

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Funktion und
pathophysiologischen Relevanz
Zyklonukleotid-aktivierter
Kationenkanäle im ZNS und der
Retina anhand CNGA3-defizienter
Mäuse**

Stylios Michalakis

aus
Augsburg

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 22.07.2003

Stylios Michalakis

Dissertation eingereicht am 22.07.2003

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Biel

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Pfeifer

Mündliche Prüfung am 07.08.2003

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	3
II. ABKÜRZUNGEN	7
III. EINLEITUNG	9
1 ZYKLONUKLEOTID-AKTIVIERTE KATIONENKANÄLE	9
1.1 Zyklonukleotid-Rezeptoren.....	9
1.2 Die Familie der CNG-Kanäle	9
1.3 Die Funktion der CNG-Kanäle im Seh- und Riechprozess.....	10
2 DER HIPPOCAMPUS UND DIE AMYGDALA AUS FUNKTIONELLER SICHT	11
2.1 Der Hippocampus	11
2.1.1 Anatomie	12
2.1.2 Funktionen.....	12
2.2 Die Amygdala.....	13
2.2.1 Anatomie	13
2.2.2 Funktionen.....	13
2.3 Molekulare und physiologische Korrelate des Lernens.....	15
3 DIE NETZHAUT	16
3.1.1 Aufbau	16
3.1.2 Skotopisches und photopisches System	17
3.1.3 Die Phototransduktion.....	17
3.1.4 Netzhautdegeneration.....	18
3.1.5 Totale Farbenblindheit	19
4 APOPTOSE	19
5 ZIELSTELLUNG	20
IV. MATERIAL UND METHODEN	21
1 VERSUCHSTIERE.....	21
1.1 Verwendete Mauslinien.....	21
1.2 Haltung und Zucht.....	21
1.3 Genotypisierung mittels PCR.....	21
2 GEWEBSISOLIERUNG	21
2.1 Allgemein.....	21
2.2 Isolierung von ZNS-Gewebe der Maus	22
2.2.1 Isolierung von Gesamtgehirn für die Histologie.....	22
2.2.2 Präparation von Riechkolben, Cerebellum und Hippocampus	22
2.2.3 Mikropräparation der basolateralen Amygdala.....	22
2.3 Isolierung von Augengewebe der Maus	23
2.3.1 Isolierung der Netzhaut für die Histologie.....	23
2.3.2 Isolierung der Netzhaut für Protein- oder RNS-Extraktion	23
2.3.3 Whole mount Präparate der Mausnetzhaut.....	23
2.3.4 Isolierung der Netzhaut für die Rasterelektronenmikroskopie	23
3 RNS-ISOLIERUNG.....	24
3.1 Isolierung von Poly(A)-RNS.....	24
3.2 Isolierung von Gesamt-RNS.....	24
4 SYNTHESE VON EINZELSTRÄNGIGER cDNA.....	25
5 POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	25

5.1	<i>Semiquantitative RT-PCR</i>	26
6	AUFTRENNUNG UND ISOLIERUNG VON DNS-FRAGMENTEN	26
6.1	<i>Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>	26
6.2	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	27
6.3	<i>Elektroelution</i>	27
6.4	<i>DNS-Isolierung mittels GFX-Säulen</i>	27
7	AUFREINIGUNG UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	27
7.1	<i>Präzipitation von Nucleinsäuren</i>	27
7.2	<i>Phenol-Chloroform-Extraktion</i>	28
7.3	<i>Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren</i>	28
8	RESTRIKTIONSVERDAU	28
9	DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNS	29
10	LIGATION VON DNS FRAGMENTEN	29
11	SEQUENZIERUNG	29
12	VERMEHRUNG UND ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS	30
12.1	<i>Kultur von Bakterien</i>	30
12.2	<i>Erzeugung kompetenter Bakterien</i>	31
12.3	<i>Transformation von E. Coli</i>	31
12.4	<i>Isolierung von Plasmid-DNS</i>	31
12.4.1	<i>Plasmidpräparation im Großmaßstab</i>	31
12.4.2	<i>Plasmidpräparation im Kleinmaßstab</i>	32
12.5	<i>Verwendete Plasmide</i>	32
13	IN SITU-HYBRIDISIERUNG.....	32
13.1	<i>In vitro-Transkription</i>	32
13.2	<i>Herstellung von Digoxigenin-markierten Oligo-Sonden</i>	33
13.3	<i>Hybridisierung</i>	34
13.4	<i>Detektion</i>	35
13.4.1	<i>Radioaktivdetektion</i>	35
13.4.2	<i>Tyramidamplifikation</i>	35
13.5	<i>Verwendete Lösungen</i>	36
14	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINEN	38
14.1	<i>Aufreinigung spezifischer Peptidantikörper</i>	38
14.2	<i>Herstellung von Gewebelysaten</i>	38
14.3	<i>Quantifizierung von Proteinen</i>	39
14.4	<i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>	39
14.5	<i>Western-Blot</i>	40
15	HISTOLOGIE	41
15.1	<i>Herstellung von Gewebeschnitten</i>	41
15.1.1	<i>Gefrierschnitte aus Gehirn</i>	41
15.1.2	<i>Gefrierschnitte aus der Netzhaut</i>	41
15.2	<i>Histologische Färbungen</i>	41
15.2.1	<i>Nissl-Färbung</i>	41
15.2.2	<i>Hoechst-Färbung</i>	41
15.3	<i>Lektin-Histochemie</i>	42
15.4	<i>Immunhistochemie</i>	42
15.4.1	<i>Protokoll für Gewebeschnitte</i>	42
15.4.2	<i>Protokoll für whole mount Retinapräparate</i>	43
15.5	<i>Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling</i>	43
15.5.1	<i>Protokoll</i>	44
16	MIKROSKOPIE.....	45
16.1	<i>Epifluoreszenzmikroskopie</i>	45

16.2 Laser-Konfokalmikroskopie	45
16.3 Rasterelektronenmikroskopie	46
16.4 Quantitative Auswertung.....	46
17 Elektrophysiologische Untersuchungen am Hippocampus.....	46
18 Verhaltensversuche	46
18.1 Diskriminierendes zwei Plattform water-maze	47
18.2 Forced swimming task.....	48
18.3 Angstkonditionierung	48
18.3.1 Konditionierung	48
18.3.2 Sensitivierung.....	50
V. ERGEBNISSE	51
1 EXPRESSION VON CNG-KANÄLEN IM ZNS	51
1.1.1 RT-PCR.....	51
1.1.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung	53
1.1.3 Immunhistochemie	54
2 FUNKTION VON CNG-KANÄLEN IM ZNS	55
2.1 Zelluläre Organisation des ZNS <i>CNGA3</i> -defizienter Mäuse	56
2.2 Synaptische Transmission in <i>CNGA3</i> -defizienten Mäusen	57
2.2.1 Basale synaptische Transmission im Hippocampus.....	57
2.2.2 Langzeitpotenzierung im Hippocampus.....	58
2.2.3 Langzeitdepression im Hippocampus	60
2.3 Räumliches Lernen in <i>CNGA3</i> -defizienten Mäusen.....	60
2.3.1 <i>Water maze</i>	60
2.3.2 Kontextuelle Angstkonditionierung	62
2.4 Angstverhalten.....	64
2.4.1 Akustische Angstkonditionierung	64
2.4.2 Sensitivierungstest.....	66
2.4.3 <i>Forced Swimming Test</i>	67
3 NETZHAUT DEGENERATION BEI <i>CNGA3</i> -DEFIZIENTEN MÄUSEN.....	68
3.1 Expression von <i>CNGA3</i> in der Retina.....	68
3.1.1 Immunhistochemie	68
3.1.2 Western-Blot	69
3.2 Verlust von <i>Seh-Zapfen</i>	70
3.2.1 Erdnussagglutinin-Markierung.....	70
3.3 Verlust von Markern der Phototransduktionskaskade.....	72
3.3.1 Opsine.....	72
3.3.1.1 MWS-Opsin	72
3.3.1.2 SWS-Opsin.....	76
3.3.2 Weitere Proteine der Phototransduktionskaskade	79
3.3.2.1 <i>CNGB3</i>	79
3.3.2.2 Zapfen-Transducin	80
3.3.2.3 Zapfen-Phosphodiesterase.....	82
3.3.2.4 Guanylylzyklase-aktivierendes Protein.....	84
3.3.2.5 Retinale Guanylylzyklase.....	85
3.4 Veränderungen der inneren Retina bei <i>CNGA3</i> -defizienten Mäusen	85
3.4.1 Veränderungen der Horizontalzellen	86
3.4.2 Die Synapsen der Zapfen	87
3.4.3 Go_{α} -Immunhistochemie zur Darstellung von Zapfen-ON-Bipolarzellen.....	88
3.5 Mechanismen des Zelltods	90
3.5.1 Apoptose.....	90

3.5.1.1 TUNEL	90
3.5.1.2 Caspase 3 Aktivierung	92
3.5.1.3 Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien	93
3.5.2 Aktivierung von Müller-Gliazellen	94
3.5.3 Neuron-spezifische Enolase	95
3.6 Rasterelektronenmikroskopie	98
3.7 Die Seh-Stäbchen bei <i>CNGA3</i> <i>-/-</i> Mäusen	99
VI. DISKUSSION	101
1 FUNKTIONEN VON <i>CNGA3</i> IN REGIONEN DES ZNS	101
1.1 Untersuchung der Expression von CNG-Kanälen im ZNS der Maus	101
1.2 Die Rolle von <i>CNGA3</i> bei der synaptischen Plastizität und dem räumlichen Lernen	102
1.3 Verändertes Angstverhalten bei <i>CNGA3</i> -defizienten Mäusen	102
2 DIE NEURODEGENERATION IN DER RETINA NACH VERLUST DER ZAPFENFUNKTION	103
2.1 Molekulare Veränderungen in nicht funktionsfähigen Seh-Zapfen	104
2.2 Konsequenzen des Verlustes von <i>CNGA3</i> für die innere Netzhaut	105
2.3 Mechanismus des Zelltods <i>CNGA3</i> -defizienter Seh-Zapfen	106
2.3.1 Apoptose	106
2.3.2 Die Aktivierung von Müller-Gliazellen	107
2.3.3 Die neuron-spezifische Enolase als früher Marker degenerierender Seh-Zapfen	107
VII. ZUSAMMENFASSUNG	108
VIII. ANHANG	110
1 PRIMER	110
2 PCR-BEDINGUNGEN	111
3 VERWENDETE ANTIKÖRPER	112
3.1 Primärantikörper	112
3.2 Sekundärantikörper	113
IX. LITERATURVEREICHNIS	114
1 ZITIERTE VERÖFFENTLICHUNGEN	114
2 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	124
X. LEBENS LAUF	125

II. Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin, bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
Ca ²⁺	Kalziumion
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
CNBD	Zyklonukleotid-Bindungsdomäne
CNG	Zyklonukleotid aktivierter Ionenkanal, Cyclic nucleotide gated channel
COS	Zapfenaußensegment, cone outer segment
cpm	Zähler pro Minute, counts per minute
cRNS	komplementäre Ribonukleinsäure
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin (3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differential-Interferenzkontrast (-Mikroskopie)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Desintegrations per minute
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERG	Elektroretinogramm
fEPSP	Exzitatorisches Postsynaptisches Feldpotential
fIPSP	Inhibitorisches Postsynaptisches Feldpotential
GCAP	Guanylylzyklase aktivierendes Protein
GCE	Guanylylzyklase Typ E
GCF	Guanylylzyklase Typ F
GC	Ganglienzellen oder Ganglienzellschicht
GFAP	Gliafibrilläres saures Protein, glial fibrillary acidic protein
h	Stunde(n) / human
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase, horseradish peroxidase
INL	Innere Körnerschicht der Netzhaut, inner nuclear layer
IPL	Innere plexiforme Schicht, inner plexiform layer
IR	Immunreaktivität, z.B. CNGA3-IR
K ⁺	Kaliumion
LB	Luria-Bertani
LTD	Langzeitdepression
Luminol	5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazindion
LSM	Laser-Konfokalmikroskop, Laser scanning confocal microscope
LTP	Langzeitpotenzierung
m	Minuten / von der Maus stammend

MCS	Multiple Klonierungsstelle, multiple cloning site
Mg ²⁺	Magnesiumion
Mo	Monat
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaAcO	Natriumacetat
Natiumcacodylat	Dimethylarsinsäure, Natriumsalz
Neo	Neomycinresistenz-Gen
NGS	Normales Ziegenserum, <i>normal goat serum</i>
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
ONL	Äußere Körnerschicht der Netzhaut, outer nuclear layer
OPL	Äußere plexiforme Schicht, outer plexiform layer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	NaCl-freie Phosphat-gepufferte Lösung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Stäbchenaußensegment, rod outer segment
RPE	Pigmentepithel der Netzhaut, retinal pigment epithelium
RPM	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-NaCl-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
Wo	Woche

III. Einleitung

1 Zyklonukleotid-aktivierte Kationenkanäle

1.1 Zyklonukleotid-Rezeptoren

Zyklonukleotid-Rezeptoren gehören zu einer Familie von Proteinen, die Bindungsdomänen für zyklische Nukleotide besitzen und durch Bindung von cAMP bzw. cGMP aktiviert oder moduliert werden. Diese Gruppe von Proteinen ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie beispielsweise dem Seh- und Riechprozess (Fesenko et al. 1985, Nakamura & Gold 1987), der synaptischen Plastizität (Bailey et al. 1996), der Kontraktion von glatter Muskulatur (Pfeifer et al. 1998), der Chlorid- und Wasser-Sekretion (Pfeifer et al. 1996) und an der Aktivierung von Thrombozyten (Aszodi et al. 1999) beteiligt. Mittlerweile sind vier große Klassen von Rezeptoren bekannt, die Zyklonukleotid-abhängigen Proteinkinasen (Taylor et al. 1992, Meinkoth et al. 1993, Hofmann et al. 1994), die Phosphodiesterasen (Beavo, 1995), cAMP-aktivierte Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (de Roij et al. 1998, Kawasaki et al. 1998) und Zyklonukleotid-modulierte Ionenkanäle (Biel et al. 1999, Biel et al. 2002, Kaupp & Seifert 2002).

1.2 Die Familie der CNG-Kanäle

Vor etwa dreißig Jahren wurden erstmals Kationenströme in den Photorezeptoren beschrieben, die durch Applikation von zyklischen Nukleotiden aktiviert werden (Fesenko et al. 1985). Diese Ionenkanäle, die später CNG-Kanäle (**c**yclic **n**ucleotide **g**ated ion channel) genannt wurden, sind in den Folgejahren aus verschiedenen sensorischen und nicht-sensorischen Geweben kloniert worden (Kaupp et al. 1989, Dhallan et al. 1990, Biel et al. 1993, Bönigk et al. 1993, Chen et al. 1993, Biel et al. 1994, Bradley et al. 1994, Liman & Buck 1994, Biel et al. 1996, Gerstner et al. 2000). Die Familie der CNG-Kanäle besteht aus sechs Genen, die für vier A und zwei B Untereinheiten kodieren (Abbildung 1).

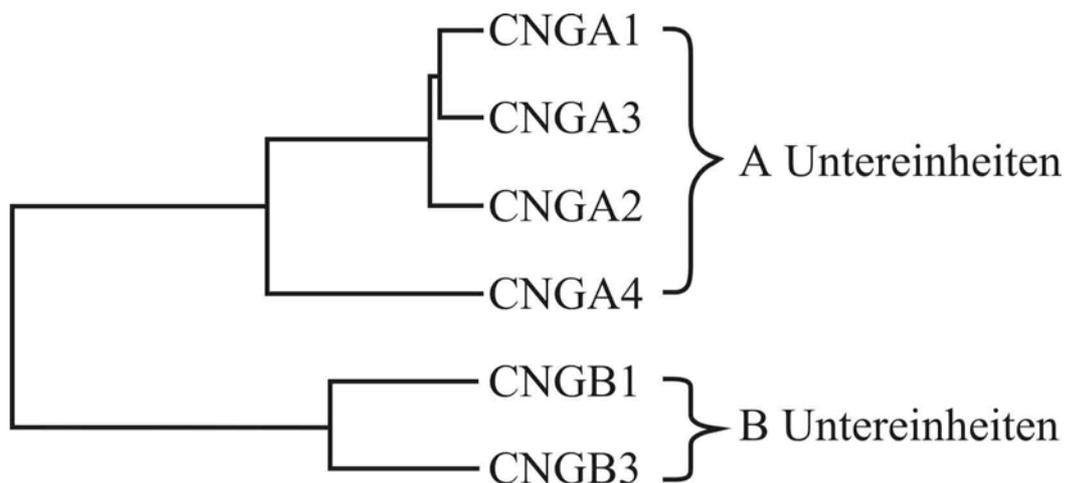


Abbildung 1

Phylogenetischer Stammbaum der CNG-Kanäle.

CNG-Kanäle sind strukturell mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen verwandt. Hydrophobizitätsanalysen ergaben sechs putative Transmembrandomänen (S1 bis S6) (Abbildung 2A). Die ionenleitende Pore wird durch die Poren-Helix, den Selektivitätsfilter

und der S6-Domäne gebildet (Doyle et al. 1998). Jiang et al. (2003) gelang es einen spannungsabhängigen Kaliumkanal zu kristallisieren. Dem daraus resultierenden Strukturmodell (in Abbildung 2B), ist die tatsächliche räumliche Anordnung der einzelnen Domänen zu entnehmen. Im intrazellulär lokalisierten Carboxyterminus des CNG-Proteins befindet sich die für die Aktivierung des Kanals essentielle Zyklonukleotid-Bindungsdomäne (CNBD, cyclic nucleotide binding domain). Durch Bindung zyklischer Nukleotide erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins, die zur Öffnung der Kanalpore führt. Der native CNG-Kanal besitzt eine heterotetramere Struktur. Der CNG-Kanal in den Stäbchen wird aus drei A1 und einer B1 Untereinheit gebildet (siehe Abbildung 2C; Zhong et al. 2002, Weitz et al. 2002). Dieses Modell kann auch auf den Zapfen-CNG-Kanal übertragen werden (Zhong et al. 2003). Er wird dementsprechend aus einer B3 und drei A3 Untereinheiten geformt. Der native olfaktorische CNG-Kanal wird durch die Untereinheiten A2, A4 und B1 gebildet (Sautter et al. 1998, Bönigk et al. 1999); die exakte Stöchiometrie ist noch nicht bekannt.

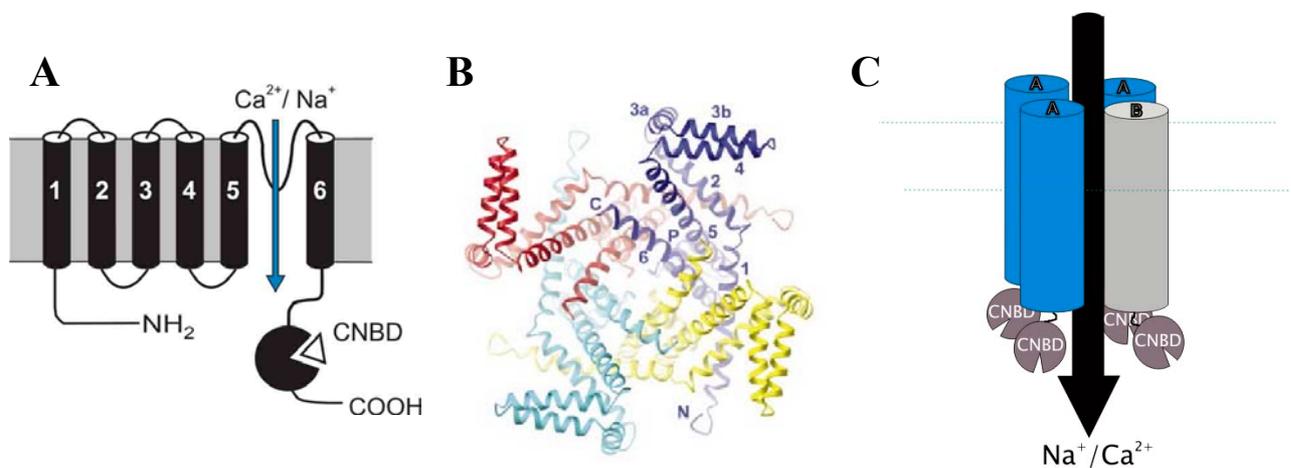


Abbildung 2

Struktur der CNG-Kanäle. A) Schematische Darstellung einer CNG-Untereinheit. B) Kristallstruktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. Die vier Untereinheiten sind in verschiedenen Farben dargestellt. Zu erkennen ist die räumliche Anordnung der einzelnen Domänen innerhalb des Kanals. (1 bis 6 = S1 bis S6, C = Carboxy-Terminus; N = Amino-Terminus; Abbildung aus Jiang et al. 2003) C) Vereinfachtes Strukturmodell des Stäbchen CNG-Kanals. Eine B- und drei A-Untereinheiten bilden einen heteromeren Kanal.

1.3 Die Funktion der CNG-Kanäle im Seh- und Riechprozess

CNG-Kanäle sind sowohl für monovalente als auch für bivalente Kationen permeabel. Unter physiologischen Bedingungen ermöglichen sie einen Na^+ - und Ca^{2+} -Einwärtsstrom (Ohyama et al. 2000). Durch Erhöhung der cAMP/cGMP-Konzentration in der Zelle öffnen diese Ionenkanäle, dies löst eine Depolarisation aus. Zusätzlich aktiviert das in die Zelle fließende Ca^{2+} nachgeschaltete Signalkaskaden.

In den Photorezeptoren ist der CNG-Kanal elementarer Bestandteil der Phototransduktionskaskade (siehe Kapitel III.3.1.3). Mutationen in Untereinheiten des Stäbchenkanals wurden in Patienten mit einer Form der autosomal rezessiven Retinitis Pigmentosa gefunden (Dryja et al. 1995, Bareil et al. 2001). CNGA3- oder CNGB3-Mutationen wurden bei Patienten mit absoluter Farbenblindheit nachgewiesen (Kohl et al. 1998, Wissinger et al. 1998, Kohl et al. 2000, Sundin et al. 2000, Wissinger et al. 2001). Die genetische Inaktivierung der A-Untereinheit des Zapfen-CNG-Kanals bei der Maus führt zum Verlust der Zapfenfunktion (Biel et al. 1999).

In olfaktorischen Neuronen vermittelt der CNG-Kanal die cAMP-induzierte Depolarisation nach einem Duftreiz (Abbildung 3). Mäuse, in denen CNGA2 genetisch inaktiviert wurde, zeigen einen Verlust des Geruchsinns (absolute Anosmie) (Brunet et al. 1996, Zhao et al. 2001). Nach Deletion der CNGA4-Untereinheit bei der Maus zeigt sich ein selektiver Defekt in der Unterscheidung verschiedener Düfte und in der Adaptation auf einen Geruchsstoff (Munger et al. 2001, Kelliher et al. 2003).

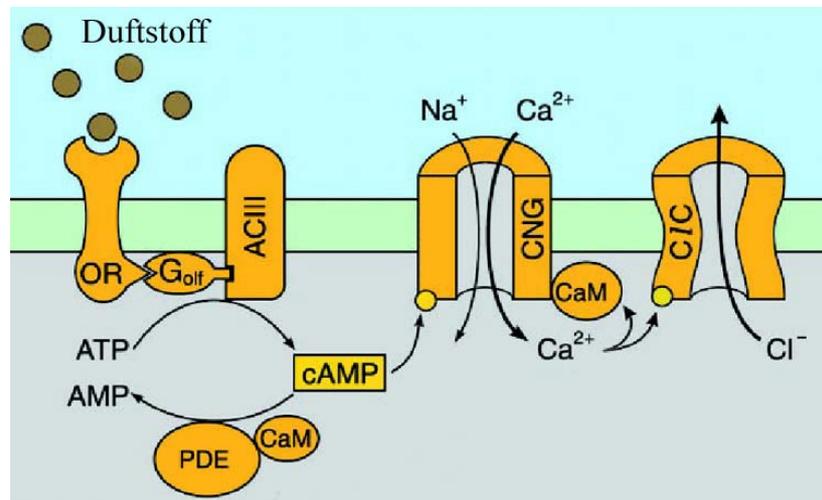


Abbildung 3

Die Riechkaskade in olfaktorischen Neuronen. Die Aktivierung von Duftrezeptoren bewirkt die G-Protein-vermittelte Aktivierung der Adenylylzyklase. Das synthetisierte cAMP bewirkt die Öffnung des CNG-Kanals und den Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} . Die einströmenden Ca^{2+} -Ionen bewirken die Aktivierung des kalziumabhängigen Chloridkanals wodurch Cl^- aus der Zelle strömt. Kombiniert führen diese Ionenströme zu einer Depolarisation, was zur Auslösung eines Aktionspotentials führt und somit eine Reizweiterleitung ermöglicht. Der Prozess kommt durch die kalziumabhängige Aktivierung der Phosphodiesterase und dem Abbau von cAMP zum Erliegen. (AC III = Adenylylzyklase III, CaM = Calmodulin, ClC = kalziumabhängiger Chloridkanal, G_{olf} = olfaktorisches G-Protein, PDE = Phosphodiesterase; Abbildung modifiziert aus Kaupp & Seifert 2002)

CNG-Kanäle wurden auch in zahlreichen sensorischen und nicht-sensorischen Geweben nachgewiesen (für eine Übersicht siehe Richards & Gordon 2000 oder Kaupp & Seifert 2002). Im Gegensatz zur Retina und dem olfaktorischen Epithel ist ihre genaue Funktion in diesen Geweben nicht bekannt.

2 Der Hippocampus und die Amygdala aus funktioneller Sicht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von CNG-Kanälen unter anderem im Hippocampus und der Amygdala der Maus untersucht. Diese Gehirnregionen werden in den folgenden Kapiteln erleutert.

2.1 Der Hippocampus

Die Hippocampus-Formation ist Teil des limbischen Systems, einer Struktur am Rande des Neokortex. Zum limbischen System (*limbus* = Saum) gehören Regionen, die das vegetative Nervensystem kontrollieren und das Zusammenspiel von viszeralen, emotionalen und kognitiven Funktionen koordinieren.

2.1.1 Anatomie

Die Hippocampus-Formation ist im Vergleich zu anderen Gehirnarealen relativ einfach aufgebaut. Sie wird in vier Regionen unterteilt: den Gyrus dentatus (DG, *dentate gyrus*), den eigentlichen Hippocampus (*cornu ammonis*, Regionen CA1, CA2 und CA3), den subikulären Komplex (Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum) und den entorhinalen Kortex. Zwischen den einzelnen Regionen und zu anderen Gehirnregionen bestehen mehrere afferente und efferente Faserverbindungen. Bei den Verbindungen innerhalb der Hippocampus-Formation handelt es sich um unidirektionale Projektionen, was für Verbindungen im Kortex untypisch ist.

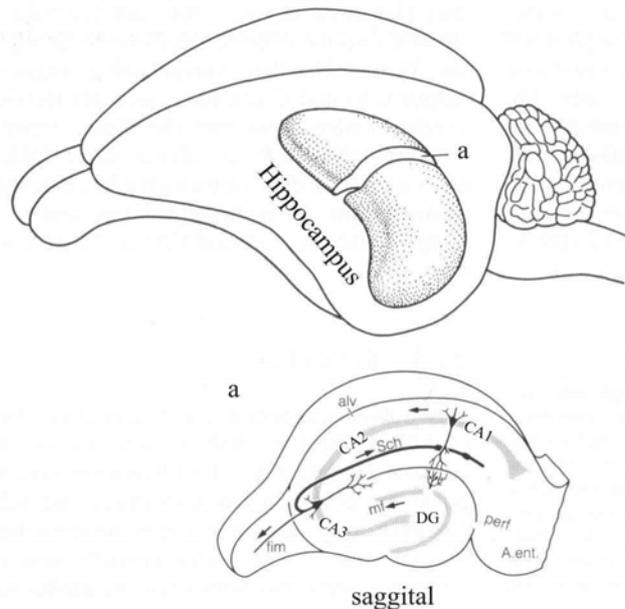


Abbildung 4

Lokalisation und Aufbau des Hippocampus. Darstellung der Lage des Hippocampus im Nagergehirn; Der Aufbau der Zellschichten und der Verlauf der wichtigsten neuronalen Bahnen wird anhand eines saggitalen Querschnittes durch den Hippocampus (a) gezeigt. (CA1 bis 3 = cornu ammonis Region 1-3, DG = gyrus dentatus, Sch = Schaffer Kollaterale). Abbildung modifiziert aus Benninghof, Anatomie Band 2, S. 610

2.1.2 Funktionen

Der Hippocampus spielt eine wichtige Rolle bei bestimmten Formen des Lernens und der Erinnerung in Vertebraten. Eine einseitige Zerstörung von Hippocampus-Strukturen wird oft bei der Temporallappenepilepsie beobachtet. Eine einseitige Resektion des Hippocampus kann bei diesen Patienten zur Heilung führen. Eine zweiseitige Resektion führt jedoch zu schweren Gedächtnisdefekten. Ein eindrucksvolles Beispiel, das in der Literatur Berühmtheit erlangte, ist Patient H.M., dem im jungen Alter der Temporallappen samt Hippocampus und Teilen der Amygdala beidseitig entfernt wurde (Corkin et al. 1997). H.M. zeigte eine schwere anterograde Amnesie (Scoville & Milner 1957), besaß jedoch einen normalen Intelligenzquotienten und konnte motorische und grammatikalische Lernaufgaben sowie schwierige Denkaufgaben gut meistern (Kensinger et al. 2001). Es war ihm jedoch unmöglich, Inhalte, die einen bewussten Abrufprozess erfordern, zu erlernen. Er hatte somit das deklarative Gedächtnis (Wissensgedächtnis) verloren, das prozedurale Gedächtnis (Verhaltensgedächtnis) war jedoch erhalten. In weiteren Untersuchungen konnte bei Patient H.M. zusätzlich ein Defekt in der Verarbeitung und Speicherung räumlicher Informationen gezeigt werden (Corkin 1965, Smith 1988). Um die Funktion des Hippocampus bei Nagern zu

untersuchen, wurde in der Vergangenheit eine Reihe von räumlichen Lernversuchen entwickelt (als Beispiele: Morris 1984, Arns et al. 1999). Mit diesen Verhaltensversuchen wurden die Auswirkungen von Medikamenten bzw. mechanischer oder genetischer Manipulation auf die Funktion des Hippocampus erforscht. Zahlreiche Experimente mit verschiedenen Modellen bewiesen die wichtige Rolle des Hippocampus im Verarbeiten und Speichern von räumlichen Informationen (Eichenbaum et al. 1999).

2.2 Die Amygdala

Die Amygdala (*Corpus amygdaloideum*) gehört wie der Hippocampus zum limbischen System. Sie wurde erstmals 1822 von Burdach (Burdach 1819-1822) am Menschen beschrieben und aufgrund ihrer Form als „Mandelkern“ bezeichnet. Sie ist bei allen Vertebraten zu finden, zeigt aber oft, wie z.B. bei Nagern, nicht die charakteristische Mandelform.

2.2.1 Anatomie

Die Amygdala besteht aus etwa 10 verschiedenen Kernen die unterschiedliche neurophysiologische Funktionen besitzen. Prinzipiell bestehen starke Verbindungen zu sensorischen Systemen. Swanson und Petrovich (1998) haben die Amygdala aus funktioneller Sicht in den zentralen Nucleus, den basolateralen Komplex (bestehend aus lateralem und basolateralem Nucleus) und den olfaktorischen Komplex (bestehend aus den restlichen Kernen) unterteilt.

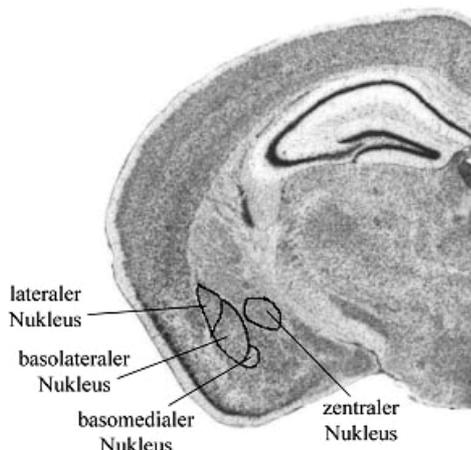


Abbildung 5

Die Amygdala bei der Maus. Lage der Amygdala in einem coronaren Gehirnschnitt der Maus. Lokalisierung der wichtigsten Kerne der Amygdala. (Nissl-gefärbter histologischer Schnitt; modifiziert aus: Mouse Brain Atlas <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>)

2.2.2 Funktionen

Die Kerne der Amygdala steuern eine Vielzahl regulatorischer und verhaltensbezogener Funktionen (Davis & Whalen 2001). Dazu gehören das emotionale Gedächtnis, das soziale und sexuelle Verhalten, das Aggressionsverhalten sowie die Modulation autonomer und endokriner Prozesse. Erste Versuche, durchgeführt von Klüver und Bucy (1937, 1939), zeigten, dass Affen denen beidseitig der Temporallappen einschließlich der Amygdala entfernt wurde, gravierende Störungen des affektiven Verhaltens aufwiesen. Ihr Zustand wurde als „psychische Blindheit“ beschrieben, sie empfanden weder Angst noch Aggression und verloren ihren sozialen Status. Spätere Versuche zeigten, dass diese Symptome allein auf die Schädigung der Amygdala zurückzuführen sind (Weiskrantz 1956; Meyers & Swett 1970). Untersuchungen an Menschen mit früher bilateraler Läsion der Amygdala (Urbach-Wiethe-Krankheit) zeigten ein selektives Defizit im Erkennen von Angstemotionen (Adolphs et al. 1994). Ein sehr elegantes Modell zur Untersuchung der Rolle der Amygdala bei der Bildung des emotionalen Gedächtnisses bei Nagern bietet die akustische

Angstkonditionierung (Maren & Fanselow 1996). Es handelt sich hierbei um eine Version der Pavlov'schen Konditionierung, bei der zunächst ein neutraler Reiz (meist ein Ton) mit einem aversiven Reiz (meist ein Elektroschock über den Käfigboden) verabreicht wird. Wenn das Versuchstier beide Reize verknüpft, lässt sich allein durch den Konditionierungston das Angstverhalten auf den aversiven Reiz auslösen. Bei Nagern kommt das Angstverhalten auf verschiedene Art und Weise zum Ausdruck. So kann eine Erhöhung der Herz- und Atemfrequenz beobachtet werden, aber auch ein Verhalten das als *freezing* (Erstarren) bezeichnet wird. Das *freezing* beschreibt das Einfrieren aller Bewegungen des Körpers (mit Ausnahme der Atembewegung). Es wird häufig als Messparameter bei der Angstkonditionierung verwendet. Die basolaterale Amygdala wird als die Region angesehen, die maßgeblich an der Bildung und Speicherung des emotionalen Gedächtnisses bei der Angstkonditionierung beteiligt ist (Fanselow & LeDoux, 1999). Durch der neuronale Verschaltung der basolateralen Amygdala mit unterschiedlichen Regionen, werden die vielseitigen Angstreaktionen ermöglicht (Abbildung 6). In Abbildung 6 sind die wichtigsten Regionen gezeigt, die bei der Angstkonditionierung eine Rolle spielen. Abbildung 7 gibt einen Überblick über die Funktionen der basolateralen Amygdala und die neuronalen Verschaltungen, die dem jeweiligen Verhalten zugrundeliegen.

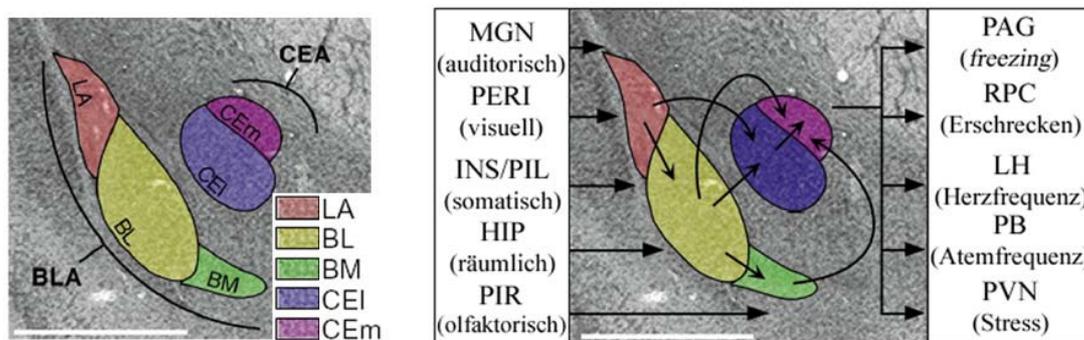


Abbildung 6

Neuronale Verschaltung der wichtigsten Kerne der Amygdala. (*BLA* = basolateraler amygdalärer Komplex, *BL* = basolaterale Amygdala, *BM* = basomedialer Nucleus, *Cel* = lateraler zentraler Nucleus, *Cem* = medialer zentraler Nucleus, *LA* = lateraler Nucleus; *INS* = Cortex insularis, *HIP* = Hippocampus, *LH* = lateraler Hypothalamus, *MGN* = Nucleus geniculatum medialis, *PAG* = periaquäduktales Grau, *PB* = Nucleus parabrachialis, *PERI* = perirhinaler Cortex, *PIL* = Nucleus thalami posterior intralaminaris, *PIR* = Cortex piriformis, *PVN* = Nucleus paraventricularis thalami, *RPC* = Nucleus reticularis pontis caudalis). Der Skalierungsbalken entspricht 1 mm. Abbildung modifiziert aus Maren 1999.

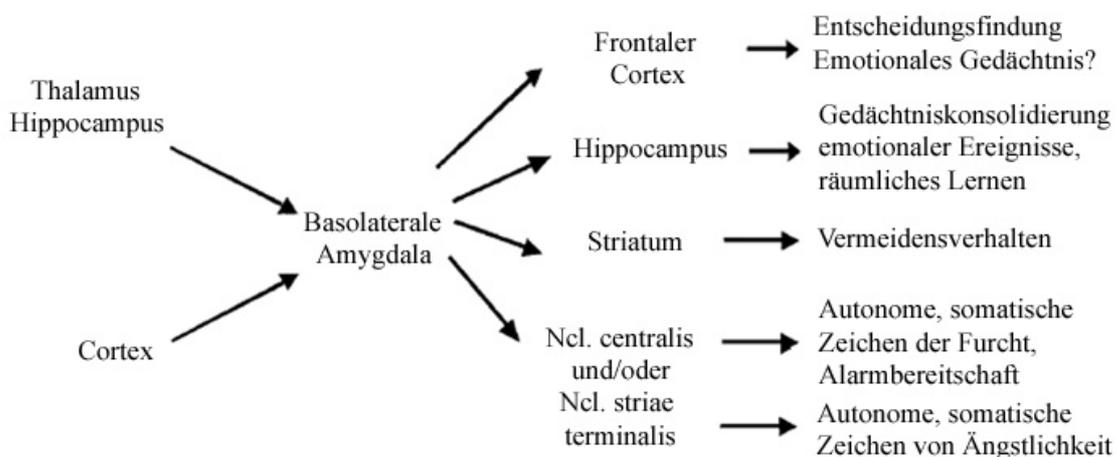


Abbildung 7

Funktionen der basolateralen Amygdala. Abbildung modifiziert aus Davis & Whalen, 2001.

2.3 Molekulare und physiologische Korrelate des Lernens

Nach der Hebb'schen Theorie (Hebb 1949) sind die Verbindungen zwischen Nervenzellen plastisch. Demnach werden synaptische Verknüpfungen je nach Beanspruchung verstärkt oder abgeschwächt. Dieses Phänomen der strukturellen Anpassung der Synapsen, welches mit einer Vielzahl von Veränderungen auf molekularer Ebene einhergeht, wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Mit jeder Erregung von Synapsen erhöht sich die Effizienz der synaptischen Transmission. Diese kann man mit elektrophysiologischen Methoden untersuchen. Nach Stimulation von Afferenzen an *in vitro* Gehirnpräparaten kann postsynaptisch eine Veränderung des exzitatorischen Potentials gemessen werden. Eine langanhaltende Veränderung der synaptischen Transmission wird als Langzeitplastizität bezeichnet. Man unterscheidet zwischen einer Verstärkung, auch Langzeitpotenzierung genannt (LTP, *long-term potentiation*), und einer Verminderung der postsynaptischen Antwort, auch als Langzeitdepression bezeichnet (LTD, *long-term depression*). In vielen Gehirnregionen, unter anderem auch im Hippocampus und der Amygdala, konnte bei glutamatergen Synapsen Langzeitplastizität beobachtet werden (siehe Übersichten von Bliss & Collingridge 1993, Linden 1994, Malenka 1994, Maren 1996, Rogan & LeDoux 1996). In Abhängigkeit von der Stärke der Stimulation kann an vielen exzitatorischen Synapsen im ZNS sowohl LTP als auch LTD induziert werden. Man vermutet, dass unterschiedliche Schwellenwerte der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) dieser Fähigkeit zur bidirektionellen Modulierung zugrunde liegen (Bienenstock et al. 1982, Bear 1995). Nach heutiger Ansicht werden durch eine starke Zunahme von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Proteinkinasen aktiviert, die Substratproteine phosphorylieren, und so zu einer LTP-Induktion führen. Eine geringere Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt demnach zu einer Aktivierung von Proteinphosphatasen, die durch Proteindephosphorylierung eine LTD auslösen (Bear & Malenka 1994, Tsumoto et al. 1996). Die synaptische Lokalisierung der LTP- bzw. LTD-Expression wird kontrovers diskutiert; es werden sowohl prä- als auch postsynaptische Mechanismen vermutet. Nach der klassischen Theorie von Hebb (1949) ist für die Induktion von synaptischer Plastizität eine Koinzidenz von prä- und postsynaptischer Aktivität notwendig. Veränderungen in der synaptischen Plastizität werden als das physiologische Korrelat des Lernens angesehen (Bliss & Collingridge 1993, Nicoll & Malenka 1995, Maren 1999). Dies beweisen auch zahlreiche Studien an Nagern, bei denen eine Veränderung von LTP und/oder LTD eine veränderte Leistung bei Lerntests bewirkt. Die meisten Ergebnisse stammen aus Arbeiten am Hippocampus, ähnliches wurde jedoch auch für die Amygdala gezeigt (Maren 1996, Rogan & LeDoux 1996, Rammes et al. 2000). An Ratten konnte gezeigt werden, dass aus der pharmakologischen Blockade der LTP eine Verschlechterung des räumlichen Orientierungsvermögens resultiert (Morris et al. 1986). Es besteht jedoch nicht immer eine kausale Verbindung zwischen LTP/LTD und räumlichem Lernen (Tsien 2000). So findet man Berichte von genetisch veränderten Mäusen, bei denen erhöhte LTP im Hippocampus sowohl mit verbessertem (Tang et al. 1999, Futatsugi et al. 1999) als auch mit verschlechtertem räumlichem Lernen verknüpft ist (Migaud et al. 1998, Gu et al. 2002, Yan et al. 2002). Desweiteren sind Veränderungen der LTP ohne erkennbare Auswirkungen auf das Lernen beschrieben (Meiri et al. 1998). All diese Ergebnisse lassen auf eine sehr komplexe Natur des Gedächtnisses schließen, bei der die Feinabstimmung zwischen Erregung und Inhibition von Synapsen eine große Rolle spielt.

3 Die Netzhaut

Die Netzhaut (Retina), entwicklungsbiologisch gesehen ein Teil des ZNS, ist ein hochspezialisiertes Gewebe, das in der Lage ist, Lichtenergie zu absorbieren, in elektrische Reize umzuwandeln und den visuellen Sinneseindruck an das Gehirn weiterzuleiten. Der Prozess der Umwandlung der Lichtenergie in ein elektrisches Signal findet in spezialisierten lichtsensitiven Neuronen, den Photorezeptoren, statt und wird Phototransduktion genannt (Ebrey & Koutalos 2001, McBee 2002).

3.1.1 Aufbau

Die Netzhaut ist aus mehreren Schichten aufgebaut (Abbildung 8A und 8B). In den Außensegmenten (OS) der Stäbchen und Zapfen finden sich alle wichtigen Bestandteile der Phototransduktionskaskade. Zusammen mit den Innensegmenten (IS) bilden sie die Photorezeptorschicht. Die äußere Körnerschicht (ONL) besteht aus den Kernen der Photorezeptoren. Die Schicht, in der die Photorezeptoren Synapsen mit den Neuronen zweiter Ordnung formen, wird als äußere plexiforme Schicht bezeichnet (OPL). In der inneren Körnerschicht (INL) befinden sich Bipolarzellen, Horizontalzellen und Amakrinzellen. Die innere plexiforme Schicht (IPL) wird durch die Axone dieser Intermediärneurone und deren Synapsen mit den Ganglienzellen gebildet. Die Axone der Ganglienzellen bilden den Sehnerv (*Nervus opticus*), der am blinden Fleck (Papille) aus dem Auge austritt und für die Reizweiterleitung ins Gehirn sorgt. Die Müller-Gliazellen durchziehen die gesamte Retina und spielen nach neueren Erkenntnissen neben Stützfunktionen auch eine Rolle in der Regeneration der Photopigmente (Mata et al. 2002).

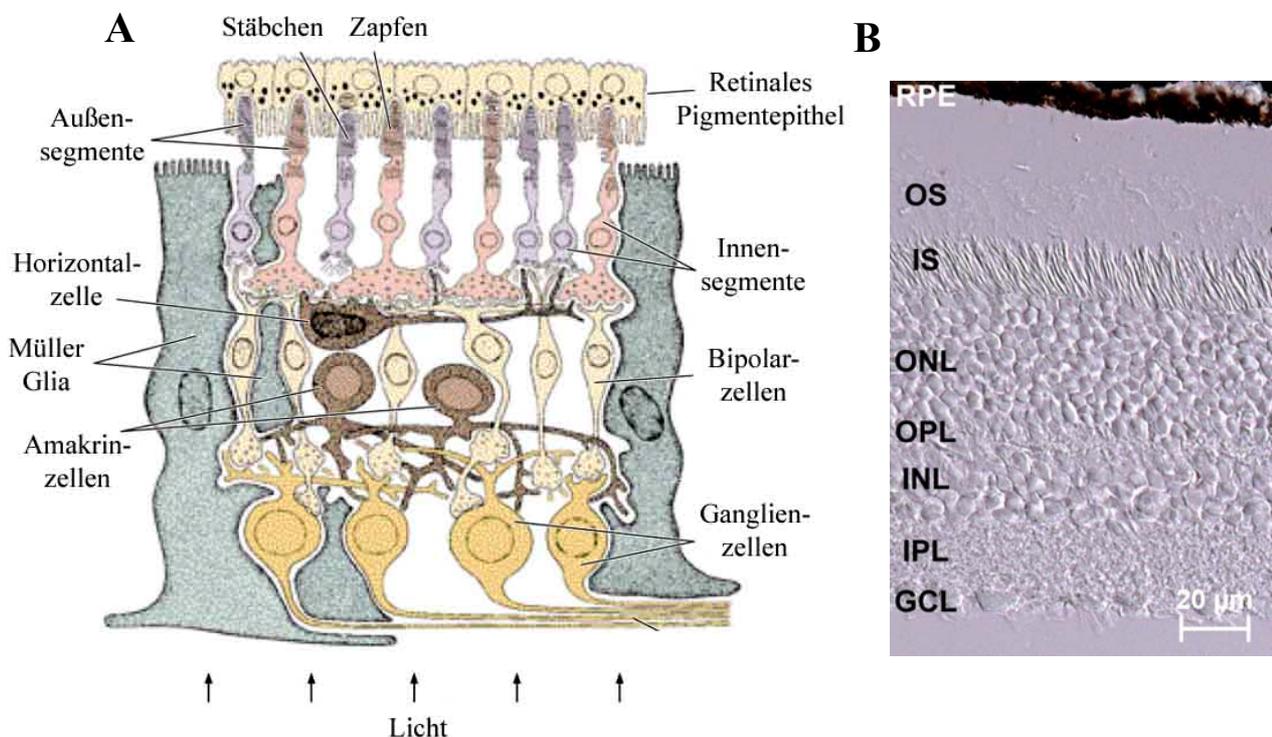


Abbildung 8

Aufbau der Netzhaut. A) Schematische Darstellung der Netzhaut. Abbildung modifiziert aus *Basic Histology Text & Atlas*, Junqueira et al. 2002, McGraw-Hill/Appleton & Lange, 10th edition. B) DIC-mikroskopische Durchlichtaufnahme der Mausretina (RPE = retinales Pigmentepithel, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht).

Nach außen hin grenzt die Pigmentepithelschicht (RPE) an die Photorezeptor-Außensegmente, mit denen sie in physiologischem Kontakt steht. Die RPE-Zellen sind mit Melaningranula gefüllt und sorgen dadurch für die Absorption von Streulicht. Zusätzlich versorgt das RPE die Photorezeptoren mit Nährstoffen. Da die Außensegmente der Photorezeptoren eine begrenzte Lebensdauer besitzen, müssen sie permanent erneuert werden. Das RPE ist für die Phagozytose der kontinuierlich nachwachsenden Außensegmente verantwortlich (Young & Bok 1969, Finnemann et al. 1997). Das Außensegment eines Stäbchens wird innerhalb von 8 bis 14 Tagen vollständig ersetzt, das eines Zapfens innerhalb eines Jahres. Eine weitere wichtige Funktion der RPE-Zellen ist die Regenerierung der Photopigmente; all-trans-Retinal wird zu 11-cis-Retinal oxidiert, das dann erneut durch den Einbau in ein Opsin als aktivierbares Lichtpigment bereitsteht.

3.1.2 Skotopisches und photopisches System

Es existieren zwei getrennte visuelle Systeme in Retina. Das skotopische System besteht aus Seh-Stäbchen und deren nachgeschalteten Neuronen (Ebrey & Koutalos 2001, Müller & Kaupp 1998). Die Stäbchen sind in der Lage, durch Absorption eines einzigen Photons eine Lichtantwort zu generieren. Eine sehr rasch eintretende Sättigung sorgt dafür, dass die meisten Stäbchen bei Tageslicht inaktiv sind (Tamura et al. 1989, Ebrey & Koutalos 2001). Eine große Anzahl von Seh-Stäbchen sind mit einem Neuron zweiter Ordnung verschaltet. Daraus ergibt sich die geringe räumliche Auflösung, erhöht jedoch die Empfindlichkeit des skotopischen Systems. Das photopische System ermöglicht das Scharf- und Farbsehen am Tag. Die darauf spezialisierten Photorezeptoren sind die Seh-Zapfen. Sie sind weniger sensitiv als die Stäbchen, besitzen aber einige Eigenschaften, die den Stäbchen fehlen. So zeigen sie eine schnellere Lichtantwort (Hestrin & Korenbrot 1990, Tachibanaki et al. 2001) und ermöglichen durch eine geringere Konvergenz auf die Sekundärneuronen eine höhere Sehschärfe (Wässle & Boycott 1991). Im gelben Fleck des menschlichen Auges ist ein Seh-Zapfen mit einer Bipolarzelle verknüpft. Durch die Bestückung der Zapfen mit unterschiedlichen Farbpigmenten wird das Farbsehen ermöglicht (Nathans et al. 1986). Der Mensch besitzt drei Zapfenarten, die Lichtpigmente mit unterschiedlicher Wellenlängensensitivität tragen. Man unterscheidet Opsine, die kurzwellenlängensensitiv (SWS oder *blue cones*, 420nm), mittelwellenlängensensitiv (MWS oder *green cones*, 531nm) oder langwellenlängensensitiv (LWS oder *red cones*, 551/558nm) sind (Ebrey & Koutalos 2001). Bei der Maus findet man nur kurz- und mittelwellenlängensensitive Opsine.

3.1.3 Die Phototransduktion

In den Photorezeptor-Außensegmenten befinden sich die lichtempfindlichen Sehpigmente. Sie bestehen aus einem Opsin (das Rhodopsin in den Stäbchen oder eines der Zapfenopsine in den Zapfen) und dem Chromophor 11-cis-Retinal. Die Absorption von Licht (Abbildung 9) führt zur Isomerisierung von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal und zu einer Konformationsänderung des Opsins. Diese Lichtreaktion ist der initiale Schritt einer Kaskade, die letztendlich die visuelle Sinneswahrnehmung ermöglicht. Die aktive Form des Opsins aktiviert das GTP-bindende Protein Transducin, das wiederum die Phosphodiesterase (PDE) aktiviert. Die PDE hydrolysiert cGMP zu GMP wodurch die im Dunklen hohe cGMP-Konzentration in den Außensegmenten rapide abfällt und der CNG-Kanal schließt. Der Ioneneinstrom, vorwiegend durch Na^+ getragen (Nakatani & Yau 1988, Ohyama et al. 2000), kommt dadurch zum Erliegen. Die Zelle hyperpolarisiert, da durch Kaliumkanäle und kaliumabhängige Natrium-Kalzium-Austauscher Kationen und somit positive Ladungen aus der Zelle heraus transportiert werden. An den Synapsen der hyperpolarisierten

Photorezeptoren kommt die Ausschüttung des Botenstoffs Glutamat zum Erliegen. Dies wird durch Glutamatrezeptoren der nachgeschalteten Bipolarzellen registriert. Die Seh-Kaskade besitzt eine sehr hohe Effizienz, da ein aktiviertes Lichtpigment etwa 120 Transducin-Moleküle bzw. 120 bis 150 PDE-Moleküle pro Sekunde aktiviert und ein aktives PDE-Molekül bis zu 2000 cGMP-Moleküle in der Sekunde spalten kann (Leskov et al. 2000). Die Phototransduktionskaskade besitzt mehrere Rückkopplungsschritte, so dass sehr rasch eine Erholung bzw. eine Adaptation eintritt (Matthews et al. 1988, Nakatani & Yau 1988, Tamura et al. 1989, Detwiler et al. 1996, Pugh et al. 1999, Fain et al. 2001).

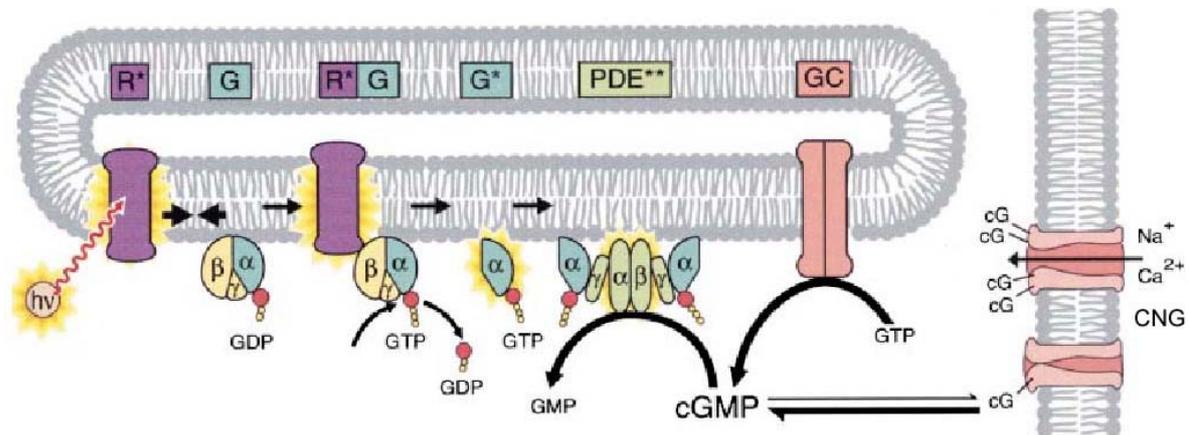


Abbildung 9

Vereinfachte Darstellung der Phototransduktionskaskade. Nach Absorption von Lichtenergie und erfolgter Konformationsänderung aktiviert das Opsin das G-Protein Transducin und aktiviert es. Das aktivierte Transducin ersetzt GDP durch GTP und setzt die α -Untereinheit frei. Die aktivierte Transducin α -Untereinheit bindet an die inhibierende γ -Untereinheit der Phosphodiesterase, wodurch diese aktiviert wird. Durch die Phosphodiesterase wird nun vermehrt cGMP abgebaut. Hierdurch kommt der durch Kationen getragene Dunkelstrom durch den cGMP-aktivierte CNG-Kanal zum Erliegen. Das bewirkt eine Hyperpolarisation der Photorezeptoren, da weiterhin durch Ionenaustauscher und Ionenkanäle positive Ladung aus der Zelle befördert wird. [R^* = aktiviertes Opsin, G = Transducin (α -, β -, γ -Untereinheit), PDE^{**} = aktivierte Phosphodiesterase (α -, β -, γ -Untereinheit), GC = Guanylylzyklase]; Abbildung aus Leskov et al. 2000.

3.1.4 Netzhautdegeneration

Blindheit entsteht häufig durch eine genetisch bedingte Netzhautdegeneration. Durch Schädigung elementarer Gene kommt es zu einer neuronalen Degeneration der Retina. Dabei ist meist ein progressiver Verlust von Photorezeptoren zu beobachten, welcher zu einer Einschränkung der Sehfähigkeit oder gar zur Erblindung führt. Die Fortschritte der Molekularbiologie ermöglichten es in den vergangenen Jahren genetische Defekte aufzuklären, die verschiedene Formen der Netzhautdegeneration bewirken (siehe RetNet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet>). Je nach Funktion der kodierten Proteine kann man diese in folgende Gruppen unterteilen:

- Proteine, die an der Phototransduktionskaskade beteiligt sind (z.B. Opsine, Phosphodiesterasen)
- Strukturproteine (z.B. Peripherin, ROM1)
- Proteine des retinalen Pigmentepithels (RPE) (z.B. RPE65, ABCR)
- Transportproteine (z.B. TULP1)
- An der retinalen Entwicklung beteiligte Proteine (z.B. CRX, Pax2)
- Sonstige (z.B. Bcl-2, HRG4) bzw. unbekannte Proteine

Es existiert eine Reihe von Tiermodellen, die eine genauere Erforschung dieser Krankheiten ermöglichen (Fauser et al. 2002). Die meisten bisher erhobenen Daten beziehen sich auf Degenerative Prozesse, die das skotopische System betreffen (für einen Überblick siehe Phelan & Bok 2000). Bei den meisten retinalen degenerativen Modellen ist ein rascher Zelltod zu beobachten; als Mechanismus konnte in vielen Fällen apoptotische Vorgänge ausgemacht werden (Remé et al. 1998, Travis 1998).

3.1.5 Totale Farbenblindheit

Die totale Farbenblindheit, auch komplette Achromatopsie oder Stäbchen Monochromatismus genannt (ACHM Typ 1 bis Typ 4), ist eine seltene (Prävalenz von etwa 1:30000; François 1961) autosomal rezessiv vererbte Augenerkrankung. Sie ist charakterisiert durch reduzierte Sehschärfe, Nystagmus und komplette Unfähigkeit, zwischen Farben zu diskriminieren (Sharpe & Nordby 1990). Klinische Untersuchungen an betroffenen Patienten zeigen intakte Seh-Stäbchen, jedoch totale Abwesenheit von Zapfen-vermittelten Antworten in Elektroretinogrammen. In den letzten Jahren konnten verschiedene Mutationen in Genen identifiziert werden, die für diese Erkrankung verantwortlich sind. Vier Formen der totalen Farbenblindheit sind als ACHM 1 bis ACHM 4 beschrieben. Das Gen das für ACHM 1 verantwortlich ist, wurde bisher noch nicht identifiziert. Kohl et al. fanden Mutationen im CNGA3-Gen bei Patienten mit totaler Achromatopsie. Diese Form wurde ACHM 2 genannt. Mutationen im CNGB3-Gen führen zur totalen Farbenblindheit vom Typ ACHM 3 (Kohl et al. 2000, Sundin et al. 2000). Vor kurzem gelang es Mutationen in einem weiteren Gen (GNAT2; Kohl et al. 2002) zu identifizieren und diese mit der totalen Farbenblindheit zu verknüpfen (ACHM 4). ACHM 3 ist mit 40-50 % die häufigste Form, ACHM 2 mit 20-30 % die zweithäufigste Form der Stäbchen-Monochromasie (Kohl et al. 2002). Der Anteil der Farbenblinden Patienten mit der ACHM 4-Form macht nur etwa 2 % aus.

Die CNGA3 -/- Maus stellt ein Tiermodell für ACHM 2 dar. Sie ist somit ideal für die Erforschung molekularer Vorgänge der ACHM, wodurch eine Grundlage für mögliche Therapieansätze geschaffen werden könnte.

4 Apoptose

In eukaryontischen Zellen existieren zwei Arten von Zelltod: die Nekrose und die Apoptose. Im ersteren Fall handelt es sich um ein mehr oder weniger unkontrolliertes Absterben von Zellen bzw. ganzen Zellarealen. Der Begriff Apoptose (gr. *απο* = von, ab; *πτωσις* = das Fallen, "zugrunde gehen"; wird im Griechischen verwendet, um den Fall des Herbstlaubes zu beschreiben) wurde erstmals von Kerr et al. (1972) eingeführt, um einen Prozess des Zelltods zu beschreiben, der sehr kontrolliert mit der Abfolge bestimmter struktureller Veränderungen abläuft. Aus diesem Grund spricht man bei der Apoptose vom programmierten Zelltod (PCD, *programmed cell death*). Die Apoptose ist meist auf eine Zelle oder eine kleine Anzahl von Zellen beschränkt. Charakteristische zelluläre Veränderungen laufen in einer definierten zeitlichen Reihenfolge ab. Zunächst kondensiert das Chromatin und die DNS wird in den Nukleosomen abgebaut. Anschließend sind eine Zellschrumpfung und Abschnürungen der Plasmamembran zu beobachten, die zur Ausbildung von Vesikeln, den sogenannten *apoptotic bodies* führen. Durch Veränderungen an der Plasmamembran, wie die Externalisierung von Phosphatidylresten, entstehen Signale, die zu einer Phagozytose der Zellreste führen (Duvall et al. 1985). Im Gegensatz zur Apoptose sind bei der Nekrose, die aufgrund toxischer, mechanischer, thermischer oder metabolischer Reize auftritt, oft größere Zellareale betroffen. Die Nekrose ist charakterisiert durch ein Anschwellen der Zelle und der Zellorganellen und

anschließendem Platzen. Das Austreten lysosomaler Enzyme sorgt meist für eine Schädigung benachbarter Zellen.

Zahlreiche wichtige Forschungsergebnisse führten in den letzten Jahren zur Aufklärung molekularer Mechanismen der Apoptose (Hengartner 2000). Das Vorliegen einer Apoptose lässt sich durch die morphologischen Veränderungen (Kerr et al. 1995) und den molekularen Nachweis der DNS-Fragmentation (Wyllie 1980, Gavrieli et al. 1992) bzw. den Nachweis an der Apoptose beteiligter Proteine beurteilen.

Die Apoptose ist ein wichtiger, genetisch kontrollierter Prozess, durch den Zellen aus dem Organismus entfernt werden. Sie ist in der Embryogenese, der Organentwicklung und Gewebeausdifferenzierung, aber auch bei der Wundheilung unverzichtbar. Auch in neurodegenerativen Prozessen wird eine Aktivierung der Apoptose beobachtet, so z.B. bei Morbus Alzheimer, Parkinson oder der Chorea Huntington (Mattson 2000).

5 Zielstellung

Bisher ist unklar, ob CNG-Kanäle im ZNS eine physiologische Funktion ausüben. Die CNGA3-defiziente Mauslinie (Biel et al. 1999) stellt ein geeignetes Modell dar, dieser Fragestellung nachzugehen. Als Basis für funktionelle Experimente, sollte die Expression aller bekannten CNG-Untereinheiten in vier Gehirnregionen untersucht werden. Hierbei sollte die Expression in der Wildtypmaus mit der in CNGA3-defizienten Mäusen verglichen werden.

Weiterführend sollte die Funktion dieser Ionenkanäle bei der synaptischen Transmission im Hippocampus untersucht werden. Mit Lernversuchen, die das räumliche und das emotionale Gedächtnis testen, sollte die Funktion von Amygdala und Hippocampus bei diesen Tieren beurteilt werden.

Es ist bekannt, dass CNGA3 für die Funktion der Seh-Zapfen eine essentielle Bedeutung hat (Biel et al. 1999). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Ereignisse, die zur Neurodegeneration der Retina bei CNGA3-defizienten Mäusen führen, im Detail charakterisiert werden. Die beobachtete Degeneration der Netzhaut sollte zeitlich und räumlich definiert werden. Daraus sollten nähere Erkenntnisse über den zapfenvermittelten Signalweg in der Netzhaut gewonnen werden. Diese Daten sollten außerdem als Grundlage dienen für Therapieansätze, die als Ziel die Wiederherstellung der Zapfenfunktion bei totaler Farbenblindheit haben.

IV. Material und Methoden

Allgemein wurden Chemikalien und Lösungen höchster Reinheit und molekularbiologischer Qualität der Firmen Roth und Merck verwendet, falls nicht anders erwähnt. Zur Herstellung aller Lösungen wurde sterilfiltriertes Wasser, das durch eine EASYpure UV/UF-Anlage (#D8612-33, WeteA Wilhelm Werner GmbH) aufbereitet wurde, verwendet.

1 Versuchstiere

1.1 Verwendete Mauslinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse, bei denen durch *gene targeting* das Gen CNGA3 inaktiviert wurde (Biel et al.1999) untersucht. Zwei Inzuchtlinien wurden verwendet, eine mit dem genetischen Hintergrund von sv 129 (Stamm sv129) und eine von C57-BL6/N-Mäusen.

1.2 Haltung und Zucht

Die Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der TU München unter Aufsicht von Pflegepersonal gehalten. Verwendet wurden Polycarbonatkäfige Typ II (für bis zu 5 adulte Tiere) und Typ III (für bis zu 12 adulte Tiere) der Firma Ehret. Als Einbettstreu wurde autoklavierte Weichholzfaser 3-4 (Altromin) verwendet. Die Tiere erhielten *ad libidum* Trinkwasser und Zuchtfutter Typ 1314 für Ratten und Mäuse (Altromin). Zur Zucht wurden zwei Weibchen im gebärfähigen Alter (6-45 Wochen) mit einem Männchen (7 Wochen bis 1½ Jahre alt) zusammengesetzt. Zur Genotypisierung (IV.1.3) wurde den Nachkommen im Alter von 7-14 Tagen Schwanzgewebe entnommen. Bis zum Alter von 4 Wochen wurden die Jungtiere bei den Müttern belassen.

1.3 Genotypisierung mittels PCR

Die entnommenen Schwanzproben (ca. 2 mm) wurden für mindestens 3 Stunden oder über Nacht mit 20µg Proteinase K (Roche) in 100 µl PCR-Puffer (Roche oder Promega) bei 55 °C lysiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K (15 min bei 95 °C) wurde die PCR (IV.5) durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Reaktionen durchgeführt, eine PCR mit den Primern mCG7f und mCG8r, die ein 284 bp Fragment innerhalb des deletierten Genabschnittes amplifizieren und eine mit den Primern mCG19f und NeoPA die ein 320 bp Fragment aus dem insertierten Genabschnitt amplifizieren. Die Primer-Sequenzen und das PCR Protokoll sind im Anhang beschrieben (VIII.1 und VIII.2). Die PCR wurde anschließend auf 2 %-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Anregung am Geldoc 2000 (Biorad) visualisiert. Bei Wildtyp Mäusen ergibt nur das Primerpaar mCG7f/mCG8r ein Produkt, bei homozygoten CNGA3-knock out Mäusen nur mCG19f/NeoPA und bei heterozygoten Mäusen sind beide Produkte zu sehen.

2 Gewebisisolierung

2.1 Allgemein

Die verschiedenen molekularbiologischen und biochemischen Analysemethoden setzen eine saubere und schnelle Isolierung von Gewebe voraus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeproben aus dem Auge und dem ZNS CNGA3-defizienter Mäuse und Kontrollmäuse isoliert und untersucht. Im Falle der Isolierung von Gewebe für die Extraktion von RNS wurde ein besonderes Augenmerk auf schnelles und kontaminations-freies Arbeiten gelegt. Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Für die Tierversuche lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor (211-2531-58/01 und 211-2531-39/99).

2.2 Isolierung von ZNS-Gewebe der Maus

2.2.1 Isolierung von Gesamtgehirn für die Histologie

Das Mausgehirn wurde als Ganzes freigelegt, sofort in auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperiertem 2-Methylbutan schockgefroren und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. 10-14 μm dünne coronare oder sagittale Gefrierschnitte wurden mit einem Kryotom (HM-500; Microm) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger (Roth) aufgebracht.

2.2.2 Präparation von Riechkolben, Cerebellum und Hippocampus

Für die Extraktion von RNS wurden olfaktorischer Bulbus, Kleinhirn und Hippocampus im Ganzen freihand unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000; Zeiss) isoliert. Es wurde auf ein schnelles und schonendes Arbeiten geachtet. Die Gewebe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3 Mikropräparation der basolateralen Amygdala

Die Mikropräparation der basolateralen Amygdala und Regionen des Hippocampus wurden am gefrorenen Gesamthirn (IV.2.2.1) durchgeführt. Gearbeitet wurde am Kryotom HM-500 (Microm) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und unter externer Beleuchtung. Verwendet wurden neurologische Gewebestanzer (Fine Science Tools) mit einem Durchmesser von 0,8 mm für die Amygdala und 1,0 mm für den Hippocampus. Die Eindringtiefe wurde mit einem Kunststoffring auf 1,2 mm limitiert. Zur Orientierungshilfe wurde der stereotaxische Atlas des Mausgehirns (Paxinos & Franklin, 2001) verwendet. Das Mausgehirn wurde mit OCT-Einbettmedium (Tissue Tek #4583; SCI Science Services) auf einem Gewebefixierteller (Microm oder Leica) fixiert. In 50 μm -Schritten wurde das Gewebe vom Vorderhirn ausgehend geschnitten. Der Punkt (Interaural 3.94, Bregma 0.14), an dem sich die vorderen Kommissurenbahnen (*Commissura anterior, pars anterior; aca*) vereinigen, wurde als Fixpunkt genommen. 1,3-1,4 mm tiefer (26-28 50 μm -Schnitte weiter) wurde die basolaterale Amygdala präpariert. Da die Amygdala im ungefärbten Gewebeverbund nicht erkennbar ist, wurde mit Hilfe histologischer Färbungen gearbeitet. Schnitt 26-28 wurde auf einem Objektträger aufgeschmolzen, eine histologische Färbung nach Nissl (IV.15.2.1) durchgeführt und unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000; Zeiss) mit einem Zirkel der Abstand zwischen dem dritten Ventrikel und der basolateralen Amygdala bestimmt. Mit dem Zirkel wurde anschließend im Gewebe eine Markierung der rechten und linken Amygdala gesetzt und die Güte der Markierung mit Hilfe eines weiteren histologischen Schnittes bewertet. Mit Hilfe dieser Information konnte mit dem Gewebestanzer die basolaterale Amygdala isoliert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Für Kontrollzwecke wurden Mikropräparationen aus den Regionen CA1-CA2-DG des Hippocampus angefertigt. Die Güte der Präparationen wurde mit Hilfe histologischer Schnitte abgesichert (siehe Abbildung 10). Die Gewebe wurden zur Isolierung von Poly(A)-RNS verwendet (IV.3.1).

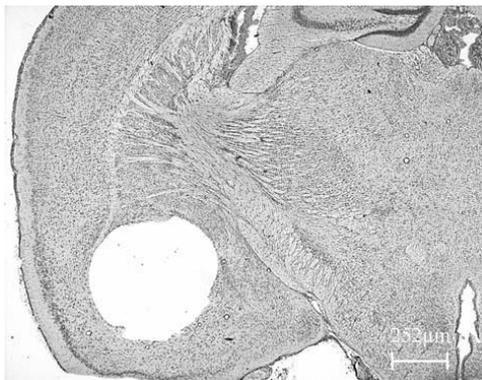


Abbildung 10

Darstellung der Region der Amygdala nach erfolgter Mikropräparation. *Nissl-gefärbter histologischer Kontrollschnitt nach der Mikropräparation. Bei erfolgreicher Präparation war die Entnahme von Gewebe ausschließlich innerhalb der Gabelung der commissura externa zu erkennen.*

2.3 Isolierung von Augengewebe der Maus

2.3.1 Isolierung der Netzhaut für die Histologie

Die Augen wurden an der toten Maus zur Beibehaltung der Orientierung mit Hilfe einer glühenden Nadel markiert, anschließend herauspräpariert und sofort in gekühlte, sterilfiltrierte 0,1 M Phosphatpufferlösung (PB, pH 7,4, 4 °C) gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurde unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000; Zeiss) gearbeitet. Mit einer 0,8 mm Kanüle (Terumo) wurde an der *ora serrata* eine Permeabilisierungsöffnung gesetzt. Die Augen wurden dann für 5 Minuten in 4 % Paraformaldehyd in 0,1M PB (4 % PFA/PB, 4 °C) präfixiert. Anschließend wurde das Auge mit einer Mikroaugenschere (Typ Mini-Vanas, Schnittfläche 3mm; Frohnhäuser) entlang der *ora serrata* aufgeschnitten und Hornhaut und Linse entfernt. Um die räumliche Information beizubehalten, wurden feine Orientierungsschnitte gesetzt. Die Augen wurden nun für 60 bis 90 Minuten in 4 % PFA/PB bei 4 °C nachfixiert. Nach drei 20 minütigen Waschschrritten in 0,1 M PB bei 4 °C wurde das Gewebe über Nacht in 30 % Saccharoselösung in 0,1 M PB kryoprotectiert. Am nächsten Tag wurde das Auge in OCT Einbettmedium eingebettet, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Nach Befestigen der so hergestellten Präparate auf Schneidtellern (Microm oder Leica) mit OCT wurden serielle 10 µm Kryoschnitte angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger (Roth) geschmolzen. Die Gefrierschnitte wurden an einem Kryotom der Firma Microm (HM-500) bei -30 °C gefertigt und für histologische und immunhistologische Färbungen (IV.15.2) verwendet.

2.3.2 Isolierung der Netzhaut für Protein- oder RNS-Extraktion

Die Isolierungsprozedur gleicht der unter IV.2.3.1 beschriebenen Methode mit wenigen Änderungen. Die Markierung der Orientierung und das Fixieren sind hier nicht notwendig. Im Falle der Isolierung zur Proteinbestimmung wurde nach Abtrennung der Hornhaut und Linse mit Hilfe zweier Feinpinzetten (Typ #5 Dumont; Fine Science Tools) unter dem Stereomikroskop die Netzhaut vom umgebenden Gewebe abgelöst und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Netzhaut bei -80 °C gelagert. Im Falle der Isolierung der Netzhaut zur Gewinnung von RNS wurde nach Setzen der Permeabilisierungsöffnung das Auge in eine Lösung gegeben, die RNAsen deaktiviert (RNAlater; Qiagen) gegeben und die Netzhaut in dieser Lösung freigelegt. Gelagert wurde die Netzhaut bis zur Verwendung bei -20 °C in 100 µl RNAlater Lösung.

2.3.3 Whole mount Präparate der Mausnetzhaut

Immunhistochemische und lektin histochemische Untersuchungen wurden auch an ganzen isolierten Retina-Präparaten (*whole mount*) durchgeführt. Hierzu wurde das Auge wie unter IV.2.3.1 präpariert. Die Nachfixierung wurde für nur 30 Minuten durchgeführt. Nach den Waschschrritten wurde nicht kryoprotectiert, sondern mit Hilfe zweier Feinpinzetten (Typ #5 Dumont; Fine Science Tools) unter dem Stereomikroskop die Netzhaut freigelegt und gleich anschließend mit der Immunhistochemie fortgefahren (IV.15.4).

2.3.4 Isolierung der Netzhaut für die Rasterelektronenmikroskopie

Die Isolierung der Netzhaut wurde prinzipiell wie unter IV.2.3.1 und IV.2.3.3 beschrieben durchgeführt, nur dass für 10 Minuten präfixiert wurde und anschließend die Subregionen aus dem oberen (*dorsal*) und unteren (*ventral*) Quadranten isoliert wurden und mit denen weitergearbeitet wurde. Nach drei 10-minütigen Waschschrritten wurde mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1M Natriumcacodylat-Lösung über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurde 2 Stunden bei 4 °C mit 0,1M Natriumcacodylat-Lösung gewaschen und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 1 % Osmiumtetroxid in 0,1M

Natriumcacodylat nachfixiert. Nach zwei 10-minütigen Waschschritten in H₂O wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO; Roth) Lösung kryoprotectiert. Hierzu wurde 30 Minuten lang in einer 25 %-iger DMSO-Lösung (in H₂O) inkubiert und 60 Minuten lang mit einer 50 %-igen DMSO-Lösung in H₂O bei Raumtemperatur behandelt. Nach Behandlung mit flüssigem Stickstoff wurde eine Gefrierfrakturierung (*freeze fracture*) mit Hilfe einer vorgekühlten Pinzette durchgeführt. Die Fragmente wurden in 50 % DMSO-Lösung aufgenommen und auf Raumtemperatur gebracht. Nach 10 Minuten Waschen mit 0,1M Natriumcacodylat wurde für eine weitere Stunde mit 1 % Osmiumtetroxid in 0,1M Natriumcacodylat nachfixiert. Nach zwei 10-minütigen Waschschritten in 0,1M Natriumcacodylat wurde in einer Ethanolreihe dehydriert. Hierzu wurde jeweils 10 Minuten in 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % und zweimal in 100 % Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Netzhautfragmente unter dem Abzug luftgetrocknet und wie in Abschnitt IV.16.3 beschrieben weiterverarbeitet.

3 RNS-Isolierung

Bei der Arbeit mit RNS wurde stets darauf geachtet Kontamination mit Ribonukleasen auszuschließen. RNAsen sind sehr stabile Proteine und werden durch Autoklavieren bei 121 °C nicht zerstört. Sie werden aber in Anwesenheit von z.B. Guanidiniumthiocyanat und reduzierenden Agentien wie β -Merkaptoethanol inaktiviert (Chirgwin et al. 1979). Alle verwendeten Glaswaren, Pinzetten, Magnetrührstäbchen etc. wurden zur RNAsen-Dekontamination für mindestens drei Stunden bei 220 °C hitzebehandelt.

3.1 Isolierung von Poly(A)-RNS

Fast das vollständige Transkriptom von Eukarionten besteht aus Boten-RNS-Molekülen, die am 3'-Ende polyadenyliert sind. Diese Poly(A)-Schwänze kann man zur Hilfe nehmen, um Boten-RNS selektiv zu isolieren. Das „Dynabeads Biomagnetic Separation System“ von Dynal wurde nach Anweisung des Herstellers verwendet. Das Gewebe wurde mit einem Ultra-Turrax T8 (mit einem S8N-5G Dispergierwerkzeug; IKA Labortechnik) homogenisiert. An magnetischen Polystyrol-Kügelchen mit kovalent fixierten Oligo(dT)-Ketten wurde die Boten-RNS aus den Gewebehomogenisaten isoliert. Durch nachgeschaltete Waschschriffe wurden Verunreinigungen entfernt. Die Boten-RNS wurde in RNase-freiem Wasser bei 80 °C eluiert und sofort für die Synthese von Einzelstrang-cDNS (IV.4) verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

3.2 Isolierung von Gesamt-RNS

Zur Isolierung von Gesamt-RNS aus isolierter Netzhaut wurde das RNeasy-Kit von Qiagen verwendet. Es wurde nach Anleitung des Herstellers gearbeitet. Die Methode beruht auf einer modifizierten Methode von Chomczynski & Sacchi (1987), die durch den Einsatz einer Säulenchromatographie vereinfacht wurde. Die Maus-Netzhaut wurde wie in Abschnitt IV.2.3.2 beschrieben isoliert. Anschließend wurde sie in einem Guanidiniumthiocyanathaltigen Lysepuffer zweimal 20 Sekunden mit Hilfe eines Ultra-Turrax T8 (einem S8N-5G Dispergierwerkzeug; IKA Labortechnik) homogenisiert. Die Gesamt-RNS wurde an eine affinitätschromatographische Säule gebunden und nach mehreren Waschschriffen mit RNase-freiem Wasser eluiert. Nach photometrischer Bestimmung der Quantität (IV.7) wurde die Gesamt-RNS bei -80 °C aufbewahrt oder sofort zur Synthese von Einzelstrang-cDNS verwendet (IV.4).

4 Synthese von einzelsträngiger cDNS

Für die Synthese komplementärer DNS aus Boten-RNS wurde das Superscript II Reverse Transkriptase H⁻ Kit von Invitrogen verwendet und nach Anweisung des Herstellers gearbeitet.

5 Polymerase-Kettenreaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zum Nachweis von Transkripten (Reverse Transkriptase-PCR, RT-PCR) und zur Genotypisierung von Mäusen verwendet. Als Template-DNS diente cDNS aus verschiedenen Geweben der Maus und genomische DNS. Die PCR wurde in einem UNO II Thermoblock (Biometra) durchgeführt. Als thermostabile Polymerase wurde die *Taq* DNS-Polymerase (Roche oder Promega) verwendet. Die Bedingungen wurden an die jeweilige PCR angepasst und sind im Anhang aufgelistet (VIII.2).

Lösungen und Bedingungen:

dNTP-Mix 1,25 mM (Roth):

dGTP (100 mM)	10 µl
dATP (100 mM)	10 µl
dTTP (100 mM)	10 µl
dCTP (100 mM)	10 µl
H ₂ O	ad 800 µl

10x PCR-Puffer (Roche oder Promega):

KCl	500 mM
MgCl ₂	15 mM
Tris-HCl	100 mM

Reaktionsansatz:	50 µl	25 µl
Primer A (10 pmol/ µl)	2,5 µl	1,25 µl
Primer B (10 pmol/ µl)	2,5 µl	1,25 µl
10x PCR-Puffer	5,0 µl	2,5 µl
dNTP-Mix	8,0 µl	4,0 µl
Taq-DNS-Polymerase (5 U/ µl)	0,5 µl	0,25 µl
H ₂ O	ad 50,0 µl	ad 25,0 µl
DNS/cDNS-Lösung	2,0 µl oder 4,0 µl	1,0 µl oder 2,0 µl

Standardbedingungen für die Amplifikation (bis 1 kb):		
(1) initiale Denaturierung	95 °C	2 min
(2) Denaturierung	95 °C	30 sec
(3) Primeranlagerung	50-68 °C	30 sec
(4) Elongation	72 °C	30 sec
(5) finale Polymerisation	72 °C	5 min

Tabelle 1

Allgemeine PCR-Bedingungen. Die Schritte 2-4 wurden je nach PCR 21 bis 39 mal wiederholt. Um eine höhere Spezifität zu erreichen, wurden für manche Primerpaare 10 Zyklen mit einer um 10 °C über dem Temperatur-optimum der Primer liegenden Temperatur vorgeschaltet (siehe Anhang VIII.2).

5.1 Semiquantitative RT-PCR

Um die Expression verschiedener Gene in den untersuchten Geweben zu vergleichen, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Die RNS Isolierung und die Synthese von cDNS wurden unter IV.3 und IV.4 beschrieben. Die zu vergleichenden Gewebeproben wurden stets gleich und parallel behandelt. Gleiche Mengen an RNS bzw. Poly(A)-RNS wurden zur Synthese von cDNS verwendet. Die PCR wurde parallel und mit einem Reaktions-Mix durchgeführt. Die PCR-Programme wurden so optimiert, dass Reaktionsprodukte entstanden, die noch einer linearen Amplifikation entsprechen. Die genauen PCR-Bedingungen und die verwendeten Primerpaare sind im Anhang (VIII.1) aufgeführt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 5 % Polyacrylamidgel (IV.6.1) die anschließende densitometrische Auswertung wurde mit der Quantity One Software (Biorad) an einem Gel Doc 2000 (Biorad) Gel-Auswertungssystem durchgeführt. Gemessen wurde das Volumen der PCR Bande, dieses wurde auf den Marker (154 bp-Fragment oder 298 bp-Fragment des 1Kb-Ladder; Invitrogen) und das *housekeeping gene* Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) normalisiert. Die Experimente wurden in Triplikaten mit drei Chargen cDNS aus unterschiedlichen RNS-Präparationen verschiedener Tiere durchgeführt.

6 Auftrennung und Isolierung von DNS-Fragmenten

Nukleinsäuren sind im Alkalischen negativ geladen und können deshalb im elektrischen Feld in einem Gel nach ihrer Masse aufgetrennt werden. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNS-Marker (1Kb Ladder, Invitrogen). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer Farbmarker zugegeben. Bromphenolblau wandert ähnlich wie keine DNS-Fragmente (10-100 bp) und markiert daher die Elektrophorese-Front. Xylencyanol verhält sich etwa wie 5 Kb DNS-Fragmente.

Lösungen:

10x TBE:

Tris HCl (Roth)	0,9 M
Borsäure (Roth)	0,9 M
EDTA pH 8,0 (Merck)	20 mM

Auftragspuffer (6x dye):

6x TBE	
Ficoll Typ 400 (Sigma)	18 %
EDTA pH 8,0	0,12 mM
Bromphenolblau (Merck)	0,15 %
Xylencyanol FF (Sigma)	0,15 %

Elektrophoresepuffer:

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H₂O)

Ethidiumbromidstammlösung:

10 mg/ml (Roth), wässrig

6.1 Polyacrylamid Gelelektrophorese

DNS Fragmente mit einer Größe von 50-1000 bp wurden durch vertikale Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Dafür wurden 5 %ige Polyacrylamidgele in 1x TBE als Laufpuffer (Sambrook et al. 1989) verwendet. Die Trennstrecke betrug 15 cm und die Dicke 0,75 mm (analytische Gele) bzw. 1,5 mm (präparative Gele).

Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:

Rotiphoresegel	3,75 ml
(Acrylamid / N,N'-Bisacrylamid = 29:1, 40 %ige wässrige Lösung; Roth)	
10x TBE	3 ml
H ₂ O	ad 30 ml
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin; Sigma)	20 µl
20 % APS (Ammoniumperoxodisulfat; Sigma)	70 µl

Die DNS Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Auftragspuffer versetzt. Zum Einlaufen wurde 10 Minuten lang eine Spannung von 100 V angelegt, zur Trennung schließlich für 50 Minuten 260 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 5 Minuten lang in Ethidiumbromidlösung (0,35 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht am Gel Doc 2000 (Biorad) ausgewertet.

6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten im Bereich von 1 bis 12 kb wurde eine horizontale Gelelektrophorese in Agarosegelen (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Agarose (Roth) wurde in 1x TBE im Mikrowellenherd aufgeschmolzen. Es wurden Gele in einer Konzentration von 0,7 % (g/v) bis 2,0 % (g/v) verwendet. Der Gel-Lösung wurde vor dem Ausgießen in eine horizontale Kammer Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration im Gel: 700 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bis 3 h bei konstanter Spannung mit 1x TBE als Laufpuffer.

6.3 Elektroelution

Um ein DNS Fragment bestimmter Größe aus einem Gemisch isolieren zu können, wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNS mit 300 µl 1x TBE in einem Dialyseschlauch (Sigma) bei 140 mA bei 4 °C aus dem Gel eluiert. Nach etwa 1,5 h wurde die DNS durch Ethanolfällung isoliert.

6.4 DNS-Isolierung mittels GFX-Säulen

Eine schnellere Möglichkeit zur Isolierung und Aufreinigung von DNS bietet das GFX™-System (Amersham Pharmacia). Es eignet sich zur Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegel-Banden oder zur Aufreinigung (Befreiung von Salzen und Enzym) einer PCR für nachfolgende Reaktionen in anderen Puffersystemen. Die ausgeschnittene Agarosegel-Bande wurde zum Auflösen der Gelstruktur mit *Capture Buffer* inkubiert. Die Lösung wurde an das chaotrope Salz einer Säule gebunden und nach Waschschritten mit einem angepassten Volumen H₂O eluiert. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte nach gleichem Schema.

7 Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

7.1 Präzipitation von Nucleinsäuren

Zur Aufkonzentrierung und Reinigung wurden Plasmide und DNS-Fragmente mit Ethanol gefällt (modifiziert nach Sambrook et al. 1989). Die wässrige Nucleinsäurelösung wurde hierzu mit 1/10 Volumen 5M Natriumacetat (pH 5,5) und dem 2,5 fachen Volumen 99,9 %, Ethanol (-20 °C) versetzt und 10 min bei -80 °C inkubiert. Die gefällte DNS wurde durch

Abzentrifugieren (16000 x g, 15min, 4 °C) pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das DNS-Pellet 5min in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet und in der gewünschten Menge Wasser aufgenommen.

7.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um störende Proteine wie Restriktionsenzyme oder RNAsen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde die Nukleinsäurelösung 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) versetzt, bis zur Emulsionsbildung geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung abzentrifugiert (16000 x g, 5 Minuten). Die Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase wurden in ein neues Eppendorfgefäß (RNase-frei, bei Arbeiten mit RNS) überführt und mit Ethanol präzipitiert (7.2).

7.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration und Reinheit von RNS- oder DNS-Lösungen zu ermitteln, wurde die Absorption einer Verdünnung an einem Photometer (Eppendorf) gemessen. Ein Maß für die Reinheit ist das Verhältnis $A_{260/280}$. Bei reiner Nukleinsäure liegt es bei 2,0, bei reinem Protein bei 0,6. Über die Absorption der Lösung bei 260 nm kann, nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz, bei einer Schichtdicke von 1 cm die Konzentration der Probe ermittelt werden:

1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml dsDNS

1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml ssRNS

8 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die ein wichtiges Instrument der Molekularbiologie sind und das Klonieren von Genen erst ermöglichten. Sie erkennen und spalten spezifische, meist palindromische Basensequenzen innerhalb einer DNS-Doppel-Helix. Mit ihrer Hilfe wurde durch Restriktionsanalyse die Identität der durch RT-PCR amplifizierten Produkte verifiziert. Die PCR-Produkte wurden vor der Restriktionsanalyse mit der GFX-Methode (IV.6.4) aufgereinigt.

Restriktionsansatz:

gereinigtes PCR-Produkt	10 µl
10x NEB-Puffer (NEB, an das Enzym angepasst)	3 µl
10x BSA (NEB)	3 µl
Restriktionsenzym (NEB)	0,5 µl
H ₂ O	13,5 µl

9 Dephosphorylierung von DNS

Die Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase) spaltet 5'-Phosphatgruppen von DNS-Molekülen ab. Diese Dephosphorylierung verhindert den durch DNS-Ligase katalysierten Ringschluß linearer, doppelsträngiger DNS-Moleküle, da dieses Enzym einen endständigen 5'-Phosphatrest benötigt. Auf diese Weise wird die Religierung eines Leervektors verhindert und damit die Klonierungseffizienz der gewünschten DNS-Fragmente erhöht. Die linearisierten Plasmide (etwa 5 pmol) wurden in 50mM Tris pH 8,0 mit 1U CIP (Roche) für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die Vektor-DNS in einer Ligationsreaktion (IV.10) eingesetzt werden.

10 Ligation von DNS Fragmenten

Die T4 DNS-Ligase (NEB) katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe- und einem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNS-Fragmente unter ATP-Verbrauch (Weiss et al, 1968). Sie wurde eingesetzt, um Fremd- und Vektor-DNS kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNS zu verknüpfen. Ligase, linearisierter, dephosphorylierter Vektor und Fremd-DNS wurden in Ligasepuffer gemischt und für 12-16 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend konnte das rekombinante Plasmid in E. Coli vermehrt werden (IV.12.3).

11 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von DNS erfolgte nach einer modifizierten Didesoxymethode (Sanger et al. 1977) mit einem ABI PrismTM 310 Sequencer (PE Applied Biosystems). Bei dieser Methode werden Sequenzabschnitte amplifiziert. In der Amplifizierungsreaktion wurden zusätzlich zu Desoxynukleotiden (dNTP), fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP) eingesetzt (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; PE Applied Biosystems). Nach Einbau eines ddNTPs ist eine Verlängerung der DNS nicht mehr möglich und es kommt zu Kettenabbrüchen. Durch sorgfältiger Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs entsteht eine Mischung aus DNS-Fragmenten jeder möglichen Länge. Nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung erfolgt im Gerät die Detektion. Jedes der vier Didesoxynukleotide ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach Fluoreszenzanregung erfolgt die Trennung der Signale am Detektor. Über die Software wird die Sequenz ermittelt.

Sequenzierreaktion

Bei einer Sequenzierreaktion können mit einer kurzen Kapillare ca. 500 Basen und mit einer langen Kapillare ca. 800 Basen identifiziert werden. Für längere DNS-Fragmente müssen mehrere Reaktionen durchgeführt werden. Es wurden 500 ng Plasmid-DNS zur Sequenzierung eingesetzt.

Sequenzier-Cycling-Ansatz

Ready Reaction Mix	4 µl
Primer 0,8 pmol/ µl	4 µl
DNS	0,5 µl
H ₂ O	11,5 µl

Sequenzier-Cycling-Reaktion

Nach einer 2-minütigen Denaturierung bei 95 °C wurden 25 Zyklen nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- (1) 95 °C 30 sec (Denaturierung)
- (2) 50 °C 40 sec (Primeranlagerung)
- (3) 60 °C 4 min (Elongation)

Die Reaktionsprodukte der PCR wurden über eine Gelfiltrationssäule (CentriSep Column, Perkin Elmer) von freien fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt, in 20 µl Template Suppression Reagent (TSR, ABI Prism) aufgenommen und für 3 Minuten bei 95 °C denaturiert. TSR verhindert die Ausbildung von doppelsträngiger DNS. Die Proben wurden entweder sofort sequenziert oder bei -20 °C aufbewahrt.

12 Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNS

Zur Amplifikation von Plasmiden wurde als Wirtsorganismus der *Escherichia coli* Stamm XL1-blue MRF' (Stratagene) verwendet.

12.1 Kultur von Bakterien

Die Kultur von Bakterien erfolgte in dem Vollmedium Luria-Bertani (LB) mit Glucose. LB- und SOC-Medium wurden für 10 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert, das LB-Medium bei 4 °C und das SOC(-)-Medium bei -20 °C gelagert. Dem SOC-Medium wurde vor Verwendung 50 µl 1 M MgCl₂ (Merck), 50 µl 1 M MgSO₄ und 100 µl 20 % Glucoselösung auf 4,8 ml SOC(-)-Medium zugegeben, um frisch transformierte Bakterien zu resuspendieren.

Luria-Bertani-Medium (+)

Pepton (Roth)	10 g
Hefeextrakt (Roth)	5 g
NaCl (Merck)	5 g
Glucose (Merck)	1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,2 - 7,5	

SOC-Medium (-)

Pepton (Roth)	20 g
Hefeextrakt (Roth)	5 g
NaCl (Merck)	0,5 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,0	

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem LB-Medium kurz vor der Kultur je nach Plasmid das Antibiotikum Ampicillin oder Kanamycin mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben. Die wässrige Stammlösung mit 50 mg/ml Ampicillin-Na (Sigma) wurde steriltfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. LB-Agar Medium wurde durch Zugabe von 15 g Agar/l (Invitrogen) zu LB-Medium vor dem Autoklavieren hergestellt. Das heiße Medium wurde im Wasserbad auf circa 50 °C abgekühlt, bevor das gewünschte Antibiotikum zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen gegossen wurde.

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob im LB-Medium. Die Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben angezogen, bei 37 °C und 225 rpm über Nacht inkubiert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Bakterien-Suspensionen auf Ampicillin-LB-Platten ausgestrichen, bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C bis zu 8 Wochen gelagert. Zur längeren Aufbewahrung wurden logarithmisch wachsende

Kulturen mit gleichem Volumen autoklaviertem Glycerol (Roth) gemischt und bei -20 °C eingefroren.

12.2 Erzeugung kompetenter Bakterien

Als kompetente Zellen bezeichnet man bakterielle Zellen, die in der Lage sind, exogene DNS aufzunehmen. Im verwendeten Protokoll wurden die *E. coli* Bakterien durch kurzfristige Behandlung mit Dimethylsulfoxid (Roth) empfänglich gemacht. 100 ml LB(-)-Medium (IV.12.1) wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur einer frischen Einzelkolonie von *E. coli* XL1-blue angeimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,35 bis 0,38 wurde die Kultur abgekühlt und abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml 1xTTS resuspendiert, in 500 µl Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

1x TTS (Transformation and Storage Solution)

Polyethylenglykol 3350 (Roth)	12,5 ml
1 M MgCl ₂ (Merck)	2,5 ml
DMSO (Roth)	2,5 ml
LB-Medium	ad 50 ml

12.3 Transformation von *E. Coli*

Als Transformation bezeichnet man das Einschleusen von fremder DNS, hier Plasmid-DNS, in Bakterienzellen. Die eingeschleusten Plasmide besitzen eine Antibiotikaresistenz, die es ermöglicht, durch Selektionsdruck die Bakterienzellen zu vermehren, die das gewünschte Plasmid tragen. Die kompetenten Bakterienzellen wurden in Eiswasser aufgetaut, zu dem Ligationsansatz (IV.10) pipettiert und zur Aufnahme der DNS auf Eis gestellt. Nach einer Erholungsphase von 1 Stunde in LB-Medium bei 37 °C wurde die Bakteriensuspension auf Ampicillin- oder Kanamycin-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C 12-16 Stunden inkubiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Plasmidpräparation (IV.12.4) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids geprüft werden.

12.4 Isolierung von Plasmid-DNS

12.4.1 Plasmidpräparation im Großmaßstab

Um größere Mengen hochreiner Plasmid-DNS zu erhalten, wurde der Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) in Verbindung mit einer anschließenden chromatographischen Reinigung über eine Anionenaustauschersäule. Die Bakterien werden in NaOH/SDS lysiert, wobei Proteine und DNS-Moleküle denaturieren. RNase A verdaut die freigesetzten RNS-Moleküle. Durch anschließende Neutralisation mit Kaliumacetat renaturiert die relativ kleine Plasmid-DNS wieder und bleibt deshalb in Lösung, während das viel größere Bakterienchromosom denaturiert mit den übrigen Zelltrümmern, ausgefallenen Salzen und SDS abgetrennt werden kann. Die Bedingungen für die chromatographische Auftrennung und die Waschschrte sind so gewählt, dass Proteine, Polysaccharide, RNS und andere Verunreinigungen quantitativ abgetrennt werden. Die eluierte Plasmid-DNS wurde gefällt, getrocknet, in 250 µl Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der DNS wurde mit einem Aliquot photometrisch bestimmt (IV.7) und eine Restriktionsanalyse (IV.8) durchgeführt.

12.4.2 Plasmidpräparation im Kleinmaßstab

Um den Erfolg des Klonierungsversuchs zu überprüfen wurde zunächst eine Plasmidpräparation in kleinerem Maßstab durchgeführt. Hierzu wurde eine alkalische Lyse von 7 ml-Kulturen durchgeführt. Es wurde weitestgehend das unter IV.12.4.1 beschriebene Protokoll verwendet, jedoch keine säulenchromatographische Reinigung durchgeführt.

Lösungen:

MP 1 (Resuspensionspuffer)

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

MP2 (Lysepuffer)

200 mM NaOH
1 % SDS

MP3 (Neutralisationspuffer)

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

12.5 Verwendete Plasmide

pAL 1

Bei diesem Vektor handelt es sich um ein Derivat von pUC 19, bei dem an beiden Seiten der multiplen Klonierungsstelle die Promotorensequenz für die RNS-Polymerasen T3 und T7 und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und Acc65I eingefügt wurden (Ludwig et al. 1997). In diesen Vektor wurde die cDNS für die *In vitro*-Transkription von *in situ*-Hybridisierungs-cRNS-Sonden kloniert.

13 *In situ*-Hybridisierung

Bei der *In situ*-Hybridisierung handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht, Boten-RNS Moleküle im Gewebe (*in situ*) nachzuweisen und zu lokalisieren. Es werden Sonden verwendet, die komplementär zur der zu untersuchenden Boten-RNS sind. Das Prinzip beruht darauf, dass nur die spezifischen Hybride, die zwischen der Sonde und der Boten-RNS entstanden sind die stringenten Wasch- oder Verdauungsschritte überstehen. Nur an den Stellen an denen die Sonde gebunden hat, erhält man später ein Signal. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Bei der ersten Methode wurde eine zu der Zielsequenz komplementäre radioaktiv markierte RNS-Sonde verwendet, die durch *in vitro*-Transkription hergestellt wurde. Bei der zweiten Methode wurde eine komplementäre Oligonukleotid DNS-Sonde verwendet, die am 3'-Ende mit Digoxigenin markiert wurde. Die Detektion erfolgte im ersten Fall autoradiographisch und im zweiten immunhistochemisch mit Hilfe eines anti-Digoxigenin Antikörpers.

13.1 *In vitro*-Transkription

Mittels RT-PCR wurden 200-300 bp lange DNS-Sequenzen (Tabelle 2) amplifiziert, die einem Abschnitt der zu untersuchenden Boten-RNS entspricht. Die SONDENSEQUENZEN wurden in einen Transkriptionsvektor kloniert, der Promotoren für die RNS-Polymerasen T3 und T7 trägt (pAL 1, IV.12.5). Für jede cRNS Sonde wurden jeweils 12 µg der entsprechenden Plasmid-DNS mit BamHI und mit Acc65I in zwei getrennten Ansätzen linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Reinigung (IV.7.2) gefällt, in 11 µl H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert. Die T7-RNS-Polymerase synthetisiert in diesem System einen RNS-Strang, der komplementär zur entsprechenden Boten-RNS ist. Die T3-Polymerase synthetisiert den Gegenstrang, der nicht komplementär, sondern identisch mit der entsprechenden Boten-RNS ist. Die sogenannte *Sense*-Probe diente als Negativkontrolle. Durch Verwendung von ³⁵S-UTP

als eines der vier Nukleotide entsteht eine radioaktiv markierte RNS-Sonde. Nach der *In vitro*-Transkription wurde die DNS-Matrize mit einer DNase I (Roche) abgebaut und der Ansatz chromatographisch (Nick-Column, Amersham Pharmacia) aufgetrennt. Die Aktivität der radioaktiv markierten Gensonden wurde im Szintillationszähler gemessen. Sie wurde anschließend mit Hybridisierungslösung auf eine Konzentration von 10^7 dpm/ml verdünnt. RNase-freie Transfer-RNS (Roche) wurde hinzugefügt, um unspezifische Bindung und Hintergrundsignal zu vermindern. Dithiothreitol (Roth) wurde als Antioxidans zur Stabilisierung des ^{35}S -UTP verwendet. Durch Autoradiographie wurde die Hybridisierung sichtbar gemacht.

Gen	Primerpaar	Gensonde	Größe	Referenz
ActRII	Act200F/Act201R	S ₂₁₈ – A ₂₉₈	243 bp	Mathews & Vale 1991
CNGA3	CNG3ISF/CNG3ISR	nt1155-1417	263 bp	Gerstner et al. 2000
CNGB3	CNG6ISF/CNG6ISR	nt1398-1650	253 bp	Gerstner et al. 2000

Tabelle 2

Sequenzen der cRNS-Sonden für die radioaktive ISH. (*ActRII* = Activin Rezeptor II)

13.2 Herstellung von Digoxigenin-markierten Oligo-Sonden

DNS-Oligonukleotide mit einer Länge von 44 bp wurden bei der Oligonukleotid-ISH als Sonden verwendet (Tabelle 3). Ein Oligonukleotid mit einer Sequenz komplementär zur in Zielsequenz wurde als *Antisense*-Sonde verwendet. Ein weiteres Oligonukleotid mit der gleichen Sequenz wie die Zielsequenz diente als *Sense*-Kontrollsonde. Die Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG synthetisiert. Das Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT; Roche) wurde verwendet, um Digoxigenin-markiertes dUTP an die endständigen 3'-Hydroxylgruppen der Oligonukleotide anzuhängen. Somit wurden Boten-RNS spezifische Digoxigenin-markierte Sonden hergestellt, die mit einem spezifischen anti-Digoxigenin Antikörper nachweisbar sind.

200pmol Oligonukleotid wurden mit 2nmol Digoxigenin-dUTP (Roche) versetzt und mit 50 Einheiten TdT (Roche) in einem Cobaltchlorid-haltigen Puffer für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,2 nmol EDTA gestoppt. Das Produkt wurde durch ausschlusschromatographische Auftrennung mit DyeEx-Säulen (Qiagen) nach Angaben des Herstellers von den nichtinkorporierten Nukleotiden und vom Enzym gereinigt. Zur Elution wurde RNase-freies Wasser verwendet. Die Lösung wurde bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert oder gleich in Hybridisierungspuffer auf eine Konzentration von 6 ng/μl verdünnt.

Sonde	5'-Oligonukleotidsequenz-3'	Erkennungssequenz
mCNGA3 Oligo Antisense	GGA GAG TCG TGC ATA CTC CGG CTT GGA GGT GTT TGG ATA GAC CCA	CNGA3 Boten-RNS: nt1205-1248 (mmu243933)
mCNGA3 Oligo Sense	TGG GTC TAT CCA AAC ACC TCC AAG CCG GAG TAT GCA CGA CTC TCC	CNGA3 Boten-RNS: nt1248-1205, (mmu243933)

Tabelle 3

Sequenzen der Oligonukleotidsonden für die nichtradioaktive ISH.

13.3 Hybridisierung

Das Protokoll für die *in situ*-Hybridisierung wurde in etwas abgeänderter Form von Simmons et al. (1989) übernommen.

- Kryoschnitte der Gewebe (IV.15.1) wurden auf Raumtemperatur gebracht oder zum Lufttrocknen aus der Ethanollösung geholt
- 5-minütiges Waschen in 1x PBS
- Im Falle der *In situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-Sonden wurde 15 Minuten mit einer 3 %igen H₂O₂-Lösung behandelt, um bei der Detektion störende endogene Peroxidasen zu inaktivieren, und anschließend 3 mal 5 Minuten in 1x PBS gewaschen
- 10 Minuten fixieren in 4 % PFA in 1x PBS
- 3 Waschschrte je 5 Minuten in 1x PBS
- Um die unspezifische Bindung der Sonde an den Schnitten zu vermeiden, wurde das Gewebe acetyliert:
 - zweimal 10 Minuten in 0,25%iger Essigsäureanhydridlösung in 0,1 M Triethylammoniumacetat (TEA; Merck)
 - zwei Waschschrte je 2 Minuten in 2x SSC
- Prähybridisierung:

Die Objektträger (OT) wurden in einer dicht schließenden Kammer waagrecht auf ein Gitter gelegt und die Gewebeschnitte mit der dickflüssigen Hybridisierungslösung bedeckt, die aus 8 Teilen 1,25x Hybridisierungspuffer, 1 Teil 1 M DTT und 1 Teil Wasser bestand. Um ein feuchtes Milieu in der Box aufrechtzuerhalten und damit ein Antrocknen der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde der Gefäßboden mit Saugpapier ausgelegt und mit Boxpuffer getränkt. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei bis drei Stunden bei 42 °C.
- Hybridisierung mit markierter Sonde:

Die ³⁵S-UTP-markierten cRNS-Sonden wurden 10 Minuten lang auf 65 °C erhitzt und nach Zugabe von Dithiotreitol als Antioxidans (100 µl 1 M DTT je 1 ml Sonde) zentrifugiert (3 Minuten, 3000 rpm). Die Digoxigenin-markierten oligonukleotid-Sonden wurden 5 Minuten auf 37 °C erhitzt und zentrifugiert (3 Minuten, 3000 rpm). 30 bis 100 µl Antisense- bzw. Sense-Probe wurden auf die prähybridisierten Schnitte pipettiert, und danach bei 55 °C (³⁵S-UTP-markierte cRNS-Sonden) bzw. 40 °C (Digoxigenin-markierte Oligonukleotid-Sonden) über Nacht im Heizwasserbad inkubiert.
- Die Objektträger wurden am nächsten Tag von unspezifisch gebundener Probe befreit. Die Waschschrte unterschieden sich in den zwei verwendeten Methoden und werden deshalb getrennt aufgeführt.
 - Wasch-Protokoll für ³⁵S-UTP-markierte cRNS-Sonden:

Alle Waschlösungen enthielten 1 mM DTT und 1 mM EDTA pH 8,0 um das ³⁵S-UTP zu stabilisieren.

 - zwei Waschschrte je 10 Minuten in 2x SSC
 - RNase A-Verdau: 30 Minuten in 20 µg/µl RNase A in 1x RNase-Puffer. (RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNS ab, RNS/RNS-Hybride werden nicht verdaut)
 - zwei Waschschrte je 10 Minuten in 2x SSC
 - zwei Waschschrte je 1 Stunde in 0,1x SSC bei 68 °C
 - drei Waschschrte je 10 Minuten in 0,5x SSC
 - Entwässern je 3 Minuten in 50 %, 70 %, 95 %, 100 % Ethanol
 - 30 Minuten vakuumtrocknen

- Wasch-Protokoll für Digoxigenin-markierte Oligonukleotid-Sonden:
 - 5 Minuten 1x SSC
 - 30 Minuten 1x SSC bei 60 °C
 - 5 Minuten 1x SSC

13.4 Detektion

Die Detektion erfolgte im Fall der ³⁵S-UTP-markierten cRNS-Sonden autoradiographisch. Im Fall der Digoxigenin-markierten Oligonukleotid-Sonden wurde eine nichtradioaktive Detektionsmethode verwendet, die auf einem immunologischen Nachweis des Haptens (Digoxigenin) und anschließender Signalamplifikation mittels einer Tyramidamplifikationsreaktion beruht.

13.4.1 Radioaktivdetektion

Auf die trockenen Objektträger wurde ein empfindlicher Film (BioMax MR; Kodak) aufgelegt. Nach 6 bis 20 Tagen Exposition bei 4 °C wurde der Film entwickelt (AGFA Curix 60 Entwicklungsmaschine).

13.4.2 Tyramidamplifikation

Die nichtradioaktive Detektion wurde verwendet, um das Arbeiten mit Radioisotopen zu umgehen. Zusätzlich ist eine bessere zelluläre Lokalisation des Hybridisierungssignals zu erwarten. Bei den durchgeführten Experimenten war eine sehr niedrige Expression zu erwarten, deshalb wurde die Tyramidamplifikation als Detektionsmethode gewählt. Das Prinzip der TSA ist in Abbildung 11 erläutert. Dabei wird die Eigenschaft der Meerrettichperoxidase (HRP) ausgenutzt das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Tyramid zu aktivieren (Abbildung 12). Das aktivierte Tyramid bindet an benachbarte Strukturen im Gewebe. Durch die sehr hohe Effizienz dieser Reaktion wird eine starke Amplifizierung des Signals erreicht.

Protokoll:

- 5 Minuten waschen in 1x TBS
- 30 Minuten blockieren mit 1x Blockierungs-Lösung in 1x TBS
- 1-2 Stunden Inkubation mit dem HRP-markierten Antikörper (anti-DIG-HRP; Roche; 1:500 verdünnt mit 1x Blockierungs-Lösung in 1x TBS)
- drei Waschschrte je 5 Minuten mit 0,05 % Tween-20 in 1x TBS
- 7 Minuten Inkubation im Dunklen mit einer 1:75-Verdünnung von Cy3-Tyramid (in TSA-Verdünnungs-Puffer, Perkin Elmer)
- zwei Waschschrte je 3 Minuten mit 0,05 % Tween-20 in 1x TBS
- 5 Minuten Kernfärbung mit 5µg/ml Hoechst in 1x PBS
- zwei Waschschrte je 3 Minuten mit 0,05 % Tween-20 in 1x TBS
- Eindeckeln im wässrigen Einbettmedium Permafluor (Beckman)
- Mikroskopieren am Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss; Filter für Cy3, Hoechst)

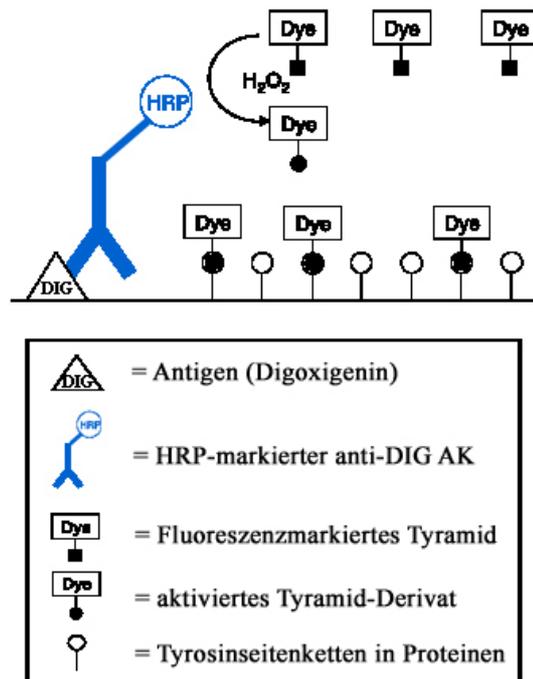


Abbildung 11

Prinzip der Tyramidamplifikation. Das Antigen, hier das Digoxigenin der Oligonukleotidsonde, wird durch den HRP-markierten Antikörper erkannt. Die Peroxidase aktiviert das markierte Tyramid, welches sofort an räumlich benachbarte Strukturen bindet. Das Fluoreszenzsignal des hier verwendeten Tyramids wird fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen.

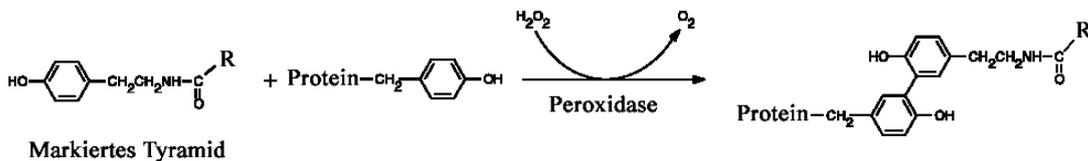


Abbildung 12

Tyramidoxidation durch die Peroxidase. ($R = \text{Fluoreszenzfarbstoff}$)

13.5 Verwendete Lösungen

Bei der Herstellung der Lösungen für die *In situ*-Hybridisierung wurde auf RNase-freies Arbeiten geachtet.

20 x SSC

NaCl (Merck) 175 g
 Na₃Citrat x 2 H₂O 88 g
 H₂O ad 1000 ml
 mit HCl_{conc} (Merck)
 auf pH 7,0 einstellen

10x PBS

NaCl 80 g
 KCl (Merck) 2 g
 Na₂HPO₄ (wasserfrei) (Roth) 6,2 g
 KH₂PO₄ (Roth) 2 g
 H₂O ad 1000 ml
 pH 7,4

0,5 M EDTA, pH 8,0

Na₂EDTA x 2 H₂O (Merck) 186,1 g
 H₂O ad 1000 ml
 mit 5 M NaOH (Merck) auf pH 8,0 einstellen

3 M Natriumacetat, pH 5,2

NaAcO x 3 H₂O (Merck) 40,8 g
 H₂O ad 100 ml
 mit Eisessig (Merck) auf pH 5,2 einstellen

5x RNase A-Puffer

5 M NaCl 250 ml
 1 M Tris pH 8,0 25 ml
 0,5 M EDTA pH 8,0 5 ml
 H₂O ad 500 ml

1 M TRIS

Tris-Base (Roth) 121 g
 H₂O ad 1000 ml
 pH mit HCl_{conc} auf pH 8,0 einstellen

5x Protease-Puffer

1 M Tris pH 8,0 250 ml
 0,5 M EDTA pH 8,0 25 ml
 H₂O ad 500 ml

TE-Puffer, pH 8,0

1 M Tris-HCl, pH 8,0 5 ml
 0,5 M EDTA, pH 8,0 1 ml
 H₂O ad 500 ml

Alle oben genannten Lösungen wurden RNase-frei hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

1 M DTT

Dithiothreitol (Roth) 1,5 g
 3 M NaAcO pH 5,2 33 µl
 H₂O ad 10 ml
 Sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20 °C lagern

Box-Puffer

Formamid (Merck) 50 ml
 20x SSC 20 ml
 H₂O ad 100 ml

50x Denhardt

Ficoll (MG 400.000; Sigma) 1 g
 Polyvinylpyrrolidon (PVP; MG 40.000; Sigma) 1 g
 BSA (Fraktion V; Roth) 1 g
 H₂O ad 100 ml
 Sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20 °C lagern

50 % Dextran

Dextransulfat (Sigma) 12,5 g
 H₂O ca. 12 ml
 3 h bei 68 °C lösen
 H₂O ad 25 ml
 bei -20 °C lagern

Formamid (deionisiert)

AG 501-X8 (D) Resin (BioRad) 5 g
 Formamid (Merck) 45 ml
 bei 4 °C lagern

4 % PFA in PBS

Paraformaldehyd (Merck) 6 g
 10x PBS 15 ml
 H₂O ad 150 ml
 bei 60 °C lösen, auf 4 °C abkühlen
 bei -20 °C lagern

1x TNT

1x TBS
 0,05 % (v/v) Tween 20 (Roth)

1,25x Hybridisierungspuffer

1 M Tris pH 8,0	0,625 ml
5 M NaCl	3,75 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	125 µl
50 x Denhardt	1,25 ml
50 % Dextranufat	12,5 ml
Formamid (deionisiert)	31,25 ml
H ₂ O	ad 50,0 ml
bei -20 °C lagern	

10x Blockierungs-Lösung

Blockierungsreagens (Roche)	5 g
1x TBS	ad 50 ml
Suspension autoklavieren bei 4 °C oder aliquotiert bei -20 °C lagern	

10x TBS

Tris-Base	12,1 g
NaCl	80,23 g
H ₂ O	ad 1000ml
pH 8,0, Autoklavieren	

Hybridisierungslösung

1,25x Hybridisierungspuffer	8 Teile
1 M DTT	1 Teil
H ₂ O	1 Teil

14 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen**14.1 Aufreinigung spezifischer Peptidantikörper**

Immunserum aus Kaninchen gegen das carboxyterminale Peptid pCNG3 (NH₂-CWRRCGFSPDRENSEDASKTD-COOH) wurde von der Firma Gramsch bezogen. Zur Aufreinigung der spezifischen Antikörper aus dem Serum wurden die reduzierten Peptide an SulfoLink-Sepharose (Pierce) gekoppelt und damit eine Glassäule bepackt. 3 ml des Immunserums verdünnt in PB 0,5 M NaCl wurde 14 Stunden bei 4 °C über die Säule zirkulieren gelassen. Der gebundene Antikörper wurde mit 5 M MgCl₂ von der Säule eluiert, und durch Ultrafiltration (G30-Säulen; Amicon) entsalzt und aufkonzentriert. Aliquots des Antikörpers wurden bei -80 °C gelagert.

Lösungen:**PB 0,1M NaCl**

NaCl (Merck)	28,4 g
KCl (Merck)	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) (Roth)	6,2 g
KH ₂ PO ₄ (Roth)	2 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,4	

14.2 Herstellung von Gewebelysaten

Gewebe der Maus wurden nach der Präparation (IV.2.2) sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C tiefgefrorene Gewebe auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe eines 1,5 bis 3-fachen Volumens Lysepuffer mit Proteaseninhibitoren wurde mit einem Ultra-Turrax T8 (mit S8N-5G Dispergierwerkzeug; IKA Labortechnik) homogenisiert. Die Homogenisate wurden für 5

bis 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 13000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für den Western-Blot verwendet.

Proteaseinhibitoren

Leupeptin	(Calbiochem; 1ng/ml Lysepuffer)
Pepstatin A	(Calbiochem; 1pmol/ml Lysepuffer)
Antipain	(Calbiochem; 1ng/ml Lysepuffer)
PMSF	(Sigma; 100pmol/ml Lysepuffer)
Orthophenanthrolin	(Sigma; 1nmol/ml Lysepuffer)
Benzamidin	(Sigma; 1nmol/ml Lysepuffer)
Iodacetamid	(Sigma; 0,9nmol/ml Lysepuffer)

Lysepuffer

HEPES (Sigma)	1,1915 g
NaCl (Merck)	0,8766 g
Glycerol (Roth)	10 ml
0,5M EDTA pH 8 (IV 13.5)	1 ml
Triton X-100 (Roth)	1 ml
H ₂ O	ad 100 ml
pH 7,5	

14.3 Quantifizierung von Proteinen

Falls erforderlich wurde der Proteingehalt von Gewebelysaten mittels Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Der Coomassie-Farbstoff, ein Triphenylmethan-Farbstoff, kann in saurem Milieu mit unpolaren Proteinstrukturen interagieren und durch anionische Sulfonsäuregruppen kationische Aminosäuren binden. Dadurch kommt es zu einer Änderung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Da die Absorption bei 595 nm direkt proportional zur Proteinmenge ist, kann die Konzentration der Probe, soweit kein SDS enthalten ist, anhand von BSA-Standards ermittelt werden. Zur Messung wurden 100 µl verdünnte Proteinlösung, Standard-Verdünnung (1-30 µg BSA/100 µl H₂O) oder Puffer (Referenzmessung) mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt 2 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm (Eppendorf Bio Photometer) bestimmt.

Bradford-Lösung

Coomassie brillant blue G250 (Merck)	50 mg
EtOH 95 %	25 ml
H ₃ PO ₄ 85 %	50 ml
H ₂ O	ad 500 ml

nach Filtrieren Lagerung bei 4 °C

14.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Lämmli (Lämmli, 1970) durchgeführt. Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele wurden Gießvorrichtungen der Firma BioRad (Mini Protean II Cell) verwendet. Durch Variation des Vernetzungsgrades des Acrylamids mit Bis-Acrylamid lassen sich die Trenneigenschaften der Gele verändern. Die Polymerisation des Gels erfolgt durch Zusatz von APS als Radikalstarter (Zerfall des Peroxides) und TEMED als Katalysator. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus Trenn- und Sammelgel, wobei die Proteine im Sammelgel fokussiert und vorsortiert werden und im Trenngel aufgetrennt werden. Das Proteinlysate wurde zunächst unter Zugabe eines Probenpuffers durch fünfminütiges Aufkochen denaturiert. Das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat zerstört die nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. Es entsteht ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein, dessen Migrationsverhalten in der Elektrophorese sich meist proportional zur Molmasse des Proteins verhält. Ein Größenstandard (Invitrogen Benchmark Protein Ladder, 10 – 220 kDa oder Rainbow-Marker) diente als Vergleichsmaßstab. Die Elektrophorese wurde bei 100 V in 1x Elektrophoresepuffer durchgeführt.

Lösungen:**5x Elektrophoresepuffer**

Tris (Roth)	15,1 g
Glycin (Roth)	72 g
SDS (Roth)	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml
bei 4 °C lagern	

6x Probenpuffer

Tris-Cl/SDS pH 6,8	7 ml
Glycerol (Merck)	3 ml
SDS	1 g
Bromphenolblau (Merck)	1,2 mg
H ₂ O	ad 10 ml
bei -20 °C lagern	

4x Trenngelpuffer

Tris	1,5 M
SDS	0,4 %
pH 8,8	

4x Sammelgelpuffer

Tris	0,5 M
SDS	0,4 %
pH 6,8	

Sammelgel

Acrylamid für SDS-PAGE	0,65 ml
4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
H ₂ O	3,05 ml
TEMED	5 µl
APS 20 %	25 µl

Trenngel

	7 %	12 %
Acrylamid für SDS-PAGE	3,5 ml	6 ml
4x Trenngelpuffer	3,75 ml	3,75 ml
H ₂ O	7,75 ml	5,25 ml
TEMED	10 µl	10 µl
APS 20 %	30 µl	30 µl

Acrylamid für SDS-PAGE (Roth)

Acrylamid	30 %
N,N'Methylen-bisacrylamid	0,8 %

14.5 Western-Blot

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung können Proteine durch Western-Blot nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Proteine aus dem SDS-PAGE-Gel (IV.14.4) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia) transferiert und anschließend mit einer Chemilumineszenzmethode nachgewiesen. Für den Proteintransfer wurde das SDS-PAGE-Gel in einem *Sandwich* aus Filterpapieren (GB; Schleicher und Schüll) und der Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham Pharmacia) in eine Blottingapparatur (Mini Trans Blot[®]; Biorad) eingespannt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und für eine Stunde eine konstante Stromstärke (300 mA) angelegt. Im Falle der Verwendung eines vorgefärbten Proteinmarkers (*prestained*) konnte anhand der Färbung die Güte des Proteintransfers beurteilt werden. Zur Visualisierung des nicht vorgefärbten Proteinmarkers wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde die Membran fünf Minuten in Ponceau-S-Lösung gebadet und nach kurzem Waschen mit H₂O der Marker mit Bleistift nachgezogen. Nach weiteren Waschschrinen in 1x TBST wurde, um das unspezifische Binden der Antikörper zu minimieren, für 1 bis 2 Stunden mit 5 % BSA in 1x TBST bei RT blockiert. Über Nacht wurde die Membran bei 4 °C mit einer Verdünnung des Primärantikörpers mit 1 % BSA in 1x TBST inkubiert. Dieser erkennt das auf der Membran gebundene Protein. Nach weiteren drei Waschschrinen in 1x TBST wurde die Membran für 1 Stunde mit der Verdünnung eines Sekundärantikörpers inkubiert, der gegen Immunglobuline der Spezies, aus der die Erstantikörper gewonnen wurden, gerichtet ist. Es wurden Zweitantikörper verwendet, die mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt sind. Nach fünf Waschschrinen mit 1x TBST wurde die Detektionsreaktion durchgeführt. Hierfür wurde aufgrund der hohen Empfindlichkeit ein Chemilumineszenz-System (ECL, Amersham Pharmacia) verwendet. Dabei wird durch die Meerrettichperoxidase in

Anwesenheit von H_2O_2 Luminol zu 3-Aminophthalat oxidiert. Bei der Reaktion wird ein lichtemittierender, angeregter Übergangszustand durchlaufen. Die Chemilumineszenz lässt sich durch Auflegen eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia) nachweisen.

Transferpuffer		Ponceau-S-Lösung	
Tris	3,03 g	Ponceau S (Sigma)	0,5 g
Glycin	14,4 g	Eisessig (Roth)	1 ml
Methanol (Roth)	200 ml	H_2O	ad 100 ml
H_2O	ad 1000 ml		

15 Histologie

15.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Für die Durchführung von histologischen Färbungen und zur immunologischen Lokalisierung von Proteinen wurden von den untersuchten Geweben Gefrierschnitte hergestellt. Die Schnitte wurden an einem Kryotom der Firma Microm (HM-500) bei -20 bis -30 °C angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger (Roth) aufgeschmolzen. Dienten die Gewebeschnitte dem Nachweis von RNS (IV.13), wurden alle Objektträger bis zur Beendigung der Arbeit im Kryotom gehalten, für 20 Minuten unter Vakuum getrocknet und anschließend sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert. Für alle anderen histologischen Methoden wurden die Gefrierschnitte bei Raumtemperatur getrocknet und zur Lagerung bei -20 °C aufbewahrt.

15.1.1 Gefrierschnitte aus Gehirn

Das herauspräparierte und eingefrorene Mausgehirn (IV.2.2.1) wurde mit OCT (Tissue Tek #4583; SCI Science Services) auf einem Schneideteller (Microm oder Leica) befestigt und bei -20 bis -25 °C geschnitten. Konsekutive 10-14 μm dünne coronare oder saggitale Gefrierschnitte wurden angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger (Roth) mit der Wärme der Finger angeschmolzen. Drei bis vier Gewebeschnitte wurden auf jedem Objektträger aufgebracht.

15.1.2 Gefrierschnitte aus der Netzhaut

Nach Einbetten der Retinapräparate, wie in Abschnitt IV.2.3.1 beschrieben, wurden diese mit OCT bei -30 °C auf Schneideteller befestigt. Serielle 10 μm Kryoschnitte wurden angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträger aufgeschmolzen.

15.2 Histologische Färbungen

Die Beurteilung der Qualität eines Gewebeschnittes bzw. die Visualisierung bestimmter Strukturen in einem Gewebeverbund wird durch histologische Färbemethoden ermöglicht.

15.2.1 Nissl-Färbung

Zur Färbung von Gehirnschnitten wurde eine Nissl-Färbemethode verwendet. Hierbei werden Bestandteile des Zellkerns sowie die basophile Nisslsubstanz (RNS-reiches rauhes endoplasmatisches Retikulum) von Neuronen durch einen basischen Farbstoff gefärbt. Es wurde eine Kresylviolettazetat-Lösung benutzt. Die Gewebeschnitte wurden 30 bis 90 Sekunden gefärbt, in einer Ethanolreihe entfärbt und dehydriert und nach Xylol-Behandlung in Harz (Roti-Histoclear, Roth) mit Deckgläschen eingebettet.

15.2.2 Hoechst-Färbung

Zur Visualisierung der Zellkerne bei Fluoreszenzlichtaufnahmen oder zur Beurteilung der Zellkernmorphologie bei der Fluoreszenz-TUNEL-Methode wurde im Anschluss an den

eigentlichen Versuch (z.B. Fluoreszenzimmunhistochemie) eine Hoechstfärbung durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebeschnitte nach den letzten Waschschritten für 5 Minuten mit einer wässrigen Hoechst 33342-Verdünnung (2-5µg/ml; Molecular Probes) behandelt. Die Hoechst-Färbung wurde im Anschluss an die immunhistochemische Prozedur durchgeführt.

15.3 Lektin-Histochemie

Lektine, auch Agglutinine genannt, sind Proteine die eine hohe Affinität zu bestimmten Oligosacchariden zeigen. Proteoglykane, Glykoproteine und Glykolipide finden sich in verschiedenen Strukturen und Organellen von Zellen, vorwiegend jedoch an äußeren Oberflächen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Lektin aus der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) aufgrund seiner Eigenschaft, in der Retina spezifisch nur an extrazelluläre Strukturen der Zapfen zu binden (Blanks et al. 1984), verwendet. Das Erdnussagglutinin (**peanut agglutinin**, PNA) ist ein 110 kD Protein bestehend aus vier identischen 27 kD Untereinheiten, das eine hohe Spezifität gegenüber Galaktosyl(β-1,3)N-acetylgalaktosamin-Resten zeigt (Lotan et al. 1975). Es wurde ein Biotin- bzw. Fluoresceinthiocyanat (FITC)-markiertes PNA (Sigma) in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Visualisierung des Biotin-markierten PNA erfolgte mittels einer Avidin-Biotin Reaktion durch die Zugabe einer 1:100 Verdünnung von fluoreszenzmarkiertem Avidin (Farbstoffe DY-550 oder DY-630; Dyomics). Die Lektininkubation erfolgte meist gemeinsam mit der Verdünnung der Sekundäantikörper während der Immunhistochemie (IV.15.4). Die Auswertung wurde am Epifluoreszenz- oder Laser-Konfokalmikroskop durchgeführt (IV.16).

15.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbemethoden besitzen in der medizinischen Diagnostik und der biomedizinischen Forschung eine sehr bedeutende Rolle. Die Methode wurde von Coons erstmals beschrieben (Coons 1941) und seither stets modifiziert und verbessert. Das Prinzip beruht auf der selektiven Erkennung von Antigenen in Zellen und Gewebeschnitten durch spezifische Antikörper. Diese können durch einen Fluoreszenzfarbstoff, ein Enzym oder ein Hapten markiert sein und somit direkt oder über nachgeschaltete Reaktionen visualisiert werden. Wichtige Voraussetzung für diese Methoden ist das Vorhandensein gut erhaltener Strukturen und Epitope in den Präparaten sowie hochspezifische Antikörper.

Durch immunhistochemische Methoden lassen sich Aussagen über die Expression und Lokalisierung von Proteinen treffen, durch Mehrfachmarkierungen ist die Kolokalisierung mit anderen Proteinen und Strukturen möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunhistochemie zum Nachweis von CNGA3 auf fixierten Gewebeschnitten der Retina und dem Gehirn der Maus verwendet. Zusätzlich wurde eine Reihe von Antikörpern eingesetzt, die zur Visualisierung bestimmter Proteine in der Netzhaut der Maus dienen.

15.4.1 Protokoll für Gewebeschnitte

Die getrockneten Gewebeschnitte (IV.15.1) wurden direkt verwendet, bzw. bei -20 °C gelagerte Schnitte wurden auf Raumtemperatur gebracht. Die Antikörperinkubationen wurden in einer feuchten verschließbaren Kunststoff-Box und alle Schritte, falls nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach kurzem Waschen mit 0,1M PB (Zusammensetzung siehe IV.14.1) wurde 10 Minuten mit 4 % PFA in PB fixiert. Danach wurde dreimal je 5 Minuten mit 1x PB gewaschen und für mindestens eine Stunde mit Blockierlösung inkubiert. Hierdurch wurden unspezifische Bindungsstellen der Antikörper abgesättigt. Die Blockierlösung wurde anschließend durch eine Verdünnung eines oder mehrerer Primäantikörper (siehe Anhang VIII.3.1) in

Inkubationslösung ausgetauscht und bei 4 °C für ca. 16 h inkubiert. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch drei 15-minütige Waschschrte in 2 % NGS in PB entfernt. Anschließend wurde für 1-2 Stunden mit einer Verdünnung des Sekundärantikörpers (siehe Anhang VIII.3.2) in 2 % NGS/PB inkubiert. Es wurde ein Sekundärantikörper verwendet, der spezifisch Immunglobulin-G der Spezies erkennt, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde. Bei der gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Proteine wurde ein Gemisch von Sekundärantikörpern verwendet. Diente die Immunhistochemie der Visualisierung von Proteinen in den Zapfen, wurde der Sekundärantikörper-Lösung das Erdnusslektin zugegeben, was eine Zapfenvisualisierung ermöglichte.

15.4.2 Protokoll für *whole mount* Retinapräparate

Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden unter ständigem Schwenken in kleinen Inkubationsschälchen mit Glasdeckel (Merck) durchgeführt. Die isolierte Netzhaut (IV.2.3.3) wurde nach drei 20-minütigen Waschschrten in 0,1 M PB für mindestens 3 Stunden in Blockierlösung geschwenkt. Die Erstantikörper-Inkubation (Verdünnung in Inkubationslösung) erfolgte für 16-18 Stunden bei 4 °C. Vor der Inkubation mit der Sekundärantikörper-Verdünnung wurde dreimal für 20 Minuten mit 2 % NGS gewaschen. Mit der Verdünnung, die zur Markierung aller Zapfen das Erdnussagglutinin und bei Mehrfachproteinbestimmungen alle Sekundärantikörper enthielt, wurde 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei Waschschrten in 2 % NGS und zwei in 0,1 M PB wurden die Netzhautpräparate unter dem Stereomikroskop mit der Photorezeptorschicht nach oben auf Objektträger gezogen und mit dem wässrigen Einbettmedium Permafluor (Beckmann-Coulter) und Deckgläschen eingedeckelt. Die Präparate wurden durch Epifluoreszenzmikroskopie (IV.16.1) ausgewertet.

Verwendete Lösungen:

0,2M PB pH7,4

NaCl (Roth)	40,0 g
KCl (Roth)	1,0 g
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O	14,5 g
KH ₂ PO ₄ (Roth)	1,2 g
H ₂ O	ad 5000 ml

autoklavieren

4 % PFA in PB

Paraformaldehyd (Merck)	6 g
0,1M PB	ad 150 ml

bei 60 °C lösen, auf 4 °C abkühlen,
sterilfiltrieren (0,2 µm) und bei -20 °C lagern

0,1M PB

0,2M PB	1 Teil
H ₂ O	1 Teil

sterilfiltrieren (0,2 µm)

2 % NGS in PB

NGS (Vector)	2 %
0,1M PB	

Blockierlösung

NGS (Vector)	10 %
Triton X-100	0,3 %
BSA	4 %
0,1 M PB	

Inkubationslösung

NGS (Vector)	5 %
Triton X-100	0,2 %
BSA	2 %
0,1 M PB	

15.5 Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling

Bei der TUNEL-Methode (Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) werden die bei der Apoptose durch DNS-Stangbrüche verstärkt freigelegten DNS-3'-Enden mit Hilfe einer Markierungsreaktion im Gewebe sichtbar gemacht. Die Methode wurde erstmals von Gavrieli et al. 1992 beschrieben und wird heute sehr häufig, kombiniert mit weiteren Methoden zum Nachweis und zur Lokalisierung apoptotischer Zellen verwendet.

Das Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase hängt an die freien 3'-OH-Gruppen die markierten Desoxynukleotide an. Die Spezifität beruht darauf, dass in nicht-apoptotischen Zellen kaum freie Hydroxylgruppen zur Verfügung stehen. Da ein vermehrtes Auftreten von DNS-Strangbrüchen in nekrotischen Zellen nicht ganz auszuschließen ist, sollten zur Abgrenzung weitere Methoden herangezogen werden.

15.5.1 Protokoll

Es wurde eine direkte Fluoreszenz-Methode und eine indirekte Methode mit einer enzymatischen Farbreaktion durchgeführt. Im ersten Fall wurde ein mit Fluoresceinthiocyanat markiertes dUTP (FITC-dUTP, Roche) verwendet, im zweiten ein mit Digoxigenin markiertes dUTP (DIG-dUTP, Roche) wobei die Visualisierung über einen Meerrettich-Peroxydasen (HRP) markierten anti-Digoxigenin Antikörper (sheep anti DIG-IgG Fab-Fragment, Roche) und einer DAB-Farbreaktion (Diaminobenzidin) erfolgte. Alternativ wurde auch das ApopTag Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection Kit (Intergen) verwendet, welches auch auf dem anti-DIG/DAB-Verfahren beruht. Es wurde nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet.

Bei Verwendung der Fluoreszenzmethode wurde im Anschluss eine Hoechst-Färbung (Hoechst 33342, Molecular Probes) zur Beurteilung der Zellkernmorphologie durchgeführt.

Fluoreszenz-Verfahren	anti-DIG/DAB-Verfahren
Die Retinaschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut (IV.15.1.2)	
<ul style="list-style-type: none"> • 5 Minuten waschen mit PBS • 5 Minuten permeabilisieren mit 0,5 % Triton X-100 • 3x 5 Minuten Waschen mit PBS 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 Minuten Blockieren endogener Peroxidasen mit 3 % H₂O₂/PBS • 3x 5 Minuten Waschen mit PBS
TdT-Reaktionsmix:	
<ul style="list-style-type: none"> • 1x TdT-Puffer (Roche oder NEB) • 2,5 mM CoCl₂ (Roche oder NEB) • 33,3 nM FITC-dUTP • 133,3 nM dATP (Roche) 	<ul style="list-style-type: none"> • 33,3 nM DIG-dUTP
Schnitte mit Reaktionsmix bedecken, 1-1,5 Stunden bei 37 °C inkubieren	
<ul style="list-style-type: none"> • 5 Minuten 5µg/ml Hoechst in PBS • 3x 5 Minuten waschen mit PBS • in Permafluor eingedeckeln und konfokalmikroskopisch auswerten 	<ul style="list-style-type: none"> • 30 Minuten Blockieren mit 1x Blockierlösung in PBS • 45 Minuten Inkubation mit 1:150 anti-DIG Antikörper • 3x 5 Minuten waschen mit PBS • 3-7 Minuten DAB-Nickel Färbung • Dehydrieren über Ethanolreihe-Xylol und mit Roti-Histoclear eindeckeln und mikroskopieren

DAB-Nickel Färbung

DAB (5,4 mg/ml, Sigma)	4 ml
1x PBS	32 ml
20 % Glukose-Lsg	400 µl
0,4 % NH ₄ Cl-Lsg	400 µl
1 % Ammonium-Nickel-Sulfat-Lsg	3,2 ml
Glucoseoxidase (1.300 U/ml; Sigma)	40 µl

Prinzip: Die Meerrettichperoxidase oxidiert mit Hilfe des in situ entstehenden H₂O₂ (Abbau von Glukose zu Glukonsäure durch die Glukoseoxidase) 3,5-Diaminobenzidin zu braunen Produkten, die durch Komplexbildung mit Ni³⁺ dunkelgrau erscheinen.

16 Mikroskopie**16.1 Epifluoreszenzmikroskopie**

Lichtmikroskopische und fluoreszenzlichtmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop mit digitaler Kamera (HMRC, Zeiss) und angeschlossenem PC durchgeführt. Eine Atto Arc Fluoreszenzlichtquelle mit HBO-Lampe (100W; Zeiss) wurde verwendet. Das Mikroskop war mit folgenden Filtern bestückt:

Bezeichnung	#	Anregung	beamsplitter	Emission	Verwendet für:
Filterset 01	(488001-0000)	BP 365/12	FT 395	LP 397	Hoechst
Filterset 10	(488010-0000)	BP 450-490	FT 510	LP 515-565	FITC, Alexa 488
Filterset 38	(1031-350)	BP 470/40	FT 495	BP 525/50	FITC, Alexa 488
Filterset 15	(488015-0000)	BP 546/12	FT 580	LP 590	Alexa 546, Cy3, DY 550
Filterset 31	(1031-350)	BP 565/30	FT 585	LP 620/60	Alexa 594, DY610

Tabelle 4 Filtersets zur selektiven Detektion am Axioskop-Epifluoreszenzmikroskop.

Mit der AxioVision Software (Versionen 3.1-3.2, Zeiss) erfolgte die Mikroskopsteuerung, Bildaufnahme und digitale Bearbeitung.

16.2 Laser-Konfokalmikroskopie

Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem LSM 510 Meta Laser-Konfokalmikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Die verwendeten Laser sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Laser	benutzte Laserlinien	Verwendet für:
UV	351 nm	Hoechst
Argon2	488 nm	FITC, Alexa 488
HeNe/1	543 nm	Alexa 546, Alexa 594, Cy3, DY 550, DY 610
HeNe/2	633 nm	Alexa 633, DY 630

Tabelle 5 Laser zur Fluoreszenzanregung am LSM 510 Meta.

16.3 Rasterelektronenmikroskopie

Es wurde das Rasterelektronenmikroskop XL 40 von Philips verwendet. Die Proben wurden nach der Vorbehandlung wie in Abschnitt IV.2.3.4 beschrieben mit Carbon-Klebstoff auf Aluminiumtellerchen befestigt und mit einer feinen Goldschicht überzogen, um die Elektronendichte zu erhöhen. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Mintova vom Institut für physikalische Chemie der LMU München durchgeführt.

16.4 Quantitative Auswertung

Die Quantifizierung der Seh-Zapfen erfolgte an repräsentativen Epifluoreszenz-aufnahmen aus der zentralen dorsalen, temporalen, nasalen und ventralen Region von entsprechend markierten whole-mount Retina-Präparaten in 400x Vergrößerung. Die Auszählung der Zapfen erfolgte mit Hilfe des Quantifizierungsmoduls der AxioVision Software (Versionen 3.1-3.2, Zeiss) in dem gesamten Aufnahmegebiet (Fläche: 0,875 mm²).

Die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen erfolgte an Durchlichtaufnahmen der Retina (200x Vergrößerung) TUNEL-markierter Netzhautschnittpräparate mit dem gleichen Quantifizierungsmodul. Die Daten wurden anschließend mit einem Statistikprogramm ausgewertet.

17 Elektrophysiologische Untersuchungen am Hippocampus

Die elektrophysiologischen Untersuchungen am Hippocampus wurden in Zusammenarbeit mit Priv. Doz. Dr. T. Kleppisch (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München) durchgeführt.

Es wurden exzitatorische postsynaptische Feldpotentiale (fEPSP) in der CA1 Region des Hippocampus von CNGA3-defizienten Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäusen (sv129 Stamm und C57-BL6/N Stamm, IV.1.1) gemessen (Kleppisch et al. 1999, Kleppisch et al. 2001). Dabei handelte es sich um Geschwisterpaare (nur adulte männliche Tiere), die aus der Verpaarung CNGA3-heterozygoter Elterntiere stammen. Die 400 µm dicken sagittalen Hippocampuschnitte wurden mit 30 °C warmer artifizierter Zerebrospinal-flüssigkeit (aACSF) perfundiert (1-2 ml/min), wobei die aACSF ständig mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast wurde. Die Stimulationselektrode wurde in die Region der Schaffer-Kollateralen gesetzt und die Stimulation wurde mittels eines Interface (Instrutech) und der PULSE Software (HEKA) durchgeführt. Die Messung der fEPSP erfolgte in der CA1-Region mit Glaselektroden, die mit 3M NaCl befüllt waren, und einem AXOCLAMP 2B Amplifier. Die Pulsprotokolle zur Induktion einer Langzeitpotenzierung (LTP) waren 50 Hz über 1 s für den schwachen Tetanus und 3 x 30 Pulse von jeweils 100 Hz mit einer Pause von 5 s für den starken Tetanus. Um eine Langzeitdepression (LTD) hervorzurufen, wurden 900 Pulspaare von 1 Hz mit einem Zwischenpulsintervall von 50 ms verwendet. Anhand der Steigung der fEPSP wurde die Stärke der synaptischen Transmission ermittelt.

18 Verhaltensversuche

Für die Verhaltensversuche wurden ausschließlich männliche 2-7 Monate alte CNGA3 -/- und +/- Geschwister (*litter matched*, "aus einem Wurf") verwendet. Die Tiere wurden mindestens eine Woche vor Beginn der Versuche vereinzelt und in Einzelkäfigen bei inversem Licht/Dunkel-Zyklus (12h:12h, Licht aus 8 Uhr morgens) oder normalem Licht/Dunkel-

Zyklus (12h:12h, Licht an 8 Uhr morgens) gehalten. Alle Versuche wurden verblindet durchgeführt und ausgewertet.

18.1 Diskriminierendes zwei Plattform *water-maze*

Um die Funktion des Hippocampus bei den CNGA3-defizienten Mäusen zu untersuchen, wurde dieser Test der räumlichen Orientierungsfähigkeit gewählt. Beim *water maze*-Test ("Wasser-Irrgarten") handelt es sich um einen diskriminierenden Test bei dem die Maus sich, schwimmend in einem Wasserbecken, zwischen zwei gleich aussehenden Plattformen entscheiden muss (Arns et al. 1999). Der Testapparat besteht aus einem Wasserbassin mit 80 cm Durchmesser und acht Startluken (Abbildung 13). Das Becken war mit 21 ± 1 °C warmem Wasser befüllt, welches durch Deckweiß (Pelikan) eingetrübt wurde, um der Maus keine Sicht auf den Beckengrund zu ermöglichen. Von den zwei Plattformen war nur die eine stabil, die andere sank nach unten, wenn die Maus sie bestieg.

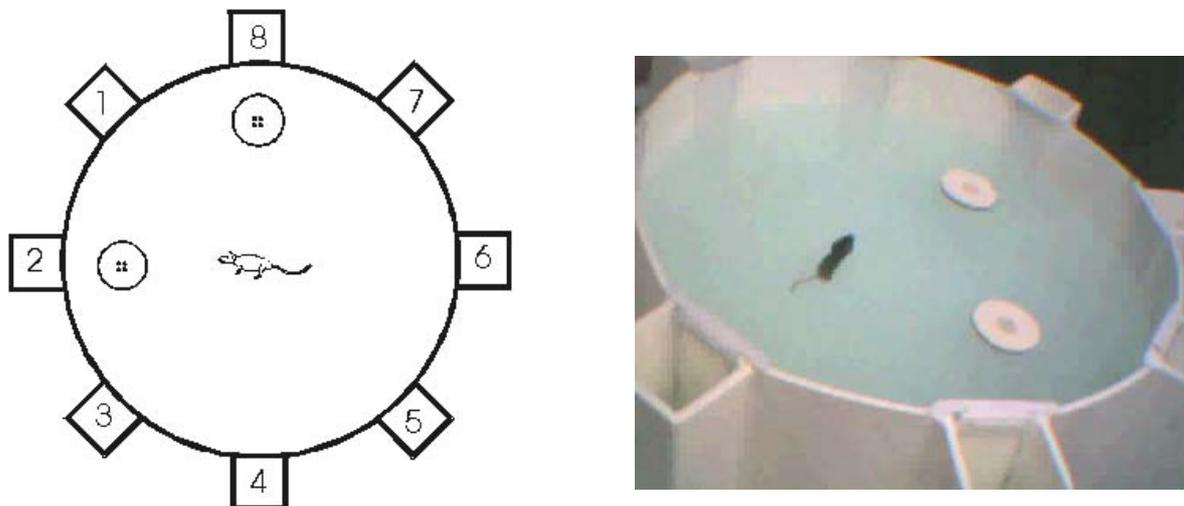


Abbildung 13

Darstellung des verwendeten diskriminierenden water maze. Schematische Aufsicht des water maze (links). Die acht Startluken, sowie die zwei schwimmenden Plattformen sind zu erkennen. Aufnahme während eines Testlaufs bei normalen Lichtverhältnissen (rechts).

Da es sich hierbei um einen visuellen Orientierungstest handelt und CNGA3-defiziente Mäuse keine funktionierenden Seh-Zapfen besitzen, wurde, um eine Einflussnahme dieses Defekts auszuschließen, der Test im Dunklen bei $1 \pm 0,1$ lux durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sehen die Mäuse ausschließlich mit den Stäbchen, die bei CNGA3^{-/-} Mäusen eine normale Funktion besitzen (Biel et al. 1999). Die Versuche fanden tagsüber statt und die Mäuse wurden hierzu im inversen Rhythmus gehalten. Im Raum wurden markante Orientierungshilfen aufgestellt.

Versuchsdurchführung:

Am Vortag des eigentlichen Versuchs wurden die Tiere in einem neutralen Wasserbassin an das Wasser gewöhnt. Der Versuch war in eine Erlernungsphase (Tag 1 bis Tag 5), der Spezifitätskontrolle (Tag 6) und einer Wiedererlernungsphase (Tag 6 bis Tag 9) eingeteilt. Die stabile Plattform befand sich von Tag 1 bis Tag 5 auf Position 8 und wurde ab Tag 6 an auf die entgegengesetzte Position 4 versetzt. Die nicht stabile ("falsche") Plattform wurde nach Beendigung eines Laufs umpositioniert. An jedem Tag wurden 10 Läufe durchgeführt in

einem 2-4 Minuten Intervall. Jeder Lauf wurde nach einem randomisierten Protokoll von unterschiedlicher Position gestartet. Die Zeit bis zur Wahl einer Plattform wurde gestoppt. Falls 30 s überschritten wurden, wurde der Lauf abgebrochen und die Maus für 10 s auf die richtige Plattform positioniert. Hatte eine Maus die richtige Plattform von selbst gefunden, wurde sie für 10 s dort belassen. Nach jedem Lauf wurden die Plattformen gereinigt und das Wasser im Becken umgewälzt; somit sollte eine Orientierung anhand des Geruchssinns verhindert werden. Zusätzlich zur gestoppten Zeit wurde die richtige oder falsche Entscheidung notiert und das Schwimmverhalten bewertet.

Am sechsten Versuchstag wurde die Position der richtigen Plattform von der Position 8 auf die Position 4 gewechselt. Die Tiere, die an den Tagen zuvor die Position der Plattform richtig anhand räumlicher Informationen in der Umgebung erlernt haben, müssen durch diesen Austausch eine deutliche Verschlechterung der Leistung zeigen. Falls die richtige Plattform durch andere olfaktorische oder visuelle Faktoren erkannt wurde, müsste diese auch in der neuen Position gefunden werden. Eine Erniedrigung der Leistung auf die Wahrscheinlichkeitsgrenze von 50 % gilt als Beweis von räumlichem Lernen.

18.2 Forced swimming task

Beim *Forced Swimming Task* handelt es sich um einen Versuch, bei dem man das Stressverhalten der Mäuse testen kann. Er wurde erstmals mit Ratten beschrieben, als Test für die Wirkung von Antidepressiva auf das Stressverhalten (Porsolt et al. 1977). Die Tiere zeigen, wenn sie in einen Zylinder mit Wasser gesetzt werden, nach erster Stressphase mit hoher Mobilität eine Immobilisierung. Werden die gleichen Tiere am nächsten Tag nochmals getestet, stellt sich die Immobilisierungsphase schneller ein und ist länger anhaltend. Die Ratten, denen Antidepressiva verabreicht wurden, zeigten eine signifikant verkürzte Immobilisierungsphase, was auf eine Verschiebung der Toleranzgrenze schließen lässt.

Versuchsdurchführung:

Die Versuchstiere wurden in Einzelkäfigen gehalten und befanden sich im normalen Licht/Dunkel-Zyklus. Die Mäuse wurden in Glaszylinder (25 cm Höhe, 17,5 cm Durchmesser) gesetzt, die mit temperiertem Wasser (25 ± 1 °C) gefüllt waren, und 6 Minuten lang das Verhalten beobachtet. Zur Dokumentation wurde eine Panasonic VHS-C Videokamera verwendet. 24 Stunden später wurde die Prozedur wiederholt. Die Auswertung erfolgte anschließend am Monitor, wobei die Zeit gewertet wurde, die eine Maus treibend ohne Bewegung des Körpers im Wasser verbrachte.

18.3 Angstkonditionierung

18.3.1 Konditionierung

Bei der akustischen und der kontextuellen Angstkonditionierung handelt es sich um modifizierte Formen der Pavlov'schen Konditionierung. Die akustische Angstkonditionierung ist ein experimentelles Modell zur Erforschung der Funktion der Amygdala bei der Bildung des emotionalen Gedächtnisses (Davis et al. 1994, LeDoux 1995). Bei der kontextuellen Angstkonditionierung wird die Verknüpfung des emotionalen Gedächtnisses mit dem räumlichen Gedächtnis und somit das Zusammenspiel zwischen der Amygdala und dem Hippocampus untersucht (Sanders et al. 2003). Wie bei der klassischen Konditionierung wird durch einen neutralen Reiz, der mit einer angeborenen Verhaltensreaktion durch Lernen verknüpft wurde, eine Reaktion ausgelöst. Akustische und kontextuelle Angstkonditionierung können auch als ein Versuch durchgeführt werden, wobei die neutralen Reize ein akustisches Signal und die räumliche Information (Umgebung in der Kammer) der Konditionierungskammer sind. Diese werden mit einem aversiven Reiz, zumeist ein elektrischer Schock über

Das Verhalten der Tiere wurde per Videokamera aufgezeichnet und nach Beendigung aller Versuche ausgewertet. Als *freezing* wurde das Fehlen jeglicher Bewegung gewertet, die Atembewegungen ausgeschlossen. Versuchsdurchführung und Auswertung waren verblindet.

18.3.2 Sensitivierung

Mit einer weiteren Gruppe von Tieren wurde ein Sensitivierungstest durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Kontrollversuch, der eine unterschiedliche Wahrnehmung des Tons bzw. des elektrischen Schocks durch die zu vergleichenden Versuchsgruppen ausschließen soll.

Die Versuchsdurchführung gleicht der Konditionierung (IV.18.3.1), mit dem Unterschied, dass am Konditionierungstag (Tag 0) der Elektroschock und der Ton getrennt verabreicht wurden und nicht koterminierten.

V. Ergebnisse

1 Expression von CNG-Kanälen im ZNS

Es besteht noch keine Klarheit darüber ob und in welchem Maße CNG-Kanäle im ZNS exprimiert werden. Da uns interessierte ob diese Ionenkanäle eine funktionelle Rolle im ZNS besitzen und wir dieser Fragestellung mit Hilfe einer CNGA3-defizienten Maus nachgehen wollten, sollte die Expression aller CNG-Kanäle im Gehirn der Maus untersucht werden. Wir haben uns auf vier wichtige Gehirnregionen konzentriert und wollten zunächst mit einer Untersuchung auf Transkriptebe Ebene beginnen. Die Expression wurde in CNGA3 $+/+$ Mäusen und CNGA3 $-/-$ Mäusen untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Da eine geringe Expressionsrate zu erwarten war, wurde zunächst die RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) angewendet. Anschließend sollte die Expression von CNGA3 mittels *in situ-Hybridisierung* und auf Proteinebene immunhistochemisch untersucht werden.

1.1.1 RT-PCR

Eine semiquantitative RT-PCR wurde durchgeführt um vergleichende Aussagen über die Expression der einzelnen CNG-Untereinheiten in den untersuchten Gehirnregionen treffen zu können. Untersucht wurden alle 6 CNG-Untereinheiten im olfaktorischen Bulbus, dem Kleinhirn, dem Hippocampus und der Amygdala.

Als Ausgangsmaterial für die reverse Transkription, wurde ausschließlich die Boten-RNS verwendet. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Boten-RNS in konzentrierter Form vorliegt. Diese wurde mit der sensitiven DynaBeads-Methode (IV.3.1) direkt aus dem Gewebelysate isoliert. Zusätzlich wurde die RT-PCR in einem Zweischnittverfahren durchgeführt, um für die einzelnen Schritte die optimalen Bedingungen wählen zu können. Für die PCR wurde eine Zyklenzahl von 30 gewählt, da somit in allen Fällen Produkte entstanden, die noch einer linearen Amplifikation entsprachen.

Bei der Mikropräparation der basolateralen Amygdala wurden jeweils nur 2mg Gewebe erhalten. Aufgrund dessen wurden für jede Charge Boten-RNS die Amygdalae zweier Tiere vereinigt. Des Weiteren wurde für die PCR eine Zyklenzahl von 35 gewählt um Produkte zu erhalten die auf dem PAGE-Gel visualisiert werden konnten.

Als *house-keeping gene* wurde die Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT) gewählt. Es handelt sich hierbei um ein Enzym des Purinstoffwechsels, das an der Wiederverwertung von Hypoxanthin und Guanin beteiligt ist. Da es sich um ein Gen handelt, das in jeder Zelle in vergleichbarem Ausmaß exprimiert wird und keine Expressionsveränderungen beschrieben sind, kann es als Kontrollgen (*house-keeping gene*) verwendet werden. Für die HPRT-PCR wurde die Zyklenzahl mit 22 ebenfalls so gewählt, dass nichtgesättigte Produkte entstanden. Sie diene als interne Kontrolle für die Güte der cDNAs. Die Einzeldaten wurden auf die HPRT normalisiert.

10 μ l der erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels PAGE-Elektrophorese (IV.6.1) aufgetrennt. Zu vergleichende PCRs wurden auf ein gemeinsames PAGE-Gel aufgetragen. Nach digitaler Aufnahme konnten die resultierenden Gelbanden mit einer Quantifizierungssoftware densitometrisch ausgewertet (IV.5.1).

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse zusammengefasst, unter dem jeweiligen Graphen befinden sich ein repräsentatives PAGE-Gel.

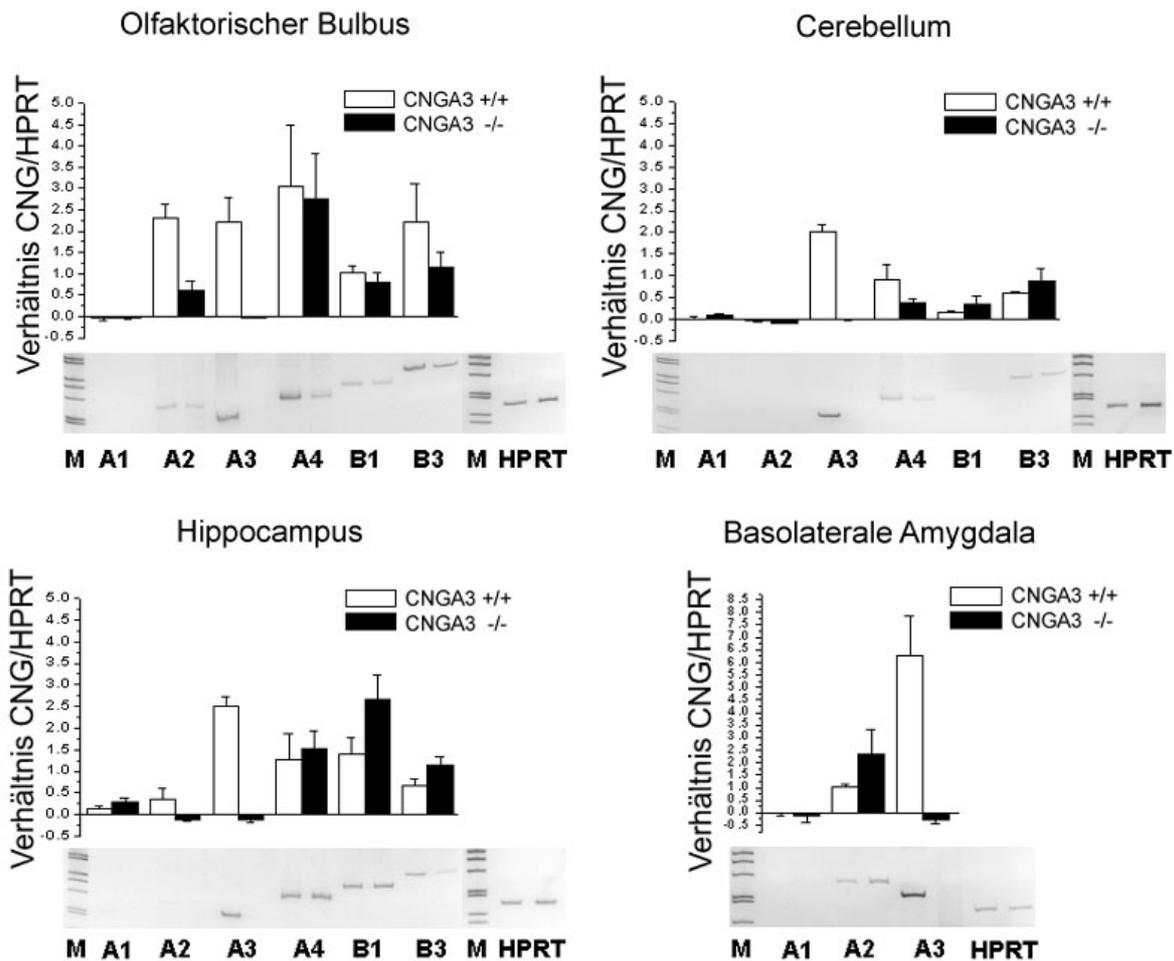


Abbildung 16

Semiquantitative RT-PCR. Analyse der Genexpression von CNG-Kanaluntereinheiten im olfaktorischen Bulbus, Cerebellum, Hippocampus und der Amygdala CNGA3-defizienter und CNGA3 +/+ Kontrollmäuse. Aufgetragen ist das Verhältnis der CNG-Bandenintensität relativ zum house-keeping gene HPRT (Mittelwert \pm SEM, $n = 3$).

Aus dem olfaktorischen Bulbus von CNGA3 +/+ Mäusen konnten Transkripte aller CNG-Untereinheiten, außer von CNGA1 amplifiziert werden. Bei den CNGA3 -/- Mäusen ergab sich ein ähnliches Bild mit dem Unterschied, dass CNGA3 nicht nachzuweisen war. Zudem zeigte CNGA2 eine erniedrigte Expression (t-test, $p < 0,05$). Im Cerebellum wurde von den Stromgebenden CNG-Untereinheiten nur CNGA3 im Wildtyp gefunden. Bis auf das Fehlen von CNGA3 bei den Deletionsmutanten ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede. Auch im Hippocampus war CNGA3 im Wildtyp stärker exprimiert als A1 und A2 (t-test, $p < 0,0005$ bzw. $p < 0,005$) und fehlte bei den CNGA3 -/- Mäusen (t-test, $p < 0,0005$).

In der basolateralen Amygdala wurde nur die Expression der stromgebenden A-Untereinheiten untersucht. Transkripte von CNGA2 und CNGA3 wurden gefunden, A3 war stärker exprimiert (t-test, $p < 0,05$). Erneut ergaben sich bis auf das Fehlen der CNGA3-Transkripte bei der CNGA3-defizienten Maus (t-test, $p < 0,05$) keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Kontrollmäusen.

1.1.2 *In situ*-Hybridisierung

Erste *in situ*-Hybridisierungs-Experimente mit ^{35}S -UTP markierten cRNS-Sonden ergaben im Gehirn der Maus, sowohl in der pre- als auch in der postnatalen Entwicklung, kein distinktes Hybridisierungssignal für CNGA3. Exemplarisch sind in Abbildung 17A die Ergebnisse an saggitalen Gewebeschnitten durch den Schädel einer neugeborenen Maus dargestellt. Im linken Teil der Abbildung ist das Ergebnis mit der *Antisense*-Sonde zu sehen, ausschließlich das deutliche Signal in der Retina ist zu erkennen. Im rechten Teil der Abbildung ist zu sehen, dass die *Sense*-Probe kein signifikantes Signal ergab. In Abbildung 17B sind Gewebeschnitte aus der selben Schnittebene zu sehen, die mit einer Sonde gegen den Activin-Rezeptor II hybridisiert wurden. Dieses Experiment diente der Visualisierung verschiedener Gehirnstrukturen. Eine Sonde welche gegen die modulierende Untereinheit des Zapfen-Kanals CNGB3 gerichtet war ergab sowohl im Gehirn, wie in der Retina, ein identisches Hybridisierungssignal zu der CNGA3-Sonde (nicht gezeigte Daten und Gerstner et al. 2000).

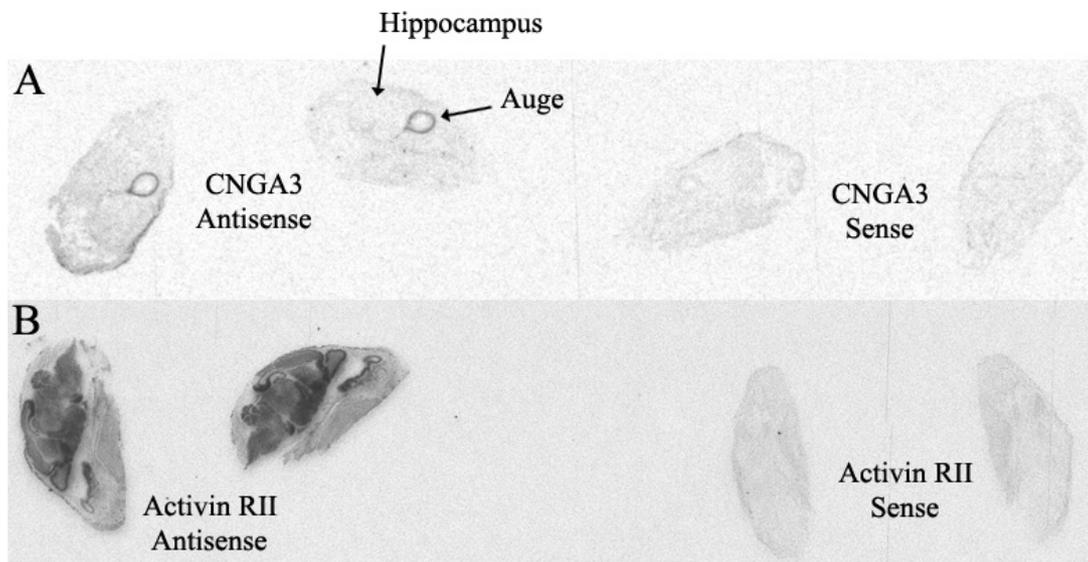


Abbildung 17

Radioaktive *in situ*-Hybridisierung. **A)** Markierung von CNGA3 Boten-RNS auf saggitalen Kryoschnitten von 1 Tag alten Wildtypmäusen. Linker Teil: Signal der Antisense-Sonde, rechter Teil Signal der Sense-Sonde. **B)** Signal der Activin RII cRNS-Sonden auf Gewebeschnitten in der gleichen Ebene wie in A). Links ist das antisense, rechts das sense Signal zu sehen.

Aufgrund der niedrigen Expressionsrate von CNGA3 Boten-RNS im Gehirn der Maus konnte diese somit nur mit RT-PCR, jedoch nicht mit konventioneller *In situ*-Hybridisierung detektiert werden. Da uns die genaue Lokalisierung der Expression von CNGA3 interessierte wählten wir als einen sensitiveren Ansatz, eine *in situ*-Hybridisierung mit anschließender Tyramid-Signalamplifikation (TSA).

Verwendet wurden diesmal DNS-Oligonukleotidsonden, da diese aufgrund der geringeren Länge ein verbessertes Penetrationsverhalten im Gewebeschnitt zeigen. Die Sonden wurden am 3'-Ende mit Digoxigenin-dUTP markiert. Digoxigenin (DIG) wurde verwendet um mittels Peroxidase-markiertem anti-DIG Antikörper (HRP anti-DIG AK; Roche), die Peroxidase indirekt an die zu detektierende Boten-RNS im Gewebe anzuhaften. Durch anschließende Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Tyramid (Cy3-Tyramid; NEN), ein Substrat der Peroxidase, wird dieses unter Verbrauch von H_2O_2 oxidiert, damit aktiviert und bindet an benachbarte Proteinstrukturen. Durch den Umsatz zahlreicher Tyramid-Moleküle durch eine

Peroxidase ergibt sich die gewünschte Signalamplifikation. Die Ergebnisse wurden am Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss) unter Verwendung eines Cy3-Filters detektiert und mittels digitaler Kamera dokumentiert. Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist kann mit dieser Methode im Hippocampus der CNGA3 $+/+$ Maus, jedoch nicht in dem CNGA3-defizienter Mäuse ein Hybridisierungssignal für CNGA3 beobachtet werden. Zu sehen ist ein schwaches jedoch klar definiertes Signal im Stratum pyramidale (hier der CA 1 Region, Pfeile in Abbildung 18). Das Signal im restlichen Hippocampus ist diffus (Stratum radiatum, Stratum moleculare), in den Granularzellen des Gyrus dentatus (DG) ist kein Signal zu erkennen. Die Sonde ergibt im Hippocampus der CNGA3 $-/-$ Maus ausschließlich ein Hintergrundsignal, welches diffus verteilt ist.

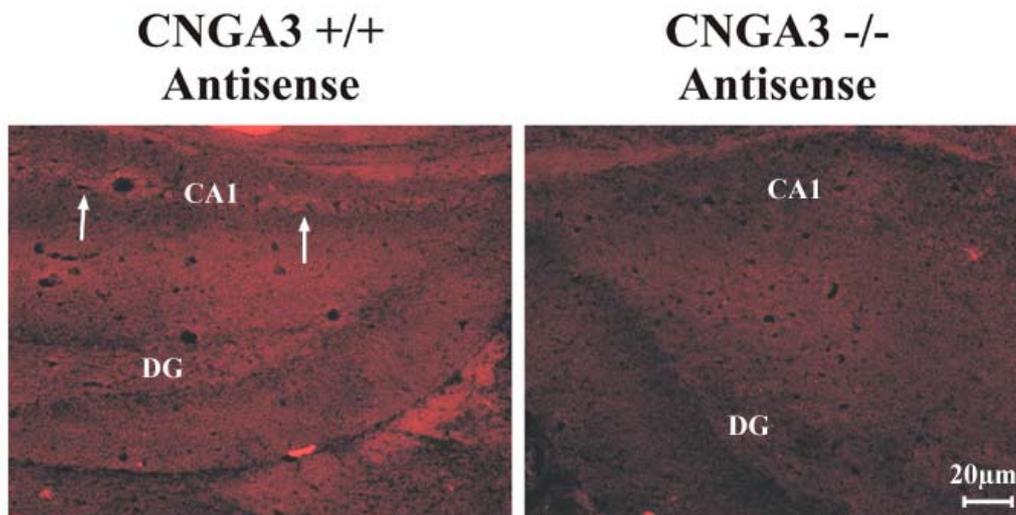


Abbildung 18

Oligo TSA *in situ*-Hybridisierung. Nachweis von CNGA3 Boten-RNS im Hippocampus 10 Wochen alter CNGA3 $+/+$ (links) und CNGA3 $-/-$ Mäuse (rechts). Zu sehen ist ein Ausschnitt aus 10 μm dicken coronaren Gehirnschnitten, der die CA1 Region zeigt.

1.1.3 Immunhistochemie

Um CNGA3 im Gehirn der Maus immunhistochemisch nachzuweisen, wurde ein Antikörper der gegen den C-Terminus von mCNGA3 gerichtet ist verwendet. Der Antikörper ergibt im Western-Blot aus Lysaten der Mausretina eine spezifische Bande auf der theoretisch berechneten Migrationshöhe (siehe Abbildung 37, Kapitel V.3.1.2). In immunhistochemischen Experimenten an der Mausretina konnten spezifisch die Seh-Zapfen markiert werden (siehe Abbildung 36, Kapitel V.3.1.1).

Bei ersten immunhistochemischen Ansätzen auf Gehirngewebe wurde hohe unspezifische Bindung des Antikörpers beobachtet. Um diese unspezifische Bindung zu minimieren wurde die Stringenz der Antikörperinkubationslösung erhöht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer Inkubationslösung welche anstatt der normal verwendeten Salzkonzentration (0,15M NaCl) 1,2mM NaCl enthält. Die optimale Salzkonzentration wurde zuvor mit verschiedenen Konzentrationen ausgetestet. Mit Hilfe dieses Versuchsansatzes konnte die unspezifische Bindung des CNGA3-Antikörpers in den meisten Gehirnregionen fast vollständig eliminiert werden. Die Ergebnisse in der CA1 Region des Hippocampus sind in Abbildung 19 gezeigt. Ausschließlich im Wildtyp, nicht jedoch in CNGA3 $-/-$ Mäusen, konnte ein schwaches Signal im Stratum pyramidale beobachtet werden.

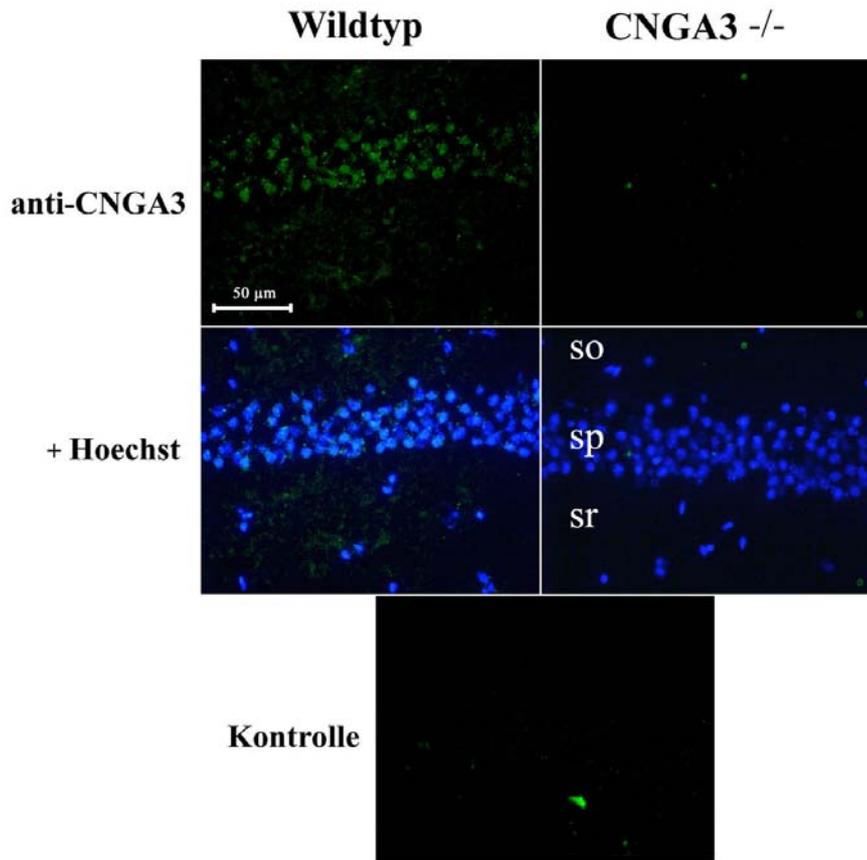


Abbildung 19

CNGA3-Immunhistochemie. Immunhistochemischer Nachweis des CNGA3 Proteins auf coronaren Gehirnschnitten 8 Wochen alter CNGA3 +/+ und CNGA3 -/- Mäuse. Eine Vergrößerung der CA1 Region des Hippocampus ist zu sehen. Im oberen Teil ist in grün das CNGA3-Signal dargestellt, darunter die jeweilige Überlagerung mit den Hoechst-gefärbten Zellkernen (blau). Ein Kontrollexperiment ohne Primärantikörper ist im unteren Teil abgebildet. (so = Stratum oriens, sp = Stratum pyramidale, sr = Stratum radiatum).

2 Funktion von CNG-Kanälen im ZNS

Durch den Nachweis von CNGA3-Kanälen im Hippocampus und der Amygdala ergab sich die Frage inwiefern die Deletion des CNGA3-Gens Konsequenzen für die normale Funktion dieser Gehirnregionen zeigt. Die Funktion von Hippocampus und Amygdala wurde zum einen mit elektrophysiologischen Experimenten *in vitro* untersucht (IV.17). Zum anderen wurden Lerntests durchgeführt, die eine normale Funktion dieser Gehirnregionen erfordern (IV.18). An transgenen Mäusen bei denen im Hippocampus oder der Amygdala funktionell wichtige Gene ausgeschaltet oder verändert wurden, konnten auch Veränderungen in der synaptischen Transmission sowie im räumlichen bzw. assoziativen Lernen gezeigt werden (Mead & Stephens 2003).

2.1 Zelluläre Organisation des ZNS CNGA3-defizienter Mäuse

Mit Hilfe von Nissl-gefärbten (IV.15.2.1) histologischen Gehirnschnitten aus CNGA3 $+/+$ und CNGA3 $-/-$ Mäusen wurde untersucht ob das Fehlen von CNGA3 zu Malformationen im ZNS führte. Wie in Abbildung 20 exemplarisch an olfaktorischem Bulbus und Hippocampus adulter Tier gezeigt, besitzt das Gehirn CNGA3-defizienter Mäuse eine normale Erscheinung. Im Vergleich zum Wildtyp sind keine histologischen Unterschiede zu erkennen.

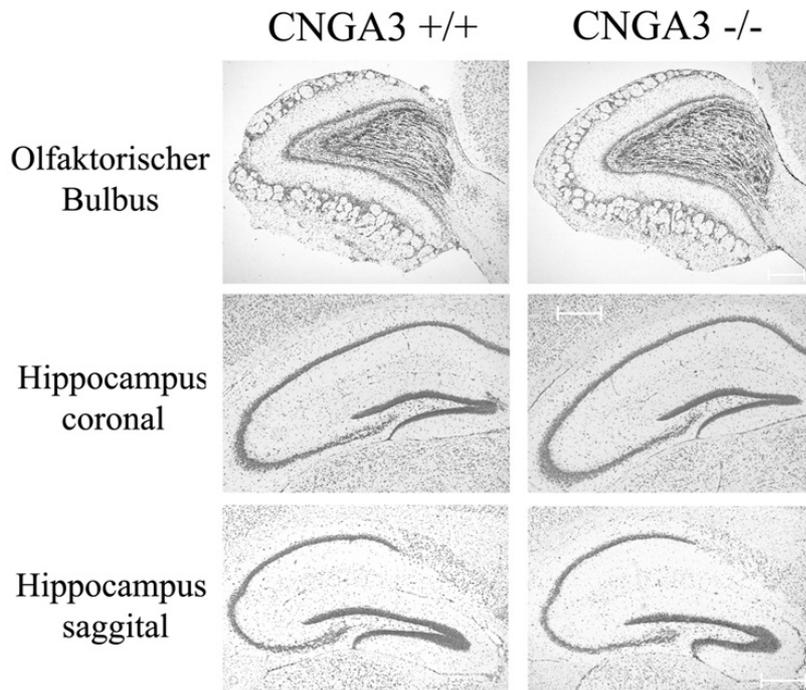


Abbildung 20

Histologische Nissl-Färbung. Nissl-gefärbte 10 µm dicke coronare bzw. saggitale Gehirnschnitte aus CNGA3 $+/+$ und CNGA3 $-/-$ Mäusen, in jeweils vergleichbaren Schnittebenen. Der Größenbalken entspricht 400 µm.

Um die normale Ausbildung von Gliazellen im Gehirn CNGA3-defizienter Mäuse zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung auf das saure Gliafaserprotein durchgeführt. Verwendet wurde ein direkt Cy3-markierter monoklonaler anti-GFAP Antikörper (Sigma). In Abbildung 21 sind die GFAP-positiven Gliazellen der Region CA1 des Hippocampus adulter CNGA3-defizienter und entsprechender Kontrollmäuse zu sehen. Man erkennt eine normale Morphologie und Verteilung der Gliazellen.

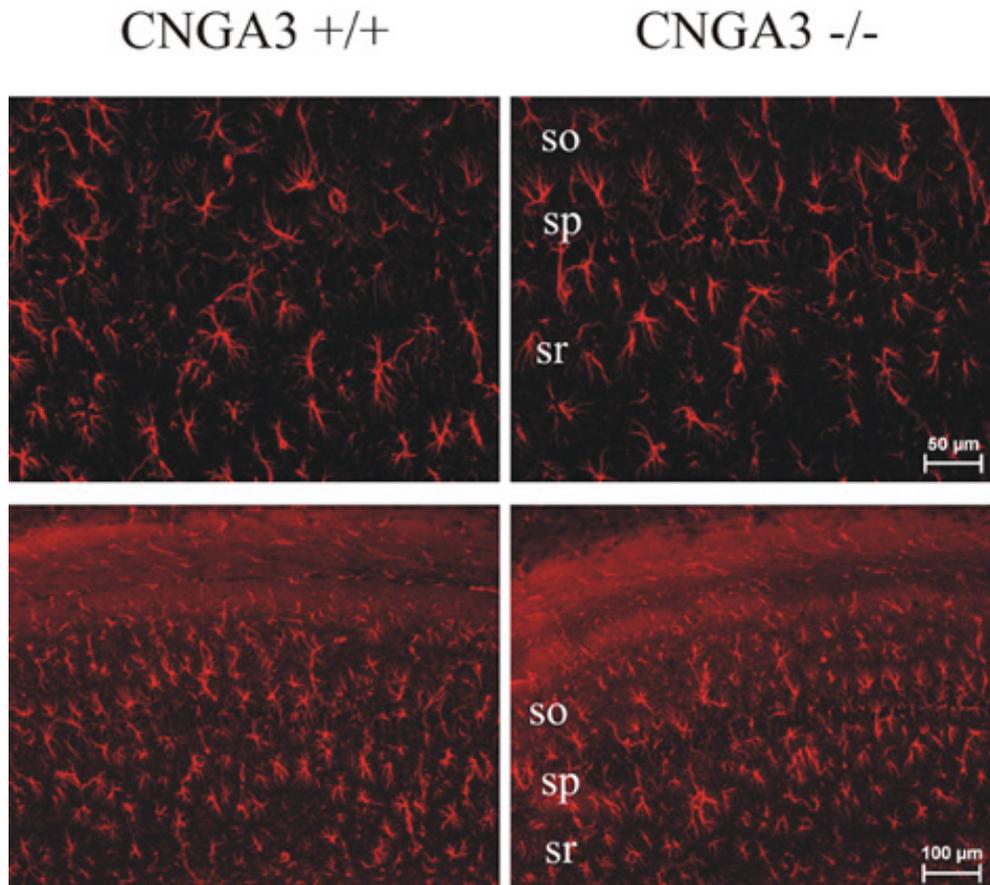


Abbildung 21

GFAP-Immunhistochemie. Nachweis der Gliazellen (rot) in der CA1 Region des Hippocampus von CNGA3-defizienten Mäusen (rechts) und Wildtypkontrollmäusen (links) mit Hilfe eines Antikörpers gegen GFAP. (so = Stratum oriens, sp = Stratum pyramidale, sr = Stratum radiatum).

2.2 Synaptische Transmission in CNGA3-defizienten Mäusen

Untersuchungen der synaptischen Transmission sollten Aufschluß über die Funktion des Hippocampus geben.

2.2.1 Basale synaptische Transmission im Hippocampus

Zunächst wurde die basale synaptische Transmission untersucht, Veränderungen hier weisen auf eine grundlegende Umstrukturierung der Synapsen bzw. deren Verschaltung hin. Untersucht wurde die Abhängigkeit der Amplitude des exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentials (fEPSP) von der Reizintensität. Die fEPSP-Anstieg aufgetragen gegen die Stimulusintensität ergibt das Reiz-Antwort-Verhältnis (*input-output relation*). Wie in Abbildung 22 gezeigt ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen CNGA3-defizienten und Kontrollmäusen.

Ein weiterer Parameter der untersucht wurde ist die *paired-pulse-facilitation* (PPF). Hierbei werden durch gepaarte Pulse fEPSPs ausgelöst und beobachtet wie sich die stufenweise Erhöhung des Interstimulusintervalls auf die Reizantwort ausprägt. Das Interstimulusintervall wurde von 25 ms schrittweise auf 225 ms erhöht. Es wurden auch hier keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen beobachtet (Abbildung 22).

Aus diesen Versuchen lässt sich sagen, dass die Deletion von CNGA3 keine globale folgen für die synaptische Transmission in der CA1-Region des Hippocampus hat.

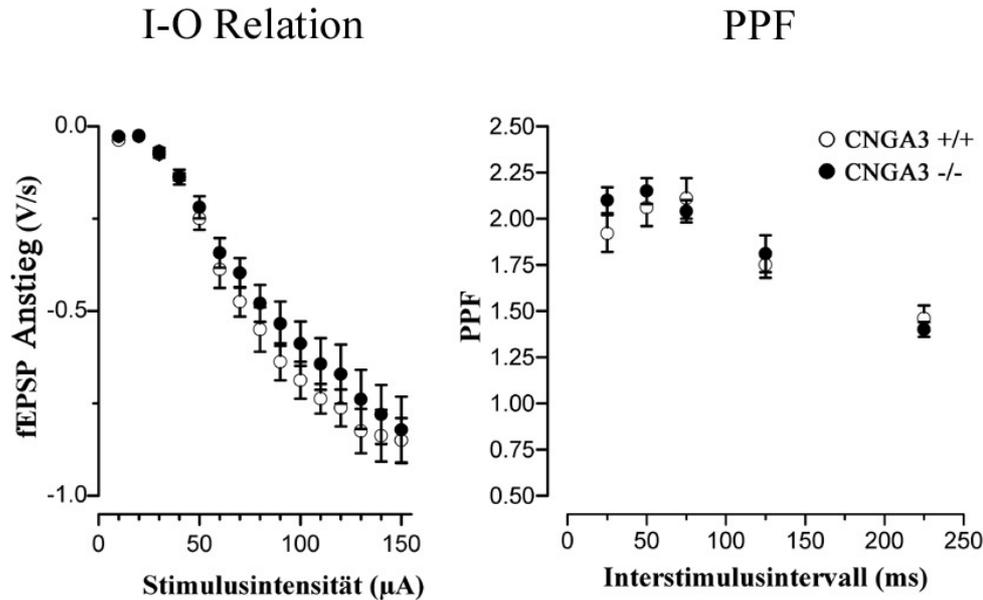


Abbildung 22

I-O Relation und PPF im Hippocampus (CA1). Das Reiz-Antwort Verhältnis (linker Graph, $n = 35$ und 32) und die paired-pulse-facilitation (rechter Graph, $n = 20$ und 23) in CNGA3 +/+ und CNGA3 -/- Mäusen.

2.2.2 Langzeitpotenzierung im Hippocampus

Als nächstes wurde die Langzeitpotenzierung (LTP) untersucht, eine grundlegende Eigenschaft von Synapsen in den meisten Regionen des Gehirns. Bei der Langzeitpotenzierung handelt es sich um die lang anhaltende Verstärkung der synaptischen Transmission, durch repetitive Aktivierung prä- und postsynaptischer Neurone (Hebb-Postulat, Hebb 1949; siehe Abschnitt III.2.3).

Um den Einfluss der Deletion von CNGA3 auf die synaptische Transmission in der CA1-Region des Hippocampus zu untersuchen, wurde an CNGA3 -/- Mäusen und CNGA3 +/+ Kontrolltieren aus gleichen Verpaarungen (*litter matched*) mit einem Tetanusreizprotokoll (IV.17) eine LTP ausgelöst. Der Versuch wurde zunächst mit Mäusen auf dem genetischen Hintergrund C57-BL6/N durchgeführt.

Nach einem initialen schwachen Tetanusreiz (50Hz) konnte bereits eine LTP beobachtet werden (Abbildung 23). Die fEPSP-Anstieg betrug 60 Minuten nach dem Reiz $123,6 \pm 6,5 \%$ (CNGA3 +/+, $n = 18$) und $141,0 \pm 7,3 \%$ (CNGA3 -/-, $n = 16$). Eine Stunde nach dem ersten Tetanusreiz wurde der stärkere Tetanusreiz (100Hz) gegeben. Interessanterweise war nun bei den CNGA3 -/- Mäusen eine signifikant erhöhte LTP ($p < 0,05$, t-test) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen zu beobachten (Abbildung 23). 60 Minuten nach dem zweiten Reiz betrug der fEPSP-Anstieg $176,6 \pm 11,7 \%$ bei den CNGA3-defizienten Mäusen ($n = 15$) und $145,8 \pm 7,6 \%$ bei den Kontrollmäusen ($n = 16$).

Um dieses Ergebnis zu untermauern und Einflüsse des genetischen Hintergrundes auszuschließen, wurde das Experiment mit sv129 Mäusen wiederholt. Mit dem 50Hz-Reizprotokoll konnte wiederum in beiden Gruppen deutlich ausgeprägte LTP induziert werden ($117,3 \pm 3,6 \%$ im Wildtyp, $n = 15$ und $122,1 \pm 4,7 \%$ bei den CNGA3 -/-, $n = 12$). Als Bestätigung der vorherigen Ergebnisse wurde auch mit diesem Mausstamm bei den CNGA3 -/- Mäusen eine signifikant höhere LTP ($p < 0,05$, t-test) nach dem starken Reiz

beobachtet (Abbildung 24). Der fEPSP-Anstieg betrug 60 Minuten nach dem zweiten Stimulus $155,2 \pm 5,5$ % bei der Deletionsmutante ($n = 12$) und $133,6 \pm 8,0$ %, beim Wildtyp ($n = 11$).

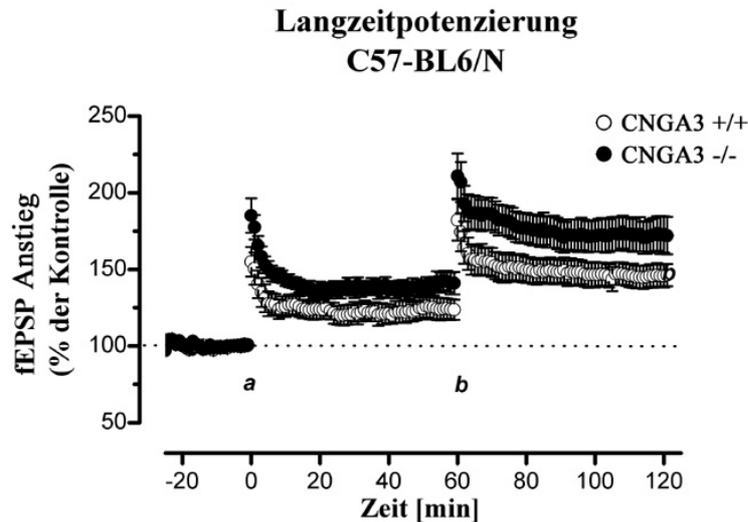


Abbildung 23

LTP in der CA1 Region des Hippocampus. Der Anstieg des fEPSP (in % der Kontrolle vor Tetanisierung) bei *CNGA3* +/+ und *CNGA3* -/- Mäusen auf dem C57-BL6/N Hintergrund. Nach Reizung der Schaffer-Kollateralen mit einem 50 Hz Tetanus (a) und einem 100Hz Tetanus. (*CNGA3* +/+, $n = 18$ und *CNGA3* -/-, $n = 16$)

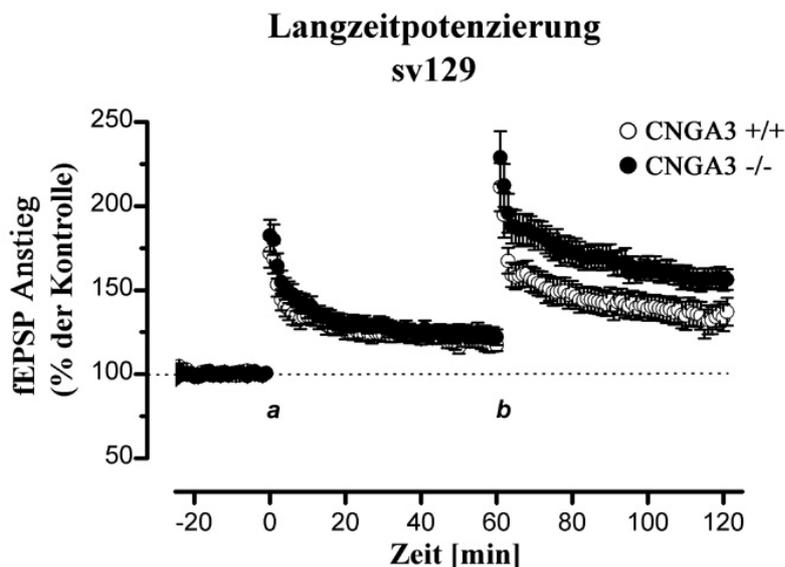


Abbildung 24

LTP in der CA1 Region des Hippocampus. Der Anstieg des fEPSP (in % der Kontrolle vor Tetanisierung) bei *CNGA3* +/+ und *CNGA3* -/- Mäusen auf dem sv129 Hintergrund. Nach Reizung der Schaffer-Kollateralen mit einem 50 Hz Tetanus (a) und einem 100Hz Tetanus. (*CNGA3* +/+, $n = 12$ und *CNGA3* -/-, $n = 11$)

Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass die Deletion von CNGA3 zu einer verstärkten Aktivierung von Synapsen in der CA1-Region des Hippocampus nach tetanischem Reiz führt. Es stellte sich nun die Frage wie der physiologische Gegenspieler, die Langzeitdepression (LTD) bei diesen Mäusen sich verhält.

2.2.3 Langzeitdepression im Hippocampus

Die Erhöhung der LTP könnte in der Enthemmung der Synapsen begründet sein. In diesem Fall sollten sich Veränderungen in der LTD zeigen, diese müsste bei den CNGA3 $-/-$ Mäusen weniger stark ausgeprägt sein. Um der Frage nachzugehen wurden Hippocampusschnitte von CNGA3 $-/-$ und Kontrollmäusen mit einem Reizprotokoll (Niederfrequenzprotokoll) stimuliert, welches bei Kontrolltieren eine LTD auslöst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 zusammengefasst.

Wie anhand der Kurven des fEPSP-Anstiegs zu erkennen ist, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Amplituden der abgeleiteten Feldpotentiale betragen 60 Minuten nach dem Reiz $79,7 \pm 5,9 \%$ beim Wildtyp ($n = 10$) und $81,6 \pm 5,4 \%$ bei den CNGA3 $-/-$ Mäusen ($n = 9$). Daraus lässt sich schließen, dass die beobachteten Veränderungen in der LTP ein selektives Phänomen darstellen, das nicht durch den Verlust der LTD bedingt ist.

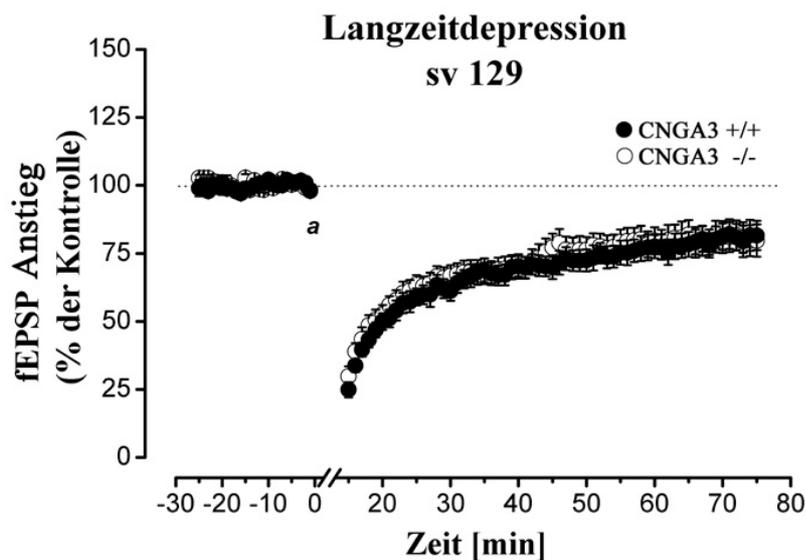


Abbildung 25

LTD in der CA1 Region des Hippocampus. Die Abnahme des Anstiegs der fEPSP nach Niederfrequenzstimulation (a: 1Hz, 900 Pulse) bei CNGA3 $+/+$ und CNGA3 $-/-$ Mäusen auf dem sv129 Hintergrund. (CNGA3 $+/+$, $n = 10$ und CNGA3 $-/-$, $n = 9$)

2.3 Räumliches Lernen in CNGA3-defizienten Mäusen

2.3.1 Water maze

Bei Mäusen die Veränderungen in der synaptischen Plastizität im Hippocampus zeigen, können oft Veränderungen der Leistungsfähigkeit bei räumlichen Lernversuchen beobachtet werden (Tsien 2000). Wir wollten nun untersuchen ob die selektive Erhöhung der LTP bei den CNGA3-defizienten Mäusen Auswirkungen auf das räumliche Lernverhalten dieser Mäuse hat. Hierzu wurde zunächst ein Lernversuch mit dem differenzierenden *water maze*

durchgeführt (IV.18.1). Es wurde gezeigt, dass Mäuse mit Läsionen im Hippocampus bei diesem Test eine verminderte Leistungsfähigkeit besitzen (Arns et al. 1999).

Für den Test wurden *litter matched* CNGA3 $+/+$ und CNGA3 $-/-$ Mäuse auf dem C57-BL6/N Hintergrund verwendet. Sv129 Mäuse schneiden bei *water maze*-Versuchen prinzipiell schlechter ab als C57-BL6-Mäuse (Crawley et al. 1997), somit sollte eine Einflussnahme des genetischen Hintergrunds ausgeschlossen werden.

Sowohl die Wildtyp-Kontrollen als auch die CNGA3-defizienten Mäuse zeigten während der Erlernungsphase (Tag 1 bis 5) eine signifikante Erniedrigung der Entscheidungslatenz ($p < 0,0001$, two-way ANOVA; Abbildung 26) um in der Wiedererlernungsphase eine Assymtote zu erreichen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Genotypen ($p < 0,01$, two-way ANOVA), nicht jedoch über den gesamten Verlauf (Genotyp x Zeit: $p = 0,256$, two-way ANOVA).

Beide Gruppen zeigten über die Erlernungsphase hinweg eine Präferenz für die stabile ("korrekte") Plattform ($p < 0,0001$; two-way ANOVA, Abbildung 27). Nach Austausch der Position der stabilen Plattform an Tag 6 konnte bei allen Mäusen eine Verschlechterung der Leistung im Vergleich zu Tag 5 beobachtet werden ($p < 0,0001$, two-way ANOVA). Über die Wiedererlernungsphase hinweg (Tag 6 bis 9) zeigten die Tiere erneut eine Präferenz für die stabile Plattform ($p < 0,0001$, two-way ANOVA). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Genotypen, sowohl während der Erlernungsphase (Genotyp: $p = 0,571$; Genotyp x Zeit: $p = 0,970$, two-way ANOVA) als auch der Wiedererlernungsphase (Genotyp: $p = 0,703$; Genotyp x Zeit: $p = 0,882$, two-way ANOVA).

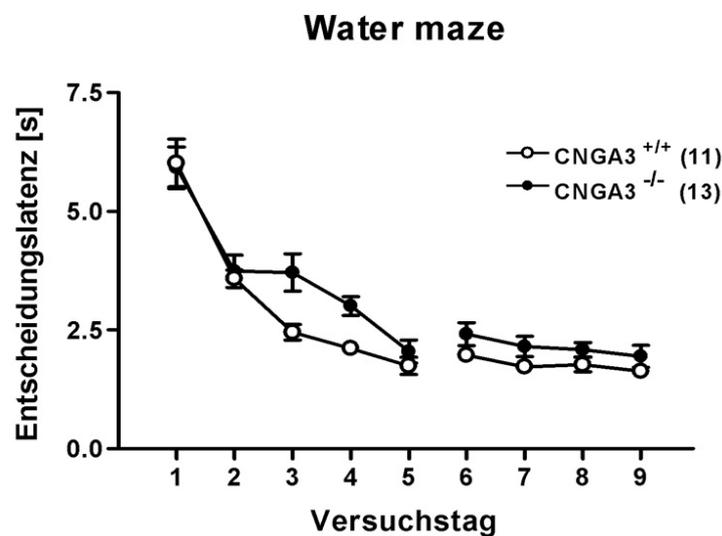


Abbildung 26

Entwicklung der Entscheidungslatenz während des Ablaufs des water maze Versuchs. Die Entscheidungslatenz [s] während der Erlernungsphase (Tag 1-5) und während der Wiedererlernungsphase (Tag 6-9). CNGA3 $-/-$ Mäuse benötigten an Tag 3 und 4 signifikant länger als die CNGA3 $+/+$ Mäuse bis zum Erreichen der Plattform ($p < 0,01$ two-way ANOVA), jedoch nicht über den gesamten Zeitverlauf (Genotyp x Zeit: $p = 0,256$ two-way ANOVA).

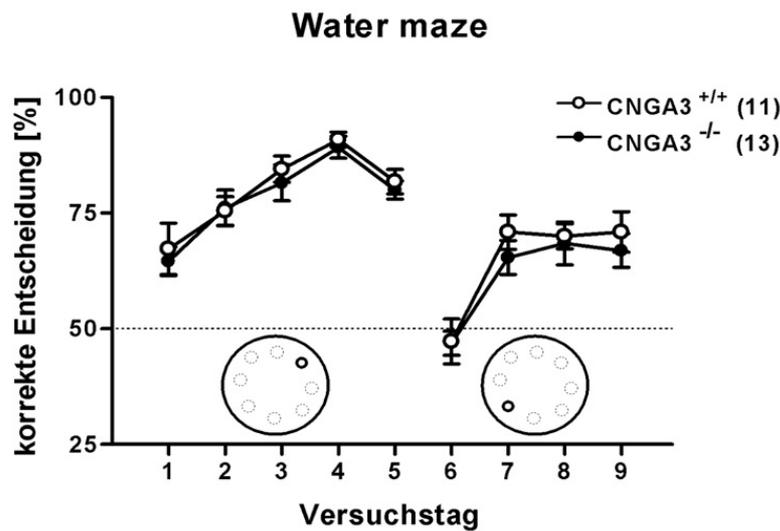


Abbildung 27

Räumliche Präferenz im water maze. Prozentueller Anteil der CNGA3^{+/+} und CNGA3^{-/-} Mäuse, die die korrekte Plattform richtig lokalisieren konnten. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Genotyp x Zeit: $p = 0,970$, two-way ANOVA). (Tag 1-5 = Erlernungsphase, Tag 6 = reversal, Tag 6-9 = Wiedererlernungsphase)

2.3.2 Kontextuelle Angstkonditionierung

Als weiterer Test für das räumliche Lernverhalten wurde eine kontextuelle Angstkonditionierung durchgeführt. Allgemein wird angenommen, dass für die räumliche Assoziierung eines furchtauslösenden Ereignisses zusätzlich zu der Amygdala eine normale Funktion des Hippocampus erforderlich ist. Die genaue Rolle des Hippocampus bei der Angstkonditionierung wird kritisch in der Übersichtsarbeit von Saunders et al. (2003) diskutiert.

Der bewertete Untersuchungsparameter war das Ausmaß der beobachteten Angstreaktion, in Form der zeitlichen Dauer einer körperlichen Starre (*freezing*). Die kontextuelle Assoziierung des furchtauslösenden Ereignisses (Elektroschock) wurde einen Tag nach der Angstkonditionierung in der selben Konditionierungsumgebung beobachtet. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse an Mäusen auf dem C57-BL6/N-Hintergrund gezeigt. Die Tiere zeigten ein signifikant stärkeres freezing-Verhalten in der Konditionierungskammer, verglichen mit der neutralen Kammer ($p < 0,0001$, two-way ANOVA/Newmann-Keuls-Test). Zwischen CNGA3-defizienten und Wildtypmäusen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied (Genotyp: $p = 0,859$; Genotyp x Kontext: $p = 0,790$, two-way ANOVA/Newmann-Keuls-Test). Diese Ergebnisse bestätigen somit die Daten aus dem differenzierenden *water maze*.

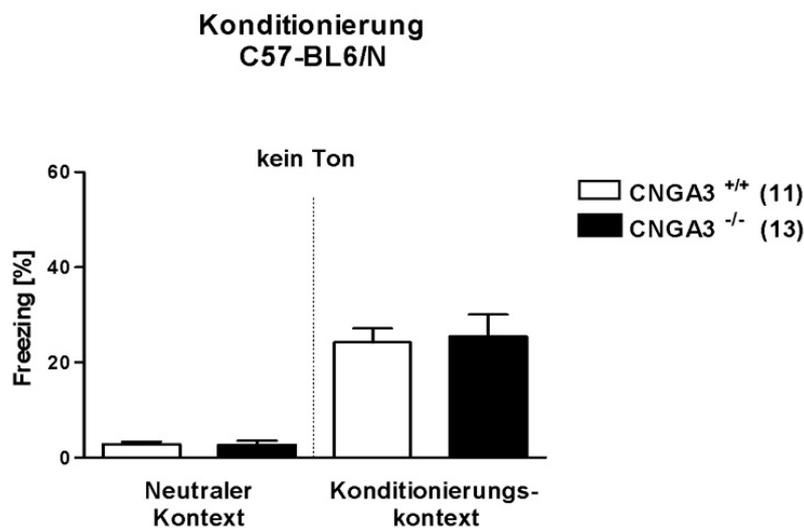


Abbildung 28

Kontextuelle Angstkonditionierung bei C57-BL6/N-Mäusen. Die Tiere zeigten unabhängig vom Genotyp im Konditionierungskontext ein verstärktes freezing (neutraler Kontext: CNGA3 ^{+/+} = $2,891 \pm 0,536$, CNGA3 ^{-/-} = $2,715 \pm 0,893$; Konditionierungskontext: CNGA3 ^{+/+} = $24,21 \pm 2,98$, CNGA3 ^{-/-} = $25,48 \pm 4,61$) [% Freezing]. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei den CNGA3 ^{-/-} Mäusen.

Die kontextuelle Angstkonditionierung wurde auch auf dem sv129 Hintergrund durchgeführt. Hierbei zeigte sich deutlich das verminderte räumliche Lernvermögen dieses Mausstamms. Unabhängig vom Genotyp konnten die sv129-Mäuse das angstausslösende Ereignis nicht mit dem Kontext assoziieren (Abbildung 29).

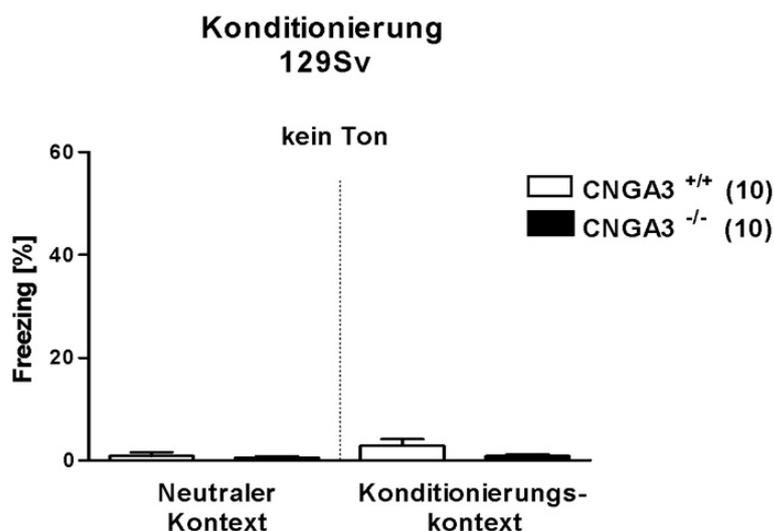


Abbildung 29

Kontextuelle Angstkonditionierung bei sv129-Mäusen. Beide Gruppen zeigten keine kontextuelle Assoziierung. (neutraler Kontext: CNGA3 ^{+/+} = $0,930 \pm 0,639$, CNGA3 ^{-/-} = $0,650 \pm 0,187$; Konditionierungskontext: CNGA3 ^{+/+} = $2,860 \pm 1,337$, CNGA3 ^{-/-} = $0,860 \pm 0,334$ [% Freezing]).

2.4 Angstverhalten

2.4.1 Akustische Angstkonditionierung

Die mit einem Ton verknüpfte Konditionierung einer Furchtreaktion ist ein klassischer Funktionstest der Amygdala, der vorwiegend bei Nagern verbreitet Anwendung findet. Die Fähigkeit der Tiere den Ton mit dem Elektroschock zu assoziieren hängt sehr stark von der Funktion des basolateralen amygdalären Komplexes (BLAC) ab.

Die Tiere wurden an Tag 1 und Tag 6 nach der Konditionierung in eine neutrale Kammer gesetzt, nach einer Ruhephase für 3 Minuten der Konditionierungston verabreicht und die Reaktion beobachtet. Der Versuch wurde zunächst mit *litter matched* Tieren auf dem C57-BL6/N Hintergrund durchgeführt.

Sowohl die Wildtypen, als auch die CNGA3-defizienten Mäuse zeigten eine verstärkte freezing-Reaktion nach Gabe des Tones im Vergleich zu der Periode ohne Ton ($p < 0,0001$, two-way ANOVA/Newmann-Keuls-Test). Interessanterweise zeigten die CNGA3 $-/-$ Mäuse eine signifikant weniger starke Reaktion auf den Konditionierungston als die Kontrollmäuse (Genotyp: $p = 0,002$, Genotyp x Ton: $p = 0,002$, two-way ANOVA; Abbildung 30). In Abbildung 31 ist der Verlauf der Angstreaktion über die Zeit gezeigt. Die Unterschiede sind von Beginn an vorhanden und bleiben über die gesamte Periode der Tonpräsentation bestehen. Das beobachtete Phänomen war ähnlich ausgeprägt auch noch an Tag 6 zu beobachten (Gesamter Verlauf, Genotyp: $p = 0,006$, two-way ANOVA).

Das Experiment wurde zusätzlich mit Mäusen auf dem genetischen Hintergrund sv129 durchgeführt. Auch bei diesem Test schnitten die sv129 Mäuse schlechter ab als die C57-BL6/N. Die vorherigen Ergebnisse konnten mit diesem Mausstamm nicht reproduziert werden. Dabei war schon bei den Wildtypmäusen nur eine schwache Reaktion auf den Konditionierungston zu beobachten (22.3 ± 4.6 % freezing; Abbildung 32). Die allgemein schlechtere Leistung dieses Mausstamms in Verhaltenstests wird somit durch die Ergebnisse der kontextuellen (Abbildung 29) und akustischen Angstkonditionierung bestätigt.

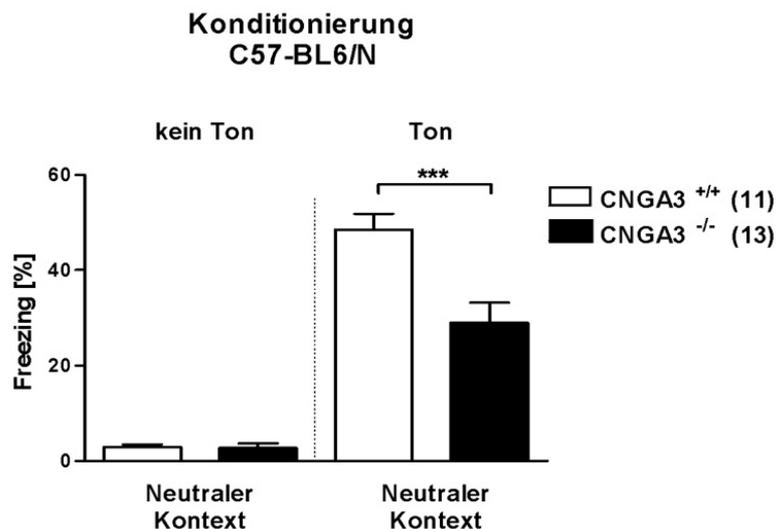


Abbildung 30

Akustische Angstkonditionierung C57-BL6/N. CNGA3 $-/-$ Mäuse assoziierten den Konditionierungston signifikant weniger stark mit dem Fußschock (ohne Ton: CNGA3 $+/+$ = $0,930 \pm 0,639$, CNGA3 $-/-$ = $0,650 \pm 0,187$; Ton: CNGA3 $+/+$ = $2,860 \pm 1,337$, CNGA3 $-/-$ = $0,860 \pm 0,334$, [% Freezing]; Genotyp x Zeit: $p = 0,002$, two-way ANOVA).

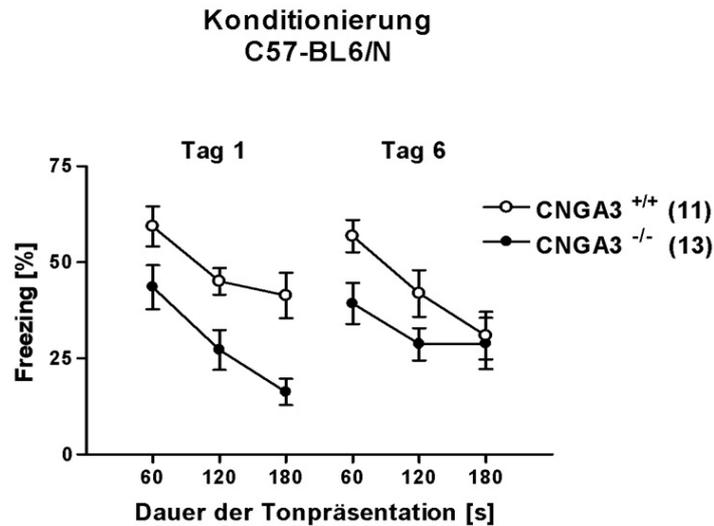


Abbildung 31

Akustische Angstkonditionierung an Tag 1 und Tag 6. Das schwächer ausgeprägte freezing-Verhalten auf den Konditionierungston bei CNGA3 ^{-/-} Mäusen, war an Tag 6 ähnlich stark ausgeprägt (Genotyp: $p=0,006$, two-way ANOVA).

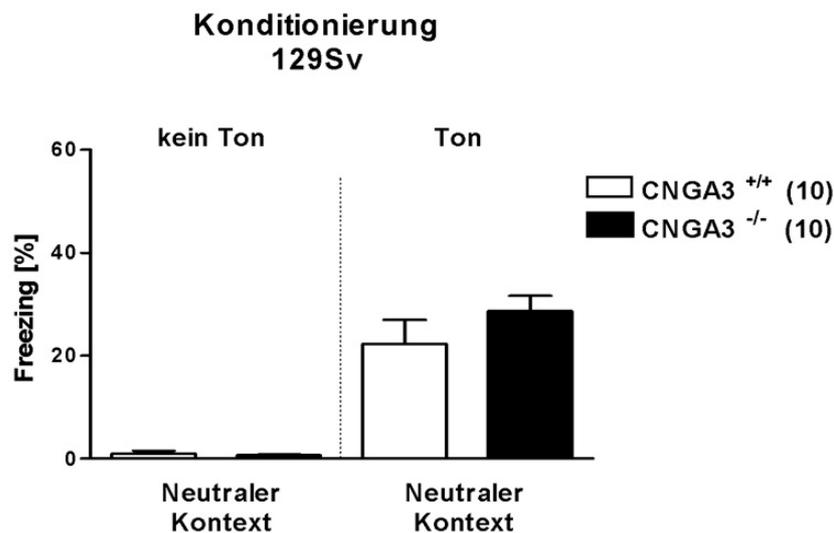


Abbildung 32

Akustische Angstkonditionierung sv129. Die Ergebnisse auf dem C57-BL6/N-Stamm konnten mit sv129 Mäusen nicht bestätigt werden. Die allgemein schlechtere Lernleistung dieser Mäuse spiegelt sich in der geringen Reaktion der CNGA3 ^{+/+} Mäuse auf den Konditionierungston (ohne Ton: CNGA3 ^{+/+} = $0,930 \pm 0,639$, CNGA3 ^{-/-} = $0,650 \pm 0,187$; mit Ton: CNGA3 ^{+/+} = $22,33 \pm 4,65$, CNGA3 ^{-/-} = $28,68 \pm 2,97$ [% Freezing]).

2.4.2 Sensitivierungstest

Mit einer weiteren Gruppe von *litter matched* C57-BL6/N-Mäusen wurde untersucht ob die CNGA3-defizienten Mäuse den Konditionierungston genauso wahrnehmen wie die Wildtypmäuse. Somit sollten sinnesphysiologisch bedingte Veränderungen ausgeschlossen werden.

Zunächst wurde in der Konditionierungskammer der Elektroschock alleine gegeben. Es handelt sich hierbei um eine kontextuelle Angstkonditionierung bei der die räumlichen Informationen (z.B. Umgebung oder Form der Kammer) im Vordergrund stehen, da kein Konditionierungston gegeben wurde. An Tag 1 wurde zum einen die Assoziierung des Kontextes untersucht und anschließend in einer neutralen Umgebung die Reaktion auf das Tonsignal alleine beobachtet.

Als Bestätigung der kontextuellen Angstkonditionierung mit dem Kontext im Hintergrund (V.2.3.2) ergaben sich auch in diesem Fall keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Genotypen. Sowohl die CNGA3-defizienten Mäuse, als auch die Wildtypmäuse zeigten eine Assoziierung auf den Kontext (Kontext: $p < 0,0001$, two-way ANOVA), aber ohne Unterschiede zwischen den Gruppen (Genotyp: $p = 0,175$, Genotyp x Kontext: $p = 0,580$, two-way ANOVA; Abbildung 33). Tiere beider Gruppen zeigten eine Reaktion auf den Ton (Ton: $p < 0,0001$, two-way ANOVA), dabei unterschieden sich die CNGA3 $-/-$ Mäuse jedoch nicht von den CNGA3 $+/+$ Kontrollen (Genotyp: $p = 0,521$, Genotyp x Ton: $p = 0,117$, two-way ANOVA; Abbildung 33). Somit muss die signifikant weniger starke Reaktion der CNGA3-defizienten Mäuse auf den Konditionierungston (V.2.4.1) als ein spezifisches Phänomen betrachtet werden.

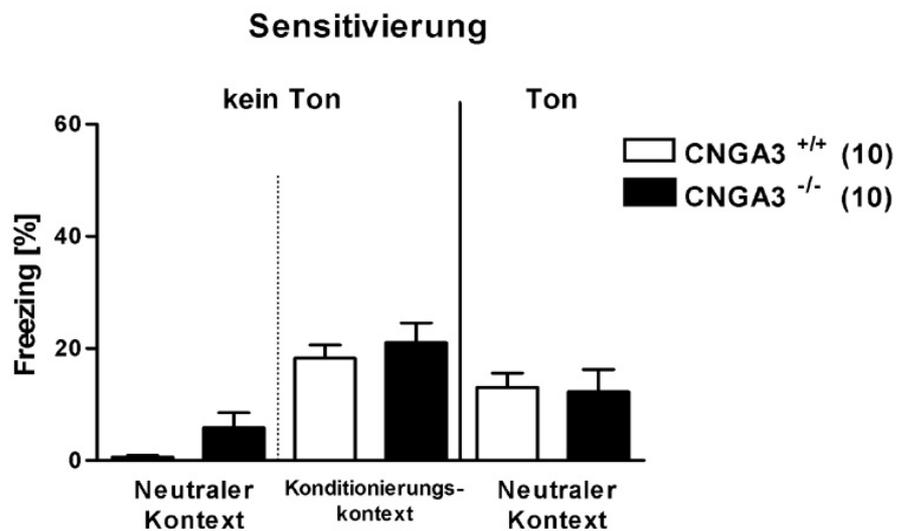


Abbildung 33

Sensitivierung C57-BL6/N. Sowohl in der kontextuellen Konditionierung mit dem Kontext im Vordergrund, als auch bei der Reaktion auf den Ton bei nichtkonditionierten Mäuse ergab sich kein unterschiedliches Verhalten der CNGA3 $-/-$ Tiere.

2.4.3 Forced Swimming Test

Bei dem diskriminierenden *water maze* Test wurde die Beobachtung gemacht, dass CNGA3-defiziente Mäuse eine längere Entscheidungslatenz in der Erlernungsphase zeigten (Abbildung 26). Diese Beobachtung ging mit einem gleichzeitig beobachteten veränderten Verhalten der Tiere einher. CNGA3 $-/-$ Mäuse zeigten vermehrt eine Bewegungslosigkeit im Wasser. Die hier verwendete modifizierte Form des *water maze* mit zwei Plattformen besitzt einen kleineren Radius als das klassische *Morris water maze*. Zusätzlich ist durch die zwei Plattformen die Dauer eines Testdurchgangs geringer. Somit bedeutet dieser Test eine weniger starke physische Beanspruchung für die Tiere als das klassische *Morris water maze*. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das bei den CNGA3 $-/-$ Mäusen beobachtete Verhalten durch eine veränderte Stresswahrnehmung bedingt war. Um dies genauer zu untersuchen wurde ein *forced swimming test* (FST) durchgeführt. Der FST stellt ein Modell dar mit dem das Stressverhalten von Nagern untersucht werden kann (Cryan et al. 2002).

Durchgeführt wurde der Test mit den C57-BL6/N-Mäusen aus dem Sensitivierungstest, 2 Wochen nach der Sensitivierung und den sv129-Mäusen aus der Angstkonditionierung 4 Wochen danach.

Alle Gruppen zeigten einen deutlichen Anpassungseffekt von Tag 1 auf Tag 2 (Abbildung 34). Jedoch ließen sich keine Unterschiede zwischen CNGA3-defizienten und Wildtypmäusen beobachten. Somit konnte mit dem FST die Beobachtungen aus dem *water-maze* nicht weiter aufgeklärt werden.

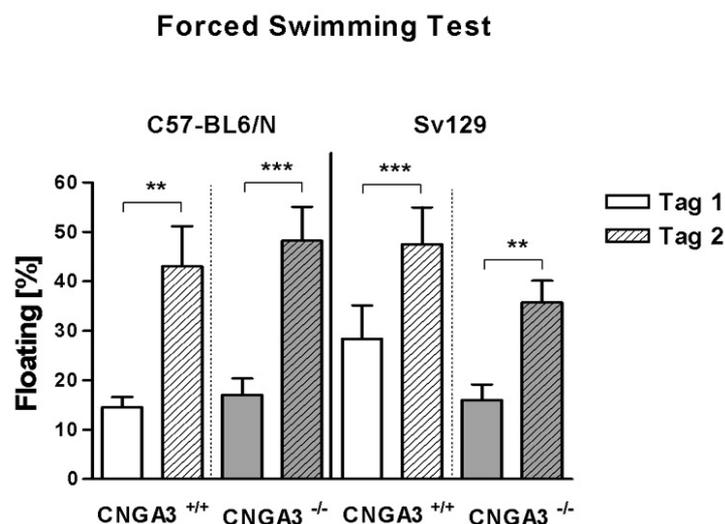


Abbildung 34

Forced swimming Test Zusammenfassung. Anteil der Floating-Zeit an der Gesamtestzeit [%], bei CNGA3 $+/+$ und CNGA3 $-/-$ Mäusen und Veränderung dieser von Tag 1 zu Tag 2. Bei allen getesteten Gruppen wurde eine Verringerung der Stresswahrnehmung (in Form einer Erhöhung der Floating-Zeit). Zwischen den CNGA3 $+/+$ und $-/-$ Mäusen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied. (Mittelwert \pm SEM, $n = 10$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, paired t -test)

3 Netzhaut Degeneration bei CNGA3-defizienten Mäusen

3.1 Expression von CNGA3 in der Retina

3.1.1 Immunhistochemie

Um die räumliche Lokalisierung des CNGA3-Proteins zu untersuchen wurde eine Immunhistochemie mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper gegen den C-Terminus des Maus-CNGA3 durchgeführt. Um eine genaue Identifizierung der markierten Zellen zu erreichen wurde eine Doppelmarkierung durchgeführt, wobei der zapfenspezifische Marker Erdnusslektin (PNA) verwendet wurde. In Abbildung 35 sind konfokalmikroskopische Aufnahmen einer immunhistochemischen Anfärbung von 10 µm dicken Netzhautschnitten mit anti-CNGA3 (grün) und PNA (rot) gezeigt, der Kaninchen anti-CNGA3-Antikörper wurde mit einem FITC-Esel anti-Kaninchen Antikörper (Dianova) detektiert. Es wurde biotinyliertes Lektin (Sigma) eingesetzt das mit einem DY-630 markiertem Avidin (Dyomics) detektiert wurde. Die Laser-Konfokalmikroskopie (Zeiss) wurde unter Anregung des Argon bzw. He/Ne₂-Lasers durchgeführt. Im Wildtyp ist CNGA3 in den Außensegmenten aller Zapfen zu sehen, die durch Kolokalisierung mit dem Lektin eindeutig als solche identifiziert werden. In der Retina von CNGA3-defizienten Mäusen ist kein CNGA3-Protein zu finden.

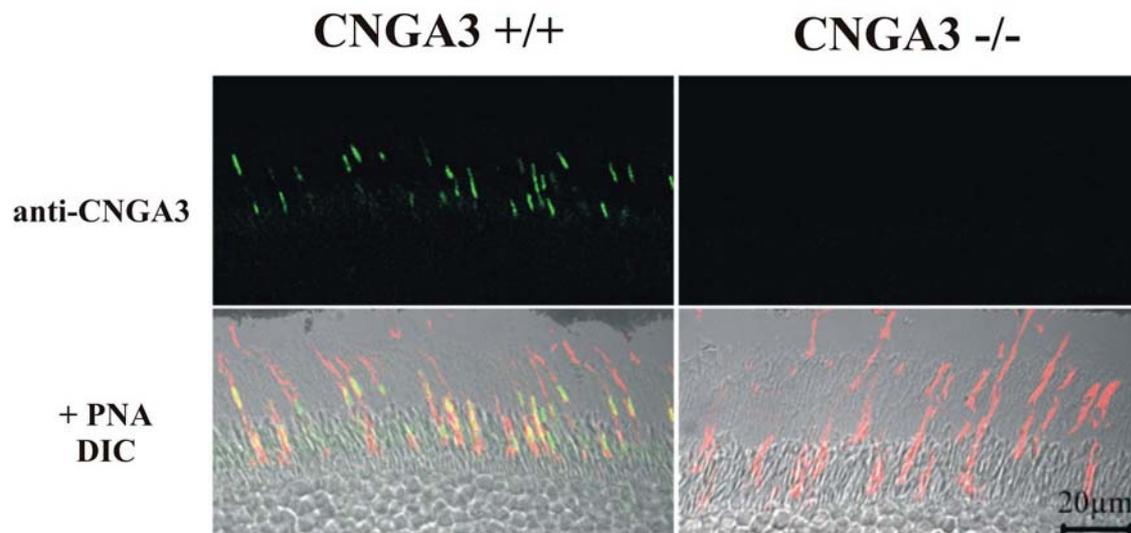


Abbildung 35

Konfokalmikroskopische Detektion von CNGA3-Protein auf Gewebeschnitten. Obere Reihe: CNGA3-Immunhistochemie (grün) in der Mausretina. Untere Reihe: Überlagerung mit PNA (rot) und DIC-Aufnahme (Differential-Interferenzkontrast). Das CNGA3-Protein ist in den Zapfensegmenten von CNGA3 +/+ (gelbe Überlagerung), nicht jedoch von CNGA3 -/- Mäusen zu sehen.

Um die räumliche Expression von CNGA3 in der Mausretina zu untersuchen wurden *whole-mount*-Präparate (IV.2.3.3) von Wildtyp und CNGA3-defizienten Mäusen mit dem anti-CNGA3 Antikörper inkubiert. In Abbildung 36 ist zu erkennen, dass das CNGA3-Protein in gleichem Ausmaß in allen Zapfen von CNGA3 +/+ Mäusen vorhanden ist, jedoch in CNGA3 -/- Mäusen vollständig fehlt. Zur Identifizierung der angefärbten Zellen, wurde auch hier zusätzlich mit Erdnusslektin inkubiert. Die Visualisierung erfolgte am

Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit dem oben beschriebenen Sekundärantikörper, das biotinylierte Lektin (Sigma) wurde diesmal mit DY-610 markiertem Avidin (Dyomics) nachgewiesen.

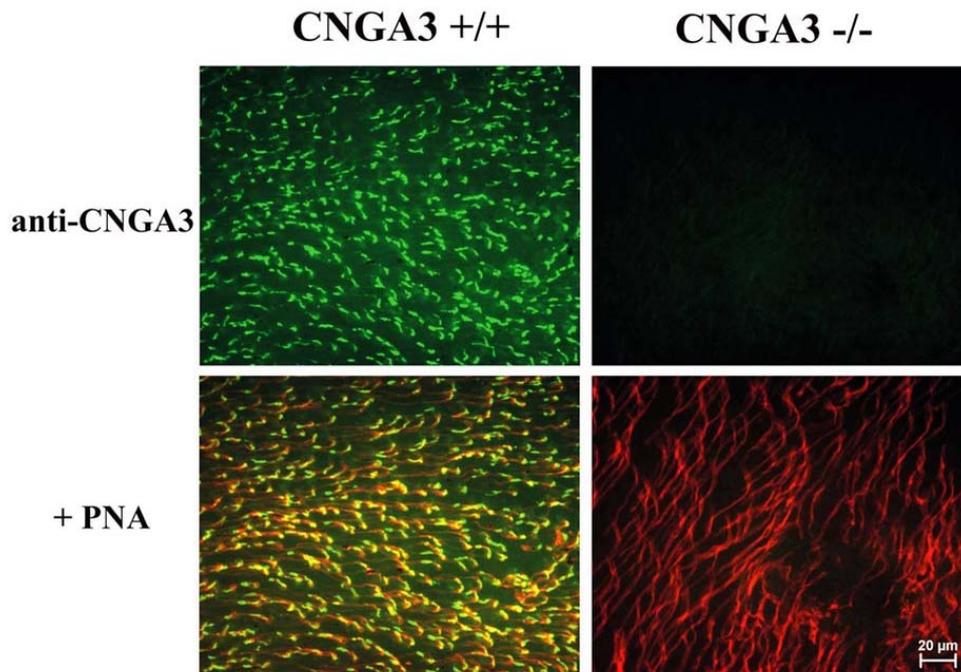


Abbildung 36

CNGA3-Immunhistochemie auf whole-mount Retinapräparaten. Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von whole-mount-Präparaten aus CNGA3 +/+ (links) und -/- Mäusen (rechts). Die Räumliche Verteilung des CNGA3-Proteins ist gezeigt. Im unteren Teil ist die Überlagerung mit dem Zapfenmarker PNA zu sehen.

3.1.2 Western-Blot

Um eine Einschätzung der Größe des CNGA3-Proteins und über den Status posttranslationaler Modifikation in-vivo zu bekommen, wurde mit Lysaten aus Mausnetzhaute eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, erkennt man eine einzige Proteinbande bei ca. 70 kD, was etwa der theoretischen Proteinmasse von 72,7 kD entspricht. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass CNGA3 nicht glykosyliert ist.

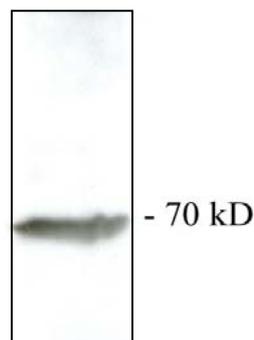


Abbildung 37

CNGA3 Western-Blot. Western-Blot aus Retina-Lysat, detektiert mit rabbit anti-CNGA3 und HRP-konjugiertem donkey anti-rabbit Sekundärantikörper.

3.2 Verlust von Seh-Zapfen

3.2.1 Erdnussagglutinin-Markierung

Das Erdnusslektin (PNA) wurde als spezifischer Marker der Seh-Zapfen verwendet um damit den zeitlichen Verlauf des Zapfen-Verlustes bei der CNGA3-defizienten Maus zu dokumentieren. Verwendet wurde ein FITC-markiertes PNA (Sigma). Die Visualisierung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss), die Quantifizierung erfolgte an digitalen Aufnahmen. In Abbildung 38 A ist zu erkennen dass, obwohl die Photorezeptorendichte (grünes Signal) selbst bei alten Wildtyp-Tieren nicht erkennbar abnimmt, in CNGA3 $-/-$ Mäusen vor allem in der unteren Retina ein starker Verlust von Zapfen zu sehen ist. In Abbildung 38 B ist die Orientierung der Präparate dargestellt (D = *dorsal*, N = *nasal*, T = *temporal* und V = *ventral*). Das räumliche Ausmaß der Abnahme des PNA-Signals nimmt mit dem Alter zu. Interessant ist, dass selbst bei alten CNGA3-defizienten Mäusen eine beträchtliche Anzahl an PNA-positiven Strukturen zu erkennen sind. Dies wird in 400-facher Vergrößerung in Abbildung 38 C deutlich, hier ist die Netzhaut von 12 Monate alten Mäusen zu sehen (normale Lebensdauer der Maus: ca. 2 ½ Jahre).

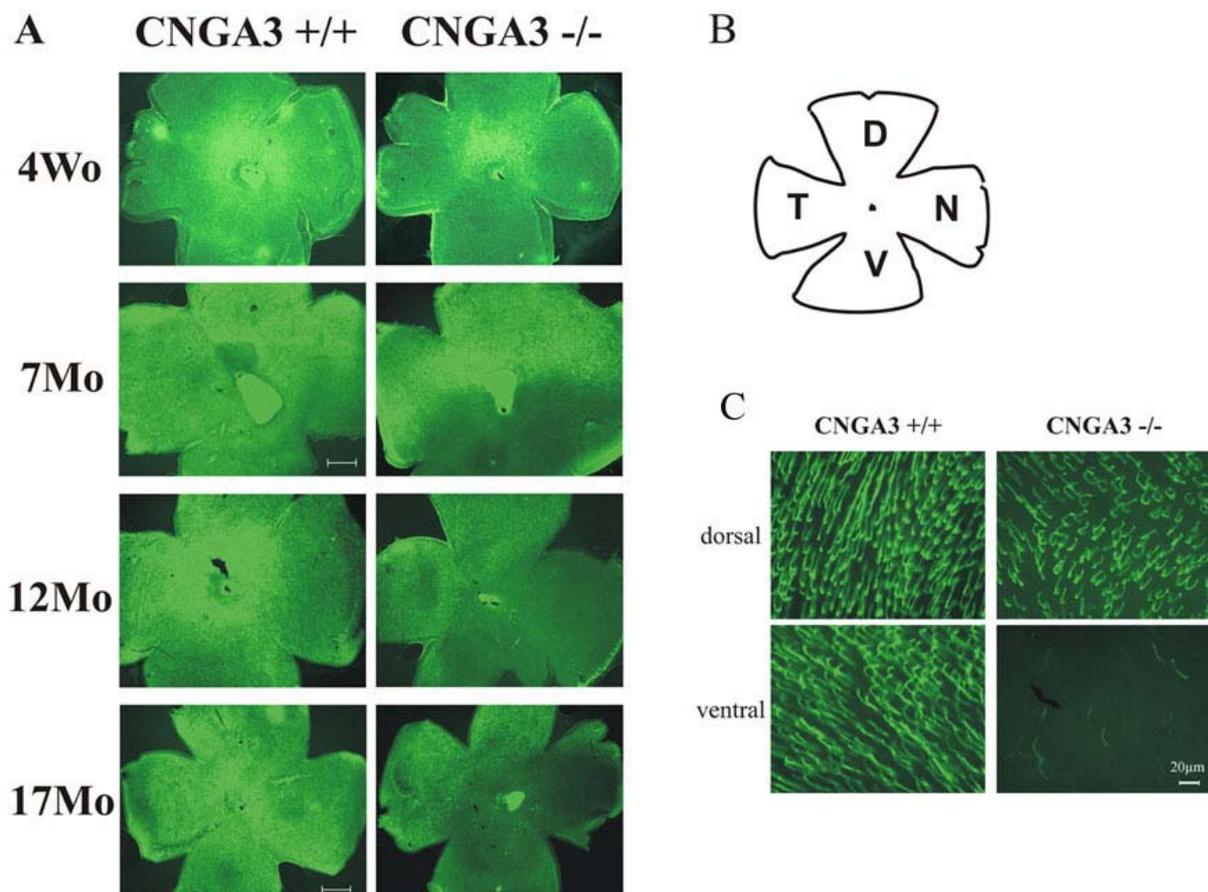


Abbildung 38

Lektinmarkierung von Seh-Zapfen in whole-mount-Präparaten. A) Zeitlicher und räumlicher Verlauf des Verlustes PNA-positiver Zapfen. Größenbalken entspricht 252 μm . B) Orientierung der Präparate in A (D = dorsal, N = nasal, T = temporal und V = ventral). C) Vergrößerter Ausschnitt aus der zentralen dorsalen (oben) und zentralen ventralen (untern) Region 12 Monate alter Mäuse.

Ein Persistenz von Seh-Zapfen in der oberen Retina wurde auch bei einem weiteren retinalen Degenerationsmodell beschrieben. Die sogenannte rd-Maus, eine natürliche Mausmutante bei der Mutationen in der β -Untereinheit der retinalen Phosphodiesterase eine Retinitis Pigmentosa auslösen (Bowes et al. 1990, McLaughlin et al. 1995), zeigt, zusätzlich zum raschen Verlust von Seh-Stäbchen, einen sekundären Verlust von Seh-Zapfen. Bei älteren rd-Mäusen persistieren ebenfalls einzelne Seh-Zapfen in der dorsalen und temporalen Retina (Jimenez et al. 1996, Oglvie et al. 1996).

Um eine genaue Einschätzung des Zapfenverlustes zu bekommen wurde eine quantitative Auswertung der lektin histochemischen Zapfenanfärbungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Graphen der Abbildung 39 zusammengefasst. Die Seh-Zapfendichte in den vier Quadranten der Netzhaut CNGA3-defizienter Mäuse ist in Prozent der Seh-Zapfen bei Wildtypkontrollmäusen dargestellt. Man erkennt, dass in der dorsalen und temporalen Retina die Zapfendichte nicht unter 50 % der Wildtypen fällt. Dagegen nimmt diese in den nasalen und ventralen Quadranten rasch ab, um ein niedriges Plateau zu erreichen. Die Originaldaten mit Statistik sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

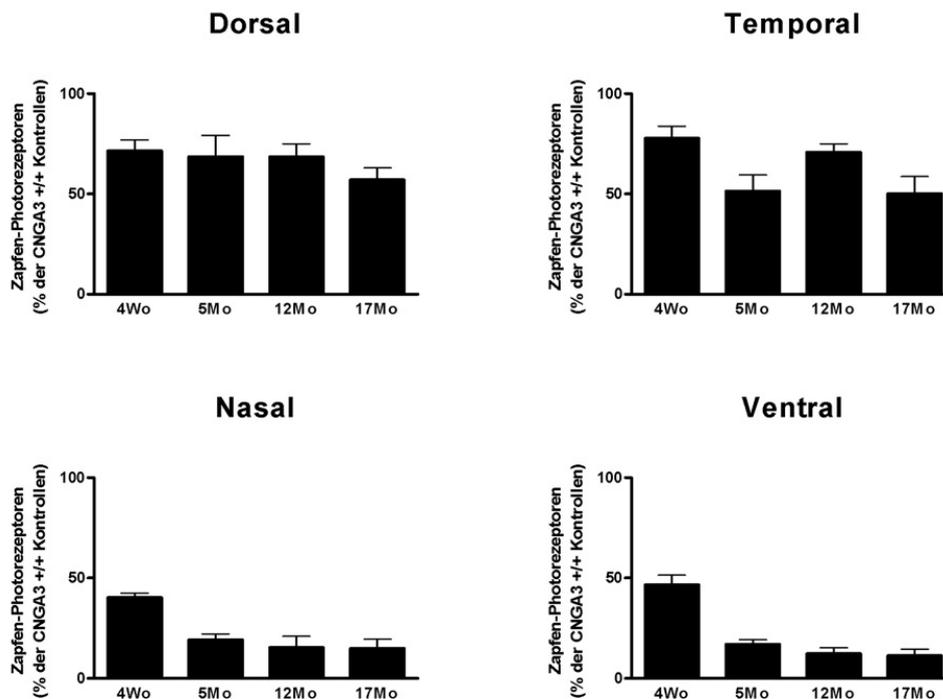


Abbildung 39

Quantifizierung der Seh-Zapfen-Abnahme bei CNGA3^{-/-} Mäusen. Aufgetragen ist der Prozentsatz der Seh-Zapfen, verglichen mit CNGA3^{+/+} Mäusen (Mittelwert \pm SEM, n = 4-8).

Region	Genotyp CNGA3	4 Wochen	5 Monate	12 Monate	17 Monate
Dorsal	+/+	272,0 ± 25,2, n=6	338,6 ± 37,1, n=5	286,4 ± 23,4, n=5	330,4 ± 32,8, n=5
	-/-	194,7 ± 13,2, n=6	211,3 ± 30,8, n=8	196,3 ± 16,1, n=4	188,4 ± 17,7, n=5
	t-test	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,01
Temporal	+/+	273,5 ± 23,0, n=6	308,7 ± 20,3, n=6	281,0 ± 9,0, n=5	330,0 ± 30,5, n=5
	-/-	212,5 ± 15,3, n=6	158,9 ± 23,2, n=8	199,3 ± 10,1, n=4	165,4 ± 25,4, n=5
	t-test	p>0,05	p=0,001	p<0,005	p<0,01
Nasal	+/+	309,8 ± 19,2, n=6	335,7 ± 55,6, n=6	257,6 ± 12,8, n=5	307,8 ± 28,2, n=5
	-/-	124,7 ± 6,2, n=6	64,7 ± 9,4, n=8	39,8 ± 12,5, n=4	46,0 ± 12,8, n=5
	t-test	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Ventral	+/+	275,0 ± 15,8, n=6	328,0 ± 40,9, n=6	290,0 ± 14,5, n=5	342,4 ± 25,6, n=5
	-/-	127,8 ± 10,0, n=6	55,9 ± 7,0, n=8	35,6 ± 7,8, n=5	39,0 ± 9,8, n=5
	t-test	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Tabelle 6

Quantifizierung der Seh-Zapfen. Gesamtanzahl der PNA-positiven Zapfen jeweils in einem 0,875 mm²-großem Feld der zentralen dorsalen, temporalen, nasalen oder ventralen Region der Netzhaut (Mittelwert ± SEM).

3.3 Verlust von Markern der Phototransduktionskaskade

Die Abnahme der Seh-Zapfen wurde mit Hilfe des Erdnusslektins räumlich und zeitlich dokumentiert. Das PNA erkennt jedoch ausschließlich Kohlehydratreste an der Außenseite der Zapfen-Zellmembran. Nun sollte die Expression funktioneller Proteine Seh-Zapfen in den CNGA3-defizienten Tieren untersucht werden.

3.3.1 Opsine

Bei der Maus sind zwei zapfenspezifische Opsine beschrieben die aufgrund ihrer Wellenlängen-sensitivität als kurzwellenlängen- (*short-wavelength sensitive*, SWS) bzw. mittel-wellenlängen-sensitives (*middle-wavelength sensitive*, MWS) Opsin bezeichnet werden. Jedes der beiden Opsine besitzt ein distinktes räumliches Expressionsmuster auf der Mausnetzhaut. Das MWS-Opsin ist verstärkt in der oberen Retina, das SWS-Opsin in der unteren Retina zu finden. Die Opsine machen einen hohen Anteil an dem Gesamtprotein der Photorezeptoren aus und tragen zur Aufrechterhaltung der Struktur der Photorezeptoren bei.

3.3.1.1 MWS-Opsin

Um zu untersuchen in welchem Maß die Expression der Zapfen Opsine durch das Fehlen von CNGA3 beeinträchtigt ist, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Der verwendete monoklonale Antikörper COS 1 wurde vor einigen Jahren detailliert beschrieben und ist spezifisch für das MWS-Opsin (Szel et al. 1986). Er erkennt das MWS-Opsin in den Außensegmenten der Seh-Zapfen.

Zunächst wurde immunhistochemisch an *whole-mount-Präparaten* die räumliche Expression untersucht. In Abbildung 40 ist eine Immunhistochemie an Retinae 4 Wochen alter Mäuse zu

sehen. Der monoklonale Antikörper wurde mit einem Alexa 594-markiertem Ziege anti-Maus Sekundäranantikörper (MoBiTec) detektiert und am Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss) visualisiert. Die Retinae wurden zusätzlich mit FITC-PNA (Sigma) inkubiert, um die Gesamtheit der Zapfen zu markieren. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus der zentralen dorsalen Region.

Im Wildtyp exprimiert fast jeder Seh-Zapfen das MWS-Opsin. Bei der 4 Wochen alten CNGA3-defizienten Maus hingegen ist fast kein Signal mehr zu erkennen. Die wenigen immunpositiven Reste kolokalisieren jedoch mit dem Zapfen-Marker.

Eine quantitative Auswertung der Immunhistochemie an 4 Wochen alten Mäusen ist in Abbildung 41 zusammengefasst, aufgetragen ist der prozentuelle Anteil der MWS-Zapfen an der Gesamtzapfenzahl. Eine signifikante Abnahme des MWS-Opsins in der dorsalen und temporalen Region (dem Hauptexpressionsort des MWS-Opsins im Wildtyp) ist zu erkennen, nur noch etwa 10 % der Zapfen beinhalten das Opsin (Tabelle 7; $p < 0,0001$, t-test, $n = 3$). In der nasalen und ventralen Region ergibt sich keine signifikante Abnahme, primär aufgrund der geringen Anzahl MWS-Opsin positiver Zapfenaußensegmente in diesen Regionen, auch die stärkere Abnahme der Seh-Zapfendichte in dieser Region bei den CNGA3 $-/-$ Mäusen trägt dazu bei.

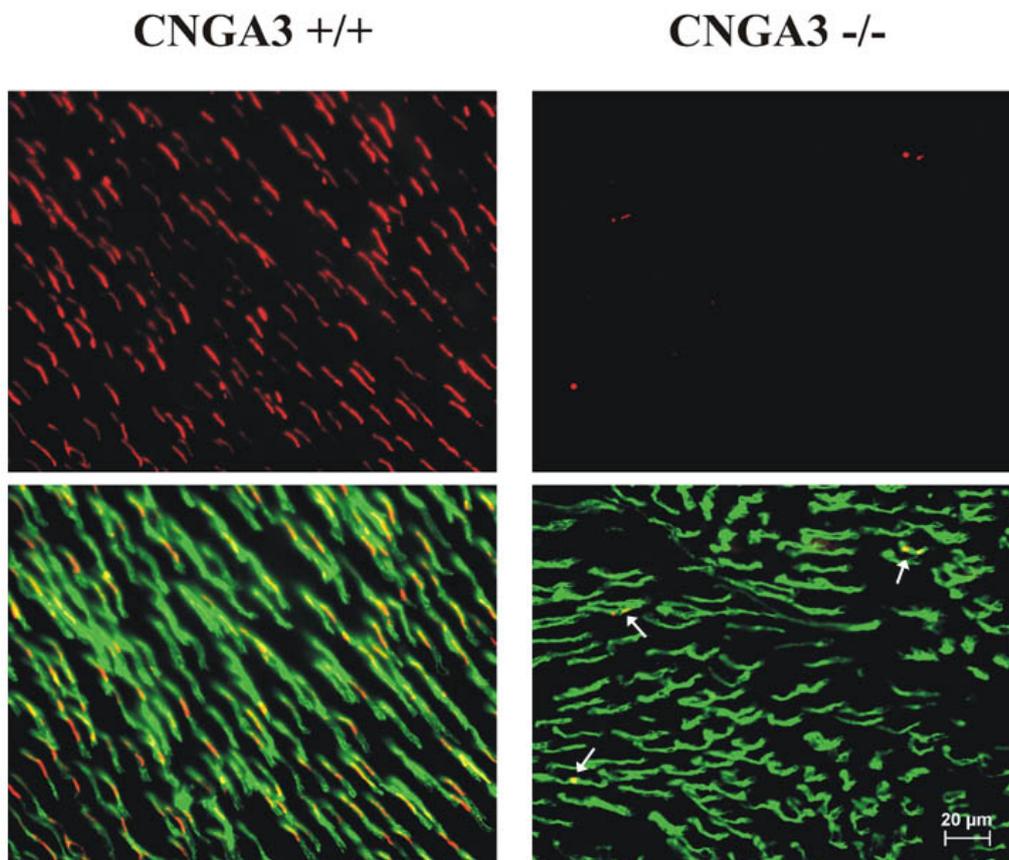


Abbildung 40

MWS-Opsin-Immunhistochemie. Immunhistochemischer Nachweis des MWS-Opsins in whole-mount Retina-Präparaten 4 Wochen alter Tiere. Nur noch wenig Restreaktivität ist in Zapfen von CNGA3 $-/-$ Mäusen zu erkennen (MWS-Opsin rot, PNA grün, Überlagerung gelb).

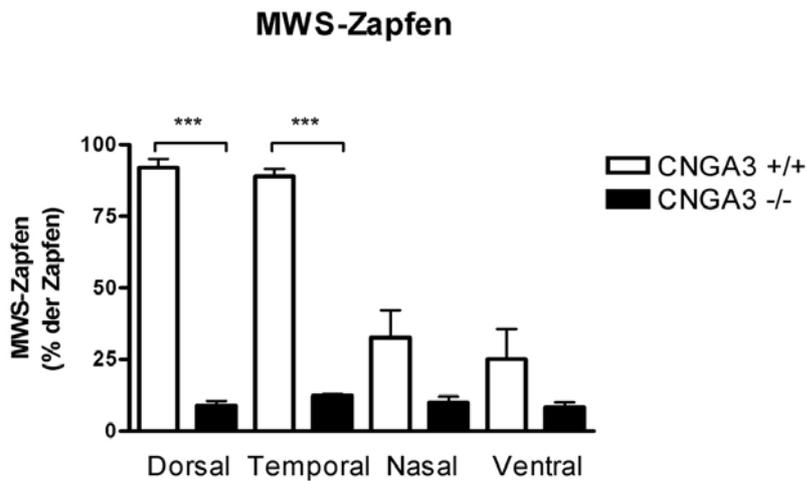


Abbildung 41

MWS-Opsin Quantifizierung. Quantitative Auswertung der COS 1 positiven MWS-Zapfen bei 4 Wochen alten Mäusen. Aufgetragen ist der Anteil der MWS-Zapfen an der jeweiligen Gesamtanzahl der Zapfen [%] (Mittelwert ± SEM; *** = $p < 0,001$, t-test; $n = 3$).

Genotyp	Anteil der MWS-Zapfen (% der Zapfen)			
	Dorsal	Temporal	Nasal	Ventral
CNGA3 +/+	92,2 ± 2,7 %	88,9 ± 2,7 %	32,7 ± 9,6 %	25,2 ± 10,4 %
CNGA3 -/-	8,9 ± 1,7 %	12,5 ± 0,4 %	9,9 ± 2,2 %	8,3 ± 1,7 %
t-test	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Tabelle 7

Quantifizierung des MWS-Opsinanteils der Seh-Zapfen. Der Anteil der MWS-Zapfen an der Gesamtzapfenanzahl des Wildtyps bzw. CNGA3-defizienten Maus (Mittelwert ± SEM, $n = 3$).

Um die Lokalisierung des MWS-Opsins in den Photorezeptoren genauer zu analysieren, wurde die Konfokalmikroskopie angewendet. Immunhistochemisch wurde an 10 µm dicken Retinaschnitten mit dem COS 1 Antikörper und einem Antikörper gegen das Zapfen-Transducin ($G_{\alpha t_2}$) bzw. FITC-PNA markiert. Der COS 1 Antikörper wurde mit einem Alexa 594-markiertem Ziege anti-Maus-AK nachgewiesen. Der Kaninchen anti- $G_{\alpha t_2}$ Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies) wurde mit einem FITC-markierten Ziege anti-Kaninchen Zweitantikörper (Dianova) detektiert. Die Visualisierung erfolgte am Laser-Konfokalmikroskop (Zeiss) mittels Argon und HeNe1 Laser-Anregung.

In Abbildung 42 sind exemplarisch die Ergebnisse an 4 Wochen und 3 Monate alten Tieren gezeigt. Im linken Teil der Abbildung zeigen die unteren Bilder eine Überlagerung der MWS-IR mit der Zapfen-Transducin-IR, bzw. Zapfen-Transducin-IR und DIC. Im rechten Teil ist unten eine Überlagerung von MWS-Opsin-IR und PNA-Signal zu sehen. Die Experimente am Wildtyp zeigen, dass das MWS-Opsin in den länglichen Zapfen-Außensegmenten lokalisiert. In den CNGA3-defizienten Mäusen sind nur noch Reste von Protein zu erkennen, selbst dieses Restsignal verschwindet bei älteren Tieren (>3Monate, Daten nicht gezeigt). Interessanterweise zeigt das Protein eine veränderte Verteilung in den Zapfen. Die Restreaktivität an MWS-Opsin ist meist nicht mehr in länglicher Form über das Außensegment verteilt, sondern bildet Klumpen an der Basis des Außensegmentes bzw. dem Innensegment der Zapfen. Dies ist im linken vergrößerten Ausschnitt deutlich zu erkennen. Bei genauerer Betrachtung ist eine sehr geringe $G_{\alpha t_2}$ -IR zu erkennen, die sich vorwiegend an der Spitze des Außensegments und in Form von Spots um den Opsin-Klumpen herum befindet. Im Wildtyp zeigt die Zapfen-Transducin-IR eine ähnliche Form wie die Zapfenopsin-

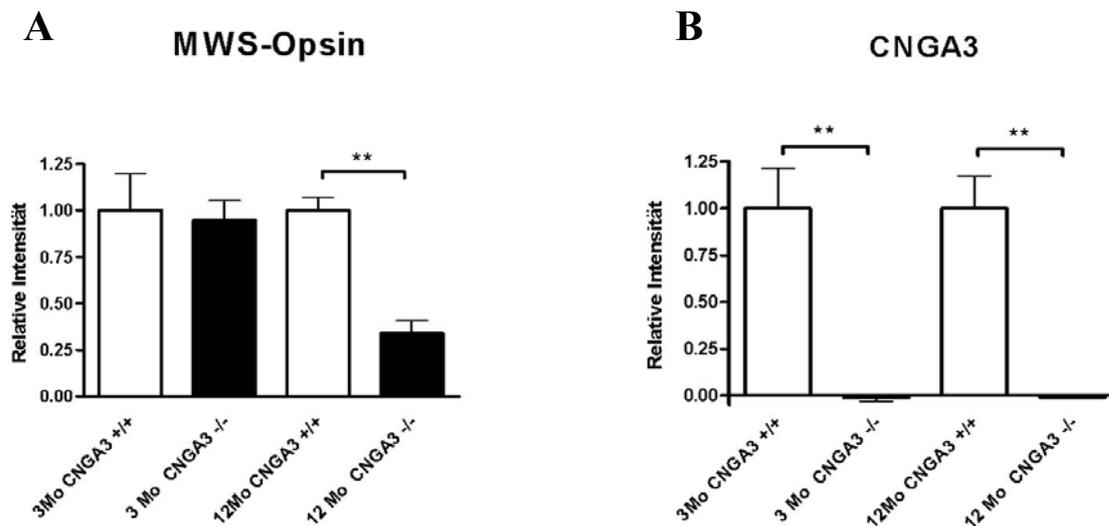


Abbildung 43

Semiquantitative MWS-Opsin RT-PCR aus der Mausretina. A) Semiquantitative MWS-Opsin-PCR. Die Späte Erniedrigung der MWS-Opsin-Transkription ist dargestellt. B) Zum Vergleich die semiquantitative Auswertung der CNGA3-RT-PCRs. (Mittelwert \pm SEM; ** = $p < 0,01$, t-test; $n = 3$)

3.3.1.2 SWS-Opsin

Als nächstes werden die Ergebnisse für das zweite Zapfenopsin der Maus besprochen. Für die Untersuchungen wurde der monoklonale Antikörper OS 2 verwendet, der bei Nagern und Primaten spezifisch das SWS-Opsin in den Außensegmenten markiert (Szel et al. 1988). In *whole-mount-Präparaten*, die mit dem monoklonalen Antikörper OS 2 behandelt wurden ist ein ähnliches Bild wie beim MWS-Opsin zu erkennen nur, dass das SWS-Opsin vorwiegend in der unteren Retina exprimiert ist, weswegen in Abbildung 44 ein Ausschnitt aus der zentralen ventralen Region der Netzhaut gezeigt wird. Man erkennt eine drastische Abnahme an SWS-Opsin-IR, nur noch Reste an Immunreaktivität sind zu sehen die jedoch in den Zapfen lokalisiert ist. Eine quantitative Auswertung an 4 Wochen alten Mäusen verdeutlicht die starke Abnahme der SWS-Opsin-IR. In Abbildung 45 ist der Anteil an SWS-Zapfen an der gesamten Zapfenanzahl in den vier Quadranten dargestellt. Im Hauptexpressionsort des SWS-Opsins ist eine signifikante Abnahme auf etwa 30 % zu beobachten ($p < 0,0001$, t-test; $n = 3$). In den Bereichen der Mausretina in denen das SWS-Opsin nur schwach exprimiert wird ist kein starker Effekt zu beobachten.

Natürlich stellte sich auch hier die Frage nach der exakten Immunlokalisierung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 in konfokalmikroskopischen Aufnahmen von Retinaschnitten 12 Tage und 4 Wochen alter Tiere gezeigt. Das SWS-Opsin ist im Wildtyp, anders als das MWS-Opsin, schon am zwölften postnatalen Tag in den Außensegmenten zu erkennen. Interessanterweise sieht man in 12 Tage alten CNGA3-defizienten Mäusen keine SWS-Opsin-IR. Bei älteren CNGA3^{-/-} Mäusen sind jedoch, wie schon für das MWS-Opsin, vereinzelt klumpenartige Reste von SWS-Opsin-IR zu beobachten, welche vorwiegend in der Zapfenaußensegmentbasis lokalisiert. In Abbildung 46 wird dieses Phänomen bei 4 Wochen alten Tieren veranschaulicht. In der Vergrößerung ist deutlich zu erkennen, dass eine Lokalisierung der roten Opsin-IR innerhalb der Zapfen (Zellmembran mit FITC-PNA grün dargestellt) vorliegt. Bei älteren CNGA3^{-/-} Mäusen verschwindet allmählich die SWS-Opsin-IR (Daten nicht gezeigt).

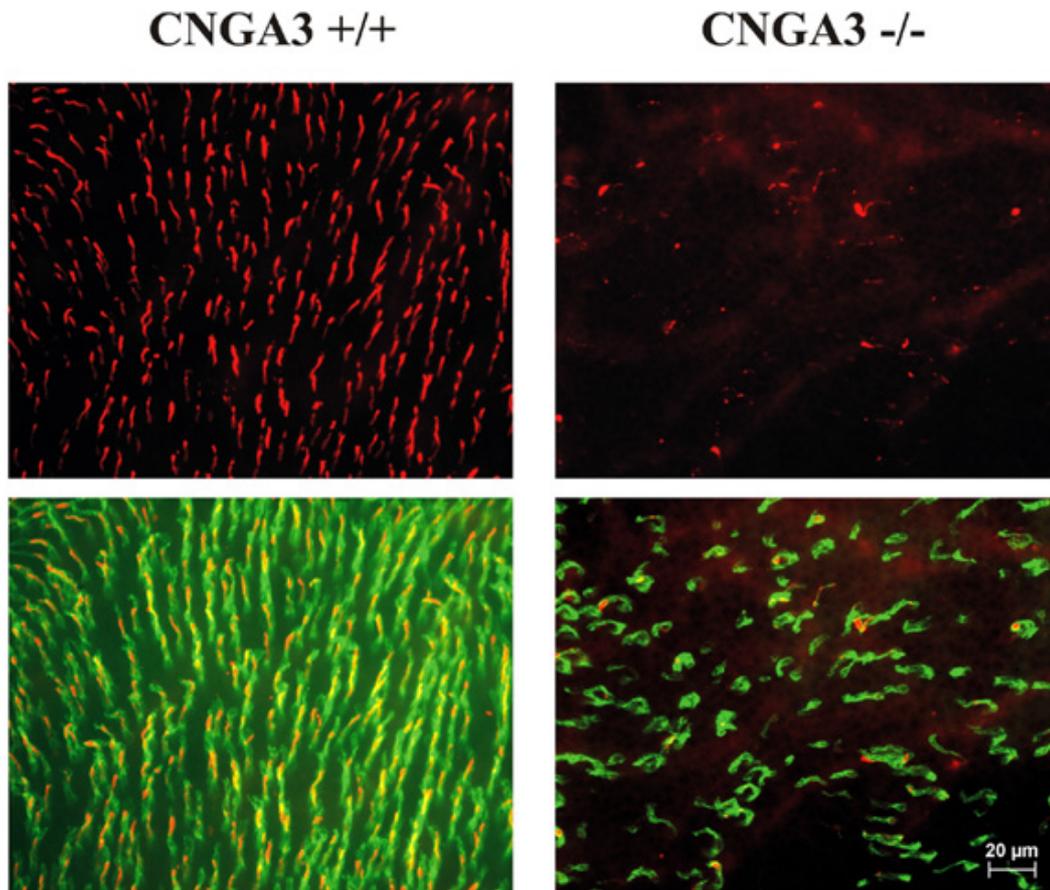


Abbildung 44

SWS-Opsin-Immunhistochemie. Immunhistochemischer Nachweis des SWS-Opsins in whole-mount Retina-Präparaten 4 Wochen alter Tiere. In Zapfen von CNGA3-defizienten Mäusen ist eine geringe Restreaktivität zu erkennen (SWS-Opsin rot, PNA grün, Überlagerung gelb).

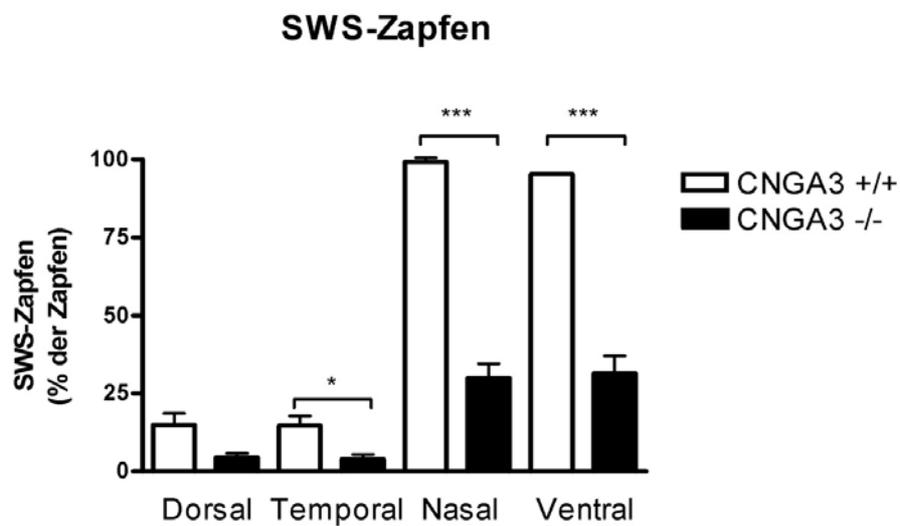


Abbildung 45

MWS-Opsin Quantifizierung. *Quantitative Auswertung der OS 2-positiven MWS-Zapfen bei 4 Wochen alten Mäusen (% der Gesamtzapfenanzahl; Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,0005$, t-test; n = 3).*

Genotyp	Anteil der SWS-Zapfen (% der Zapfen)			
	Dorsal	Temporal	Nasal	Ventral
CNGA3 +/+	14,9 \pm 3,7 %	14,7 \pm 2,9 %	99,3 \pm 1,3 %	95,4 \pm 0,4 %
CNGA3 -/-	4,5 \pm 1,3 %	3,9 \pm 1,5 %	29,9 \pm 4,6 %	31,4 \pm 5,5 %
t-test	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p = 0,0001$	$p < 0,0005$

Tabelle 8

Quantifizierung des SWS-Opsinanteils der Seh-Zapfen. (Mittelwert \pm SEM, n = 3).

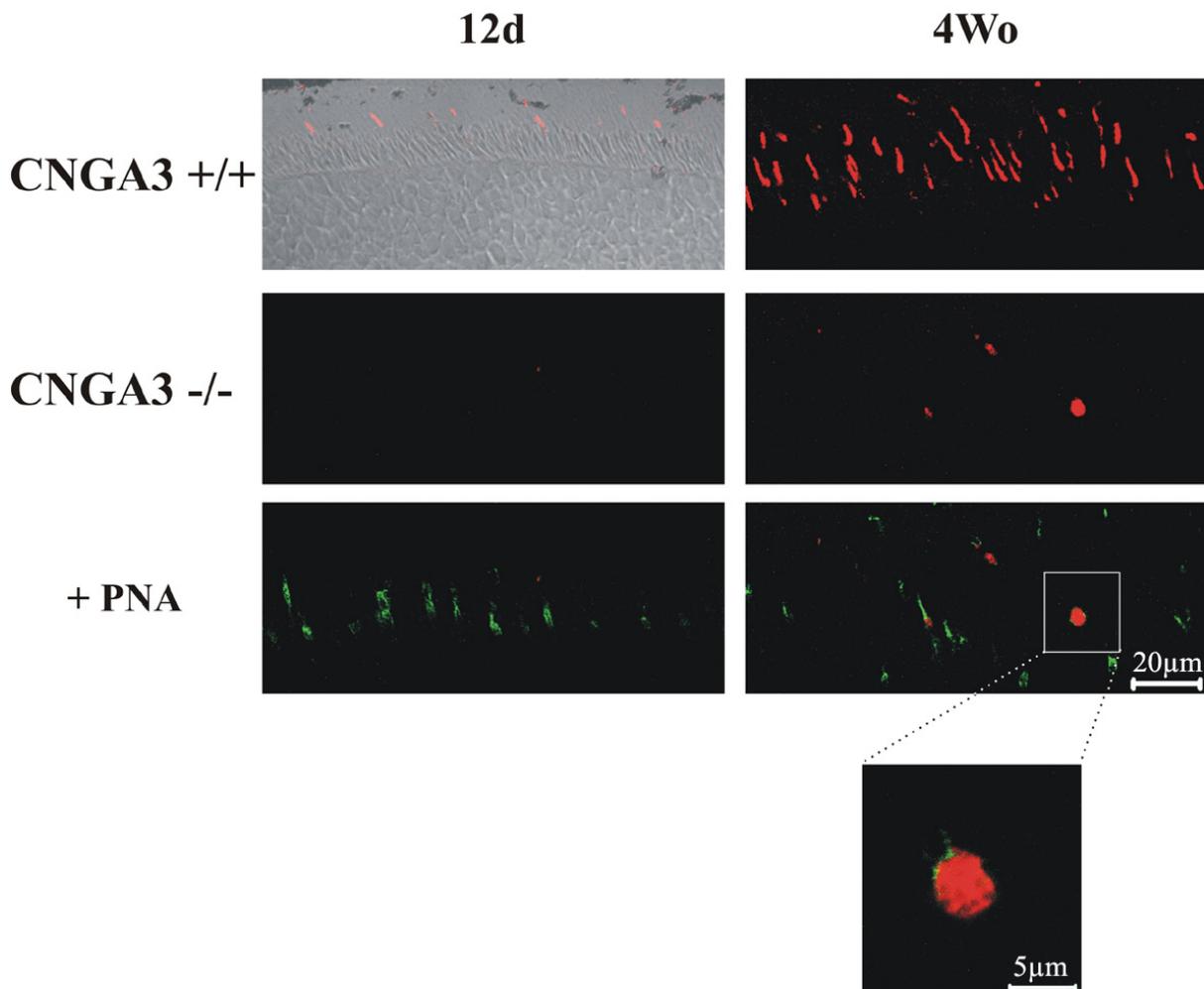


Abbildung 46

Konfokalmikroskopische Detektion von SWS-Opsin in der Mausretina. *OS2-Signal in der Netzhaut von CNGA3 +/+ Mäusen (oben) und CNGA3 -/- Mäusen (untere Reihen). Kolokalisierung von COS1-IR mit dem*

Zapfenmarker PNA (unten). Die verspätete Expression von SWS-Opsin bei 12 Tage alten CNGA3^{-/-} Mäusen ist links dargestellt. Der Verlust von OS2-IR und die Fehllokalisierung der Restimmunreaktivität bei älteren CNGA3^{-/-} Mäusen ist rechts zu erkennen.

Im Weiteren ist auch für das SWS-Opsin untersucht worden, wie sich die Transkriptexpression verhält. Im Gegensatz zum MWS-Opsin kann man hier schon früh (siehe Abbildung 47) eine signifikante Abnahme der Genexpression auf RNS-Ebene sehen. Schon bei 3 Monate alten CNGA3-defizienten Mäusen ist eine Reduktion der Boten-RNS auf $24,1 \pm 5,3$ % des Wildtyp-Levels zu erkennen ($p < 0,005$, t-test). Interessanterweise ist selbst bei 12 Monate alten CNGA3^{-/-} Tieren ein geringer Restgehalt an SWS-Opsin-RNS zu finden ($15,7 \pm 2,7$ % des Wildtyps; $p < 0,001$, t-test). Dies lässt darauf schließen, dass spät noch erhaltene Seh-Zapfen noch über einen funktionellen Zellkern verfügen.

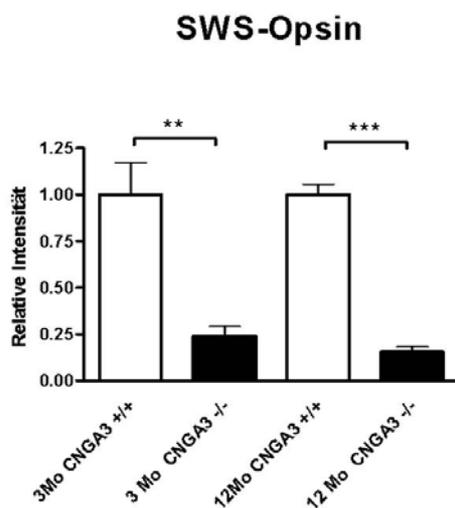


Abbildung 47

Semiquantitative MWS-Opsin RT-PCR aus der Mausretina. Erniedrigung der SWS-Opsin-Transkription schon bei 3 Monate alten CNGA3-defizienten Mäusen. (Mittelwert \pm SEM; ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,001$, t-test; $n = 3$).

3.3.2 Weitere Proteine der Phototransduktionskaskade

3.3.2.1 CNGB3

Mit einem Antikörper gegen CNGB3 sollte die Lokalisierung der zweiten Zapfen CNG-Untereinheit immunhistochemisch untersucht werden. Die Abbildung 48 zeigt die Lokalisierung des CNGB3-Proteins in der Mausretina von 3 Monate alten Mäusen. Im linken Teil der Abbildung ist zu erkennen, dass das CNGB3-Signal sich in allen Seh-Zapfen befindet. Interessanterweise ist bei der CNGA3-defizienten Maus ein fast vollständiger Verlust der CNGB3-IR zu beobachten. Diese Beobachtung ist sowohl in jüngeren als auch älteren CNGA3^{-/-} Mäusen zu machen (Daten nicht gezeigt).

Die CNGB3 Transkripte werden durch die Deletion von CNGA3 nicht beeinflusst, was in Abbildung 49 deutlich wird. Nach drei Monaten sind noch $83,8 \pm 8,4$ % CNGB3-RNS vorhanden. Beachtlicherweise sind nach 12 Monaten trotz dem oben beschriebenen massiven Verlust von Seh-Zapfen noch $58,2 \pm 5,1$ % der Wildtyp-Transkriptmenge vorhanden.

Die oben gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass das CNGB3-Protein alleine, nicht in der Lage ist in die Photorezeptormembran zu gelangen bzw. ohne CNGA3 rascher abgebaut wird.

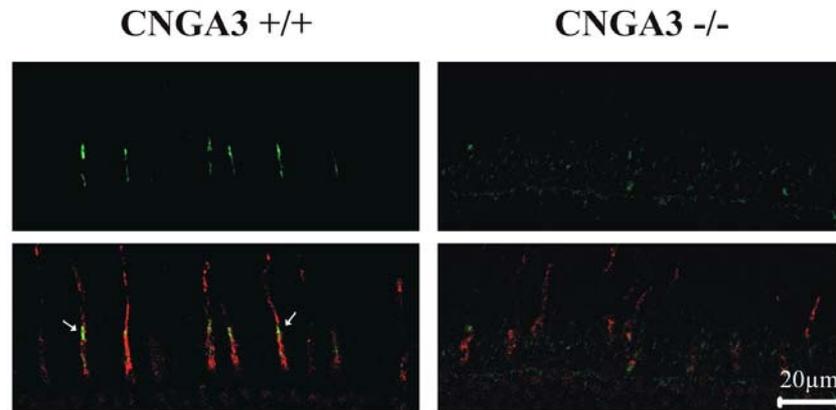


Abbildung 48

Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer CNGA3 Immunhistochemie. Nachweis des CNGA3-Proteins (grün) auf Gefrierschnitten der Mausretzhaut. Im unteren Teil ist eine Überlagerung mit dem Zapfenmarker PNA zu sehen (rot).

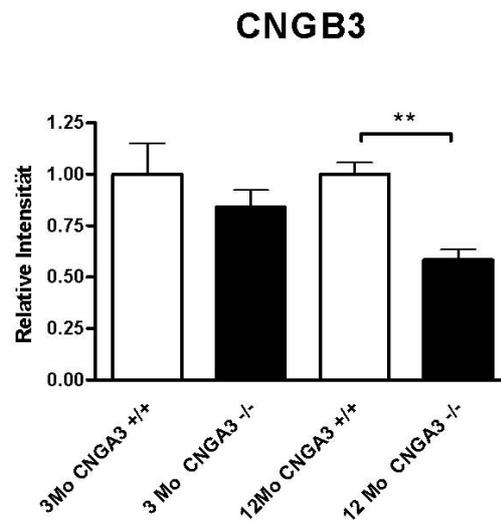


Abbildung 49

Semiquantitative CNGA3 RT-PCR aus der Mausretina. (Mittelwert \pm SEM; ** = $p < 0,01$, t -test; $n = 3$).

3.3.2.2 Zapfen-Transducin

Das Zapfen-Transducin ($G_{\alpha t_2}$) ist ein GTP-bindendes Protein, das innerhalb der Retina ausschließlich in den Zapfen exprimiert ist und für die Aktivierung der Phosphodiesterase verantwortlich ist. Ein Kaninchen anti- $G_{\alpha t_2}$ Antikörper (Santa Cruz Biotechnologies) wurde verwendet um immunhistochemisch zu untersuchen ob die Expression von $G_{\alpha t_2}$ sich in den

CNGA3-defizienten Mäusen verändert. Detektiert wurde mit einem FITC Esel anti-Maus Zweitantikörper (Dianova). Die Zapfen wurden zusätzlich mit biotinyliertem PNA (Sigma) und DY-630 Avidin (Dyomics) sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 50 gezeigt wird, kann im Wildtyp schon bei 9 Tage alten Mäusen das $G_{\alpha t_2}$ -Protein in den zu diesem Zeitpunkt heranwachsenden Zapfen beobachtet werden. Zu späteren Zeitpunkten ist das Zapfen-Transducin in allen Seh-Zapfen enthalten. Mittels PNA-Markierung konnte eine Lokalisierung innerhalb der Zapfen in einer Region die dem Außensegment entspricht beobachtet werden. Exemplarisch ist in Abbildung 50 die Überlagerung bei 3 Monate alten Mäusen gezeigt.

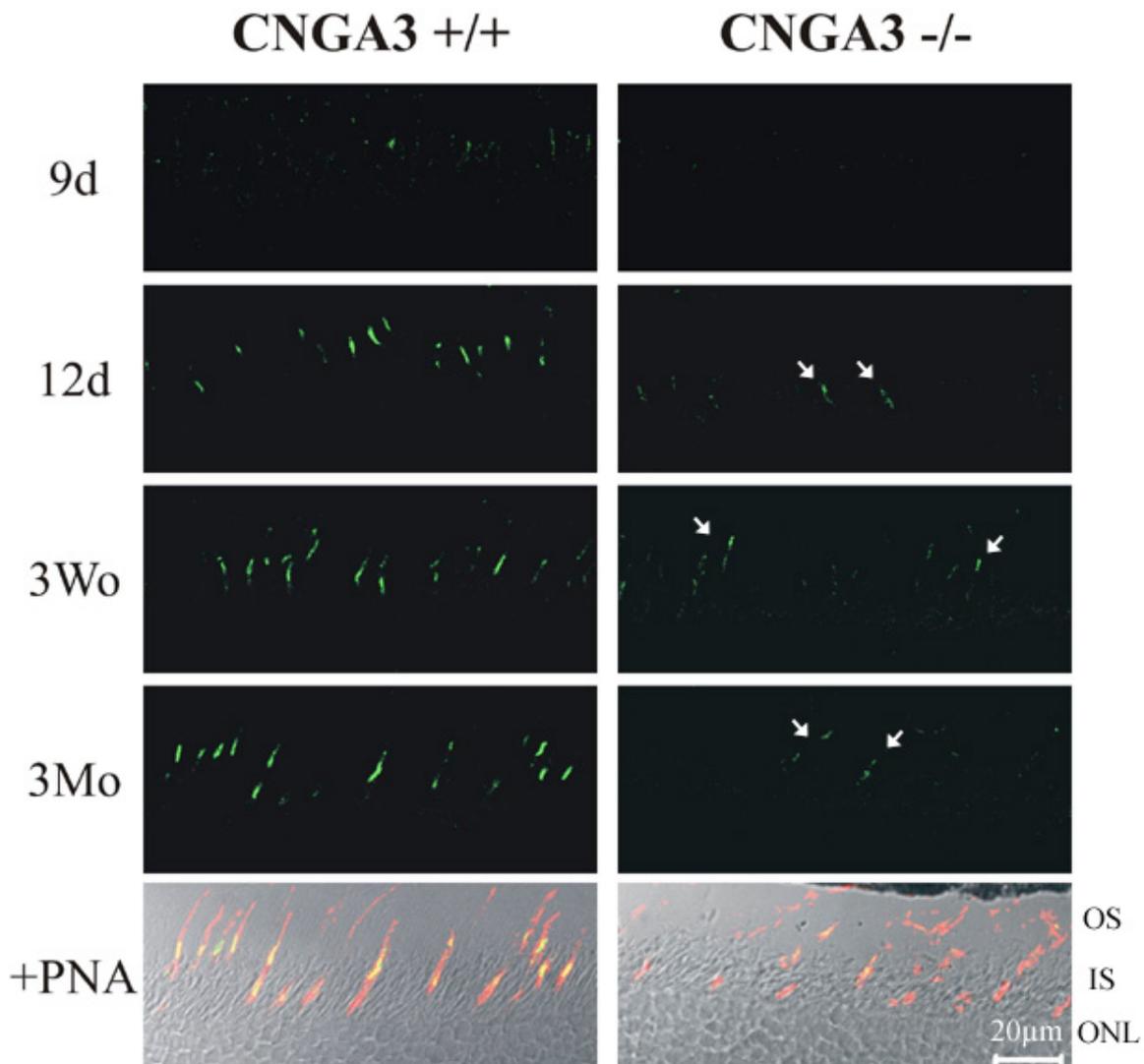


Abbildung 50

Zapfen-Transducin-Immunhistochemie. Konfokalmikroskopischer Nachweis des $G_{\alpha t_2}$ -Proteins in der Maus-Retina. Zeitlicher Verlauf der Expression in CNGA3 +/+ (links) und CNGA3 -/- Mäusen (rechts). Im unteren Teil ist exemplarisch die Kolo-kalisierung der $G_{\alpha t_2}$ -IR mit dem Zapfenmarker PNA gezeigt. Die verspätete (erst ab Tag 12) und erniedrigte Expression von Zapfen-Transducin ist zu erkennen.

Bei den CNGA3-defizienten Mäusen ist ein ähnliches Phänomen wie beim SWS-Opsin zu sehen. Bei 9 Tage alten Tieren, dem ersten untersuchten Zeitpunkt an dem im Wildtyp $G_{\alpha t_2}$ -

Protein erkennbar ist, kann bei CNGA3 $-/-$ Mäusen keine Immunreaktivität beobachtet werden. Wie beim SWS-Opsin ist zu späteren Zeitpunkten nur eine schwache Immunreaktivität zu beobachten. Nur ein Bruchteil der Seh-Zapfen trägt das Zapfen-Transducin, jedoch scheint das Protein in den Außensegmenten lokalisiert zu sein. Doppelmarkierung mit anti- $G_{\alpha t_2}$ und COS 1 oder OS 2 (MWS bzw. SWS-Opsin) zeigten, dass diejenigen Zapfen die noch eine schwache Transducin-IR zeigten auch eine schwache Opsin-IR aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Wie schon bei MWS-Opsin und CNGB3 ist auch hier die Reduktion an $G_{\alpha t_2}$ -Protein nicht auf eine transkriptionelle Herunterregulation zurückzuführen. Wie in Abbildung 51 gezeigt, ist in 3 Monate alten CNGA3-defizienten Mäusen noch ähnlich viel $G_{\alpha t_2}$ -RNS zu finden wie in Wildtypmäusen. Bei 12 Monate alten Mäusen ist aufgrund dem oben beschriebenen Zapfenverlust eine signifikante Abnahme auf $37,3 \pm 5,7$ % des Wildtypwertes zu beobachten ($p < 0,01$, t-test; $n = 3$).

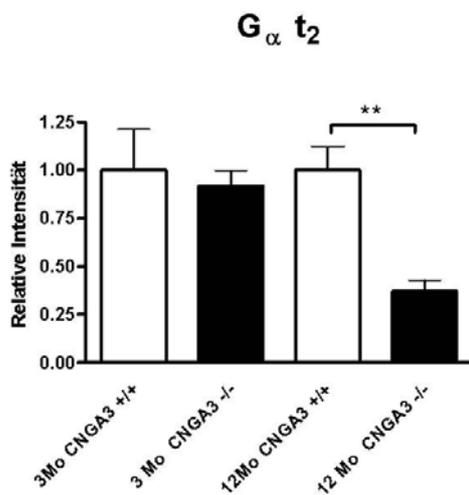


Abbildung 51

Semiquantitative RT-PCR-Analyse für $G_{\alpha t_2}$. (Mittelwert \pm SEM; ** = $p < 0,01$, t-test; $n = 3$).

3.3.2.3 Zapfen-Phosphodiesterase

Die Phosphodiesterase ist ein weiterer wichtiger Bestandteil der Phototransduktionskaskade. Da kein geeigneter Antikörper vorhanden ist der spezifisch ist für die ausschließlich in Zapfen exprimierte Phosphodiesterase (PDE 6c') wurde der monoklonale Antikörper ROS 1 verwendet, der Phosphodiesterasen sowohl in den Stäbchen als auch in den Seh-Zapfen erkennt (Hurwitz et al. 1984). Die Expression in den Seh-Stäbchen ist in CNGA3-defizienten Mäusen vergleichbar mit der im Wildtyp. Interessanterweise ist in CNGA3 $-/-$ Mäusen eine verstärkte Immunreaktivität in den Zapfen zu erkennen, wobei diese bei alten Mäusen wieder abgenommen hat. Exemplarisch sind in Abbildung 52 die Ergebnisse an 3 Monate alten Mäusen gezeigt. Ein Kontrolleexperiment unter Verwendung des Sekundärantikörpers alleine verdeutlicht, dass dieser im Bereich der Photorezeptoren keine unspezifische Bindung zeigt.

Mittels semiquantitativer RT-PCR sollte untersucht werden ob die Transkription der α -Untereinheit der zapfenspezifischen Phosphodiesterase durch die Deletion von CNGA3 beeinflusst wird. Das Gen wird in sehr niedrigem Niveau exprimiert, aufgrund dessen war eine große cDNS-Menge und eine hohe Zyklenanzahl für die PCR notwendig. Bei 3 Monate

alten Mäusen konnte kein Unterschied festgestellt werden. In 12 Monate alten CNGA3-defizienten Mäusen war nur noch ein geringer Rest an PDE 6c'-RNS nachzuweisen.

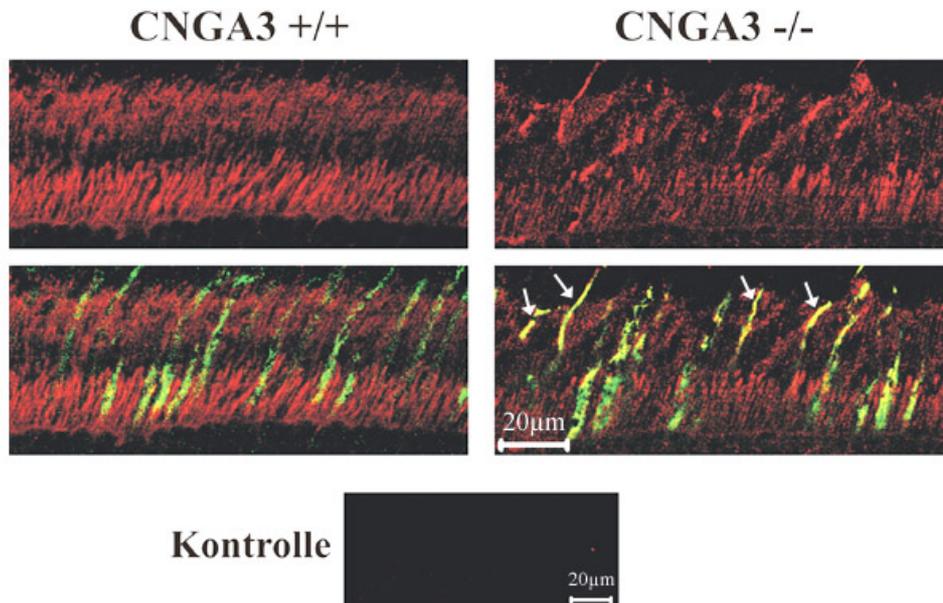


Abbildung 52

ROS 1-Immunhistochemie. Konfokalmikroskopischer Nachweis der retinalen Phosphodiesterasen. Bei 3 Monate alten CNGA3-defizienten Tieren ist eine verstärkte ROS-1-IR in den Seh-Zapfen zu erkennen.

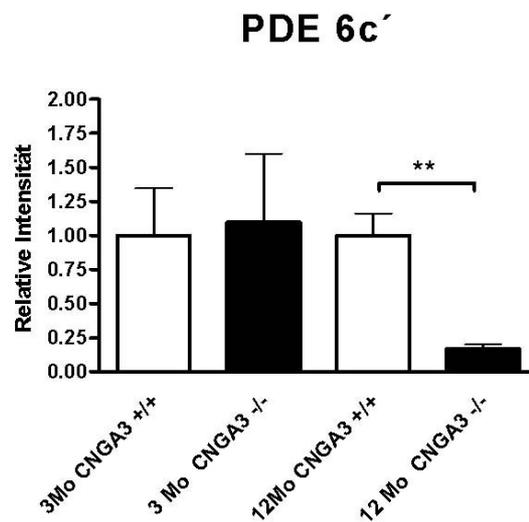


Abbildung 53

Semiquantitative RT-PCR-Analyse von PDE 6c'. Verlust von Transkripten der zapfenspezifischen Phosphodiesterase bei 12 Monate alten CNGA3-defizienten Mäusen. (Mittelwert \pm SEM; ** = $p < 0,01$, t-test; $n = 3$).

3.3.2.4 Guanylylzyklase-aktivierendes Protein

Drei Guanylylzyklase-aktivierende Proteine wurden in der Retina beschrieben (Howes et al. 1998, Imanishi et al. 2002), wovon nur GCAP1 und GCAP2 in der Maus exprimiert sind. GCAP2 kommt dort ausschließlich in den Stäbchen, GCAP1 in den Seh-Stäbchen und Seh-Zapfen vor. Ein GCAP1 Antikörper wurde benutzt um immunhistochemisch das GCAP1-Protein bei CNGA3-defizienten Mäusen zu untersuchen. Wie in Abbildung 54 dargestellt zeigte sich bei 9 Tage alten CNGA3-defizienten Mäusen ein ähnliches Signal wie bei der Wildtypmaus. Erst bei 12 Tage alten Mäusen zeigte sich ein deutlicher Verlust der Immunreaktivität. Ab diesem Zeitpunkt ist eine GCAP1-IR ausschließlich in den Seh-Stäbchen zu erkennen (Abbildung 54).

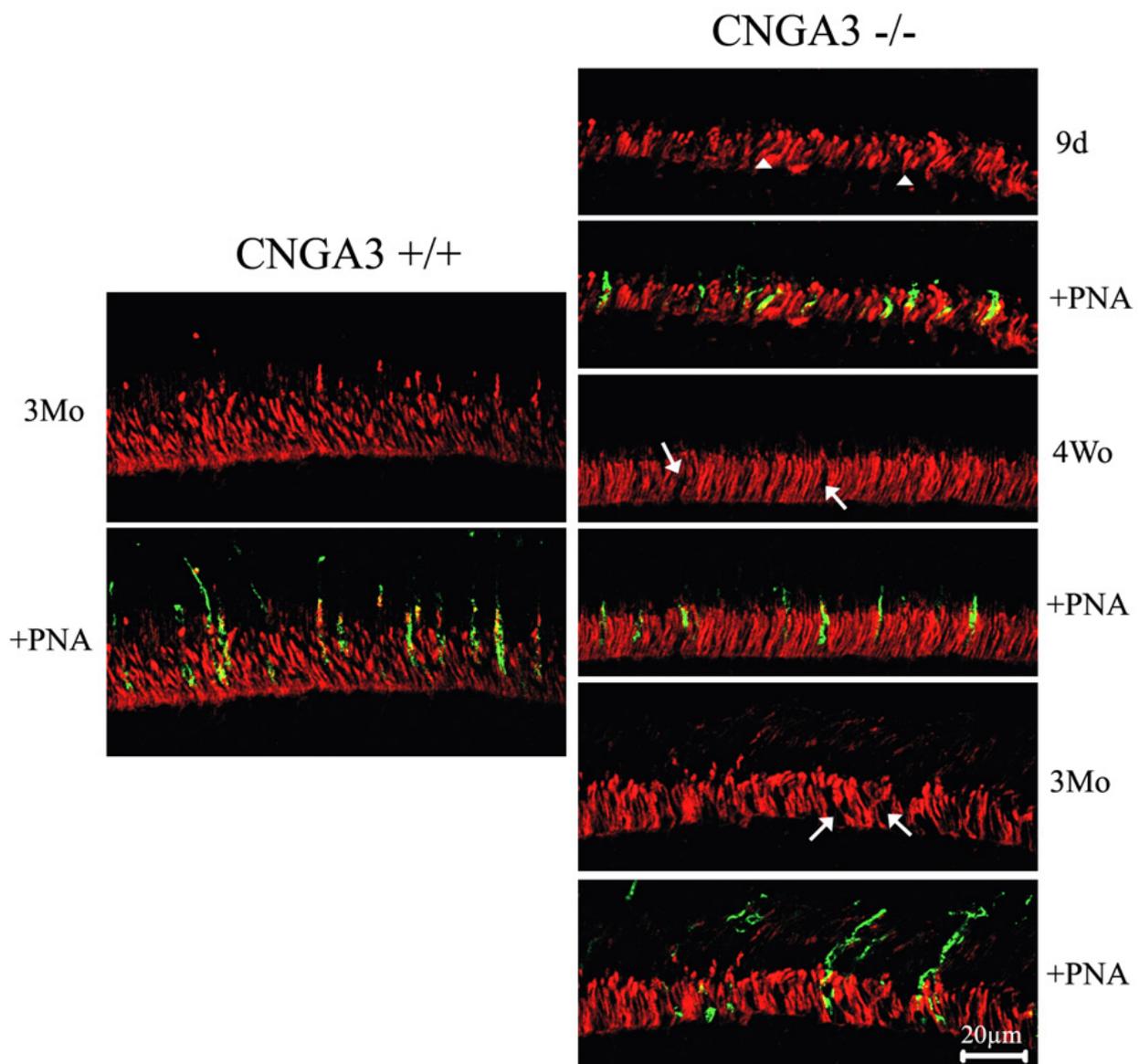


Abbildung 54

GCAP1-Immunhistochemie. *Konfokalmikroskopische Darstellung des selektiven Verlustes von GCAP1-IR (rot) in den Seh-Zapfen (Überlagerung mit PNA-Signal). Bei 9 Tage alten CNGA3^{-/-} Mäusen sind noch immunpositive Zapfen zu erkennen, bei adulten jedoch nicht mehr.*

3.3.2.5 Retinale Guanylylzyklase

Nach dem beobachteten Verlust des Guanylylzyklase-aktivierenden Proteins, interessierte uns wie sich die Expression der Guanylylzyklase in den Seh-Zapfen verhält. In der Mause Netzhaut wurden zwei unterschiedliche membrangebundene Guanylylzyklasen beschrieben (Yang & Garbers 1997). Davon ist die GC-F ausschließlich in den Seh-Stäbchen, die GC-E sowohl in den Seh-Stäbchen als auch in den Seh-Zapfen zu finden. Ein Antikörper gegen die GC-E wurde verwendet um die Expression des GC-E-Proteins bei der CNGA3-defizienten Maus zu untersuchen. Wie schon für die bisher beschriebenen zapfenspezifischen Bestandteile der Sehkaskade ist auch für die GC-E ein früher Verlust der Immunreaktivität in Seh-Zapfen zu beobachten (Abbildung 55). Interessanterweise exprimiert GC-E in den Stäbchen weiterhin in normalem Ausmaß. Ein kompletter Verlust GC-E positiver Zapfen ist bereits bei 9 Tage alten Mäusen zu erkennen, der sich über die gesamte postnatale Entwicklung hinwegzieht.

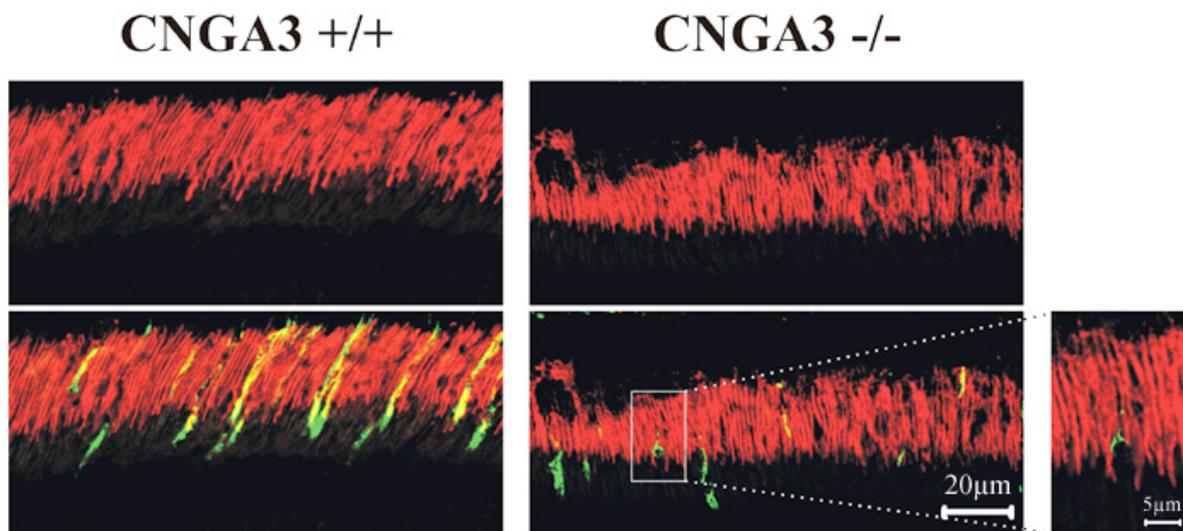


Abbildung 55

GC-E Immunhistochemie. GC-E Immunreaktivität (rot) in der Netzhaut 4 Wochen alter CNGA3 +/+ und -/- Mäuse auf konfokalmikroskopischen Aufnahmen. In grün sind die PNA-markierten Zapfen zu sehen, die Überlagerung erscheint gelb. Es ist ein Verlust der GC-E-IR spezifisch in den Zapfen CNGA3-defizienter Mäuse zu beobachten, der sich schon bei 9 Tage alten Mäusen äußert.

3.4 Veränderungen der inneren Retina bei CNGA3-defizienten Mäusen

Die bisherigen Untersuchungen konzentrierten sich auf die Veränderungen in den Photorezeptoren CNGA3-defizienter Mäuse. Eine wichtige Frage die sich nun stellt ist, wie sich die den Photorezeptoren nachgeschalteten Neurone zweiter Ordnung verhalten.

Etwa die Hälfte der Neuronen zweiter Ordnung (bei der Ratte bestimmt, Euler & Wässle 1995) gehören dem Zapfen-System an. Das Verhältnis der Komponenten des photopischen zu

denen des skotopischen Systems verändert sich in der inneren Retina beträchtlich (nur 3 % der Photorezeptoren der Maus sind Zapfen). So sind im Gegensatz zu einem Typ von Stäbchen-Bipolarzellen, zehn verschiedene signalkonservierende oder signalinvertierende Typen von Zapfen-Bipolarzellen beschrieben. Horizontalzellen, eine weitere Gruppe von Neuronen die den Photorezeptoren nachgeschaltet sind, bilden Kontakte sowohl mit Zapfen, als auch mit Stäbchen aus.

In den letzten Jahren wurden Veränderungen an Neuronen zweiter Ordnung in der Retina verschiedener degenerativer Modelle beschrieben. Bei diesen Untersuchungen wurden ausschließlich Modelle mit einem primären Defekt der Seh-Stäbchen verwendet (Strettoi et al. 2003). Ob ähnliche Veränderungen bei retinalen Degenerationsmodellen mit einem zapfenspezifischen Defekt auftreten ist noch unklar.

3.4.1 Veränderungen der Horizontalzellen

Seh-Zapfen bilden mit ihren Synapsen zahlreiche Kontakte mit Dendriten der Horizontalzellen aus. Horizontalzellen bilden zusätzlich dazu mit Ihren Axonen zahlreiche Kontakte zu den Seh-Zapfen. Um der Frage nachzugehen ob Horizontalzellen durch den Verlust der Zapfenfunktion beeinträchtigt werden, wurde eine Immunhistochemie mit einem monoklonalen Antikörper gegen das kalziumbindende Protein Calbindin durchgeführt. Beim Calbindin handelt es sich um ein zytosolisches Protein das über die gesamte Zelle verteilt ist, somit lassen sich mit dem Antikörper gesamte Strukturen der Horizontalzellen darstellen. In der Mausretina werden mittels Calbindin-Immunhistochemie zusätzlich zu den Horizontalzellen in geringerem Maße einzelne Amakrinzellen markiert.

Zunächst sollte an Retinaschnitten die korrekte Lokalisierung von Calbindin untersucht werden. Detektiert wurde der monoklonale Antikörper mit einem Alexa 594-markierten Ziege anti-Maus Antikörper (MoBiTec) und am Epifluoreszenz-mikroskop (Zeiss) mit Digitaler Kamera visualisiert.

Auf den ersten Blick ergab sich bei CNGA3 $+/+$ und CNGA3 $-/-$ Mäusen ein ähnliches Bild (Abbildung 56). Bei genauer Betrachtung der Präparate konnte ein *neuronal sprouting* einzelner Horizontalzellen beobachtet werden. Beim *neuronal sprouting* handelt es sich um ein Phänomen das die Ausbildung neuronaler Zellfortsätze beschreibt und bei nicht ausdifferenzierten oder gestressten Neuronen beobachtet werden kann. In Abbildung 56 sind die Horizontalzellen bei CNGA3 $+/+$ und CNGA3 $-/-$ Mäusen in schwarz dargestellt. Es wurde eine hohe Belichtungszeit gewählt um die feinen Ausläufer zu visualisieren. Die Fluoreszenzlichtaufnahmen wurden invertiert, so dass das Signal schwarz erscheint. In der noch nicht ausgereiften Mausretina 12 Tage alter Wildtypmäuse sind, wie in der Abbildung 56 oben links zu sehen, vereinzelt Horizontalzellen zu beobachten die ein *sprouting* zeigten. Das *sprouting* ist in Form einzelner Auswüchse zu erkennen die in die Schicht der Photorezeptorkerne hineinwachsen. Zu diesem Zeitpunkt ergibt sich für die Horizontalzellen von CNGA3 $-/-$ Mäusen ein ähnliches Bild. Wie zu erwarten, war kein *neuronal sprouting* bei älteren Wildtypmäusen zu beobachten. Interessanterweise zeigen Horizontalzellen CNGA3-defizienter Mäuse auch in der adulten Retina ein *neuronal sprouting*. Ausläufer die in die Schicht die äußere Körnerschicht hineinwachsen sind zu jedem Zeitpunkt zu sehen, wobei ein Peak bei 3 Monate alten Tieren zu beobachten ist. In Abbildung 56 sind diese Ausläufer durch Pfeile markiert. Da für die Visualisierung des anti-Calbindin-MAK ein anti-Maus IgG-Zweitantikörper verwendet wurde und in der Region in der sich die Horizontalzellen befinden retinale Blutgefäße verlaufen ist ein Signal des Zweitantikörpers zu erwarten das dem endogenen Maus IgG entspricht. Exemplarisch ist im unteren Teil der Abbildung 56 ein Kontrollexperiment an der Retina 7 Monate alter Tiere zu sehen bei dem der

Sekundärantikörper alleine verwendet wurde. Markiert wurden ausschließlich Strukturen innerhalb der Gefäße.

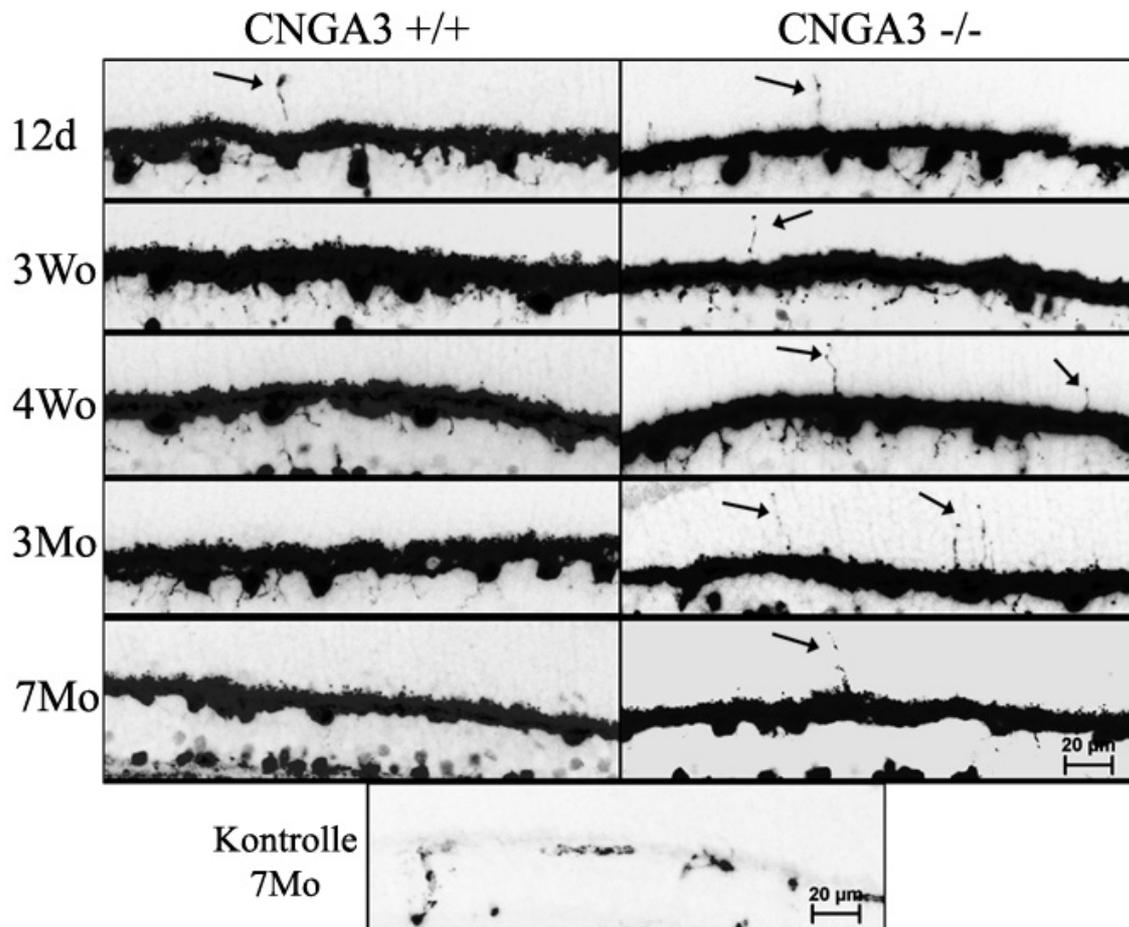


Abbildung 56

Calbindin-Immunhistochemie. Immunhistochemische Darstellung der Horizontalzellen auf Retinaschnitten von *CNGA3 +/+* und *CNGA3 -/-* Mäusen. Veranschaulichung der Ausbildung von Ausläufern der Horizontalzellen (Pfeile) bei *CNGA3 -/-* Mäusen.

3.4.2 Die Synapsen der Zapfen

Das Erdnusslektin erkennt wie oben beschrieben Kohlenhydratreste in der Zellmembran der Seh-Zapfen und markiert somit das gesamte Neuron. Bisher wurden ausschließlich Bilder gezeigt die das PNA-Signal in den Innen- und Außensegmenten zeigen. Mit dem PNA werden jedoch auch die Synapsen der Zapfen in der inneren plexiformen Schicht (*inner plexiform layer, IPL*) markiert. Im Experiment das in Abbildung 57 gezeigt ist wurde biotinyliertes PNA mit DY-630-Avidin verwendet um die Veränderungen der Synapsenanzahl in der *CNGA3*-defizienten Maus zu untersuchen. Dargestellt ist ein Zeitverlauf anhand je eines repräsentativen Ausschnittes aus der dorsalen und der ventralen Retina. Das Bild im dorsalen Quadranten der Netzhaut entspricht bei *CNGA3 -/-* Mäusen bis zu einem Alter von 4 Wochen dem der Wildtypretina. Erst später zeigt sich ein langsam voranschreitender Verlust

an PNA-positiven Synapsen. Bei 3 Monate und 7 Monate alten Mäusen zeigen sich schon einige Lücken und bei 17 Monate alten Tieren ist nur noch vereinzelt ein Signal zu sehen. Anders zeigt sich das Bild in der ventralen Retina, der Verlauf ist viel rascher, schon bei 3 Monate alten Mäusen sind fast keine PNA-positiven Synapsen mehr zu erkennen sind.

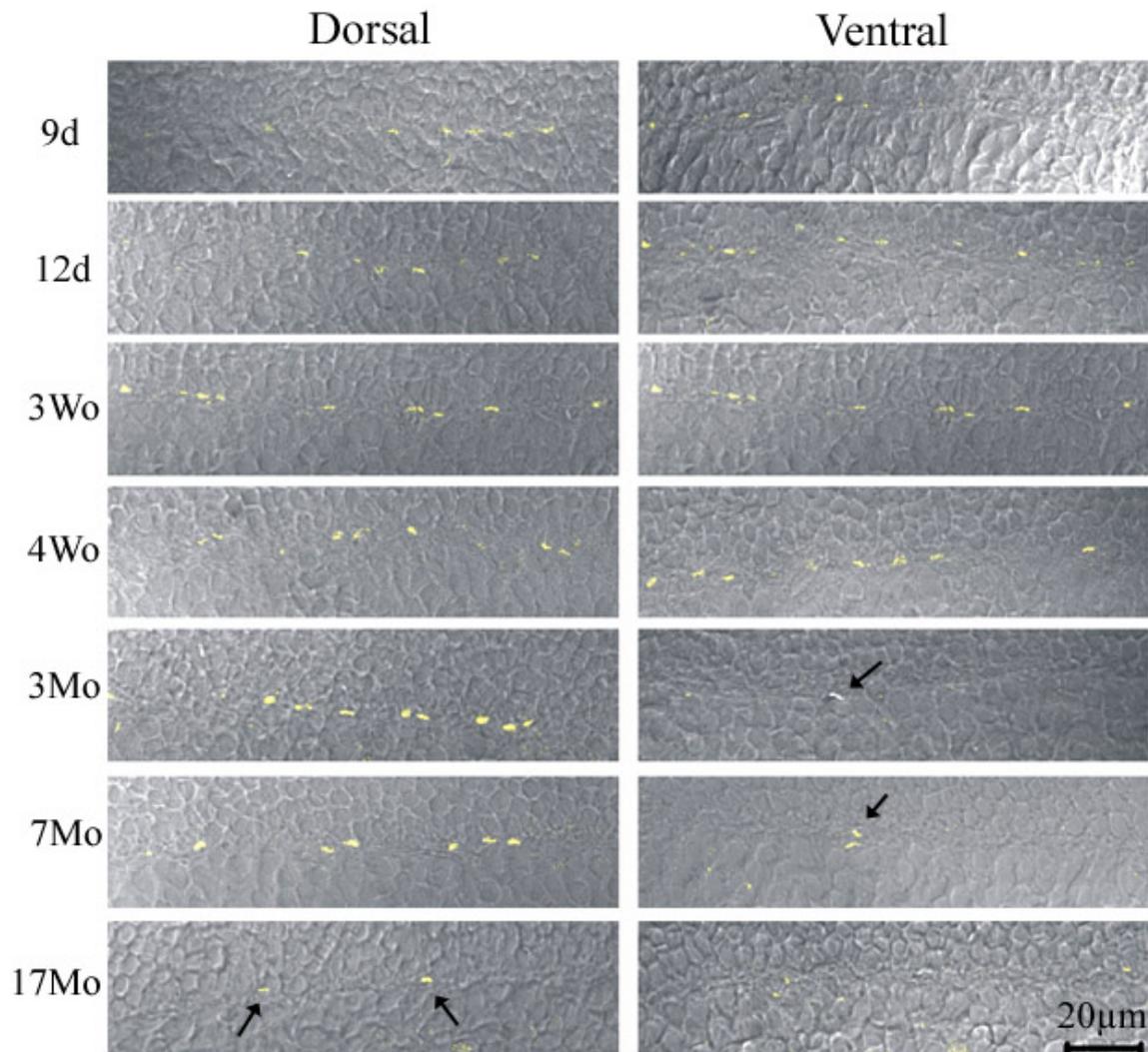


Abbildung 57

PNA-Histochemie. Markierung der Zapfen-Synapsen im IPL CNGA3-defizienter Mäuse mittels Erdnusslektin-Anfärbung (gelb). Der verzögerte zeitliche Verlauf des Verlustes PNA-positiver Zapfen-Synapsen in der dorsalen Retina (links) im Vergleich zur ventralen Retina (rechts) bei CNGA3^{-/-} Mäusen ist dargestellt. Das Erscheinungsbild der Zapfen-Synapsen entspricht in der dorsalen Retina bis zur vierten postnatalen Woche in etwa dem Wildtyp.

3.4.3 Go_α-Immunhistochemie zur Darstellung von Zapfen-ON-Bipolarzellen

Der monoklonale Antikörper, gerichtet gegen das G-Protein Go_α (Chemicon), markiert in der Mausretina Zapfen-ON-Bipolarzellen, sowie alle Stäbchen-Bipolarzellen (Haverkamp & Wässle 2000). Das G-Protein Go_α ist in der Signalkaskade der Zapfen-ON-Bipolarzellen dem metabotropen Glutamatrezeptor (mGluR6) nachgeschaltet. Hier wurde dieser Antikörper verwendet um die Funktionalität dieser Zellen zu untersuchen. Detektiert wurde der monoklonale Antikörper mit einem Alexa 594-markierten Ziege anti-Maus Antikörper und am Konfokalmikroskop mittels He/Ne1-Laser Anregung visualisiert.

In Abbildung 58 ist bei der CNGA3 $+/+$ Maus das typische Färbemuster zu erkennen. Der Antikörper markiert die Zellmembran, die Dendriten und die Axone der Bipolarzellen. Die feinen Dendriten dieser Zellen regen in die innere plexiforme Schicht hinein (Pfeile). Im unteren Teil der Abbildung ist ein Kontrolllexperiment ohne Primärantikörper gezeigt, welches unter den gleichen Bedingungen kein signifikantes Signal zu erkennen lässt.

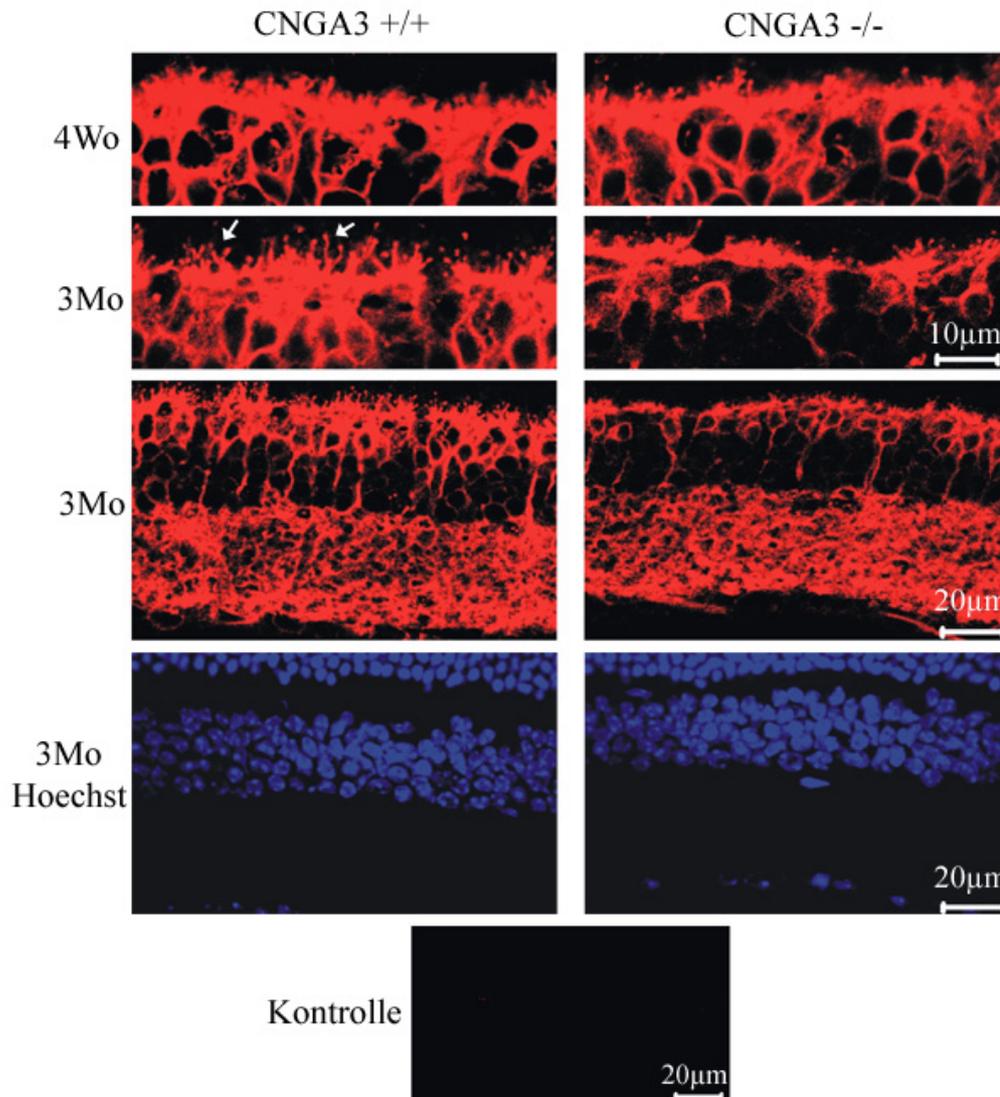


Abbildung 58

Go $_{\alpha}$ -Immunhistochemie. Immunhistochemische Markierung der Stäbchen-Bipolarzellen und aller Zapfen ON-Bipolarzellen. Der Verlust der Go $_{\alpha}$ -IR bei älteren CNGA3-defizienten Mäusen ist dargestellt. Es ist ein Verlust Go $_{\alpha}$ -positiver Dendriten und Zellkörper schon bei 3 Monate alten CNGA3 $-/-$ Mäusen zu sehen. Bei Betrachtung der Hoechst-markierten Zellkerne auf demselben Gewebeschnitt (unterer Teil der Abbildung) ist zu erkennen, dass der Verlust der Go $_{\alpha}$ -IR nicht mit einem Zellverlust einhergeht. Ein Kontrolllexperiment ohne Primärantikörper ist am Ende der Abbildung gezeigt.

In der Retina junger CNGA3-defizienter Mäuse (bis 4 Wochen) konnte kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. Interessanterweise konnten jedoch bei älteren CNGA3 $-/-$ Mäusen feine Veränderungen beobachtet werden, die im ventralen Teil der Retina stärker ausgeprägt waren als im dorsalen Teil. Es ist ein Verlust von Go $_{\alpha}$ -positiven Zellen zu erkennen. Zusätzlich zum Verlust an positiven Zellsomata, sind auch weniger markierte Dendriten zu erkennen. Es handelt sich hierbei ausschließlich um einen Verlust des Proteins

nicht der gesamten Zelle, da die gleichzeitig durchgeführte Zellkernfärbung einen Erhalt des Zellkerns zeigt (Hoechst Kernfärbung, unterer Teil der Abbildung). Da die Sehstäbchen bei CNGA3 $-/-$ Mäusen eine normale Funktion besitzen ist anzunehmen, dass diese Veränderungen ausschließlich Zapfen-ON-Bipolarzellen betreffen.

3.5 Mechanismen des Zelltods

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit der massive Verlust an Seh-Zapfen beschrieben wurde, war das nächste Ziel den Mechanismus für den beobachteten Zelltod zu beschreiben.

3.5.1 Apoptose

In einigen Modellen degenerativer Netzhauterkrankungen ist eine Apoptose als Mechanismus des Zelltods beschrieben worden (Übersicht in Travis 1998). Es lag nahe die Aktivierung einer Apoptose in der Retina CNGA3-defizienter Mäuse zu untersuchen.

3.5.1.1 TUNEL

Bei der Apoptose werden vermehrt DNS-Strangbrüche beobachtet, welche durch die Caspasen-aktivierte DNase (CAD, caspase-activated DNase) vermittelt werden. Dies geschieht durch die caspasen-vermittelte Inaktivierung von ICAD (Inhibitor of caspase-activated DNase) einem Inhibitor der CAD (Liu et al. 1997).

Als erster Ansatz zur Detektion von Vorgängen die mit der Apoptose verbunden sind, wurde die Detektion fragmentierter DNS durch eine TUNEL-Analyse (IV.15.5) gewählt. Hierzu wurden histologische Gewebeschnitte der Retina von CNGA3 $+/+$ und CNGA3 $-/-$ Mäusen untersucht. In ausdifferenzierten Geweben sind nur vereinzelt TUNEL-positive Zellen zu beobachten, treten diese gehäuft auf kann dies als erster Anhaltspunkt für Apoptose gewertet werden. In Abbildung 59 ist eine Zeitreihe mit TUNEL-markierten Retinaschnitten CNGA3-defizienter und Kontrollmäuse dargestellt. Ein repräsentativer Ausschnitt der die Schicht der Photorezeptorkerne zeigt ist zu sehen. Im linken Teil der Abbildung ist der Wildtyp abgebildet, an Tag 12 ist aufgrund der entwicklungsbedingte Apoptose eine erhöhte DNS-Fragmentierung zu erkennen. Zwei TUNEL-positive Zellkerne sind im unteren Teil der äußeren Körnerschicht zu erkennen. Bei der CNGA3 $-/-$ Maus zeigt sich an Tag 12 ein ähnliches Bild, im hier dargestellten Bild sind drei deutlich positive Zellen zu erkennen. Bei CNGA3 $+/+$ Mäusen sind schon in der dritten Lebenswoche nur noch vereinzelt TUNEL-positive Zellen zu beobachten. Anders verhält es sich in der Retina CNGA3-defizienter Mäuse. In 3 Wochen alten Mäusen ist deutlich eine höhere Anzahl TUNEL-positiver Photorezeptorkerne zu erkennen. Auch bei CNGA3 $-/-$ Mäusen in der vierten Lebenswoche ist dieses Phänomen noch deutlich zu beobachten. Erst bei 3 Monate alten Tieren nimmt die Anzahl TUNEL-positiver Photorezeptoren ab. Eine statistische Auswertung ist in der Abbildung 60 gezeigt. Am postnatalen Tag 9 ist deutlich die in der Ausdifferenzierungsphase zu beobachtende Apoptose zu sehen, welche zum Tag 12 etwas abnimmt. Beide Gruppen unterscheiden sich in diesem Alter nicht voneinander. Bei 3 und 4 Wochen alten CNGA3-defizienten Tieren ist im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Photorezeptoren zu erkennen (ANOVA, Tukey's-Test; $p < 0,001$, $n = 4-7$). Die im Wildtyp beobachtete signifikante Abnahme TUNEL-positiver Photorezeptoren in der dritten und vierten postnatalen Woche, verglichen zu Tag 12 (ANOVA, Tukey's-Test; $p < 0,01$) ist bei der CNGA3-defizienten Maus nicht zu erkennen (ANOVA, Tukey's-Test; $p > 0,05$).

Als weitere wichtige Beobachtung war zu erkennen, dass die meisten TUNEL-positiven Photorezeptoren bei der CNGA3-defizienten Maus während der Peak-Phase im oberen Drittel der Photorezeptorschicht lokalisierten. In der Literatur ist beschrieben, dass die Zellkerne Seh-Zapfen in der ausdifferenzierten Retina sich vorwiegend in der oberen Hälfte der ONL

befinden. 50 % der Zapfenkerne sind am oberen Rand der ONL lokalisiert (Carter-Dawson & LaVail 1979). Dies lässt vermuten, dass es sich bei den TUNEL-positiven Photorezeptoren um Zapfen handelt.

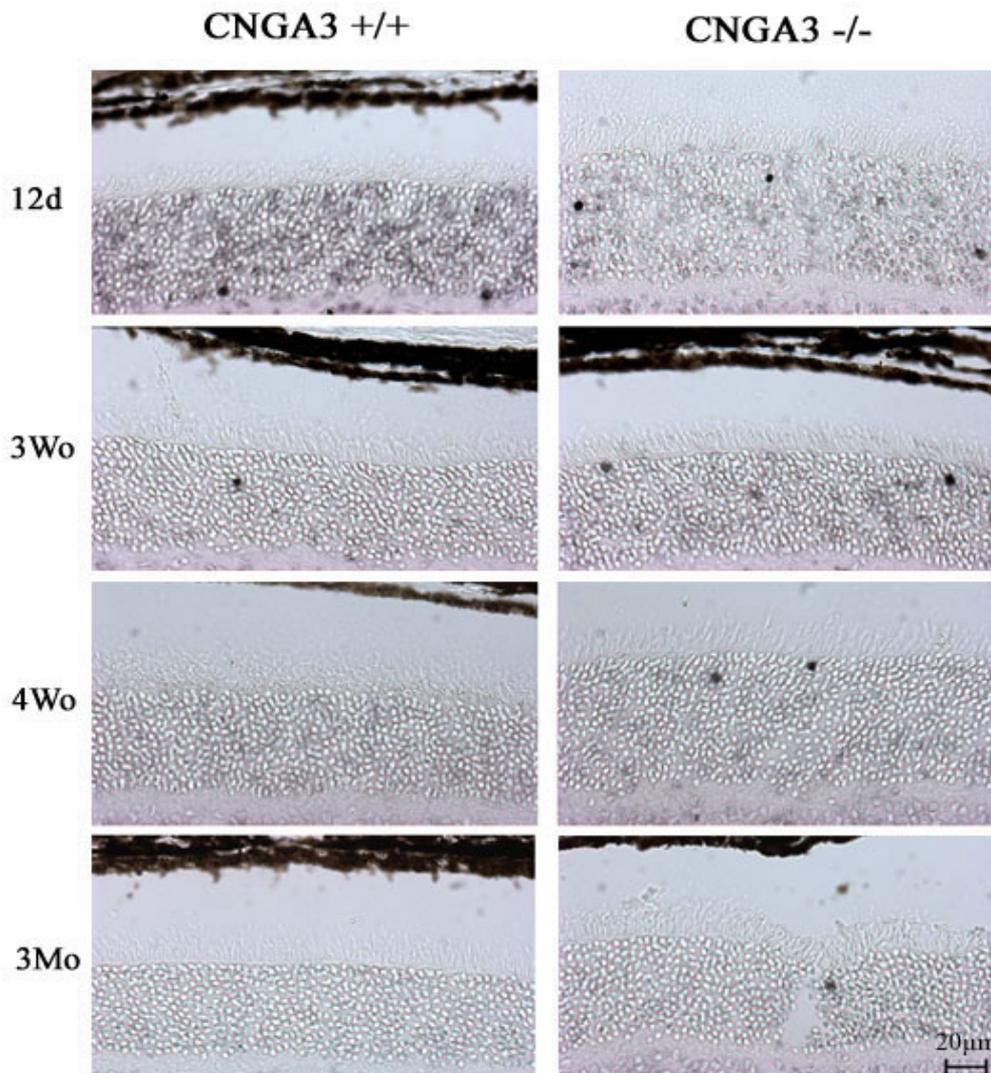


Abbildung 59

TUNEL-Histochemie. *TUNEL-Analyse der DNS-Fragmentation auf histologischen Kryoschnitten. Zeitverlauf bei CNGA3 +/+ (links) und CNGA3 -/- Mäusen (rechts).*

Da eine Fragmentierung von DNS auch bei der Nekrose nach Freisetzung lysosomaler DNAsen beobachtet werden kann (Ueda et al. 1995, Dong et al. 1997), sollten zur Identifizierung einer Apoptose weitere Experimente durchgeführt werden.

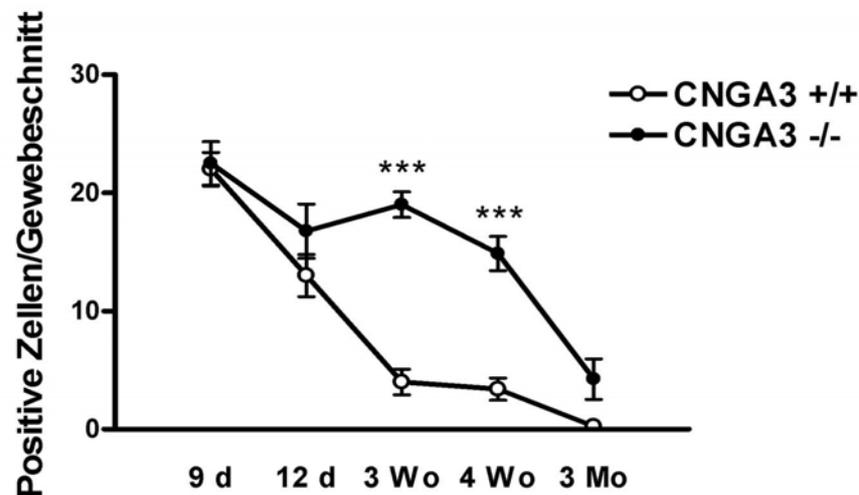


Abbildung 60

Quantitative TUNEL-Analyse. Quantifizierung der TUNEL-Positiven Photorezeptoren bei CNGA3 +/+ und CNGA3 -/- Mäusen (Mittelwert ± SEM; *** = $p < 0,001$; ANOVA, Tukey's-Test, $n = 4-7$).

3.5.1.2 Caspase 3 Aktivierung

Bei der Caspase 3 handelt sich um eine Effektor-Caspase welche, nach proteolytischer Aktivierung durch vorgeschaltete Initiator-Capsasen, elementare zelluläre Proteine abbaut und somit zum Tod der Zelle führt. Mit einem Antikörper welcher ausschließlich gegen die proteolytisch gespaltene und somit aktivierte Form der Caspase 3 gerichtet ist, können Zellen in denen eine Apoptose abläuft eindeutig identifiziert werden. Es wurde ein Antikörper aus Kaninchen verwendet, der gegen die 17 und 19 kD Untereinheiten gerichtet ist (Cell Signaling), welche durch eine Spaltung der Caspase 3 am Aspartat an Position 175 resultieren. Durch diesen Antikörper wird die unprozessierte Caspase 3 nicht erkannt. Die Detektion erfolgte über einen FITC-markierten Esel anti-Kaninchen Antikörper am LSM.

Mit diesem Antikörper konnten im Wildtyp apoptotische Zellen während der Ausdifferenzierungsphase (Tag 9 und Tag 12) der Retina detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese waren über die gesamte Retina verteilt. Die apoptotischen Zellen waren ab der dritten postnatalen Woche nicht mehr zu beobachten. In Abbildung 61 sind exemplarisch die Ergebnisse bei 3 und 4 Wochen alten Mäusen gezeigt. In der Retina CNGA3-defizienter Mäuse war zu diesen Zeitpunkten an denen die größte Dichte an TUNEL-positiven Zellen zu beobachten war (V.3.5.1.1), eine deutliche Aktivierung der Caspase 3 zu erkennen. Durch den Antikörper wurden vorwiegend Strukturen in der Schicht der Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren befinden markiert. Das Signal zeigte sich in Form von runden oder leicht länglichen (Vergrößerung in Abbildung 61) Strukturen. In älteren CNGA3 -/- Mäusen waren nur vereinzelt positive Photorezeptoren zu sehen.

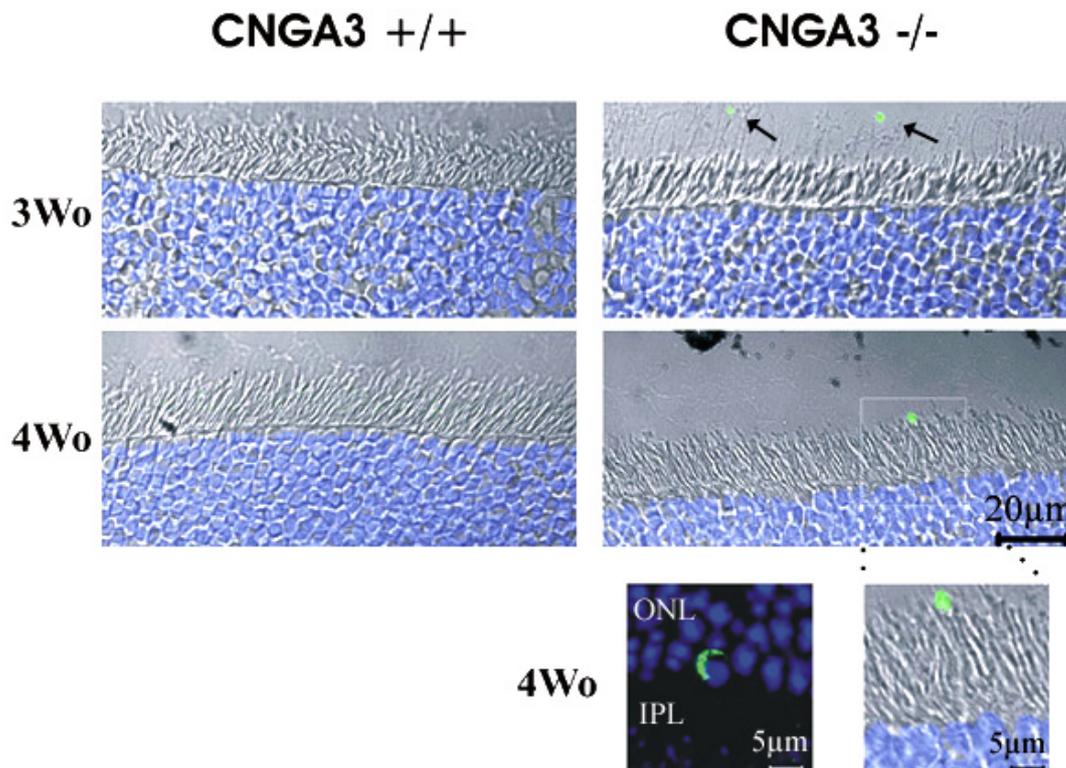


Abbildung 61

Immunhistochemischer Nachweis der Caspase3-Aktivierung. Darstellung der Immunreaktivität des gegen die aktivierte Caspase3 gerichteten Antikörpers auf Retinaschnitten von CNGA3 +/+ und CNGA3 -/- Mäusen. Bei 3-4 Wochen alten Mäusen waren nur in der Netzhaut der CNGA3-defizienten Mäuse Caspase3-positive Photorezeptoren zu sehen.

3.5.1.3 Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien

Die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien ins Zytosol stellt einen wichtigen Schritt in der Mitochondrien-abhängigen Aktivierung der Apoptose dar (Green & Reed 1998). Cytochrom c bindet nach Freisetzung an APAF-1 welches in der Lage ist dATP und Procaspase 9 zu binden, wodurch das sogenannte "Apoptosom" entsteht. Unter Verbrauch von ATP wird proteolytisch Caspase 9 freigesetzt und dadurch die Apoptose eingeleitet (Zhou et al. 1997).

Es wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Cytochrom c (BD Biosciences) verwendet um zu untersuchen ob die beobachtete Apoptose mit einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien einhergeht. Hierzu wurden Gewebeschnitte der Retina CNGA3-defizienter und Wildtyp Kontrollmäuse mit dem Antikörper inkubiert und dieser mit einem Alexa 488 markiertem Ziege anti-Maus Antikörper detektiert. Durch anschließende Konfokalmikroskopie (Argon-Laser Anregung) wurde die IHC ausgewertet. Bei 9 und 12 Tage alten Mäusen konnten unabhängig vom Genotyp, verteilt über die gesamte Retina, einzelne Cytochrom c-positive Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei adulten Wildtypmäusen konnte kein Signal für Cytochrom c detektiert werden. Interessanterweise waren bereits bei 12 Tage alten CNGA3 -/- Mäusen stark Cytochrom c-markierte Photorezeptoren zu erkennen. Das Signal war vorwiegend im Bereich der Außen- jedoch auch der Innensegmente zu beobachten (siehe Abbildung 62). Die Anzahl der markierten Photorezeptoren nahm in der dritten und vierten Lebenswoche zu, um anschließend wieder

abzunehmen. Zu keinem Zeitpunkt war eine derartige Markierung bei den CNGA3 $+/+$ Mäusen zu beobachten. In beiden Genotypen war ein schwaches Signal zu erkennen, welches bei der hier gewählten Belichtungszeit nicht zu erkennen ist, das dem Verteilungsmuster der Mitochondrien entsprach, diese sind in der Retina vorwiegend in den Innensegmenten der Photorezeptoren, der äußeren und inneren Plexiformen Schicht lokalisiert.

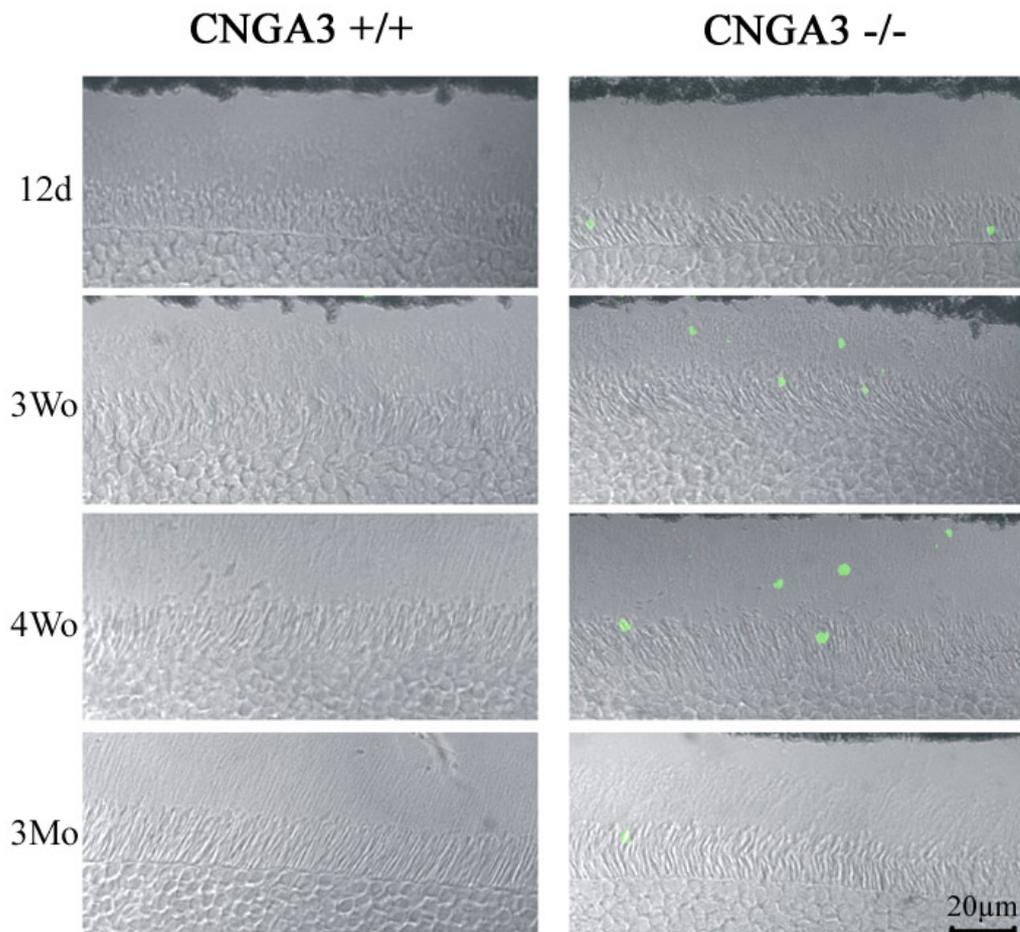


Abbildung 62

Cytochrom c-Immunhistochemie. Die Zeitreihe zeigt den Verlauf der Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien bei CNGA3-defizienten Mäusen. Nur bei den CNGA3 $-/-$ (rechts), jedoch nicht bei CNGA3 $+/+$ Mäusen (links) sind Cytochrom-IR-positive Strukturen im Bereich der Photorezeptoren zu erkennen.

3.5.2 Aktivierung von Müller-Gliazellen

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das saure Gliafaserprotein (Sigma), der direkt mit dem Fluorophor Cy3 markiert ist wurden Müller-Gliazellen auf Netzhaut-Kryoschnitten nachgewiesen. Das Signal in der Netzhaut der CNGA3 $+/+$ Maus ist im oberen Teil der Abbildung 63 zu sehen. Müller-Gliazellen sind dort sowohl im jungen als auch im adulten Alter ausschließlich in der Schicht der Nervenfasern zu erkennen, wo auch sehr viele versorgende Gefäße verlaufen. Erst in der Retina älterer Wildtypmäuse (deutlich bei 17 Monate alten), ist eine Induktion mancher Gliazellen in die innere plexiforme Schicht

erkennbar. Bei den CNA3-defizienten Mäusen ergibt sich ein ganz anderes Bild. Nachdem die Retina 9 Tage alter Tiere sich im GFAP-Signal nicht vom Wildtyp unterscheidet, sind schon bei 12 Tage alten Mäusen deutlich aktivierte Gliazellen zu erkennen. Diese bilden Ausläufer die sich in Richtung innere Retina bewegen. Bei 3 Wochen alten CNGA3 $-/-$ Mäusen ist eine massive Induktion von Müller-Gliazellen zu beobachten die sich bis zur 4 Lebenswoche weiterhin verstärkt. In der vierten postnatalen Woche ist ein Maximum dieses Phänomens zu erkennen. In der Retina CNGA3-defizienter Mäuse ist ab dem dritten postnatalen Monat zwar die Anzahl der GFAP-positiven Zellen leicht geringer, jedoch erkennt man die Zunahme der Stärke und der Länge der Gliafasern. Zu diesem Zeitpunkt sind etliche Müller-Gliazellen zu erkennen die bis ans obere Ende des ONL ragen und dort einzelne Kerne von Photorezeptoren ummanteln. Im unteren rechten Ausschnitt der Abbildung 63 ist dies bei einer 17 Monate alten CNGA3 $-/-$ Maus zu sehen. Die Lokalisierung am äußersten Ende des ONL lässt vermuten, dass es sich dabei um den Kern eines Zapfenphotoreptors handelt der von dem Ausläufer einer Gliazelle umschlossen ist. Bei sehr alten CNGA3 $-/-$ Mäusen (17Mo) ist an den Randgebieten der Retina (nahe der *ora serrata*) eine starke Gliose zu beobachten die alle Schichten der Netzhaut umfasst (Daten nicht gezeigt).

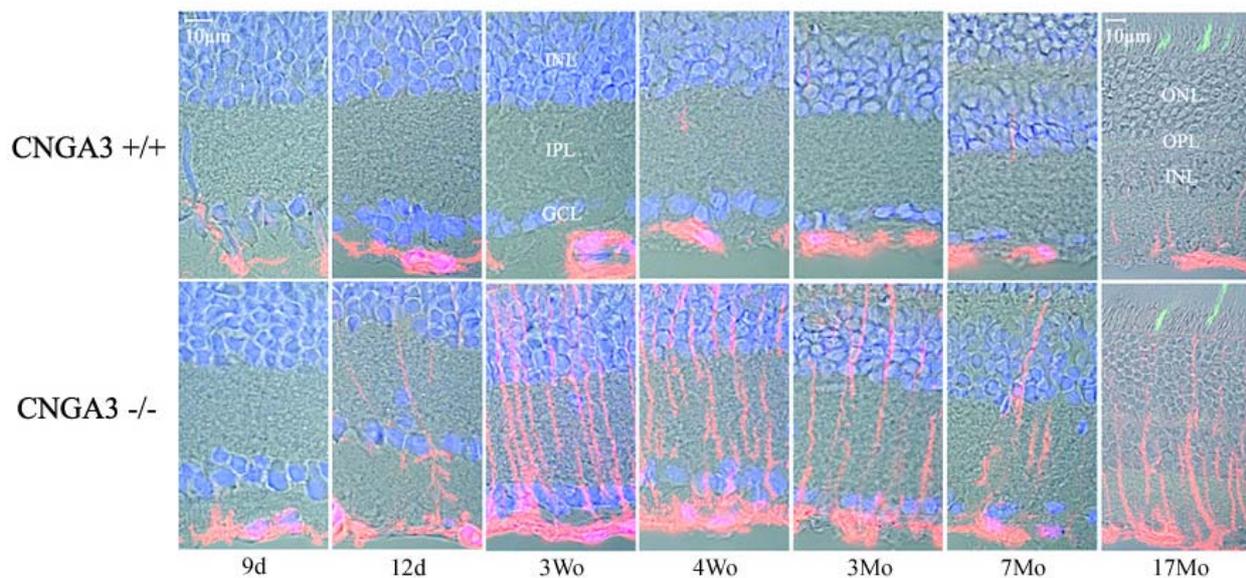


Abbildung 63

GFAP-Immunhistochemie. Immunhistochemische Darstellung der Aktivierung von Müller-Gliazellen in der Retina CNGA3-defizienter Mäuse. Schon bei 12 Tage alten CNGA3 $-/-$ Tieren ist deutlich die GFAP-positiven Gliazellen zu erkennen. Ein Aktivierungsmaximum ist bei 3 und 4 Wochen alten Mäusen zu sehen. Die Zellkerne sind mit Hoechst gegengefärbt; ganz rechts sind die Seh-Zapfen mit FITC-PNA markiert.

3.5.3 Neuron-spezifische Enolase

Die Enolase ist das Enzym, welches in der Glykolyse unter Abspaltung eines Wassermoleküls 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat umwandelt. In Neuronen und neuroendokrinen Zellen sind die $\alpha\gamma$ - und $\gamma\gamma$ -Isoformen exprimiert, welche auch als neuron-spezifische Enolase (NSE) bezeichnet werden (Marangos et al. 1978).

Ein Antikörper gegen die neuron-spezifische Enolase wurde als zapfenspezifischer Marker in der Mausretina verwendet, um das Migrationsverhalten der Seh-Zapfen während der Ausdifferenzierung der Netzhaut zu verfolgen (Rich et al. 1997). Vor allem im frühen Entwicklungsstadium der Retina werden diese stärker markiert als Seh-Stäbchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein polyklonaler NSE Antikörper (Biotrend) für immunhistochemische Experimente auf retinalen Gewebeschnitten verwendet. Nachgewiesen wurde dieser mit einem FITC-markierten Esel anti-Maus Zweitantikörper (Dianova) und am Konfokalmikroskop (Zeiss) visualisiert.

In einer Zeitreihe wurde zunächst das Augenmerk auf die Photorezeptoren gelegt. In Abbildung 64 sind exemplarisch die Ergebnisse dargestellt. Im linken Teil der Abbildung ist ein Ausschnitt der Photorezeptorschicht NSE gefärbter Retinapräparate von CNGA3 $+/+$ Mäusen. Wie erwartet sind bei 9 Tage alten Mäusen sowohl die Stäbchen, als auch die Seh-Zapfen markiert, wobei die Intensität der Färbung der Zapfen stärker erscheint. Die Netzhaut der 9 Tage alten CNGA3 $-/-$ Maus unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. Am zwölften postnatalen Tag ist bei Wildtyp Mäusen eine Abschwächung des Zapfensignals zu beobachten. Dieser Effekt verstärkt sich in der Netzhaut älterer CNGA3 $+/+$ Mäuse, wie im linken Teil der Abbildung 64 bei 3 Wochen, 3 Monate und 17 Monate alten Tieren zu erkennen ist. Zur Verdeutlichung ist hier jeweils eine Überlagerung mit der Erdnussagglutinin-Markierung der Zapfen gezeigt. Überraschenderweise ist schon in 12 Tage alten CNGA3 $-/-$ Retinae, eine Intensivierung des NSE-Signals in einigen Zapfen zu beobachten. Dieser Effekt wird umso stärker, je älter die Tiere werden. In den vergrößerten Ausschnitten in der Abbildung 64 ist dies deutlich zu erkennen. In der jeweiligen Überlagerung ist zusätzlich zu erkennen, dass nicht alle PNA-positiven Zapfen eine erhöhte NSE Immunreaktivität aufweisen. Diese Beobachtung ist, aufgrund der Tatsache, dass der NSE eine neuroprotektive Rolle zugesprochen wird von großem Interesse. Aus einem anderen Gesichtspunkt her, könnte dies jedoch auch bedeuten, dass die NSE als Marker sterbender Seh-Zapfen Verwendung finden kann.

In einem weiteren Experiment wurde der NSE-Antikörper gleichzeitig mit einem Antikörper gegen den Horizontalzellmarker Calbindin verwendet. Die NSE-IR wurde wie oben beschrieben detektiert, der monoklonale Calbindin-Antikörper mit einem Alexa 594-markierten Ziege anti-Maus Sekundärantikörper. Es wurde eine Zeitreihe angefertigt und am LSM detektiert.

Das Signal der beiden Antikörper im IPL wurde genauer untersucht. Wie zu erwarten war, konnte bei 9 Tage alten Wildtypen ein starkes NSE-Signal in den Zapfen-Synapsen beobachtet werden. Zusätzlich dazu konnte man ein Signal in Horizontalzellen sehen, wie anhand einer Überlagerung des grün dargestellten NSE-Signals und der rot dargestellten Calbindin-IR zu erkennen ist (Pfeile in Abbildung 65). Deutlich sind die Kontakte der Horizontalzellendriten mit den Zapfen-Synapsen als gelbe Punkte (Überlagerung der Einzelsignale) zu sehen. Die Betrachtung 9 Tage alter CNGA3 $-/-$ Präparate ergab keine Unterschiede.

In älteren Wildtyp Retinae konnten zwei Beobachtungen gemacht werden. Zum einen wurden durch den NSE Antikörper zusätzlich zu den Zapfen-Synapsen auch die Stäbchen-Synapsen gefärbt, zum anderen konnte kein hervorgehobenes NSE-Signal mehr in Horizontalzellen beobachtet werden. In der dorsalen Retina 4 Wochen alter CNGA3-defizienter Mäuse war die NSE-IR noch erhalten. In der ventralen Retina deutete sich ein Phänomen an das bei 3 Monate alten Tieren auch in der dorsalen Retina zu sehen war. Es war sowohl ein Verlust der NSE-IR in den Zapfen-Synapsen, als auch eine erneute Verstärkung der NSE-IR in Horizontalzellen zu beobachten. Dieses Phänomen war auch in älteren Mäusen zu sehen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 65 zusammengefasst.

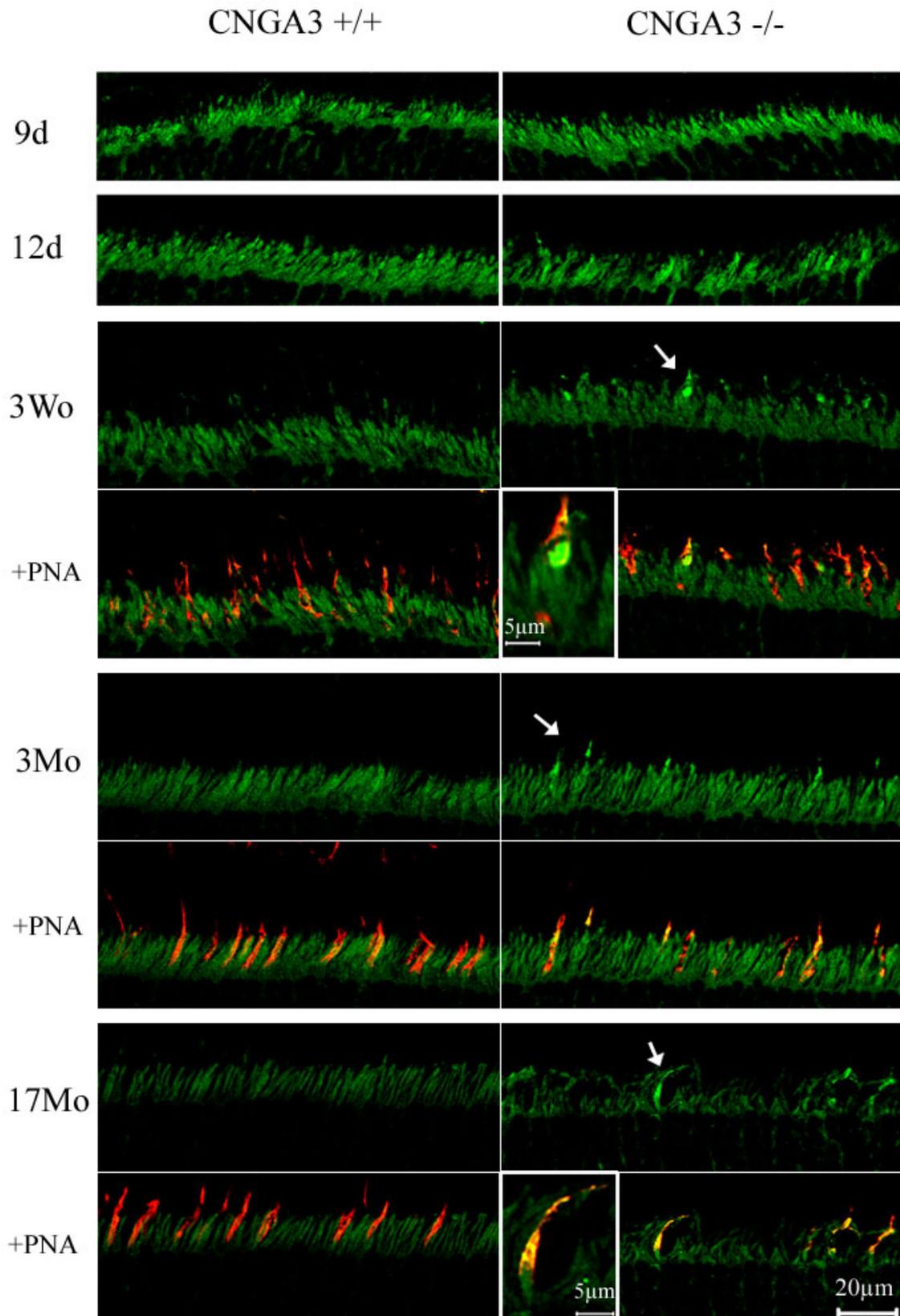


Abbildung 64

NSE-Immunhistochemie. Immunhistochemische Darstellung der Hochregulation der NSE (grün) in den Seh-Zapfen von CNGA3^{-/-} Mäusen. Ab der dritten postnatalen Woche ist in CNGA3^{+/+} Mäusen ausschließlich ein diffuses Signal in den Photorezeptoren zu sehen. Bei den CNGA3^{-/-} Mäusen hingegen ist deutlich die Induktion der NSE in einzelnen Photorezeptoren zu erkennen. Die Überlagerung mit PNA beweist, dass es sich dabei um Seh-Zapfen handelt.

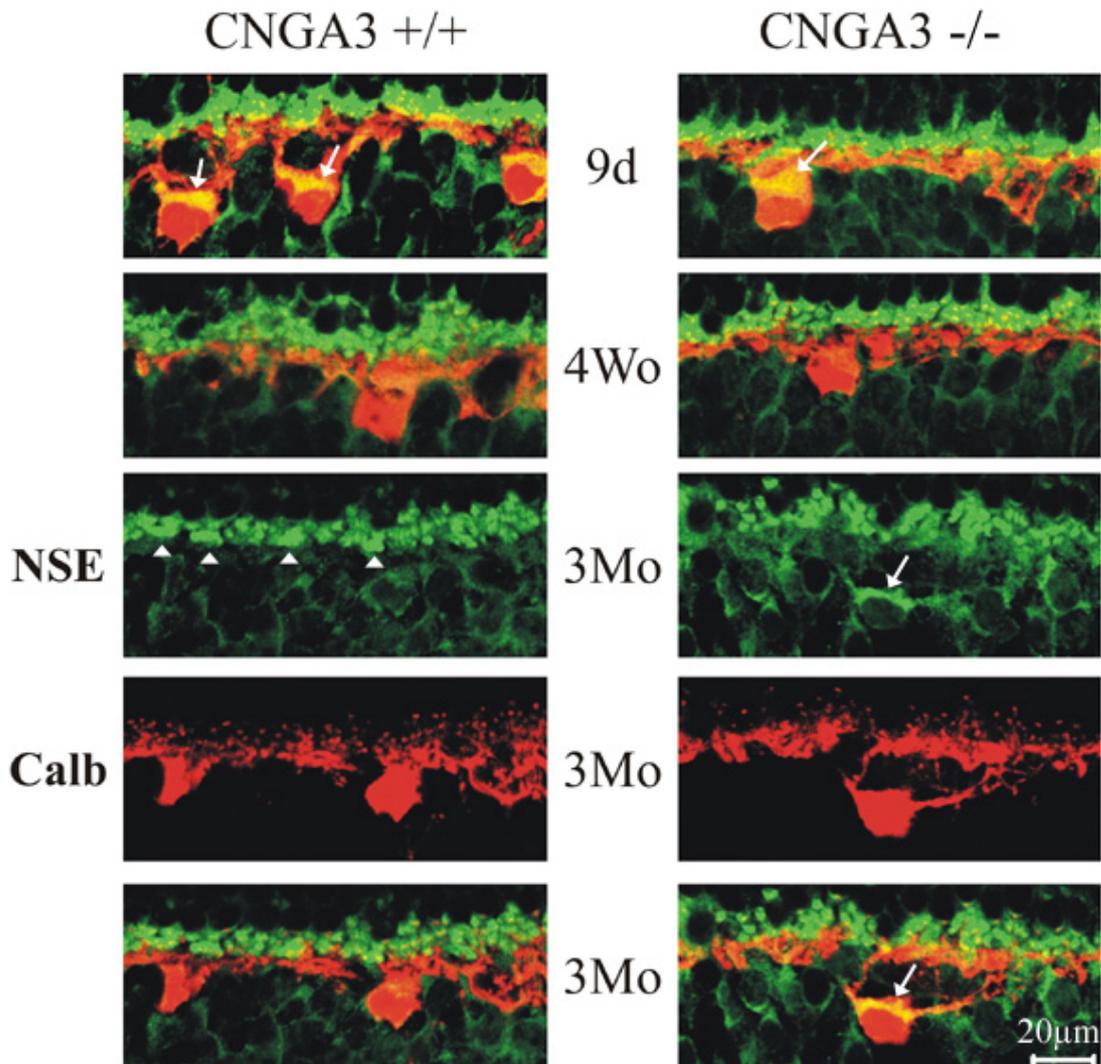


Abbildung 65

Immunohistochemischer Nachweis von NSE und Calbindin. Darstellung von NSE-positiven Strukturen (grün) in der Grenzregion zwischen den Photorezeptoren und den Neuronen zweiter Ordnung. Die Zapfen-Synapsen und in adulten Mäusen die Stäbchen-Synapsen werden im Wildtyp erkannt (links; die Pfeilspitzen zeigen auf die Zapfen-Synapsen, die durch ihre längliche Form deutlich von den Stäbchen-Synapsen zu unterscheiden sind). Zusätzlich ist bei 9 Tage alten CNGA3 +/+ Mäusen ein Signal in den Horizontalzellen zu sehen (Pfeil; Überlagerung mit der in rot dargestellten Calbindin-IR). Bei CNGA3 -/- Mäusen ist bis zu einem Alter von 4 Wochen in der dorsalen Retina kein Unterschied zu erkennen. Erst bei älteren Tieren zeigt sich ein Verlust der NSE-IR in den Zapfen-Synapsen. Zusätzlich ist ein deutlicher Anstieg der NSE-Expression in Horizontalzellen 3 Monate alter CNGA3-defizienter Mäuse zu beobachten (Pfeil).

3.6 Rasterelektronenmikroskopie

Um strukturelle Veränderungen genauer zu untersuchen, wurden Präparate aus der Retina CNGA3-defizienter Mäuse mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurde die Netzhaut isoliert und mit dem *freeze-fracture* Verfahren (IV.2.3.4) Fragmente hergestellt, in denen ein Querschnitt durch die Netzhaut zu erkennen war. Untersucht wurden adulte Tiere im Alter von 7 Wochen. Im allgemeinen konnten keine großen strukturellen Veränderungen

in den Präparaten aus *CNGA3* $-/-$ Mäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Bei genauerer Betrachtung konnte man einen Verlust einzelner Photorezeptoren beobachten. Dies ist in der Abbildung 66 exemplarisch dargestellt. Im Wildtyp war eine lückenlose Anordnung der Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht zu beobachten. Im Gegensatz dazu waren in der Retina *CNGA3*-defizienter Mäuse, sowohl im oberen Bereich des ONL als auch zwischen Photorezeptorinnensegmenten, einzelne Lücken zu erkennen. Die Lokalisierung der Lücken am oberen Rand der äußeren Körnerschicht lässt darauf schließen, dass es sich dabei um einen Verlust von Seh-Zapfen handelte.

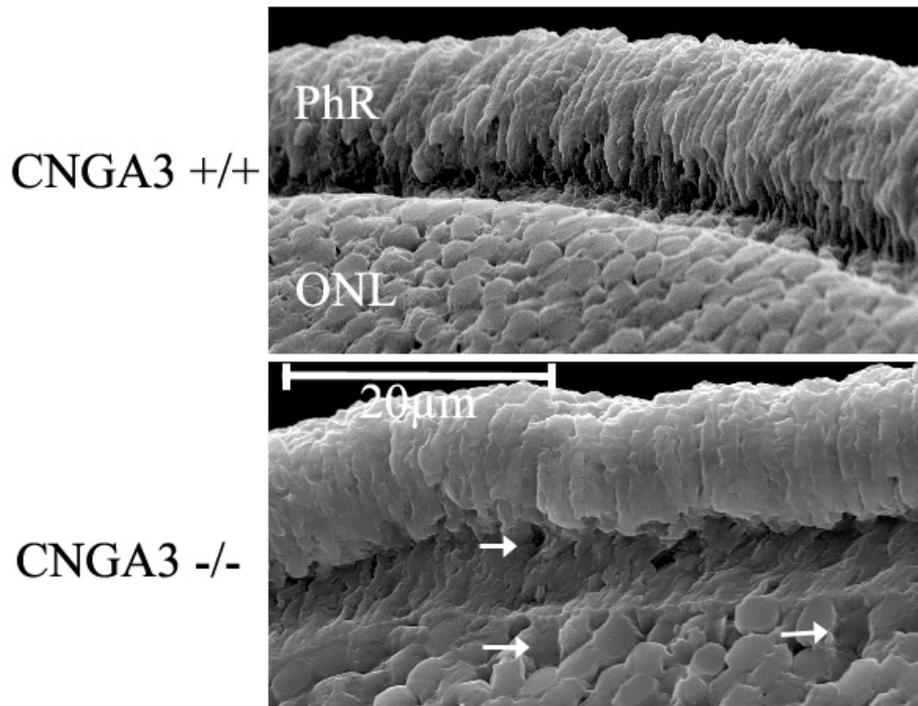


Abbildung 66

Rasterelektronenmikroskopie. Darstellung der Netzhaut anhand einer Fraktur. Bei der adulten *CNGA3* $-/-$ Maus sind vereinzelt Lücken in der ONL zu erkennen, die vermutlich durch den Verlust von Seh-Zapfen entstanden sind.

3.7 Die Seh-Stäbchen bei *CNGA3* $-/-$ Mäusen

Abschließend wurde das Stäbchen-System untersucht. Messungen des Stäbchen-Elektroretinogramms an dunkeladaptierten *CNGA3*-defizienten Mäusen ergaben, dass die Seh-Stäbchen in diesen Tieren voll funktionsfähig sind. Diese Beobachtung konnte sowohl in jungen (Biel et al. 1999) als auch in alten Mäusen gemacht werden (persönliche Mitteilung Dr. M. Seeliger, Augenklinik Universität Tübingen). Somit kann aus funktioneller Sicht eine Beeinträchtigung des skotopischen Systems ausgeschlossen werden. Auch durch immunhistochemische Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Veränderungen beobachtet werden. Immunfärbungen mit Antikörpern gegen Rhodopsin (dem

Stäbchen-Opisin) und die stäbchenspezifische retinale Guanylylzyklase GC-F ergaben in CNGA3 $-/-$ Mäusen ein ähnliches Signal wie in CNGA3 $+/+$ Mäusen (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 67 ist eine immunhistochemische Anfärbung der B-Untereinheit des Stäbchen-CNG-Kanals CNGB1 zu sehen. Gezeigt sind die Retinae 17 Monate alter Tiere. Zwar ist die Schicht der Photorezeptoraußensegmente bei der CNGA3 $-/-$ Maus nicht so organisiert aufgebaut wie die der Wildtypkontrolle, doch ist deutlich eine CNGB1-IR in den Stäbchen-Außensegmenten zu erkennen.

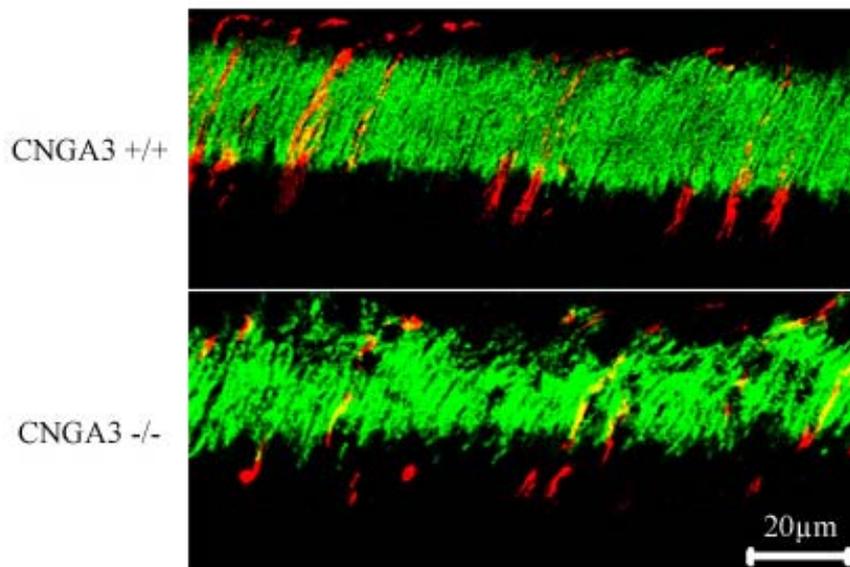


Abbildung 67

CNGB1-Immunhistochemie. Immunhistochemische Anfärbung aller Seh-Stäbchen mit einem CNGB1-Antikörper (grün). Mittels PNA-Färbung sind die Seh-Zapfen dargestellt (rot). Die Abbildung zeigt Retinaschnitte 17 Monate alter CNGA3 $+/+$ (oben) und CNGA3 $-/-$ Mäuse (unten). Das CNGB1-Signal ist bei alten CNGA3-defizienten Mäusen noch erhalten.

Diese Befunde stimmen mit Untersuchungen an Patienten überein die, unter X-Chromosomal-er Zapfen-Degeneration leiden. Selbst in hohem Alter zeigen diese Patienten eine normale Funktion der Seh-Stäbchen (To et al. 1998).

VI. Diskussion

1 Funktionen von CNGA3 in Regionen des ZNS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Untersuchungen an der CNGA3-defizienten Maus der Fragestellung zur Funktion von CNG-Kanälen im ZNS nachgegangen. Im Gegensatz zu der ausführlich charakterisierten Rolle der CNG-Kanäle in der Retina und dem olfaktorischen Epithel (Fesenko et al. 1985, Nakamura & Gold 1987) ist bisher wenig über die Funktion dieser Kanäle im ZNS bekannt. Es existieren zwar Untersuchungen, die eine Expression einzelner CNG-Kanäle im ZNS beschreiben (Kingston et al. 1996, Bradley et al. 1997, Kingston et al. 1999, Stijbos et al. 1999), doch wurden bisher noch nicht die gesamten bekannten CNG-Untereinheiten systematisch untersucht. Zudem sind die erhobenen Daten bezüglich der Expression von Komponenten des Stäbchen-CNG im ZNS widersprüchlich. Eine funktionelle Rolle konnte den CNG-Kanälen im ZNS bis jetzt nicht zugewiesen werden. Vermutet wird eine Beteiligung an der ZNS-Entwicklung und der synaptischen Plastizität (Zufall et al. 1997). Die funktionellen Untersuchungen beschränken sich auf zwei Publikationen. Parent et al. (1998) konnten mit Hilfe elektrophysiologischer Experimente eine Abnahme der LTP im Hippocampus CNGA2-defizienter Mäuse feststellen. Untersuchungen, die die Konsequenzen dieses Phänomens auf die physiologische Funktion dieser Gehirnregion aufzuklären, wurden jedoch nicht durchgeführt. Kuzmiski und MacVicar (2001) konnten zudem zeigen, dass CNG-Kanäle zum cholinergen Plateaupotential in hippocampalen CA1 Neuronen beisteuern. Experimente zur Aufklärung der Identität des verantwortlichen CNG-Kanals stehen noch aus.

1.1 Untersuchung der Expression von CNG-Kanälen im ZNS der Maus

Zunächst wurde systematisch die Expression aller CNG-Untereinheiten im ZNS der Maus untersucht. Dies erfolgte aus den folgenden zwei Gründen: Zum einen existierten bisher keine Daten bezüglich der Expression von Untereinheiten des Zapfen CNG-Kanals im ZNS. Zum anderen stammen alle Expressionsdaten zu den restlichen CNG-Kanälen bis auf eine Untersuchung von Parent et al. (1998) zu CNGA2 von der Ratte.

Mittels RT-PCR sollten CNG-Transkripte aus vier Gehirnregionen amplifiziert werden. CNGA1-Transkripte konnten unter den gewählten Bedingungen aus keiner der untersuchten Gehirnregionen amplifiziert werden. Dies widerspricht den Daten von Kingston et al. (1996), belegt jedoch die Ergebnisse von Bradley et al. (1997). Auch CNGA2-RNS wurde außer im olfaktorischen Bulbus nur in sehr geringen Mengen im Hippocampus der Maus gefunden. Diese Daten widersprechen teilweise den Ergebnissen von Kingston et al. (1996) und Bradley et al. (1997), die bei der Ratte eine Expression von CNGA2 auch im Cerebellum, sowie eine stärkere Expression im Hippocampus fanden. Dieser beobachtete Unterschied kann zum einen speziesbedingt sein, zum anderen aus den unterschiedlichen Versuchsbedingungen resultieren. Bei den Experimenten in dieser Arbeit wurden nur 30 PCR-Zyklen durchgeführt, im Gegensatz zu 35 in den oben erwähnten Berichten.

Überraschenderweise war CNGA3 die einzige CNGA-Untereinheit, die aus allen vier Gehirnregionen amplifiziert werden konnte. In der Amygdala, dem Cerebellum und dem Hippocampus war CNGA3 die am stärksten exprimierte CNGA-Untereinheit.

Die gleichzeitig durchgeführte Expressionsanalyse bei der CNGA3 $-/-$ Maus zeigte den erwarteten Verlust der CNGA3-RNS. Bis auf eine signifikante Reduktion des CNGA2-Signals im olfaktorischen Bulbus der CNGA3-defizienten Mäuse ergaben sich keine weiteren Unterschiede.

Die Expression von CNGA3 wurde mittels *in situ*-Hybridisierung weiter untersucht. Eine Detektion im ZNS war aufgrund der niedrigen Expressionsrate mittels klassischer

radioaktiver *in situ*-Hybridisierung nicht möglich. Erst unter Verwendung der hoch empfindlichen Methode der Tyramidamplifikation gelang es die CNGA3-RNS im Hippocampus der Maus zu visualisieren. Ein distinktes Signal in den Pyramidenzellen war zu erkennen, zusätzlich ein diffuses Signal in nahezu dem gesamten Hippocampus. Mit einem CNGA3-Antikörper konnte zudem eine schwache Expression des CNGA3-Proteins im Stratum pyramidale gezeigt werden.

Der erfolgte Nachweis von CNGA3 im Gehirn ermutigte uns mit der CNGA3-defizienten Maus als Modell der Frage nach der Funktion von CNG-Kanälen im ZNS weiter nachzugehen.

1.2 Die Rolle von CNGA3 bei der synaptischen Plastizität und dem räumlichen Lernen

Die ersten Experimente sollten die Frage klären, ob durch die Deletion von CNGA3 eine Beeinflussung der ZNS-Entwicklung erfolgte. An histologisch und immunhistologisch gefärbten Gehirnpräparaten CNGA3-defizienter Mäuse, konnte sowohl eine normale neuronale Struktur als auch eine normale Morphologie der Gliazellen gezeigt werden. Auch die elektrophysiologische Untersuchung der basalen synaptischen Transmission in der hippocampalen CA1-Region von CNGA3 $-/-$ Mäusen ergab keinerlei Auffälligkeiten. Somit fanden sich keine Hinweise für eine Rolle von CNGA3 in der neuronalen Entwicklung.

Weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen im Hippocampus zeigten jedoch Veränderungen bei den Deletionsmutanten. So wurde nach starker Tetanisierung in der CA1-Region eine signifikant erhöhte LTP im Vergleich zu Kontrollmäusen festgestellt. Diese Experimente wurden, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den genetischen Hintergrund auszuschließen, mit einem zweiten Mausstamm wiederholt. Die Befunde konnten dadurch bestätigt werden.

Um den Grund für die Erhöhung der LTP zu hinterfragen, wurde zusätzlich die LTD untersucht; ein Phänomen, das als physiologischer Gegenspieler der LTP betrachtet wird. PSD 95-defiziente Mäuse zeigten, ähnlich wie die CNGA3 $-/-$ Maus, eine signifikant erhöhte CA1-LTP (Migaud et al 1998). Interessanterweise konnte bei diesen Mäusen beobachtet werden, dass durch ein niederfrequentes Reizprotokoll keine LTD, sondern im Gegenteil dazu eine LTP induziert werden konnte. Die Untersuchung der CA1-LTD bei den CNGA3 $-/-$ Mäusen ergab jedoch keine derartige Auffälligkeiten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die beobachtete Erhöhung der LTP bei CNGA3-defizienten Mäusen auf LTP-spezifische Veränderungen zurückzuführen ist und nicht mit einer Entkopplung der LTD einhergeht.

Mit Hilfe räumlicher Lerntests sollten die Konsequenzen der erhöhten LTP auf die Funktion des Hippocampus untersucht werden. Als weit verbreitetes Testprinzip wurde das *water maze* verwendet. Die Untersuchungen mit den CNGA3-defizienten Mäusen ergaben bezüglich des räumlichen Lernverhaltens keine Unterschiede zu den Kontrollmäusen. Um dies weiter abzuklären wurde als zweiter räumlicher Lerntest eine kontextuelle Angstkonditionierung durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben ebenfalls keine Unterschiede. Somit konnte trotz Erhöhung der LTP im Hippocampus mit zwei unabhängigen Funktionstests keine Beeinträchtigung seiner physiologischen Funktion festgestellt werden. Ähnliche Beispiele sind auch für weitere transgene Mäuse beschrieben (siehe Einleitung III.2.3). Als Begründung kann in Betracht gezogen werden, dass die selektive Erhöhung der LTP durch den starken Tetanus sich nicht in den gewählten Tests widerspiegelt. Desweiteren kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass durch das visuelle Defizit eventuell doch eine verbesserte Lernleistung bei den CNGA3 $-/-$ Mäusen kaschiert wurde.

1.3 Verändertes Angstverhalten bei CNGA3-defizienten Mäusen

Da eine Expression von CNGA3-Transkripten auch in der Amygdala gezeigt wurde, sollte auch die Amygdalafunktion in einem Lerntest untersucht werden. Eine wichtige Rolle der

Amygdala in der Angstkonditionierung bei Nagern und beim Menschen ist hinreichend bewiesen (siehe Einleitung III.2.2.2). Die akustische Angstkonditionierung wurde deshalb als Modell gewählt, um die Amygdalafunktionen bei der CNGA3-defizienten Maus genauer zu untersuchen.

Nachdem in der kontextuellen Angstkonditionierung, bei der die Amygdala zusätzlich zum Hippocampus eine tragende Rolle spielt (Sanders et al. 2003), keine Unterschiede beobachtet wurden, überraschte es sehr, dass die CNGA3-defizienten Mäuse bei der akustischen Angstkonditionierung eine veränderte Reaktion zeigten. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen zeigten sie eine signifikant schlechtere akustische Angstkonditionierung. Der anschließend durchgeführte Sensitivierungstest bewies die Spezifität dieser Beobachtung. Das Ergebnis konnte jedoch nicht mit Mäusen auf dem sv129 Hintergrund bestätigt werden. Es konnten keine Rückschlüsse über das Angstverhalten der sv129 Mäuse gezogen werden, da schon die CNGA3 +/- Mäuse mit diesem genetischen Hintergrund nur eine schwache Konditionierung zeigten. Dieser Inzuchtstamm besitzt wie in verschiedenen Studien gezeigt, allgemein schlechtere Leistungen in einer Vielzahl von Verhaltensversuchen (eine Übersicht in Crawley et al. 1997).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erstmals eine Involvierung von CNG-Kanälen bei der Ausbildung der Angstreaktion, einer physiologischen Funktion der Amygdala, gezeigt werden konnte. Das beobachtete Phänomen des Verlusts der akustischen Konditionierung bei CNGA3-defizienten Mäusen ist äußerst interessant, da bisher wenig über die molekularen Mechanismen der Angstreaktion bekannt ist.

2 Die Neurodegeneration in der Retina nach Verlust der Zapfenfunktion

Bisher existiert noch keine detaillierte Analyse eines zapfenspezifischen Degenerationsmodells. Als einzige Modelle einer zapfenspezifischen Degeneration wurden zwei transgene Mauslinien beschrieben, in denen jeweils unter Kontrolle eines zapfenspezifischen Promotors ein Diphtherietoxin exprimiert wurde. Im ersten Fall wurde ein modifiziertes Diphtherie-Toxin-A (DT-A) Genkonstrukt unter Kontrolle des humanen Promotors für das langwellen-sensitive (LWS) Opsin exprimiert (Soucy et al. 1998). Schon am fünften postnatalen Tag war bei diesen Mäusen ein Verlust von Seh-Zapfen zu beobachten. Eine Beeinflussung der Seh-Stäbchen, Stäbchen-Bipolarzellen und Ganglienzellen wurde nicht festgestellt. Einschränkend sollte bemerkt werden, dass der verwendete humane Promotor für das LWS-Opsin das Transgen nicht in allen Seh-Zapfen exprimiert. Mit einer weiteren Mauslinie, die unter diesem Promotor das grün fluoreszierende Protein GFP exprimiert, konnte gezeigt werden, dass ausschließlich in der dorsalen Retina die Mehrzahl der Seh-Zapfen die grüne Fluoreszenz zeigte und somit das Transgen exprimierte (Fei & Hughes 2001). In der ventralen Retina dieser Mäuse enthielt nur ein Bruchteil der Zapfen das Transgen. Somit besitzt dieses Modell nicht die Voraussetzungen, um die Folgen eines globalen Seh-Zapfenverlusts zu untersuchen. Bei der zweiten Mauslinie wurde ebenfalls ein DT-A-Genkonstrukt verwendet, diesmal unter Kontrolle des Maus GNAT2 (Zapfen-Transducin)-Promotors, der eine Verstärkersequenz aus dem IBPR-Gen (Interphotoreceptor binding protein) enthielt (Ying et al. 2000). Bei diesen Mäusen wurde ein früher Verlust von $G_{\alpha 2}$ Boten-RNS und Protein beobachtet. Zusätzlich wurde ein massiver Verlust von Seh-Zapfen, jedoch auch von Seh-Stäbchen beschrieben, beginnend am postnatalen Tag 12. Das hohe Ausmaß der Schädigung lässt auf eine starke Mitbeeinflussung der Seh-Stäbchen schließen. Eine Expression des Diphtherietoxins ist sowohl in den Zapfen- als auch in den Seh-Stäbchen zu vermuten. Aufgrund der mangelnden Zapfenspezifität stellt diese Mauslinie kein geeignetes System dar, um zapfenspezifische Phänomene zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die degenerativen Veränderungen in der Netzhaut CNGA3-defizienter Mäuse untersucht werden, die einen Funktionsverlust aller Seh-Zapfen zeigen. Der Degenerationsprozess sollte im Detail auf molekularer Ebene beschrieben werden. Die gewählten Versuchsbedingungen sollten eine räumliche und zeitliche Lokalisierung der Veränderungen erlauben. Zunächst wurde das Augenmerk auf die Seh-Zapfen gelegt, welche als erste Veränderungen zeigen. Desweiteren wurde untersucht, inwiefern die innere Retina und die darin lokalisierten Neuronen zweiter Ordnung durch den Verlust der Zapfenfunktion beeinträchtigt wurden. Es existieren zwar Berichte, die den Verlust neuronaler Strukturen der inneren Retina nach Verlust der Photorezeptorfunktion beschreiben (Strettoi et al. 2003), jedoch handelt es sich dabei ausschließlich um Seh-Stäbchen-spezifische Degenerationsmodelle.

Letztlich sollte der Frage zum Mechanismus des Zelltods nachgegangen werden. Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden wurden Apoptose-spezifische Vorgänge in der Netzhaut CNGA3-defizienter Mäuse untersucht.

2.1 Molekulare Veränderungen in nicht funktionsfähigen Seh-Zapfen

Als erstes wurde der zeitliche und räumliche Verlauf des Zapfenverlusts untersucht. Die Markierung der Seh-Zapfen mit Erdnusslektin zeigte interessanterweise einen räumlich unterscheidbaren Verlauf der Degeneration. Der Zapfenverlust war im oberen Teil der Netzhaut weniger stark ausgeprägt als im unteren Teil. Da es sich bei der Maus um ein Bodentier handelt, stellt die ventrale Retina den wichtigeren Teil des Mausauges dar. Bei der rd-Maus, bei der es zu einem raschen Verlust der Seh-Stäbchen kommt, zeigt die sekundär auftretende Zapfendegeneration ein ähnliches räumliches Verteilungsmuster (Jimenez et al. 1996, Ogilvie et al. 1997). Dieses Phänomen lässt auf eine Progression der Zapfen-Degeneration durch die verstärkte Beanspruchung der ventralen Retina oder auf das Vorhandensein bestimmter neuroprotektiver Mechanismen in der dorsalen Retina schließen.

Auf molekularer Ebene konnte bei den CNGA3-defizienten Mäusen ein rasch eintretender Verlust wichtiger Elemente der Phototransduktionskaskade gezeigt werden. Für die zwei Zapfenopsine konnte ein früher Verlust des Proteins und eine Fehllokalisierung des noch vorhandenen Restproteins beobachtet werden. Interessanterweise konnte für das kurzwellenlängensensitive Opsin ein verspäteter Beginn der Expression in den Zapfen-Außensegmenten und ein stärkerer Verlust der Boten-RNS gezeigt werden.

Ähnlich wie beim SWS-Opsin konnte für das Zapfen-Transducin eine verzögerte Aktivierung der Proteinexpression und eine verringerte Expression beobachtet werden. Auch das Guanylylzyklase-aktivierende Protein GCAP1 und die retinale Guanylylzyklase GC-E konnte sehr früh schon bei CNGA3-defizienten Mäusen nicht mehr in den Seh-Zapfen nachgewiesen werden. Ausschließlich bei 9 Tage alten CNGA3^{-/-} Mäusen war eine GCAP1-IR in den Sehzapfen nachzuweisen, die GC-E dagegen war schon zu diesem Zeitpunkt nicht mehr in den Zapfen nachweisbar.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Proteinen konnte mittels Immunhistochemie eine Hochregulation der retinalen Phosphodiesterase in den Zapfen junger adulter CNGA3-defizienter Mäuse beobachtet werden. Bei älteren Mäusen wurde dagegen ein Verlust der PDE-IR beobachtet. Inwiefern dies eine Gegenregulation während der Zapfendegeneration darstellt, sollte in Zukunft durch weitere Versuche abgeklärt werden.

Der Zapfen CNG-Kanal wird, wie anfangs beschrieben aus drei CNGA3-Untereinheiten und einer CNGB3-Untereinheit gebildet. Eine wichtige Frage molekularer Natur betrifft die genauen Funktionen der einzelnen Untereinheiten. Patienten mit Mutationen in den Genen der CNGB-Untereinheiten CNGB1 bzw. CNGB3 entwickeln, genau wie Patienten mit Mutationen in den A-Untereinheiten, Retinitis Pigmentosa bzw. Stäbchen-Monochromatismus (Bareil et al. 2001, Kohl et al. 2000, Sundin et al. 2000). Zudem sind Patienten die unter

totaler Farbenblindheit leiden, die in Mutationen der Gene CNGA3 oder CNGB3 begründet ist, klinisch kaum voneinander zu unterscheiden (Eksandh et al. 2002). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass wie Zhong et al. (2003) zeigen konnten, die B-Untereinheit für die richtige Assemblierung und für den Transport des CNG-Kanals an die Zellmembran verantwortlich ist. Insgesamt lassen diese Berichte darauf schließen, dass die Funktion der B-Untereinheiten von essentieller Bedeutung für die Ausbildung eines funktionsfähigen CNG-Kanals ist.

Bei der CNGA3-defizienten Maus war immunhistochemisch ein früher Verlust der CNGB3-IR in den Zapfen zu beobachten. Dieser frühe Verlust des CNGB3-Proteins könnte durch die Degeneration der Zapfen bedingt sein. Falls die fehlende CNGA-Untereinheit für den Transport des CNGB3-Proteins an die Zellmembran notwendig ist, wäre vorstellbar, dass durch den ausbleibenden Transport an die Membran eine rasche Eliminierung des Proteins erfolgt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine unerwartete Persistenz von Seh-Zapfen in der dorsalen Netzhaut der CNGA3-defizienten Maus beobachtet werden konnte. Interessanterweise war die Transkription wichtiger Gene der Sehkaskade der Zapfen, ausgenommen des SWS-Opsins, bei 3 Monate alten CNGA3 $-/-$ Mäusen auf Niveau der Wildtypkontrolle erhalten. Erst bei 12 Monate alten Tieren wurde für alle untersuchten Transkripte ein Verlust der Expression festgestellt. Dies lässt darauf schließen, dass erst spät eine ausreichende Anzahl an Zellkernen geschädigt wird. Dagegen war auf Proteinebene bei CNGA3-defizienten Mäusen sehr früh tiefgreifende Veränderungen erkennbar. Für alle untersuchten Proteine, mit Ausnahme der Phosphodiesterase, konnte schon vor der zweiten postnatalen Woche eine Erniedrigung der Immunreaktivität in den Außensegmenten der Seh-Zapfen beobachtet werden. Die vielfältigen Veränderungen auf molekularer Ebene lassen auf komplexe Vorgänge schließen, die letztlich zum Untergang der Seh-Zapfen führen.

2.2 Konsequenzen des Verlustes von CNGA3 für die innere Netzhaut

Durch Verlust des CNG-Kanals in den Seh-Zapfen verlieren diese auch die Fähigkeit, über ihre Synapsen die nachgeschalteten Neuronen zu stimulieren. Nun stellte sich die Frage, was die Konsequenzen dieses Zustands für die nachgeschalteten Neuronen der inneren Retina sind.

Mittels Erdnusslektin-Histochemie konnte gezeigt werden, dass die Zapfen-Synapsen in der dorsalen Retina CNGA3-defizienter Mäuse bis in ein spätes Alter als PNA-positive Strukturen erhalten bleiben. Im Gegensatz dazu verlieren die Zapfen-Synapsen in der ventralen Retina das PNA-Signal zu einem früheren Stadium. In Zapfen- und Stäbchen-Synapsen von CNGA3 $+/+$ Mäusen konnte zudem mit einem NSE-Antikörper eine Immunreaktivität auf die Neuron-spezifische Enolase festgestellt werden. Interessanterweise war bei alten CNGA3 $-/-$ Mäusen ein selektiver Verlust der NSE-IR in den Zapfen-Synapsen zu sehen.

In Untersuchungen der Horizontalzellen konnte erstmalig bei einem Zapfendegenerationsmodell ein *neuronal sprouting* beobachtet werden. In der ausdifferenzierten Retina CNGA3-defizienter Mäuse konnte gezeigt werden, dass Horizontalzellen auf den Verlust des "Zapfeninputs" mit einer Aktivierung von Zellausläufern reagieren, die sich in Richtung der Photorezeptoren bewegen. Das *sprouting* von Neuronen ist ein Phänomen, das außer in der Ausdifferenzierungsphase auch in pathologischen Zuständen (z.B. nach einer Epilepsie) beobachtet werden kann. Die genaue funktionelle Bedeutung dieses Vorgangs bleibt noch zu klären. Interessanterweise konnte in den Horizontalzellen adulter CNGA3-defizienter Mäuse eine Erhöhung der NSE-IR beobachtet werden. Die genaue Bedeutung dieser NSE-Hochregulierung kann nicht vorausgesagt werden, doch könnte dies ein Anhaltspunkt für einen erhöhten Zellstoffwechsel und von erhöhtem zellulären Stress sein.

Als weitere Klasse von Neuronen der inneren Retina wurden die Zapfen-ON-Bipolarzellen untersucht. Diese können neben Stäbchen-Bipolarzellen durch einen Antikörper gegen das G-Protein Go_α detektiert werden. Ein teilweiser Verlust der Go_α -IR bei 3 Monate alten CNGA3-defizienten Mäusen war zu beobachten. Zusätzlich zu dem Verlust des Go_α -Signals in der Zellmembran konnte eine Atrophie von Go_α -positiven Dendriten beobachtet werden. Die Neuronen, in denen diese Veränderungen zu beobachten sind, stellen vermutlich Zapfen-ON-Bipolarzellen dar. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei um Stäbchen-Bipolarzellen handelt, ist gering, da diese keine Kontakte zu Seh-Zapfen ausbilden und die Seh-Stäbchen voll funktionsfähig sind.

Studien, die Veränderungen in der inneren Retina nach Störung der Photorezeptorfunktion beschreiben, waren bisher auf Degenerationsmodelle mit einer primären Störung der Seh-Stäbchen beschränkt. Veränderungen in Neuronen zweiter Ordnung bei der rd-Maus sind erstmals von Strettoi et al. (2000) beschrieben worden. Die Autoren konnten, ähnlich den hier beschriebenen Ergebnissen, entsprechende Veränderungen zeigen, jedoch in Neuronen die den Seh-Stäbchen nachgeschaltet sind. So war ein Verlust von Stäbchen-Bipolarzellen und deren Dendriten, aber auch ein *neuronal sprouting* der Horizontalzellen zu erkennen. Das *sprouting* zeigte sich jedoch nicht in Form von Ausläufern in die Schicht der Photorezeptoren, sondern als Ausläufer, die in den INL ausstrahlten oder sich entlang dem OPL ausbreiteten (Strettoi et al. 2002). Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten dadurch bedingt sein, dass Stäbchen-Synapsen Kontakte mit den Axonen der Horizontalzellen ausbilden, die Zapfen-Synapsen dagegen mit den zahlreichen Dendriten dieser Neurone.

Die Untersuchungen von Zapfendegenerationsmodellen waren bisher auf das oben erwähnte LWS-DT-A-Zapfendegenerationsmodell (Soucy et al. 1998) beschränkt. Der Zapfen-Signalweg wurde bei diesen Mäusen zwar untersucht, jedoch ergaben sich keine Unterschiede. Auch an den Horizontalzellen wurden keine Veränderungen beschrieben. So wurde in einer Studie, die das Ziel hatte, die Horizontalzellanzahl dieser LWS-DT-A-Mäuse zu bestimmen, keine Abnahme festgestellt (Raven et al. 2003). Diese Beobachtungen könnten mehrere Gründe haben. Zum einen wurde für die Identifizierung der Zapfen-Bipolarzellen nur ein Antikörper gegen Recoverin verwendet, der in der Mausretina nur einen Subtyp von Zapfen-OFF-Bipolarzellen markiert (Haverkamp et al. 2003). Zum anderen sollte man auch für die Veränderungen der inneren Retina in Betracht ziehen, dass der verwendete humane Promotor für das LWS-Opisin das Transgen nur in den Seh-Zapfen im dorsalen Teil der Retina exprimiert. Eine dramatische Abnahme der Horizontalzellendichte sollte zudem erst bei erhöhtem Alter zu erwarten sein.

2.3 Mechanismus des Zelltods CNGA3-defizienter Seh-Zapfen

2.3.1 Apoptose

Mit einer TUNEL-Analyse konnte eine DNS-Fragmentierung in den Kernen der Photorezeptoren CNGA3-defizienter Mäuse gezeigt werden. Im Gegensatz zum Wildtyp konnte in der dritten bis vierten postnatalen Woche eine erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen im ONL beobachtet werden. Ein Nachweis der DNS-Fragmentierung allein reicht jedoch als Beweis für eine Apoptose nicht aus. Als spezifischer Nachweis sollte eine immunhistochemische Detektion der aktivierten Caspase 3 erfolgen. Bei 3 bis 4 Wochen alten CNGA3^{-/-} Mäusen konnte damit eine verstärkte Caspase 3-Aktivierung gezeigt werden. Die Immunreaktivität wurde in der Region der Photorezeptorausensegmente, vermutlich der Seh-Zapfen, beobachtet. Als weiterer Beweis einer Apoptose konnte die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien gezeigt werden. Dies erlaubt zusätzlich den Schluss auf die Beteiligung der Mitochondrien bei der beobachteten Apoptose.

Der Nachweis eines apoptose-vermittelten Zelltods in den Photorezeptoren der CNGA3 -/- Maus stimmt mit Berichten zu weiteren Modellen degenerativer Netzhauterkrankungen überein (Travis 1998).

2.3.2 Die Aktivierung von Müller-Gliazellen

Müller-Gliazellen sind in der gesunden Nager-Retina ohne spezifische Färbemethoden nicht erkennbar. Feine Gliafasern durchziehen die gesamte Netzhaut oder ziehen entlang der Neurofilamentschicht unterhalb der Ganglienzellschicht lokalisiert und umschließen dort Blutgefäße. Man postuliert, dass sie als Makrophagen fungieren, die bei Zellschädigung in die betroffene Region migrieren und Zelltrümmer phagozytieren (Thanos et al. 1996).

Bereits in der Netzhaut 12 Tage alter CNGA3 -/- Mäuse konnte eine beginnende Aktivierung der Müller-Gliazellen beobachtet werden. So konnte verstärkt induzierte Gliafasern beobachtet werden, die von der Neurofilamentschicht in die äußere Netzhaut ziehen. Dieses Phänomen zeigte ein Maximum bei 3 bis 4 Wochen alten Mäusen. Bei älteren CNGA3-defizienten Mäusen konnte eine Abnahme der Anzahl, gleichzeitig jedoch eine Zunahme des Durchmessers der Gliafasern beobachtet werden.

Bei diversen Degenerationsmodellen der Netzhaut ist ebenfalls eine Aktivierung von Müller-Gliazellen beschrieben worden (Tso et al. 1994, Gupta et al. 2003). Die funktionelle Bedeutung dieses Phänomens ist noch nicht aufgeklärt. Zusätzlich zu der Funktion als Makrophagen wurden für Müller-Gliazellen weitere zellprotektive sowie zellschädigende Funktionen postuliert (Thanos et al. 1996).

2.3.3 Die neuron-spezifische Enolase als früher Marker degenerierender Seh-Zapfen

Neben der Funktion in der Glykolyse werden für die Enolasen verschiedene weitere Funktionen postuliert (eine Übersicht in Pancholi 2001). Die Enolase wird zudem als unspezifischer Marker bei einer Vielzahl von Tumorarten verwendet (Kaiser et al. 1989). Aufgrund der Fähigkeit, Plasminogen zu binden (Miles et al. 1991, Nakajima et al. 1994), wird der Enolase ein tumor- und metastasefördernder Effekt angedacht. Ein erhöhter NSE-Serumspiegel gilt zudem als früher Marker einer neuronalen Degeneration (Hatfield & McKernan 1992). Erhöhte NSE-Spiegel im Serum oder der Zerebrospinal-flüssigkeit können nach hypoxischer Gehirnschädigung (Schoerhuber et al. 1999), beim Morbus Alzheimer (Cutler et al. 1986) oder bei der Epilepsie (Schmitt & Bandtlow 1996) beobachtet werden. Für die NSE wird zusätzlich eine Funktion als neuroprotektiver Faktor sowohl im ZNS (Takei et al. 1991, Hattori et al. 1994) als auch in der Retina (Li et al. 1995) postuliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine spezifische Erhöhung der NSE-Immunreaktivität in einer Subpopulation der Seh-Zapfen CNGA3-defizienter Mäuse beobachtet werden. Bei älteren Tieren zeigte sich, dass sämtliche noch vorhandene Zapfen ein starkes NSE-Signal aufwiesen. Diese Beobachtung, in Verbindung mit Berichten über einen neuroprotektiven Effekt der Enolase, lassen den interessanten Schluss zu, dass die NSE mit einem zellprotektiven Effekt in Verbindung stehen könnte, der für die Persistenz der Seh-Zapfen in der dorsalen Retina alter CNGA3-defizienter Mäuse verantwortlich ist. Zusätzlich könnte man in Betracht ziehen, die NSE als frühen Marker degenerierender Seh-Zapfen einzusetzen.

VII. Zusammenfassung

CNG-Kanäle sind elementare Bestandteile der Seh- und Riechkaskade. Es existieren sechs verschiedene Gene, die für unterschiedliche CNG-Untereinheiten kodieren. CNGA1 und CNGB1 bilden den Stäbchen-CNG-Kanal, CNGA3 und CNGB3 den CNG-Kanal der Seh-Zapfen. Der olfaktorische CNG-Kanal wird aus den Untereinheiten CNGA2 und CNGA4 sowie der CNGB1-Untereinheit, welche auch am Stäbchen-Kanal beteiligt ist, gebildet.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Expression und die Funktion von CNG-Kanälen im ZNS untersucht werden. Dies wurde mittels RT-PCR aus vier Gehirnregionen der Maus durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass CNGA3 in der Amygdala, dem Cerebellum und dem Hippocampus die am stärksten exprimierte CNGA-Untereinheit war. Die Arbeit konzentrierte sich anschließend auf die Untereinheit CNGA3. Diese konnte mittels *in situ*-Hybridisierung und immunhistochemisch im Hippocampus der Maus nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob CNGA3 eine funktionelle Rolle im Hippocampus der Maus besitzt, wurde die synaptische Plastizität in der CA1-Region des Hippocampus CNGA3-defizienter Mäuse untersucht. Interessanterweise konnte bei CNGA3 $-/-$ Mäusen eine signifikant erhöhte Langzeit-potenzierung bei normal erhaltener Langzeitdepression beobachtet werden.

Mit zwei unabhängigen Lernversuchen wurde untersucht, ob dieser Befund Auswirkungen auf die Funktion des Hippocampus für das räumliche Lernvermögen dieser Mäuse besitzt. Die Leistungsfähigkeit sowohl bei einem water-maze Versuch als auch bei der kontextuellen Angstkonditionierung zeigte sich jedoch durch die Deletion von CNGA3 nicht beeinträchtigt.

Da CNGA3 auch in der Amygdala nachgewiesen werden konnte, wurden die CNGA3 $-/-$ Mäuse auf eine Beeinträchtigung der physiologischen Funktion dieser Gehirnregion getestet. Zu diesem Zweck wurde eine akustische Angstkonditionierung durchgeführt. Bei diesem klassischen Test der Amygdalafunktion zeigten die CNGA3-defizienten Mäuse überraschenderweise ein signifikant weniger stark ausgeprägtes Angstverhalten. Detailliertere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Funktion von CNG-Kanälen in der Amygdala aufzuklären.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die in der Retina CNGA3-defizienter Mäuse beobachtete neuronale Degeneration untersucht. Die durchgeführten Experimente erlaubten es, molekulare Veränderungen in räumlicher und zeitlicher Auflösung zu beschreiben. Interessanterweise konnte im oberen Teil der Netzhaut ein verlangsamter Verlauf der Zapfendegeneration beobachtet werden. Selbst bei über 1 Jahr alten CNGA3-defizienten Mäusen war in der oberen Retina eine Persistenz von etwa 50 % der Seh-Zapfen zu beobachten. Dagegen trat der Verlust von Seh-Zapfen in der unteren Retina viel früher ein.

Auf molekularer Ebene zeigte sich schon während der ersten Wochen der postnatalen Entwicklung ein starker Verlust elementarer Proteine der Phototransduktionskaskade. So war für die zwei Zapfen-Opsine der Maus ein früher Verlust der Immunreaktivität in den Zapfen-Außensegmenten zu beobachten. Zusätzlich wies das verbliebene Protein eine veränderte Lokalisierung auf. Für CNGB3, der zweiten Untereinheit des Zapfen CNG-Kanals, wie für fast alle untersuchten Komponenten der Sehkaskade der Zapfen, zeigte sich ein früher Verlust der Immunreaktivität ohne Beeinflussung der Transkription. Die Ausnahmen stellten das SWS-Opisin und die Phosphodiesterase dar, bei ersten zeigte sich schon bei 3 Monate alten Mäusen eine Herunterregulation der Boten-RNS, die Phosphodiesterase wies zumindest bei jungen CNGA3 $-/-$ Mäusen eine erhöhte Immunreaktivität auf.

Zusätzlich zu den Veränderungen in den Photorezeptoren konnten subtile Veränderungen in der inneren Netzhaut der CNGA3 $-/-$ Mäuse gezeigt werden. Zum einen entwickelten die Horizontalzellen neuronale Ausläufer, die in die äußere Körnerschicht hineinwuchsen. Zum anderen wurde ein Verlust der Immunreaktivität für das G-Protein Go_{α} in ON-Bipolarzellen CNGA3-defizienter Mäuse festgestellt.

Als Mechanismus, der zum Zelltod von Photorezeptoren in CNGA3 ^{-/-} Mäusen führt, wurde die Apoptose ausgemacht. Der Nachweis erfolgte durch die Kombination mehrerer Methoden. So wurde zunächst eine TUNEL-Analyse durchgeführt, die eine erhöhte DNS-Fragmentation mit einem Maximum zwischen der dritten und vierten postnatalen Woche ergab. Im gleichen Zeitraum konnte ebenfalls eine Aktivierung der Caspase 3 und eine Freisetzung von Cytochrom c beobachtet werden. Das Ausmaß und der Beginn des degenerativen Prozesses in der CNGA3 ^{-/-} Retina wurde durch den Nachweis einer sehr frühen und starken Aktivierung von Müller-Gliazellen deutlich. Als zusätzliche Beobachtung konnte eine Erhöhung der neuron-spezifischen Enolase in den Seh-Zapfen der CNGA3-defizienten Maus gezeigt werden. Inwiefern dies einen zellprotektiven oder zellschädigenden Effekt darstellt, bleibt noch zu klären.

Letztlich wurde durch Untersuchungen der Seh-Stäbchen bei der CNGA3-defizienten Maus auf molekularer Ebene bestätigt, dass das skotopische System nicht durch den Verlust der Zapfenfunktion beeinträchtigt wurde.

VIII. Anhang

1 Primer

Name	Gen	5'- Sequenz -3'	Produkt	Quelle
CNG6ISHfor	mCNGB3	GCAGCAACAGCCAATCAGAACTAC	415 bp	Gerstner et al. 2000
CNG280rev	mCNGB3	TCAGAGTAACCAGAACTTGAGCA		Gerstner et al. 2000
QG-197	mHPRT	GTAATGATCAGTCAACGGGGGAC	177 bp	
QG-198	mHPRT	CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA		
mCNG1ex8for	mCNGA1	CTCCAGTCTGATTACCTAGAATAC	222 bp	
mCNG1ex9rev	mCNGA1	CCACCCAAACTTGATGTACAGC		
mCNG2ex2/3for	mCNGA2	GTTGGCAGAGATGGATACTCC	271 bp	
mCNG2ex4rev	mCNGA2	ACGGTAATACCAGTCTCCAGC		
mCNG3st for	mCNGA3	GCTACAATCAGAGCACCTGAC	223 bp	
mCNG3ex9rev	mCNGA3	CACGCCAACTTTAAATAAGCC		
mCNG5-1for	mCNGA4	GTGGCTGCCAGTCTAGACCCAT	297 bp	
mCNG5-1rev	mCNGA4	GGACGCCAGGTCCAACAGGAAGC		
mCOSfor		GATTCTGGTGAACCTGGCAG	537 bp	
mCOSrev		ATGCGTGTCACCTCCTTCT		
mCG7F	mCNGA3	TGCACGACTCTCCCGGAAGTACA	284 bp	Biel et al. 1999
mCG8R	mCNGA3	ACCGGATAACCCGAGTCTCCAAG		Biel et al. 1999
mCG19F	mCNGA3	CTTAGGTTTCCTTGAGGCAAGG	320 bp	Biel et al. 1999
NeoPA	Neomycin	GCCTGCTCTTACTGAAGGCTCT		Biel et al. 1999
mGat2for	mGNAT2	ATCAGAGCCATGTCCACACT	451 bp	
mGat2rev	mGNAT2	ACCAGCACCATGTCGTAGG		
mOSfor		ACGCTACGTTGTCATCTGTA	505 bp	
mOSrev		GTTGTAGACACAGGAGCTCT		
mPDE6cfor	mPDE6c'	GAGAACAGCAGACCTGTACG	579 bp	
mPDE6crev	mPDE6c'	ATCTGCTCGCAGGTATCAAC		
PH31F	mCNGB1	CCAAGAAGGCCCCAGAACCAGA	358 bp	Hüttl et al. unpublizierte Daten
PH33R	mCNGB1	ATGATGTCCCCGCCTTTGACA		Hüttl et al. unpublizierte Daten

2 PCR-Bedingungen

PCR	Primerpaar	Ausgangsmaterial	Zyklusanzahl und Primeranlagerung
Genotypisierungs-PCR: CNGA3	mCG7F/mCG8R	genomische DNS, 0,25 µl (0,5 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	10x 65 °C, 30sec 30x 55 °C, 30sec
Genotypisierungs-PCR: Neomycin	mCG19F/NeoPA	genomische DNS, 2,5 µl (5 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	10x 65 °C, 30sec 30x 55 °C, 30sec
CNGA1	mCNG1ex8for/ mCNG1ex9rev	Boten-RNS aus Mausgehirn, 2 µl (4 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	10x 67 °C, 30sec 30x 57 °C, 30sec
CNGA2	mCNG2ex2/3for/ mCNG2ex4rev	Boten-RNS aus Mausgehirn, 2 µl (4 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	10x 67 °C, 30sec 30x 57 °C, 30sec
CNGA3	mCNG3st for/ mCNG3ex9rev	Boten-RNS aus Mausgehirn, 2 µl (4 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	10x 67 °C, 30sec 30x 57 °C, 30sec
CNGA3	mCNG3st for/ mCNG3ex9rev	Gesamt-RNS aus Mausretina, 0,5 µl in 25 µl-Ansatz	29x 57 °C, 30sec
CNGA4	mCNG5-1for/ mCNG5-1rev	Boten-RNS aus Mausgehirn, 2 µl (4 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	10x 68 °C, 30sec 30x 58 °C, 30sec
CNGB1	PH31F/ PH33R	Boten-RNS aus Mausgehirn, 2 µl (4 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	10x 68 °C, 30sec 30x 58 °C, 30sec
CNGB3	CNG6ISHfor/ 280rev	Boten-RNS aus Mausgehirn, 2 µl (4 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	10x 68 °C, 30sec 30x 58 °C, 30sec
CNGB3	CNG6ISHfor/ 280rev	Gesamt-RNS aus Mausretina, 0,5 µl in 25 µl-Ansatz	29x 57 °C, 30sec
Gat2	mGat2for/ mGat2rev	Gesamt-RNS aus Mausretina, 0,5 µl in 25 µl-Ansatz	28x 65 °C, 30sec
HPRT	QG-197/ QG-198	Boten-RNS aus Mausgehirn, 1 µl (2 µl) in 25 µl (50 µl)-Ansatz	22x 57 °C, 30sec
HPRT	QG-197/ QG-198	Gesamt-RNS aus Mausretina, 1 µl in 25 µl-Ansatz	22x 57 °C, 30sec
MWS-Opsin	mCOSfor/ mCOSrev	Gesamt-RNS aus Mausretina, 0,5 µl in 25 µl-Ansatz	29x 65 °C, 30sec
SWS-Opsin	mOSfor/ mOSrev	Gesamt-RNS aus Mausretina, 0,5 µl in 25 µl-Ansatz	29x 64 °C, 30sec
PDE6c'	mPDE6cfor/ mPDE6crev	Gesamt-RNS aus Mausretina, 2 µl in 25 µl-Ansatz	43x 53 °C, 30sec

3 Verwendete Antikörper

3.1 Primärantikörper

Antigen	Antikörper	Aus Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
aktivierte Caspase 3	Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:100	Cell Signalling, # 9661S
Calbindin	anti-Calbindin D-28K	Maus, monoklonal	Immunhistochemie, 1:2000-1:5000	Swant, # 300
CNGA3, Maus	anti-CNGA3	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:100-1:200; Western-Blot, 1:500	Biel et al. 1999
CNGB1, Maus	anti-CNGB1	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:500	Hüttl et al. unpublizierte Daten
CNGB3, Maus	anti-CNGB3	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:100	Gerstner et al. unpublizierte Daten
Cytochrom c	anti-Cytochrome c, Clone 7H8.2C12	Maus, monoklonal	Immunhistochemie, 1:100	BD Pharmingen, # 556433
Digoxigenin	sheep anti-Digoxigenin-POD, Fab-Fragment	Schaf, polyklonal	Immunhistochemischer DIG-Nachweis bei ISH und TUNEL, 1:250-500	Roche, # 1207733
Gα ₂	anti-Gα ₂ (I20)	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:100	Santa Cruz, # sc-390
GCAP1	UW14	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:500 bis 1:1000	Prof. Palczewski; Howes et al. 1998
GC-E	K286	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:100-1:200	Yang & Garbers 1997
GC-F	L671	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:200	Yang & Garbers 1997
GFAP	anti-GFAP clone G-A-5 Cy3 Conjugate	Maus, monoklonal	Immunhistochemie, 1:1000	Sigma, # C9205
Go _α	anti-Go _α	Maus, monoklonal	Immunhistochemie, 1:1000	Chemicon, # MAB3073
NSE	pAb anti-NSE	Kaninchen, polyklonal	Immunhistochemie, 1:200	Biotrend, # NA1247
MWS-Opsin	COS1	Maus, monoklonal	Immunhistochemie, 1:1000	Szel et al. 1986
Rhodopsin	Rhodopsin Ab-1 (Clone RET-P1)	Maus, monoklonal	Immunhistochemie, 1:100	Dunn Labortechnik, # MS-1233-P0
Retinale PDE	ROS1	Maus, monoklonal	Immunhistochemie, 1:10-1:50	Hurwitz et al. 1984
SWS-Opsin	OS2	Maus, monoklonal	Immunhistochemie, 1:1000	Szel et al. 1986

3.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Anti Spezies	Aus Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Quelle
Alexa 488 anti-mouse IgG (H+L) , highly cross-adsorbed	Maus, IgG	Ziege	Immunhistochemie, 1:800 – 1:1000	MoBiTec, # A-11017
Alexa 546 anti- rabbit IgG (H+L), highly cross-adsorbed	Kaninchen, IgG	Ziege	Immunhistochemie, 1:600 – 1:800	MoBiTec, # A-11035
Alexa 594 anti- mouse IgG (H+L) , highly cross-adsorbed	Maus, IgG	Ziege	Immunhistochemie, 1:400	MoBiTec, # A-11032
FITC donkey anti- rabbit IgG (H+L), AffiniPure	Kaninchen, IgG	Esel	Immunhistochemie, 1:200	Dianova, #711-095-152
POD anti-rabbit	Kaninchen, IgG	Esel	Western-Blot, 1:2000	Amesham Pharmacia, # NA 934

IX. Literaturverzeichnis

1 Zitierte Veröffentlichungen

- Adolphs R, Tranel D, Damasio H, Damasio A (1994) Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature* 372(6507):669-72
- Arns M, Sauvage M, Steckler T (1999) Excitotoxic hippocampal lesions disrupt allocentric spatial learning in mice: effects of strain and task demands. *Behav Brain Res* 106(1-2):151-64
- Aszodi A, Pfeifer A, Ahmad M, Glauner M, Zhou XH, Ny L, Andersson KE, Kehrel B, Offermanns S, Fassler R (1999) The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J* 18(1):37-48
- Bareil C, Hamel CP, Delague V, Arnaud B, Demaille J, Claustres M (2001) Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the β -subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum Genet* 108 :328-334
- Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER (1996) Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24):13445-52
- Beavo JA (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75(4):725-48
- Biel M, Altenhofen W, Hullin R, Ludwig J, Freichel M, Flockerzi V, Dascal N, Kaupp UB, Hofmann F (1993) Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta. *FEBS Lett* 329(1-2):134-8
- Biel M, Zong X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V, Hofmann F (1994) Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9):3505-9
- Biel M, Zong X, Hofmann F (1995) Molecular diversity of cyclic nucleotide-gated cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353(1):1-10
- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F (1996) Molecular cloning and expression of the Modulatory subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel. *J Biol Chem* 1996 271(11):6349-55
- Biel M, Zong X, Hofmann F (1999) Cyclic nucleotide gated channels. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 33:231-50
- Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E, Hofmann F. (1999) Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13):7553-7
- Biel M, Schneider A, Wahl C (2002) Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* 12(5):206-12
- Blanks JC, Johnson LV (1984) Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(5):546-57

- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-9
- Bönigk W, Bradley J, Muller F, Sesti F, Boekhoff I, Ronnett GV, Kaupp UB, Frings S (1999) The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J Neurosci* 19(13):5332-47
- Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB (1990) Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347(6294):677-80
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
- Brunet LJ, Gold GH, Ngai J. (1996) General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17(4):681-93
- Bradley J, Li J, Davidson N, Lester HA, Zinn K (1994) Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19):8890-4
- Bradley J, Zhang Y, Bakin R, Lester HA, Ronnett GV, Zinn K (1997) Functional expression of the heteromeric "olfactory" cyclic nucleotide-gated channel in the hippocampus: a potential effector of synaptic plasticity in brain neurons. *J Neurosci* 17(6):1993-2005
- Burdach KF (1819-1822) Vom Baue und Leben des Gehirns. *Leipzig*
- Carter-Dawson LD, LaVail MM (1979) Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 188(2):245-62
- Chen E, Soderberg PG, Lindstrom B (1989) Activity distribution of cytochrome oxidase in the rat retina. A quantitative histochemical study. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 67(6):645-51
- Chen TY, Peng YW, Dhallan RS, Ahamed B, Reed RR, Yau KW (1993) A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362(6422):764-7
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9
- Coons AH, Creech HJ, Jones R (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47:200
- Corkin S (1965) Tactually-guided maze learning in man: Effects of unilateral cortical excisions and bilateral hippocampal lesions. 3:339-351 *Neurpsychologia*
- Corkin S, Amaral DG, Gonzalez RG, Johnson KA, Hyman BT (1997) H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *J Neurosci* 17(10):3964-79
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw 1997 Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 132(2):107-24

- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23(5):238-45
- Davis M, Rainnie D, Cassell M (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 17(5):208-14
- Davis M, Whalen PJ (2001) The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 6(1):13-34
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396(6710):474-7
- Detwiler PB, Gray-Keller MP (1996) The mechanisms of vertebrate light adaptation: speeded recovery versus slowed activation. *Curr Opin Neurobiol* 6(4):440-4
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA (1997) Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 151(5):1205-13
- Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW (1995) Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22):10177-81
- Duvall E, Wyllie AH, Morris RG (1985) Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 56(2):351-8
- Ebrey T, Koutalos Y. (2001) Vertebrate photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* 20(1):49-94
- Eichenbaum H, Dudchenko P, Wood E, Shapiro M, Tanila H (1999) The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron* 23(2):209-26
- Euler T, Wassle H (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361(3):461-78
- Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y (2001) Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* 81(1):117-151
- Fanselow MS, LeDoux JE (1999) Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* 23(2):229-32
- Fei Y, Hughes TE (2001) Transgenic expression of the jellyfish green fluorescent protein in the cone photoreceptors of the mouse. *Vis Neurosci* 18(4):615-23
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roma R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielson M (1987) Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7413-7417
- Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313(6000):310-3
- Finn JT, Krautwurst D, Schroeder JE, Chen TY, Reed RR, Yau KW (1998) Functional co-assembly among subunits of cyclic-nucleotide-activated, nonselective cation channels, and across species from nematode to human. *Biophys J* 74(3):1333-45

- Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez (1997) Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24):12932-7
- François, J (1961) Heredity in Ophthalmology. *C.V. Mosby, St Louis*
- Futatsugi A, Kato K, Ogura H, Li ST, Nagata E, Kuwajima G, Tanaka K, Itohara S, Mikoshiba K (1999) Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *Neuron* 24(3):701-13
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3):493-501
- Gerstner A, Zong X, Hofmann F, Biel M (2000) Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina. *J Neurosci* 20(4):1324-32
- Graham FL, Smiley J (1973) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381):1309-12
- Gu Y, McIlwain KL, Weeber EJ, Yamagata T, Xu B, Antalffy BA, Reyes C, Yuva-Paylor L, Armstrong D, Zoghbi H, Sweatt JD, Paylor R, Nelson DL (2002) Impaired conditioned fear and enhanced long-term potentiation in Fmr2 knock-out mice. *J Neurosci* 22(7):2753-63
- Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76(4):463-71
- Haverkamp S, Wassle H (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424(1):1-23
- Haverkamp S, Ghosh KK, Hirano AA, Wassle H (2003) Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *J Comp Neurol* 455(4):463-76
- Hattori T, Ohsawa K, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S (1994) Synthetic peptide corresponding to 30 amino acids of the C-terminal of neuron-specific enolase promotes survival of neocortical neurons in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 202(1):25-30
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-6
- Hestrin S, Korenbrot JJ (1990) Activation kinetics of retinal cones and rods: response to intense flashes of light. *J Neurosci* 10(6):1967-73
- Howes K, Bronson JD, Dang YL, Li N, Zhang K, Ruiz C, Helekar B, Lee M, Subbaraya I, Kolb H, Chen J, Baehr W (1998) Gene array and expression of mouse retina guanylate cyclase activating proteins 1 and 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(6):867-75
- Hurwitz RL, Bunt-Milam AH, Beavo JA (1984) Immunologic characterization of the photoreceptor outer segment cyclic GMP phosphodiesterase. *J Biol Chem* 259(13):8612-8

- Imanishi Y, Li N, Sokal I, Sowa ME, Lichtarge O, Wensel TG, Saperstein DA, Baehr W, Palczewski K (2002) Characterization of retinal guanylate cyclase-activating protein 3 (GCAP3) from zebrafish to man. *Eur J Neurosci* 15(1):63-78
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K(+) channel. *Nature* 423(6935):33-41
- Jimenez AJ, Garcia-Fernandez JM, Gonzalez B, Foster RG (1996) The spatio-temporal pattern of photoreceptor degeneration in the aged rd/rd mouse retina. *Cell Tissue Res* 284(2):193-202
- Kaiser E, Kuzmits R, Pregant P, Burghuber O, Worofka W (1989) Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin Chim Acta* 183(1):13-31
- Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82(3):769-824
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282(5397):2275-9
- Kelliher KR, Ziesmann J, Munger SD, Reed RR, Zufall F (2003) Importance of the CNGA4 channel gene for odor discrimination and adaptation in behaving mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7):4299-304
- Kerr JF, Wyllie A H, Currie A R (1972) Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
- Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV (1995) Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol* 46:1-27
- Kingston PA, Zufall F, Barnstable CJ (1996) Rat hippocampal neurons express genes for both rod retinal and olfactory cyclic nucleotide-gated channels: novel targets for cAMP/cGMP function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19):10440-5
- Kingston PA, Zufall F, Barnstable CJ (1999) Widespread expression of olfactory cyclic nucleotide-gated channel genes in rat brain: implications for neuronal signalling. *Synapse* 32(1):1-12
- Kluver H, Bucy PC (1937) Psychic blindness and other symptoms following bilateral lobectomy in rhesus monkeys. *Am J Physiol* 119:352-353
- Kluver H, Bucy PC (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatry* 42:979-1000.
- Kohl S, Marx T, Giddings I, Jagle H, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B (1998) Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat Genet* 19(3):257-9
- Kohl S, Baumann B, Broghammer M, Jagle H, Sieving P, Kellner U, Spegal R, Anastasi M, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B (2000) Mutations in the CNGB3 gene encoding the beta-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel are responsible for achromatopsia (ACHM3) linked to chromosome 8q21. *Hum Mol Genet* 9(14):2107-16

- Kohl S, Baumann B, Rosenberg T, Kellner U, Lorenz B, Vadala M, Jacobson SG, Wissinger B (2002) Mutations in the cone photoreceptor G-protein alpha-subunit gene GNAT2 in patients with achromatopsia. *Am J Hum Genet* 71(2):422-5
- Kuzmiski JB, MacVicar BA (2001) Cyclic nucleotide-gated channels contribute to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 21(22):8707-14
- Lämmlli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259):680-5
- LeDoux JE (1995) Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol* 46:209-35
- Leskov IB, Klenchin VA, Handy JW, Whitlock GG, Govardovskii VI, Bownds MD, Lamb TD, Pugh EN Jr, Arshavsky VY (2000) The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements. *Neuron* 27(3):525-37
- Li A, Lane WS, Johnson LV, Chader GJ, Tombran (1995) Neuron-specific enolase: a neuronal survival factor in the retinal extracellular matrix? *J Neurosci* 15(1 Pt 1):385-93
- Liman ER, Buck LB (1994) A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* 13(3):611-21
- Linden DJ (1994) Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12(3):457-72
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2):175-84
- Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N (1975) The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem* 250(21):8518-23
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F (1997) Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* 17(4):1339-49
- Malenka RC (1994) Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78(4):535-8
- Marangos PJ, Zis AP, Clark RL, Goodwin FK (1978) Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res* 150(1):117-33
- Maren S 1996 Synaptic transmission and plasticity in the amygdala. An emerging physiology of fear conditioning circuits. *Mol Neurobiol* 13:1-22
- Maren S, Fanselow MS (1996) The amygdala and fear conditioning: has the nut been cracked? *Neuron* 16(2):237-40
- Maren S (1999) Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci* 22(12):561-7

- Mata NL, Radu RA, Clemmons RC, Travis GH (2002) Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* 36(1):69-80
- Mathews LS, Vale WW (1991) Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65(6):973-82
- Matthews HR, Murphy RL, Fain GL, Lamb TD (1988) Photoreceptor light adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration. *Nature* 334(6177):67-9
- Mattson MP (2000) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(2):120-9
- McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP (1995) Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8):3249-53
- Mead AN, Stephens DN (2003) Selective disruption of stimulus-reward learning in glutamate receptor *gria1* knock-out mice. *J Neurosci* 23(3):1041-8
- Meinkoth JL, Alberts AS, Went W, Fantozzi D, Taylor SS, Hagiwara M, Montminy M, Feramisco JR (1993) Signal transduction through the cAMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biochem* 127-128:179-86
- Meiri N, Sun MK, Segal Z, Alkon DL (1998) Memory and long-term potentiation (LTP) dissociated: normal spatial memory despite CA1 LTP elimination with Kvl.4 antisense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25):15037-42
- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396(6710):433-9
- Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF (1991) Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30(6):1682-91
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11(1):47-60
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319(6056):774-6
- Munger SD, Lane AP, Zhong H, Leinders-Zufall T, Yau KW, Zufall F, Reed RR. (2001) Central role of the CNGA4 channel subunit in Ca²⁺-calmodulin-dependent odor adaptation. *Science* 294(5549):2172-5
- Myers RE, Swett C (1979) Social behavior deficits of free-ranging monkeys after anterior temporal cortex removal: a preliminary report. *Brain Res* 18(3):551-556
- Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S (1994) Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *J Neurochem* 63(6):2048-57

- Nakamura T, Gold GH (1987) A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325(6103):442-4
- Nakatani K, Yau KW (1988) Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. *J Physiol* 395:695-729
- Nakatani K, Yau KW (1988) Calcium and light adaptation in retinal rods and cones. *Nature* 334(6177):69-71
- Nathans J, Thomas D, Hogness DS (1986) Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* 232(4747):193-202
- Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377(6545):115-8
- Ogilvie JM, Tenkova T, Lett JM, Speck J, Landgraf M, Silverman MS (1997) Age-related distribution of cones and ON-bipolar cells in the rd mouse retina. *Curr Eye Res* 16(3):244-51
- Ohyama T, Hackos DH, Frings S, Hagen V, Kaupp UB, Korenbrot JI (2000) Fraction of the dark current carried by Ca(2+) through cGMP-gated ion channels of intact rod and cone photoreceptors. *J Gen Physiol* 116(6):735-54
- Pancholi V (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58(7):902-20
- Parent A, Schrader K, Munger SD, Reed RR, Linden DJ, Ronnett GV (1998) Synaptic transmission and hippocampal long-term potentiation in olfactory cyclic nucleotide-gated channel type 1 null mouse. *J Neurophysiol* 79(6):3295-301
- Paxinos G, Franklin K (2001) The Mouse Brain Stereotaxic Coordinate, 2nd Edition. *Academic Press*
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:105-49
- Phelan JK, Bok D (2000) A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis* 6:116-24
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266(5604):730-2
- Pugh EN, Nikonov S, Lamb TD (1999) Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation. *Curr Opin Neurobiol* 9(4):410-8
- Rammes G, Steckler T, Kresse A, Schutz G, Zieglgansberger W, Lutz B (2000) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala in transgenic mice expressing dominant-negative cAMP response element-binding protein (CREB) in forebrain. *Eur J Neurosci* 12(7):2534-46
- Reme CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A (1998) Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Prog Retin Eye Res* 17(4):443-64

- Rich KA, Zhan Y, Blanks JC (1997) Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 388(1):47-63
- Richards MJ, Gordon SE (2000) Cooperativity and cooperation in cyclic nucleotide-gated ion channels. *Biochemistry* 39(46):14003-11
- Rogan MT, LeDoux JE (1996) Emotion: systems, cells, synaptic plasticity. *Cell* 85(4):469-75
- Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS (2003) The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol* 463(1-3):217-23
- Sautter A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1998) An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel beta subunit expressed in olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A Apr 14;95(8):4696-701*
- Schmitt B, Bandtlow C (1996) Serum NSE in status epilepticus. *Neurology* 46(6):1780-1
- Schoerhuber W, Kittler H, Sterz F, Behringer W, Holzer M, Frossard M, Spitzauer S, Laggner AN (1999) Time course of serum neuron-specific enolase. A predictor of neurological outcome in patients resuscitated from cardiac arrest. *Stroke* 30(8):1598-603
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21
- Sharpe LT, Nordby K (1990) Total colour blindness: An introduction. *Night Vision: Basic, Clinical and Applied Aspects (Edited by R. F. Hess, L. T. Sharpe, K. Nordby)* Cambridge University Press
- Smith ML (1988) Recall of spatial location by the amnesic patient H.M.. *Brain Cogn* (2):178-83
- Soucy E, Wang Y, Nirenberg S, Nathans J, Meister M (1998) A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian retina. *Neuron* 21(3):481-93
- Strettoi E, Pignatelli V (2000) Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (20):11020-5
- Strettoi E, Porciatti V, Falsini B, Pignatelli V, Rossi C (2002) Morphological and Functional Abnormalities in the Inner Retina of the rd/rd Mouse. *J Neurosci* 22(13):5492-5504
- Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, Porciatti V, Falsini B (2003) Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vision Res* 43(8):867-77
- Strijbos PJ, Pratt GD, Khan S, Charles IG, Garthwaite J (1999) Molecular characterization and in situ localization of a full-length cyclic nucleotide-gated channel in rat brain. *Eur J Neurosci* 11(12):4463-7
- Sundin OH, Yang JM, Li Y, Zhu D, Hurd JN, Mitchell TN, Silva ED, Maumenee IH (2000) Genetic basis of total colourblindness among the Pingelapese islanders. *Nat Genet* 25(3):289-93
- Szel A, Takacs L, Monostori E, Diamantstein T, Vigh-Teichmann I, Rohlich P (1986) Monoclonal antibody-recognizing cone visual pigment. *Exp Eye Res* 43(6):871-83

- Szel A, Diamantstein T, Rohlich P (1988) Identification of the blue-sensitive cones in the mammalian retina by anti-visual pigment antibody. *J Comp Neurol* 273(4):593-602
- Tachibanaki S, Tsushima S, Kawamura S (2001) Low amplification and fast visual pigment phosphorylation as mechanisms characterizing cone photoresponses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):14044-9
- Takei N, Kondo J, Nagaike K, Ohsawa K, Kato K, Kohsaka S (1991) Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase. *J Neurochem* 57(4):1178-84
- Tamura T, Nakatani K, Yau KW (1989) Light adaptation in cat retinal rods. *Science* 245(4919):755-8
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 401(6748):63-9
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM (1992) Structural Framework for the Protein Kinase Family. *Annu Rev Cell Dev Biol* 8:429-462
- Thanos S, Moore S and Hong YM (1996) Retinal Microglia *Prog Retin Eye Res* 15(2):331-361
- To K, Adamian M, Jakobiec FA, Berson EL (1998) Histopathologic and immunohistochemical study of dominant cone degeneration. *Am J Ophthalmol* 126(1):140-2
- Travis GH (1998) Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations. *Am J Hum Genet* 62(3):503-8
- Tsien JZ (2000) Linking Hebb's coincidence-detection to memory formation. *Curr Opin Neurobiol* 10(2):266-73
- Tso MO, Zhang C, Abler AS, Chang CJ, Wong F, Chang GQ, Lam TT (1994) Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(6):2693-9
- Ueda N, Walker PD, Hsu SM, Shah SV (1995) Activation of a 15-kDa endonuclease in hypoxia/reoxygenation injury without morphologic features of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16):7202-6
- Van der Meer M, Baumans V, Olivier B, Kruitwagen CL, Van Dijk JE, Van Zutphen LF (2001) Behavioral and physiological effects of biotechnology procedures used for gene targeting in mice. *Physiol Behav* 73(5):719-30
- Wässle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 71(2):447-80
- Weiskrantz L (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 49:381-391
- Weitz D, Ficek N, Kremmer E, Bauer PJ, Kaupp UB (2002) Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron* 36(5):881-9
- Wissinger B, Jagle H, Kohl S, Broghammer M, Baumann B, Hanna DB, Hedels C, Apfelstedt-Sylla E, Randazzo G, Jacobson SG, Zrenner E, Sharpe LT (1998) Human rod monochromacy: linkage analysis and mapping of a cone photoreceptor expressed candidate gene on chromosome 2q11. *Genomics* 51(3):325-31

- Wissinger B, Gamer D, Jagle H, Giorda R, Marx T, Mayer S, Tippmann S, Broghammer M, Jurklics B, Rosenberg T, Jacobson SG, Sener EC, Tatlipinar S, Hoyng CB, Castellán C, Bitoun P, Andreasson S, Rudolph G, Kellner U, Lorenz B, Wolff G, Verellen-Dumoulin C, Schwartz M, Cremers FP, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Salati R, Sharpe LT, Kohl S. (2001) CNGA3 mutations in hereditary cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet* 69(4):722-37
- Wolfer DP, Crusio WE, Lipp HP (2002) Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci* 25(7):336-40
- Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284(5756):555-6
- Yan J, Zhang Y, Jia Z, Taverna FA, McDonald RJ, Muller RU, Roder JC (2002) Place-cell impairment in glutamate receptor 2 mutant mice. *J Neurosci* 22(3):RC204
- Yang RB, Garbers DL (1997) Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers. *J Biol Chem* 272(21):13738-42
- Ying S, Jansen HT, Lehman MN, Fong SL, Kao WW (2000) Retinal degeneration in cone photoreceptor cell-ablated transgenic mice. *Mol Vis* 6:101-8
- Young RW, Bok D (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42(2):392-403
- Zagotta WN, Siegelbaum SA (1996) Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci* 19:235-63
- Zhao H, Reed RR. (2001) X inactivation of the OCNC1 channel gene reveals a role for activity-dependent competition in the olfactory system. *Cell* 104(5):651-60
- Zhong H, Molday LL, Molday RS, Yau KW (2002) The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry. *Nature* 420(6912):193-8
- Zhong H, Lai J, Yau KW (2003) Selective heteromeric assembly of cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9):5509-13
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90(3):405-13

2 Eigene Veröffentlichungen

- Michalakis S, Kleppisch T, Wotjak CT, Marsicano G, Hofmann F, Gerstner A, Biel M (2003) Altered hippocampal transmission in mice lacking the cone cyclic nucleotide-gated channel CNGA3. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol [Suppl.]* 367:R83, 320
- Michalakis S, Kleppisch T, Wotjak CT, Hofmann F, Gerstner A, Biel M (2003) Altered synaptic transmission and defective fear conditioning in CNGA3-deficient mice. *Manuskript in Vorbereitung*
- Michalakis S, Gerstner A, Hofmann F, Biel M (2003) Molecular characterization of the neurodegenerative process in the retina of CNGA3-deficient mice. *Manuskript in Vorbereitung*

X. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Stylios Michalakis
Geburtstag	16.04.1975
Geburtsort	Augsburg
Staatsangehörigkeit	griechisch

Schulbildung

09/1981 - 07/1986	Griechische Grundschule, Augsburg
09/1986 - 07/1990	Griechisches Gymnasium, Augsburg
09/1990 - 05/1993	Griechisches Lyzeum, Augsburg
05/1993	Griechisches Abitur

Studium

09/1993 - 07/1994	Studium im Fach Medizinanalytik am TEI Heraklion, Griechenland
09/1994 - 02/1995	Studium im Fach Medizinanalytik am TEI Larissa, Griechenland
05/1995 - 05/1999	Studium der Pharmazie an der LMU München
09/1997	1. Staatsexamen Pharmazie
05/1999	2. Staatsexamen Pharmazie
05/1999 – 10/1999	Erstes praktisches Halbjahr in der Mariahilf-Apotheke, München
11/1999 – 05/2000	Zweites praktisches Halbjahr am Lehrstuhl von Prof. Dr. Martin Biel, Pharmakologie für Naturwissenschaften, Department Pharmazie, LMU München
07/2000	3. Staatsexamen Pharmazie
08/2000	Approbation zum Apotheker
08/2000 – 08/2003	Dissertation am Lehrstuhl von Prof. Dr. Martin Biel, Pharmakologie für Naturwissenschaften, Department Pharmazie, LMU München

Herrn Prof. Dr. Martin Biel möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Nennung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit ganz herzlich danken. Besonders zu erwähnen ist die für sämtliche Mitarbeiter "ständig offene Tür".

Herrn Prof. Dr. Alexander Pfeifer danke ich sehr für die Übernahme des Korreferats, sowie für Anregungen und wissenschaftliche Ratschläge.

Bei Frau Dr. Andrea Gerstner möchte ich mich für die Einweisung in das molekularbiologische Arbeiten und die Kunst des RNase-freien Arbeitens bedanken. Besonders in der Anfangszeit wäre ein Vorankommen ohne Ihre Hilfe sehr schwer gewesen. Vielen Dank auch für die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Kleppisch für die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen am Hippocampus. Über das Fachliche hinaus möchte ich mich bei Ihm für die vielen lustigen Momente bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt auch PD Dr. Carsten Wotjak für die Einweisung in die Verhaltensbiologie der Maus, sowie für die Durchführung der Angstkonditionierung.

Bei Dr. Giovanni Marsicano möchte ich mich sehr, für die Möglichkeit das Isolieren der Amygdala zu erlernen, bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Berit Noack und Daniela Scholz, die durch ihre hervorragenden technischen Fähigkeiten den Laboralltag aller sehr erleichterten.

Für die kritische Durchsicht der Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Christian Wahl-Schott, Sabine Hüttl, Dr. Andrea Gerstner, und Daniela bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Pharmakologie der TU München bedanken. Dem "zweiten Stock" möchte ich für die lustige Zeit im ersten Jahr meiner Arbeit bedanken. PD Dr. Andreas Ludwig und Dr. Sven Moosmang möchte ich für die anregenden Diskussionen danken.

An diesem Punkt möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitgliedern der gesamten Pharmakologie für das sehr gute Arbeitsklima bedanken.

Robert und Pine, euch danke ich sehr für die jahrelange Freundschaft, die selbst unter dem ab und zu stressigen Laboralltag nicht gelitten hat. Ich danke Christian und Rothäusé für die Freundschaft und die vielen schönen und vor allem lustigen Momente.

Ich möchte mich bei allen PDM-Mitgliedern und vor allem Frank, H-P, Matthias, Robert und Rothäusé ganz herzlich für die sehr lustige und unvergessliche Zeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei den mit Mitgliedern des Lehrstuhls der Pharmazeutischen Biologie PD Dr. Verena Dirsch und Irina Müller für den fruchtbaren Austausch der mich in Sachen Apoptose sehr weitergebracht hat.

H-P und Robert euch möchte ich nochmal besonders danken, für die schöne Zeit während des Studiums und der Promotion, dich Matthias darf ich diesbezüglich natürlich auch nicht vergessen.

Dani, dir möchte ich für die große Geduld danken, die du während der vergangenen Jahre und vor allem während der letzten Monate bewiesen hast!