 285-320.
- Mariani AP 1983b. Bipolar cells in monkey retina selective for the cones likely to be blue-sensitive. *Nature* 308: 184-186.
- Mariani AP 1984. The neuronal organization of the outer plexiform layer of the primate retina. *Internat Rev Cytol* 86: 285-320.
- Maronde E, Stehle JH 2007. The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends Endocrinol Metab* 18: 142-149.
- Martínez-Soriano F, Welker HA, Vollrath L 1984. Correlation of the number of pineal "synaptic" ribbons and spherules with the level of serum melatonin over a 24-hour period in male rabbits. *Cell Tiss Res* 236: 555-560.
- Martínez-Soriano F, Hernandez Gil de Tejada T, Cimas Garcia C, Armañanzas E 1992. Pineal "synaptic" ribbons evolution over a 24 hour period during two different photoluminous seasons, a comparative and statistical analysis. *J Hirnforsch* 33: 271-275.
- Martínez-Soriano F, Jordan-Lluch M, Hernandez Gil de Tejada T, Ruiz-Torner A 1996. A photophase and seasonal study of the pineal parenchyma and melatonin serum levels in the albino rat subjected to immobilization stress. *Arch Ital Biol* 134: 235-248.
- Martínez-Soriano F, Ruiz-Torner A, Armañanzas E, Valverde-Navarro AA 2002. Influence of light/dark, seasonal and lunar cycles on serum melatonin levels and synaptic bodies number of the pineal gland of the rat. *Histol Histopathol* 17: 213-222.
- Masland RH 2001. The fundamental plan of the retina. *Nature Neurosci* 4: 877-886.
- Massey SC 1990. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. In: Osborne NN, Chader G (Ed.). *Progress in retinal research*, Vol 9. Pergamon Press, London: 399-425.
- Massey SC, Maguire G 1995. The role of glutamate in retina circuitry. In: Wheal H, Thomson A (Ed.). *Excitatory Amino Acids and synaptic transmission*. 2nd ed. Academic Press New York: 201-221.

- Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP 1996. Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci* 16: 4457-4467.
- Matsusaka T 1967. Lamellar bodies in the synaptic cytoplasm of the accessory cone from the chick retina as revealed by electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 18: 55-70.
- Matsushima S, Morisawa Y, Aida I, Abe K 1983. Circadian variations in pinealocytes of the Chinese hamster, *Cricetulus griseus*. *Cell Tiss Res* 228: 231-244.
- Matthews G 1996. Synaptic exocytosis and endocytosis: capacitance measurements. *Curr Opin Neurobiol* 6: 358-364.
- McArdle CB, Dowling JE, Masland RH 1977. Development of outer segments and synapses in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 175: 253-274.
- McCartney MD, Dickson DH 1977. Diurnal morphometric and 3-D reconstruction analysis of guinea pig photoreceptor synaptic ribbons. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 25 (Suppl.): 63.
- McCartney MD, Dickson DH 1985. Photoreceptor synaptic ribbons: three dimensional shape, orientation and diurnal (non)variation. *Exp Eye Res* 41: 313-321.
- McGuire BA, Stevens JK, Sterling P 1984. Microcircuitry of bipolar cells in the cat retina. *J Neurosci* 4: 2920-2938.
- McLaughlin BJ, Boykins L 1977. Ultrastructure of E-PTA stained synaptic ribbons in the chick retina. *J Neurobiol* 8:91-96.
- McNeill ME, Whitehead DS 1979. The synaptic ribbons of the guinea-pig pineal gland in sterile, pregnant and fertile but non-pregnant females and in reproductively active males. *J Neural Transm* 45: 149-164.
- McNulty JA 1980. Ultrastructural observations on synaptic ribbons in the pineal organ of the goldfish. *Cell Tiss Res* 210: 249-256.
- McNulty JA, Fox LM 1992. Pinealocyte synaptic ribbons and neuroendocrine function. *Microsc Res Tech* 21: 175-187
- McNulty JA, Fox L, Taylor D, Miller M, Takaoka Y 1986. Synaptic ribbon populations in the pineal gland of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Cell Tiss Res* 243: 353-357
- McNulty JA, Prechel MM, Van de Kar LD, Fox LM 1989. Effects of isoproterenol on synaptic ribbons in pinealocytes of the rat and C57BL/6J mouse. *J Pin Res* 7: 305-311.
- Merchan-Perez A, Liberman MC 1996. Ultrastructural differences among efferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate. *J Comp Neurol* 371: 208-221.
- Midorikawa M, Tsukamoto Y, Berglund K, Ishii M, Tachibana M 2007. Different roles of ribbon-associated and ribbon-free active zones in retinal bipolar cells. *Nature Neurosci* 10: 1268-1276.
- Migdale K, Herr S, Klug K, Ahmad K, Linberg K, Sterling P, Schein SJ 2003. Two ribbon synaptic units in rod photoreceptors of macaque, human, and cat. *J Comp Neurol* 455: 100-112.
- Miller RF, Fagerson MH, Staff NP, Wolfe R, Doerr T, Gottesman J, Sikora MA, Schuneman R 2001. Structure and functional connections of presynaptic terminals in the vertebrate retina revealed by activity-dependent dyes and confocal microscopy. *J Comp Neurol* 437: 129-155.
- Missotten L 1960a. Étude des synapses de la rétine humaine au microscope électronique. *Proc Eur Reg Conf on Electron microsc*, Delft 2: 818-821.
- Missotten L 1960b. Étude des bâtonnets de la rétine humaine au microscope électronique. *Ophthalmologica* 140: 200-214.
- Missotten L 1963. L'ultrastructure des cones de la rétine humaine. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 132: 472-502.
- Missotten L 1964. L'ultrastructure des tissus oculaires. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 136: 1-200.
- Missotten L 1965a. The ultrastructure of the human retina. Brüssel, Arscia Uitgraven Verlag.
- Missotten L 1965b. The synapses in the human retina. In: The structure of the eye, II. Symposium, Rohen JW (Ed.). Schattauer-Verlag, Stuttgart: 17-28.
- Missotten L, Appelmans M, Michiels J 1963. L'ultrastructure des synapses des cellules visuelles de la rétine humaine. *Bull Mem Soc Franc Ophthalmol* 76: 59-82.
- Montanaro F, Carbonetto S, Campbell KP, Lindenbaum M 1995. Dystroglycan expression in the wild type and mdx mouse neural retina: synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. *J Neurosci Res* 42: 528-538.
- Morgans CW 2000a. Presynaptic proteins of ribbon synapses in the retina. *Microsc Res Tech* 50: 141-150.

- Morgans CW 2000b. Neurotransmitter release at ribbon synapses in the retina. *Immunol Cell Biol* 78: 442-446.
- Morgans CW 2001. Localization of the alpha(1F) calcium channel subunit in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2414-2418.
- Morgans CW, Bayley PR, Oesch NW, Ren G, Akileswaran L, Taylor WR 2005. Photoreceptor calcium channels: insight from night blindness. *Vis Neurosci* 22: 561-568.
- Moser T, Brandt A, Lysakowski A 2006. Hair cell ribbon synapses. *Cell Tiss Res* 326: 347-359.
- Mountford SH 1963. Effects of light and dark adaptation on the vesicle populations of receptor-bipolar synapses. *J Ultrastruct Res* 9: 403-418.
- Morigawa K, Vardi N 1999. Differential expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the outer retina. *J Comp Neurol* 405: 173-184.
- Mullinger AM 1969. The organization of ampullary sense organs in the electric fish, *Gymnarchus niloticus*. *Tissue Cell* 1: 31-52.
- Muresan V, Lyass A, Schnapp BJ 1999. The Kinesin Motor KIF3A is a component of the pre-synaptic ribbon in vertebrate photoreceptors. *J Neurosci* 19: 1027-1037.
- Nelson R 1977. Cat cones have rod input: a comparison of the response properties of cones and horizontal cell bodies in the retina of the cat. *J Comp Neurol* 172: 109-135.
- Nelson R, Kolb H 1983. Synaptic patterns and response properties of bipolar and ganglion cells in the cat retina. *Vis Res* 23: 1183-1195.
- Nguyen T-H, Balkema GW 1999. Antigenic epitopes of the photoreceptor synaptic ribbon. *J Comp Neurol* 413: 209-218.
- Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Minzuno N, Nakanishi S 1994. Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate-receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77: 361-369.
- Nouvian R, Beutner, D, Parsons TD, Moser T 2006. Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membrane Biol* 209: 153-165.
- Nowicki N, Lewczuk B, Przybylska-Goronowicz B 2002. Influence of 4-day long treatment with vasoactive intestinal peptide on ultrastructure and function of the rat pinealocytes in organ culture. *Folia Histochem Cytobiol* 40: 9-16.
- Ogden TE, Mascetti GG, Pierantoni R 1985. The outer horizontal cell of the frog retina: morphology, receptor input, and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 643-656.
- Oikawa T, Ogawa T, Motokawa K 1959. Origin of so-called cone action potential. *J Neurophysiol* 22: 102-111.
- Oksche A 1965. Survey of the development and comparative morphology of the pineal organ. *Progr Brain Res* 10: 3-29.
- Okuda K 1962. Electron microscopic observations of the retinal pigment epithelium of vertebrate animals. *Jap J Ophthalmol* 6: 76-87.
- Olney JW 1968. An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina. *Invest Ophthalmol* 7: 250-268.
- Osborne MP, Thornhill RA 1972. The effect of monoamine depleting drugs upon the synaptic bars in the inner ear of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Z Zellforsch* 127: 347-355.
- Pan F, Massey SC 2007. Rod and cone input to horizontal cells in the rabbit retina. *J Comp Neurol* 500: 815-831.
- Parsons TD, Sterling P 2003. Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt? *Neuron* 37: 379-382.
- Pedler CMH, Tilly R 1965. The serial reconstruction of a complex receptor synapse. In: The structure of the eye, II. Symposium, Rohen JW (Ed.). Schattauer-Verlag, Stuttgart: 29-54.
- Peichl L 1992. Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina der Säugetiere. *Biol unserer Zeit* 22: 45-53.
- Peichl L, Gonzalez-Soriano J 1994. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci* 11: 501-517.
- Peichl L, Sandmann D, Boycott BB 1998. Comparative anatomy and function of mammalian horizontal cells. In: Chalupa LM, Finlay BL (Ed.). Development and organization of the retina. Plenum press, New York: 147-172.
- Peng Y-W, Hao Y, Petters RM, Wong K 2000. Ectopic synaptogenesis in the mammalian retina caused by rod photoreceptor-specific mutations. *Nature Neurosci* 3: 1121-1127.
- Perkins GA, Ellisman MH, Fox DA 2003. Three-dimensional analysis of mouse rod and cone mitochondrial cristae architecture: bioenergetic and functional implications. *Mol Vis* 9: 60-73.

- Perkins GA, Ellisman MH, Fox DA 2004. The structure function correlates of mammalian rod and cone photoreceptor mitochondria: observations and unanswered questions. *Mitochondrion* 4: 695-703.
- Peschke E, Spessert R, Spiwoks-Becker I, Dorner P, Vollrath L 1996. Morphometry of pineal synaptic ribbon profile numbers after cytochalasin D treatment. *Acta Anat.* 156: 94-98.
- Pévet P 1977. On the presence of different populations of pinealocytes in the mammalian pineal gland. *J Neural Transm* 40: 289-304.
- Pévet P, Aqez L, Bothorel B, Saboureau M, Gauer F, Laurent V, Masson-Pévet M 2006. Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol Int* 23: 39-51.
- Pillers DAH, Fitzgerald KM, Duncan NM, Rash SM, White RA, Dwinnell SJ, Powell BR, Schnur RE, Ray PN, Cibis GW, Weleber RG 1999. Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Human Genetics* 105: 2-9.
- Pierantoni RL, McCann GD 1984. A quantitative study on synaptic ribbons in the photoreceptors of turtle and frog. In: Borsellino A, Cervetto L (Ed.). *Photoreceptors*. Plenum press New York, London: 255-283.
- Polyak SL 1941. *The retina*. Chicago, Ill. Univ. Chicago Press.
- Pow DV, Barnett NL 1999. Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Müller cell glutamate transporter GLAST. *Cell Tiss Res* 297: 57-66.
- Pow DV, Barnett NL 2000. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci Lett* 280: 21-24.
- Pow DV, Barnett NL, Penfold P 2000. Are neuronal transporters relevant in retinal glutamate homeostasis? *Neurochem Internat* 37: 191-198.
- Prescott ED, Zenisek D 2005. Recent progress towards understanding the synaptic ribbon. *Curr Opin Neurobiol* 15: 1-6.
- Quesada A, Prada FA, Genis-Galvez JM 1988. Bipolar cells in the chicken retina. *J Morphology* 197: 337-351.
- Qin P, Pourcho RG 1999. Localization of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the cat retina: a light- and electron-microscopic study. *Vis Neurosci* 16: 169-177.
- Rao R, Buchsbaum G, Sterling P 1994. Rate of quantal transmitter release at the mammalian rod synapse. *Biophys J* 67:57-63.
- Rao-Mirotnik R, Buchsbaum G, Sterling P 1998. Transmitter concentration at a three-dimensional synapse. *J Neurophysiol* 80: 3163-3172.
- Rao-Mirotnik R, Harkins AB, Buchsbaum G, Sterling P 1995. Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14: 561-569.
- Rapaport DH 1989. Quantitative aspects of synaptic ribbon formation in the outer plexiform layer of developing cat retina. *Vis Neurosci* 3: 21-32.
- Rauen T 2000. Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* 19: 53-62.
- Rauen T, Kanner BI 1994. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett* 169: 137-140.
- Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M 1998. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tiss Res* 291: 19-31.
- Raviola E 1976. Intercellular junctions in the outer plexiform layer of the retina. *Invest Ophthalmol* 15: 881-895.
- Raviola E, Gilula NB 1973. Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina. *Proc Nat Acad Sci USA* 70: 1677-1681.
- Raviola E, Gilula NB 1975. Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *J Cell Biol* 65: 192-222.
- Raviola E, Raviola G 1982. Structure of the synaptic membranes in the inner plexiform layer of the retina: a freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *J Comp Neurol* 209: 233-248.
- Raynauld J-P, Laviolte JR, Wagner HJ 1979. Goldfish retina: a correlate between cone activity and morphology of the horizontal cell cone pedicles. *Science* 204: 1436-1438.
- Rea R, Li J, Dharia A, Levitan ES, Sterling P, Kramer RH 2004. Streamlined synaptic vesicle cycle in cone photoreceptor terminals. *Neuron* 41: 755-766.

- Redecker P, Veh RW 1994. Glutamate immunoreactivity is enriched over pinealocytes of the gerbil pineal gland. *Cell Tiss Res* 278: 579-588.
- Reiter RJ 1977. *The pineal*. Eden Press, Montreal.
- Reiter RJ 1980. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrinol Rev* 1: 109-131.
- Reiter RJ 1981. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat* 162: 287-313.
- Reiter RJ 1991. Pineal gland. Interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrinol Metabol* 2:13-19.
- Reiter RL 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664.
- Remé CE, Young RW 1977. The effects of hibernation on cone visual cells in the ground squirrel. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 815-840.
- Relkin R 1976. *The pineal*. Eden Press, Montreal.
- Reuss S 1987. Electrical activity of the mammalian pineal gland. *Pineal Res Rev* 5: 153-189.
- Reuss S 1993. Das Werk der inneren Uhr. *Naturwissenschaften* 80: 501-510.
- Reuss S 1996. Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tiss Res* 285: 353-378.
- Reuss S 2003. The clock in the brain: Anatomy of the mammalian circadian timing system. In: Peschke E (Ed.). *Endokrinologie. Vorträge im Rahmen des Projekts "Zeitstrukturen endokriner Systeme"*, *Abhandl Sächs Akad Wiss* 60: 9-48.
- Reynolds ES 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212
- Riemann R 1990. Morphologische und biochemische Aspekte der Zirbeldrüse Vasopressindefizienter Brattleboro-Ratten. Inauguraldissertation, Fachbereich Medizin, J. Gutenberg-Universität Mainz.
- Riemann R, Reuss S, Stehle J, Khaledpour C, Vollrath L 1990. Circadian variations of "synaptic" bodies in the pineal glands of Brattleboro rats. *Cell Tiss Res* 262: 519-522.
- Roberts WM, Jacobs RA, Hudspeth AJ 1990. Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic zones of hair cells. *J Neurosci* 10: 3664-3684.
- Robertson GN, Dickson H 1987. Day-night differences in the number and structure of synaptic ribbons in chick pineal. *J Pineal Res* 4:135-145.
- Rodieck RW 1973. *The vertebrate retina: Principles of structure and function*. Freeman WH & Co. press, San Francisco.
- Rodieck RW 1988. The primate retina. *Comp Primate Biol* 4: 203-278.
- Romijn HJ 1975. The ultrastructure of the rabbit pineal gland after sympathectomy, parasympathectomy, continuous illumination and continuous darkness. *J Neural Transm* 36: 183-194.
- Roorda A, Williams DR 1999. The arrangement of the three cone classes in the living human eye. *Nature* 397: 520-522.
- Ross MD 2000. Changes in ribbon synapses and rough endoplasmic reticulum of rat utricular macular hair cells in weightlessness. *Acta otolaryngol* 120: 490-499.
- Ruel J, Wang J, Rebillard G, Eybalin M, Lloyd R, Pujol R, Puel J-L 2007. Physiology, pharmacology and plasticity at the inner hair cell synaptic complex. *Hearing Res* 227: 19-27.
- Roux I, Safieddine S, Nouvain R, Grati M, Simmler M-C, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C 2006. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 127: 277-289.
- Saidapur SK, Seidel A, Vollrath L 1990. Nocturnal pineal synaptic ribbon numbers in Sprague-Dawley rats: no differences at different stages of the oestrous cycle or between males and females. *Med Sci Res* 18: 853-854.
- Sakai Y, Aida I, Matsushima 1896. Effect of continuous darkness on circadian morphological rhythms in pinealocytes of the chinese hamster, *Cricetulus griseus*. *Cell Tiss Res* 245: 127-134.
- Sandmann D, Boycott BB, Peichl L 1996. Blue-cone horizontal cells in the retinae of horses and other *equidae*. *J Neurosci* 16: 3381-3396.
- Sanyal S, Hawkins RK, Jansen HG, Zeilmaker GH 1992. Compensatory synaptic growth in the rod terminals as a sequel to partial photoreceptor cell loss in the retina of chimaeric mice. *Developm* 114: 797-803.

- Sassoé-Pognetto M, Wässle H, Grünert U 1994. Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: cone bipolar cells express the $\alpha 1$ subunit of the glycine receptor. *J Neurosci* 14: 5131-5146.
- Sato A, Kawakami I 1976. The fine structure of the lateral-line organ of larvae of the newt, *Triturus pyrrhogaster*. *Annot Zool Japonenses* 49: 131-141.
- Satoh Y, Vollrath L 1988. Lack of "synaptic ribbons" in the pineal gland of BALB/c mice. *J Pin Res* 5: 13-17.
- Schaaf U 1996. Lichtabhängige Veränderungen der Synaptic Ribbons in den Stäbchensynapsen von BALB/c-Mäusen. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Schacher S, Holtzman E, Hood DC 1976. Synaptic activity of frog retinal photoreceptors. A peroxidase uptake study. *J Cell Biol* 70: 178-192.
- Schaeffer SF, Raviola E 1978. Membrane recycling in the cone cell endings of the turtle retina. *J Cell Biol* 79: 802-825.
- Schein SJ, Sterling P, Ngo IT, Huang TM, Herr S 2004. Evidence that each S cone in macaque fovea drives one narrow-field and several wide field blue-yellow ganglion cells. *J Neurosci* 24: 8366-8378.
- Schenda J, Vollrath L 1998. Demonstration of action-potential-producing cells in the rat pineal gland in vitro and their regulation by norepinephrine and nitric oxide. *J Comp Physiol* 183: 573-81.
- Schenda J, Vollrath L 2000. Single-cell recordings from chick pineal glands in vitro reveal ultradian and circadian oscillations. *Cell Mol Life Sci* 57: 1785-1792.
- Scherry DM, Wang MM, Frishman LJ 2003. Differential distribution of vesicle associated membrane protein isoforms in the mouse retina. *Mol Vis* 9: 673-688.
- Schmitz F, Drenckhahn D 1991. Influence of Ca^{2+} on synaptic morphology of fish cone photoreceptors. *Brain Res* 546: 341-344.
- Schmitz F, Drenckhahn D 1993. Intermediate stages in the disassembly of synaptic ribbons in cone photo-receptors of the crucian carp, *Carassius carassius*. *Cell Tiss Res* 272: 487-490.
- Schmitz F, Drenckhahn D 1997. Localization of dystrophin and beta-dystroglycan in bovine retinal photoreceptor processes extending into the postsynaptic dendritic complex. *Histochem Cell Biol* 108: 249-255.
- Schmitz F, Kirsch M, Wagner H-J 1989. Calcium modulated synaptic ribbon dynamics in cone photoreceptors: a pharmacological and electron spectroscopic study. *Eur J Cell Biol* 49: 207-212.
- Schmitz F, Königstorfer A, Südhof TC 2000. RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28: 857-872.
- Schneeweis DM, Schnapf JL 1995. Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *Science* 268: 1053-1056.
- Schneeweis DM, Schnapf JL 1999. The photovoltage of macaque cone photoreceptors: adaptation noise and kinetics. *J Neurosci* 19: 1203-1216.
- Schneider T, Semm P, Vollrath L 1981. Ultrastructural observations on the central innervation of the guinea-pig pineal gland. *Cell Tiss Res* 220: 41-49.
- Schultze M 1866. Zur Anatomie und Physiologie der Retina. *Arch Mikrosk Anat Entwicklunsmech* 2: 175-286.
- Siegel JH 1990. Serial reconstruction of inner hair cell afferent innervation using semithick sections. *J Electron Microscop Tech* 15: 197-208.
- Simonneaux V, Ribelayga C 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55: 325-395.
- Singer JH, Diamond JS 2006. Vesicle depletion and synaptic depression at a mammalian ribbon synapse. *J Neurophysiol* 95: 3191-3198.
- Singer JH 2007. Multivesicular release and saturation of glutamatergic signalling at retinal ribbon synapses. *J Physiol* 580: 23-29.
- Singer JH, Lassová L, Vardi N, Diamond JS 2004. Coordinated multivesicular release at a mammalian ribbon synapse. *Nature Neurosci* 7: 826-833.
- Sjöstrand FS 1953a. The ultrastructure of the retinal rod synapses of the guinea pig eye. *J Applied Physics* 24: 1422.

- Sjöstrand FS 1953b. The ultrastructure of the inner segments of the retinal rods of the guinea pig eye as revealed by electron microscopy. *J Cell Comp Physiol* 42: 45-70.
- Sjöstrand FS 1956. Synaptic structures of the retina of the mammalian eye. *Proceed 3rd Internat Conf Electron Microsc London 1954. Proc Roy Micr Soc* : 428-431.
- Sjöstrand FS 1958. Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea-pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *J Ultrastruct Res* 2: 122-170.
- Sjöstrand FS 1961. Topographic relationship between neurons synapses and glial cells. In: Jung R, Kornhuber H (Ed.). *Neurophysiologie und Psychophysik des visuellen Systems. Symposium Freiburg*. Springer Berlin Göttingen Heidelberg: 13-23.
- Sjöstrand FS 1970. The outer plexiform layer and the neural organization of the retina. In: Straatsma BR, Allen RA, Hall MO, Crescitelli F (Ed.). *The retina: morphology, function and clinical characteristics*. Univ California Press, Los Angeles: 63-100.
- Sjöstrand FS 1974. A search for the circuitry of directional selectivity and neural adaptation through three-dimensional analysis of the outer plexiform layer of the rabbit retina. *J Ultrastruct Res* 49: 60-156.
- Sjöstrand FS 1976. The outer plexiform layer of the rabbit retina, an important data processing center. *Vision Res* 16: 1-14.
- Sjöstrand FS 1989a. An elementary information processing component in the circuitry of the retina generating the ON-responses. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 102: 24-38.
- Sjöstrand FS 1989b. A mechanism for spatial brightness contrast enhancement and a basis for the duplicity of vision. *J Ultrastruct Mol Struct Res* 102: 39-46.
- Sjöstrand FS 1998a. Structure determines function of the retina, a neural center. 1. The synaptic ribbon complex. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30: 1-29.
- Sjöstrand FS 1998b. Structure determines function of the retina, a neural center. 2. The second, third and forth circuits. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30: 193-206.
- Sjöstrand FS 1998c. Structure determines function of the retina, a neural center. 3. Contrast enhancement, directional selectivity, some incomplete circuits. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30: 329-340.
- Sjöstrand FS 1998d. Structure determines function of the retina, a neural center. 4. The 'duplex' nature of vision. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30: 463-474.
- Sjöstrand FS 2001a. Sequential pictorial presentation of neural interaction in the retina. 1. The synaptic ribbon complex. *J Submicrosc Cytol Pathol* 33: 313-321.
- Sjöstrand FS 2001b. Sequential pictorial presentation of neural interaction in the retina. 2. The depolarizing and hyperpolarizing bipolar cells at rod terminals. *J Submicrosc Cytol Pathol* 34: 85-98.
- Sjöstrand FS 2003a. Color vision at low light intensity, dark adaptation, Purkinje shift, critical flicker frequency and the deterioration of vision at low illumination. *Neurophysiology at the nanometer range of neural structure*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35: 117-127.
- Sjöstrand FS 2003b. Kuffler's inhibitory surround, the function of the inner plexiform layer and an information processing unit in the retina. *Neural interaction at the nanometer level*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35: 359-371.
- Sjöstrand FS 2004. Movement perception, directionally selective ganglion cell responses and the involuntary eye movements. *Neurophysiology at the level of information processing*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 35: 359-371.
- Smallwood PM, Ölveczky BP, Williams GL, Jacobs GH, Reese BE, Meister M, Nathans J 2003. Genetically engineered mice with an additional class of cone photoreceptors: Implications for the evolution of color vision. *Proc Nat Acad Sci USA* 100: 11706-11711.
- Smelser GK, Ozanics V, Rayborn M, Sagun D 1974. Retinal synaptogenesis in the primate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 13: 340-361.
- Smith CA, Sjöstrand FS 1961. A synaptic structure in the hair cells of the guinea-pig cochlea. *J Ultrastruct Res* 5: 184-192.
- Smith RG, Freed MA, Sterling P 1986. Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the rod-cone network. *J Neurosci* 6: 3505-3517.
- Sobkowicz HM, Rose JE, Scott GE, Slapnick SN 1982. Ribbon synapses in the developing intact and cultured organ of Corti in the mouse. *J Neurosci* 7: 942-957.
- Sobkowicz HM, Rose JE, Scott GE, Levenick CV 1986. Distribution of synaptic ribbons in the developing organ of Corti. *J Neurocytol* 15: 693-714.

- Spadaro A, de Simone I, Puzzolo 1978. Ultrastructural data and chronobiological patterns of the synaptic ribbons in the outer plexiform layer in the retina of albino rats. *Acta Anat* 102: 365-373.
- Spence HJ, Dhillon AS, James M, Winder SJ 2004. Dystroglycan, a scaffold for the ERK-MAP kinase cascade. *EMBO Reports* 5: 484-489.
- Spira AW 1975. In utero development and maturation of the retina of a non-primate mammal: a light and electron microscopic study of the guinea-pig. *Anat Embryol* 146: 279-300.
- Spira AW, Hollenberg MJ 1973. Human retinal development: Ultrastructure of the inner retinal layers. *Develop Biol* 31: 1-21.
- Spiwoks-Becker I 1995. Untersuchungen zur Plastizität retinaler und pinealer Synaptic Ribbons. Dissertation, Fachbereich Biologie, J. Gutenberg-Universität Mainz: 184pp.
- Spiwoks-Becker I, Glas M, Lasarzik I, Vollrath L 2004. Mouse photoreceptor synaptic ribbons loose and regain material in response to illumination change. *Eur J Neurosci* 19: 1559-1571.
- Spiwoks-Becker I, Jastrow H, Vollrath L 2007. Exposure to constant darkness results in the formation of ectopic synaptic ribbons in bipolar cell dendrites near rod cell spherules: hints for a retrograde information channel in the retina? European retina meeting 04.-06.10.2007, Frankfurt/Main. [POSTER]
- Stehle JH, von Gall C, Korf H-W 2002. Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tiss Res* 309: 173-182.
- Stell WK 1965. Correlation of retinal cytoarchitecture and ultrastructure in Golgi preparations. *Anat Rec* 153: 389-397.
- Sterio DC 1984. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134: 127-136.
- Sterling P 1990. Retina. In: Shepherd GM (Ed.). *The synaptic organization of the brain*. Oxford Univ Press New York: 170-213.
- Sterling P, Matthews G 2005. Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci* 28: 20-29.
- Sterling P, Cohen E, Freed MA, Smith RG 1987. Microcircuitry of the ON-beta ganglion cell in daylight, twilight, and starlight. *Neurosci Res* 6: 269-285.
- Stevens JK, Jacobs R, Jackson ML 1984. Rings of cross-striated fibrils within the cat cone pedicle: a computer assisted serial EM analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25: 201-208.
- Szabo T, Wersäll J 1970. Ultrastructure of an electroreceptor (mormyromast) in a mormyrid fish, *Gnathonemus petersii* II. *J Ultrastruct Res* 30: 473-90.
- Szamier RB, Wachtel AW 1970. Special cutaneous receptor organs of fish. VI. ampullary and tuberous organs of *Hypopomus*. *J Ultrastruct Res* 30: 450-471.
- Szamier RB, Berson EL 1977. Retinal ultrastructure in advanced retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16: 947-962.
- Szél A, Röhlich P, vanVeen T 1993. Short-wave sensitive cones in the rodent retina. *Exp Eye Res* 57: 503-505.
- Taylor AN, Wilson RW 1970. Electrophysiological evidence for the action of light on the pineal gland in the rat. *Experientia* 26: 267-269.
- Theron JJ, Biagio R, Meyer AC 1981. Circadian changes in microtubules, synaptic ribbons and synaptic ribbon fields in the pinealocytes of the baboon (*Papio ursinus*). *Cell Tiss Res* 217: 405-413.
- Thorn J, Schinko I, Wetzstein R 1972. Synaptic bar in the efferent part of a synapse in the organ of Corti. *Experientia* 28: 835.
- Trifonov YA 1968. Study of synaptic transmission between the photoreceptor and the horizontal cell using electrical stimulation of the retina. *Biophysika* 13: 809-817.
- tom Dieck S, Brandstätter JH 2006. Retinal ribbon synapses. *Cell Tiss Res* 326: 339-346.
- tom Dieck S, Altrock WD, Kessels MM, Qualmann B, Regus H, Brauner D, Fejtova A, Bracko O, Gundelfinger ED, Brandstätter JH 2005. Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J Cell Biol* 168: 825-836.
- Townes-Anderson E, MacLeish PR, Raviola E 1985. Rod cells dissociated from mature salamander retina: ultrastructure and uptake of horseradish peroxidase. *J Cell Biol* 100: 175-188.
- Trujillo-Cenóz O 1961. Electron microscope observations on chemo- and mechanoreceptor-cells of fishes. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 54: 654-676.

- Tsukamoto Y, Masarachia P, Schein SJ, Sterling P 1992. Gap junctions between the pedicles of macaque foveal cones. *Vis Res* 32: 1809-1815.
- Tsukamoto Y, Morigawa K, Ueda M, Sterling P 2001. Microcircuits for night vision in mouse retina. *J Neurosci* 21: 8616-8623.
- Uga S, Nakao F, Mimura M, Ikui H 1970. Some new findings on the fine structure of the human photoreceptor cells. *J Electron Microscopy* 19: 210-214.
- Usukura J, Yamada E 1987. Ultrastructure of the synaptic ribbons in photoreceptor cells of *Rana catesbeiana* revealed by freeze-etching and freeze-substitution. *Cell Tiss Res* 247: 483-488.
- Usukura J 1989. Cytoskeletal architecture of synaptic endings in the photoreceptor cells. *Neurosci Res* 10: 837-846.
- Vaney DI 1994. Patterns of neuronal coupling in the retina. *Prog Ret Res* 13: 301-355.
- Vaney DI, Nelson C, Pow DV 1998. Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. *J Neurosci* 18: 10594-10602.
- Vardi N, Morigiwa K, Wang T-L, Shi Y-J, Sterling P 1998. Neurochemistry of the mammalian cone 'synaptic complex'. *Vis Res* 38: 1359-1369.
- Villegas GM 1961. Comparative ultrastructure of the retina in fish, monkey and man. In: Jung R, Kornhuber H (Ed.). *The visual system. Neurophysiology and psychophysics. Symposium Freiburg 1960.* Springer Berlin, Göttingen, Heidelberg: 3-13.
- Villegas GM 1964. Ultrastructure of the human retina. *J Anat* 98: 501-513.
- Vollrath L 1973. Synaptic ribbons of a mammalian pineal gland. Circadian changes. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 145: 171-183.
- Vollrath L 1975. Die Struktur der Meerschweinchenzirkelrinne unter dem Einfluß von Licht und Dunkelheit. *Verh Anat Ges* 69: 447-451.
- Vollrath L 1981. The pineal organ. In: Oksche A, Vollrath L (Ed.). *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd VI/7.* Springer, Berlin Heidelberg New York: 665 pp.
- Vollrath L 1986. Inverse behaviour of "synaptic" ribbons and sphere numbers in the pineal gland of male guinea-pigs exposed to continuous illumination. *Anat Embryol* 173: 349-354.
- Vollrath L, Huss H 1973. The synaptic ribbons of the guinea-pig under normal and experimental conditions. *Z Zellforsch* 139: 417-429.
- Vollrath L, Howe C 1976. Light and drug induced changes of epiphysial synaptic ribbons. *Cell Tiss Res* 165: 383-390.
- Vollrath L, Maitra SK 1986. Interspecies differences in the response of pineal "synaptic" ribbon numbers to continuous illumination. *Neuroendocrinol Lett* 8: 135-140.
- Vollrath L, Spiwoks-Becker I 1996. Plasticity of retinal ribbon synapses. *Microsc Res Tech* 35: 472-487.
- Vollrath L, Schultz RL, McMillan PJ 1983. "Synaptic" ribbons and spheres of the guinea-pig pineal gland: inverse day/night differences in number. *Am J Anat* 168: 67-74.
- Vollrath L, Meyer A, Buschmann F 1989. Ribbon synapses of the mammalian retina contain two types of synaptic bodies - ribbons and spheres. *J Neurocytol* 18: 115-120.
- Vollrath L, Karasek M, Kosaras B, Kunert-Radek J, Lewinski A 1985. Influence of melatonin and serotonin on the number of rat pineal "synaptic" ribbons and spherules in vitro. *Cell Tiss Res* 242: 607-611.
- Vollrath L, Spiwoks-Becker I, Adly MA, Schaaff U, Lasarzik I, Neumann S 2001. Synaptic ribbon dynamics in photoreceptors of mice. *Ital J Anat Embryol* 106: 499-507.
- vanEpps HA, Hayashi M, Lucast L, Stearns GW, Hurley JB, De Camilli P, Brodin L 2004. The zebrafish *nrc* mutant reveals a role for the polyphosphoinositide phosphatase synaptojanin 1 in cone photoreceptor ribbon anchoring. *J Neurosci* 24: 8641-8650.
- von Gersdorff H 2001. Synaptic ribbons: versatile signal transducers. *Neuron* 29: 7-10.
- von Gersdorff H, Matthews G 1994. Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature* 367: 735-739.
- von Gersdorff H, Vardi E, Matthews G 1996. Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16: 1221-1227.
- von Mach MA, Vollrath L 2003. Plasticity of synaptic ribbons of the rat pineal gland in vitro – minor effects of electrical stimulation. *Ann Anat* 185: 397-402.
- Wachtler T, Doi E, Lee TW, Sejnowski TJ 2007. Cone selectivity derived from the responses of the retinal cone mosaic to natural scenes. *J Vision* 7: 1-14.
- Wagner H-J 1997. Presynaptic bodies ("ribbons"): from ultrastructural observations to molecular perspectives. *Cell Tiss Res* 287: 235-446.

- Wagner H-J 1980. Light-dependent plasticity of the morphology of horizontal cell terminals in cone pedicles of fish retinas. *J Neurocytol* 9: 563-590.
- Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC 1997. Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature* 388: 593-598.
- Wartenberg H 1968. The mammalian pineal organ: electron microscopic studies on the fine structure of pinealocytes, glial cells and on the perivascular compartment. *Z Zellforsch* 86: 74-97.
- Wässle H, Boycott BB 1991. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 71: 447-480.
- Wässle H, Dacey DM, Haun T, Haverkamp S, Grünert U, Boycott BB 2000. The mosaic of horizontal cells in the macaque monkey retina: with a comment on bplexiform ganglion cells. *Vis Neurosci* 17: 591-608.
- Weidmann TA, Kuwabara T 1968. Postnatal development of the rat retina. *Arch Ophthalmol* 79: 470-484.
- Weidmann TA, Kuwabara T 1969. Development of the rat retina. *Invest Ophthalmol* 8: 60- 69.
- Wersinger E, Schwab Y, Sahel J-A, Rendon A, Pow DV, Picaud S Roux MJ 2006. The glutamate transporter EAAT5 works as a presynaptic receptor in mouse rod bipolar cells. *J Physiol* 577: 221-234.
- Williams MA, Gherson J, Fisher LJ, Pinto LH. Synaptic lamellae of the photoreceptors of pearl and wild-type mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 992-1001.
- Wolfe DE 1965. The epiphysial cell: an electron-microscopic study of its intercellular relationships and intracellular morphology in the pineal body of the albino rat. *Prog Brain Res* 10: 332-386.
- Wu SM 1994. Synaptic transmission in the outer retina. *Annu Rev Physiol* 56: 141-168.
- Wurtman RJ, Axelrod J, Sedvall G, Moore R 1967. Photic and neural control of the 24 hour norepinephrine rhythm in the rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther* 157: 487-492.
- Wurtmann RJ, Axelrod J, Kelly DE 1968. The pineal. Academic Press, New York London.
- Yamada E 1965. Some observations on the membrane-limited structure within the retinal element. In: Seno S, Cowdry EV (Ed.). *Intracellular membranous structure*, Okayama, Japan Soc Cell Biol: 49-61.
- Yamada E 1966. Some observations on the fine structure of the human retina. *Fukuoka Acta Med* 57: 163-182.
- Yamada E, Ishikawa T 1965. Some observations on the submicroscopic morphogenesis of the human retina. In: Rohen JW (Ed.). *Eye structure*, 2. Symp. Schattauer Verlag, Stuttgart: 5-16.
- Zenisek D, Steyer JA, Almers W 2000. Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406: 849-854.
- Zenisek D, Davila V, Wan L, Almers W 2003. Imaging calcium entry sites and ribbon structures in two presynaptic cells. *J Neurosci* 23: 2538-2548.
- Zenisek D, Horst NK, Merrifield C, Sterling P, Matthews G 2004. Visualizing synaptic ribbons in the living cell. *J Neurosci* 24: 9752-9759.
- Zhou Z-Y, Wan Q-F, Thakur P, Heidelberger R 2006. Capacitance measurements in the mouse rod bipolar cell identify a pool of releasable synaptic vesicles. *J Neurophysiol* 96: 2539-2548.

8. Abbildungsverzeichnis: Seite 1

Nr.	Kurzbeschreibung	Ort	Spezies	Animation	Seite
01	rekonstruiertes Zapfenterminal mit 4 Stäbchenendkolben	ÄPS	Homo	01.avi	00
02	Feld plattenförmiger SK	P	MS	02.avi	00
03	Feld bizarrer SK, Dauerlichttier	P	MS	03.avi	00
1	SK Profile in Photorezeptoren, Pinealozyt und Haarzelle	←	Homo, MS		4
2	Stereobild 3D rekonstruierter SK in einem Feld	P	Ratte	2.avi	5
3	rekonstruierte SK in Originalgrauwerten	P	Ratte	3.avi	5
4	bizarre SK unter Dauerlicht	P	MS	4.avi	5
5	Stereobild einer Stäbchensynapse mit einem SK	ÄPS	Homo	5.avi	6
6a	rekonstruierte SK in einem Zapfenpedikel	ÄPS	Homo	6.avi	6
6b	größere SK in einem Zapfen einer der BALB/c Maus	ÄPS	Maus	6a.avi	6
7	Stäbchenterminale, Zapfenpedikel + postsynapt. Elemente	ÄPS	Homo	01.avi	7
8	unter Ca ⁺⁺ -Entzug massiv veränderte SK	ÄPS	Maus	8.avi	7
9	SK einer Zapfenbipolarzelle	IPS	Ratte	9.avi	8
10	verschiedene SK einer Stäbchenbipolarzelle	IPS	Ratte	10.avi	8
11	Übersicht und Schichtgliederung der Retina	←	Homo		9
12	Zirbeldrüse: Pinealozyten und SK-Feld	P	MS		10
Met1	Monitorschnappschuß: IDL® Tool zur Schnittüberlagerung	P	MS		20
Met2	Prinzip der Modifikation der Disektor Zählmethode	P	Ratte		22
Met3	Erklärungszeichnung zum Procedere bei dieser Methode				22
Huhn	band- bzw. plattenförmige SK in einem Feld	P	Huhn	Huhn.avi	26
MS1	großes Feld paralleler plattenförmiger SK, Normaltier	P	MS	MS1.avi	27
MS2	4 verschiedene Fotos gepaarter SK-Felder, Dauerlichttiere	P	MS		28
MS3	Rekonstruktion eines doppelt gepaarten Feldes	P	MS	MS3.avi	29
MS4	trogförmiges bzw. kelchförmiges SK, Dauerlichttiere	P	MS	MS4.avi	29
MS5	breite atypische SK, eines mit Hohlraum, Dauerlichttier	P	MS	MS5.avi	30
MS6	gepaartes Feld rinnenförmiger SK, Dauerlichttier	P	MS	03.avi	31
Js1	Beispiele für verschiedene SK-Profile	ÄPS	Ratte		32
Jb1	Beispiele atypischer SK-Profile in Zapfenterminalen	ÄPS	Maus		34
Jb2	sehr großes rundes SK-Profil	ÄPS	Maus		34
BDG1	Retina mit anti-β-Dystroglykan & anti-Bassoon Markierung	←	Huhn		36
BDG2	segmentierte Zapfenterminale mit Immunogoldmarkierung	ÄPS	Huhn		37
BDG3	Idem, anderes Detail	ÄPS	Huhn		38
BDG4	3D-Rekonstruktion der BDG Markierung	ÄPS	Huhn		38
BDG5	Stereobild: keine BDG Markierung im Bereich von SK	ÄPS	Huhn	BDG5.avi	39
BDG6	Stereobild einer Zapfenpedikelbasis mit SK und BDG	ÄPS	Huhn	BDG6.avi	39
BDG7	idem, andere Ansicht	ÄPS	Huhn	BDG7.avi	39
BALB1	Originalschnitte: Stäbchenterminale, Ca ⁺⁺ -Entzug in Kultur	ÄPS	Maus		41
BALB2	3D-Rekonstruktion eines massiv veränderten SK	ÄPS	Maus	BALB2.avi	41
BALB3	SK in Stäbchenterminalen bei um 5.45 getöteten Tieren	ÄPS	Maus		42
BALB4	Zapfenterminal mit SK eines solchen Tieres	ÄPS	Maus	BALB4.avi	42
BALB5	Stereobild ektopischer SK dieses Tieres	ÄPS	Maus	BALB5.avi	43
BALB6	SK in Stäbchenbipolarzellen um 5.45 getöteter Tiere	IPS	Maus		43
BALB7	Stäbchenribbonsynapsen eines um 8.10 getöteten Tieres	ÄPS	Maus	BALB7.avi	44
BALB8	SK eines Bipolarzellterminals (8.45 getötetes Tier)	IPL	Maus	BALB8.avi	45
BALB8a	SK in Stäbchenendkolben um 8.45 getöteter Tiere	ÄPS	Maus		45
BALB9	medial eingeschnürte SK eines um 17.00 getöteten Tieres	ÄPS	Maus		46
BALB10	Zapfenterminal eines solchen Tieres	ÄPS	Maus		46
BALB11	Zapfen-SK um 17.00 getöteter Tiere	ÄPS	Maus		47
BALB12	Bipolarzell-SK um 17.00 getöteter Tiere	ÄPS	Maus		47
BALB13	Topographie der Bipolarzell-SK solcher Tiere	ÄPS	Maus		48

Ort: IPS = innere plexiforme Schicht der Retina; ÄPS = äußere plexiforme Schicht; P = Pinealozyt; ← = siehe links

Spezies: Homo = Mensch; MS = Meerschweinchen; Ratte = SD-Ratte; Maus = BALB/c-Maus; Huhn = Hühnchen

Die **Animationen** finden sich im Verzeichnis "Animationen" des beiliegenden Datenträgers und alphabetisch geordnet im Animationsverzeichnis; bei mehreren wird nur der Name der ersten angegeben.

Abbildungsverzeichnis: Seite 2

Nr.	Kurzbeschreibung	Ort	Spezies	Animation	Seite
BALB14	Stäbchen-SK eines um 22.00 getöteten Tieres	ÄPS	Maus		49
BALB15	verschiedene Stäbchen-SK eines um 22.00 getöteten Tieres	ÄPS	Maus		49
Ekt1	Beispiele ektopischer SK in Originalfotos	ÄPS	Ratte		50
Ekt2	Tubuli an eSK und sagittales eSK in Originalfotos	ÄPS	Ratte		51
Ekt3	eSK an einem Stäbchenterminal	ÄPS	Ratte	Ekt3.avi	51
Ekt4	2 eSK an einem Stäbchenterminal	ÄPS	Maus	Ekt4.avi	52
Ekt5	Originalfoto mit Profilen mehrerer eSK	ÄPS	Maus		52
Ekt6	3D-Rekonstruktion dieser eSK	ÄPS	Maus	Ekt6.avi	53
Ekt7	Klumpige eSK mit Hohlräumen im Inneren	ÄPS	Maus	Ekt7.avi	53
IPS1	kleines plattenförmiges SK eines Zapfenbipolarzellaxons	IPS	Ratte	IPS1.avi	54
IPS2	Stäbchenbipolarzellaxon mit plattenförmigen SK	IPS	Ratte	IPS2.avi	54
Homo1	rekonstruiertes Zapfenterminal mit 4 Stäbchenendkolben	ÄPS	Homo	Homo1.avi	55
Homo2	rekonstruierte Bipolarzellaxone mit SK	IPS	Homo	Homo2.avi	55
Homo3	Originalschnitt mit Farbcodierung segmentierter Strukturen	ÄPS	Homo		56
Homo4	Komponenten der Ribbonsynapse eines Stäbchenterminals	ÄPS	Homo	Homo4.avi	56
Homo5	Serienschnitte eines kompletten Stäbchenterminals	ÄPS	Homo	Homo5.avi	57
Homo6	Rekonstruktion eines Stäbchenendkolbens mit 2SK	ÄPS	Homo	Homo6.avi	58
Homo7	idem mit 2SK, 3 Bipolarzellendriten + 1 HZfortsatz	ÄPS	Homo	Homo7.avi	58
Homo8	idem mit 1SK, 1 Bipolarzellendriten + 3 HZfortsätze	ÄPS	Homo	Homo8.avi	59
Homo9	idem mit 2SK, 3 Bipolarzellendriten + 1 HZfortsatz	ÄPS	Homo	Homo9.avi	59
Homo10	idem mit 3SK, 4 Bipolarzellendriten + 3 HZfortsätze	ÄPS	Homo	Homo10.avi	59
Homo11	standardisierte Darstellung von 11 Stäbchen SK	ÄPS	Homo		60
Homo12	Basalansichten zweier Zapfenpedikel mit SK	ÄPS	Homo		61
Homo13	3 typische Ribbonsynapsen von Zapfenterminalen	ÄPS	Homo	Homo13.avi	62
Homo14	Fortsätze von Zapfenterminalen in Fotos + Rekonstruktion	ÄPS	Homo	Homo14.avi	62
Homo15	Serienschnitte einer kompletten Zapfentriade	ÄPS	Homo	Homo15.avi	63
Homo16	Rekonstruktion mehrerer Zapfenribbonsynapsen	ÄPS	Homo	Homo16.avi	64
Homo17	in Reihe stehende SK an einem Zapfenbipolarzellendriten	ÄPS	Homo	Homo17.avi	65
Homo18	parallel stehende SK an einem Zapfenbipolarzellendriten	ÄPS	Homo		66
Homo19	standardisierte Darstellungen der rekonstruierten Zapfen SK	ÄPS	Homo		66-67
Homo20	SK in Axonen verschiedener Bipolarzellen	IPS	Homo	Homo20.avi	68
Homo21	Originalfoto einer Bipolarzelle mit einem eSK-Profil	IPS	Homo		69
Homo22	bandförmige Stäbchenbipolarzell-SK	IPS	Homo	Homo22.avi	69
Homo23	SK in Bipolarzellaxonen	IPS	Homo	Homo23.avi	70
Homo24	standardisierte Darstellung von 14 Bipolarzell-SK	IPS	Homo		70
Rat1	Feld synaptischer Körperchen eines Rattenpinealocyten	P	Ratte	Rat1.avi	73
Rat2	Transparente + 3D Rekonstruktion pinealer SK	P	Ratte	Rat2.avi	74
Disk1	Entstehung großer atypischer SK durch Aneinanderlagerung	P	MS		78
Disk2	Membranverankerung normaler + atypischer SK	P+R	#	Homo10.avi	80
Disk3a,b	unterschiedliche Morphologie zweier Stäbchenterminale	ÄPS	Homo	Disk3.avi	83
Disk3c	Stäbchenribbonsynapsen mit dargestellter aktiver Zone	ÄPS	Homo	Disk3c.avi	86
Disk4	Ribbonsynapsen eines Zapfenterminals	ÄPS	Homo	Disk4.avi	92
Disk5	verschiedene Bipolarzellendriten eines Zapfenpedikels	ÄPS	Homo	Disk5.avi	101
Disk6	Schemazeichnung zur Berechnung von SK-Profillängen				109
Disk7	Schemazeichnung zur fehlerfreien Disektorzählung				112
Disk8	Laminierung eines senkrecht angetroffenen SK Profils	ÄPS	Homo		122
Disk9	tubuläres Netzwerk bei einem ektopischen SK	ÄPS	Ratte	Disk9.avi	125
Disk10	Foto: Endo- + Exozytosevorgänge einer Stäbchensynapse	ÄPS	Ratte		128
Ende	sagittal getroffenes Stäbchen-SK (1 Vakuole einkopiert)	ÄPS	Maus		162

Ort: IPS = innere plexiforme Schicht der Retina; ÄPS = äußere plexiforme Schicht;

P = Pinealozyt; P+R = pinealocytes und Retina

Spezies: Homo = Mensch; MS = Meerschweinchen; Ratte = SD-Ratte; Maus = BALB/c Maus;

Huhn = Hühnchen; # = Mensch, Hühnchen und Meerschweinchen im Vergleich

Die **Animationen** finden sich im Verzeichnis "Animationen" des beiliegenden Datenträgers und alphabetisch geordnet im Animationsverzeichnis; bei mehreren wird nur der Name der ersten angegeben.

9. Animationsverzeichnis: Seite 1

Name	Kurzbeschreibung	Ort	Spezies
01.avi	rekonstruiertes Zapfenterminal mit 4 Stäbchenendkolben	ÄPS	Homo
02.avi	Feld plattenförmiger SK	P	MS
03.avi	Feld bizarrer SK, Dauerlichttier	P	MS
2.avi	3D rekonstruierte SK in einem Feld eines Pinealozyten	P	Ratte
3.avi	rekonstruierte platten- und bandförmige SK in Originalgrauwerten	P	Ratte
4.avi	bizarre SK unter Dauerlicht	P	MS
5.avi	Stäbchensynapse mit einem SK	ÄPS	Homo
6.avi	rekonstruierte SK in einem Zapfenpedikel + eine rekonstruierte Triade	ÄPS	Homo
6a.avi	große SK in einem Zapfenpedikel	ÄPS	Maus
8.avi	unter Ca ⁺⁺ -Entzug massiv veränderte SK	ÄPS	Maus
9.avi	SK einer Zapfenbipolarzelle	IPS	Ratte
10.avi	verschiedene SK einer Stäbchenbipolarzelle	IPS	Ratte
BALB2.avi	3D-Rekonstruktion von Stäbchen-SK, Organkultur unter Ca ⁺⁺ -Entzug	ÄPS	Maus
BALB4.avi	Zapfenterminal mit SK eines um 5.45 getöteten Tieres	ÄPS	Maus
BALB5.avi	ektopische SK angelagert an einen Zapfenpedikel dieses Tieres	ÄPS	Maus
BALB7.avi	Stäbchenribbonsynapsen eines um 8.10 getöteten Tieres	ÄPS	Maus
BALB7a.avi	idem ohne Darstellung der Stäbchenterminale	ÄPS	Maus
BALB8.avi	SK einer Bipolarzelle einer um 8.45 getöteten BALB/c Maus	IPS	Maus
BDG5.avi	keine Betadystroglykan Markierung im Bereich von SK	ÄPS	Huhn
BDG6.avi	Zapfenpedikelbasis mit SK und BDG-Markierung	ÄPS	Huhn
BDG7.avi	detailliertere Ansicht einer Zapfenbasis mit SK & BDG-Markierung	ÄPS	Huhn
Disk3.avi	2 Ribbonsynapsen in einem Stäbchenterminal	ÄPS	Homo
Disk3c.avi	3 Ribbonsynapsen eines Stäbchenterminals mit visualisierten aktiven Zonen	ÄPS	Homo
Disk4.avi	Ribbonsynapsen eines Zapfenterminals	ÄPS	Homo
Disk5.avi	verschiedene Bipolarzellendriten eines Zapfenpedikels	ÄPS	Homo
Disk9.avi	tubuläres Netzwerk bei einem ektopischen SK	ÄPS	Ratte
Ekt3.avi	Ektopische SK an einem Stäbchenterminal	ÄPS	Ratte
Ekt4.avi	2 in etwa parallele eSK an einem Stäbchenterminal	ÄPS	Maus
Ekt6.avi	3D-Rekonstruktion von eSK an einem Stäbchen- und einem Zapfenterminal	ÄPS	Maus
Ekt7.avi	klumpiges eSK einer Zapfenbipolarzelle mit offenen Hohlraum im Inneren	ÄPS	Maus
Ekt7a.avi	klumpige eSK von Stäbchenbipolarzellen mit Hohlräumen im Inneren	ÄPS	Maus
Homo1.avi	rekonstruiertes Zapfenterminal mit 4 Stäbchenendkolben	ÄPS	Homo
Homo2.avi	rekonstruierte Bipolarzellaxone mit SK & Originalschnitt	IPS	Homo

Ort: IPS = innere plexiforme Schicht der Retina; ÄPS = äußere plexiforme Schicht; P = Pinealozyt

Spezies: Homo = Mensch; MS = Meerschweinchen; Ratte = SD-Ratte; Maus = BALB/c-Maus; Huhn = Hühnchen
Die **Animationen** finden sich im Verzeichnis "Animationen" des beiliegenden Datenträgers

3D-Stereoanimationen sind gelb unterlegt

Animationsverzeichnis: Seite 2

Name	Kurzbeschreibung	Ort	Spezies
Homo4.avi	Komponenten der Ribbonsynapse eines Stäbchenterminals	ÄPS	Homo
Homo5.avi	Serienschnitte eines kompletten Stäbchenterminals	ÄPS	Homo
Homo6.avi	Rekonstruktion eines Stäbchenendkolbens mit 2SK	ÄPS	Homo
Homo7.avi	idem mit 2 SK + 3 Bipolarzellendriten + 1 Horizontalzellfortsatz	ÄPS	Homo
Homo8.avi	idem mit 1 SK + 1 Bipolarzellendriten + 3 Horizontalzellfortsätze	ÄPS	Homo
Homo9.avi	idem mit 2 SK + 3 Bipolarzellendriten + 1 Horizontalzellfortsatz	ÄPS	Homo
Homo10.avi	idem mit 3 SK + 4 Bipolar- + 3 Horizontalzellfortsätzen und aktiver Zone	ÄPS	Homo
Homo10a.avi	SK dieser 3 Stäbchenribbonsynapsen mit ad und aktiver Zone	ÄPS	Homo
Homo13.avi	typische Ribbonsynapse einer Zapfentriade, Schnitt im Hintergrund	ÄPS	Homo
Homo13a.avi	andere typische Ribbonsynapse eines Zapfenpedikels	ÄPS	Homo
Homo14.avi	laterale Fortsätze eines Zapfenterminals zu benachbarten Stäbchen	ÄPS	Homo
Homo15.avi	Serienschnitte einer kompletten Zapfentriade	ÄPS	Homo
Homo16.avi	Rekonstruktion mehrerer Zapfenribbonsynapsen (Triaden)	ÄPS	Homo
Homo17.avi	in Reihe stehende SK an einem Zapfenbipolarzellendriten	ÄPS	Homo
Homo20.avi	SK in Axonen verschiedener Bipolarzellen mit Schnitt im Hintergrund	IPS	Homo
Homo22.avi	bandförmige Stäbchenbipolarzell-SK, eines mit Membranverankerung	IPS	Homo
Homo23.avi	SK in Bipolarzellaxonen der unteren IPS	IPS	Homo
Huhn.avi	band- bzw. plattenförmige SK in einem Feld	P	Huhn
Huhn1.avi	idem mit geglätteter, interpolierter Oberfläche der SK	P	Huhn
IPS1.avi	kleines plattenförmiges SK eines Zapfenbipolarzellaxons	IPS	Ratte
IPS2.avi	Stäbchenbipolarzellaxon mit 2 plattenförmigen SK ähnlich Abb. IPS2	IPS	Ratte
MS1.avi	großes Feld paralleler plattenförmiger SK, Normaltier	P	MS
MS1a.avi	großes Feld paralleler plattenförmiger SK, Normaltier, Schnitt im Hintergrund	P	MS
MS3.avi	Rekonstruktion eines doppelt gepaarten Feldes mit Schnitt im Hintergrund	P	MS
MS3a.avi	Rekonstruktion eines doppelt gepaarten Feldes, eine Platte mit Loch	P	MS
MS4.avi	trogförmiges SK, Dauerlichttier	P	MS
MS4a.avi	kelchförmiges SK, Dauerlichttier	P	MS
MS5.avi	breite atypische SK eines mit innerem Hohlraum, Oberflächendarstellung	P	MS
MS5a.avi	idem halb aufgeschnittene Darstellung	P	MS
MS5b.avi	idem transparente Darstellung mit heller erscheinendem Hohlraum	P	MS
Rat1.avi	Feld synaptischer Körperchen eines Rattenpinealozyten	P	Ratte
Rat2.avi	3D Rekonstruktion segmentierter pinealer SK	P	Ratte
Rat2a.avi	Transparente 3D Rekonstruktion pinealer SK	P	Ratte

Ort: IPS = innere plexiforme Schicht der Retina; ÄPS = äußere plexiforme Schicht; P = Pinealozyt

Spezies: Homo = Mensch; MS = Meerschweinchen; Ratte = SD-Ratte; Maus = BALB/c-Maus; Huhn = Hühnchen
Die **Animationen** finden sich im Verzeichnis "Animationen" des beiliegenden Datenträgers;

3D-Stereoanimationen sind gelb unterlegt

10. Danksagungen

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Ilse von Graevenitz, ohne deren hervorragende technische Unterstützung am Elektronenmikroskop und versierte Anfertigung von unzähligen Präparaten und Schnittserien diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Meiner Kollegin Frau Dr. rer. nat. Isabella Spiwoks-Becker danke ich sehr für zahlreiche zur Verfügung gestellte Präparate und konstruktive Diskussionen im Rahmen diverser Kooperationen. Herrn Dirk Schmanke bin ich für seine Hilfe bei der Programmierung eines Überlagerungstools für Serienschnitte dankbar, ebenso Herrn Jörg Weinert für die programmiertechnische Unterstützung, die die Nutzung der anfänglich verwendeten Visualisierungssoftware (NeurOPS) ermöglichten. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stephan Kröger danke ich für einige der im Rahmen unserer gemeinsamen Publikation durchgeführten Untersuchungen und Unterstützung bei der hier integrierten Zusammenfassung unserer Ergebnisse. Den folgenden von mir betreuten Doktoranden bin ich dankbar für ihre Hilfe bei der Gewinnung von Bildmaterial, quantitativen Daten, der Mitarbeit bei der Anfertigung von Postern, Vorbereitungen von Vorträgen und den damit verbundenen anregenden Diskussionen: Marc-Alexander von Mach, Dirk Bernhard Gustavus, Jörg Racke, Georgios Kolios und Michael Hainz. Einige der hier mit präsentierten Ergebnisse sind Bestandteile ihrer Dissertationen oder/und wurden zum Teil gemeinsam veröffentlicht. Herrn OA Prof. Dr. med. B. Stoffelns (Universitätsaugenklinik Mainz) danke ich für das Präparat der operativ gewonnenen menschlichen Retina, Herrn OA Prof. Dr. med. N. Ardjomand und Frau Prof. Dr. rer. nat. E. Haller-Schober (beide Universitätsaugenklinik, Graz, Österreich) bin ich für die überlassenen Präparate menschlicher Augäpfel dankbar. Herrn Prof. Dr. Müller-Stach (FB Mathematik, J. Gutenberg-Universität Mainz) danke ich für die mathematische Unterstützung zu Punkt 4b2 der Diskussion. Einen besonderen Dank möchte ich auch meinem ehemaligen Chef, Herrn Univ.-Prof. emeritus Dr. med. Lutz Vollrath aussprechen für die Einführung in das Thema, viele Anregungen und Diskussionen, die Möglichkeit weitgehend selbstständig arbeiten zu können und für kritische Revisionen diverser Manuskripte.

Den Gutachtern dieser Arbeit danke ich für ihre aufgewendete Zeit und Mühe.

Dieses "lachende Ribbon" soll nun den Abschluß dieser Arbeit kennzeichnen:

