# Adaptationsmechanismen inhibierender Netzwerke in der Fischretina

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg zur Erlangung des Grades und Titels eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) angenommene Dissertation

> von Sebastian Hermann geboren am 21.05.1980 in Oldenburg, Deutschland

Gutachter: Apl.-Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch Tag der Disputation: 03.12.2014

# Inhaltsverzeichnis

| 1. Einleitung  | 10             |
|--|----------------|
| 1.1 Die Vertebratenretina  | 10             |
| 1.1.1 Aufbau und Struktur der Vertebratenretina                                  | 10             |
| 1.1.2 Funktionen der Vertebratenretina   | 11             |
| 1.2 Gap Junctions  | 13             |
| 1.2.1 Struktureller Aufbau von Gap Junctions                                     | 14             |
| 1.2.2 Modulation von Gap Junctions   | 17             |
| 1.3 Lichtadaptationsmechanismen in der Vertebrateretina                          | 18             |
| 1.3.1 Horizontalzellen   | 19             |
| 1.3.2 Funktion von Horizontalzellen  | 21             |
| 1.3.3 Horizontalzellkopplung   | 23             |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit   | 27             |
| 2. Material und Methoden   | 30             |
| 2.1 Versuchstiere  | 30             |
| 2.2 Präparationen der Augenbecher und Retinen                                    | 30             |
| 2.4 Proteinbiochemische Methoden   | 33             |
| 2.4.1 Subzelluläre Fraktionierung  | 33             |
| 2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)                                     | 33             |
| 2.4.3 Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)                                      | 34             |
| 2.4.4 Western-Blot nach Towbin et al., (1979) und ECL-Nachweisreaktion           | 35             |
| 2.5 Herstellung retinaler Primärkulturen   | 37             |
| 2.6 Histologische Methoden   | 37             |
| 2.6.1 Fixierung der Augenbecher und retinaler Primärkulturen                     | 37             |
| 2.6.2 Anfertigung von Gefrierschnitten   | 38             |
| 2.6.3 Immunhistochemie/ Immuncytochemie  | 38             |
| 2.6.4 Konfokale Lasermikroskopie; Auswertung mittels ImageJ                      | 39             |
| 2.6.5 Elektronenmikroskopie  | 40             |
| 2.7 Molekularbiologische Methoden  | 41             |
| 2.7.1 Klonierung von Karpfen Connexinen  | 41             |
| 2.7.2 Isolierung von mRNA aus einzelnen Horizontalzellen                         | 42             |
| 2.7.3 Reverse Transkriptase Reaktion   | 42             |
| 2.7.4 Primer Design und Polymerase Kettenreaktion (PCR); Einzelzell-PCR          | 43             |
| 2.7.5 Agarose Gelelektrophorese  | 44             |
| 2.7.6 In Situ Hybridisierung (ISH)   | 44             |
| 2.7.7 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)                                  | 45             |
| 2.8 Zellbiologische Methoden (Zellkultur)  | 45             |
| 2.8.1 Kultivierung von N2A-Zellen  | 45             |
| 2.8.2 Transiente Transfektion von N2A-Zellen                                     | 46             |
| 2.9 Physiologische Methoden  | 47             |
| 2.9.1 Intrazellulärableitungen von Horizontalzellen                              | 47             |
| 2.9.2 Neurobiotin-Injektionen  | 47             |
| 3. Ergebnisse  | 49             |
| 3.1 Differentielle Expression von Connexinen in Horizontalzellen der Karpfenreti | i <b>na</b> 49 |
| 3.1.2 Expression von cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 in der            |                |
| Karpfenretina  | 51             |
| 3.1.3 Expression des Karpfenconnexins cpCx53.8                                   | 58             |
| 3.1.4 Relative Expressionslevel der Connexine in den Horizontalzellsubtypen      | 62             |

| 3.1.5 Ultrastrukturelle Analyse zur Verteilung von cpCx53.8 und cpCx55.5 in o    | ler |
|--|-----|
| Karpfenretina  | 65  |
| 3.2 Modulation der Horizontalzellkopplung und des Connexins cpCx53.8             | 67  |
| 3.2.1 Lichtabhängige Modulation  | 67  |
| 3.2.2 Effekte von Dopamin und PKA auf die Horizontalzellkopplung und die         |     |
| Phosphorylierung von cpCx53.8  | 72  |
| 3.2.3 Effekte von Retinsäure und PKC auf die Horizontalzellkopplung und die      |     |
| Phosphorylierung von cpCx53.8  | 79  |
| 3.2.4 Effekte der kombinativen Inhibition von PKA und PKC auf die                |     |
| Horizontalzellkopplung und die Phosphorylierung von cpCx53.8                     | 85  |
| 3.2.5 Aminosäuresequenzanalyse zur Identifikation potentieller Phosphosites in   | 1   |
| cpCx53.8   | 89  |
| 3.2.6 Lichtabhängige Modulation des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters           | 92  |
| 3.2.7 Effekte von Dopamin und Retinsäure auf das cpCx53.8-                       |     |
| Immunoreaktivitätsmuster   | 93  |
| 3.2.8 Effekte der PKA- und PKC-Inhibition auf die lichtabhängige Modulation      | des |
| cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters   | 96  |
| 3.2.9 cpCx53.8 Expressionsstudien an Neuroblastoma Zellen (N2A-Zellen)           | 100 |
| 4. Diskussion  | 106 |
| 4.1 Horizontalzellen der Karpfenretina weisen ein distinktes Expressionsmuster o | ler |
| vier identifizierten Connexine cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 auf     | 106 |
| 4.2 Modulation der Horizontalzellkopplung und des horizontalzell-spezifischen    |     |
| Connexins cpCx53.8   | 109 |
| 4.2.1 Die Entkopplung von Horizontalzellen korreliert mit der gesteigerten       |     |
| cpCx53.8-Phosphorylierung  | 109 |
| 4.2.2 Dopamin und Retinsäure bewirken eine verringerte Horizontalzellkopplu      | ng  |
| und eine gesteigerte Phosphorylierung von cpCx53.8                               | 112 |
| 4.2.2.1 Dopamin wirkt über die Aktivierung von PKA                               | 112 |
| 4.2.2.2 Retinsäure wirkt über die Aktivierung von PKC                            | 114 |
| 4.2.3 PKA und PKC wirken additiv bei der Vermittlung der lichtabhängigen         |     |
| Modulation   | 115 |
| 4.3 Die gesteigerte cpCx53.8-Phosphorylierung korreliert mit einer erhöhten      |     |
| cpCx53.8-Immunoreaktivität in der äußeren Retina                                 | 119 |
| 4.4 Putative Signalmoleküle zur Vermittlung adaptiv-bedingter                    |     |
| Modulationsmechanismen   | 121 |
| 4.4.1 Dopamin als Signalmolekül  | 122 |
| 4.4.2 Retinsäure als Signalmolekül   | 125 |
| 4.5 Ausblick   | 130 |
| 5. Zusammenfassung   | 133 |
| 6. Summary   | 136 |
| 7. Literaturverzeichnis  |     |
| 8. Anhang  | 153 |
| 8.1 Puffer, Lösungen und Medien  |     |
| 8.2 Kollaborationen  |     |
| 8.3 Erklärung  | 164 |
| 8.4 Danksagung   | 165 |
| 8.4 Lehenslauf   | 166 |
|  |     |

# Abkürzungsverzeichnis

| °C                 | Grad Celsius   |
|--------------------|--|
| 8-Br-cAMP          | 8-Bromo-zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat             |
| 9-cis RA           | 9-cis Retinsäure   |
| 13-cis RA          | 13-cis Retinsäure  |
| А                  | Adenin   |
| Abb.               | Abbildung  |
| Amp                | Ampicillin   |
| AP                 | alkaline Phosphatase                                       |
| APS                | Ammoniumpersulfat  |
| AS                 | Aminosäure   |
| ATP                | Adenosin-Triphosphat                                       |
| at-RA              | all-trans Retinsäure                                       |
| bp                 | Basenpaare   |
| BSA                | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)                  |
| С                  | Cytosin  |
| cAMP               | zyklisches Adenosin-3´-5´-monophosphat                     |
| cDNA               | DNA-Kopie einer Messenger-RNA ( <i>complementary DNA</i> ) |
| ср                 | Karpfen ( <i>Cyprinus carpio</i> )                         |
| cRNA               | RNA-Kopie einer DNA ( <i>complementary RNA</i> )           |
| Cx                 | Connexin   |
| dH <sub>2</sub> O  | deionisiertes Wasser                                       |
| ddH <sub>2</sub> O | bidestilliertes Wasser                                     |
| DEPC               | Diethylpyrocarbonat  |
| DIG                | Digoxiginin  |
| DMEM               | Dulbecco's Modified Eagle Medium                           |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                                     |
| DNAse              | Desoxyribonuklease   |
| dNTPs              | 2'-Desoxvribonukleosid-5-Triphosphate                      |
|                    | (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)                                |
| dr                 | Zebrafisch (Danio rerio)                                   |
| DTT                | Dithiothreitol   |
| ECL                | Enhanced Chemiluminescence                                 |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat                                   |
| EGTA               | Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat               |
| EGFP               | enhanced green fluorescent protein                         |
| et al.             | et alii  |
| EtBr               | Ethidiumbromid   |
| FCS                | fötales Kälberserum  |
| FISH               | Fluoreszenz in situ Hybridisierung                         |
| G                  | Guanin   |
| GCL                | Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)                  |
| gDNA               | genomische DNA   |
| hm                 | Mensch ( <i>human</i> )                                    |
| H <sub>2</sub> O   | Wasser   |
| HP <sub>2</sub>    | Homogenisierungspuffer                                     |
| HRP                | Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )  |
| INL                | innere nukleäre Schicht ( <i>inner nuclear laver</i> )     |
| IPL                | innere plexiforme Schicht ( <i>inner plexiform laver</i> ) |
| IPTG               | Isopropyl-β-D-thiogalaktosid                               |
|                    |  |

| ISH   | in situ Hybridisierung  |
|-------|---|
| Kan   | Kanamycin   |
| kb    | Kilobasenpaare  |
| kDa   | Kilodalton  |
| LB    | Luria Bertani, Bakterienmedium                                    |
| MCS   | Multiple Klonierungsstelle  |
| mm    | Maus (Mus musculus)   |
| mRNA  | messenger-Ribonukleinsäure  |
| NBT   | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid                                      |
| nt    | Nukleotide  |
| OD    | optische Dichte   |
| ONL   | äußere nukleäre Schicht (outer nuclear layer)                     |
| OPL   | äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)                 |
| ORF   | offenes Leseraster (open reeding frame)                           |
| OS    | Außensegemente der Photorezeptoren                                |
| OT    | Objektträger  |
| PAGE  | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                   |
| PB    | Phosphatpuffer  |
| PBS   | phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)         |
| PCR   | Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)             |
| PE    | Pigmentepithel  |
| PFA   | Paraformaldehyd   |
| pН    | negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration |
| RNA   | Ribonukleinsäure  |
| RNase | Ribonuklease  |
| rpm   | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)                        |
| RT    | Reverse Transkriptase oder Raumtemperatur                         |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat  |
| SSC   | Salz-Natriumcitrat-Lösung   |
| Т     | Thymin  |
| Tab.  | Tabelle   |
| TBE   | Tris-Borsäure-EDTA-Elektrophoresepuffer                           |
| TBST  | Tris gepufferte Salzlösung mit Tween20                            |
| U     | Einheit (Unit)  |
| UTR   | Nicht-translatierte Region (untranslated region)                  |
| v/v   | Volumen pro Volumen   |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-galaktosid                          |

# Abbildungsverzeichnis

## Seite:

| Abb. 1.1: | Schematischer Aufbau der Vertebratenretina                                  | 11  |
|-----------|---|-----|
| Abb. 1.2: | Schematische Darstellung zum Aufbau von Gap Junctions                       | 15  |
| Abb. 1.3: | Topologie eines Connexins in der Plasmamembran                              | 16  |
| Abb. 1.4: | Lichtadaptation im visuellen System   | 19  |
| Abb. 1.5: | Karpfenhorizontalzellen und deren Lokalisation innerhalb der Retina         | 20  |
| Abb. 1.6: | Triphasische Modellvorstellung zur Horizontalzellkopplung                   | 25  |
| Abb. 3.1: | Phylogenetischer Verwandtschaftsgrad (Phylogramm) von                       |     |
|           | Horizontalzellconnexinen des Zebrafisches und des Karpfens                  | 50  |
| Abb. 3.2: | Verteilung von cpCx49.5-, cpCx52.6- and Cx55.5-mRNA in                      |     |
|           | vertikalen Schnitten der Karpfenretina                                      | 52  |
| Abb. 3.3: | Spezifitätsnachweis von anti-drCx52.9, anti-drCx52.6 und                    |     |
|           | anti-drCx55.5; Immunoreaktivität von cpCx49.5, cpCx52.6                     |     |
|           | und cpCx55.5 in der Karpfenretina   | 54  |
| Abb. 3.4: | Verteilung von cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5 in dissoziierten             |     |
|           | Horizontalzellen der Karpfenretina  | 57  |
| Abb. 3.5: | Proteinbiochemische und immunhistochemische                                 |     |
|           | Charakterisierung von cpCx53.8  | 60  |
| Abb. 3.6: | Semi-quantitative Einzelzell-RT-PCR   | 63  |
| Abb. 3.7: | Ultrastrukturelle Lokalisation von cpCx53.8 und cpCx55.5 in dendro-         |     |
|           | dendritischen und axo-axonischen Gap Junctions in der OPL und INL der       |     |
|           | Karpfenretina   | 66  |
| Abb. 3.8: | Modulatorischer Einfluss unterschiedlicher Adaptationsstadien auf die       |     |
|           | Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen und die Phosphorylierung        |     |
|           | von cpCx53.8  | 69  |
| Abb. 3.9: | Einfluss von Dopamin auf die Horizontalzellkopplung und die Phosphorylier   | ung |
|           | von cpCx53.8  | 73  |
| Abb. 3.10 | Effekte der PKA-Inhibition auf die unterschiedlichen Adaptationszustände_   | 77  |
| Abb. 3.11 | : Einfluss von Retinsäure auf die Horizontalzellkopplung und die            |     |
|           | Phosphorylierung von cpCx53.8   | 80  |
| Abb. 3.12 | : Effekte der PKC-Inhibition auf die unterschiedlichen Adaptationszustände_ | 84  |
| Abb. 3.13 | : Effekte der gleichzeitigen Inhibition der PKA und PKC auf die             |     |
|           | Kopplungseigenschaften und die Phosphorylierung von cpCx53.8                | 87  |

| Abb. 3.14         | : NetPhosK Analyse zur Identifizierung potentieller Konensussequenzen für   |           |
|-------------------|---|-----------|
|                   | Proteinkinasen auf der cpCx53.8 Aminosäuresequenz                           | 90        |
| Abb. 3.15         | cpCx53.8-Aminosäuresequenz; putative PKA- und PKC-Phosphosites              | 91        |
| Abb. 3.16         | Auswirkungen unterschiedlicher Adaptationszustände auf die cpCx53.8-        |           |
|                   | Immunoreaktivität in der Karpfenretina                                      | 92        |
| Abb. 3.17         | : Modulation der cpCx53.8-Immunoreaktivität durch Dopamin und cAMP          | <u>94</u> |
| Abb. 3.18         | : Modulation der cpCx53.8-Immunoreaktivität durch Retinsäure und            |           |
|                   | Staurosporin  | 95        |
| Abb. 3.19         | Auswirkungen der selektiven PKA- und PKC-Inhibition auf das cpCx53.8-       |           |
|                   | Immunoreaktivitätsmuster in lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierte | n         |
|                   | Retinen   | 97        |
| Abb. 3.20         | Auswirkungen der gleichzeitigen PKA- und PKC-Inhibition auf das             |           |
|                   | Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8                                       | 99        |
| Abb. 3.21         | cpCx53.8-pCS2+ transfizierte N2A-Zellen und der Einfluss von cAMP auf c     | lie       |
|                   | subzelluläre Verteilung von cpCx53.8  | 101       |
| Abb. 3.22         | cpCx53.8-pCS2+ transfizierte N2A-Zellen und der Einfluss von cAMP und       |           |
|                   | Retinsäure auf die subzelluläre Verteilung von cpCx53.8                     | 103       |
| Abb. 4.1:         | Modell zur Modulation von cpCx53.8 über einen PKA- und einen PKC-           |           |
|                   | Signalweg   | 129       |
| Abb. 8.1:         | Einfluss von cGMP auf den Phosphorylierungszustand von cpCx53.8             | 153       |
| Abb. 8.2:         | Einfluss von Microcystin auf die Dopamin- und 8-Br-cAMP-vermittelte         |           |
|                   | Phosphorylierung von cpCx53.8   | 155       |
| <b>Abb. 8.3</b> : | Einfluss der CamKII-Inhibition auf die DA- und at-RA-vermittelte cpCx53.8   | 3-        |
|                   | Phosphorylierung  | 155       |
| Abb. 8.4:         | Modulation der Cx53.8-Phosphorylierung in Membranfraktionen von             |           |
|                   | Goldfischretinen  | 155       |

# Tabellenverzeichnis

### Seite:

| Tab. 2.1: | Verwendete Neuromodulatoren und Kinase Inhibitoren                                     | 32      |
|-----------|--|---------|
| Tab. 2.2: | Zusammensetzung der verwendeten Trenngele  | 35      |
| Tab. 2.3: | Zusammensetzung der verwendeten Sammelgele   | 35      |
| Tab. 2.4: | Ansatz der DNAse-Behandlung  | 42      |
| Tab. 2.5: | PCR-Reaktionsansatz  | 43      |
| Tab. 8.1: | $Mittelwerte \ (\pm \ Standard a b weich ung) \ der \ Antwort amplituden \ (mV) \ der$ |         |
|           | Horizontalzellen auf den Ring-Punkt-Stimulus   | 153     |
| Tab. 8.2: | Mittelwerte (± Standardabweichung) der Auszählung cpCx53.8-                            |         |
|           | immunoreaktiver Plaques in Karpfenretinen  | 154     |
| Tab. 8.3: | Primäre und sekundäre Antikörper   | 156     |
| Tab. 8.4: | Sequenzen der verwendeten Primer   | 157/158 |

### 1. Einleitung

Eines der grundlegendsten Ziele der Neurowissenschaften ist es zu verstehen, wie die Kommunikation bzw. die Signalübertragung zwischen Nervenzellen (Neuronen) organisiert ist und welche Prozesse für das Aufrechterhalten funktionaler Zellkommunikation verantwortlich sind. Bekannt ist, dass die Kommunikation über zwei grundsätzlich verschiedene Typen von Synapsen gewährleistet wird. Man unterscheidet die chemischen von den elektrischen Synapsen. Die chemischen Synapsen werden durch einen präsynaptischen Mechanismus zur Transmitterfreisetzung und postsynaptische Rezeptoren zur Auslösung zellspezifischer Antworten in der Empfängerzelle charakterisiert. Die elektrische Signalübertragung zwischen Neuronen wird durch direkte Zell-Zell-Kontakte (sog. Gap Junctions) gewährleistet und bietet neben der elektrischen Signalweitergabe auch die Möglichkeit des direkten Transfers kleiner Moleküle (<1 kDa) zwischen benachbarten Zellen. Die Retina bietet ein ideales Forschungsobjekt zur Untersuchung dieses Kommunikationsweges, da bereits eine Vielzahl unterschiedlicher retinaler Gap Junctions beschrieben werden konnten.

#### **1.1 Die Vertebratenretina**

Die Retina stellt aufgrund ihrer Ontogenese einen in der Peripherie gelegenen, funktionellen Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) dar und wird während der Embryonalentwicklung durch eine Ausstülpung des Zwischenhirns gebildet (Kolb *et al.*, 1995a, b). Der auch als *Stratum cerebrale* bezeichnete Bereich enthält mit Photorezeptoren, Bipolarzellen, Ganglienzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und Interplexiformen Zellen sechs Typen von Neuronen sowie mit Müllerzellen, Astrocyten und Mikroglia drei Gliazelltypen.

#### 1.1.1 Aufbau und Struktur der Vertebratenretina

Der grundsätzliche Aufbau der Retina ist bei allen Vertebraten gleich organisiert (vgl. Abb. 1.1). Die Zellen sind innerhalb der Retina in mehreren lateral organisierten Schichten angeordnet. Ausgehend von der Reihenfolge des Verarbeitungsprozesses von Lichtreizen liegt im distalen Bereich die äußere Kernschicht (*outer nuclear layer*; ONL), in der die Somata der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) lokalisiert sind. Auf die ONL folgt die äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer*, OPL), in der die Synapsen zwischen Photorezeptoren, Horizontalzellen und Bipolarzellen lokalisiert sind. Die Somata der Horizontalzellen, Bipolarzellen und Amakrinzellen sind in spezifischen Unterschichten

(*sublayer*) in der inneren Kernschicht (*inner nuclear layer*, INL) organisiert. Ebenso sind die synaptischen Verschaltungen von Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen in der inneren plexiformen Schicht (*inner plexiform layer*, IPL) in mehreren Schichten organisiert. Die Somata der Ganglienzellen bilden den basalen Bereich der Retina und werden als Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) bezeichnet. Die zusammenlaufenden Axone der Ganglienzellen führen als optischer Nerv (Sehnerv; *Nervus opticus*) in der Nervenfaserschicht (*nerve fibre layer*, NFL) aus dem Auge heraus und ziehen dann durch den *Canalis opticus* zur Sehnervenkreuzung (*Chiasma opticum*). Von dort aus setzt sich die Sehbahn über den *Tractus opticus* fort und projiziert zum Großteil auf den *Corpus geniculatum laterale* (seitlicher Kniehöcker) und weiter zur primären Sehrinde (*Area striata*) im Okzipitallappen des visuellen Cortex.



#### Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der Vertebratenretina

Auf der linken Seite sind die unterschiedlichen Zelltypen der Retina gekennzeichnet und auf der rechten Seite sind die charakteristischen Schichten der Vertebratenretina markiert. [Quelle: journals.cambridge.org; (modifiziert)]

#### 1.1.2 Funktionen der Vertebratenretina

Die grundsätzliche Aufgabe der Retina besteht darin, aus den optischen Eigenschaften der Umwelt ein in neuronale Aktionspotentiale codiertes Abbild zu generieren. Dies geschieht durch die Verarbeitung verschiedener, auf die Retina treffender Lichtreize. Die Detektion der Lichtreize erfolgt hierbei hauptsächlich über die Photorezeptoren und die anschließende Prozessierung verläuft über zwei prinzipiell unterschiedliche Signalverarbeitungswege. Man unterscheidet den vertikalen Informationsfluss, der von den Photorezeptoren über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen führt, und den lateralen Verarbeitungsweg, der die Interaktionen der Photorezeptoren und Bipolarzellen mit den Horizontalzellen (OPL) beschreibt und des Weiteren die Verschaltung von Amakrinzellen zwischen den Synapsen Ganglienzellen (IPL) von **Bipolarzellen** und beinhaltet. Bei der vertikalen Informationsübermittlung erfolgt die interzelluläre Kommunikation hauptsächlich über chemische Synapsen, während der laterale Informationsfluss vor allem über Gap Junctions vermittelt wird (Cook und Becker, 1995; Wu, 2010).

Die Photorezeptoren lassen sich in zwei unterschiedliche Zelltypen einteilen, die Stäbchen-Photorezeptoren (*rods*) und die Zapfen-Photorezeptoren (*cones*). Stäbchen-Photorezeptoren zeichnen sich durch eine sehr hohe Lichtsensitivität aus, d.h. sie sind schon bei geringem Umgebungslicht erregbar und somit für das sog. "Dämmerungssehen" verantwortlich (Baylor, 1996; Rieke und Baylor, 1996). Zapfen-Photorezeptoren sind hingegen weniger lichtsensitiv. Sie sind vor allem für Sehen bei Tageslicht bzw. für das "Farbensehen" verantwortlich.

Photorezeptoren sind in Ruhelage (bei Dunkelheit) leicht depolarisiert, was eine ständige Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat zur Folge hat. Bei Erregung durch einen Lichtreiz kommt es zur Hyperpolarisation der Photorezeptoren und in Folge dessen zur verringerten Glutamatausschüttung an den jeweiligen synaptischen Endigungen der Photorezeptoren (Stäbchen = "rod spherules"; Zapfen = "cone pedicles"). Auf postsynaptischer Seite trifft das Glutamat auf invaginierende Fortsätze von Horizontalzellen, sowie auf dendritische Fortsätze von Bipolarzellen. Man bezeichnet diese synaptische Struktur als Triade, in der die lateralen Elemente von Horizontalzellen gebildet werden und die zentralen Elemente aus den Bipolarzelldendriten gebildet werden (Mariani, 1984; Stell et al., 1975). Die Bipolarzellen, die im zentralen Bereich der triadischen Synapse invaginieren werden ON-Bipolarzellen genannt. Im Gegensatz zu diesen Zellen existiert ein zweiter Typ von Bipolarzellen, die OFF-Bipolarzelle, deren Dendriten jedoch ausschließlich an den basalen, flachen Kontakten zur Photorezeptorsynapse beteiligt sind (Kolb, 1970; Boycott und Hopkins, 1993). Die Unterscheidung zwischen ON- und OFF-Bipolarzellen beruht auf ihrem unterschiedlichen Antwortverhalten auf einen Lichtreiz. Die ON-Bipolarzellen werden durch einen Anstieg der Intensität eines Lichtreizes erregt (depolarisiert), während die OFF-Bipolarzellen auf eine entsprechende Erniedrigung der Lichtintensität reagieren und bei zunehmender Lichtintensität hyperpolarisieren (Wässle und Boycott, 1991). Eine erste Charakterisierung von Bipolarzellen wurde von Cajal (1893) vorgenommen, welcher zwei grundsätzlich verschiedene Typen beschrieb, die als "bipolaires destinés aux bâtonnets"

(Stäbchen-Bipolarzelle) und *"bipolaires destinés aux cônes*" (Zapfen-Bipolarzelle) bezeichnet wurden. In der Säugerretina existieren ca. 10-12 Bipolarzelltypen und in verschiedenen *Cyprinidae* (Karpfenfische) konnten zwischen 15 (Goldfisch, *Carassius auratus*) (Ishida *et al.*, 1980; Sherry und Yazulla, 1993) und 17 (Zebrafisch, *Danio rerio*) (Connaughton *et al.*, 2004) Bipolarzelltypen identifiziert werden. Jeweils etwa die Hälfte dieser Zellen stellen ONbzw. OFF-Bipolarzellen dar. In der Säugerretina kontaktiert nur ein Typ der Bipolarzellen die Stäbchen, man bezeichnet ihn demnach als Stäbchen-Bipolarzelle. Alle anderen Bipolarzellen gehören zu den Zapfen-Bipolarzellen, die überwiegend mit den synaptischen Endigungen der Zapfen assoziiert sind. In Retinen verschiedener *Cyprinidae* existieren neben den reinen Stäbchen-Bipolarzellen auch solche Zellen, die gemischten Eingang von Stäbchen und Zapfen erhalten. Als erster konnte Stell (1967) an der Goldfischretina zeigen, dass verschiedene "Stäbchen-Bipolarzellen ausschließlich mit den Zapfen assoziiert sind. Vergleichbare Befunde konnten ebenfalls am Karpfen (Famiglietti *et al.*, 1977; Saito *et al.*, 1983) sowie am Zebrafisch (Connaughton und Nelson, 2000; Connaughton *et al.*, 2004) erbracht werden.

Die weiterführende Reizweiterleitung erfolgt im Falle der ON-Bipolarzellen über direkte synaptische Verbindungen mit den ON-Ganglienzellen und im Falle der OFF-Bipolarzellen mit OFF-Ganglienzellen. Die Ganglienzellen senden die Signale über ihre zusammenlaufenden Axone (Sehnerv) an das Gehirn.

Der größte Teil des vertikal verlaufenden Informationsflusses zwischen den entsprechenden retinalen Neuronen erfolgt über chemische Synapsen. Darüber hinaus zeigten Tracer-Injektionsstudien, dass zwischen allen Neuronentypen der Vertebratenretina auch eine Kommunikation über Gap Junctions erfolgt (Vaney, 1994; Cook und Becker, 1995), deren molekulare Bausteine (Connexine) in allen Neuronen einer Vielzahl von Vertebraten nachgewiesen wurden (Cook und Becker, 1995; Bloomfield und Völgyi, 2009). Diese Befunde verdeutlichen die universelle Bedeutung von Gap Junctions in der Retina. Der folgende Abschnitt gibt einen umfassenden Überblick über den derzeitigen Kenntnisstand zur Struktur, zum Aufbau und zur Funktion von Gap Junctions und Connexinen, im Allgemeinen und in Bezug auf die Vertebratenretina.

#### **1.2 Gap Junctions**

Die interzelluläre Kommunikation stellt ein Schlüsselelement zur Entstehung und Aufrechterhaltung funktionaler Gewebe, Organe und letztendlich ganzer vielzelliger Organismen dar. Im Laufe der Evolution haben sich unterschiedliche Arten interzellulärer Kommunikation entwickelt, die den jeweiligen Gegebenheiten angepasst sind. Neben neuronalen Signalwegen, welche Informationen über Aktionspotentiale z.T. über weite Strecken schnell und effizient übermitteln können, gibt es z.B. auch endokrine Signalwege, die vor allem bei der Verbreitung von Hormon-gesteuerten Signalen eine wichtige Rolle spielen. Eine weitere Art der interzellulären Kommunikation beruht auf dem unmittelbaren physischen Kontakt benachbarter Zellen, bei denen es zur Ausbildung von direkten Zell-Zell-Verbindungen kommt. Yamada und Ishikawa (1965) waren die ersten, die sog. "fused membrane structures" zwischen morphologisch gleichen Horizontalzelltypen beschrieben. Der Begriff Gap Junction wurde von Goodenough und Revel (1970) zum ersten Mal zur Beschreibung dieser Membranstrukturen verwendet.

Neben der rein metabolischen Kopplung entsprechender Zellen, die den direkten Austausch von Ionen (z.B. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>), *second messenger* Molekülen (z.B. cAMP, cGMP, Ca<sup>2+</sup> oder IP3) sowie kleiner niedermolekularer Metabolite (z.B. Saccharide und Nucleotide) (< 1,2 - 1,8 kDa) ermöglicht (Simpson *et al.*, 1977; Neijssen *et al.*, 2005), können über diese Verbindungen auch elektrische Signale vermittelt werden, weshalb Gap Junctions auch als elektrische Synapsen bezeichnet werden. Die schnelle Übermittlung elektrischer Signale bildet die Grundlage für eine synchronisierte Erregungsweiterleitung in unterschiedlichen Gewebetypen (Gilula, 1987; Perkins *et al.*, 1997), wie z.B. dem Herzmuskel, in dem die Ausbildung funktioneller Synzytien für eine effiziente Synchronisation spezifischer Zellantworten essentiell ist (Bruzzone *et al.*, 1996). Gleiches gilt auch für die Retina, in der nur durch die schnelle Synchronisation der Aktivität in parallel arbeitenden neuronalen Netzen die Fülle der visuellen Reize (Kontrast, Farbe, Bewegung) verarbeitet werden kann.

#### 1.2.1 Struktureller Aufbau von Gap Junctions

Eine Gap Junction ist definiert als eine Kanäle-bildende Struktur, welche sich über zwei benachbarte Zellen erstreckt (Makovski *et al.*, 1977). Sie wird aus einer Zusammenlagerung vieler einzelner Gap Junction-Kanäle gebildet, man bezeichnet sie demnach auch als Gap Junction-Plaque (vgl. Abb. 1.2). Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Analysen konnte gezeigt werden, dass in dem Bereich einer Gap Junction der Abstand der Zellmembranen von normalerweise ca. 20 nm auf ca. 3 nm reduziert ist (Yamada und Ishikawa, 1965; Payton *et al.*, 1969). Ein einzelner Gap Junction-Kanal ist aufgebaut aus zwei gegenüberliegenden Halbkanälen (sog. Connexonen oder Hemikanälen), wobei jeweils ein Connexon in der Plasmamembran der jeweiligen Zelle lokalisiert ist. Ein Connexon ist jeweils aus sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen (Cx), aufgebaut. Die Connexine sind in einer

ringförmigen Struktur zu einem Hemikanal zusammengelagert, der einen Porendurchmesser von bis zu 2 nm aufweisen kann (Kumar und Gilula, 1996; Reviewartikel: Söhl und Willecke, 2004) (vgl. Abb. 1.2)



#### Abb. 1.2: Schematische Darstellung zum Aufbau von Gap Junctions

Eine Gap Junction besteht aus vielen einzelnen Gap Junction-Kanälen. Ein Gap Junction-Kanal wird aus zwei Halbkanälen (Connexonen, *hemichannels*) gebildet, die jeweils in der Plasmamembran zweier benachbarter Zellen verankert sind. Jedes Connexon ist aus sechs Proteinuntereinheiten (Connexinen) aufgebaut. Je nach Zusammensetzung, ob aus gleichen oder unterschiedlichen Connexinen aufgebaut, werden Connexone als homomer oder heteromer bezeichnet. Ein Gap Junction-Kanal, der aus gleich aufgebauten Connexonen besteht wird als homotypisch bezeichnet und ein Kanal aus unterschiedlichen Connexonen wird als heterotypisch bezeichnet. Im Bereich einer Gap Junction ist der Abstand der Zellmembranen auf ca. 2-4 nm verringert. Quelle: Bloomfield und Völgyi (2009).

Basierend auf ihrer molekularen Komposition weisen Gap Junction-Kanäle ein hohes Maß an Diversität auf. Connexone die aus sechs identischen Connexinen aufgebaut sind werden als Homomere bezeichnet, solche die aus unterschiedlichen Connexinen aufgebaut sind als Heteromere. Hierbei ergeben sich je nach Zusammensetzung der Connexone unterschiedliche physiologische Konsequenzen und Auswirkungen auf die Öffnungsund Schließeigenschaften (gating) sowie auf die Permeabilität des Kanals. Diese Variabilität wird noch erweitert, da der aus den Connexonen gebildete Gap Junction-Kanal entweder homotypisch (aus gleichen Connexonen) oder heterotypisch (aus unterschiedlichen Connexonen) aufgebaut sein kann (vgl. Abb. 1.2).

Auf der Grundlage von Klonierungsexperimenten, Aminosäuresequenzanalysen, Hydrophobizitätsanalysen und Sequenzvergleichen konnten die Connexine als eine Superfamilie von Transmembranproteinen identifiziert werden, die eine charakteristische Struktur und Topologie aufweisen (Paul, 1986; Zimmer *et al.*, 1987, Goodenough *et al.*, 1996). Jedes Connexin beinhaltet vier hydrophobe α-helikale Transmembrandomänen (M1-M4), welche über zwei extrazelluläre Schleifen (*extracellular loops*; E1 und E2) sowie eine intrazelluläre Schleife (*cytoplasmatic loop*; CL) miteinander verbunden sind. In das Zellinnere ragend befinden sich der kurze Amino- und der längere Carboxy-Terminus (Zimmer et al., 1987; Bruzzone et al., 1996; Evans und Martin, 2002; Söhl *et al.*, 2005) (vgl. Abb. 1.3).



# Abb. 1.3: Topologie eines Connexins in der Plasmamembran

Connexine besitzen vier Transmembrandomänen (M1-M4), zwei extrazelluläre Schleifen (E1 und E2), eine intrazelluläre Schleife (I) sowie eine jeweils intrazellulär lokalisierte carboxyterminale Region (C) und eine aminoterminale Region (N); (verändert nach Bruzzone *et al.*, 1996.)

Durch die Transmembrandomänen sind die Connexine fest in der Membran verankert (Martin et al., 2000) und über die zwei extrazellulären Schleifen können die Connexine gegenüberliegender Zellen miteinander agieren. Jede der extrazellulären Schleifen besitzt außerdem jeweils drei hochkonservierte Cysteinreste, die bei entsprechender Annäherung der Zellen Disulfidbrücken mit den Cysteinresten der gegenüberliegenden Connexine bilden und somit zur Interaktion der Connexone und damit der Stabilisierung der Gap Junction-Kanäle beitragen (Kumar und Gilula, 1996). Die extrazellulären Schleifen (EL1 und EL2) sowie die Transmembrandomänen stellen die am höchsten konservierten Regionen eines Connexins dar und weisen eine Sequenzhomologie von ca. 60 % auf (Bruzzone et al., 1996; Söhl et al., 2005). Die stärksten individuellen Unterschiede in Bezug auf die Aminosäuresequenz und deren Länge bestehen demnach in den weniger stark konservierten Bereichen, der intrazellulären Schleife und dem Carboxy-Terminus. Die Sequenzvariabilität innerhalb dieser Bereiche bestimmt zum einen die jeweilige Größe eines Connexins und hat zum anderen Auswirkungen auf dessen physiologische Eigenschaften. Des Weiteren stellen diese Bereiche aufgrund ihrer hohen Variabilität die beste Detektionsfläche für Connexin-spezifische Antikörper dar.

#### **1.2.2 Modulation von Gap Junctions**

Gap Junctions sind höchst variable Strukturen, die durch eine Vielzahl modulatorisch wirksamer Mechanismen und Signalkaskaden reguliert werden. So werden vor allem die Konformation der einzelnen Gap Junction-Kanäle und damit das gating über spezifische Signalkaskaden und intrazelluläre Signale beeinflusst (Bruzzone et al., 1996). Dabei kann die Öffnungswahrscheinlichkeit der Gap Junction-Kanäle zum einen über elektrisch vermittelte Signale der Potentialdifferenz zweier Zellen gesteuert werden (Srinivas et al., 1999). Zum anderen hängen ihre Öffnungseigenschaften aber auch von Änderungen des intrazellulären pH-Werts oder der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ab (Spray et al., 1981; Bevans und Harris, 1999). Die Beeinflussung der Öffnungswahrscheinlichkeiten von Gap Junctions über Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird u.a. mit der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Calmodulin Kinase II (CamKII) in Verbindung gebracht. CamKII vermittelt seine Wirkung auf die entsprechenden Zielproteine indem es diese phosphoryliert und damit eine Konformationsänderung bewirkt, die im Fall der Connexine u.a. die Öffnungswahrscheinlichkeit des Gap Junction-Kanals moduliert (Unwin, 1989; Ahmad et al., 2001). In unterschiedlichen Connexinen wurden CamKII-Konsensussequenzen identifiziert. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Kopplungseigenschaften von AII-Amakrinzellen der Kaninchenretina über eine CamKIIvermittelte Phosphorylierung von Cx36 gesteuert wird (Kothmann et al., 2012). Des Weiteren konnten Huang et al. (2011) im C-terminalen Ende des kardialen Cx43 15 CamKII-Phosphorylierungssequenzen identifizieren.

Proteine, die über Proteinkinasen phosphoryliert werden können, werden als Phosphoproteine bezeichnet. Ihre Dephosphorylierung erfolgt immer über entsprechende Phosphatasen. Neben der Beeinflussung des *gatings* werden über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung der Connexine z.B. auch ihre Synthese, die Bildung und Zusammenlagerung von Hemikanälen und Gap Junctions sowie die Beweglichkeit der Kanäle in der Membran (Auflösung von Gap Junction-Plaques) und die Degradation von Gap Junctions gesteuert (Takens-Kwak und Jongsma, 1992; Lampe und Lau, 2000).

Die Aktivierung spezifischer Proteinkinasen oder Phosphatasen und die daraus resultierende Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Proteinen erfolgt meist infolge der Aktivierung spezifischer zellulärer Signaltransduktionskaskaden. Diese Kaskaden können über eine Vielzahl extrazellulärer Signale, z.B. unterschiedliche Neurotransmitter, Neuromodulatoren, Hormone oder Neuropeptide aktiviert werden und ermöglichen letztendlich über die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des beteiligten Phosphoproteins eine feinabgestimmte Stimulus-abhängige Kontrolle seiner Funktion bzw. Aktivität (Nestler und Greengard, 1984).

Die Notwendigkeit dieser Modulation lässt sich unter anderem in Bezug auf das visuelle System und die Verarbeitung optischer Lichtreize verdeutlichen. Die enorme Masse visueller Eindrücke setzt ein hohes Maß an Variabilität und Anpassungsfähigkeit der beteiligten Systeme voraus. Die Retina stellt hierbei die erste Verarbeitungsebene dar, in der eintreffende visuelle Informationen durch adaptative Prozesse vorverarbeitet werden und somit gefiltert ins Gehirn (visueller Cortex) gelangen.

#### **1.3 Lichtadaptationsmechanismen in der Vertebrateretina**

Das visuelle System des Menschen ermöglicht es in einem Lichtintensitätsbereich von etwa 12 logarithmischen Einheiten verwertbare Informationen über die Umwelt zu erlangen und zu verarbeiten (Bloomfield *et al.*, 1995; Weiler *et al.*, 2000; Pottek und Weiler, 2000; Bloomfield und Völgyi, 2009). Die minimale Lichtintensität, die durch das visuelle System wahrgenommen werden kann liegt im skotopischen Bereich bei ca. 4 x  $10^{-7}$  foot-Lamberts (fL) (~1,37 x  $10^{-6}$  candela/m<sup>2</sup> [cd/m<sup>2</sup>]) und entspricht in etwa der Lichtstärke, welche durch einen 1 Kilometer entfernten Kerzenschein bei absoluter Dunkelheit erzeugt wird. Die maximale Lichtintensität liegt mit ca. 30.000 fL (~103.000 cd/m<sup>2</sup>) im photopischen Bereich der Beleuchtungsstärke und entspricht der Reflektion von hellen Sonnenstrahlen auf weißem Hintergrund, wie z.B. an einem weißen Sandstrand. Aus der Abb. 1.4 geht hervor, dass innerhalb der gesamten Bandbreite des wahrnehmbaren Lichtintensitätsbereiches nur ein geringer Teil ohne entsprechende Adaptationsmechanismen verwertbar ist (Bartlett, 1965; Hallett, 1969).



#### Abb. 1.4: Lichtadaptation im visuellen System

Der Lichtintensitätsbereich in dem durch das visuelle System des Menschen verwertbare Informationen gewonnen werden können reicht von ca. 0,0000004 fL bis ca. 30.000 fL und umfasst demnach ca. 12 log Einheiten. Innerhalb dieses Bereiches kann lediglich ein geringer Teil unter mesopischen Bedingungen ohne eine entsprechende Adaptation verwertet werden (Bartlett, 1965; Hallett, 1969).

Um die Aufrechterhaltung des gesamten Arbeitsbereiches zu gewährleisten, ist das visuelle System mit verschiedenen Adaptationsmechanismen ausgestattet, die eine schnelle Anpassung an sich ändernde Umgebungshelligkeiten ermöglichen. Ein geringer Teil visueller Adaptation wird z.B. über den Pupillenreflexes gewährleistet, der durch Öffnungs- und Schließmechanismen die Menge, des auf die Retina treffenden Lichts regulieren kann. Der Großteil der Lichtadaptation wird allerdings über retinale Anpassungsmechanismen gewährleistet. So findet ein Großteil visueller Adaptation bereits in den Photorezeptoren statt, deren Sensitivität gegenüber veränderten Lichtbedingungen über die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kontrolliert wird (Mathews *et al.*, 1988; Fain *et al.*, 2001, 2011). Neben den Photorezeptoren spielen auch die Horizontalzellen und Amakrinzellen eine wichtige Rolle bei lichtadaptiven Prozessen, da sie über laterale Verschaltungen zwischen den Synapsen der Neurone des vertikalen Informationsflusses einen starken Einfluss auf die zum Gehirn gesendeten Signale haben.

#### **1.3.1 Horizontalzellen**

Horizontalzellen sind Interneurone, die zusammen mit den Photorezeptoren für erste adaptive Steuerungsprozesse bei der Verarbeitung visueller Informationen in der äußeren Retina von essentieller Bedeutung sind (vgl. 1.3.2.). Aufgrund ihrer Morphologie unterscheidet man zwischen A-Typ Horizontalzellen, welche axonlos sind, und B-Typ Horizontalzellen, welche sich durch ein langes Axon (bis zu 230 µm) und große Axonendigungen, die sogenannten Axonterminalien auszeichnen (Suzuki und Pinto, 1986; Perlman et al., 2007). In der Retina von Cypriniden, u.a. des Spiegelkarpfens (*Cyprinus carpio*), Goldfisches (*Carassius auratus*) und Zebrafisches (Danio rerio), die Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit sind, wurden vier morphologisch unterschiedliche Typen von Horizontalzellen identifiziert, welche als H1-H4 Horizontalzellen bezeichnet werden (Stell et al., 1975; Weiler, 1978; Li et al., 2009; Connaughten & Nelson, 2010) (vgl. Abb. 1.5 A). Im Vergleich zu den H1-H3 Horizontalzellen, die ein Axon besitzen und den B-Typ Horizontalzellen zugeordnet werden, ist die H4 Horizontalzelle axonlos und entspricht somit dem A-Typ. Die Nomenklatur der Karpfenhorizontalzellen geht auf die Beschreibung unterschiedlicher Horizontalzelltypen im Goldfisch (Carassius auratus) zurück, deren charakteristische, somatische Anordnung innerhalb spezifischer Ebenen (sublayer) der INL beschrieben wurde. Danach sind die Somata der H1 Zellen vor allem in der äußeren distalen INL lokalisiert, während die weiteren Zelltypen entsprechend proximal darunter liegen (Naka und Carraway, 1975; Stell et al., 1975; Stell and Lightfoot, 1975) (vgl. Abb. 1.5 B und 1.5 C).



Abb. 1.5: Karpfenhorizontalzellen und deren Lokalisation innerhalb der Retina

A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der vier Horizontalzelltypen (H1-H4) des Karpfens; Pfeil = Axon; Skalierung = 25  $\mu$ m (aus Weiler, 1978, modifiziert); **B**) Schematische Darstellung der Verschaltung von H1-H3 Horizontalzellen mit unterschiedlichen Zapfen-Photorezeptortypen im Goldfisch (B = blau sensitive Zapfen, R = rot sensitive Zapfen, G = grün sensitive Zapfen) (aus Stell *et al.*, 1975); **C**) Schematische Darstellung der charakteristischen Verteilung der Zellsomata der vier Horizontalzelltypen im Goldfisch (H1-H3; RH = *rod horizontal cell*, Stäbchen Horizontalzelle, H4) (aus Stell und Lightfoot, 1975), ONL = outer nuclear layer; IPL = inner plexiform layer

Neben der charakteristischen Anordnung der Horizontalzellsomata in der INL und der entsprechenden Ausbreitung der dendritischen Fortsätze lassen sich die vier unterschiedlichen Zelltypen auch morphologisch gut unterscheiden. Die H1 Zellen zeichnen sich durch ein eher rundlich geformtes Soma (ca. 40-50 µm) aus, von dem wenige relativ dünne und kurze Dendriten abgehen (Abb. 1.5A; H1; Weiler, 1978). Der Durchmesser des dendritischen Feldes beträgt ca. 40-60 µm. H2 Zellen besitzen mit ca. 25-40 µm ein eher kleines Soma, welches allerdings meist etwas länglich gestreckt erscheint. Des Weiteren zeichnet sich dieser Zelltyp durch kurze und relativ dicke dendritische Fortsätze und ein dendritisches Feld von ca. 80-100 µm aus (Abb. 1.5A; H2; Weiler, 1978). Die H3 Zellen sind in ihrer Gesamterscheinungsform um ein Vielfaches größer als die H1 und H2 Zellen, besitzen allerdings auch ein kleines Soma (ca. 20-40 µm). Charakteristisch für die H3 Zellen sind viele dünne und weit verzweigte Dendriten, die ein dendritisches Feld von ca. 150 µm im Durchmesser bilden (Abb. 1.5 A; H3; Weiler, 1978). Die H4 Zellen ähneln in ihrer Erscheinungsform den H3 Zellen. Sie zeichnen sich ebenfalls durch ein kleines Soma (ca. 20 µm) aus, von dem mehrere, häufig sehr dicke dendritische Fortsätze abgehen, die an den Endigungen feinere Verzweigungen aufweisen. Die Gesamtgröße des dendritischen Feldes beträgt ebenfalls ca. 150 µm im Durchmesser (Abb. 1.5 A; H4; Weiler, 1978). Aktuellere Untersuchungen von Horizontalzellen in der Zebrafischretina (Li et al., 2009) und in der Goldfischretina (vorliegende Arbeit) unterstützen diese HC-spezifischen Morphologien von Horizontalzellen.

Mit Hilfe Tracer-Kopplungsstudien gezeigt von konnte werden, dass alle Horizontalzellsubtypen über Gap Junctions gekoppelt sind und umfangreiche, unabhängige neuronale Netzwerke ausschließlich durch homologe Kopplung ausbilden (Stell et al., 1975; Kaneko und Stuart, 1984; Kouvama und Watanabe, 1986). Die Kopplung der einzelnen Subtypen kann sowohl durch die Bildung dendro-dendritischer sowie soma-somatischer Gap Junctions erfolgen (Yagi, 1986). Außerdem zeichnen sich auch die Axonterminalien der entsprechenden Axon-tragenden Subtypen der Horizontalzellen (H1-H3) durch eine intensive Gap Junction-vermittelte Kopplung aus (Kouvama und Watanabe, 1986; Kamermans et al., 1990).

#### **1.3.2 Funktion von Horizontalzellen**

Horizontalzellen sind Sekundärneurone, welche postsynaptisch zu den Photorezeptoren lokalisiert sind. Der modulatorische Einfluss dieser Zellen auf die Signalweiterleitung im Bereich der Photorezeptorsynapsen wird über sog. *feedback*-Mechanismen gesteuert, wobei je nach Abhängigkeit der Auswirkungen auf die Transmitterfreisetzung zwischen *positive feedback* (Jackman *et al.*, 2011) und *negative feedback* (Fahrenfort *et al.*, 2005; 2009) unterschieden wird. Die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat an der Photorezeptorsynapse korreliert mit der Aktivität spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, die in

der Photorezeptormembran in der unmittelbaren Nähe zur Ribbon-Synapse (Triade) lokalisiert sind. Der Einstrom von Ca<sup>2+</sup> durch diese Kanäle reguliert die Freisetzung von Glutamat, das bei Dunkelheit konstant ausgeschüttet wird, während bei Beleuchtung die Ausschüttung in Abhängigkeit von der Intensität reduziert wird. Der Mechanismus der negativen Rückkopplung von den Horizontalzellen auf die Photorezeptoren übt dabei einen direkten Einfluss auf die spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in der Photorezeptormembran aus und reguliert darüber indirekt die Glutamatausschüttung. Horizontalzellen sind während Dunkelheit leicht depolarisiert und reagieren auf Belichtung mit einer Hyperpolarisation, die nachfolgend die Öffnung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und damit eine Modulation der Ca<sup>2+</sup>-Ströme in die Photorezeptorsynapsen hinein bewirkt und weiter in einer vermehrten Ausschüttung von Glutamat resultiert (Verweij et al., 1996; Klaassen et al., 2011). Obgleich nach derzeitigem Kenntnisstand grundlegender Konsens über das Vorhandensein von feedback-Mechanismen in der äußeren Retina besteht (Burkhardt, 1993; Kamermans und Spekreijse, 1999, Thoreson und Mangel, 2012), existieren mehrere Hypothesen in Bezug auf die beteiligten molekularen Komponenten und zellulären Regulationsmechanismen (Kamermans et al., 2001; Hirasawa und Kaneko, 2003; Fahrenfort et al., 2009). Die älteste dieser Hypothesen basiert auf der Annahme, dass der feedback von Horizontalzellen auf Photorezeptoren über den Neurotransmitter Gamma Amino-Buttersäure (gamma-aminobutyric acid; GABA) vermittelt wird. Diesem Modell zufolge wirkt GABA als direkter inhibitorischer Neurotransmitter der Horizontalzellen auf GABA-Rezeptoren bzw. GABA-abhängige Cl-Kanäle an den Photorezeptorsynapsen (Studholme und Yazulla, 1988; Yazulla et al., 1989; Yazulla und Studholme, 1997). Durch diese Interaktion verändert sich die Leitfähigkeit der Photorezeptoren, wodurch eine Beeinflussung der Glutamatausschüttung an den Photorezeptorsynapsen resultiert (Yazulla und Brecha, 1980; Yazulla, 1981).

Als weitere von GABA unabhängige Mechanismen werden ein durch den pH-Wert gesteuertes *feedback*-System (DeVries, 2001; Hirasawa und Kaneko, 2003; Vessey *et al.*, 2005) und ein auf geöffneten Hemikanälen basierendes (ephaptisches) *feedback*-System diskutiert (Kamermans und Spekreijse, 1999; Kamermans *et al.*, 2001). Das pH-Wert-basierte Model des *feedback*-Mechanismus geht von einer durch Licht vermittelten verringerten Ausschüttung von Protonen aus den Horizontalzellen als Folge der Hyperpolarisation aus. Dies würde zu einer verstärkten Alkalinisierung des synaptischen Spalts und einer entsprechenden Veränderung des intersynaptischen pH-Wertes führen. Der Verschiebung der negativeren Ladung innerhalb des synaptischen Spalts entsprechend würde sich auch das Membranpotential der Photorezeptorsynapsen zu einem mehr negativen Potential hin

verschieben, was zur Öffnung der spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in der Photorezeptormembran und im Weiteren zur vermehrten Ausschüttung von Glutamat führen würde (Reviewartikel: Hirasawa *et al.*, 2012).

Die Hypothese des ephaptisch-vermittelten feedback-Mechanismus basiert auf der Annahme Connexin-Hemikanäle in der geöffneter Membran der lateral invaginierenden Horizontalzellfortsätze. Als eine Ephapse wird ein Bereich definiert, in dem zwei oder mehrere Fortsätze von Neuronen (hier: die Fortsätze der Photorezeptoren, Bipolarzellen und Horizontalzellen) miteinander interagieren, ohne dabei die typischen synaptischen Kontakte zu bilden (Söhl et al., 2005). Der Hypothese nach wird der feedback durch die lichtinduzierte Reduzierung der Glutamatausschüttung im Bereich der Ribbon-Synapsen der Photorezeptoren eingeleitet, die Horizontalzellen hyperpolarisieren, die auf den Horizontalzellfortsätzen lokalisierten Hemikanäle werden geöffnet und es erfolgt ein Einstrom positiv geladener Ionen (Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>) aus dem intersynaptischen Raum in das Innere der Horizontalzelldendriten. Der dadurch bedingte Spannungsabfall im engen synaptischen Spalt zwischen Photorezeptoren und Horizontalzellen wird von den Ca<sup>2+</sup>-Kanälen detektiert, die in der Nähe der präsynaptischen Ribbons lokalisiert sind und verschiebt ihre Aktivierungskurve zu negativeren Potentialen. Infolgedessen öffnen die Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und das einströmende Calcium induziert die erneute Freisetzung von Glutamat (Kamermans und Spekreijse, 1999; Kamermans et al., 2001; Pottek et al., 2003; Fahrenfort et al., 2005).

Insgesamt ist festzuhalten, dass Horizontalzellen von entscheidender funktioneller Bedeutung für den negativen feedback auf Photorezeptoren in der äußeren Retina sind und darüber die vom Adaptationszustand abhängige Glutamatausschüttung (*photoreceptor gain control*) durch diese steuern. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen des negativen feedbacks sind jedoch noch nicht endgültig geklärt, aber die aktuellsten Befunde (Vroman et al., 2014) postulieren die Beteiligung des ephaptischen Mechanismus an der schnellen Komponente des negativen feedbacks und des Protonen-Mechanismus an der langsameren Komponente.

#### 1.3.3 Horizontalzellkopplung

Im Hinblick auf die Gesamtheit, der von der Retina verarbeiteten Signale bzw. der von den Photorezeptoren vermittelten Signale ist der inhibitorische Einfluss einzelner Horizontalzellen marginal. Der theoretische Wirkungsgrad wird durch die Ausbreitung des jeweiligen Dendritenbaums und der Kontaktstellen zu einzelnen Photorezeptoren begrenzt. Ein entscheidendes Charakteristikum der Horizontalzellen besteht jedoch in deren intensiver elektrischer Kopplung über Gap Junctions. Durch Gap Junction-vermittelte Kopplung entstehen weitreichende Horizontalzellnetwerke, die es ermöglichen Informationen von einer Vielzahl von Photorezeptoren über einen großen Bereich der Retina zu erlangen (Vaney, 1994). Die rezeptive Feldgröße einzelner Horizontalzellen wird dadurch stark vergrößert und kann die Größe des rein dendritischen Feldes einer einzelnen Zelle um ein Vielfaches übersteigen (Hombach *et al.*, 2004; Bloomfield und Völgyi, 2009). Es können neuronale Netzwerke aus bis zu 500 Horizontalzellen in der Mausretina bzw. bis zu 250 Horizontalzellen in der Fischretina entstehen, welche eine Ausbreitung der rezeptiven Felder um einige Millimeter ermöglichen (Vaney, 1994; Söhl *et al.*, 2005). Durch diese Kopplung verstärkt sich der inhibitorische Effekt der Horizontalzellen auf die Photorezeptoren. Außerdem führt es dazu, dass eine einzelne Bipolarzelle, die über direkte synaptische Verbindungen Input von wenigen Photorezeptoren erhält, zusätzlichen indirekten inhibitorischen Input von Horizontalzellen bzw. peripheren Photorezeptoren erfährt. Dieses Phänomen wird auch als laterale Inhibition beschrieben, wodurch der klassische *Center/Surround*-Antagonismus von Bipolarzellen induziert wird (Dowling und Werblin, 1969; Matsumoto und Naka, 1972; Kaneko, 1973; Schwartz, 1974).

Der Grad der Kopplung von Horizontalzellen ist abhängig von dem auf die Retina treffenden Umgebungslicht. Die physiologische Charakterisierung der rezeptiven Feldgröße und des korrespondierenden Grades der elektrischen Kopplung unter verschiedenen Lichtbedingungen sowie die Analyse der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen und deren pharmakologische Beeinflussbarkeit sind seit längerem Gegenstand der Forschung. So konnten Xin und Bloomfield (1999) zeigen, dass die Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen der Kaninchenretina einer triphasischen Organisation folgen, und Baldridge (2001) konnte eine entsprechende triphasische Organisation der Adaptationsmechanismen von Horizontalzellen ebenfalls am Goldfisch nachweisen (vgl. Abb. 1.6). Diese Modellvorstellung zur Organisation der Horizontalzellkopplung hat bis heute Gültigkeit und beschreibt den derzeitigen Kenntnisstand im Hinblick auf das Kopplungsverhalten von Horizontalzellen in verschiedenen Spezies (Umino *et al.*, 1991; Reviewartikel: Bloomfield und Völgyi, 2009).



#### Abb. 1.6: Triphasische Modellvorstellung zur Horizontalzellkopplung

Die Abbildung verdeutlicht die Korrelation unterschiedlicher Lichtverhältnisse mit dem Grad der Horizontalzellkopplung. Demzufolge weisen die Zellen unter skotopischen und photopischen Lichtverhältnissen eine reduzierte Kopplung auf, während unter mesopischen Lichtverhältnissen eine maximale Kopplung erreicht wird. (Landschaftsbilder aus Bloomfield und Völgyi, 2009)

Bei sehr schwachen Lichtintensitäten (skotopische Lichtverhältnisse) sowie bei hohen Lichtintensitäten (photopische Lichtverhältnisse) ist der Grad der Kopplung gering, während er bei mittleren Lichtintensitäten (mesopische Lichtverhältnisse) hoch ist. Ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Veränderungen der rezeptiven Feldgröße und der Antworteigenschaften von Horizontalzellen konnten an unterschiedlichen Knochenfischen (Teleostei) gezeigt werden. In Retinen des Weißbarsches (Roccus americana) zeigte sich nach einer dauerhaften Dunkeladaptation (prolonged darkness; > 2 Std.) eine Reduzierung in der Stärke des Antwortverhaltens bei gleich bleibender Lichtstimulation (Mangel et al., 1994). Dieses Antwortverhalten wird auf eine Reduzierung der rezeptiven Feldgröße der entsprechenden Horizontalzellen zurückgeführt, welche durch eine verminderte elektrische Kopplung hervorgerufen wird. Anhand physiologischer Untersuchungen, wie Intrazellulärableitungen und *Tracer*-Kopplungsstudien, konnte an unterschiedlichen Vertebraten gezeigt werden, dass die lichtabhängige Modulation unter anderem über verschiedene Neuromodulatoren, wie Dopamin (Knapp und Dowling, 1987; Dowling, 1991; Perlmann und Ammermüller, 1994; Weiler et al., 1997), Retinsäure (Pottek et al., 1997; Weiler et al., 1998; Weiler et al., 1999) und Stickstoffmonoxid (Baldridge et al., 1998; Pottek und Weiler, 2000; Weiler et al., 2001) vermittelt wird.

Insgesamt belegen alle bisherigen Studien, dass die jeweils beobachtete Reduzierung des rezeptiven Feldes einer einzelnen Horizontalzelle auf der Reduktion der Gap Junctioninduzierten Kommunikation (*gap junction-induced communication*; GJIC) basiert, die wiederum durch die Modulation der Öffnungs- und Schließeigenschaften der jeweiligen Gap Junction-Kanäle bedingt ist.

Wie in Abschnitt 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben stellen Gap Junctions höchst variable Strukturen dar, deren Variabilität und Dynamik durch eine Vielzahl verschiedener Neurotransmitter und

Modulatoren (u.a. Dopamin, Retinsäure und Stickstoffmonoxid in der Vertebratenretina) gesteuert werden kann. Wie die einzelnen Modulatoren ihre Wirkung auf die Gap Junction-Kanäle bzw. ihre molekularen Bausteine entfalten und welche intrazellulären Signalkaskaden in die Regulation der der Gap Junctions involviert sind, ist jedoch noch relativ wenig bekannt. Als wird die ein wichtiger, grundsätzlicher Mechanismus Modulation des Phosphorylierungszustandes der beteiligten Connexine beschrieben, über den u.a. das gating und die Permeabilität der Gap Junction-Kanäle beeinflusst wird (Bloomfield und Völgyi, 2009), wobei unterschiedliche Befunde hinsichtlich der Korrelation von Connexin-Phosphorylierung und verringerter bzw. verstärkter Gap Junction-Kopplung vorliegen. Nachweise für eine Phosphorylierungs-induzierte Reduzierung der Zellkommunikation (bzw. der Gap Junction-Kopplung) wurden für eine Vielzahl von Connexinen in unterschiedlichen Spezies und Geweben erbracht (Reviewartikel: Lampe und Lau, 2004). So konnte z.B. gezeigt werden, dass das Cx49 vom Schaf (homolog zu menschlichem Cx50) durch Casein Kinase I phosphoryliert wird, woraus eine verminderte Gap Junction-vermittelte Kommunikation resultiert (Cheng und Louis, 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Cx56 vom Huhn (homolog zum menschlichen Cx46) an den Serin-Resten S118 und S493 durch PKCy phosphoryliert wird, was ebenfalls zu einer reduzierten Gap Junction-vermittelten Kommunikation führt (Berthoud et al., 1997, 2000). Eine Reihe von Studien legt auch in Bezug auf die Horizontalzellen eine gesteigerte Phosphorylierung als Mechanismus zur Entkopplung der Zellen nahe (Teranishi et al., 1983; Teranishi et al., 1984). Am besten untersucht ist in dieser Hinsicht sicherlich der Dopamin-vermittelte Einfluss. Dopamin bindet demzufolge an D1-Typ-Dopamin-Rezeptoren (auch D1-Rezeptoren) (DAR<sub>1</sub>), welche an der Plasmamembran der Horizontalzellen lokalisiert sind. Diese Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und es existieren Hinweise darauf, dass die weitere Vermittlung der Signale über einen intrazellulären cAMP-Anstieg und einer daraus resultierenden Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) sowie der weiterführenden Phosphorylierung der Connexine verläuft (Laufer et al., 1989; Reviewartikel: Laufer und Salas, 1993).

Hinsichtlich der Wirkungsweise von Retinsäure auf die Horizontalzellkopplung ist weitaus weniger bekannt. Bislang konnten zwei Gruppen von Retinoidrezeptoren identifiziert werden, die RA-Rezeptoren (RAR) und die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) (Levin *et al.*, 1992; Tate und Grippo, 1995). Beide Gruppen zählen allerdings zu den Kernrezeptoren, die zwar unterschiedliche Präferenzen für Retinsäure-Isoformen aufweisen, jedoch für eine mögliche membranständige Retinsäure-Bindestelle eher nicht in Frage kommen. Die bisher beschriebenen Auswirkungen der Aktivierung dieser Rezeptoren beziehen sich vor allem auf

ihren Einfluss auf die Genregulation während der embryonalen Entwicklung und in der Retina (Hyatt et al., 1993; Sakai et al., 2004; Dräger, 2006). Andererseits konnten bisher viele verschiedene Subtypen dieser Rezeptoren identifiziert werden, so existieren z.B. RARa, RAR $\beta$  und RAR $\gamma$  Rezeptoren, die jeweils durch ein eigenes Gen codiert werden (Zelent *et al.*, 1989; Lotan, 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass die Subtypen von Retinsäure-Rezeptoren durch alternatives Spleißen in eine Vielzahl weiterer Isoformen unterteilt werden können (z.B. RARa1 und RARa2). Durch unterschiedliche Bindungspräferenzen für verschiedene Retinsäure-Isoformen ergeben sich folglich auch vielfältige regulatorische Möglichkeiten sowohl bei der Kontrolle der Genexpression (Zhang et al., 1998; Idres et al., 2002), als auch auf der Ebene spezifischer Stoffwechsel- bzw. Signaltransduktionsvorgänge. Daher ist nicht auszuschließen, dass die nachgewiesenen Effekte der Retinsäure auf die Horizontalzellkopplung über einen spezifischen bisher noch nicht identifizierten Retinsäure-Rezeptorsubtyp vermittelt werden.

Darüberhinaus ist es aber auch denkbar, dass die Retinsäure-vermittelte Modulation der Gap Junctions der Horizontalzellen nicht über spezifische Membranrezeptoren gesteuert wird. Vielmehr ist Retinsäure, als hydrophobes Molekül, auch in der Lage die Zellmembran zu passieren und über eine direkte Interaktion mit löslichen Proteinen seine Wirkung intrazellulär zu entfalten. So konnte z.B. in der Kaninchenretina und im Rattenhirn eine direkte Interaktion von Retinsäure mit unterschiedlichen PKC-Isoformen nachgewiesen werden (Bouzinba-Segard *et al.*, 1994; Radominska-Pandya *et al.*, 2000).

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Zu den wichtigsten Eigenschaften des visuellen Systems gehört die Fähigkeit der schnellen Anpassung an sich ändernde Umgebungshelligkeiten (Adaptationsfähigkeit). Nur durch die Adaptation kann gewährleistet werden, dass die Vielzahl unterschiedlicher optischer Reize, die auf die Retina treffen effizient verarbeitet werden können. Dabei sind es vor allem retinale Adaptationsmechanismen, die zur Aufrechterhaltung der stets optimalen Lichtsensitivität des visuellen Systems gegenüber sich ändernden Umgebungshelligkeiten beitragen (vgl. 1.3). Horizontalzellen repräsentieren eines der ersten neuronalen Netzwerke in der Retina, welches durch intrazelluläre und molekulare Prozesse einen modulatorischen Einfluss auf die Signalstärke, der von den Photorezeptoren empfangenen optischen Reize ausübt und damit erheblich zur Lichtadaptationsfähigkeit der Retina beiträgt (Bloomfield *et al.*, 1995; Van Leeuwen *et al.*, 2009). Ihre charakteristische Eigenschaft ist die Fähigkeit durch eine intensive elektrische Kopplung über Gap Junctions ausgeprägte Netzwerke in der äußeren Retina auszubilden. Die Stärke der elektrischen Kopplung bzw. der Kopplungsgrad ist dabei abhängig von dem jeweilig herrschenden Umgebungslicht und dem damit verbundenen Adaptationszustand der Retina (Ribelayga und Mangel, 2007). So konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Lichtverhältnisse die Eigenschaften der Gap Junctions von Horizontalzellen hinsichtlich ihrer Kopplung (Baldridge und Ball, 1991; Xin und Bloomfield, 1999), ihres gating-Verhaltens (Mangel und Dowling, 1985) und ihrer Morphologie (Kurz-Isler und Wolburg, 1986; Kurz-Isler *et al.*, 1992) beeinflussen. Bisher ist allerdings nur wenig darüber bekannt, wie diese Modulation vermittelt wird, welche Connexine beteiligt sind und welche molekularen Mechanismen an der Signalübertragung innerhalb der Netzwerke homolog gekoppelter Horizontalzellen beteiligt sind.

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, zum einen den Kenntnisstand über die Identität der molekularen Bausteine der Gap Junctions in den Horizontalzellnetzwerken der Fischretina zu erweitern und zum anderen die Rolle von Proteinphosphorylierungssystemen an der Regulation bzw. der Modulation dieser Netzwerke am Beispiel des neu identifizierten Karpfenconnexins cpCx53.8 zu untersuchen.

Entsprechend konzentriert sich der erste Teil der Arbeit auf die Identifikation und Charakterisierung von Connexinen, die in Horizontalzellen der Karpfenretina exprimiert werden. Vorangegangene Studien (RACE-PCR, *in situ* Hybridisierungen) der Arbeitsgruppe Neurobiologie (Diplomarbeit Gabi Ommen, 2009; unveröffentliche Arbeiten von Frau Dr. Petra Dirks, 2008-2009) liefern erste Hinweise auf horizontalzellspezifische Connexingene in der Karpfenretina. Sequenzabgleiche mit bereits bekannten Zebrafischconnexinen (u.a. drCx52.6 und drCx55.5) untermauern eine horizontalzellspezifische Expression der identifizierten Connexine. Die Fragestellungen bzw. die Arbeitshypothesen für den ersten Teil der Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Welche Connexine werden in den Horizontalzellen der Karpfenretina exprimiert?
- Wie ist das Verteilungsmuster dieser Connexine in den unterschiedlichen Horizontalzellsubtypen?

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit umfasst vor allem Untersuchungen, die sich mit der Modulation der Gap Junction-vermittelten Kopplung von Horizontalzellen beschäftigen. Hierbei gilt es vor allem einen vertiefenden Einblick in die molekularen Hintergründe und zellbiologischen Abläufe zu erlangen, welche eine Veränderung der Gap Junction-induzierten Kommunikation bewirken. Der Einfluss auf die Horizontalzellconnexine der Karpfenretina wurde in dieser Arbeit exemplarisch am Connexin cpCx53.8 untersucht. Dieses Connexin wird, wie im ersten Teil meiner Arbeit nachgewiesen, in allen vier Horizontalzellsubtypen der Karpfenretina exprimiert und scheint demnach maßgeblich an der Bildung von Gap Junctions zwischen den Horizontalzellen beteiligt zu sein.

Zusammenfassend lässt sich die Zielsetzung des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit wie folgt formulieren:

- Handelt es sich bei cpCx53.8 um ein Phosphoprotein?
- Besteht eine Korrelation zwischen der lichtabhängigen Modulation des Kopplungsverhaltens von Horizontalzellen und der Phosphorylierung von cpCx53.8?
- Welche Signalvorgänge/Neuromodulatoren sind an der Vermittlung der lichtabhängigen Modulation beteiligt?
- Wie wird die lichtabhängige Modulation des Verteilungsmusters cpCx53.8-enthaltener Gap Junctions in der Retina vermittelt?

Durch den kombinativen Einsatz physiologischer und molekularbiologischer Methoden wurde ergründet, ob ein veränderter Phosphorylierungszustand von cpCx53.8 als Mechanismus zur Regulierung der Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen in Frage kommt. Unter Berücksichtigung der triphasischen Modulation der Horizontalzellkopplung wurden zuerst die Einflüsse unterschiedlicher retinaler Adaptationszustände auf die Kopplungseigenschaften der Horizontalzellen und die Phosphorylierung von cpC53.8 untersucht. Im weiteren Verlauf wurden die potentiellen lichtabhängigen Neuromodulatoren Dopamin und Retinsäure auf deren modulatorischen Einfluss getestet und verglichen, ob die jeweiligen Effekte der lichtabhängigen Modulation entsprechen. Außerdem galt es, durch den Einsatz verschiedener Proteinkinase-Aktivatoren und Inhibitoren Hinweise auf die intrazellulären Signalvorgänge und Kaskaden zu erhalten, welche an der Vermittlung der Dopamin- und Retinsäure-Effekte beteiligt sind.

Neben der Modulation des Phosphorylierungszustandes von cpCx53.8 wurde untersucht, welche Auswirkungen die unterschiedlichen Adaptationszustände auf das Verteilungsmuster von cpCx53.8 innerhalb der Retina haben. Lichtabhängige Veränderungen des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters wurden äquivalent zur Modulation des Phosphorylierungszustandes von cpCx53.8 hinsichtlich putativer Dopamin- und Retinsäure-vermittelter Signalkaskaden untersucht.

### 2. Material und Methoden

#### 2.1 Versuchstiere

Die proteinbiochemischen sowie die immunhistologischen Versuche wurden größtenteils an 1-2 jährigen Karpfen (*Cyprinus carpio*) durchgeführt, welche von einer Fischfarm in Visbek bezogen wurden. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden vor allem an Goldfischen (*Carassius auratus auratus*) durchgeführt. Für die Intrazellulärableitungen wurden die Fische von der Dalhousie University (Aquatron, Halifax, Kanada) bezogen. Die Goldfische für die Injektionsversuche stammten von einem Lieferanten aus Oldenburg. Die Tiere wurden in einem Bassin unter Simulation eines 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus bei ca. 10 °C Wassertemperatur gehalten.

Alle, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuchtiere wurden entsprechend der jeweiligen institutstionellen Maßgaben zum Tierschutz der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg (Deutschland) und der Dalhousie University, Halifax (Kanada) gehalten und behandelt. Die gesetzlichen Bestimmungen zum Tierschutz, welche von der deutschen bzw. der kanadischen Regierung festgelegt sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit befolgt.

#### 2.2 Präparationen der Augenbecher und Retinen

Vor Beginn der Präparation wurden die Fische für eine Stunde dunkeladaptiert und danach durch einen Schnitt durch die Wirbelsäule getötet. Mit einer dünnen Schere wurden sowohl das Gewebe rund um das Auge als auch der optische Nerv durchtrennt und das Auge aus der Augenhöhle entnommen. Mit einer Lanzette wurde ein Loch direkt unterhalb der Iris gestochen und mit einer feinen Schere entlang des Randes der Iris geschnitten, so dass schließlich der gesamte vordere Teil des Auges mit der Linse und dem Glaskörper (dioptrischer Apparat) entfernt werden konnte. Zur immunhistologischen Untersuchung wurde die Retina im Augenbecher belassen, in L15 Medium (Leibovitz L15 Medium, Sigma-Aldrich. siehe Anhang, S. 159) überführt und entsprechend der jeweiligen Inkubationsbedingung inkubiert (siehe Tabelle 2.1). Für die proteinbiochemischen Analysen sowie für die Intrazellulärableitungen wurde die Retina aus dem Augenbecher isoliert. Hierzu wurde der Augenbecher in eine Petri-Schale mit HEPES-Fischringer (siehe Anhang, S. 158) oder L15 Medium überführt und mit leichtem Druck auf den hinteren Teil des Augenbechers die Retina vorsichtig aus dem Auge herausgeschwemmt.

#### 2.3 In vitro Inkubationsbedingungen zur Modulation retinaler Connexine

Für die proteinbiochemischen Modulationsversuche wurden die isolierten Retinen in Schraubdeckelgläschen mit L15 Medium überführt und für 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur (RT) equilibriert. Anschließend wurden die Retinen entsprechend der jeweiligen Versuchsvorgaben in neues L15 Medium überführt und mit den in Tab. 2.1 aufgelisteten Neuromodulatoren und Proteinkinase-Inhibitoren inkubiert. Zur Lichtadaptation wurden die Retinen für 45 Minuten bei einer Lichtintensität von ca. 1.000 candela/m<sup>2</sup> (cd/m<sup>2</sup>, photopische Bedingungen, entspricht in etwa einer Beleuchtungsstärke von 5.000 lux) in L15 Medium inkubiert (RT). Als Lichtquelle diente eine Schwanenhals-Kaltlichtlampe KL1500 (Firma Schott AG, Mainz, Deutschland). Die Kontrollbedingungen der Dunkeladaptation wurden durch eine 45minütige Inkubation in L15 Medium bei sehr schwachem Rotlicht (mesopische Lichtverhältnisse) erzeugt (Lichtintensität ca. 30 cd/m<sup>2</sup>  $\triangleq$  20 lux). Für die dauerhafte Dunkeladaptation wurden die Retinen in L15 Medium für 3 Stunden bei Dunkelheit inkubiert (RT) (Lichtintensität ca. 0,002 cd/m<sup>2</sup>). Aufgrund der langen Inkubationszeit wurden in diesem Fall 2 Medienwechsel durchgeführt (jeweils nach 1 Stunde).

| Modulator/ Inhibitor               | Endkonzentration | Hersteller              |
|------------------------------------|------------------|-------------------------|
|                                    |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
|                                    |                  | GmbH, Steinheim,        |
| Dopamin (DA)                       | 500 µM           | Deutschland             |
|                                    |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
| Pargylin (Antioxidans)             | 20 µM            | GmbH, Steinheim         |
|                                    |                  | Promega GmbH, Mannheim, |
| 8-Bromo-zyklisches AMP (8-Br-cAMP) | 200 µM           | Deutschland             |
|                                    |                  | Promega GmbH, Mannheim, |
| 8-Bromo-zyklisches GMP (8-Br-cGMP) | 10 µM; 100 µM    | Deutschland             |
|                                    |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
|                                    |                  | GmbH, Steinheim,        |
| all-trans Retinsäure (at-RA)       | 10 µM            | Deutschland             |
|                                    |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
|                                    |                  | GmbH, Steinheim,        |
| 9-cis-Retinsäure (9-cis RA)        | 10 µM            | Deutschland             |
|                                    |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
|                                    |                  | GmbH, Steinheim,        |
| 13-cis-Retinsäure (13-cis RA)      | 10 µM            | Deutschland             |
| Microcystin LR (MC-LR) (PP2A-      |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
| Inhibitor)                         | 0,5 nM           | GmbH, Steinheim         |
| H89 (Dihydrochloride Hydrate) (PKA |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
| Inhibitor)                         | 2 µM             | GmbH, Steinheim         |
|                                    |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
| Staurosporin (PKC Inhibitor)       | 1 µM             | GmbH, Steinheim         |
|                                    |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
| Phorbol-12,13-Dibutyrat (PDBu)     | 10 µM            | GmbH, Steinheim         |
|                                    |                  | Sigma-Aldrich Chemie    |
| KN62 (CamKII-Inhibitor)            | 5 µM             | GmbH, Steinheim         |
|                                    | •                | Promega GmbH, Mannheim, |
| UO126 (MEK/MAP-Kinase Inhibitor)   | 5 µM             | Deutschland             |
|                                    | •                | Sigma-Aldrich Chemie    |
| SCH23390 (D1-Dopamin Rezeptor      |                  | GmbH, Steinheim,        |
| Antagonist                         | 10 µM            | Deutschland             |

Tab. 2.1: Verwendete Neuromodulatoren und Proteinkinase-Inhibitoren

Die Inkubation der Retinen mit den jeweiligen Modulatoren erfolgte für 45 Minuten in L15 Medium (RT). Entsprechende Präinkubationen mit den Proteinkinase-Inhibitoren bzw. mit dem D1-Dopamin-Rezeptor Antagonisten SCH23390 erfolgten vor der jeweiligen Inkubation mit den Modulatoren, respektive entsprechender Licht- oder Dunkeladaptationen für 15 Minuten in L15 Medium. Anschließend erfolgte die weitere Behandlung mit der Kombination des Modulators und des jeweiligen Inhibitors bzw. Antagonisten. Die Dopamin-Inkubation erfolgte immer in Kombination mit dem Antioxidans Pargylin. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird dies nur noch als Dopamin-Inkubation bezeichnet. Die Retinen wurden in Homogenisierungspuffer (HP<sub>2</sub>; siehe Anhang, S.158) mit Hilfe eines Glaspotters

homogenisiert (je nach Größe der Retinen wurden zwischen 150 und 200  $\mu$ l HP<sub>2</sub> verwendet). Zum Abstoppen jeglicher Phosphataseaktivität bzw. zur Blockierung des proteasomalen Abbaus der Proteine wurde dem Puffer jeweils 1  $\mu$ M Protease Blocker und Phosphatase Blocker (ProtStop, PhosStop; Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) zugefügt. Das erhaltene Homogenat wurde entsprechend der in 2.4.1 beschriebenen subzellulären Fraktionierung weiterbehandelt.

#### 2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.4.1 Subzelluläre Fraktionierung

Vor der weiteren Verarbeitung des Totalhomogenates (TH) wurden je nach Bedarf 10-20  $\mu$ l für die gelelektrophoretische Kontrolle der Fraktionierung entnommen und auf Eis gelagert. Das restliche TH wurde für 10 min bei 1.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand (Ü1) wurde vorsichtig entnommen, in ein Eppendorf Cup überführt und ebenfalls auf Eis gestellt. Das Pellet wurde je nach Größe bzw. Anzahl der verwendeten Retinen in 50-200  $\mu$ l HP<sub>2</sub> rehomogenisiert und erneut abzentrifugiert (10 min, 1.500 rpm, 4 °C). Der erhaltene Überstand (Ü2) wurde wiederum vorsichtig abgesaugt und mit dem Ü1 vereint. Das erhaltene Pellet (P1) stellt die sog. grobe Kernfraktion dar, in der vor allem die Zellkerne und andere schwere Zellbestandteile/grober Zelldebris enthalten sind. Die vereinten Überstände wurden erneut zentrifugiert (60 min, 14.000 rpm, 4 °C). Das gewonnene Pellet (P2) entspricht einer groben Membranfraktion, in der vor allem membranständige Proteine konzentriert sind. Im Überstand (Ü2) befinden sich hauptsächlich die cytosolischen Proteine (cytosolische Fraktion). Zur exakten Bestimmung der in den einzelnen Fraktionen vorliegenden Proteinkonzentration wurde die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) durchgeführt.

#### 2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Das Prinzip der Bradford-Proteinbestimmung beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 in Gegenwart von Proteinen ein verändertes Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm aufweist. Vor der photometrischen Analyse der Retinaproben wurde eine Eichgrade mit Rinderserumalbumin-Standard (BSA) erstellt. Die Ausgangskonzentration der eingesetzten BSA-Lösung betrug 1 mg/ml. Im Dreifachansatz wurden jeweils Verdünnungen mit 5, 10, 15 und 20  $\mu$ g BSA pro 3 ml Bradford-Reagenz (siehe Anhang, S. 157) angesetzt. Nach 15 minütiger Wartezeit wurden die Extinktionen der Verdünnungen bei 595 nm in einem Zweistrahlphotometer (LibraS12; Firma BioChrom) gemessen. Von den zu untersuchenden Proben wurden jeweils 3  $\mu$ l pro 3 ml Bradford-Reagenz eingesetzt und ebenfalls bei 595 nm gemessen. Anhand der erhaltenen Extinktionen konnte nun mit Hilfe der Eichgrade die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

#### 2.4.3 Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

#### Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen aus einem Homogenat mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Durch die Behandlung mit SDS (sodiumdodecylsulfate) werden die Eigenladungen eines Proteins überlagert, was dazu führt, dass alle Proteine eines Gemisches eine negative Ladung erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die SDS-PAGE Proteinkonzentrationen zwischen 40 und 60 µg eingesetzt. Die Probenvorbereitung erfolgte jeweils nach dem gleichen Schema. Nach der Proteinbestimmung wurde die jeweilige Menge x der Probe entnommen und in ein Eppendorf-Cup vorgelegt. Mit HP<sub>2</sub> wurde auf 30 µl aufgefüllt und jeder Probe wurden 15 µl 3 x SDS-Puffer (siehe Anhang, S. 157) zugesetzt. Durch zusätzliches Erhitzen der Proben (4 minütiges Kochen) wurden die Proteine denaturiert. Die denaturierten, negativ geladenen Peptidketten konnten nun anhand einer elektrischen Spannung in einem Polyacrylamidgel separiert werden, wobei die Laufgeschwindigkeit von der Länge der Polypeptidketten abhängig ist. Durch diese Abhängigkeit lassen sich die einzelnen Proteine direkt im Gel voneinander trennen. Durch Variationen Polyacrylamidkonzentrationen durch der bzw. Erzeugen eines Polyacrylamidkonzentrationsgradienten können des Weiteren die Auftrennungsbereiche eines Gels variiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Polyacrylamidgele mit einem 8-10% igen Polyacrylamidkonzentrationsgradienten verwendet. Die Trenngele wurden entsprechend der Tab. 2.2 zusammenpipettiert und in einen Gradientenmischer mit zwei voneinander getrennten Mischkammern gegeben. Durch den Zufluss des 8% igen Gels in die Mischkammer des 10% igen Gels und durch gleichzeitigen Auslauf der Gellösungen in die Gelkammern wurde ein entsprechender Gradient mit 10% iger Acrylamidkonzentration im unteren Bereich des Gels und 8% iger Acrylamidkonzentration im oberen Bereich des Gels erzeugt. Die noch flüssigen Gele wurden direkt im Anschluss mit einer 0,1% igen SDS Lösung überschichtet und für ca. 30 Minuten zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach erfolgter Polymerisation wurde über das Trenngel ein Sammelgel gegossen (Tab. 2.3). Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer konstanten Spannung von 160 V für 1,5–2 Stunden.

|                             |       | 9     |
|-----------------------------|-------|-------|
| Trenngel                    | 8 %   | 10 %  |
| Aqua bidest (ml)            | 4,35  | 3,75  |
| Bisacrylamid (ml)           | 2,40  | 3,00  |
| 1,5 M Tris/ HCI pH 8,8 (ml) | 2,25  | 2,25  |
| APS (10 %) (µl)             | 20,00 | 20,00 |
| TEMED (ul)                  | 20.00 | 20.00 |

Tab. 2.2: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele

Tab. 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Sammelgele

| Sammelgel                   |       |
|-----------------------------|-------|
| Aqua bidest (ml)            | 2,90  |
| Bisacrylamid (ml)           | 0,75  |
| 1,5 M Tris/ HCl pH 8,8 (ml) | 1,25  |
| APS (10 %) (µl)             | 40,00 |
| TEMED (µl)                  | 20,00 |

#### 2.4.4 Western-Blot nach Towbin et al., (1979) und ECL-Nachweisreaktion

Die, in dem Polyacrylamidgel separierten Proteine wurden mit Hilfe der Western-Blot Methode (Immuno-Blot) auf eine Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 85; Firma Schleicher und Schuell, Deutschland) transferiert. Hierbei wird eine exakte Replik, der zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf der Trägermembran erzeugt. Der Transfer erfolgte in einer Blotkammer (Mini Protean II Dual slab cell; Firma Biorad, Deutschland), die vollständig mit Transferpuffer (siehe Anhang, S. 160) befüllt war, in der das Gel auf die Membran jeweils zwischen zwei Whatman-Filterpapieren und jeweils einem dünnen Schaumstoffschwamm auf die Nitrozellulosemembran gebettet wurde. Der Transfer, der negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 500 nA für eine Stunde. Im Anschluss daran wurde die Membran aus der Blottingapparatur entfernt und die auf ihr gebundenen Proteine mit Hilfe einer Ponceau-Rot Färbung sichtbar gemacht. Die Ponceau-Färbung diente vor allem dazu, den vollständigen Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen und die Vergleichbarkeit der Proteinmengen innerhalb der jeweiligen Proben zu kontrollieren. Nachdem die sichtbar gewordenen Markerbanden des eingesetzten HMW- bzw. LMW-Markers (High Molecular Weight, respektive Low Molecular Weight; siehe Anhang, S. 158 bzw. S. 159) mit einem Kugelschreiber nachgezogen wurden, wurde die Membran zuerst mit Aqua bidest und anschließend mit TBST-Puffer (siehe Anhang, S. 160) bei leichtem Schütteln vollständig entfärbt. Durch eine anschließende Inkubation der Membran in einer 5% igen Magermilchlösung (5 % Magermilchpulver gelöst in TBST) für eine Stunde bei 37 °C wurden alle potentiell unspezifischen Bindungen auf der Membran blockiert. Zur Detektion bestimmter Proteine auf der Membran wurde diese mit dem jeweils entsprechenden primären Antikörper (siehe Anhang, Tab. 8.3, S. 155) inkubiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach 3 x 10minütigem Waschen mit TBST erfolgte die weitere Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (siehe Anhang, Tab. 8.3, S. 155) für zwei Stunden (RT) in einer 0,2% igen Magermilchlösung (gelöst in TBST). Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit TBST erfolgte der Immunonachweis mit Hilfe der Enhanced Chemiluminescence Methode (ECL). Diese Methode stellt eine luminometrische Nachweisreaktion dar, bei der die luminogene Substanz (Luminol) in ein elektronisch angeregtes Produkt umgewandelt wird. Unter alkalischen Bedingungen wird Luminol bei der Peroxidase-katalysierten Umsetzung von H2O2 über mehrere Zwischenstufen und unter Abspaltung von N<sub>2</sub> zu einem kurzlebigen, energiereichen, zyklischen Peroxid oxidiert. Die Aufspaltung der Peroxidbindungen und die dabei freiwerdende Energie führen zur Anregung der beiden Carbonylbindungen, dieses führt anschließend zur Chemilumineszenz. Zur Durchführung wurden die Reaktionslösungen (Luminol und Peroxidase; Pierce Thermo Fischer Scientific GmbH, Deutschland) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf den Blot (Membran) aufgetragen. Die jeweiligen sekundären Antikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche bei der einsetzenden Reaktion die Luminolreaktion katalysiert. Durch diese Katalyse wird Licht freigesetzt (Chemilumineszenz), das mittels lichtempfindlicher Röntgenfilme (Kodak X-O-MAT) in einer Dunkelkammer detektiert wurde. Durch eine Behandlung mit sog. Strip-Puffern (Strip-Puffer 1, Strip-Puffer 2; siehe Anhang, S. 160) war es möglich dieselbe Membran für mehrmalige Immuno-Nachweisreaktionen zu verwenden (Behandlung mit Strip-Puffer 1 für 1 Stunde bei 37 °C, anschließend mit Strip-Puffer 2 für 2 Stunden bei 37 °C, jeweils unter starkem Schwenken).

#### 2.4.5 Dephosphorylierung retinaler Proteine

Eine Dephosphorylierung aller in der jeweiligen vorhandenen Phosphoproteine erfolgte mit plazentaler alkaliner Phosphatase (AP) aus dem Rind (Boehringer Mannheim, Deutschland). Dazu wurden die Retinen wie in 2.3 beschrieben unter den gegebenen Bedingungen inkubiert. Die Homogenisierung erfolgte in diesem Fall in einem abgewandelten Homogenisierungspuffer (HPAP; siehe Anhang, S. 159), der außerdem nicht mit dem Phosphatase Blocker versetzt wurde. Nach entsprechender Homogenisierung und subzellulärer Fraktionierung wurden von den Membranfraktionen die entsprechenden Proteinmengen für die spätere Auftrennung mittels SDS-PAGE (siehe 2.4.3) in ein Eppendorf-Cup gegeben und für 2 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Durch diese Behandlung wurde jegliche enzymatische Aktivität innerhalb der Probe verhindert. Im Anschluss wurden die Proben mit jeweils 6 µl AP versetzt und mit HPAP auf 30 µl aufgefüllt.
Dieser Reaktionsansatz wurde für ca. 19 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die weitere Aufbereitung der Proben für die SDS-PAGE bzw. die Western Blot Analysen erfolgte entsprechend der in 2.4.3 gemachten Angaben.

#### 2.5 Herstellung retinaler Primärkulturen

Für die Immuncytochemie und die Analyse der relativen Expressionsprofile der Connexine in Horizontalzellen wurden Primärkulturen der Karpfenretina hergestellt. Dazu wurden die Retinen enzymatisch und mechanisch trituriert und die gewonnene Zellsuspension anschließend auf gereinigten Objektträgern ausplattiert. Diese wurden vorab mit einer 20% igen Poly-L-Lysin Lösung beschichtet, um die Adhäsion der Zellen an das Substrat und ihr Überleben zu unterstützen. Für die Beschichtung wurde ein Bereich auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet (ca. 1/3 der Größe des Objektträgers). In diesen wurden 1,5 ml der Poly-L-Lysin-Lösung gegeben und die Beschichtung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Für die Dissoziation wurden die präparierten Retinen (siehe 2.2) mit einer Rasierklinge geviertelt und anschließend in einer Papain/Cystein-Lösung (siehe Anhang S. 159) für 15 Minuten auf einem Rüttler in einem ersten Schritt enzymatisch dissoziiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Retinastücke mit einer großporigen abgeflammten Pasteurpipette in ein L15 Medium/10 % FCS (Fötales Kälberserum) überführt und 2 x für 5 Minuten auf dem Rüttler inkubiert. Anschließend erfolgte mit feinporigen, abgeflammten Pasteurpipetten die schrittweise mechanische Dissoziation der Retinastücke in L15 Medium (je nach Größe der Retina in ca. 1-2 ml L15 Medium), um eine weitestgehend von Photorezeptoren und ihren Außensegmenten befreite Suspension retinaler Zellen zu erhalten. Die laufende Überprüfung der Dissoziation und Qualität der Zellsuspension erfolgte mikroskopisch. Von der Zellsuspension wurden 300 µl auf die beschichteten und vorher noch 3 x mit L15 Medium gewaschenen Objektträger aufgetragen. Die Sedimentation der Zellen erfolgte für mindestens 45 Minuten (RT). Danach wurden die Zellen entweder für die immuncytochemische Untersuchung weiter behandelt (vgl.2.6.3) oder die Subtypen von Horizontalzellen wurden direkt für die Expressionsanalyse (vgl. 2.7.2 ff) mit Hilfe von Mikromanipulatoren und Mikropipetten am Mikroskop aufgesammelt.

#### 2.6 Histologische Methoden

#### 2.6.1 Fixierung der Augenbecher und retinaler Primärkulturen

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Augenbecher, die den verschiedenen Inkubationsbedingungen (siehe Tab. 2.1) ausgesetzt waren, im Anschluss zweimal in einer 2% igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA, siehe Anhang, S. 160) für 10 Minuten fixiert. Desgleichen wurden für die immuncytochemischen Untersuchungen die auf beschichteten Objektträgern aufgetragenen retinalen Primärkulturen (vgl. 2.5) fixiert. Durch die Fixierung wird verhindert, dass die in den Zellen enthaltenen Stoffe (Zellkompartimente, Proteine etc.) abgebaut werden. Das Gewebe sowie die Proteinverteilung in den Zellen wird somit dauerhaft in dem Zustand erhalten der zum Zeitpunkt der Fixierung vorlag. Nach der PFA-Behandlung wurden die Augenbecher 3 x 10 Minuten mit 0,1 M PB-Puffer (siehe Anhang S. 159) gewaschen und anschließend in eine 30% ige Succrose-Lösung überführt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.6.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Nach der Entnahme aus der Succrose-Lösung wurden die Augenbecher einzeln in eine Kryomatrix (Medite Medizintechnik, Kryoblock) und unter flüssigem Stickstoff eingebettet. Der jeweilige Kryoblock wurde anschließend in ein Gefriermikrotom (Firma Bright, Instrument Company Ltd, Huntingdon, England) eingespannt und bei einer Temperatur von - 24 °C wurden 15-18 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Aufnahme der Gefrierschnitte erfolgte auf gelatinisierten Objektträgern (Menzel, 76 x 26 mm), die weitere 30 Minuten auf einer Wärmeplatte (30 °C) zur besseren Anheftung der Schnitte wurden. Die Schnittpräparate konnten nun direkt immunhistologisch weiterbearbeitet werden oder bei -20 °C bis zur weiteren Behandlung aufbewahrt werden.

#### 2.6.3 Immunhistochemie/ Immuncytochemie

In der vorliegenden Arbeit wurden die zu charakterisierenden Antigene mittels der sensitiven indirekten immunhistochemischen/immuncytochemischen Methode nachgewiesen. Dabei werden spezifische sekundäre Antikörper verwendet um an das Antigen gebundene spezifische primäre Antikörper zu detektieren. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Fluorchrom kann mit Hilfe von Laserstrahlen entsprechender Wellenlänge angeregt werden, wodurch es zur Fluoreszenz kommt die mittels Fluoreszenzmikrokopie erfasst werden kann. Zur Durchführung wurden die Objektträger mit den Gefrierschnitten bzw. den fixierten retinalen Primärkulturen nach dem folgenden Standard-Protokoll weiter bearbeitet:

- 3 x 10 min in 0,1 M PB-Puffer bei RT waschen
- 1 Stunde mit Chemieblocker (CTA) in einer Feuchtkammer blockieren
- Inkubation mit dem primären Antikörper verdünnt in CTA über Nacht bei 4°C

- 3 x 10 min in 0,1 M PB-Puffer bei RT waschen
- 2 Stunden Inkubation mit dem sekundären Antikörper verdünnt in CTA bei RT
- 3 x 10 min in 0,1 M PB-Puffer bei RT waschen

- Eindeckeln der Objektträger mit Vectashield (Vector Laboratories)

Die Auswertung der Objektträger erfolgte ausschließlich am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS SL), und die Quantifizierung der Immunoreaktivität erfolgte mit dem frei erhältlichen Programm ImageJ (NIH, Bethesda, MD). Die finale Bildbearbeitung und die Zusammenstellung verschiedener repräsentativer Ausschnitte unterschiedlicher Inkubationsoder Adaptationsbedingungen erfolgten mit Adobe Photoshop CS<sup>®</sup> (Adobe Systems Incorporated, USA).

#### 2.6.4 Konfokale Lasermikroskopie; Auswertung mittels ImageJ

Die Retinaschnitte wurden am konfokalen Laserscanning-Mikroskop in z-Richtung über einen Bereich von 2 µm gescannt (63x-Ölobjektiv). Der jeweilige Bereich wurde in 16 Abschnitte (*selection*) unterteilt und jeder dieser Abschnitte wurde zweimal gescannt (*average*). Das gemittelte Bild für die dargestellte Projektion aller Bilder (*Projection*) wurde mit einer Bildgröße von 1024 x 1024 Pixel verwendet. Je nach Versuchsbedingungen wurden die Querschnitte unterschiedlicher Inkubationsbedingungen bzw. Adaptationsbedingungen auf einem Objektträger analysiert. Vor Beginn des *Scan*-Vorgangs wurden die *Gain-* und *Offset*-Einstellungen festgelegt. Der *Gain*-Wert dient zur Verstärkung des detektierten Signals und der *Offset*-Wert legt einen Schwellenwert fest, so dass ausschließlich Signale detektiert werden, die oberhalb dieses Wertes liegen. Hierdurch können mögliche Hintergrundsignale weitestgehend reduziert werden, so dass sie bei der späteren Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Pro Querschnitt wurden drei Aufnahmen aus dem zentralen Bereich der Retina gemacht. Die *Gain-* und *Offset*-Einstellungen wurden für alle weiteren Bedingungen im Hinblick auf die Immunoreaktivität sicherzustellen.

Zur Auszählung immunoreaktiver Plaques auf den Retinaschnitten wurde im ImageJ Programm eine *Selection* mit gleich bleibender Größe (200  $\mu$ m x 200  $\mu$ m) festgelegt. Pro Aufnahme wurden jeweils fünf dieser Auswahlquadrate im Bereich der cpCx53.8-Immunoreaktivität (OPL und distale INL) ausgezählt. Innerhalb der *Selection* wurde ein Grenzwert (*Threshold*) zur Detektion eines Spots festgelegt, der die Helligkeit der auszuzählenden Spots bestimmt. Durch Einstellen einer minimalen Spotgröße (2  $\mu$ m<sup>2</sup>)wurden eventuelle Hintergrundfärbungen von der Zählung ausgeschlossen. Nach einmaligem Einstellen des *Threshold* und der Spotgröße wurden die entsprechenden Werte für alle untersuchten Retinaschnitte beibehalten, um eine eindeutige Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Für die Auswertung der Anzahl der Plaques wurden die Mittelwerte ( $\pm$ Standardabweichung) aus den Auswahlquadraten für jede Bedingung in Excel (Microsoft Office Excel 2003, USA) ermittelt und die Ergebnisse der unterschiedlichen Inkubations- und Adaptationsbedingungen für die einzelnen Präparationen graphisch dargestellt. Die erhaltenen Mittelwerte wurden mittels des student *t*-Tests auf Signifikanz geprüft. Hierbei wurde die folgende Abstufung der Signifikanz in Bezug auf die ermittelten p-Werte festgelegt: p > 0,05 (nicht signifikant, n.s.); p < 0,05 (signifikant, \*), p < 0,01 (sehr signifikant, \*\*), p < 0,001 (höchst signifikant, \*\*\*).

#### 2.6.5 Elektronenmikroskopie

Für die ultrastrukturelle Analyse der Connexin-Immunoreaktivität in der Karpfenretina erfolgte die Fixierung der aus dem Augenbecher isolierten Retina in 3 % PFA/ 3 % Sucrose in 0,1 M PB-Puffer für 40 Minuten bei RT. Nach dem Waschen (3 x 10 min in 0,1 M PB-Puffer, RT) wurden die Retinen über Nacht bei 4°C in Gefrierschutzlösung (30 % Sucrose in 0,1 M PB-Puffer) inkubiert und anschließend wurden Retinaviertel unter flüssigem Stickstoff als Flatmounts auf gefrorene Kryomatrix aufgefroren. Von den entsprechenden Retinastücken wurden am Gefriermikrotom ca. 60 µm dicke tangentiale Schnitte erstellt, die zunächst mit einer 10% igen NGS-Lösung (normal goat serum, in 0,1 M PB-Puffer) bei 4 °C über Nacht blockiert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Konzentration (siehe Tab. 3) für 4 Tage bei 4 °C. Zur Vermeidung möglicher Bakterienbildung wurde dem Inkubationsansatz zusätzlich 0,02 % Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) zugegeben. Nach intensivem Waschen in 0,1 M PB-Puffer (min. 3 x 30 min) wurden die Schnitte mit einem biotinylierten sekundären Antikörper (biotinylated goat anti-rabbit; 1:250 in PB + 0,02 % Natriumazid) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion der mit primärem und sekundären Antikörpern markierten Antigene erfolgte nach intensivem Waschen in PB-Puffer mit dem "Vectastain Elite ABC-Kit" (Vector Laboratories). Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Postfixierung der Schnitte in 1,6 % Glutaraldehyd, 2 % Paraformaldehyd, 3 % Sucrose in 0,1 M PB-Puffer für eine Stunde bei RT. Zur Intensivierung Immunomarkierungen wurden die Präparate bei 60 °C für 10 Minuten mit 2,6% der Hexamethylentetramin, 0,2 % Silbernitrat und 0,2 % Borax behandelt, wobei zwischen allen Inkubationsschritten jeweils ein Waschschritt mit 0,1 M PB-Puffer für ca. 20 Minuten erfolgte. Zur Kontrastierung und besseren Fixierung von Membranen erfolgte anschließend

eine einstündige Inkubation der Präparate mit 1 % Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>) (in *Aqua bidest* gelöst) bei RT, und nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Acetonreihe (50–100 %) dehydriert und Epoxydharz (Agar100, Plano) eingebettet. Von den eingebetteten Präparaten wurden 90 nm dicke Schnitte erstellt und am Elektronenmikroskop (Firma Zeiss, 902, Deutschland) ausgewertet.

#### 2.7 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden mit Handschuhen ausgeführt, um mögliche Kontaminationen mit RNAsen zu verhindern. Die verwendeten Lösungen wurden ausschließlich mit DEPC-behandeltem Wasser (siehe Anhang, S. 157) hergestellt und die verwendeten Glaswaren zur Aufbewahrung von Puffern und Lösungen wurden zuvor durch 4-stündiges Ausbacken bei 200°C sterilisiert. Alle verwendeten Gerätschaften, welche keine Hitze vertragen wurden mit RNAse AWAY (Roth, Karlsruhe) entsprechend den Vorgaben des Herstellers behandelt.

#### 2.7.1 Klonierung von Karpfen Connexinen

Zur Extrahierung der Gesamt-RNA aus dem Gewebe der Karpfenretina wurde das NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Aus der gewonnenen RNA wurde mittels SuperScript® III Reverse Transkriptase (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) die "first-strand" cDNA umgeschrieben. Als interne Kontrolle zur Überprüfung der cDNA Qualität wurde die Expression von ß-Aktin mittels "intron-spanning Primern" (siehe Anhang, Tab. 8.4, S. 155/156) ermittelt. Um die Kodierungssequenzen der verschiedenen Karpfenconnexine zu erhalten wurde eine Reihe von Primern generiert, die komplementär zu den konservierten Regionen von Connexinen sind (Haefliger et al., 1992). Die partiellen cDNA Sequenzen wurden mit 1 Unit Taq DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) in Taq-Reaktionspuffer (siehe Anhang S. 160) amplifiziert [2 Minuten bei 95 °C, 45 x (30 Sekunden bei 95 °C, 1 Minute bei 56 °C, 1,5 Minuten bei 72 °C) und 10 Minuten bei 72 °C]. Die erhaltenen Transkripte wurden mittels Agarose Gelelektrophorese (siehe 2.7.5) aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert [QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)]. Danach wurden sie in einer zweiten PCR-Reaktion mit denselben Primern reamplifiziert, mittels eines pCR®II Vektors (Invitrogen, Groningen, Niederlande) einkloniert und anschließend sequenziert (LGC Genomics, Berlin, Deutschland). Um die gesamten Kodierungssequenzen (full-length coding sequences) der identifizierten Connexine zu erhalten wurden 5' und 3' Amplifikationen von cDNA-Enden durchgeführt (RACE-PCR) [BD SMART<sup>TM</sup> RACE kit (Clontech, Heidelberg, Deutschland)]. Durch die Kombination eines universellen Primer Mix (UPM, BD SMART<sup>TM</sup> RACE kit) mit den gen-spezifischen Primern (GSP5 und GSP3, siehe Anhang Tab. 8.4, S. 155/156/157) wurden die entsprechenden Bereiche der Connexingene amplifiziert. In einer nested-PCR unter Verwendung von nested Universal-Primern (NUP; BD SMART<sup>TM</sup> RACE kit) und nested gen-spezifischen Primern (NGSP5 und NGSP3, siehe Anhang Tab. 8.4, S. 155/156/157) wurden die Transkripte reamplifiziert. Anschließend wurden sie erneut mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels des pCR<sup>®</sup>II Vektors einkloniert. Ausgewählte Klone wurden sequenziert.

#### 2.7.2 Isolierung von mRNA aus einzelnen Horizontalzellen

Für diesen experimentellen Ansatz wurden die frisch hergestellten Primärkulturen der Karpfenretina (vgl. 2.5) verwendet. Die verschiedenen Subtypen (H1–H4) von Horizontalzellen wurden anhand ihrer charakteristischen, morphologischen Eigenschaften (vgl. Weiler, 1978) identifiziert und das Cytoplasma jeder Zelle wurde mit Hilfe einer Patch-Pipette in die Pipettenspitze gesaugt und in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegtem RNAse-Inhibitor (RNasin Plus, Promega GmbH) überführt. Um die Kontamination mit genomischer DNA in den Proben zu vermeiden wurden die Proben mit DNAse (DNAse Aplification Grade, Invitrogen) behandelt. Der Ansatz für eine DNAse-Behandlung ist der Tab. 2.4 zu entnehmen.

| RNA                                   | 1 μg                |
|---------------------------------------|---------------------|
| RNasin Plus® (40 U/µl)                | 1 μl                |
| 10 x DNase-I-Reaktionspuffer          | 1 μl                |
| DNase I Amplification Grade (10 U/µl) | 1 μl                |
| nukleasefreies Wasser                 | Auffüllen auf 10 µl |

Tab. 2.4: Ansatz der DNAse-Behandlung

Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die DNAse durch Zugabe von 1  $\mu$ l EDTA (25 mM) für zehn Minuten bei 65 °C inaktiviert.

#### 2.7.3 Reverse Transkriptase Reaktion

Das Umschreiben der in der Probe enthaltenen mRNA-Moleküle in cDNA erfolgte mit der "Reverse Transkriptase Superscript<sup>™</sup> III" (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde die Gesamt-RNA entsprechend dem nachfolgenden Schema weiterbehandelt:

| Gesamt-RNA            | 10 µl |
|-----------------------|-------|
| Oligo(dT) (500 µg/µl) | 1 µl  |
| dNTP-Mix (10 mM)      | 1 μl  |

Der erhaltene Reaktionsansatz wurde mit DEPC-Wasser auf 13  $\mu$ l aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Erststrangsynthese erfolgte nach der Zugabe der folgenden Substanzen:

| 5 x First-Strand Buffer                    | 4 µl |
|--|------|
| DTT (0,1 M)                                | 1 µl |
| RNAsin Plus (40 U/µl)                      | 1 µl |
| Superscript <sup>™</sup> III RT (200 U/µl) | 1 μl |

Im Anschluss wurde der Transkriptionsansatz für 60 Minuten bei 50 °C und anschließend für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert.

### 2.7.4 Primer Design und Polymerase Kettenreaktion (PCR); Einzelzell-PCR

Zum Herstellen der Primer für die vier untersuchten Connexine (cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5) wurde das Programm Primer3 OligoAnalyzer 3.1 verwendet (http://:eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer). Die Primer wurden von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die in dieser Arbeit für die Einzelzell-PCR verwendeten Primer sind im Anhang (Tab. 8.4, S. 155/156/157) aufgeführt.

Die Amplifikation der cDNA wurde mit der HotStar Taq DNA-Polymerase (Qiagen, Venlo, Niederlande) durchgeführt. Als Matrizen-DNA wurden Plasmid-DNA, genomische DNA, cDNA oder die Amplikons einer PCR verwendet. Für die PCR-Reaktion wurde entsprechend der verwendeten Probenanzahl der nachfolgende Reaktionsansatz erstellt, wobei 3 µl Template für den Nachweis eingesetzt wurden.

| Tab. 2 | 2.5: | PCR-Reaktionsansatz |
|--------|------|---------------------|
|--------|------|---------------------|

|                                     |                     | Endkonzentration |
|-------------------------------------|---------------------|------------------|
|                                     |                     | 1x (1,5 mM       |
| HotStar PCR Reaktionspuffer (10x)   | 2,5 µl              | MgCl2)           |
| dNTP-Mix (10 mM)                    | 0,5 µl              | 250 µM           |
| Forward Primer (10 pmol/µl)         | 2 µl                | 0,8 pmol/µl      |
| Reverse Primer (10 pmol/µl)         | 2 µl                | 0,8 pmol/µl      |
| HotStar Taq DNA-Ploymerase (5 U/µl) | 0,2 µl              | 0,04 U/µl        |
| Nuklease-freies Wasser              | auffüllen auf 25 µl |                  |
|                                     |                     |                  |

Nachdem die Proben zusammenpipettiert wurden, erfolgte die PCR-Reaktion in einem Thermocycler der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland). Zur Ermittlung der optimalen

Annealing-Temperatur wurden im Vorfeld verschiedene PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt. Die folgenden Connexinspezifischen PCR-Reaktionen wurden mit der jeweils ermittelten Annealing-Temperatur durchgeführt, bei der nur dieses eine spezifische DNA-Fragment mit der erwarteten Größe amplifiziert wurde (cpCx49.5 =  $68^{\circ}$ C, cpCx52.6 =  $63^{\circ}$ C, cpCx53.8 =  $63^{\circ}$ C, cpCx55.5 =  $61,2^{\circ}$ C).

#### 2.7.5 Agarose Gelelektrophorese

Für die Auswertung der PCR-Reaktionen wurden die Proben mittels Agarose Gelelektrophorese analysiert. Hierzu wurden ausschließlich 2% ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (1xTBE-Puffer; siehe Anhang S. 160) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach einer kurzen Abkühlphase unter ständigem Rühren wurde das handwarme Gel in einen Gelträger gegossen und durch Einsetzen eines Gelkamms wurden die Taschen für die Proben ausgespart. Die PCR-Proben wurden mit Ladepuffer (GelPilot Loading Dye 5x, Qiagen) versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard diente eine Standard-DNA-Leiter (peqGOLD DNA-Leiter Mix, siehe Anhang, S. 159) (Peqlab, Erlangen, Deutschland). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte für ca. 90 Minuten bei 110 V in einer horizontalen Gelkammer, die mit TBE-Puffer befüllt war. Die anschließende Auswertung erfolgte mit einem UV-Transilluminator in Kombination mit dem Programm UV-AlphaImager (Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland).

#### 2.7.6 In Situ Hybridisierung (ISH)

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) wurde an Gewebeschnitten von Karpfenretinen sowie an dissoziierten Zellen durchgeführt und diente zur Lokalisation der identifizierten Connexin-Transkripte (cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5) in der Retina bzw. den Subtypen von Horizontalzellen. Diese Methode beruht auf der Detektion spezifischer mRNA-Moleküle durch die Bindung Digoxigenin (DIG)-markierter Ribosonden an komplementäre mRNA-Sequenzen im Gewebe (Rapley und Manning, 1998). Zur Synthese der entsprechend markierten antisense- und sense cRNA-Ribosonden wurden pBluescript II KS+ Plasmide (Stratagene, Waldbronn, Germany) verwendet, welche Teilsequenzen spezifischer cDNA von cpCx52.6 (nt 709-1382), cpCx55.5 (nt 1053-1479), und cpCx49.5 (nt 712-1332) enthielten. Die Gewebeschnitte bzw. die dissoziierten Zellen wurden in 4 % PFA in PBS (pH 7,2) (Anhang, S. 159) für 20 min bei 4 °C fixiert und anschließend 3 x für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden sie für 5 Minuten mit 70% igem Ethanol behandelt und anschließend 2 x 10 Minuten mit Diethylpyrocarbonat-behandelten Wasser (H<sub>2</sub>O bidest) gespült. Nach einem 5minütigen Inkubationsschritt in 0,1 M HCl (Permeabilisierung) wurden die Schnitte Zellen für 20 Minuten mit einer 0,25% igen bzw. sauren Essigsäureanhydrid/Triethanolamin-Lösung (pH 8,0) (siehe Anhang, S. 157) behandelt. Danach wurden die entsprechenden Proben über eine ansteigende Ethanolreihe dehydriert und an der Luft getrocknet. Die sich anschließende Vorgehensweise bei der ISH erfolgte nach den detaillierten Vorgaben in Montag-Sallaz et al. (2003). Nach entsprechender Prähybridisierung (3 Stunden, 37 °C), wurden die Schnitte bzw. Zellen mit den jeweiligen DIG-cRNA Ribosonden für 16-18 Stunden bei 55 °C hybridisiert. Nach anschließendem Waschen der Proben (3 x 5 Minuten in PBS) wurden sie mit dem alkaline Phosphatase (AP)-konjugierten anti-DIG-Antikörper (Roche, Mannheim, Germany) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

#### 2.7.7 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Der grundsätzliche Ablauf der Hybridisierung erfolgte wie zuvor für die ISH beschrieben. Zur Detektion der entsprechenden Connexin-Transkripte wurden in diesem Fall DIG- und *Fluorescein* (FL)-markierte cRNA-Ribosonden verwendet. Nach der erfolgten Hybridisierung wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch eine 15-minütige Behandlung mit 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in PBS) abgestoppt. Die Proben wurden gewaschen (3 x 5 Minuten; PBS) und mit den jeweiligen Meerrettich-Peroxidase-konjugierten anti-DIG- bzw. anti-FL-Antikörpern inkubiert (über Nacht, 4 °C). Zur Visualisierung der Ribosonden wurde das TSA Plus *Cyanine 3 & Fluorescein* System (Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

#### 2.8 Zellbiologische Methoden (Zellkultur)

Die zellbiologischen Experimente erfolgten an einer sterilen *Clean-Bench* (Holten Laminair). Die verwendeten Medien und Puffer wurden sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Vor der jeweiligen Anwendung wurden sie auf 37 °C erwärmt.

#### 2.8.1 Kultivierung von N2A-Zellen

Für die Transfektionen und Expression spezifischer Connexin-Transkripte wurden Neuroblastoma Zellen (Neuro-2A-Zellen; N2A-Zellen) verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert (in DMEM-Medium [*Dulbecco Modified Eagle Medium*] mit Penicillin/Streptomycin, 10 % FCS). Bei einer Konfluenz von

ca. 70-80 % erfolgte die Passage der Zellen. Hierzu wurden die Zellen kurz mit einer Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen und anschließend für 5 Minuten im Inkubator bei 37 °C in der Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Durch diese Behandlung lösten sich die Zellen von der Zellkulturflasche und konnten somit als Zellsuspension aufgenommen werden. Diese Suspension wurde anschließend mit 3 ml DMEM-Medium versetzt, kurz resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Für die Transfektion wurden 24-*well*-Platten verwendet und pro Transfektionsansatz wurden ca. 50.000 Zellen in ein *well* auf einem Coverslip (in 0,5 ml DMEM-Medium) ausgesät. Für die Transfektion in einer 6 cm Zellkulturschale wurden ca. 500.000 Zellen ausgesät. Die Passage der Zellen erfolgte jeweils einen Tag vor der Transfektion.

#### 2.8.2 Transiente Transfektion von N2A-Zellen

Nach der 24-stündigen Inkubationsdauer der Zellen (37 °C) im Inkubator erfolgte ein Medienwechsel. Anschließend erfolgte die eigentliche Transfektion mit dem Kontrollplasmid (pCS2+) oder dem Plasmid in das die entsprechende Connexingensequenz einkloniert wurde (u.a. cpCx53.8-pCS2+). Hierzu wurden für die Coverslips in 60 µl DMEM-Medium (ohne Zusätze) jeweils 0,4 µg der hochreinen Plasmid-DNA und 1 µl des Transfektionsreagenz Attractene (Qiagen) gelöst. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und anschließend zur Präzipitat-Bildung für ca. 10-15 Minuten bei RT inkubiert. Entsprechend der höheren Zellzahl bei den 6 cm Kulturschalen wurde in diesem Fall die zehnfache Menge an Plasmid-DNA und Attractene eingesetzt. Die erhaltenen DNA-Attractene-Präzipitate wurden anschließend auf die Zellen pipettiert und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO2 inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Medienwechsel und nach 23 Stunden erfolgte die jeweilige Behandlung der Zellen mit 8-Bromo-cAMP oder at-RA. Unter sterilen Bedingungen (Clean-Bench) wurde das jeweilige Agenz in der entsprechenden Konzentration (siehe Tab. 2.1) in Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst auf die Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken der well-Platte verteilt. Um den Einfluss der Proteinkinase-Inhibitoren zu untersuchen erfolgte ggf. eine Präinkubation der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor für 15 Minuten. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz der lediglich mit DMSO behandelt wurde. Die behandelten Zellen wurden für 1 Stunde bei 37 °C (5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Das Abstoppen der Inkubation erfolgte durch einmaliges Waschen der Coverslips mit physiologischem PBS-Puffer und der Fixierung der Zellen mit 2 % PFA-Lösung. Anschließend erfolgte die immuncytochemische Analyse.

#### 2.9 Physiologische Methoden

#### 2.9.1 Intrazellulärableitungen von Horizontalzellen

Die Intrazellulärableitungen von Horizontalzellen isolierter Goldfischretinen wurden wie in Daniels und Baldridge (2011) beschrieben durchgeführt. Zur Herstellung der Glaselektroden wurden dünnwandige Borosilicat-Glas-Rohlinge (World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) verwendet. Diese wurden mit einem Flaming-Brown P-97 Mikroelektrodenpuller (Sutter Instruments, Novato, Kanada) auf die gewünschte Stärke gezogen, so dass nach dem Befüllen mit 2,5 M KCl-Lösung Widerstände von 80-120 MΩ erreicht wurden. Die isolierten Retinen wurden während der gesamten Versuchszeit mit einer Ringer-Lösung (siehe Anhang, S. 156) überspült, welche durchgehend mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast wurde, um den pH-Wert von 7,4 aufrecht zu erhalten. Als Verstärker der abgeleiteten Antworten diente ein Dagan 8700 Cell Explorer amplifier (Dagan Corporation, Minneapolis, USA). Zur Analyse bzw. Aufzeichnung der Daten wurde das Programm Axoscope 9.0 (Axon Instruments Inc., Union City, Kanada) verwendet. Die unterschiedlichen Subtypen von Horizontalzellen wurden aufgrund ihres charakteristischen Antwortverhaltens auf unterschiedliche chromatische Stimuli identifiziert (Stell et al., 1975; Stell und Lightfoot, 1975). Zur Bestimmung der rezeptiven Feldgröße einzelner Zellen wurden die Antworten der jeweiligen Zelle auf einen Ring-Stimulus (annulus) (1,0 mm innerer Durchmesser und 1,5 mm äußerer Durchmesser) und einen Punkt-Stimulus (spot) (100 µm Durchmesser) miteinander verglichen. Die Stimuli wurden alternierend mit einer jeweiligen Dauer von 500 Millisekunden und einer Pause von 2 Sekunden präsentiert. Für die entsprechenden Modulationsversuche wurden der Ringerlösung je nach Versuchsbedingung zunächst die entsprechenden Proteinkinase-Inhibitoren H89 oder Staurosporin zugeführt. Nach einer Präinkubationszeit von 15 Minuten wurden die jeweiligen Inkubationsbedingungen angepasst, indem ein weiterer Zufluss mit Ringerlösung gestartet wurde, der die zu untersuchenden Neuromodulatoren Dopamin oder all-trans Retinsäure zugesetzt wurde (vgl. Tab. 2.1).

#### 2.9.2 Neurobiotin-Injektionen

Die Neurobiotin-Injektionen zur Überprüfung der Kopplung von Horizontalzellen wurden an der sog. *inverted-eyecup* Präparation durchgeführt. Diese Art der Präparation wurde erstmals von Weiler *et al.* (1998) beschrieben. Nachdem wie zuvor beschrieben, die Präparation des Augenbechers erfolgte (vgl. 2.2) wurde dieser an den Seiten vertikal eingeschnitten, wobei darauf zu achten war, dass nicht in die Retina geschnitten wurde. Die so entstandenen Ausschnitte wurden nach außen hin abgeklappt und der gesamte Augenbecher wurde auf ein

abgerundetes Balza-Holz gestülpt, so dass die Retina mit der Ganglienzellseite nach oben zu liegen kam. Mit Hilfe kleiner Papierstücke wurde der Augenbecher auf dem Holz fixiert, wobei das Papier ebenfalls als Abflusshilfe bei der späteren Superfusion mit Ringerlösung (siehe Anhang, S. 158) diente. Durch ständiges Begasen der Ringerlösung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) wurde der zuvor eingestellte pH-Wert von 7,4 aufrecht gehalten. Für die ebenfalls dünnwandige Borosilicat-Glaselektroden Injektionen wurden verwendet (Widerstand ca. 100 M $\Omega$ ) (vgl. 2.9.1). Die Injektion mit Neurobiotin erfolgte nach erfolgreicher Identifizierung einer abgeleiteten Horizontalzelle für 8 Minuten mit Hilfe eines Strompulses mit einer Amplitude von 2 nA und einer Dauer von 1 Sekunde und 3 Sekunden Pause zwischen den einzelnen Pulsen. Zur vollständigen Diffusion des Farbstoffes wurde die Retina nach der Injektion für 20 Minuten bei ständiger Superfusion auf dem Holz belassen. Im Anschluss wurde der gesamte Augenbecher vorsichtig von dem Holz entfernt und in einer 2% igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) in 0,1 M PB 2x für 10 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Waschen (jeweils 10 Minuten) des Augenbechers in 0,1 M PB erfolgte die Inkubation mit einer 1% igen Streptavidinlösung (Streptavidin konjugiert mit ALEXA488 [1 % Triton X-100 in 0,1 M PB, 4 °C]) für 2 Stunden. Im Anschluss daran wurde die Retina vorsichtig von dem Augenbecher gelöst und mit der Photorezeptorseite nach oben auf einen Objektträger gebracht. Die Analyse erfolgte anschließend am konfokalen Lasermikroskop (Leica, TCS SL) und die Auszählung der mit Neurobiotin gekoppelten Zellen erfolgte wiederum mit ImageJ (NIH, Bethesda, MD). Hierzu wurden die Projektionsaufnahmen in ImageJ als 8-bit Datei geladen. Durch Festlegen eines Threshold wurden mögliche Hintergrundfärbungen von der Zählung ausgeschlossen und im Anschluss wurde mittels "Analyze Particles" die Zahl der mit Neurobiotin gekoppelten Zellen ermittelt. Mit Excel (Microsoft Office Excel 2003, USA) wurden die jeweiligen Mittelwerte (± Standardabweichung) ermittelt und mit dem student t-Test auf Signifikanz untersucht (p > 10,05 (nicht signifikant, n.s.); p < 0,05 (signifikant, \*), p < 0,01 (sehr signifikant, \*\*), p < 0,050,001 (höchst signifikant, \*\*\*).

### 3. Ergebnisse

In Anlehnung an die in Abschnitt 1.4 formulierte Zielsetzung wurde der Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit in zwei inhaltlich getrennte Abschnitte unterteilt. Der erste Teil beinhaltet Ergebnisse zur Identifizierung der Connexine, die in Horizontalzellen der Karpfenretina exprimiert werden und zur differentiellen Expression dieser Connexine in den unterschiedlichen Horizontalzellsubtypen (H1-H4). Im zweiten Abschnitt sind die Ergebnisse der molekularen und physiologischen Untersuchungen zusammengefasst, die ein Stück weit zur Aufklärung der an der lichtabhängigen Modulation der Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen beteiligten intrazellulären Signalkaskaden und Moleküle beigetragen haben (vgl. Abb. 4.1).

## 3.1 Differentielle Expression von Connexinen in Horizontalzellen der Karpfenretina

In der Zebrafischretina [Zebrafisch = *Danio rerio* (dr)] wurde bisher die Expression von 12 der 37 im Zebrafischgenom identifizierten Connexingene nachgewiesen (Eastman *et al.*, 2006, Zoidl *et al.*, 2004; Zoidl *et al.*, 2008). Für zwei dieser Connexine (drCx52.6 und drCx55.5) konnte eindeutig eine Expression in Horizontalzellen nachgewiesen werden (Shields *et al.*, 2007, Klaasen *et al.*, 2011) und für ein weiteres (drCx52.9) gibt es ebenfalls Befunde die auf seine spezifische Expression in Horizontalzellen hindeuten (Klaassen *et al.*, 2011).

#### 3.1.1 Identifizierung und Klonierung von Connexinen der Karpfenretina

Da für eine Analyse der Signalkaskaden, die der lichtabhängigen Modulation der Horizontalzellkopplung zugrunde liegen, die Identifizierung und Charakterisierung der beteiligten Connexine unerlässlich ist, wurde in einem ersten Schritt die cDNA der Karpfenretina mit degenerierten sowie genspezifischen Primern und der RACE-PCR untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchungen, die im wesentlichen von meiner Kollegin Petra Dirks durchgeführt wurden, konnten u.a. vier Connexin-Transkripte identifiziert und kloniert werden, die aufgrund ihres theoretischen Molekulargewichts als cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 bezeichnet werden (Janssen-Bienhold *et al.*, 2007). Mittels eines *Screenings* der *GenBank-database* (BLAST und der Anwendung der Programme ClustalW bzw. MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), mit dem Nucleotide bzw. Aminosäuren *aligned* und Verwandtschaftsgrade zwischen Genen bzw. Proteinen bestimmt werden können), wurden die vier identifizierten Karpfenconnexine als Homologe der Zebrafischconnexine drCx52.9, drCx52.6 bzw. drCx55.5 ermittelt (vgl. Abb. 3.1). Die Datenbankanalyse wurde von meiner Kollegin Frau Helena Greb durchgeführt.



Abb. 3.1: Phylogenetischer Verwandtschaftsgrad (Phylogramm) von Horizontalzellconnexinen des Zebrafisches (*danio rerio*) (dr) und des Karpfens (*cyprinus carpio*) (cp)

Die Connexin Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe des frei verfügbaren Programms ClustalW analysiert (Durchführung von meiner Kollegin Frau Helena Greb). Die Erstellung des Phylogramms erfolgte auf der Grundlage der kompletten Aminosäuresequenzen der verschiedenen Connexine mit Hilfe des Programms MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). Übereinstimmungen innerhalb der Aminosäuresequenzen von >95% sind an den jeweiligen Knotenpunkten des Phylogramms angegeben. Die Skalierung entspricht der Sequenzdivergenz von 5%

Im Detail ergab diese Analyse eine 68% ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen cpCx49.5 und drCx52.9 (Zoidl *et al.*, 2008) und von 89 % zwischen cpCx55.5 und drCx55.5 (Dermietzel *et al.*, 2000). Für die beiden Karpfenretina-Connexine cpCx52.6 und cpCx53.8 wurde der höchste Grad an Sequenzübereinstimmung mit drCx52.6 (Zoidl *et al.*, 2004) ermittelt (cpCx52.6/ drCx52.6 = 87 %; cpCx53.8/ drCx52.6 = 88 %). Daher wird angenommen, dass es sich bei diesen beiden Karpfenconnexinen um entsprechende orthologe Connexine zu drCx52.6 handelt. Die Abb. 3.1 verdeutlicht außerdem die isolierte Stellung des Zebrafischconnexins drCx52.7, was darauf hindeuten könnte, dass zu diesem Connexin kein Ortholog innerhalb der Karpfenretina existiert, oder es im Rahmen der bisherigen Arbeiten noch nicht identifiziert werden konnte. Weiterführende Analysen des phylogenetischen Verwandtschaftsgrades der Aminosäuresequenzen der vier Karpfenconnexine in Bezug auf die humanen Connexine ergaben, dass es sich bei cpCx49.5 und cpCx55.5 um homologe

Connexine zu dem humanen Connexin Cx59 handelt (49 % bzw. 46 % Übereinstimmung), während cpCx52.6 und cpCx53.8 eine hohe Sequenzhomologie zum humanen Connexin Cx62 (46 % bzw. 47 %) aufweisen. Außerdem weisen cpCx52.6 und cpCx53.8 eine Sequenzhomologie von 48 % bzw. 50 % zum retinalen Connexin mmCx57 der Maus auf (Hombach *et al.*, 2004).

#### 3.1.2 Expression von cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 in der Karpfenretina

Die Analyse der Expressions- und Verteilungsmuster der identifizierten Connexine (cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5) in der Karpfenretina sowie in den vier Subtypen von Horizontalzellen erfolgte durch einen Multi-Methoden-Ansatz. Um das mRNA-Verteilungsmusters der genannten Connexine innerhalb der Karpfenretina und der Horizontalzellen zu bestimmen, wurden sowohl *in situ* Hybridisierungen (ISH) als auch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) durchgeführt. Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse der ISH und FISH entstammen der Diplomarbeit von Gabi Omen (2009), die unter Anleitung und Betreuung von Dr. Petra Dierks (2009) und Apl.-Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold (Arbeitsgruppe Neurobiologie; Universität Oldenburg) die entsprechenden Untersuchungen durchgeführt hat. Sie ergänzen und vervollständigen die von mir in den Subtypen der Horizontalzellen bestimmten Expressionsprofile (vgl. 3.1.2 [Abb. 3.4] und 3.1.3).



Abb. 3.2: Verteilung von cpCx49.5-, cpCx52.6- and Cx55.5-mRNA in vertikalen Schnitten der Karpfenretina

Im linken Bildabschnitt (A, C und F) sind jeweils Kontrollaufnahmen der sense-Ribosonden zu den entsprechenden Connexin-Transkripten gezeigt (A = cpCx49.5; C = cpCx52.6; F = cpCx55.5). Die Detektion der Connexin-Transkripte mittels spezifischer anti-sense-Ribosonden ist in den Abschnitten B, D und G gezeigt (siehe Beschriftung). In E und H ist das jeweilige Detektionsmuster von cpCx52.6 (grün) sowie cpCx55.5 (magenta) mittels FISH dargestellt und in I ist eine Überlagerung eines Ausschnittes der Retina und der Detektion beider Connexine gezeigt. OPL = outer plexiform layer; INL = inner nuclear layer; IPL = inner plexiform layer

Die mRNA von cpCx49.5, cpCx52.6 sowie cpCx55.5 wurde mit Hilfe spezifischer anti-sense Sonden (siehe 2.7.6) detektiert. Entsprechende Kontrollversuche mit *sense* Sonden zeigten keine spezifische Färbung innerhalb der Retina (Abb. 3.2 A, C, F), was auf die Spezifität der eingesetzten *anti-sense* Sonden hindeutet.

Grundsätzlich wurde in allen drei Fällen die entsprechende Connexin-mRNA innerhalb der OPL bzw. der distalen INL detektiert, was auf eine Expression der Connexine in Horizontalzellen schließen lässt. Im Fall von cpCx52.6 und cpCx55.5 waren ausschließlich diese Bereiche angefärbt. Hier war die Färbung im Vergleich zu cpCx49.5 auch um ein Vielfaches intensiver (Abb. 3.2 B, D, G). Das Signal für cpCx52.6 war charakteristisch angeordnet, indem einige Bereiche in der OPL eher gering gefärbt und andere, oval geformte Bereiche sehr intensiv gefärbt waren (siehe Abb. 3.2 D, Pfeile). Auch das Signal für cpCx55.5 mRNA war im Bereich zwischen der OPL und der INL unterschiedlich stark (Abb. 3.2 G, Pfeile). Vermutlich handelt es sich bei den intensiv gefärbten Bereichen um Somata von einzelnen Horizontalzellen, deren Zellsomata in charakteristischer Weise in Schichten in der distalen INL angeordnet sind (Stell und Lightfoot, 1975). Zusätzliche FISH-Analysen bestätigten das spezifische Verteilungsmuster von cpCx52.6- und cpCx55.5-mRNA innerhalb markanter Bereiche zwischen der OPL und der INL (Abb. 3.2 E und H). Wie im Teilabschnitt I der Abb. 3.2 zu erkennen ist, überlappen die Expressionsmuster beider Connexine teilweise, was durch die weiße Färbung (Abb. 3.2 I, Pfeile) sichtbar wird. Diese Ko-Lokalisation ist ein erster Hinweis dafür, dass unterschiedliche Connexine möglicherweise in den gleichen Subtypen von Horizontalzellen synthetisiert und für den Aufbau ihrer Gap Junctions genutzt werden. Im Vergleich zum mRNA-Expressionsmuster von cpCx52.6 und cpCx55.5 ergab sich für die Verteilung von cpCx49.5 mRNA ein distinkteres Muster mit weiteren Markierungen in der proximalen INL (putative Amakrinzellen) und vereinzelt auch in der Ganglienzellschicht (GCL, Abb. 3.2 B).

Nachdem mit Hilfe der ISH und FISH erste Erkenntnisse über die Verteilung von cpCx49.5-, cpCx52.6- und cpCx55.5-mRNA gewonnen werden konnten, wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper das Verteilungsmuster innerhalb der Retina auf Proteinebene untersucht. Dafür wurden Antikörper (anti-drCx52.6, anti-drCx55.5, anti-drCx52.9, vgl. Anhang, Tab. 8.3, S. 154/155) verwendet. die spezifisch gegen bestimmte Epitope der jeweiligen Zebrafischconnexine gerichtet sind. Da diese einen hohen Grad an Identität der Aminosäuresequenzen mit den jeweiligen Karpfenconnexinen aufweisen, wurde angenommen, dass sie diese auch in der Karpfenretina bzw. auf dem Immunoblot detektieren können. Die Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Georg Zoidl (York University, Toronto, Kanada) und Prof. Dr. Maarten Kamermans (Netherlands Institute for Neuroscience (NIN), Amsterdam, Niederlande) bereitgestellt.



# Abb. 3.3: Spezifitätsnachweis von anti-drCx52.9, anti-drCx52.6 und anti-drCx55.5; Immunoreaktivität von cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5 in der Karpfenretina

A) C), E) Western Blot der Membranfraktionen von Neuroblastoma Zellen (N2A-Zellen), die mit Plasmiden (pCS2+), die keine (Ko) bzw. das jeweilige Connexingen (cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5) enthielten, transfiziert wurden. Die Blots wurden mit den entsprechenden, gegen die homologen Zebrafischconnexine gerichteten Antikörper anti-drCx52.9 (1:1.000 aus Huhn), anti-drCx52.6 (1:1.000 aus Kaninchen), anti-drCx55.5 (1:1.000 aus Kaninchen) und den entsprechenden sekundären Antikörpern: Ziege anti-Huhn IgG HRP-konjugiert (1:2.000), Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000) inkubiert. B); D); F) Detektion der Immunoreaktivitätsmuster von cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5 in Cryoschnitten der Karpfenretina mit den Zebrafisch-spezifischen Antikörpern (anti-drCx52.9, anti-drCx52.6, anti-drCx55.5; Verdünnung: 1:1.000; grün) im Bereich der OPL und der distalen INL; Gleichzeitig wurden Zapfen-Photorezeptoren mit anti-FRet43 (1:1.000) angefärbt (magenta). Als sekundäre Antikörper wurden für die Immunfluoreszenz Ziege anti-Huhn FITC-konjugiert (1:200) und Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600 verdünnt) eingesetzt. OPL = outer plexiform layer, INL = inner nuclear layer; Potentielle Horizontalzellsomata in der distalen INL direkt unterhalb der markierten Zapfenterminalien sind mit einem Asterisk (\*) markiert; Skalierung = 10  $\mu$ m

Die Spezifität der verwendeten Antikörper wurde anhand der Membranfraktionen von entsprechend transfizierten Neuroblastoma Zellen (N2A-Zellen) mit Hilfe der Western Blot Methode nachgewiesen (siehe Abb. 3.3 A, C und E). Durch das Entfernen gebundener Antikörper von der Blot Membran mit Hilfe des sog. "Strippen" (vgl. 2.4.4) war es möglich,

denselben Blot für die Inkubation mit den drei entsprechenden Antikörpern zu verwenden. Wie in den Teilabschnitten A, C und E der Abbildung 3.3 zu erkennen ist, detektierten die einzelnen Antikörper jeweils und z.T. hochspezifisch (starke Markierung von cpCx49.5 durch anti-drCx52.9 und von cpCx55.5 durch anti-drCx55.5) nur das erwartete Connexin, und keiner zeigte eine Kreuzreaktion mit einem der anderen auf dem Blot vorhandenen Connexinhomologe (vgl. Abb. 3.3 A, C, E, Pfeile). Lediglich anti-drCx52.6 wies eine schwache Immunreaktivität mit cpCx52.6 auf und zeigte auch einige schwache unspezifische Kreuzreaktionen mit anderen Membranproteinen der N2A-Zellen (Abb. 3.3 C). Als Kontrolle (Ko) diente in diesem Versuch die Membranfraktion von N2A-Zellen, die lediglich mit dem zur Transfektion verwendeten Vektor (pCS2+) (vgl. 2.8.2) transfiziert wurden.

Die Feststellung, dass in keinem Fall Kreuzreaktionen eines Antikörpers mit einem der jeweils anderen Connexine auftraten ist essentiell für die weiteren Analysen, da nur auf der Grundlage dieses Befundes verlässliche Aussagen über das Vorkommen und die Verteilung der einzelnen Connexine in der Retina bzw. den spezifischen Retinaneuronen getroffen werden können (vgl. Abb. 3.3 B, D, F).

In den Teilabschnitten B, D und F der Abb. 3.3 sind jeweils exemplarische Bereiche von Karpfenretinaquerschnitten aus dem Bereich zwischen der OPL und der distalen INL gezeigt. Zur verbesserten Visualisierung wurden die Zapfen-Photorezeptoren mittels eines FRet43 Antikörpers markiert (Abb. 3.3 B, D, F, magenta). Die Inkubation mit den entsprechenden Connexin-Antikörpern resultierte in teilweise unterschiedlichen Verteilungsmustern immunoreaktiver Spots (grün), wie sie für Connexine erwartet werden. Mit jedem der drei Antikörper wurden punktuelle Markierungen ausschließlich im Bereich der OPL und distalen INL erzielt. Da die Markierungen insbesondere mit anti-drCx52.6 und anti-drCx52.9 sehr fein waren und sich sowohl um ein ovales, ungefärbtes Zellsoma (\*) in der distalen INL befanden als auch konzentriert im Bereich der OPL unterhalb und um die mit anti-FRet43 markierten Zapfenterminalien (magenta) auftraten, ist es wahrscheinlich, dass diese Antikörper cpCx52.6und cpCx49.5-haltige Gap Junctions zwischen den Somata von Karpfenhorizontalzellen sowie ihren Dendriten markieren (Abb. 3.3 B, D). Im Vergleich dazu, erstreckte sich die cpCx55.5-Immunoreaktivität ausgehend von der OPL auch bis in weite Bereiche der mittleren und proximalen INL hinein. Außerdem erschienen die Markierungen in diesem Fall in vergleichsweise großen und z.T. länglich gestreckten Spots (bzw. Plaques). Letztere kamen vor allem in der INL (Mitte und proximal) vor, während die feineren Markierungen nahezu ausschließlich in der absolut distalen INL und OPL auftraten. In der distalen INL waren ebenso wie bei den Cx49.5und Cx52.6-

55

Immunoreaktivitätsmustern in regelmäßigen Abständen jeweils oval geformte Bereiche (Somata von Horizontalzellen) zu finden, in denen keine Immunoreaktivität auftrat (Abb. 3.3, Asterisks). Insgesamt deutet diese begrenzte Verteilung immunoreaktiver Spots um die Somata der Horizontalzellen herum und mit einer Konzentration in der OPL stark auf das Vorhandensein der Connexine in den dendritischen Fortsätzen hin und ist ein erster Hinweis auf Cx49.5-, Cx52.6- und Cx52.9-haltige dendro-dendritische Gap Junctions in der OPL der Karpfenretina.

Diese Befunde untermauern die mit der ISH und FISH erzielten Befunde und stützen die Annahme, nach der die drei Karpfenconnexine cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx52.9 in Horizontalzellen exprimiert werden. Die zum Teil unterschiedlichen Verteilungen der Immunoreaktivität in der Retina weisen zudem möglicherweise auf die selektive Expression einzelner Connexine in den unterschiedlichen Horizontalzelltypen hin. So deutet die Konzentration von cpCx49.5- sowie cpCx52.6-immunoreaktiver Spots primär im Bereich der OPL z.B. auf eine möglicherweise eingegrenzte Expression in H1- und H2-Zellen hin, da diese vor allem in der äußersten distalen INL lokalisiert sind (vgl. Abb. 1.5 B, C). Das Verteilungsmuster cpCx55.5-immunoreaktiver Spots innerhalb der OPL und der INL deutet dagegen auf eine breitere Expression des Connexins hin. Neben den distal lokalisierten Horizontalzelltypen scheint in diesem Fall auch eine Expression in den weiter proximal lokalisierten Horizontalzelltypen vorzuliegen (H3 und H4). Außerdem sind in diesem Bereich die Axonterminalien der Horizontalzellen lokalisiert, welche bekanntermaßen ebenfalls über homologe Kopplung eigenständige Netzwerke bilden. Das Vorhandensein cpCx55.5immunoreaktiver Spots könnte demnach auch auf dessen Beteiligung an der Bildung axoaxonischer Gap Junctions hindeuten.

Die bisher gezeigten Daten legen die Vermutung nahe, dass eine differentielle Expression der Connexine cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5 innerhalb der verschiedenen Typen von Horizontalzellen der Karpfenretina vorliegt. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde in einem weiteren Ansatz diese differentielle Expression anhand immuncytologischer Analysen sowie FISH an dissoziierten Horizontalzellen untersucht.



Abb. 3.4: Verteilung von cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5 in dissoziierten Horizontalzellen der Karpfenretina

Ergebnisse der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zur Detektion von cpCx49.5-, cpCx52.6- und cpCx55.5-mRNA und Immuncytochemie zum Nachweis der Connexin-spezifischen Immunoreaktivität (IR) in den vier unterschiedlichen Horizontalzelltypen (H1-H4) und isolierten Axonterminalien (AT); Verwendete Antikörper: anti-drCx52.9 (1:750), sekundärer Antikörper: Ziege anti-Huhn FITC-konjugiert (1:200); anti-drCx52.6 (1:750), anti-drCx55.5 (1:1.000), sekundärer Antikörper: Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600); Skalierung = 10 µm

Abb. 3.4 gibt eine Übersicht der Ergebnisse zur mRNA-Verteilung und zum Immunonachweis der drei in der Retina identifizierten Connexine in den vier Horizontalzelltypen (H1-H4) und den Axonterminalien (AT) der H1-H3 Zellen. Mittels der FISH konnte die Expression von cpCx49.5- und cpCx55.5-mRNA nur in H1, H2 und H4 Horizontalzellen nachgewiesen werden, während cpCx52.6-mRNA in allen vier Typen von Horizontalzellen gefunden wurde. Diese Befunde stimmen weitestgehend mit den Ergebnissen der immuncytologischen Analysen überein. Hier resultierte die Inkubation der

Zellen mit den entsprechenden Antikörpern zum einen in der charakteristischen "patch"artigen ("Flecken-artigen") Markierung von H1, H2 und H4 Horizontalzellen durch den antidrCx52.9 Antikörper, der cpCx49.5 detektiert. Im Vergleich dazu wurden cpCx52.6 und abweichend von den FISH-Befunden auch cpCx55.5 in allen vier Horizontalzelltypen detektiert. Zusätzlich wurden in isolierten Axonterminalien zum Teil größere cpCx55.5immunoreaktive Markierungen detektiert, die in Übereinstimmung mit den an Karpfenretinaschnitten erzielten immunhistologischen Befunden für das Vorhandensein von cpCx55.5-haltigen axo-axonischen Gap Junctions in der INL sprechen. Derartige Axonterminal-spezifischen Immunomarkierungen wurden weder bei Inkubation der Zellen mit anti-drCx52.9 noch mit anti-drCx52.6 detektiert, was wiederum mit den an Retinaschnitten erzielten Immunoreaktivitätsmustern für diese beiden Antikörper übereinstimmt, da beide auch keine Markierungen in der mittleren und distalen INL zeigten. Eine Zuordnung der Axonterminalien z.B. anhand ihrer Größe, Dicke oder sonstiger Strukturmerkmale zu den jeweiligen Subtypen H1–H3 ist leider nicht möglich.

#### 3.1.3 Expression des Karpfenconnexins cpCx53.8

Wie einleitend erwähnt, wurde neben den Connexinen cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5 ein weiteres Connexin in der Karpfenretina identifiziert. Hierbei handelt es sich um das Connexin53.8 (cpCx53.8), welches ein Paralog zum cpCx52.6 sowie das Ortholog zum Zebrafisch Connexin drCx52.6 ist (vgl. Abb. 3.1). Außerdem weist es eine hohe Sequenzhomologie (> 50%) zum Maus Connexin57 (mmCx57) auf (Hombach *et al.*, 2004). Entsprechend den zuvor unternommenen Analysen zur Verteilung von cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5 wurde auch für dieses Connexin eine umfassende Charakterisierung vorgenommen. Allerdings war eine Analyse der Verteilung der cpCx53.8 und cpCx52.6 mit Ausnahme eines kleinen Abschnitts am 3'-Ende nahezu identisch sind wodurch die Herstellung einer spezifischen Sonde sehr erschwert wurde bzw. nicht gelungen ist.

Proteinbiochemische und immunhistologische Untersuchungen waren jedoch möglich, da ein spezifischer anti-Cx53.8 Antikörper zur Verfügung stand. Die für die Herstellung dieses Antikörpers verwendete Peptidsequenz (CSMSMILELSSIMKK) wurde anhand der C-Terminalen Aminosäuresequenz von cpCx53.8 ausgewählt und der Antikörper wurde von Pineda Antibody Service (Berlin, Deutschland) hergestellt. Das zur Immunisierung verwendete Peptid umfasste 15 Aminosäuren, die korrespondierend sind zu den letzten 12 Aminosäuren des C-terminalen Endes von mmCx57 (SMILELSSIMKK), so dass der im

weiteren als anti-Cx53.8 bezeichnete Antikörper (vgl. Anhang Tab. 8.3, S. 155) auch mmCx57 in dendro-dendritischen und axo-axonischen Gap Junctions zwischen Horizontalzellen detektieren konnte (Janssen-Bienhold *et al.*, 2007; Diplomarbeit Gerrit Hilgen, 2007, Janssen-Bienhold *et al.*, 2009).

In der Karpfenretina musste dieser Antikörper zunächst auf seine Spezifität hin überprüft werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt sein Immunoreaktivitätsmuster im Western Blot Verfahren untersucht (Abb. 3.5.A, B, C).





**A)**; **B)** Western Blot Analyse von subzellulären Fraktionen der Karpfenretina, TH = Totalhomogenat, M = Membranfraktion, C = cytosolische Fraktion; Inkubation mit dem Cx53.8-Präimmunserum (1:10.000) (A) und dem spezifischen anti-Cx53.8 Antikörper (1:750) (B), sekundärer Antikörper = goat anti-rabbit HRP-konjugiert (1:3.000); **C)** Western Blot Analyse der Membranfraktionen von den mit Transkripten für cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 transfizierten N2A-Zellen, Inkubation mit anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); **D)** Repräsentativer Ausschnitt des Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8 (grün) an Cryoschnitten der Karpfenretina innerhalb des Bereiches der OPL und der distalen INL; Zapfen Photorezeptoren wurden mit anti-FRet43 (1:1.000) angefärbt (magenta); OPL = outer plexiform layer, INL = inner nuclear layer; Skalierung = 10 µm; Asterisks = Bereiche der Horizontalzellsomata; **E)**, **F)**, **G)**, **H)**, **I)** Immunoreaktivität von cpCx53.8 an dissoziierten Karpfenhorizontalzellen des Typs H1, H2, H3 und H4 sowie eines dissoziierten Axonterminals (AT), primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600), Skalierung = 10 µm

Dabei zeigte sich in subzellulären Fraktionen der Karpfenretinen bei Inkubation mit dem anti-Cx53.8 Antikörper eine deutliche Markierung von Proteinbanden im Bereich von ca. 55 kDa (Abb. 3.5 B, Pfeil). Diese Bande erschien im Totalhomogenat (TH) wesentlich schwächer als in der Membranfraktion (M) was auf die Anreicherung des Proteins in Membranen hindeutet und in der cytosolischen Fraktion (C) war keine Immunoreaktivität in diesem Bereich zu verzeichnen. Die Spezifität der Antikörperbindung an das Membranprotein von ca. 55 kDa wurde anhand eines Kontroll-Immunoblots, der mit dem cpCx53.8-Präimmunserum inkubiert wurde, bestätigt. Auf diesem Blot (Abb. 3.5 A) wurde keine spezifische Markierung in dem entsprechenden Molekulargewichtsbereich in der Membranfraktion detektiert. Im Vergleich zum spezifischen anti-Cx53.8 Antikörper detektierte das cpCx53.8-Präimmunserum mehrere Proteine die mit einer Ausnahme (Abb. 3.5 A, Pfeil) alle außerhalb des zu cpCx53.8 korrespondierenden Molekulargewichts liegen. Im Gegensatz zu cpCx53.8, das sich wie für ein Connexin zu erwarten in der Membranfraktion anreichert, handelt es sich bei dem vom Präimmunserum detektierten Protein um ein cytosolisches Protein.

Die hohe Affinität des verwendeten Antikörpers für cpCx53.8 konnte des Weiteren auch mit einer Immunoblot-Analyse bestätigt werden, die mit Membranfraktionen von transfizierten N2A-Zellen durchgeführt wurde (Abb. 3.5 C). In diesem Versuch zeigte sich nach der Inkubation des Western Blots mit anti-Cx53.8 ausschließlich ein immunoreaktives Protein mit dem entsprechenden Molekulargewicht in der Laufbahn, die mit der Membranfraktion der cpCx53.8-exprimierenden N2A-Zellen bestückt wurde. Weder in der Kontrolle (N2A-Zellen transfiziert mit pCS2+) noch in einer der anderen Laufbahnen, die mit Membranproben bestückt wurden, die von cpCx52.6 bzw. cpCx49.5 bzw. cpCx55.5 exprimierenden N2A-Zellen stammten, zeigte sich eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit einem der anderen Karpfenconnexine (Abb. 3.5 C, Pfeil).

In der immunhistochemischen Analyse zur Verteilung der cpCx53.8-Immunoreaktivität in Gefrierschnitten der Karpfenretina zeigte sich ein z.T. sehr intensiv gefärbtes "Fleckenartiges" Muster, das besonders intensiv in der OPL unterhalb der mit anti-FRet43 (magenta) markierten Zapfenterminalien war und sich weiter bis in die proximale INL ausbreitete (Abb. 3.5 D). Des Weiteren konnten auch bei diesen Immunfärbungen in der distalen INL in regelmäßigen Abständen oval geformte Bereiche beobachtet werden, die keine Immunoreaktivität aufwiesen (Abb. 3.5 D, Asterisks). Hierbei handelt es sich, wie bereits bei den mit anti-drCx52.9 bzw. anti-drCx52.6 erzielten Immunoreaktivitätsmustern (vgl. Abb. 3.3 B und D) beobachtet, höchstwahrscheinlich um die Zellkörper der Horizontalzellen. Die cpCx53.8-immunoreaktiven Plaques zeigten die für Gap Junctions charakteristische Erscheinungsform, die in der Literatur als "*patch-like*"("Flecken-artig", s.o.) bezeichnet wird und die meist etwas länglich gestreckte Form und das separierte Auftreten der Plaques beschreibt. Die immuncytologische Analyse zum Vorkommen und zur Verteilung von cpCx53.8 in den verschiedenen Horizontalzellsubtypen dokumentiert eindeutig eine ubiquitäre Verteilung dieses Connexins in allen vier Subtypen, sowie in den Axonterminalien der Horizontalzellen (vgl. Abb. 3.5 E-I). Wie aus den Abbildungen 3.5 E-H ersichtlich, sind die cpCx53.8-haltigen Gap Junctions primär in den Dendriten der Horizontalzellen lokalisiert und es liegen nur selten und vereinzelt Markierungen im Bereich des jeweiligen Zellsomas vor. Bei den untersuchten Axonterminalien zeigte sich stets eine intensive, oft großflächigere Markierung entlang des gesamten Axonterminals. Ein solches Verteilungsmuster lässt auf die Beteiligung von cpCx53.8 an der Bildung sowohl dendro-dendritischer als auch axoaxonischer Gap Junctions zwischen den Zellen schließen.

Zusammenfassend deuten die bisher gezeigten Befunde darauf hin, dass die vier Connexine offensichtlich nicht zelltypspezifisch exprimiert werden. Die Connexine cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 wurden primär immuncytologisch in allen Subtypen von Horizontalzellen nachgewiesen, während allein cpCx49.5 nicht in H3-Zellen gefunden wurde. Daraus folgend kann angenommen werden, dass die Bildung von homolog gekoppelten Horizontalzellnetzen, sehr wahrscheinlich nicht über homomere/homotypische Gap Junctions erfolgt. Vielmehr auf eine komplexere deuten diese Daten molekulare Zusammensetzung horizontalzellspezifischer Gap Junctions hin, die wahrscheinlich über die Bildung von heteromeren/heterotypischen Gap Junctions realisiert wird.

#### 3.1.4 Relative Expressionslevel der Connexine in den Horizontalzellsubtypen

Um zu überprüfen inwieweit die in 3.1.2 und 3.1.3 erzielten Befunde zur Proteinexpression der vier Connexine (cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5) in den vier Subtypen von Horizontalzellen sich auch auf der Ebene der mRNA-Expression manifestieren wurde mit Hilfe einer semi-quantitativen Einzelzell-RT-PCR Analyse die relative mRNA-Expression der vier Connexine in den einzelnen Zelltypen untersucht. Im Rahmen dieses experimentellen Ansatzes wurden die relativen mRNA-Expressionslevel für jedes der vier Connexine in insgesamt 23 Horizontalzellen (5 x H1; 6 x H2; 6 x H3; 6 x H4) sowie in mehreren Photorezeptorzellen (Negativkontrolle) analysiert. Für die Bestimmung der relativen Connexinexpression und als Kontrolle für gleiche Mengen an eingesetztem Template wurde der Expressionslevel des *"housekeeping-gene"*  $\beta$ -Aktin herangezogen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Abb. 3.6 zusammengefasst.



#### Abb. 3.6: Semi-quantitative Einzelzell-RT-PCR

A) Ergebnisse der PCR (Agarosegel) für  $\beta$ -Aktin, cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx55.5 und cpCx53.8. Es wurden jeweils 3 µl cDNA als Template/Probe verwendet; Als Negativkontrolle (-) diente eine Probe, welche ausschließlich mit Wasser (ddH<sub>2</sub>O) versetzt wurde. Als Positivkontrolle (+) wurde eine Probe von Karpfen 5`-RACE cDNA verwendet. PR = Photorezeptor **B**) Mittelwerte der optischen Dichte (*integrated density values*, IDV) aller im Agarosegel detektierten Banden für alle getesteten Horizontalzellen; **C**) Verhältnis (*ratio*) der IDVs zwischen den einzelnen Connexinbanden des Agarosegels und der jeweiligen  $\beta$ -Aktin-Bande; **D**) Graphische Darstellung des ermittelten Verhältnisses der IDVs jedes Connexins und  $\beta$ -Aktin in den unterschiedlichen Horizontalzellsubtypen.

Die RT-PCR wurde wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend in einem 2% igen Agarosegel elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt (Abb. 3.6 A). Das Gel wurde zur Visualisierung der Transkripte mit Roti<sup>®</sup>-Safe gefärbt und anschließend in einem AlphaImager HP gescannt. Die densitometrischen Auswertungen der optischen Dichten (*integrated density values*, IDV) in den jeweiligen Banden/Transkripten im Gel wurden anschließend mit dem AlphaView Programm (Spot Densor, Biozym Scientific) analysiert. Diese Auswertung wurde für jedes Connexin durchgeführt und die für jedes Connexin-Transkript ermittelten IDVs wurden zu den jeweils für die Zelle bestimmten  $\beta$ -Aktin-IDVs ins Verhältnis gesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass die Kontroll-PCR mit den Primern für  $\beta$ -Aktin in allen Proben eine konstant gleich bleibende Intensität der jeweiligen Banden aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass die in den Proben enthaltenen Konzentrationen von spezifischer cDNA annähernd gleich waren. In der Tabelle B der Abb. 3.6 sind die gemittelten Werte der IDVs für das jeweilige Connexintranskript und das β-Aktin-Transkript in den untersuchten Zelltypen gezeigt. Wie zu erkennen ist, ergab die densitometrische Analyse für die β-Aktin Banden einen relativ konstanten Wert (IDV) von ca. 32. Die in Tabelle C gezeigten Werte geben das Verhältnis der gemittelten IDVs der einzelnen Connexintranskripte zu den entsprechenden Werten für β-Aktin an. Diese Werte ermöglichen eine ungefähre Abschätzung des mRNA-Expressionslevels der Connexine in den einzelnen Subtypen von Horizontalzellen. Ein Wert um 1 beschreibt demnach eine durchschnittliche optische Dichte, die vergleichbar ist mit der β-Aktin-Expression. Zur verbesserten Übersicht sind die ermittelten Werte des Verhältnisses der IDVs zwischen β-Aktin und dem jeweiligen Connexin ( $\beta$ -Aktin/ConnexinX *ratio*) in Abschnitt D der Abb. 3.6 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse belegen die Expression aller Connexine in den Zelltypen H1, H2 und H4, wobei zum Teil starke Schwankungen im Expressionsgrad zu beobachten waren. Insgesamt wurden die relativ höchsten mRNA-Expressionslevel für cpCx52.6 in H2-Zellen (cpCx52.6/ $\beta$ -Aktin = 2,15), für cpCx53.8 in H3-Zellen (cpCx53.8/ $\beta$ -Aktin = 2,09), für cpCx49.5 in H4-Zellen (cpCx49.5/ $\beta$ -Aktin = 1.19) und für cpCx55.5 in H1-Zellen (cpCx55.5/ $\beta$ -Aktin = 1.45) nachgewiesen (Abb. 3.6 C und D).

Die schwächste Expression wurde mit einem Wert von 0,09 für cpCx49.5 in H3-Zellen ermittelt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass cpCx49.5 nicht in Horizontalzellen des Typs H3 exprimiert wird, was wiederum mit den zuvor an den dissoziierten Horizontalzellen gewonnenen Erkenntnissen der immuncytologischen Analysen übereinstimmt (vgl. Abb. 3.4). Eine ebenfalls sehr schwache Expression wurde außerdem für cpCx55.5 in den H3-Zellen ermittelt (cpCx55.5/ $\beta$ -Aktin = 0,18). Dieser Befund ist bedingt widersprüchlich zu den immuncytologischen Befunden, die eindeutig cpCx55.5-Immunoreaktivität in H3-Zellen gezeigt haben (vgl. Abb.3.4). Grundsätzlich ist es möglich, dass eine verringerte Intensität der Banden (Transkripte) auf dem Gel durch methodisch bedingte Fehler verursacht wurde. Allerdings ist dies in diesem Fall (cpCx55.5 mRNA in H3-Zellen) als eher unwahrscheinlich anzunehmen, da für die Bestimmung der relativen mRNA-Expressionsrate eines jeden Connexins immer die gleiche Menge der aus einer Zelle gewonnenen cDNA eingesetzt wurde. Des Weiteren wurden insgesamt die Expressionsprofile von 6 H3-Zellen bestimmt, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass speziell für ein Connexin Fehler bei der Durchführung auftraten, minimiert wurde.

# 3.1.5 Ultrastrukturelle Analyse zur Verteilung von cpCx53.8 und cpCx55.5 in der Karpfenretina

Die Befunde der immuncytologischen Analysen dissoziierter Horizontalzellen bzw. die immunhistologischen Analysen an Querschnitten der Karpfenretinen deuten auf die Lokalisation von cpCx53.8 und cpCx55.5 auf den Dendriten der verschiedenen Horizontalzellsubtypen, sowie auf den Axonterminalien hin (vgl. 3.1.1 und 3.1.2). Wie aus den Abb. 3.4 und 3.5 hervorgeht, war eine Immunoreaktivität auf dissoziierten Axonterminalien ausschließlich für diese beiden Connexine detektierbar, was auf deren Beteiligung an der Bildung axo-axonischer Gap Junctions zwischen den Axon-tragenden Horizontalzellsubtypen hindeutet. Zur Verifizierung dieser Annahme wurde in Kooperation mit Dr. Konrad Schultz und der Diplomstudentin Viola Knostmann die ultrastrukturelle Verteilung beider Connexine in der Karpfenretina mittels Immuno-Elektronenmikroskopie untersucht. cpCx53.8

cpCx55.5





Dargestellt sind ultrastrukturelle Aufnahmen von cpCx53.8-immunoreaktiven (linker Bildteil) und cpCx55.5immunoreaktiven (rechter Bildteil) Gap junctions aus dem Bereich der OPL und der INL. Mit den Pfeilen im oberen Bildabschnitt sind jeweils cpCx53.8- und cpCx55.5-enthaltende Gap Junctions zwischen Horizontalzelldendriten gekennzeichnet. Im unteren Bildabschnitt markieren die Pfeilspitzen entsprechend immunoreaktive Gap Junctions zwischen Axonterminalien. Skalierung = 500 nm

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Analysen sind in der Abb. 3.7 anhand repräsentativer Aufnahmen aus dem Bereich der OPL und der INL dargestellt. Beide Antiköper markieren, wie zu erwarten, da sie gegen Epitope des intrazellulären C-Terminals von cpCx53.8 bzw. cpCx55.5 gerichtet sind, intrazelluläre Bereiche entlang von Membranabschnitten die bei höherer Auflösung die klassische septalaminare Struktur von Gap Junctions aufweisen (Pfeile in der OPL und Pfeilspitzen in der INL). Diese Erscheinungsform der detektierten Signale ist charakteristisch für Gap Junctions, entsprechend wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Markierungen um cpCx53.8respektive cpCx55.5-enthaltende Gap Junctions handelt. Die positive Detektion dieser Strukturen in der OPL deutet auf das Vorhandensein dendro-dendritischer Gap Junctions zwischen homologen Horizontalzelltypen hin. Im Falle der Detektion von cpCx53.8 in der OPL (oberer linker Bildabschnitt) sind deutlich die Abgrenzungen (Membranen) der dendritischen Strukturen und die exakt auf diesen verlaufenden Gap Junctions zu erkennen. Eine derartig klare Abgrenzung dendritischer Strukturen ist im Falle der cpCx55.5 Detektion (oberer rechter Bildabschnitt) zwar nicht zu sehen, allerdings ist erkennbar, dass diese ebenfalls von membranartigen Strukturen flankiert wird und es sich somit ebenfalls um einen Kontaktpunkt zwischen Horizontalzelldendriten handelt. Die Axonterminalien, welche hauptsächlich in der INL lokalisiert vorliegen, lassen sich hingegen wesentlich eindeutiger identifizieren. Sie zeichnen sich durch eine länglich gestreckte Form aus, treten häufig dicht aneinander liegend auf und erstrecken sich z.T. über weite Bereiche der INL. Wie die unteren Bildabschnitte der Abb. 3.7 verdeutlichen, kam es in beiden Fällen zur Detektion immunoreaktiver Gap Junction-Plaques zwischen benachbarten Axonterminalien (siehe Pfeilspitzen). Diese Befunde untermauern demnach die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die Connexine cpCx53.8 und cpCx55.5 an der Bildung axo-axonischer Gap Junctions beteiligt sind.

### 3.2 Modulation der Horizontalzellkopplung und des Connexins cpCx53.8

#### 3.2.1 Lichtabhängige Modulation

Retinale Horizontalzellen zeichnen sich durch intensive elektrische Kopplung über Gap Junctions aus. Dadurch entstehen Horizontalzellnetzwerke, deren Größe bzw. Ausdehnung lichtabhängig moduliert werden: Unter skotopischen und photopischen Lichtverhältnissen ist der Grad der Kopplung gering, während er bei gemäßigten (mesopischen) Lichtverhältnissen Überprüfung Maximum erreicht. Zur der triphasischen Modulation ein der Horizontalzellkopplung wurden der Grad der Kopplung sowie die rezeptive Feldgröße mittels Neurobiotin-Injektionen und Intrazellulärableitungen im Hinblick auf unterschiedliche lichtadaptive Zustände der Retinen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Adaptationszustände getestet (vgl. 2.2.1). In Anlehnung an Arbeiten von Yang et al. (1988) und Baldridge et al. (1995), welche die Formulierungen "prolonged darkness", "light-sensitized" und "light-adapted" für die unterschiedlichen adaptiven Stadien bzw. die entsprechenden Inkubationsbedingungen etablierten, wurden die jeweiligen Adaptationszustände in dieser Arbeit mit "dauerhaft dunkeladaptiert (DD)", "dunkeladaptiert (D)" und "lichtadaptiert (L)" beschrieben.

Mit Hilfe der im folgenden Verlauf gezeigten Daten wird der Versuch unternommen physiologische Befunde zur Modulation der Horizontalzellkopplung mit proteinbiochemischen Erkenntnissen zur Modulation des horizontalzellspezifischen Connexins cpCx53.8 zu korrelieren. Die physiologischen Daten wurden an Goldfischretinen erhoben, während die proteinbiochemischen Versuche an Karpfenretinen durchgeführt wurden. Sowohl der Goldfisch (*Carassius auratus*) als auch der, in der Arbeitsgruppe Neurobiologie verwendete Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio*) gehören zur Oberfamilie der Karpfenartigen Fische (*Cypriniformes*). Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades ist davon auszugehen, dass die physiologischen Eigenschaften sowie die zellbiologischen Signalvorgänge in beiden Arten weitestgehend identisch sind. Außerdem wurden zur Überprüfung der Vergleichbarkeit potentieller modulatorischer Einflüsse auf das Connexin Western Blot Analysen mit Goldfischretinaproben durchgeführt. Die Befunde dieser Analysen belegen die Analogie in Bezug auf modulatorische Effekte im Goldfisch und im Karpfen. Somit konnte anhand dieser Daten eine eindeutige Vergleichbarkeit der physiologischen mit den proteinbiochemischen Daten sichergestellt werden.





A) Exemplarischer Vergleich der Antwortamplituden einer Horizontalzelle (Typ H2) auf einen Ring-Punkt-Stimulus (*annulus-spot*) nach Dunkeladaptation und Lichtadaptation; **B**) Quantifizierung der gemessenen Amplituden auf einen Ring-Punkt-Stimulus, Vergleich zwischen dunkeladaptierten (D) und lichtadaptierten (L) Retinen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung), n = 7 für beide Bedingungen; **C**) Antwortamplituden einer H2 Horizontalzelle auf einen Ring-Punkt-Stimulus nach Dunkeladaptation und dauerhafter Dunkeladaptation. **D**) Quantifizierung der gemessenen Amplituden auf einen Ring-Punkt-Stimulus, Vergleich zwischen dunkeladaptierten (D) und dauerhaft dunkeladaptierten (DD) Retinen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung), n = 7 für beide Bedingungen; **E**) repräsentative Aufnahmen von Neurobiotin-injizierten Horizontalzellen (Typ H2) in unterschiedlich adaptierten Goldfischretinen (DD, D, L) (scale bar = 50 µm). **F**) Quantifizierungsergebnis der Auszählung Neurobiotin-gekoppelter Zellen (Typ H2) unter den verschiedenen Adaptationsbedingungen (n = 6 für jede Bedingung); **G**) Western Blot Analyse zum Vergleich des Immunoreaktivitätsmusters von cpCx53.8 in Membranfraktionen die aus dauerhaft dunkeladaptierten (DD), dunkeladaptierten (D) bzw. lichtadaptierten (L) Karpfenretinen gewonnen wurden und in einem Parallelansatz jeweils mit alkaliner Phosphatase (AP) behandelt wurden, um den Phosphorylierungsgrad von cpCx53.8 zu bestimmen. In jeder Probe wurden 40 µg Protein aufgetragen; primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); kDa = kilo Dalton; Signifikanz **B**), **D**) und **E**) = (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; n.s. p > 0.05)

Mit Hilfe von Intrazellulärableitungen und durch Verwendung eines kombinierten Ring-Punkt-Lichtstimulus (annulus-spot stimulus) wurden die Auswirkungen der verschiedenen Adaptationszustände auf die rezeptive Feldgröße einzelner Horizontalzellen untersucht. In Abb. 3.8 A ist der Vergleich des Antwortverhaltens einer H2-Horizontalzelle nach Dunkeladaptation und nach Lichtadaptation auf einen solchen Stimulus exemplarisch dargestellt. Wie zu erkennen ist, zeigte sich nach der Lichtadaptation eine deutlich verringerte Antwortamplitude auf den Ring-Stimulus, während die Antwortamplitude auf den Punkt-Stimulus verstärkt wurde. Eine vergleichbare Auswirkung auf das Antwortverhalten der Zellen zeigte sich ebenfalls nach der dauerhaften Dunkeladaptation, wie es exemplarisch für eine Zelle (Typ H2) in dem Abschnitt C der Abb. 3.8 dargestellt ist. Zur Quantifizierung der Daten wurden die Antworten auf den jeweiligen Lichtstimulus unter den verschiedenen Bedingungen jeweils zu Beginn des Stimulus am größten Ausschlag der Amplitude (peak response) gemessen. Die so erhaltenen Werte wurden für jede Bedingung gemittelt und statistisch ausgewertet. Da die H2-Horizontalzellen bei der Analyse überwogen, beziehen sich die hier gezeigten Daten ausschließlich auf diesen Typ. Beim Vergleich dunkeladaptierter und lichtadaptierter Retinen ergab sich eine deutliche Reduzierung der Antwortamplitude auf den Ring-Stimulus während es zu einem leichten Anstieg der durchschnittlichen Antwort auf den Punkt-Stimulus kam. Eine vergleichbare Veränderung des Antwortverhaltens der Zellen war nach dauerhafter Dunkeladaptation zu beobachten (Abb. 3.8 D). Die entsprechenden Mittelwerte (± Standardabweichung) sind im Anhang (Tab. 8.1, S. 152) zusammengefasst. Die aus diesen Befunden abgeleitete Reduzierung der rezeptiven Feldgröße der Zellen nach Lichtadaptation bzw. nach dauerhafter Dunkeladaptation stimmt mit den Befunden der Neurobiotin-Injektionsversuche überein (Abb. 3.8 E und F). Hier konnte gezeigt werden, dass die Gap Junction-vermittelte Kopplung der Zellen unter dunkeladaptierten (D) Bedingungen am höchsten ist und in einer großflächigen Ausbreitung des Neurobiotins in viele benachbarte Zellen resultiert, während nach einer dauerhaften Dunkeladaptation (DD) bzw. Lichtadaptation (L) diese Kopplung reduziert ist und wesentlich weniger benachbarte Zellen das Neurobiotin aufgenommen haben. Nach Auszählung der gekoppelten Zellen ergaben sich Mittelwerte (± Standardabweichung) von 41 ± 9 gekoppelte Zellen in dunkeladaptierten Retinen (n = 6),  $4 \pm 2$  gekoppelte Zellen nach Lichtadaptation (n = 6; p = 2 x 10<sup>-6</sup>) und 15 \pm 4 gekoppelte Zellen nach dauerhafter Dunkeladaptation (n = 5; p = 4 x  $10^{-5}$ ) (Abb. 3.8 F). Die hier beschriebenen Effekte unterschiedlicher Lichtadaptationszustände auf die Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen bestätigen die Annahme der zuvor beschriebenen triphasischen Organisation Gap Junction-vermittelter Kommunikation von Horizontalzellen (vgl. 1.3.3).

Basierend auf diesen physiologischen Befunden wurde ein potentieller modulatorischer Einfluss der verschiedenen Adaptationszustände von Retinen auf das horizontalzellspezifische Connexin cpCx53.8 mittels Western Blot Analysen untersucht. Wie in der Abb. 3.8 G zu erkennen ist, treten deutliche Unterschiede im cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmuster in Abhängigkeit vom adaptiven Status der Retinen auf. In den dunkeladaptierten Proben (D) ist in der Regel eine prominente Proteindoppelbande im Bereich von ca. 55-57 kDa zu beobachten (Abb. 3.8 G, Asterisks). Dieses Immunoreaktivitätsmuster verändert sich in den Membranproben der dauerhaft dunkeladaptierten Retinen (DD) bzw. der lichtadaptierten Retinen (L) dahingehend, dass verstärkt höhermolekulare Proteinbanden im Bereich von ca. 60 kDa auftreten (Abb. 3.8 G, Pfeile). So erscheint u.a. die Proteinbande bei ca. 57 kDa, die in der dunkeladaptierten Probe sehr prominent war, in den Proben der dauerhaft dunkeladaptierten sowie lichtadaptierten Retinen in einer weitaus schwächeren Intensität, während gleichzeitig höhermolekulare immunoreaktive Banden auftauchen. Aufgrund dieses Befundes wurde angenommen, dass cpCx53.8 über einen lichtabhängigen Mechanismus moduliert wird, der die Laufeigenschaften des Proteins innerhalb des Polyacrylamidgels beeinflusst. Ein Mechanismus über den die Ladungs- und Laufeigenschaften von Proteinen im Gel beeinflusst werden können ist die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, und es ist Eigenschaften von Gap Junctions über einen veränderten bekannt, dass die Phosphorylierungszustand, der an ihrem Aufbau beteiligten Connexine moduliert werden (Lampe und Lau, 2000). Um zu überprüfen ob die beobachteten Veränderungen im cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmuster auf Veränderungen in dessen Phosphorylierung zurückzuführen sind wurde daher in einem ersten Schritt getestet welche Wirkung die Behandlung der Proben mit alkaliner Phosphatase (AP) auf das jeweilige Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8 hat. Wie aus Abb. 3.8 G ersichtlich wird, reduziert sich durch die Behandlung mit AP (vgl. 2.2.2) die cpCx53.8-Immunoreaktivität in allen drei Proben (DD/AP, D/AP, L/AP) auf eine einzige prominente Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 53 kDa (Abb. 3.8 G, Pfeilspitzen). Folglich repräsentiert diese Proteinbande die native (unphosphorylierte) Form von cpCx53.8, und es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den insbesondere in den dauerhaft dunkeladaptierten und lichtadaptierten Proben beobachteten höhermolekularen Proteinbanden um phosphorylierte Isoformen von cpCx53.8 handelt. Zusammen mit den in Abb.3.8 A–F dargestellten physiologischen Befunden zum Kopplungsverhalten von Horizontalzellen deuten diese ersten, zur Modulation des Phosphorylierungszustandes von cpCx53.8 erzielten Befunde daraufhin, dass eine Entkopplung der Zellen mit einer gesteigerten Phosphorylierung zumindest eines der von Horizontalzellen exprimierten Connexine einhergeht. Darüberhinaus verdeutlichen die proteinbiochemischen Befunde der Abb. 3.8 G, dass nicht nur die Proteinbanden der dauerhaft dunkeladaptierten und lichtadaptierten Retinaproben phosphorylierte Isoformen darstellen, sondern dass bereits die in der dunkeladaptierten Retinaprobe detektierten Proteinbanden phosphorylierten Isoformen von cpCx53.8 entsprechen, was wiederum bedeuten könnte, dass nur phosphoryliertes cpCx53.8 Protein in die Zellmembran eingebaut wird, wie dies bereits für Cx43 beschrieben wurde (Solan und Lampe, 2007).

# 3.2.2 Effekte von Dopamin und PKA auf die Horizontalzellkopplung und die Phosphorylierung von cpCx53.8

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen lichtabhängigen Veränderungen des Kopplungszustandes von Horizontalzellen und dem veränderten Phosphorylierungsgrad eines der in Horizontalzellen exprimierten Connexine (cpCx53.8) besteht. Um detaillierte Erkenntnisse hinsichtlich der zugrunde liegenden zellulären Prozesse zu gewinnen, wurde in weitergehenden Experimenten getestet, welche Neurotransmitter und Neuromodulatoren sowie Proteinkinasen an der Vermittlung der lichtabhängigen Modulation dieses Connexins beteiligt sind. Dazu wurde zunächst der Einfluss, des in der Retina gut untersuchten Neuromodulators Dopamin sowohl auf physiologischer Ebene (Intrazellulärableitungen und Neurobiotininjektionen) als auch auf proteinbiochemischer Ebene (Western Blot Analysen) getestet (Abb. 3.9).


Abb. 3.9: Einfluss von Dopamin auf die Horizontalzellkopplung und die Phosphorylierung von cpCx53.8 A) Vergleich der Amwortamplituden einer H2-Horizontalzelle auf einen kombinierten Ring-Punkt-Lichtstimulus (*annulus-spot*) nach Dunkeladaptation und nach der Inkubation mit Dopamin. In **B**) und **C**) sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) der Antwortamplituden (mV) der Horizontalzellen auf den Ring-Punkt-Lichtstimulus unter den jeweilig gekennzeichneten Inkubationsbedingungen graphisch dargestellt. **D**) Exemplarische Aufnahmen von Neurobiotin-Injektionen in H2 Zellen nach Dopamin Inkubation (DA) und einer Präinkubation mit H89 (DA/H89) (Skalierung = 50 µm). Die Ergebnisse der Quantifizierung Neurobiotin gekoppelter Zellen und der Vergleich der jeweiligen Inkubationsbedingungen sind in **E**) graphisch dargestellt (Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung, n = 6); **F**) Dopamin (DA) induziert einen Anstieg der Phosphorylierung von cpCx53.8. Der Dopamin-Effekt wird durch eine Präinkubation mit Schering23390 (SCH) oder H89 inhibiert. **G**) Die Inhibitoren Staurosporin (stau) und UO126 haben keinen Einfluss auf die Dopamin-induzierte Phosphorylierung; **H**) Die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit 8-Br-cAMP (cAMP) resultiert in einer gesteigerten Phosphorylierung von cpCx53.8. Der cAMP-Effekt wird durch eine Präinkubation mit H89 inhibiert. In jeder Probe wurden 40 µg Protein aufgetragen; primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); kDa = kilo Dalton; Signifikanz **B**), **C**) und **E**) = (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n.s. p > 0,05)

Zur Untersuchung der rezeptiven Feldgröße mittels Intrazellulärableitungen wurde wieder ein kombinierter Ring-Punkt-Lichtstimulus (annulus-spot) verwendet. Nach Inkubation dunkeladaptierter (D) Retinen mit Dopamin (DA) zeigten sich eine Reduzierung der durchschnittlichen Antwortamplitude auf den Ring-Stimulus und ein leichter Anstieg auf den Punkt-Stimulus (vgl. Abb. 3.9 A, B und Tab. 8.1 im Anhang, S. 152). Diese Befunde belegen eine Verringerung der rezeptiven Feldgröße nach Dopamin-Inkubation, welche mit der durch Licht bzw. dauerhafter Dunkeladaptation hervorgerufenen Reduzierung vergleichbar ist (vgl. Abb. 3.8) und bestätigen vorangegangene Untersuchungen (Mangel und Dowling, 1985; McMahon und Mattson, 1996). Die Befunde zur Dopamin-vermittelten Reduzierung der rezeptiven Feldgröße stimmen mit den Befunden der Injektionsversuche überein (Abb. 3.9 D und E). Die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin resultierte in einer deutlich reduzierten Anzahl gekoppelter Zellen (7  $\pm$  5 gekoppelte Zellen; n = 6) im Vergleich zur Dunkeladaptation (41  $\pm$  9 gekoppelte Zellen, n = 6) und ist demnach in etwa vergleichbar mit der durch Licht- bzw. dauerhafter Dunkeladaptation hervorgerufenen Reduzierung der Kopplung (vgl. Abb. 3.8).

Zur Überprüfung potentieller Effekte von Dopamin auf das Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster von cpCx53.8 wurden dunkeladaptierte Retinen mit Dopamin inkubiert und die Muster der gewonnenen Membranfraktionen anschließend mittels Western Blot mit denen von dunkeladaptierten (D) und lichtadaptierten (L) Retinen verglichen. Letztere wurden zur besseren Vergleichbarkeit und als Kontrolle für jeden Versuch mit analysiert. Anhand der Abbildungen 3.9 F und G wird deutlich, dass die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin zu einer erhöhten Phosphorylierung von cpCx53.8 führte (Pfeilspitzen). In den dunkeladaptierten Proben wurde hauptsächlich die Proteinbande bei ca. 55 kDa (Abb. 3.9 F und G; Pfeile) detektiert. In einigen Fällen wurde auch in der dunkeladaptierten Probe eine leichte Zunahme der Immunoreaktivität in höhermolekularen Isoformen beobachtet (vgl. Abb. 3.9 F; oberer Pfeil). Aufgrund dieser Varianz im cpCx53.8-Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster war es unerlässlich, die jeweiligen Kontrollproben auf jedem Gel mit aufzutragen, da nur so potentielle Effekte des eingesetzten Modulators eindeutig bestimmt werden konnten. Für die mit Dopamin durchgeführten Versuche zeigte sich in allen Fällen (n = 6), dass das Dopamin-induziertecpCx53.8-Phosphorylierungsmuster nahezu identisch war mit dem durch Licht-induzierten Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster.

In Horizontalzellen wirkt Dopamin über die Aktivierung von D1-Rezeptoren, wodurch es nachgeschaltet in den Zellen zur Aktivierung des cAMP/PKA-Signalwegs kommt (Frail et al., 1993; Bloomfield und Völgyi, 2009). Um zu überprüfen inwieweit die Aktivierung dieser Signalkaskade, zusätzlich zu ihrem Einfluss auf die Größe der rezeptiven Felder und Kopplung von Horizontalzellen, auch einen Einfluss auf das cpCx53.8-Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster hat wurden im Weiteren (1) die Wirkung des D1-Dopamin-Antagonisten SCH23390 (SCH) auf die Dopamin-induzierte Rezeptor (DAR1) Phosphorylierung von cpCx53.8 und (2) die Effekte des spezifischen PKA-Inhibitors H89-Dihydrochloride (H89) untersucht. Dieser Inhibitor wurde sowohl hinsichtlich seiner Wirkung auf die Dopamin-induzierte Phosphorylierung von cpCx53.8 getestet als auch auf die Größe der rezeptiven Felder und Kopplung von Horizontalzellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.9. C, D und E zusammengefasst. Sie zeigen, dass die Präinkubation mit H89 nicht nur die Dopamin-induzierte Reduzierung der rezeptiven Feldgröße signifikant hemmt (vgl. Abb. 3.9 C; Anhang, Tab. 8.1, S. 152), sondern auch die durch Dopamin induzierte Entkopplung der Horizontalzellen (Abb. 3.9 D und E, dargestellt mittels Neurobiotin-Injektionen) verhindert. Eine Präinkubation mit H89 resultierte in einer vermehrten Kopplung benachbarter Zellen. Nach Auszählung der gekoppelten Zellen ergab sich ein signifikanter Anstieg von 7  $\pm$  5 (Dopamin-Inkubation; n = 6) auf 31  $\pm$  7 gekoppelte Zellen nach Präinkubation mit H89 (n = 5; p = 0,0001) (vgl. Abb. 3.9 E). Der hemmende Einfluss des DAR1 Antagonisten SCH23390 auf die Dopamin-vermittelte Reduzierung der rezeptiven Feldgröße und die Entkopplung von Horizontalzellen konnte bereits in vorangegangenen Studien gezeigt werden (McMahon und Mattson, 1996; Wang et al., 1997). Demnach wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt von SCH23390 ausschließlich auf die Dopamin-induzierte Phosphorylierung von cpCx53.8 untersucht. Es zeigte sich, dass nach einer entsprechenden Präinkubation mit H89 sowie mit SCH23390 die Dopamin-induzierte Phosphorylierung vollständig blockiert wurde (vgl. Abb. 3.9 F). Das cpCx53.8-Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster glich in diesen Proben dem der dunkeladaptierten Kontrollprobe (D). Zur Überprüfung, ob weitere Proteinkinasen an der Vermittlung der Dopamin-induzierten Phosphorylierung von cpCx53.8 beteiligt sein könnten wurde zusätzlich untersucht, ob der PKC-Inhibitor Staurosporin (stau) oder der MAP-Kinase-Inhibitor UO126 (MAP = mitogen activated protein) einen hemmenden Effekt auf die Dopamin-vermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8 zeigten. Wie auf der Abb. 3.9 G zu sehen ist, wurde die Dopamin-induzierte Phosphorylierung durch keinen dieser Inhibitoren beeinflusst, da in diesen Proben ebenfalls eine Detektion höhermolekularer Isoformen von cpCx53.8 erfolgte (Pfeilspitzen). Die Inhibition der Dopamin-Effekte durch SCH23390 bzw. H89 deutet auf die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade hin, welche über einen D1-Rezeptor in der Aktivierung der PKA resultiert. Es ist bekannt, dass innerhalb der PKA-Signalkaskade cAMP als *second messenger* agiert. Dementsprechend wurde ebenfalls der Effekt von cAMP auf die Phosphorylierung von cpCx53.8 getestet. Zur Überprüfung der Effekte wurde das membrangängige cAMP-Derivat 8-Bromo-cAMP (8-Br-cAMP) verwendet. Eine entsprechende Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit 8-Br-cAMP resultierte ebenfalls in einer gesteigerten Phosphorylierung von cpCx53.8 (Abb. 3.9 H; Pfeilspitzen). Der cAMP-induzierte Effekt konnte durch Präinkubation mit H89 inhibiert werden.

Zusammenfassend deuten diese Befunde darauf hin, dass an der Vermittlung der lichtabhängigen Modulation des Kopplungsverhaltens der Horizontalzellen sowie der Phosphorylierung von cpCx53.8 eine PKA-Signalkaskade beteiligt ist. Zur Überprüfung dieser Annahme, wurden die Auswirkungen der PKA-Inhibition (H89-Präinkubation) auf die unterschiedlichen Lichtbedingungen untersucht.



Abb. 3.10: Effekte der PKA-Inhibition auf die unterschiedlichen Adaptationszustände

In **A**) und **B**) sind jeweils repräsentative Beispiele der Antwortamplituden von H2-Zellen auf den Ring-Punkt-Stimulus (annulus-spot) unter verschiedenen Inkubationsbedingungen gezeigt. In A) ist der Vergleich zwischen der Präinkubation mit dem PKA-Inhibitor H89 (dunkeladaptiert/H89) und der anschließenden Lichtadaptation gezeigt (lichtadaptiert/H89). In B) ist hingegen der Einfluss der Präinkubation mit H89 auf die dauerhafte Dunkeladaptation gezeigt. **C**) und **D**) Quantifizierung der gemittelten Antwortamplituden (Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung) von H2-Horizontalzellen auf einen Ring-Punkt-Lichtstimulus nach Dunkeladaptation (D), Lichtadaptation (L) und dauerhafter Dunkeladaptation (DD) sowie nach Präinkubation mit H89. **E**) Exemplarische Darstellung von Neurobiotin-gekoppelten Zellen nach Lichtadaptation (L) und dauerhafter Dunkeladaptation (DD) sowie nach der der jeweiligen Präinkubation mit H89, IP). F) Quantifizierungsergebnis der Auszählung Neurobiotin-gekoppelter Zellen unter den gekennzeichneten Inkubationsbedingungen; **G**) Western Blot Analyse von Membranfraktionen dunkeladaptierter (D), lichtadaptierter (L) und dauerhaft dunkeladaptierter (DD) Retinen und der jeweiligen Präinkubation mit H89, primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); kDa = kilo Dalton; Signifikanz C), D) und E) = (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; n.s. p > 0.05)

Die Analyse der Effekte von H89 auf die unterschiedlichen Adaptationszustände erfolgte ebenfalls sowohl auf physiologischer Ebene (Intrazellulärableitungen und Neurobiotin-Injektionen) als auch auf proteinbiochemischer Ebene (Western Blot). Die Abschnitte A und B der Abb. 3.10 zeigen jeweils exemplarisch das veränderte Antwortverhalten einer H2 Zelle nach der H89-Präinkubation und anschließender Lichtadaptation bzw. dauerhafter Dunkeladaptation. Die Quantifizierung der Daten (Abb. 3.10 C und D) zeigte, dass die Inhibition der PKA sowohl bei Lichtadaptation als auch bei dauerhafter Dunkeladaptation in einem signifikanten Anstieg der durchschnittlichen Antwortamplitude auf den Ring-Stimulus resultierte. Außerdem zeigte sich ebenfalls in beiden Fällen eine Reduzierung der Amplitude auf den Punkt-Stimulus (Mittelwerte ± Standardabweichung siehe Anhang, Tab. 8.1, S. 152). Die PKA-Inhibition führt demnach in beiden Fällen zu einem erneuten Anstieg der rezeptiven Feldgröße der abgeleiteten Horizontalzellen. Diese Annahme bestätigte sich ebenfalls im Hinblick auf die Daten der Neurobiotininjektionen (Abb. 3.10 E und F). Die Präinkubation mit H89 führte sowohl nach Lichtadaptation als auch nach dauerhafter Dunkeladaptation zu einem signifikanten Anstieg gekoppelter Zellen, was auf eine erhöhte Gap Junction-Kopplung bzw. auf eine erhöhte Permeabilität der Gap Junction-Kanäle schließen lässt. Im Falle der Lichtadaptation stieg die Anzahl gekoppelter Zellen nach H89-Präinkubation auf  $14 \pm 3$  (n = 6;  $p = 5 \ge 10^{-5}$  (lichtadaptiert = 4 ± 2) und im Falle der dauerhaften Dunkeladaptation auf 21  $\pm 2$  (n = 6; p = 5 x 10<sup>-5</sup>) (dauerhaft dunkeladaptiert = 8  $\pm$  3).

Zur Überprüfung des Einflusses von H89 auf die lichtabhängige Phosphorylierung von cpCx53.8 wurden die Membranfraktionen entsprechend inkubierter Retinen mittels Western Blot Analysen verglichen. Im Abschnitt G der Abb. 3.10 ist erneut der modulatorische Einfluss der Lichtadaptation bzw. der dauerhaften Dunkeladaptation in Form einer gesteigerten Phosphorylierung von cpCx53.8 gezeigt. In der Probe der dunkeladaptierten Retinen, kam es zur Detektion der charakteristischen Doppelbande bei ca. 58 und 59 kDa (Abb. 3.10; Asterisks). In den Proben der dauerhaft dunkeladaptierten bzw. lichtadaptierten Retinen zeigte sich eine Verschiebung des Immunoreaktivitätsmusters (*shift*), welche sich in der Detektion höhermolekularer Isoformen von cpCx53.8 im Bereich von ca. 60 kDa äußerte (Abb. 3.10; Pfeile). Die Proteinbande bei ca. 58 kDa, welche innerhalb der dunkeladaptierten Probe deutlich markiert wurde, erschien nach der Lichtadaptation bzw. der dauerhaften

Dunkeladaptation weitaus weniger intensiv. In den Proben, der mit H89 präinkubierten Retinen kam es wiederum zur Detektion der entsprechenden Bande bei ca. 58 kDa (Abb. 3.10 G; Pfeilspitzen). Außerdem zeigte sich sowohl in der lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierten Probe, dass die PKA-Inhibition einen Einfluss auf die höhermolekularen phosphorylierten Isoformen aufweist. Die Proteinbanden bei ca. 60 kDa werden in beiden Fällen nur noch sehr schwach detektiert. Grundsätzlich ähnelt das Detektionsmuster der L/H89 und der DD/H89 Proben dem der Dunkelkontrolle (D).

Die gezeigten Befunde lassen den Schluss zu, dass an der Vermittlung der lichtabhängigen Signale, welche zu einem Schließen der Gap Junction-Kanäle und zu einer Reduzierung der rezeptiven Feldgröße führt, eine PKA-Signalkaskade beteiligt ist. Durch die Aktivierung Phosphorylierung dieser Kaskade wird offensichtlich eine gesteigerte der Horizontalzellconnexine eingeleitet, welche zur Modulation der Permeabilität der Gap Junctions führt. Als ein mögliches Signalmolekül zur Aktivierung dieser Kaskade kommt der Neuromodulator Dopamin in Frage. Die Befunde verdeutlichen allerdings auch, dass die PKA-Inhibition nicht zu einer vollständigen Hemmung der, durch die unterschiedlichen Adaptationszustände hervorgerufenen Effekte führt. Demnach ist es denkbar, dass an der Vermittlung der lichtabhängigen Modulation weitere Signalwege und/oder Neuromodulatoren beteiligt sein könnten.

# 3.2.3 Effekte von Retinsäure und PKC auf die Horizontalzellkopplung und die Phosphorylierung von cpCx53.8

Neben Dopamin stellt Retinsäure (RA) einen weiteren Neuromodulator dar, der die Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen nachweislich beeinflusst (Pottek *et al.*, 1997; Weiler *et al.*, 1998). Der Syntheseprozess von Retinsäure ist zwar weitestgehend bekannt (Sporn und Roberts, 1985), die Vielfältigkeit der unterschiedlichen Wirkungsweisen verschiedener Retinsäure-Derivate ist jedoch nur unzureichend untersucht. Retinsäure (auch Vitamin A Säure) ist ein Nebenprodukt des Phototransduktionszyklus und kommt als Signalmolekül in unterschiedlichen Isomeren vor. Zu den biologisch wirksamsten Formen zählen 9-*cis*-RA, 13-*cis*-RA sowie *all-trans*-RA.



Abb. 3.11: Einfluss von Retinsäure auf die Horizontalzellkopplung und die Phosphorylierung von cpCx53.8

A) Vergleich der Amwortamplituden einer H2-Horizontalzelle auf einen kombinierten Ring-Punkt-Lichtstimulus (*annulus-spot*) nach Dunkeladaptation und nach der Inkubation mit *all-trans* Retinsäure (at-RA). In **B**) und **C**) sind die Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichungen) der Antwortamplituden (mV) der Horizontalzellen auf den Ring-Punkt-Lichtstimulus unter den jeweilig gekennzeichneten Inkubationsbedingungen graphisch dargestellt; **D**) Exemplarische Aufnahmen von Neurobiotin-Injektionen in H2 Zellen nach *all-trans* Retinsäure Inkubation (at-RA) und einer Präinkubation mit Staurosporin (at-RA/stau) (scale bar = 50 µm). Die Ergebnisse der Quantifizierung Neurobiotin gekoppelter Zellen und der Vergleich der jeweiligen Inkubationsbedingungen sind in **E**) graphisch dargestellt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung); **F**) Die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit at-RA führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung von cpCx53.8. Die Retinsäure Derivate 9-*cis* RA und 13-*cis* RA haben keinen Effekt auf die cpCx53.8 Phosphorylierung; **G**) Die at-RA-vermittelte Phosphorylierung wird durch Präinkubation mit Staurosporin gehemmt. Die Inhibitoren UO126 (MEK/MAP-Inhibitor) und H89 haben keinen Einfluss auf die Retinsäure-induzierte Phosphorylierung; **H**) Die Inkubation dunkeladaptierter

Retinen mit PDBu resultiert in einer gesteigerten Phosphorylierung von cpCx53.8, der PDBu-Effekt wird durch eine Präinkubation mit Staurosporin inhibiert. In jeder Probe wurden 40 µg Protein aufgetragen; primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); kDa = kilo Dalton; Signifikanz **B**), **C**) und **E**) = (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n.s. p > 0,05)

Zur Untersuchung potentieller Effekte von Retinsäure auf die rezeptive Feldgröße bzw. die Kopplungseigenschaften der Horizontalzellen wurden die Inkubationen mit *all-trans*-RA (at-RA) durchgeführt. Die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit at-RA resultierte in einer ähnlich starken Reduzierung der rezeptiven Feldgröße wie dies nach Dopamin-Inkubation der Fall war (vgl. Abb. 3.9). Dies äußerte sich in einer Verringerung der durchschnittlichen Antwortamplitude auf den Ring-Stimulus und einem entsprechenden Anstieg der Amplitude auf den Punkt-Stimulus (Abb. 3.11 A und B; Anhang Tab. 8.1, S. 152) (n = 7). Die Befunde der Intrazellulärableitungen waren ebenfalls kongruent mit denen der Neurobiotin-Injektionen (Abb. 3.11 D und E). So resultierte die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit at-RA ebenfalls in einer deutlich reduzierten Anzahl gekoppelter Zellen. Nach der Auszählung, der mit Neurobiotin gefärbten Zellen ergab sich ein Mittelwert der dunkeladaptierten Retinen (41 ± 9 gekoppelte Zellen; vgl. Abb. 3.8) unterscheidet (p =  $6.8 \times 10^{-6}$ ).

Zur Untersuchung der Effekte von Retinsäure auf den Grad der Phosphorylierung von cpCx53.8 wurden neben at-RA auch die Derivate 9-cis-RA und 13-cis-RA getestet. Im Falle der Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit at-RA zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung, welcher sich in einer Verschiebung des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters und der Detektion höhermolekularer phosphorylierter Isoformen von cpCx53.8 bei ca. 60-65 kDa äußerte (Abb. 3.11 F; Pfeilspitzen). Die Detektion von cpCx53.8 in der at-RA Probe war vergleichbar mit der Detektion des Connexins innerhalb der lichtadaptierten Kontrollprobe. Es zeigte sich, dass weder 9-cis-RA noch 13-cis-RA einen Effekt auf die Phosphorylierung von cpCx53.8 hatten. Die Immunodetektion von cpCx53.8 resultierte in beiden Fällen in einer Doppelbande bei ca. 55–58 kDa, die vergleichbar war mit der in der dunkeladaptierten Probe (D) (Abb. 3.11 F; Pfeile). Die gezeigten Ergebnisse belegen demnach eindeutig einen modulatorischen Effekt von at-RA auf die Phosphorylierung von cpCx53.8.

Der veränderte Phosphorylierungsgrad von cpCx53.8 nach der Behandlung mit at-RA deutet ebenfalls auf die Aktivierung einer Proteinkinase hin. Dementsprechend wurde auch in diesem Fall der Einfluss der Proteinkinase-Inhibitoren (H89, Staurosporin, UO126) auf die at-RA-vermittelte Phosphorylierung untersucht. In Abb. 3.11 G ist zu sehen, dass lediglich eine Präinkubation mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin (stau) den at-RA-Effekt blockierte (Abb. 3.11 G; Pfeilspitze). Im Falle einer Präinkubation mit H89 oder UO126 wurde die at-RA-vermittelte Phosphorylierung nicht beeinflusst und das cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmuster entsprach in etwa dem, durch Licht induzierten. Vergleichbare Ergebnisse zur at-RA-vermittelten Phosphorylierung von cpCx53.8 bzw. zur Inhibition der Effekte durch Staurosporin konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit in insgesamt 4 Versuchen reproduziert werden. Außerdem konnten entsprechende Reproduktionen in der Masterarbeit von Katharina John (2011; Arbeitsgruppe Neurobiologie, Universität Oldenburg) erzielt werden. Die im weiteren Verlauf der Arbeit dargestellten und beschriebenen Effekte von Retinsäure beziehen sich ausschließlich auf die *all-trans* Form. Aus Gründen der verbesserten Lesbarkeit wird nur noch der Begriff Retinsäure (bzw. die Abkürzung RA) verwendet.

Die spezifische Inhibition der Retinsäure-Effekte durch Staurosporin stellt einen direkten Hinweis auf eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8 dar. Zur weiteren Überprüfung einer PKC-abhängigen Modulation wurde ebenfalls der Effekt des Phorbolesters Phorbol-12,13-Dibutyrat (PDBu), welcher einen spezifischen PKC-Aktivator darstellt (Worley *et al.*, 1986; Janssen-Bienhold *et al.*, 1993, 1995; Weiler *et al.*, 1998) getestet. Wie auf der Abb. 3.11 H zu erkennen ist, zeigte sich nach der Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit PDBu auch ein Anstieg der Phosphorylierung von cpCx53.8, welcher sich ebenfalls in der Detektion höhermolekularer Isoformen des Proteins im Vergleich zur dunkeladaptierten Probe äußerte. Der PDBu-vermittelte Einfluss auf die Phosphorylierung von cpCx53.8 konnte in 3 Versuchen reproduziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die PDBu-vermittelte Phosphorylierung durch Staurosporin gehemmt wurde (Abb. 3.11 H). Die gezeigten Befunde untermauern die Annahme, dass cpCx53.8 ein Substrat für die PKC darstellt. Zusätzlich ist in der Abb. 3.11 H zu sehen, dass eine Präinkubation mit Staurosporin keinen Einfluss auf den cAMP-vermittelten Anstieg der Phosphorylierung von cpCx53.8 hat.

Die bisherigen Befunde deuten darauf hin, dass die Retinsäure-vermittelte Entkopplung der Horizontalzellen mit einer PKC-vermittelten Phosphorylierung von cpCx53.8 einhergeht. Zur Überprüfung der Annahme wurden die Auswirkungen der PKC-Inhibition (Staurosporin-Präinkubation) ebenfalls auf physiologischer Ebene mittels Intrazellulärableitungen und Neurobiotin-Injektionen untersucht. Kongruent zu den proteinbiochemischen Befunden zeigte sich auch hier, dass die Präinkubation mit Staurosporin zur Hemmung der Retinsäure-Effekte führte (Abb. 3.11 C, D und E). Sowohl für den Ring- als auch für den Punkt-Stimulus waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen durchschnittlichen Antwortamplituden der Dunkelkontrolle und der mit Staurosporin präinkubierten (at-RA/stau) Retinen zu verzeichnen (n = 8) (Abb. 3.11 C). Die Ergebnisse der Quantifizierung sind im Anhang (Tab. 8.1, S. 152) angefügt. Auch bei den Neurobiotin-Injektionen zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der durchschnittlichen Anzahl gekoppelter Zellen. Nach Auszählung der gekoppelten Zellen ergaben sich Mittelwerte von  $6 \pm 4$  gekoppelte Zellen nach Retinsäure Inkubation (n = 6) und  $35 \pm 6$  gekoppelte Zellen nach einer entsprechenden Präinkubation der Retinen mit Staurosporin (n = 5; p = 6,7 x 10<sup>-6</sup>) (Abb. 3.11 E).

Zur Überprüfung, ob die Inhibition der PKC auch Auswirkungen auf die, durch die unterschiedlichen Adaptationszustände hervorgerufene Modulation der rezeptiven Feldgröße, der Neurobiotin-Kopplung und der cpCx53.8-Phosphorylierung hat, wurde der Effekt von Staurosporin auf die unterschiedlichen adaptiven Stadien getestet.





In **A**) und **B**) sind jeweils repräsentative Beispiele der Antwortamplituden von H2-Zellen auf den Ring-Punkt-Stimulus (*annulus-spot*) nach den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen gezeigt. In A) ist der Vergleich zwischen der Präinkubation mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin (stau) (dunkeladaptiert/stau) und der anschließenden Lichtadaptation gezeigt (lichtadaptiert/stau). In B) ist hingegen der Einfluss der Präinkubation mit H89 auf die dauerhafte Dunkeladaptation gezeigt. **C**) und **D**) Quantifizierung der gemittelten Antwortamplituden von H2-Horizontalzellen auf den Ring-Punkt-Lichtstimulus nach Dunkeladaptation (D), Lichtadaptation (L) und dauerhafter Dunkeladaptation (DD) sowie nach Präinkubation mit Staurosporin. **E**) Exemplarische Darstellung von Neurobiotin-gekoppelten Zellen nach Lichtadaptation (L) und dauerhafter Dunkeladaptation (DD) sowie nach der der jeweiligen Präinkubation mit Staurosporin (L/stau, DD/stau). F) Quantifizierungsergebnis der Auszählung Neurobiotin-gekoppelter Zellen unter den gekennzeichneten Inkubationsbedingungen; **G**) Western Blot Analyse von Membranfraktionen dunkeladaptiert (D), lichtadaptierter (L) und dauerhaft dunkeladaptierter (DD) Retinen und der jeweiligen Präinkubation mit Staurosporin, primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); kDa = kilo Dalton; Signifikanz **C**), **D**) und **F**) = (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n.s. p > 0,05)

Die Inhibition der PKC durch Staurosporin hatte sowohl nach Lichtadaptation als auch nach dauerhafter Dunkeladaptation einen Einfluss auf das Antwortverhalten der Horizontalzellen auf den Ring-Punkt-Stimulus, wie dies exemplarisch in den Abschnitten A und B der Abb. 3.12 gezeigt ist. Ähnlich der zuvor gezeigten Ergebnisse zur PKA-Inhibition zeigte sich ein erneuter Anstieg der durchschnittlichen Antwortamplitude auf den Ring-Stimulus bei einer gleichzeitigen Verringerung der Amplitude auf den Punkt-Stimulus sowohl bei Lichtadaptation (n = 7) als auch bei dauerhafter Dunkeladaptation (n = 7) (Abb. 3.12 C und D; Anhang Tab. 8.1, S. 152). Diese Befunde deuten auf eine erneute Vergrößerung der rezeptiven Felder der abgeleiteten Zellen hin. Auch die Befunde der Neurobiotin-Injektionen zeigen einen erneuten Anstieg gekoppelter Zellen nach der Präinkubation mit Staurosporin und anschließender Lichtadaptation bzw. dauerhafter Dunkeladaptation (Abb. 3.12 E und F). So stieg die Anzahl gekoppelter Zellen nach der Präinkubation mit Staurosporin von  $4 \pm 2$  auf  $16 \pm 3$  (n = 6; p = 0,00001) im Falle der Lichtadaptation und von  $8 \pm 3$  auf  $17 \pm 4$  (n = 6; p = 0,0058) im Falle der dauerhaften Dunkeladaptation. Zur Überprüfung des Einflusses von Staurosporin auf die lichtabhängige Phosphorylierung von cpCx53.8 wurden die Membranfraktionen entsprechend inkubierter Retinen mittels Western Blot Analysen verglichen. Wie im Abschnitt G der Abb. 3.12 zu erkennen ist, resultierte die Präinkubation lichtadaptierter und dauerhaft dunkeladaptierter Retinen mit Staurosporin in einem veränderten cpCx53.8-Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster im Vergleich zu den Kontrollproben. Erneut kam es zur Detektion der Proteinbande bei ca. 58 kDa (Abb. 3.12 G, Asterisks), welche in den Proben der lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierten Retinen nicht bzw. nur äußerst schwach markiert wurde. Ebenfalls ist deutlich zu erkennen, dass die Detektion der höhermolekularen phosphorylierten Isoformen bei ca. 60 kDa (Abb. 3.12 G, Pfeilspitzen) in den mit Staurosporin behandelten Proben wesentlich geringer ausfiel als in den entsprechenden Kontrollproben.

### **3.2.4 Effekte der kombinativen Inhibition von PKA und PKC auf die Horizontalzellkopplung und die Phosphorylierung von cpCx53.8**

Die bisherigen Befunde veranschaulichen, dass an der Vermittlung der lichtabhängigen Modulation des Kopplungsverhaltens der Horizontalzellen sowie des Phosphorylierungszustandes von cpCx53.8 sowohl ein PKA- als auch ein PKC-vermittelter Signalweg beteiligt sind. Auffallend ist jedoch, dass eine Präinkubation mit H89 bzw. Staurosporin weder bei Lichtadaptation noch bei dauerhafter Dunkeladaptation zu einem vergleichbaren Rückgang der rezeptiven Feldgröße, der Gap Junction-Kopplung oder der Phosphorylierung von cpCx53.8 führte, wie dies unter Kontrollbedingungen der Fall war. In einem weiteren Ansatz wurden demnach auch die Effekte der kombinativen Applikation beider Inhibitoren auf die Lichtadaptation bzw. die dauerhafte Dunkeladaptation getestet.





In **A**) und **B**) ist das jeweilige Antwortverhalten von H2-Horizontalzellen auf den Ring-Punkt-Lichtstimulus (*annulus-spot*) nach der Präinkubation mit Staurosporin (stau) und H89 und anschließender Lichtadaptation, respektive dauerhafter Dunkeladaptation exemplarisch gezeigt. **C**) und **D**) Quantifizierung der Antwortamplituden (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung) von H2-Horizontalzellen auf einen Ring-Punkt-Lichtstimulus nach Dunkeladaptation (D), Lichtadaptation (L) und dauerhafter Dunkeladaptation (DD) sowie nach Präinkubation mit den Inhibitoren H89 und Staurosporin (L\* bzw. DD\*) (n = 7 für jede Bedingung). **E**) Beispiele für die Neurobiotin-Injektionen und den Grad der Gap Junction-Kopplung unter lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierten Bedingungen sowie nach der Präinkubation mit Staurosporin und H89 (L\* und DD\*). **F**) Quantifizierungsergebnis der Auszählung Neurobiotin-gekoppelter Zellen (Typ H2) nach

Dunkeladaptation, Lichtadaptation und dauerhafter Dunkeladaptation sowie der Präinkubation mit H89 und Staurosporin (L\* bzw. DD\*; jeweils n = 6); G) Western Blot Analyse von Membranfraktionen dunkeladaptierter (D), lichtadaptierter (L) und dauerhaft dunkeladaptierter (DD) Retinen sowie der Präinkubation mit H89 und Staurosporin (L\* und DD\*), primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); kDa = kilo Dalton; Signifikanz C), D) und F) = (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n.s. p > 0,05)

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur selektiven Wirkung von H89 bzw. Staurosporin auf die rezeptive Feldgröße deuteten bereits daraufhin, dass die lichtabhängige Modulation auf einer additiven Wirkung von PKA und PKC beruht. Diese Annahme wird durch die hier gezeigten Befunde bestätigt, da bei gleichzeitiger Präinkubation mit H89 und Staurosporin eine nahezu vollständige Inhibition der lichtabhängigen modulatorischen Einflüsse erzielt wurde. Eine gleichzeitige Inhibition von PKA und PKC führte zu einem starken Anstieg der Antwortamplituden auf den Ring-Stimulus sowie einem leichten Rückgang der Antwortamplituden auf den Punkt-Stimulus sowohl bei Lichtadaptation (n = 7) als auch bei dauerhafter Dunkeladaptation (n = 7) (Abb. 3.13 A, B, C, D). Dieser Befund veranschaulicht, dass sich die rezeptive Feldgröße der jeweiligen abgeleiteten Zellen vergrößerte und sich in beiden Fällen ( $L^*$  = lichtadaptiert/stau/H89 und  $DD^*$  = dauerhaft dunkeladaptiert/stau/H89) nicht mehr signifikant von der dunkeladaptierter Retinen unterscheidet. Die Mittelwerte (± Standardabweichung) der einzelnen Messungen sind der Tab. 8.1, S. 152 im Anhang zu entnehmen. Anhand der Injektionsdaten konnte gezeigt werden, dass durch die gleichzeitige Inhibition von PKA und PKC ebenfalls die Anzahl Gap Junction-gekoppelter Zellen signifikant anstieg. So ergab sich nach der Quantifizierung für die Lichtadaptation ein Anstieg von 4  $\pm$  2 auf 27  $\pm$  6 gekoppelte Zellen (n = 6; p = 7 x 10<sup>-6</sup>) und für die dauerhafte Dunkeladaptation ein Anstieg von  $8 \pm 3$  auf  $29 \pm 5$  gekoppelte Zellen (n = 6; p = 4,6 x 10<sup>-5</sup>). Eine vollständige Inhibition der lichtabhängigen Effekte auf den Kopplungsgrad der Zellen kann jedoch nach der hier gezeigten Datenlage nicht postuliert werden. In keinem der beiden Fälle resultierte die Inhibition in einem vergleichbaren Wert wie nach der Dunkeladaptation  $(41 \pm 9 \text{ gekoppelte Zellen})$  (D/L\*: p = 0.0118; D/DD\*: p = 0.0149).

Zusätzlich zu den physiologischen Auswirkungen der PKA- und PKC-Inhibition wurden ebenfalls deren Effekte auf den Phosphorylierungszustand von cpCx53.8 untersucht. Der Abschnitt D der Abb. 3.13 verdeutlicht erneut die modulatorische Wirkung einer Lichtadaptation bzw. einer dauerhaften Dunkeladaptation auf den Phosphorylierungszustand von cpCx53.8 im Vergleich zu der dunkeladaptierten Kontrolle. In der Probe der dunkeladaptierten Retinen wurde hauptsächlich die charakteristische Doppelbande bei ca. 55 und 56 kDa detektiert (Abb. 3.13 G, Asterisks). In den Proben der dauerhaft dunkeladaptierten bzw. lichtadaptierten Retinen kam es zur Verschiebung der Immunoreaktivität und zur Detektion höhermolekularer cpCx53.8-Isoformen im Bereich von ca. 60-62 kDa (Abb. 3.13 G, Pfeil). Die Proteinbande bei ca. 55 kDa verschwand nach der Lichtadaptation bzw. der dauerhaften Dunkeladaptation fast vollständig. Eine gleichzeitige Präinkubation der lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierten Retinen mit Staurosporin und H89 resultierte in einem deutlich verringerten Anstieg der Phosphorylierung von cpCx53.8. In beiden Fällen kam es wieder verstärkt zur Detektion der 55 bzw. 56 kDa Proteinbande und einer insgesamt weitaus geringeren Verschiebung ("shift") des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters in den höhermolekularen Bereich. Allerdings wurde auch in beiden Fällen noch eine phosphorylierte Isoform bei ca. 60 kDa detektiert (Abb. 3.13 G, Pfeilspitze), welche in der Intensität jedoch schwächer ausfiel als in den Proben der lichtadaptierten bzw. dauerhaft dunkeladaptierten Retinen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Präinkubation mit den Inhibitoren einen hemmenden Effekt auf den Anstieg der Phosphorylierung von cpCx53.8 ausübt. Eine vollständige Inhibition der jeweiligen Effekte von Lichtadaptation und dauerhafter Dunkeladaptation konnte allerdings nicht gezeigt werden, da zwischen dem Immunoreaktivitätsmuster der Kontrollbedingungen (dunkeladaptiert) und der Proben mit den Inhibitoren Unterschiede in Bezug auf die detektierten Isoformen bestehen. Die gezeigten Befunde konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit mehrfach mit einem vergleichbaren Resultat wiederholt werden. Außerdem konnten die Befunde im Rahmen der Bachelorarbeit von Janina Padecken (2013; AG Neurobiologie, Universität Oldenburg) reproduziert werden.

# 3.2.5 Aminosäuresequenzanalyse zur Identifikation potentieller *Phosphosites* in cpCx53.8

Zusammenfassend deuten die proteinbiochemischen Befunde zur Dopamin- und Retinsäurevermittelten Phosphorylierung darauf hin, dass die licht-induzierte Modulation von cpCx53.8 über zwei unabhängige Signalwege gesteuert wird. Die Inhibition spezifisch induzierter Phosphorylierung des Connexins durch H89 sowie Staurosporin belegt sowohl eine PKA- als auch eine PKC-vermittelte Modulation. Zur Überprüfung von Konsensussequenzen für Proteinkinasen wurde die Sequenz von cpCx53.8 mittels des frei verfügbaren Programms NetPhosK (NetPhosK 1.0 Server; *Technical University of Denmark*) analysiert.

| Site        | Kinase | Score |
|-------------|--------|-------|
| <br>c_0     | CKTT   | 0 62  |
| 0-9<br>T-19 | DKG    | 0.62  |
| S-50        | CKII   | 0.57  |
| S-86        | PKA    | 0.56  |
| T-121       | CKII   | 0.69  |
| S-151       | РКА    | 0.66  |
| S-151       | cdc2   | 0.54  |
| S-164       | PKC    | 0.51  |
| T-205       | PKC    | 0 61  |
| S-221       | PKA    | 0.70  |
| T-240       | PKC    | 0.73  |
| V-242       | SRC    | 0.58  |
| V-242       | TNSR   | 0.51  |
| S-247       | CKIT   | 0.53  |
| 8-256       | PKC    | 0.87  |
| 8-260       | PKA    | 0.56  |
| S-271       | PKC    | 0.67  |
| T-280       | PKC    | 0.51  |
| T-282       | PKC    | 0.66  |
| S-306       | CKII   | 0.53  |
| S-307       | DNAPK  | 0.64  |
| S-307       | АТМ    | 0.64  |
| S-313       | cdc2   | 0.52  |
| S-329       | DNAPK  | 0.57  |
| S-329       | PKG    | 0.60  |
| S-335       | PKA    | 0.53  |
| T-342       | PKC    | 0.74  |
| T-347       | PKA    | 0.83  |
| S-354       | PKA    | 0.57  |
| S-356       | CKII   | 0.57  |
| S-357       | CKI    | 0.60  |
| S-365       | PKA    | 0.58  |
| S-365       | cdc2   | 0.52  |
|             |        |       |

Abb. 3.14: NetPhosK Analyse zur Identifizierung potentieller Konensussequenzen für Proteinkinasen auf der cpCx53.8 Aminosäuresequenz

Es sind alle putativen Konsensussequenzen für verschiedene Proteinkinasen auf der cpCx53.8 Aminosäuresequenz gezeigt. In der ersten Spalte (Site) ist die jeweilige Position des entsprechenden Serin- oder Threonin-Restes innerhalb der Sequenz angegeben (S = Serin, T = Threonin). In der zweiten Spalte (Kinase) ist angegeben um welche Kinase es sich handelt und in der dritten Spalte (Score) wird die Wahrscheinlichkeit der Konsensussequenz für die Kinase angegeben. Die putativen PKA- und PKC-Phosphorylierungsstellen sind farbig unterlegt (PKA = blau; PKC = rot).

Ausgehend von der Umgebung einer phosphorylierbaren Aminosäure wird ein Score-Wert berechnet, der angibt, wie wahrscheinlich eine Phosphorylierung an dieser Stelle ist. Dieser Score-Wert geht bis maximal 1,0. Geringe Score-Werte beinhalten ein höheres Risiko für falsch positive Ergebnisse, so dass für cpCx53.8 erst Score-Werte ab 0,50 in die Analyse Die ergab die höchsten Score-Werte aufgenommen wurden. Analyse von Konsensussequenzen für PKC (Position 256; 0,87) und für PKA (Position 467; 0,86). Für die Analyse wurden nur entsprechende Sites berücksichtigt, die als mögliche intrazelluläre Targets in Frage kommen. In der Übersicht sind die Sites für PKC und PKA entsprechend farbig unterlegt (PKC = rot; PKA = blau). Des Weiteren veranschaulicht die Abb. 3.14, dass

neben den putativen Phosphorylierungsstellen für PKC und PKA noch weitere potentielle *Sites* für eine Vielzahl anderer Kinasen auf der Sequenz zu finden sind (z.B. CKII = CamKinaseII, PKG = Proteinkinase G etc.). Diese zeigten jedoch durchweg geringere *Score*-Werte und keine dieser *Sites* zeigte einen Wert über 0,70.

- 1-40 MGDWNLLGSILEEVHIHSTIVGKIWLTILFIFRMLVLGVA
- 41-80 AEDVWDDEQSEFV<mark>C</mark>NTEQPG<mark>C</mark>KNV<mark>C</mark>YDRAFPISLIRYWVL
- 81-120 QIIFVSSPSLVYMGHALYRLRALEKERHKKKAHLKVELEE
- 121-160 TEALEEHKRIEKELRKLEEQKKVRKAPLRGSLLRTYVLHI
- 161-200 ITRSVVEVGFIVGQYVLYGIGLSPLYKCERDPCPNSVDCF
- 201-240 VSRPTEKNIFMIFMLVIAGVSLFLNLLEIFHLGVKKIKE
- 241-280 IYGSKYSGDDESICR<mark>S</mark>KKN<mark>S</mark>MVQQVCILTN<mark>S</mark>SPQKHMHL
- 281-320 HTSLVVVPDGQMAPMPLYMPMAGPPSSQEVPNSNPNGSEQ
- 321-360 PPRQNRLPSQPEFQSLQQLGATERRPTLDNRPHSCSSEES
- 361-400 GPKG<mark>S</mark>GPPRNFSQQPRA<mark>S</mark>LRA<mark>S</mark>NIEIPAALRKQ<mark>S</mark>RVSQCK
- 401-440 DFSEESDSQESGNYP<mark>T</mark>ARKA<mark>S</mark>FMSRGLSESPSESAASKSG
- 441-480 SDTEANRLAQGESPAMTPPPATGRRMSMSMILELSSIMKK

#### Abb. 3.15: cpCx53.8-Aminosäuresequenz; putative PKA- und PKC-Phosphosites

Nach der Ermittlung putativer Phosphorylierungsstellen für PKA und PKC innerhalb des C-terminalen Endes der cpCx53.8-Aminosäuresequenz wurden die entsprechenden Serin und Threonin Aminosäuren farbig gekennzeichnet (PKA = blau, PKC = rot). Neben den Phosphorylierungsstellen sind die Bereiche der Transmembrandomänen (grau), der Antikörper-Bindedomäne (grün) sowie die extrazellulär lokalisierten Cysteinreste (gelb) farbig unterlegt.

In der Abb. 3.15 ist die gesamte Aminosäuresequenz von cpCx53.8 dargestellt. Innerhalb der Sequenz sind die Transmembrandomänen (grau), die Cysteinreste (gelb) der extrazellulären Loops (EL1 und EL2), sowie die Antikörper-Bindedomäne (grün) gekennzeichnet. Außerdem sind die putativen Phosphosites für PKA (blau) und PKC (rot), welche auf dem C-terminalen Ende der Sequenz lokalisiert sind gekennzeichnet. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse scheint sowohl eine PKA- als auch eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8 möglich. Die Befunde bestärken demnach abermals die Hypothese, dass zwei unabhängige Signalwege zur Modulation von cpCx53.8 vorhanden sind.

#### 3.2.6 Lichtabhängige Modulation des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters

Zusätzlich zu den physiologischen und proteinbiochemischen Analysen zum Kopplungsverhalten der Horizontalzellen bzw. zur Phosphorylierung von cpCx53.8 wurden im Rahmen dieser Arbeit umfassende immunhistologische Untersuchungen hinsichtlich putativer Veränderungen des cpCx53.8-Verteilungsmusters in der Retina unternommen. Im Folgenden wird der Einfluss der unterschiedlichen Adaptationszustände auf die cpCx53.8-Immunoreaktivität dargelegt.



### Abb. 3.16: Auswirkungen unterschiedlicher Adaptationszustände auf die cpCx53.8-Immunoreaktivität in der Karpfenretina

A) Repräsentative Ausschnitte unterschiedlich adaptierter Karpfenretinen (dauerhaft dunkeladaptiert = DD; dunkeladaptiert = D; lichtadaptiert = L) im Bereich zwischen der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und der inneren nuklearen Schicht (INL) nach Inkubation mit anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600); Skalierung = 20 µm; B) Ergebnisse der Quantifizierung ausgezählter immunoreaktiver Plaques/100 µm<sup>2</sup> von drei separaten Präparationen bei den unterschiedlichen Inkubationsbedingungen; Die Grafik zeigt die Mittelwerte ± Standardabweichung aus jeweils 5 Zählquadraten/3 Objektträgern; C) Zusammenfassung der Quantifizierungsdaten der drei separaten Präparationen; Signifikanz = (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n.s. p > 0,05)

In der Abb. 3.16 A ist die Immunodetektion von cpCx53.8 in jeweils repräsentativen Ausschnitten zwischen der OPL und der INL von dauerhaft dunkel-, dunkel- und lichtadaptierten (DD, D, L) Karpfenretinen gezeigt. Es zeigen sich deutliche Unterschiede in Bezug auf die Intensität der Färbung bzw. das Verteilungsmuster der cpCx53.8immunoreaktiven Plaques. Innerhalb der dauerhaft dunkeladaptierten und der lichtadaptierten Retinen erscheint die Immunoreaktivität intensiver als die dunkeladaptierter Retinen und es erscheinen deutlich mehr Plaques. Zur Analyse potentiell modulatorischer Effekte auf das Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8 wurde in Anlehnung an vorangegangene Studien (Diplomarbeit Gerrit Hilgen, 2009; Masterarbeit Nadine Mellies, 2010) die jeweilige durchschnittliche Anzahl cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques innerhalb der Retina bestimmt (vgl. 2.6.4). Zum Vergleich wurden ausschließlich Bereiche des mittleren Teils der Schnitte (nahe des optischen Nervs) gewählt. In diesen Bereichen fand sich stets ein konstantes und durchgehendes cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmuster. In drei separaten Präparationen wurden die Augen jeweils eines Tieres für eine der drei Lichtbedingungen verwendet und die Anzahl immunoreaktiver Plaques/100  $\mu m^2$  (Mittelwerte ± Standardabweichung) miteinander verglichen (Abb. 3.16 B). Die jeweiligen Mittelwerte der Quantifizierung der drei Präparationen sind im Anhang in der Tab. 8.2, S. 153 aufgeführt. Im Abschnitt C der Abb. 3.16 sind die Ergebnisse der Quantifizierung von allen drei Präparationen graphisch zusammengefasst. Diese Befunde zeigen deutlich, dass sowohl eine dauerhafte Dunkeladaptation als auch eine Lichtadaptation der Retinen zu einem signifikanten Anstieg cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques im Vergleich zu den dunkeladaptierten Retinen führte(p-Werte: D/DD = 0,00028; D/L = 0,00002; DD/L = 0,45694). Eine eindeutige Klärung der Ursache für das vermehrte Auftreten der cpCx53.8-immunoreaktiven Plaques kann auf Grundlage der gezeigten Befunde nicht vorgenommen werden. Es kann lediglich vermutet werden, dass die inkubationsbedingten Unterschiede des Verteilungsmusters auf strukturellen Veränderungen cpCx53.8-enthaltender Gap Junctions beruhen (z.B. veränderte Dichte der Plaques, vermehrter Einbau in die Membran) oder auf eine erhöhte Expression von cpCx53.8 zurückzuführen sind (vgl. 3.2.9 und 4.3).

**3.2.7 Effekte von Dopamin und Retinsäure auf das cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmuster** In den vorherigen Abschnitten der Ergebnisse wurde gezeigt, dass eine Veränderung des adaptiven Status von Karpfenretinen sowohl die Phosphorylierung von cpCx53.8 beeinflusst, als auch Auswirkungen auf das Immunoreaktivitätsmuster des Connexins innerhalb der Retina hat (vgl. Abb. 3.8 und 3.16). Es konnte gezeigt werden, dass die lichtabhängige Phosphorylierung von cpCx53.8 durch die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin, cAMP (8-Br-cAMP) oder Retinsäure immitiert wird. Basierend auf den proteinbiochemischen Befunden wurde im weiteren Verlauf der Einfluss dieser Neuromodulatoren auf die Immunoreaktivität von cpCx53.8 in Querschnitten der Karpfenretina untersucht.



#### Abb. 3.17: Modulation der cpCx53.8-Immunoreaktivität durch Dopamin und cAMP

Repräsentative Bereiche zwischen der OPL und INL von Karpfenretinaquerschnitten zum Vergleich des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters in dunkeladaptierten Karpfenretinen und nach Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin und cAMP und zusätzlicher Präinkubation mit SCH23390 (SCH) und H89 (**A-J**), primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:1.000), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600); **K-O**) Ergebnisse der Quantifizierung ausgezählter cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques/100  $\mu$ m<sup>2</sup> (Mittelwerte ± Standardabweichung) aus jeweils 3 separaten Präparationen (#1, #2, #3) und der Vergleich der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen; OPL = outer plexiform layer, INL = inner nuclear layer; Skalierung = 20  $\mu$ m; Signifikanz = (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; n.s. p > 0.05)

In der Abb. 3.17 ist der Effekt von Dopamin und cAMP (8-Br-cAMP) sowie des PKA-H89 auf Inhibitors und des DAR<sub>1</sub>-Antagonisten SCH23390 (SCH) das Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8 gezeigt. In den Teilbereichen A-J sind jeweils repräsentative Ausschnitte der immunoreaktiven Bereiche zwischen der OPL und der INL gezeigt. In den Teilabschnitten K-O der Abb. 3.17 sind die Ergebnisse der Auszählung immunoreaktiver Plaques graphisch dargestellt (vgl. Tab. 8.2, S. 153). Die gezeigten Werte entsprechen den jeweiligen Mittelwerten (± Standardabweichung) von jeweils 5 Zählquadraten pro Retinaquerschnitt aus drei separaten Präparationen (#1, #2, #3), bezogen

auf die Anzahl immunoreaktiver Plaques pro 100  $\mu$ m<sup>2</sup> (vgl. 2.6.4). Aus jeder Präparation wurde jeweils ein Auge bzw. ein Augenbecher zur Inkubation mit den zu vergleichenden Bedingungen herangezogen, um einen möglichst hohen Vergleichsstandard zu erzielen. Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin (DA) oder 8-Br-cAMP (cAMP) in allen drei Präparationen zu einem signifikanten Anstieg der immunoreaktiven Plaques führte (Abb. 3.17 K und N). In Anlehnung an die proteinbiochemischen Versuche und die Befunde zur Inhibition der Dopamin- und cAMP-Effekte durch H89 bzw. SCH23390, wurde deren Einfluss ebenfalls auf immunhistologischer Ebene untersucht. In den Teilabschnitten L und M der Abb. 3.17 ist zu erkennen, dass der Dopamin-vermittelte Anstieg der immunoreaktiven Plaques durch eine entsprechende Präinkubation mit SCH23390 oder H89 gehemmt wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der cAMP-Effekt ebenfalls durch H89 gehemmt wurde.





**A-D)** Repräsentative Bereiche der cpCx53.8-Immunoreaktivität zwischen der OPL und der INL von Karpfenretinaquerschnitten zum Vergleich der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (D = dunkeladaptiert, at-RA = Retinsäure, stau = Staurosporin), primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:1.000), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600), Skalierung = 20  $\mu$ m; **E**); **F**) Ergebnisse der Quantifizierung ausgezählter cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques/100  $\mu$ m<sup>2</sup> (Mittelwerte ± Standardabweichung) aus jeweils 3 separaten Präparationen (#1, #2, #3) und der Vergleich der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen; OPL = outer plexiform layer, INL = inner nuclear layer; Signifikanz = (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n.s. p > 0,05)

Beim Vergleich dunkeladaptierter Retinen mit Retinsäure-Inkubation ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede in Bezug auf die Anzahl immunoreaktiver Plaques. In den Teilabschnitten A und B der Abb. 3.18 sind repräsentative Ausschnitte entsprechend inkubierter Retinen zu sehen. Während nach der Dunkeladaptation die Immunoreaktivität hauptsächlich im Bereich der OPL lokalisiert war, ist deutlich zu erkennen, dass nach der Retinsäure Inkubation eine verstärkte Ausbreitung immunoreaktiver Spots zusätzlich im distalen Bereich der INL auftrat. Außerdem erscheinen in den mit Retinsäure inkubierten Retinen insgesamt mehr immunoreaktive Plaques als in den dunkeladaptierten Retinen. Die Effekte von Retinsäure auf die Anzahl immunoreaktiver Plaques wurden durch eine Präinkubation der Retinen mit Staurosporin gehemmt. In den Ausschnitten C und D ist der Vergleich zwischen der Retinsäure-Inkubation und einer entsprechenden Präinkubation mit Staurosporin gezeigt. Es ist zu erkennen, dass nach der Staurosporin-Behandlung eine Reduzierung der Intensität des immunoreaktiven Bereiches auftrat. Die Retinsäure-induzierte Ausbreitung der immunoreaktiven Plaques in die distale INL war nach der Staurosporin Behandlung ebenfalls nicht mehr zu erkennen, so dass die Erscheinung der Immunoreaktivität insgesamt derer, nach der Dunkeladaptation glich.

Die Quantifizierung der Daten erfolgte nach den gleichen Vorgaben wie zuvor für die Dopamin-Inkubationen beschrieben. Die Ergebnisse dieser Quantifizierungen sind in den Abschnitten E und F der Abb. 3.18 graphisch dargestellt. Die einzelnen Werte sind im Anhang (Tab. 8.2, S. 153) angefügt. Die Inkubation mit Retinsäure resultierte in einem vermehrten Auftreten immunoreaktiver Plaques im Vergleich zu den jeweiligen Dunkelkontrollen. Außerdem zeigte sich, dass der Retinsäure Effekt durch eine entsprechende Präinkubation mit Staurosporin weitestgehend gehemmt wurde. Die Anzahl immunoreaktiver Plaques reduzierte sich in diesen Fällen auf vergleichbare Werte wie dies nach Dunkeladaptation der Fall war.

### 3.2.8 Effekte der PKA- und PKC-Inhibition auf die lichtabhängige Modulation des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von PKA und PKC auf die unterschiedlichen Adaptationszustände wurde der Einfluss von Staurosporin und H89 auch auf das cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmuster getestet. Es wurde ebenfalls die selektive Wirkung beider Inhibitoren als auch deren kombinativer Einfluss in Bezug auf dauerhaft dunkeladaptierte bzw. lichtadaptierte Retinen untersucht.



Abb. 3.19: Auswirkungen der selektiven PKA- und PKC-Inhibition auf das cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmuster in lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierten Retinen

A-F) Repräsentative Ausschnitte der cpCx53.8-Immunoreaktivität im Bereich zwischen der OPL und der distalen INL und der Vergleich einer selektiven Präinkubation mit Staurosporin (stau) und H89 bei nachfolgender Lichtadaptation (L) bzw. dauerhafter Dunkeladaptation (DD); primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:1.000), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600); Skalierung = 20  $\mu$ m; G-H) Graphische Darstellungen zur Quantifizierung der ausgezählten immunoreaktiven Plaques/100  $\mu$ m<sup>2</sup> unter den gekennzeichneten Adaptations- bzw. Inkubationsbedingungen (Mittelwerte ± Standardabweichung); Signifikanz = (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n.s. p > 0,05)

Die in den Abschnitten A-F gezeigten repräsentativen Bereiche der Retinaschnitte verdeutlichen, dass in allen Fällen eine annähernd gleich starke Intensität der cpCx53.8-Immunoreaktivität in dem Bereich zwischen der OPL und der distalen INL vorliegt. Eine spezifische Wirkung von einem der beiden Inhibitoren in Bezug auf einen lichtadaptiven Status konnte demnach bereits beim Betrachten der jeweiligen Objektträger weitestgehend ausgeschlossen werden. Diese Annahme bestätigte sich auch nach der Auszählung der immunoreaktiven Plaques und der weiterführenden Quantifizierung (Abb. 3.19 G und H). Bei allen vier Kombinationsmöglichkeiten (L/stau, L/H89; DD/stau, DD/H89) zeigte sich durchweg lediglich ein leichter Rückgang in Bezug auf die durchschnittliche Anzahl immunoreaktiver Plaques (Mittelwerte ± Standardabweichung siehe Anhang, Tab. 8.2, S. 153). Die Befunde deuten darauf hin, dass der inhibitorische Einfluss von Staurosporin und H89 sowohl in den dauerhaft dunkeladaptierten als auch in den lichtadaptierten Retinen zum Tragen kommt. Das jeweilig verbleibende Auftreten immunoreaktiver Plaques wäre demnach durch den nicht inhibierten Signalweges zu erklären. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde im weiteren Verlauf getestet, ob die Kombination beider Inhibitoren eine entsprechende Verstärkung des inhibitorischen Effektes sowohl bei Lichtadaptation als auch bei dauerhafter Dunkeladaptation bewirkt.



Abb. 3.20: Auswirkungen der PKA- und PKC-Inhibition auf das Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8

**A-D)** Repräsentative Ausschnitte von Querschnitten der Karpfenretina im Bereich zwischen der OPL und der distalen INL und der Einfluss der kombinierten Präinkubation dauerhaft dunkeladaptierter (DD) und lichtadaptierter (L) Retinen mit Staurosporin (stau) und H89, primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:1.000), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600); Skalierung = 20 µm; E-F) Graphische Darstellungen zur Quantifizierung der ausgezählten immunoreaktiven Plaques/100 µm<sup>2</sup> unter den gekennzeichneten Adaptations- bzw. Inkubationsbedingungen (Mittelwerte ± Standardabweichung); Signifikanz = (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; n.s. p > 0,05)

Wie aus den repräsentativen Ausschnitten (A-D) der Abb. 3.20 ersichtlich wird, zeigten sich deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Intensität der cpCx53.8-Immunoreaktivität nach der Präinkubation mit Staurosporin und H89 in Bezug auf beide Adaptationszustände. Die Immunoreaktivität fiel in den präinkubierten Retinen deutlich schwächer aus als in den Kontrollen (L und DD). In den Teilabschnitten E und F der Abb. 3.20 sind die Ergebnisse der Quantifizierung von jeweils drei separat erfolgten Präparationen und Inkubationen (#1, #2, #3) gezeigt. Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen wurde

bei jeder Präparation jeweils ein Auge eines Tieres licht- bzw. dauerhaft dunkeladaptiert und das jeweilige zweite Auge mit den Inhibitoren präinkubiert (Mittelwerte ± Standardabweichung, siehe Anhang, Tab. 8.2, S. 153) aufgeführt. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die gleichzeitige Präinkubation mit beiden Inhibitoren zu einer verringerten Anzahl immunoreaktiver Plaques, sowohl in den lichtadaptierten als auch den dauerhaft dunkeladaptierten Retinen führte. In Übereinstimmung zu den zuvor gezeigten Daten untermauern diese Befunde erneut die Annahme des Vorhandenseins eines PKA- und eines PKC-Signalweges zur Vermittlung adaptiver Prozesse sowohl bei dauerhafter Dunkeladaption als auch bei Lichtadaptation.

#### 3.2.9 cpCx53.8 Expressionsstudien an Neuroblastoma Zellen (N2A-Zellen)

Die vorangegangenen Ergebnisse zur Modulation der Immunoreaktivität von cpCx53.8 in der Karpfenretina und den Befunden der proteinbiochemischen Versuche legen die posttranslationale Phosphorylierung von cpCx53.8 als eine notwendige Modifikation zum Einbau des Connexins in die Plasmamembran nahe. Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde ein cpCx53.8-Expressionssystem auf der Basis von Neuroblastoma-Zellen (N2A-Zellen) etabliert (Klebe und Ruddle, 1969). Das Connexin wurde mit Hilfe des Transfektionskonstrukts cpCx53.8-pCS2+ in N2A-Zellen exprimiert (vgl. 2.7.2). Die Expression von cpCx53.8 sowie dessen subzelluläre Lokalisation wurden mittels immuncytochemischer Analysen unter Verwendung des anti-Cx53.8 Antikörpers ermittelt. Die Etablierung des N2A-Expressionssystems erfolgte vor allem im Rahmen der Masterarbeit von Nadine Mellies (2011) in der Arbeitsgruppe Neurobiologie. Um eine erfolgreiche Transfektion von cpCx53.8 in den Zellen zu erreichen, führte Nadine Mellies eine Reihe von Vorversuchen durch. Anhand dieser Versuche wurden wichtige Parameter, die zur optimalen

cpCx53.8-Expression in den Zellen führten, ermittelt (einzusetzende DNA-Menge, extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration etc.). Des Weiteren wurden im Rahmen der Masterarbeit von Nadine Mellies entsprechende Spezifitätsnachweise sowohl auf immuncytochemischer als auch auf proteinbiochemischer Ebene durchgeführt, welche die spezifische Expression von cpCx53.8 in den Zellen belegen. Aufgrund dieser Befunde wird innerhalb der Ergebnisdarstellung der vorliegenden Arbeit davon abgesehen eine ausführliche Herleitung des methodischen Vorgehens bzw. entsprechende Spezifitätsnachweise zu zeigen.



Abb. 3.21: cpCx53.8-pCS2+ transfizierte N2A-Zellen und der Einfluss von cAMP auf die subzelluläre Verteilung von cpCx53.8

Die Abbildung zeigt den Vergleich des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters in mit cpCx53.8-pCs2+transfizierten N2A-Zellen unter verschiedenen Bedingungen. In A-C) sind Übersichtsaufnahmen repräsentativer Bereiche der Immunoreaktivität in den Zellen unter den gekennzeichneten Inkubationsbedingungen dargestellt. In D-F) sind entsprechende repräsentative Vergrößerungen vereinzelter Zellen gezeigt. Innerhalb der mit 8-BrcAMP behandelten Zellen (E) ist zu erkennen, dass es zu einer verstärkten Immunoreaktivität im Bereich der Zellmembranen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (D) kam. Dieses verstärkte Auftreten immunoreaktiver Plaques wurde durch eine Präinkubation der Zellen mit H89 vor der Inkubation mit 8-BrcAMP inhibiert (F). Starke Markierungen cpCx53.8-immunoreaktiver Spots in den Membranen dicht benachbarter Zellen deuten auf Gap Junction charakteristische Signale hin (E und H, Pfeilspitzen). In G-I) sind die Überlagerungen der Fluoreszenz- mit den jeweiligen Durchlichtaufnahmen gezeigt. Primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:1.000), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600), Skalierung = (A-C) = 10  $\mu$ m, (D-F) = 5  $\mu$ m Die Abb. 3.21 verdeutlicht, die im Rahmen der Masterarbeit von Nadine Mellies gewonnenen Erkenntnisse des subzellulären Verteilungsmusters von cpCx53.8 in den N2A-Zellen und dessen Modulation durch 8-Br-cAMP. In der oberen Reihe der Abbildung (Abschnitt A, B und C) sind jeweilige Übersichtsaufnahmen von N2A-Zellen unter den entsprechenden Inkubationsbedingungen gezeigt. Man kann deutlich erkennen, dass die cpCx53.8-Immunoreaktivität nach der Inkubation, der mit cpCx53.8-pCS2+ transfizierten N2A-Zellen mit 8-Br-cAMP zunimmt. Eine Präinkubation der Zellen mit H89 (Abb. 3.21 C) führte hingegen zu einer Inhibition des 8-Br-cAMP-Effektes und resultierte in einer ähnlich starken Immunoreaktivität wie diese unter Kontrollbedingungen zu verzeichnen war (Abb. 3.21 A). Noch deutlicher werden die Unterschiede beim Betrachten der Nahaufnahmen, der in D, E und F gezeigten Zellen. Es sind jeweils Zellen gezeigt, die die cpCx53.8-Immunoreaktivität der Mehrheit der Zellen des jeweiligen Ansatzes repräsentieren. Unter Kontrollbedingungen ist zu erkennen, dass der Großteil der cpCx53.8-Immunoreaktivität vorwiegend in aggresomartigen Strukturen innerhalb des Cytoplasma nahe des Zellkerns bzw. des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert vorliegt (Abb. 3.21 D, Asterisks). Eine Assoziation der cpCx53.8-Immunoreaktivität im Bereich der Zellmembranen wurde nur sehr schwach detektiert und trat vor allem in einer punktuellen Markierung auf. Nach der Inkubation mit 8-Br-cAMP ist deutlich zu erkennen, dass die cpCx53.8-Immunoreaktivität im Bereich der Zellmembranen intensiver ist (Abb. 3.21 E, Pfeilspitzen). Die Membranen sind in diesem Fall größtenteils durchgehend angefärbt und es kommt vermehrt zu der Bildung von Gap Junctiontypischen Plaques zwischen benachbarten Zellen (Abb. 3.21 H, Vergrößerung, Pfeilspitzen). Mittels der Präinkubation mit H89 und anschließender 8-Br-cAMP Behandlung wurde untersucht, welche Auswirkungen die PKA-Inhibition auf das Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8 hat. Die cpCx53.8-Immunoreaktivität glich in diesem Fall derer unter Kontrollbedingungen. Die Anfärbung der Membranen war stark verringert und die hauptsächliche Detektion von cpCx53.8 erfolgte, ähnlich wie bei den Kontrollzellen in aggresomartigen Strukturen innerhalb des Cytoplasma. Diese Befunde untermauern demnach die Annahme einer notwendigen PKA-vermittelten Phosphorylierung von cpCx53.8 zum korrekten Einbau des Connexins in die Membran und zur Formung funktionsfähiger Gap Junctions (Assemblierung) zwischen benachbarten Zellen.

Auf der Grundlage der Befunde zur cAMP-vermittelten Modulation des Expressionsmusters von cpCx53.8 in den N2A-Zellen, galt es im Rahmen dieser Arbeit zum Einen die Ergebnisse von Nadine Mellies zu reproduzieren und weiterführend zu untersuchen, ob eine Inkubation der Zellen mit Retinsäure ebenfalls eine Veränderung des Immunoreaktivitätsmusters induziert. Die Durchführung der Transfektion bzw. die Inkubation der Zellen erfolgte hierbei nach den gleichen Vorgaben, wie diese zuvor etabliert wurden.



Abb. 3.22: cpCx53.8-pCS2+ transfizierte N2A-Zellen und der Einfluss von cAMP und Retinsäure auf die subzelluläre Verteilung von cpCx53.8

Die Abb. zeigt jeweilige Beispielaufnahmen der Immunodetektion von cpCx53.8 in mit cpCx53.8-pCS2+ transfizierten N2A-Zellen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. Jeweils in der ersten Reihe (A; D; G; J; M) sind Übersichtsaufnahmen repräsentativer Bereiche gezeigt und entsprechend darunter liegend sind Vergrößerungsaufnahmen einzelner Zellpaare dargestellt. In der untersten Reihe sind die Überlagerungen der Fluoreszenzaufnahmen mit den Durchlichtbildern der einzelnen Zellpaare gezeigt. In den Spalten sind die verschiedenen Inkubationsbedingungen gezeigt, welche entsprechend gekennzeichnet sind: **A-C**) Kontrollbedingungen (nur mit DMSO behandelt); **D-F**) Inkubation mit 8-Br-cAMP; **G-I**) Präinkubation mit H89 und anschließender Inkubation mit 8-Br-cAMP; **J-L**) Inkubation mit Retinsäure; **M-O**) Präinkubation mit Staurosporin (stau) und anschließender Inkubation mit Retinsäure. primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:1.000), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG ALEXA488-konjugiert (1:600), Skalierung (A, D, G, J, M) = 10  $\mu$ m; Skalierung (B, E, H, K, N) = 5  $\mu$ m

In der Abb. 3.22 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Transfektionsversuche und der entsprechende Einfluss von cAMP (8-Br-cAMP) sowie Retinsäure auf die cpCx53.8-Immunoreaktivität exemplarisch dargestellt. Die Erkenntnisse zur cAMP-vermittelten Modulation des Immunoreaktivitätsmusters von cpCx53.8 stimmen weitestgehend mit den Befunden von Nadine Mellies überein. Unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.22 A-C) zeigte sich die cpCx53.8-Immunoreaktivität vor allem in aggresomartigen Strukturen innerhalb der Zellen (nahe des Zellkerns). Eine Assoziation immunoreaktiver Plaques mit der Zellmembran konnte nur sehr vereinzelt und in meist schwacher Intensität beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte sich nach einer Inkubation mit 8-Br-cAMP eine deutlich höhere Immunoreaktivität in der Gesamtheit aller Zellen und außerdem war zu erkennen, dass die cpCx53.8-Immunoreaktivität verstärkt im Bereich der Zellmembranen lokalisiert vorlag (vgl. Abb. 3.22 E und F). Des Weiteren konnten nach der Behandlung mit 8-Br-cAMP vermehrt Gap Junction-typische Plaques zwischen benachbarten Zellen detektiert werden (vgl. Abb. 3.22 E Pfeilspitzen und F, Vergrößerungen a und b). Die Behandlung mit 8-Br-cAMP scheint außerdem einen morphologischen Einfluss auf die Zellen auszuüben, da im Gegensatz zu den Kontrollbedingungen wesentlich mehr Zellen deutlich ausdifferenziert waren. Dies machte sich vor allem darin deutlich, dass die Zellen unter Kontrollbedingungen eher rundlich erschienen und nur wenige, meist kurze Fortsätze bzw. Zellausläufer bildeten. Nach der 8-BrcAMP-Inkubation zeigte ein Großteil der Zellen eine stark veränderte Morphologie, welche sich in einem flächigen Soma und der Bildung mehrerer Ausläufer und entsprechender Kontaktpunkte zwischen einzelnen Zellen widerspiegelte. Wie bereits zuvor anhand der Daten von Nadine Mellies gezeigt, wurde der 8-Br-cAMP-vermittelte Effekt durch eine Präinkubation der Zellen mit H89 inhibiert. Die Zellen der Abb. 3.22 G-I verdeutlichen diese Inhibition, da in diesem Fall die Immunoreaktivität ähnlich wie bei den Kontrollzellen vermehrt im Bereich der jeweiligen Zellsomata vorlag und keine bzw. nur eine sehr schwache Detektion von cpCx53.8 im Bereich der Membranen zu verzeichnen war. Diese Befunde untermauern die Annahme einer cAMP- und PKA-vermittelten Modulation des Expressionsverhaltens von cpCx53.8 bzw. einer durch PKA vermittelten Phosphorylierung von cpCx53.8 zum verstärkten Einbau des Connexins in die Zellmembranen.

Die grundsätzliche Erscheinungsform des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters, wie sie unter Kontrollbedingungen zu erkennen war, änderte sich nicht nach der Behandlung der Zellen mit Retinsäure. Die hauptsächliche Detektion von cpCx53.8 erfolgte ebenfalls innerhalb der Zellsomata bzw. in aggresomartigen Strukturen nahe des Zellkerns und es fand keine Detektion an den Membranen statt (Abb. 3.22 J-L). Demzufolge wurden auch nach der Präinkubation mit Staurosporin und anschließender Retinsäure Behandlung keine markanten Veränderungen hinsichtlich des Detektionsmuster von cpCx53.8 ermittelt. Es konnte allerdings durchweg beobachtet werden, dass die Zellen nach der Retinsäure Behandlung ebenfalls einen erhöhten Differenzierungsgrad aufwiesen. Dieser äußerte sich, wie zuvor für die 8-Br-cAMP-behandelten Zellen beschrieben, in einer großflächigeren Ausbreitung der Zellen und der Bildung zahlreicher Zellausläufer. Offensichtlich übt demnach Retinsäure einen vergleichbaren Einfluss auf die morphologischen Eigenschaften der Zellen aus wie cAMP. Dieser Einfluss wird jedoch höchstwahrscheinlich nicht über die zuvor beschriebene PKC-Aktivierung vermittelt, da ein erhöhter Differenzierungsgrad der Zellen ebenfalls nach der Präinkubation mit Staurosporin zu beobachten war.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die entsprechenden Transfektionsversuche unter Einfluss von 8-Br-cAMP bzw. Retinsäure jeweils zweimal durchgeführt. Im Falle der cAMP-Inkubation konnte die von Nadine Mellies aufgestellte Hypothese des vermehrten Auftretens cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques in der Membran bestätigt werden. Im Falle der Retinsäure-Inkubation werden aktuell entsprechende Reproduktion im Rahmen der Doktorarbeit von Jasmin Segelken (AG Neurobiologie) durchgeführt.

### 4. Diskussion

Die Ausbildung von Horizontalzellnetzwerken in der Karpfenretina wird durch eine homologe Kopplung der unterschiedlichen Horizontalzellsubtypen (H1-H4) gewährleistet. Dadurch entstehen vier Netzwerke, die unabhängig voneinander agieren und entsprechend ihrer Interaktion mit den unterschiedlichen Zapfentypen die eingehenden Signale farbspezifisch separat verarbeiten (Stell, 1967). Die Prozesse bzw. Mechanismen, die während der Entwicklung die Ausbildung der Horizontalzellnetzwerke steuern bzw. ihre Aufrechterhaltung in der adulten Retina regulieren, sind bislang noch weitestgehend unbekannt. Einige Studien deuten jedoch daraufhin, dass sowohl die Morphologie der Subtypen von Horizontalzellen als auch ihre Konnektivität (GJIC) und ihre flächendeckende Ausbreitung zu, die gesamte Retina abdeckenden Netzwerken, vor allem durch die lokale Dichte der einzelnen Subtypen gesteuert werden sowie durch die Nähe zu homotypischen Nachbarzellen (Reese et al., 2005). Darüber hinaus wird angenommen, dass Gap Junctions und ihre molekularen Bausteine, die Connexine, sowie deren spezifische Interaktionspartner, wie z.B. Scaffolding Proteine, und vor allem auch Zelladhäsionsmoleküle, wie die Calciumabhängigen Cadherine, für die Ausbildung der Horizontalzellnetzwerke von entscheidender Bedeutung sind (Reese und Galli-Resta, 2002; Wong und Gosh, 2002; Tanabe et al., 2006). Um die Rolle der Gap Junctions bzw. der Connexine, für die Ausbildung homologer Horizontalzellnetzwerke detaillierter untersuchen zu können ist es wichtig, sie zu identifizieren und im weiteren ihre bio-physikalischen Eigenschaften zu bestimmen. Dieser Ansatz wurde mit der vorliegenden Arbeit verfolgt, und resultierte in der Identifizierung von vier phylogenetisch nahe verwandten Connexinen, die ein distinktes Expressionsmuster in den Horizontalzellsubtypen aufweisen. Des weiteren konnten, in einer methodisch umfangreichen Analyse, charakteristische Eigenschaften eines dieser Connexine (cpCx53.8) bestimmt werden und es konnte seine funktionelle Bedeutung für die elektrische Kopplung zwischen Horizontalzellen sowie deren lichtabhängige bzw. durch Neuromodulatoren wie Dopamin und Retinsäure gesteuerte Modulation zum Teil aufgeklärt werden.

# 4.1 Horizontalzellen der Karpfenretina weisen ein distinktes Expressionsmuster der vier identifizierten Connexine cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 auf

Die Grundlage für eine Analyse der Connexinexpression in Horizontalzellen der Karpfenretina, war die Identifizierung dieser als cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 bezeichneten Connexine und die Klonierung der entsprechenden Gene. Diese

Arbeiten wurden in der AG Neurobiologie von Dr. Petra Dirks durchgeführt. Die identifizierten Karpfenconnexine konnten über einen Abgleich mit den in den Standard-Genbzw. Protein-Datenbanken gespeicherten Connexinen als Orthologe der entsprechenden Zebrafischconnexine charakterisiert werden. So wurde das in der Karpfenretina exprimierte cpCx49.5 als Ortholog zum Zebrafischconnexin drCx52.9 identifiziert. Entsprechend repräsentieren die Karpfenconnexine cpCx52.6 und cpCx53.8 Orthologe zu drCx52.6 und cpCx55.5 ist das Ortholog zu drCx55.5 (vgl. Abb. 3.1). Durch Anwendung eines, vielfältige Methoden umfassenden experimentellen Ansatzes gelang es im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal einen umfassenden und detaillierten Einblick in das Expressions- und relative Verteilungsmuster dieser vier Connexine in den vier Horizontalzellsubtypen zu gewinnen.

Erste Erkenntnisse zur Lokalisation der vier Connexine bzw. der entsprechenden mRNA der ISH und FISH sowie immunhistologischer Analysen wurden mittels an Karpfenretinaquerschnitten gewonnen. Danach werden mit Ausnahme von cpCx49.5 alle anderen identifizierten Connexine horizontalzellspezifisch exprimiert. Diese Befunde bestätigen entsprechende Untersuchungen an der Zebrafischretina (Shields et al., 2007; Zoidl et al., 2008; Ul-Hussain et al., 2008). Die FISH und die immuncytologischen Untersuchungen, welche an dissoziierten Horizontalzellen durchgeführt wurden untermauern zum einen die Annahme der horizontalzellspezifischen Expression von cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 und zum anderen veranschaulichen sie das Verteilungsmuster der vier Connexine innerhalb der unterschiedlichen Zelltypen. So ergibt sich auf Grundlage der vorliegenden Befunde das folgende Verteilungsmuster: cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 werden in allen vier Horizontalzelltypen exprimiert und cpCx49.5 wird in H1-, H2- und H4-Horizontalzellen exprimiert. Auch die Rückschlüsse, die mittels der Einzelzell-PCR auf das relative Verteilungsmuster der vier Connexine innerhalb der unterschiedlichen Horizontalzellsubtypen wurden. weitestgehend diesem ermittelt stimmen mit Verteilungsmuster überein.

Eine weitere Differenzierung hinsichtlich der Verteilung der Connexine konnte im Hinblick auf deren Vorkommen in den Axonterminalien vorgenommen werden. So wurden in dissoziierten Axonterminalien ausschließlich cpCx53.8 und cpCx55.5 detektiert. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Bildung axo-axonischer Gap Junctions zwischen den jeweiligen Horizontalzelltypen wahrscheinlich nur durch diese beiden Connexine realisiert wird. Die Axonterminalien verlaufen größtenteils proximal unter den Somata der Horizontalzellen in der INL. Das jeweilige Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8 sowie cpCx55.5 an den Retinaquerschnitten, welches sich z.T. bis in weite Bereiche der INL zog,

107

untermauert demzufolge die Annahme der Bildung axo-axonischer Gap Junctions durch diese beiden Connexine. Die intensiv von den Antikörpern markierten cpCx53.8- und cpCx55.5haltigen Gap Junctions (*,,patches*") in der OPL bzw. distalen INL, sowie die an den dendritischen Ausläufern aller dissoziierten Zellen vorhandenen Markierungen verdeutlichen des weiteren die Beteiligung beider Connexine an der Bildung dendro-dendritischer Gap Junctions. Die Verteilung des Immunoreaktivitätsmusters von cpCx49.5 und cpCx52.6 zeigte hingegen eine deutliche Begrenzung auf den Bereich der OPL und den äußersten distalen Bereich der INL, was wiederum mit den Befunden der dissoziierten Horizontalzellen bzw. Axonterminalien übereinstimmt. Es ist demzufolge anzunehmen, dass cpCx49.5 und cpCx52.6 ausschließlich an der Bildung dendro-dendritischer Gap Junctions zwischen den jeweiligen Zelltypen beteiligt sind.

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass in Bezug auf die Detektion der Connexine (speziell cpCx49.5) methodisch bedingte Fehler auftraten, die z.B. bei der Einzelzell-PCR zu falsch negativen Ergebnissen führten. Außerdem muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Dissoziation bzw. die anschließende Zuordnung einzelner Zellen zu einem Zelltyp ausschließlich auf Grundlage morphologischer Eigenschaften erfolgte, welches unweigerlich eine potentielle Fehlerquelle beinhaltet. Die optische Begutachtung und die Zuordnung der Zellen erfolgte allerdings stets durch mindestens zwei unabhängige Betrachter und die Einteilung bzw. das Auswählen einer Zelle zur weiteren Analyse erfolgte nur bei einstimmiger Zuordnung zu einem jeweiligen Zelltyp. Somit wurde versucht diese mögliche Fehlerquelle zu minimieren. Auch die Tatsache, dass für die Einzelzell-PCR insgesamt 6 H3-Zellen analysiert wurden, untermauert die Annahme, dass cpCx49.5 nicht in diesem Zelltyp vorkommt. Falls es tatsächlich zu einer falschen Zuordnung gekommen wäre und zur Analyse von cpCx49.5 in H3-Zellen auch andere Zelltypen herangezogen würden, so hätte dies zu falsch positiven Ergebnissen geführt. Dies war nicht der Fall, da die Ergebnisse der PCR bzw. der Agarosegelelektrophorese durchweg eindeutig waren.

Unklarheit besteht jedoch darüber, wie die Zellen ihre homologen Kopplungspartner finden, wenn nahezu alle Zelltypen die gleichen Connexine exprimieren. Die Connexinexpression ist jedoch nicht alleine ausschlaggebend für die dendritische Morphogenese und die Bildung synaptischer Strukturen retinaler Neurone. Eine entscheidende Funktion nehmen hierbei unterschiedliche *Scaffolding*-Proteine (z.B. Cadherine) ein, welche z.T. zelltypspezifisch exprimiert werden und somit die Identifikation homologer Kopplungspartner ermöglichen (Obst-Pernberg und Redies, 1999). Cadherine sind eine Familie von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen, die an der Synaptogenese unterschiedlicher Zell-Verbindungen in
verschiedenen Geweben und Organen, wie z.B. dem ZNS (Huntley *et al.*, 2002; Suzuki und Takeichi, 2008) und der Retina (Tanabe *et al.*, 2006) beteiligt sind. In Horizontalzellen der Hühnerretina, welche 3 unterschiedliche Horizontalzelltypen enthält, konnten Tanabe *et al.* (2006) zeigen, dass die zelltypspezifische Expression von Cadherinen die Formierung homologer Netzwerke ermöglicht.

## 4.2 Modulation der Horizontalzellkopplung und des horizontalzellspezifischen Connexins cpCx53.8

## 4.2.1 Die Entkopplung von Horizontalzellen korreliert mit der gesteigerten cpCx53.8-Phosphorylierung

Basierend auf den Befunden früherer Studien zur Modulation des Kopplungsverhaltens von Horizontalzellen in verschiedenen Spezies (Mangel et al., 1994; Baldridge et al., 1998; Xin und Bloomfield, 1999; Pottek und Weiler, 2000; Baldridge, 2001) wurden im Rahmen dieser Arbeit drei unterschiedliche Adaptationsbedingungen hinsichtlich ihrer physiologischen Auswirkungen auf den Kopplungszustand von Horizontalzellen der Fischretina getestet (vgl. Abb. 3.8). Die Daten der Neurobiotin-Injektionen verdeutlichen anschaulich die Kopplung der Horizontalzellen unter den jeweiligen Adaptationsbedingungen. Demnach ist der Grad der Kopplung nach Dunkeladaptation am höchsten, während er nach dauerhafter Dunkeladaptation bzw. Lichtadaptation stark reduziert ist. Ausgehend von der Annahme, dass die rezeptive Feldgröße einzelner Horizontalzellen vor allem durch die Gap Junctionvermittelte Kopplung der Zellen bestimmt wird, kann vermutet werden, dass die Horizontalzellen der lichtadaptierten bzw. dauerhaft dunkeladaptierten Retinen eine deutlich reduzierte Größe ihrer rezeptiven Felder aufweisen. Wie zu erwarten war, zeigte sich nach dauerhafter Dunkeladaptation bzw. Lichtadaptation eine verringerte durchschnittliche Antwortamplitude der Zellen auf den Ring-Stimulus, während ein leichter durchschnittlicher Anstieg der Amplitude auf den Punkt-Stimulus zu verzeichnen war. Dieses Antwortverhalten ist charakteristisch für eine Reduzierung der rezeptiven Feldgröße (McMahon, 1994; Pottek und Weiler, 2000; Daniels und Baldridge, 2011). Allerdings ist der Zusammenhang der rezeptiven Feldgröße einzelner Zellen und der Permeabilität ihrer Gap Junctions nicht zwangsläufig direkt (Baldridge et al., 1998). Eine exakte Beschreibung der Ausdehnung rezeptiver Felder wurde erstmals von Piccolino et al. (1984) an Horizontalzellen der Schildkrötenretina vorgenommen. Demnach wird die räumliche Konstante (space constant)  $\lambda$ eines rezeptiven Feldes durch die Korrelation des Membranwiderstands (Rm; membrane leakage resistance) und des Kopplungswiderstandes (R<sub>i</sub>; gap junction resistance) wie folgt beschrieben:  $\lambda = \sqrt{R_m/R_i}$ . Als eine logische Konsequenz dieses Befundes kann die Reduzierung des rezeptiven Feldes entweder auf einem verringerten Membranwiderstand oder auf einem erhöhten Gap Junction-Widerstand beruhen. Die Kombination eines Ring-Punkt-Stimulus stellt eine verlässliche Methode dar, um die Veränderungen der rezeptiven Felder auf eine entsprechende Erhöhung des Gap Junction-Widerstands zu beziehen. Bei einer Beeinflussung des Membranwiderstands wäre neben der reduzierten Antwortamplitude auf die periphere Stimulation (Ring-Stimulus) auch eine entsprechende Erniedrigung der Antwortamplitude bei zentraler Stimulation (Punkt-Stimulus) zu verzeichnen. Da dies in den hier gezeigten Versuchen nicht der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass der Membranwiderstand während der Messungen unverändert blieb. Zwangsläufig lässt dies den Schluss zu, dass es zu einem erhöhten Gap Junction-Widerstand in den jeweiligen Zellen kam. Dieser wird durch eine veränderte Permeabilität bzw. ein Schließen der einzelnen Gap Junction-Kanäle hervorgerufen.

Die die hier gezeigten Daten bestätigen triphasische Organisation der Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen, wie sie von Xin und Bloomfield (1999) bzw. von Baldridge (2001) postuliert wurde (vgl. Abb. 1.6). Im Hinblick auf die Anpassung des visuellen Systems auf veränderte Umgebungshelligkeiten erscheint eine derartige Organisation der Horizontalzellkopplung sinnvoll. Unter skotopischen Lichtverhältnissen sind es vor allem die Stäbchen-Photorezeptoren, die eingehende Lichtsignale verarbeiten, eine Prozessierung entsprechender Reize über die Zapfen-Photorezeptoren findet unter diesen Umständen nicht bzw. nur sehr eingeschränkt statt. Demzufolge ist auch die Notwendigkeit der Modulation entsprechender Signale durch die Zapfen-assoziierten Horizontalzellen nicht gegeben und eine großflächige Vernetzung der Zellen ist nicht erforderlich. Mit steigender Lichtintensität (mesopischer Bereich) werden die Signale vermehrt über die Zapfen-Photorezeptoren verarbeitet, wodurch auch eine entsprechende Aktivität der jeweiligen Horizontalzellen erforderlich wird und eine großflächige Ausbreitung elektrisch gekoppelter Netzwerke die Modulation der eingehenden Signale sicherstellt. Aufgrund der annähernd maximalen Reizung der Photorezeptoren unter hohen Lichtintensitäten (photopischer Bereich) besteht die Notwendigkeit, dass einzelne Horizontalzellen über inhibierende feedback Signale zu einzelnen Photorezeptorzellen deren Reizschwelle maximal senken. Diese maximale Herabsetzung der Reizschwelle kann nur durch den unmittelbaren Einfluss einiger weniger Horizontalzellen zu den jeweiligen Photorezeptoren gewährleistet werden. Eine großflächige Kopplung der Horizontalzellen und der damit einhergehende geringfügige Verlust des

direkten *feedback*-Mechanismus wären in diesem Fall kontraproduktiv. Eine verstärkte Kopplung der Horizontalzellen ist demnach unter maximalen Lichtintensitäten nicht gegeben.

In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Befunden sind vorangegangene Studien an verschiedenen Teleostei [Weißbarsch (*Morone Americana*) und Karpfen], welche entsprechende Entkopplungseffekte bzw. eine Reduzierung der rezeptiven Feldgröße einzelner Horizontalzellen nach einer dauerhaften Dunkeladaptation belegen (Mangel und Dowling, 1985, 1987; Tornqvist *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1988). Außerdem konnten Baldridge und Ball (1991) am Goldfisch sowie Umino *et al.* (1991) am Weißbarsch zeigen, dass eine Lichtadaptation zur Entkopplung der Horizontalzellen führt. Teilweise gegensätzlich zu den gezeigten Befunden sind allerdings Studien an Amphibien wie dem Krallenfrosch (*Xenopus Laevis*) (Witkovsky und Shi, 1990) und dem Salamander (*Necturus Maculosus*) (Dong und McReynolds, 1991), welche zwar auch eine Entkopplung der Horizontalzellen nach Lichtadaptation beschreiben, allerdings keine entsprechenden Effekte nach dauerhafter Dunkeladaptation zeigen konnten.

In Übereinstimmung mit den physiologischen Experimenten wurden die, für die proteinbiochemischen (und immunhistologischen) Versuche verwendeten Retinen unter den gleichen Adaptationsbedingungen inkubiert. Potentielle modulatorische Einflüsse unterschiedlicher Lichtbedingungen wurden exemplarisch am horizontalzellspezifischen Connexin cpCx53.8 untersucht.

Eine der grundlegendsten Erkenntnisse dieser Arbeit besteht darin, dass es sich bei cpCx53.8 um ein Phosphoprotein handelt, welches lichtabhängig über einen veränderten Phosphorylierungszustand moduliert wird. Der in Abb. 3.8 gezeigte Western Blot verdeutlicht diese Modulation sehr anschaulich. Demzufolge kommt es sowohl nach dauerhafter Dunkeladaptation als auch nach Lichtadaptation der Retinen zu einem Anstieg der Phosphorylierung von cpCx53.8, welcher sich in der Immunodetektion höhermolekularer Proteinbanden auf dem Western Blot widerspiegelt. Der Grad der Phosphorylierung von cpCx53.8 unter Kontrollbedingungen (dunkeladaptiert) ist vergleichsweise gering und äußerte sich meist in der Detektion einer charakteristischen Doppelbande im Bereich von ca. 55-57 kDa. Die Korrelation der Befunde lichtabhängigen Modulation zur der Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen und des cpCx53.8-Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmusters legt die Vermutung nahe, dass eine gesteigerte Phosphorylierung der Horizontalzellconnexine den molekularen Mechanismus zur Auslösung einer Entkopplung der Horizontalzellen darstellt.

## 4.2.2 Dopamin und Retinsäure bewirken eine verringerte Horizontalzellkopplung und eine gesteigerte Phosphorylierung von cpCx53.8

Der modulatorische Einfluss von Dopamin und Retinsäure auf die Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen ist bekannt (Weiler *et al.*, 2000). Im Rahmen einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass beide Neuromodulatoren vergleichbare Auswirkungen auf die rezeptive Feldgröße und den Grad der Gap Junction-vermittelten Kopplung haben wie dieser nach Lichtadaptation bzw. dauerhafter Dunkeladaptation zu beobachten ist (Mangel und Dowling, 1985; McMahon und Mattson, 1996; Pottek und Weiler, 2000). Diese Befunde konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da eine Inkubation dunkeladaptierter Retinen sowohl mit Dopamin als auch mit Retinsäure zu einer verringerten Gap Junction-vermittelten Kopplung und zu einer Reduzierung der rezeptiven Feldgröße der Horizontalzellen führte.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin oder Retinsäure auch zu einer erhöhten Phosphorylierung von cpCx53.8 führte, wie dies ebenfalls nach Lichtadaptation bzw. dauerhafter Dunkeladaptation zu beobachten war. Es scheint demnach sehr wahrscheinlich, dass sowohl Dopamin als auch Retinsäure an der Vermittlung adaptiver Prozesse innerhalb der Retina bzw. der Horizontalzellen beteiligt sind. Tiefergehende Einblicke zur Vermittlung der Phosphorylierung von cpCx53.8 konnten durch den Einsatze verschiedener Proteinkinase-Aktivatoren bzw. -Inhibitoren und des DAR<sub>1</sub>-Antagonisten SCH23390 erzielt werden.

#### 4.2.2.1 Dopamin wirkt über die Aktivierung von PKA

Die Dopamin-vermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8 wurde durch eine Präinkubation der Retinen mit H89 gehemmt. H89 ist ein zellpermeabler PKA-Inhibitor, welcher spezifisch an die ATP-Bindestelle der katalytisch aktiven Untereinheit der PKA bindet und somit deren Aktivität bzw. eine Phosphorylierung der PKA-Substrate verhindert (Kase *et al.*, 1987; Murray, 2008). Dieser erste Hinweis zur Aktivität von PKA in Bezug auf die cpCx53.8-Phosphorylierung wurde durch die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit dem membrangängigen cAMP-Derivat 8-Br-cAMP noch verstärkt, da cAMP nachweislich als *second messenger* innerhalb der PKA-Signalkaskade wirkt (Piccolino *et al.*, 1984; Lasater und Dowling, 1985). Wie zu erwarten, konnte auch die 8-Br-cAMP-vermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8 durch die Präinkubation mit H89 inhibiert werden. Des Weiteren zeigte sich, dass auch die Präinkubation mit dem DAR<sub>1</sub>-Antagonisten SCH23390 zur Inhibition der Dopamin-vermittelten Phosphorylierung von cpCx53.8 führte. Neben der

Reproduktion der beschriebenen Effekte von H89 auf die Dopamin- bzw. 8-Br-cAMPvermittelte Modulation konnte im Rahmen der Masterarbeiten von Nadine Mellies (2011) und Nina Hoyer (2011) ein vergleichbarer Effekt durch den Einsatz von KT5720 erzielt werden. KT5720 stellt ebenfalls einen membranpermeablen PKA-Inhibitor dar, welcher eine Aktivierung der katalytischen Untereinheiten der PKA hemmt (Engh *et al.*, 1996).

Die PKA-abhängige Wirkung von Dopamin konnte ebenfalls auf physiologischer Ebene belegt werden. So zeigte sich, dass durch die Präinkubation mit H89 die Dopamin-induzierte Reduzierung der rezeptiven Feldgröße sowie die verminderte Gap Junction-Kopplung der Horizontalzellen weitestgehend gehemmt wurde. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass SCH23390 auch die Dopamin-vermittelten Effekte auf die Kopplungseigenschaften der Horizontalzellen inhibiert (McMahon, 1994; McMahon und Mattson, 1996; Wang *et al.*, 1997). Außerdem belegen Studien von Teranishi *et al.* (1984) und McMahon *et al.* (1989), dass 8-Br-cAMP vergleichbare Auswirkungen auf die Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen hat wie Dopamin.

Zusammenfassend deuten die Befunde auf eine PKA-Signalkaskade in Horizontalzellen hin, welche durch Bindung des Neuromodulators Dopamin an einen D1-Rezeptor ausgelöst wird und über den *second messenger* cAMP die Aktivierung der PKA bewirkt (vgl. Abb. 4.1). Es scheint, dass diese Aktivierung der PKA direkt zur Phosphorylierung von cpCx53.8 führt, wodurch weiterführend offensichtlich die Entkopplung der Horizontalzell-Gap Junctions induziert wird.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (vgl. Kapitel 1.3.3), konnten in mehreren Studien an unterschiedlichen Spezies vergleichbare Rückschlüsse zur gesteigerten Connexin-Phosphorylierung und einer verminderten Gap Junction-Kopplung gezogen werden (Teranishi *et al.*, 1983; Teranishi *et al.*, 1984; Berthoud *et al.*, 1997, 2000; Cheng und Louis, 2001; Lampe und Lau, 2004). Allerdings zeigten Kothmann *et al.* (2009), dass die Entkopplung von AII-Amakrinzellen in der Kaninchenretina über eine Dephosphorylierung von Cx36 gesteuert wird. Den Autoren zufolge kommt es hierbei zur Aktivierung einer Dopamin-vermittelten Signalkaskade, welche ebenfalls in der Aktivierung von PKA resultiert, die in diesem Fall jedoch nicht zur direkten Phosphorylierung des Gap Junction-formenden Connexins Cx36 führt, sondern zur Aktivierung der Protein-Phosphatase 2A (PP2A). Die PP2A induziert dann die Dephosphorylierung von Cx36, was zur Entkopplung der entsprechenden Gap Junction-Kanäle führt. Eindeutige Hinweise auf die Dopamin-vermittelte Aktivierung der PP2A wurden in dieser Studie vor allem durch die Verwendung des PP2A-Inhibitors Microcystin-LR (MC-LR) erzielt. Um zu untersuchen, ob auch im Falle der Horizontalzellen (der

Karpfenretina) eine Aktivität der PP2A und eine daraus resultierende Dephosphorylierung von cpCx53.8 möglich ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt einer Präinkubation mit MC-LR und anschließender Inkubation mit Dopamin bzw. 8-Br-cAMP auf das cpCx53.8-Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster mittels Western Blot untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Abb. 8.2 im Anhang (S. 153) zusammengefasst. Es zeigte sich, dass MC-LR weder im Falle der Dopamin-Inkubation (n = 3) noch im Falle der 8-Br-cAMP-Inkubation (n = 2) einen Einfluss auf das cpCx53.8-Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster hat. Demnach deuten diese ersten Befunde nicht auf eine Aktivität der PP2A innerhalb der Karpfenhorizontalzellen hin. Zur weiteren Verifizierung ist es jedoch unerlässlich, potentielle Effekte von MC-LR (bzw. auch weiterer Phosphatase-Inhibitoren) auch auf physiologischer Ebene zu untersuchen.

#### 4.2.2.2 Retinsäure wirkt über die Aktivierung von PKC

Die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Retinsäure resultierte in einer Reduzierung der rezeptiven Feldgröße einzelner Horizontalzellen sowie deren Gap Junction-vermittelter Kopplung (vgl. Abb. 3.11). Diese Befunde sind weitestgehend kongruent mit früheren physiologischen Studien (Pottek et al., 1997; Weiler et al., 1998). Als ein neuer Befund konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Retinsäure (ähnlich wie Dopamin) auch Auswirkungen auf den Phosphorylierungszustand eines der Karpfenhorizontalzellconnexine (cpCx53.8) hat, welches sich ebenfalls in einer gesteigerten Phosphorylierung dieses Connexins äußerte. Wie im Falle von Dopamin, glich das cpCx53.8-Immunoreaktivitäts-/Phosphorylierungsmuster der mit Retinsäure behandelten Proben denen der jeweiligen Lichtadaptationskontrollen (vgl. Abb. 3.11). Durch den Einsatz der jeweiligen Kinase-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Retinsäure-vermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8 ausschließlich durch die Präinkubation mit Staurosporin gehemmt wurde. Eine entsprechende Kombination von Retinsäure mit H89 bzw. dem MEK/MAP-Inhibitor UO126 zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf das cpCx53.8-Phosphorylierungsmuster. Eine potentielle Vermittlung der Retinsäure-Effekte über einen PKA- bzw. einen MAP-Kinase-Signalweg ist demnach weitestgehend auszuschließen, während eine PKC-Signalkaskade in Bezug auf die Retinsäure-vermittelte Modulation wahrscheinlich erscheint. Ein weiterer Hinweis darauf, dass cpCx53.8 ein Substrat für die PKC darstellt, konnte durch die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit dem Phorbolester PDBu (Phorbol-12,13-dibutyrat) und der daraus resultierenden Phosphorylierung von cpCx53.8 erbracht werden (vgl. Abb. 3.11). Die Phorbolester stellen eine Gruppe von Tumorpromotoren dar, welche nachweislich eine spezifische Aktivierung von PKC auslösen (Worley *et al.*, 1986; Janssen-Bienhold *et al.*, 1993, 1995; Weiler *et al.*, 1998). Der PDBu-vermittelte Effekt auf die Phosphorylierung von cpCx53.8 wurde ebenfalls durch die Präinkubation mit Staurosporin gehemmt. Vergleichbare Resultate zur Modulation des Phosphorylierungszustandes von cpCx53.8 durch Retinsäure und PDBu und die Inhibition durch Staurosporin konnten im Rahmen der Masterarbeit von Katharina John (2011) reproduziert werden.

Kongruent zu den zuvor beschriebenen Effekten von Dopamin und H89 konnte im Falle von Retinsäure ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibition von PKC durch die Präinkubation mit Staurosporin auch die Retinsäure-vermittelte Modulation des Kopplungsverhaltens (Reduzierung der rezeptiven Feldgröße und der Gap Junction-vermittelten Kopplung) der Horizontalzellen hemmt.

Unklarheit besteht jedoch nach wie vor darüber, wie Retinsäure die Aktivierung der PKC vermittelt. Denkbar wäre es zum einen, dass ein membranständiger Retinsäure-Rezeptor über die Aktivierung der Phospholipase C zur Auslösung der PKC-Signalkaskade führt (vgl. Abb. 4.1). Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, konnte bereits eine Vielzahl unterschiedlicher Retinsäure-Rezeptoren sowie mehrere Rezeptor-Subtypen identifiziert werden. Bislang konnte jedoch kein entsprechender Rezeptor bzw. eine Retinsäure-Bindedomäne an Membranen von Horizontalzellen identifiziert werden. Zum anderen kann zum derzeitigen Zeitpunkt auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine direkte Interaktion von Retinsäure mit der PKC vorliegt. Aktuell werden in der Arbeitsgruppe Neurobiologie Untersuchungen hinsichtlich der Klärung dieser Frage durchgeführt (siehe auch 4.4 Ausblick).

Um zu überprüfen, ob die Dopamin- oder Retinsäure-induzierte Phosphorylierung auf einer Aktivierung der CamKII beruht, wurde zusätzlich der Effekt einer Präinkubation mit KN62 und anschließender Inkubation mit Dopamin und Retinsäure untersucht (siehe Anhang, Abb. 8.3, S. 111). Die Befunde zeigen, dass KN62 weder die Dopamin- noch die Retinsäure-vermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8 beeinflusst. Eine entsprechende Aktivierung der CamKII ist somit ebenfalls weitestgehend auszuschließen.

## 4.2.3 PKA und PKC wirken additiv bei der Vermittlung der lichtabhängigen Modulation

Eine vorläufige Interpretation der gezeigten Befunde ließe den Schluss zu, dass Veränderungen des Adaptationszustands der Retina und damit der Gap Junction-vermittelten Kommunikation über mindestens zwei unabhängig agierende Signalwege (Dopamin/cAMP/PKA und Retinsäure/PKC) innerhalb der Horizontalzellen vermittelt werden. Von zentraler Bedeutung war es demnach, die Effekte von Staurosporin und H89 sowohl an lichtadaptierten als auch an dauerhaft dunkeladaptierten Retinen zu testen.

Die Versuchsanordnung zur selektiven Wirkung von H89 und Staurosporin auf lichtadaptierte und dauerhaft dunkeladaptierte Retinen diente vor allem der Klärung, ob jeweils ein unabhängiger Signalweg die Vermittlung entweder der licht-induzierten oder der dauerhaft dunkel-induzierten Modulation bewirkt. Weder in den lichtadaptierten noch in den dauerhaft dunkeladaptierten Retinen war eine komplette Hemmung der jeweiligen Effekte durch einen der beiden Inhibitoren zu verzeichnen. Es zeigte sich ein leichter inhibitorischer Effekt auf den Grad der Gap Junction-Kopplung und die rezeptive Feldgröße sowohl nach Staurosporinals auch nach H89-Präinkubation in dauerhaft dunkeladaptierten und lichtadaptierten Retinen (vgl. Abb. 3.17). Dies spricht für eine grundsätzliche Aktivität von PKA und PKC sowohl in Bezug auf die Vermittlung von "Lichtsignalen" als auch auf die Vermittlung von "Dunkelsignalen". Das verbleibende Auftreten der adaptiv-bedingten Modulation der physiologischen Eigenschaften der Horizontalzellen wäre demzufolge auf die verbleibende Aktivität des jeweils nicht inhibierten Signalweges zurückzuführen.

Bei entsprechenden Western Blot Analysen kam es bei allen 4 Kombinationsmöglichkeiten (L/stau; L/H89; DD/stau; DD/H89) zu einer erneuten Detektion der "Grundbande" von cpCx53.8 bei ca. 55 kDa. Im Vergleich zu den jeweiligen Dunkelkontrollen wiesen diese Banden zwar eine etwas schwächere Intensität auf, jedoch erschienen sie eindeutig intensiver als in den Kontrollen der lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierten Retinen. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Fraktionen vermehrt die "Grundbande" bei ca. 55 kDa vorhanden ist. Insgesamt war das Erscheinungsbild der cpCx53.8-Immunoreaktivität der 4 Kombinationen sehr ähnlich und stellte sozusagen eine Art "Zwischenstufe" zwischen den detektierten Banden der Dunkelproben ("Grundbande" ca. 55 kDa) und den höhermolekularen Isoformen (>58 kDa), der adaptierten Kontrollen dar. Eine teilweise Inhibition der Effekte von Lichtadaptation bzw. dauerhafter Dunkeladaptation ist demzufolge sowohl durch H89 als auch durch Staurosporin nachzuweisen. Diese Befunde stellen einen eindeutigen Hinweis darauf adaptiv-bedingte Modulation Horizontalzellkopplung dar. dass die der höchstwahrscheinlich auf einer additiven Wirkung des PKA- und des PKC-Signalweges beruhen.

Diese Annahme wurde ebenfalls durch die Versuche zur kombinativen Inhibition von PKA und PKC sowohl auf physiologischer als auch auf proteinbiochemischer Ebene bestätigt. In Bezug auf die physiologischen Eigenschaften der Horizontalzellen konnte gezeigt werden, dass die kombinative Inhibition von PKA und PKC in einem signifikanten Anstieg der rezeptiven Feldgröße und der Gap Junction-Kopplung resultierte. Sowohl bei den lichtadaptierten als auch bei den dauerhaft dunkeladaptierten Retinen waren die entsprechenden Veränderungen nicht signifikant unterschiedlich zu den jeweiligen Kontrollen der dunkeladaptierten Retinen. Auf den entsprechenden Western Blot Analysen (vgl. Abb. 3.13) war in den Fraktionen der lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierten Retinen, welche mit beiden Inhibitoren präinkubiert wurden ein deutlicher Rückgang der Phosphorylierung von cpCx53.8 zu erkennen. Auffallend in beiden Proben war, dass vor allem die "Grundbande" (ca. 55 kDa) des Connexins, welche in der dunkeladaptierten Retina stets in einer hohen Intensität detektiert wurde, verstärkt zum Vorschein kam. Diese Bande war in den jeweiligen Kontrollproben meist nicht oder nur sehr schwach detektierbar. Außerdem zeigte sich durchweg, dass eine präzise Detektion der höhermolekularen Isoformen (>57 kDa), welche sich zuvor in definierten Proteinbanden äußerte, in den Proben mit den Inhibitoren meist nicht mehr gegeben war. Vielmehr kam es in diesen Fällen zur Detektion eines schwachen immunoreaktiven Hintergrunds, welcher jedoch in einer weitaus schwächeren Intensität im Vergleich zu den höhermolekularen Proteinbanden der jeweiligen Kontrollen auftrat. Das. durch den Einsatz der Inhibitoren resultierende Immunoreaktivitätsmuster von cpCx53.8 glich in etwa dem, der jeweiligen Dunkelkontrollen. Etwaige Unterschiede können zum einen darauf beruhen, dass der Einfluss der Lichtadaptation bzw. der dauerhaften Dunkeladaptation auf die Phosphorylierung so stark ist, dass er nicht vollständig durch den Einsatz der Inhibitoren blockiert wurde. Des Weiteren ist auch denkbar, dass die verwendeten Konzentrationen der Inhibitoren zu gering waren bzw., dass die Präinkubationszeit von 15 Minuten zu kurz war, um eine vollständige Inhibition zu gewährleisten.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für das verbleibende Auftreten der schwachen cpCx53.8-Immunoreaktivität im höhermolekularen Bereich besteht darin, dass ein weiterer Neuromodulator an der Vermittlung der modulatorischen Einflüsse unterschiedlicher Adaptationszustände beteiligt ist. Die verbleibende Immunoreaktivität wäre demnach auf das Vorhandensein von weiteren phosphorylierten Isoformen des Connexins zurückzuführen. Für das Vorhandensein eines solchen Signalweges sprechen vor allem physiologische Hinweise früherer Studien, welche neben Dopamin und Retinsäure auch Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) als potentiellen Neuromodulator im Hinblick auf die Horizontalzellkopplung der Fischretina beschreiben. Pottek *et al.* (1997) erbrachten den ersten Hinweis darauf, dass der NO-Donor Nitroprussid (*sodium nitroprusside*) zu einer reduzierten Kopplung der

Horizontalzellen der Karpfenretina führt. Weiterführende Studien von Baldridge et al. (1998) und Daniels und Baldridge (2011) an der Goldfischretina bestätigten durch den Einsatz des NO-Donors S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP), dass NO zu einer Reduzierung der rezeptiven Feldgröße einzelner Horizontalzellen und einem verringerten Grad der Gap Junction-vermittelten Kopplung der Zellen führt. Außerdem konnte ebenfalls am Goldfisch gezeigt werden, dass es durch NO zu einem intrazellulären Anstieg des second messenger cGMP kommt (Baldridge und Fischer, 2001). Dieser ist nachweislich an der intrazellulären Vermittlung von Signalen beteiligt, welche ausgehend von der Guanylatzyklase zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) führen (Alberts et al., 1995; Bloomfield und Völgyi, 2009). Denkbar wäre es demzufolge, dass neben den bereits beschriebenen Signalkaskaden (Dopamin-DAR<sub>1</sub>-cAMP-PKA; Retinsäure-PKC) auch eine NO-abhängige cGMP-PKG-Signalkasakde existiert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse putativer Phosphosites in der Sequenz von cpCx53.8 untermauert die Möglichkeit einer PKGvermittelten Modulation von cpCx53.8. Im Bereich des C-Terminus sind 4 Serin-Reste lokalisiert, welche putative PKG-Phosphosites darstellen (Abb. 3.14, S-329 Score = 0,60; S-372 Score = 0,57; S-394 Score = 0,60; S-421 Score = 0,58). Diese Sites zeigen zwar durchgehend geringere Score-Werte zur Interaktion mit der Kinase als PKA und PKC, dennoch lässt sich cpCx53.8 als putatives Substrat für die PKG identifizieren. Zur Überprüfung der Annahme einer cGMP-vermittelten Signalkaskade, welche in der Aktivität von PKG resultiert wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Vorversuche durchgeführt und der Einfluss von cGMP auf das Phosphorylierungsmuster von cpCx53.8 untersucht. Äquivalent zu den cAMP-Analysen wurde das membrangängige Derivat 8-Bromo-cGMP (8-Br-cGMP) verwendet. Die vorläufigen Ergebnisse dieser Analysen sprechen ebenfalls für das Vorhandensein eines weiteren Signalweges, da die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit 8-Br-cGMP zur Detektion höhermolekularer Proteinbanden auf dem Western Blot führte, welches für eine gesteigerte Phosphorylierung von cpCx53.8 spricht (siehe Anhang, Abb. 8.1, S. 151). Entsprechende Befunde konnten zwar bereits in zwei separaten Präparationen reproduziert werden, allerdings stützen sich die vorläufigen Aussagen und Interpretationen dieser Befunde lediglich auf eine durchgeführte SDS-PAGE bzw. Western Blot Analyse. Die Ergebnisse sind demnach entsprechend zu beurteilen und es muss darauf hingewiesen werden, dass weitere unabhängige Reproduktionen in dieser Hinsicht unabdingbar sind. Außerdem ist es nötig entsprechende Einflüsse sowohl auf molekularer als auch auf physiologischer Ebene zu untersuchen.

# 4.3 Die gesteigerte cpCx53.8-Phosphorylierung korreliert mit einer erhöhten cpCx53.8-Immunoreaktivität in der äußeren Retina

Das zuvor beschriebene veränderte Phosphorylierungsmuster von cpCx53.8 korrelierte mit entsprechenden Veränderungen des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters in Querschnitten der Karpfenretina. Eine Entkopplung der Zellen unter lichtadaptierten und dauerhaft dunkeladaptierten Bedingungen scheint demnach mit einer strukturellen Veränderung der cpCx53.8-enthaltenden Gap Junctions einherzugehen. Vergleichbare Resultate in Bezug auf eine Lichtadaptation konnten in der Diplomarbeit von Gerrit Hilgen (2008) und den Masterarbeiten von Nadine Mellies (2011), Nina Hoyer (2011) und Katharina John (2011) (AG Neurobiologie, Universität Oldenburg) erzielt werden.

Die durch Lichtadaptation und dauerhafte Dunkeladaptation sowie durch die Inkubation mit Dopamin und Retinsäure erhöhte Anzahl cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques kann unterschiedliche Ursachen haben. Es ist denkbar, dass die Entkopplung der Zellen direkte Auswirkungen auf die Anzahl bzw. die Dichte der cpCx53.8-enthaltenden Gap Junction-Plaques ausübt. Entsprechende Effekte konnten bereits zuvor anhand ultrastruktureller Untersuchungen innerhalb der Karpfenretina beobachtet werden (Kurz-Isler und Wolburg, 1986, 1988; Kurz-Isler *et al.*, 1992). Im Rahmen dieser Studien wurde gezeigt, dass die Dichte der Connexone in dunkeladaptierten Retinen mit ca. 7.000 Connexonen pro 100  $\mu$ m<sup>2</sup> deutlich höher ist als in lichtadaptierten Retinen in denen nur ca. 3.000 Connexone pro 100  $\mu$ m<sup>2</sup> vorlagen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gap Junction-Plaques in lichtadaptierten Retinen mit ca. 3  $\mu$ m<sup>2</sup> sechsmal größer sind als entsprechende Plaques in dunkeladaptierten Retinen (ca. 0,5  $\mu$ m<sup>2</sup>). Den Autoren zufolge stellt vor allem die Verringerung der Connexondichte während der Lichtadaptation das charakteristische Kriterium bzw. jene dynamische und strukturelle Veränderung dar, welche eine Entkopplung der Horizontalzellen kennzeichnet.

Eine weitere mögliche Erklärung des vermehrten Auftretens cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques besteht darin, dass die Entkopplung der Zellen zu einem verstärkten Abbau der entsprechenden Gap Junctions führt. Ein derartiger Degradationsprozess für Gap Junctions beinhaltet das Auflösen der einzelnen Kanäle und deren endocytotische Aufnahme in die beteiligten Zellen und eine Internalisierung in doppelwandige Transportvesikel (Berthoud *et al.*, 2004). Die internalisierten Kanäle stehen den Zellen somit zur weiteren Verwendung zur Verfügung oder sie werden in Proteasomen oder Lysosomen abgebaut (Jordan *et al.*, 1999; Berthoud *et al.*, 2004). Das Auflösen der jeweiligen Gap Junction-Plaques hätte zur Folge, dass insgesamt mehr cpCx53.8-immunoreaktive Spots detektierbar sind. Denkbar ist auch, dass die Veränderungen des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters auf eine verstärkte bzw. verringerte Expression von cpCx53.8 zurückzuführen sind. Wie bereits zuvor erwähnt (vgl. 1.2.2), sind neben den modulatorisch wirksamen Effekten der PKA ebenfalls genregulatorische Effekte beschrieben (Alberts et al., 1995; Delghandi et al., 2005). Dieser Einfluss äußert sich in einer erhöhten Expression bestimmter Proteine und wird durch die Aktivierung (PKA-vermittelte Phosphorylierung) des Transkriptionsfaktors CREB und einer anschließenden Bindung an dessen Co-Faktor CRE ermöglicht. Eine Inhibition der PKA hätte demnach zur Folge, dass CREB nicht bzw. nur eingeschränkt phosphoryliert wird, woraus eine verminderte Expression von cpCx53.8 resultiert. Bislang wurden diese genregulatorischen Effekte meist im Hinblick auf langfristige Veränderungen der Genexpression bezogen, welche z.B. für das Erinnerungsvermögen oder das Langzeitgedächtnis von Bedeutung sind (Bito et al., 1996; Kandel, 2012). Allerdings konnte in einigen Studien auch gezeigt werden, dass höchstwahrscheinlich eine schnelle und eine langsame Komponente an diesen genregulatorischen Effekten beteiligt sind (Friedrich et al., 2010). Den Autoren zufolge spielt sich die schnelle Komponente der PKA-vermittelten Phosphorylierung von CREB und der Bindung an CRE bereits innerhalb weniger Minuten bzw. unter einer Stunde ab. In Anbetracht der Inkubationszeit in dieser Arbeit von 45 Minuten ist es nicht auszuschließen, dass die erhöhte cpCx53.8-Immunoreaktivität zumindest zum Teil auf die erhöhte Expression von cpCx53.8 zurückzuführen ist.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug auf die Veränderungen der cpCx53.8-Immunoreaktivität ergibt sich aus dem Befund, dass die detektierten cpCx53.8-Proteinbanden innerhalb der dunkeladaptierten Proben phosphoryliert Isoformen darstellen (vgl. Abb. 3.8 D). Dies führt zu der Annahme, dass cpCx53.8 bereits phosphoryliert sein muss, um in die Membran eingebaut werden zu können, um weiterführend funktionale Gap Junctions zu bilden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten der cytoplasmatischen Schleife bzw. des C-Terminus verschiedener Connexine das *gating*-Verhalten der entsprechenden Kanäle beeinflusst und ebenfalls essentiell für ihren zellulären Lebenszyklus, einschließlich ihres Transports und den Einbau in die Zellmembranen ist (Lampe und Lau, 2000; 2004). Nadine Mellies ist es im Rahmen ihrer Masterarbeit (2011) gelungen ein geeignetes Modellsystem zu etablieren, welches es ermöglicht den Einfluss einer induzierten Phosphorylierung von cpCx53.8 auf dessen Einbau in die Zellmembranen zu untersuchen. Die heterologe Expression von cpCx53.8 erfolgt hierbei in einer speziellen Zelllinie der Neuroblastoma Zellen, den sog. N2A-Zellen (Klebe und Ruddle, 1969). Zusammenfassend verdeutlichen die von Nadine Mellies sowie die, in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass auch im Falle von cpCx53.8 eine posttranslationale Phosphorylierung den Einbau in die Zellmembranen ermöglicht bzw. verstärkt. Die Ergebnisse verdeutlichen des Weiteren, dass diese Phosphorylierung aller Wahrscheinlichkeit nach über einen cAMP-PKA-vermittelten Signalweg vermittelt wird. So konnte eine erhöhte Immunoreaktivität innerhalb der Zellmembranen der Mehrzahl der Zellen ausschließlich nach der Inkubation mit dem membranpermeablen cAMP-Derivat, 8-Br-cAMP beobachtet werden, welche zuverlässig durch eine entsprechende Präinkubation mit H89 inhibiert wurde.

In Bezug auf die Befunde der Retinsäure-Inkubation kann bislang kein eindeutiges Bild hinsichtlich einer modulatorischen Wirkung zur Assemblierung bzw. zum Einbau von cpCx53.8 in die Membranen gegeben werden. Die hier gezeigten Befunde deuten darauf hin, dass Retinsäure keinen direkten Einfluss auf den Einbau des Connexins in die Membran hat, da in diesen Fällen durchweg eine vergleichbare cpCx53.8-Immunoreaktivität innerhalb der Membranen zu finden war, wie sie auch unter Kontrollbedingungen auftrat. Das vermehrte Auftreten immunoreaktiver Plaques, welches in der Retina nach Retinsäure-Inkubation zu verzeichnen war, wäre demzufolge nicht auf den verstärkten Einbau von cpCx53.8 in die Membranen zurückzuführen. Zum einen wäre es denkbar, dass die Retinsäure-vermittelte Modulation des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters innerhalb der Retina ausschließlich in Folge der kopplungsbedingten verringerten Dichte der Gap Junction Plaques hervorgerufen wird. Zum anderen ist es auch möglich, dass zur Vermittlung der Retinsäure-Effekte tatsächlich ein membranständiger Rezeptor existiert, welcher in den N2A-Zellen nicht vorkommt. Einen direkten Hinweis auf das Vorhandensein eines solchen Rezeptors stellen erste Versuche von Jasmin Segelken (Arbeitsgruppe Neurobiologie) dar, die zeigen, dass durch die Inkubation mit dem PKC-Aktivator PDBu ebenfalls eine erhöhte Membranassoziierte cpCx53.8-Immunoreaktivität in den N2A-Zellen zu verzeichnen ist. Die direkte Aktivierung von PKC scheint demzufolge auch Einfluss auf die Genexpression bzw. die Assemblierung und den Einbau cpCx53.8-enthaltender Gap Junctions zu haben. Hierbei handelt es sich allerdings um vorläufige Befunde und die weitere Verifizierung bzw. entsprechende Reproduktionen stehen zurzeit noch aus.

## 4.4 Putative Signalmoleküle zur Vermittlung adaptiv-bedingter Modulationsmechanismen

Das Vorhandensein zweier, unabhängig agierender Signalvorgänge über PKA und PKC, welche über einen veränderten Phosphorylierungszustand von cpCx53.8 Einfluss auf das

gating der Horizontalzell-Gap Junctions ausüben, steht nach der hier gezeigten Ergebnisdarstellung weitestgehend außer Frage. Auch die Beteiligung beider Signalwege an der lichtabhängigen Modulation kann als erwiesen angesehen werden. Auf Grundlage der gezeigten Ergebnisse kann jedoch nicht eindeutig postuliert werden, dass die PKA-vermittelte Modulation stets über Dopamin und die PKC-vermittelte Modulation stets über Retinsäure als jeweilig aktivierende Signalmoleküle vermittelt wird. Im Folgenden soll diskutiert werden welche Möglichkeiten im Hinblick auf die Aktivierung entsprechender Signalkaskaden durch verschiedene Neuromodulatoren bestehen. Unter Bezugnahme auf bereits erbrachte Erkenntnisse soll außerdem dargelegt werden wie wahrscheinlich die Beteiligung von Dopamin bzw. Retinsäure an der Vermittlung adaptiv-bedingter Signale ist.

#### 4.4.1 Dopamin als Signalmolekül

In der Fischretina erfolgt die Synthese von Dopamin in dopaminergen interplexiformen Zellen (dopaminergic interplexiform cells; dIPCs). Die Somata der dIPCs sind in der proximalen INL lokalisiert und ihre dendritischen Fortsätze projizieren in beide plexiformen Schichten der Retina. In der OPL werden durch diese Fortsätze Kontaktpunkte zu den Bipolarzell- sowie den Horizontalzelldendriten gebildet (Dowling und Ehinger, 1978). Als allgemein anerkannt gelten die Licht-korrelierte Synthese von Dopamin innerhalb der dIPCs und die erhöhte Freigabe des Neurotransmitters bei Licht (Djamgoz und Wagner, 1992; Ribelayga und Mangel, 2007). Die weitere Vermittlung der Dopamin-Effekte erfolgt grundsätzlich über zwei unterschiedliche Typen von Dopamin-Rezeptoren, den D1- und den D2-Rezeptoren (Schorderet und Nowak, 1990; Dong und McReynolds, 1991). An den Horizontalzellen (der Fischretina) sind ausschließlich die D1-Rezeptoren lokalisiert, und deren Aktivität führt nachweislich zur Auslösung der cAMP-abhängigen PKA-Signalkaskade. Durch die Verwendung des spezifischen PKA-Inhibitors H89 und des DAR<sub>1</sub>-Antagonisten SCH23390 in Verbindung mit der Dopamin-Inkubation war es möglich in dieser Arbeit gezielt in den Dopamin-PKA-Signalweg einzugreifen und dessen exakten Verlauf umfassend nachzuvollziehen. Zusammenfassend deuten die Befunde auf einen Dopamin-DAR1-cAMP-PKA-Signalwege hin, welcher während der Lichtadaptation die erhöhte Phosphorylierung der Horizontalzellconnexine und die daraus resultierende Modulation des Kopplungsverhaltens der Zellen induziert.

Hinsichtlich der PKA-Aktivierung während andauernder Dunkelheit kann kein eindeutiges Bild des exakten Verlaufs der entsprechenden Signalkaskade gegeben werden. Es existieren mehrere Studien, welche die Effekte dauerhafter Dunkeladaptation mit einer entsprechend erhöhten Synthese bzw. Aktivität von Dopamin in Verbindung bringen (Mangel und Dowling, 1985; Mangel und Dowling, 1987; Yang et al., 1988). Allerdings beziehen sich diese Studien ausschließlich auf die Vergleiche der Wirkungen von Dopamin und dauerhafter Dunkeladaptation in Bezug auf die Horizontalzellphysiologie. Ein direkter Nachweis der Vermittlung des modulatorischen Einflusses von Dopamin während andauernder Dunkelheit wird nicht gegeben. Exakte Messungen hinsichtlich des Vorhandenseins von Dopamin und dessen hauptsächlichem metabolischen Produkt dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) wurden in der Karpfenretina erstmals von Weiler et al. (1989) durchgeführt. In dieser Studie konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Synthese von Dopamin in den dIPCs nur während der Lichtadaptation stattfindet und nicht während andauernder Dunkelheit. Außerdem zeigte sich eine Reduzierung der DOPAC-Werte um ca. ein Drittel der Ausgangskonzentration während der ersten 90 Minuten in Dunkelheit und ein Rückgang der endogenen Freigabe von Dopamin aus den dIPCs um ca. 25% nach den ersten 30 Minuten in kompletter Dunkelheit. Dieser Wert blieb jedoch auch bei anhaltender Dunkelheit auf einem gleich bleibenden Niveau während gleichzeitig der "Pool" der zur Verfügung stehenden Menge von Dopamin um ca. ein Drittel anstieg. Den Autoren zufolge könnte die verminderte Ausschüttung von Dopamin während andauernder Dunkelheit dennoch zur Vermittlung der physiologischen Effekte beitragen. Es wird in dieser Hinsicht diskutiert, dass bei andauernder Dunkelheit bereits eine verminderte Konzentration von Dopamin ausreicht, um das Zapfen-System, welches nachweislich eine erhöhte Sensitivität während absoluter Dunkelheit aufweist, zu beeinflussen. Entsprechende Effekte von Dopamin bzw. der PKA in den Horizontalzellen wären demnach ebenfalls denkbar.

Ein weiterer indirekter Hinweis zur Dopamin-vermittelten Aktivierung der PKA-Signalkaskade während andauernder Dunkelheit wurde von Young *et al.* (1990) ebenfalls in der Karpfenretina erbracht. In dieser Studie wurde mittels immunhistologischer und autoradiographischer Untersuchungen gezeigt, dass ein Anstieg des *second messenger* cAMP in Horizontalzellen sowohl nach dauerhafter Dunkeladaptation (>2 Stunden) als auch nach Dopamin-Inkubation zu verzeichnen war. Dieser Anstieg konnte in allen Zapfen-assoziierten Typen der Horizontalzellen (H1-H3) nachgewiesen werden. Eine dementsprechend erhöhte Konzentration von cAMP innerhalb der Zellen hätte zwangsläufig eine verstärkte Aktivität der PKA zur Folge.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass hinsichtlich der Wirkung von Dopamin auf die PKA-Signalkaskade während andauernder Dunkelheit bislang kein eindeutiger Nachweis erbracht wurde, allerdings viele indirekte Hinweise für eine entsprechende Aktivierung existieren. Nicht auszuschließen ist es allerdings, dass die Aktivierung der PKA-Signalkaskade (während dauerhafter Dunkeladaptation) durch einen weiteren Neuromodulator bzw. ein weiteres Signalmolekül hervorgerufen wird.

Einen putativen Kandidaten in dieser Hinsicht stellt das Neurohormon Adenosin dar. Die Synthese von Adenosin unterliegt einer zirkadiären Rhythmik (circadian rhythm), welche einen entgegengesetzten Phasenverlauf zur Dopamin-Synthese aufweist. Demnach kommt es zu einem Anstieg der extrazellulären Adenosin-Konzentration bei andauernder Dunkelheit bzw. bei Nacht im Vergleich zur verringerten Konzentration bei Lichtadaptation bzw. bei Tag (Ribelayga und Mangel, 2005). Adenosin reguliert nachweislich eine Vielzahl unterschiedlicher Photorezeptor-Funktionen in exakt gegensätzlicher Weise wie Dopamin (Rey und Burnside, 1999; Stella et al., 2002; 2003). Die Vermittlung der entsprechenden Effekte wird über spezifische Adenosin-Rezeptoren gewährleistet (Blazynski, 1990). Bislang wurden zwei unterschiedliche Subtypen dieser Rezeptoren beschrieben, die A1-Adensoin-Rezeptoren und die A2-Adenosin-Rezeptoren (A1a-R; A2a-R). Die Unterscheidung der zwei Rezeptortypen beruht auf deren jeweiliger Kopplung zur Adenylatzyklase über entweder ein stimulierendes oder ein inhibierendes G-Protein (G<sub>s</sub>; G<sub>i</sub>) (Phillis und Wu, 1983; Phillis et al., 1991). In den Photorezeptoren sind ausschließlich die A2a-R lokalisiert, welche zur Aktivierung der Adenylatzyklase und einem entsprechenden Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration beitragen (Londos et al., 1980; Friedman et al., 1989). Basierend auf diesen Befunden untersuchten Li et al. (2013) den Einfluss von Dopamin und Adenosin auf die Kopplungseigenschaften von Photorezeptoren in der Mausretina (C57BL/6-Mauslinie). Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Adenosin bzw. die Aktivierung der A2a-Rezeptoren eindeutig in Bezug zur Dunkeladaptation stehen und dass die Regulierung der Photorezeptor-Kopplungseigenschaften über eine PKA-vermittelte Phosphorylierung von Cx36 gesteuert wird. Vergleichbare Befunde zur Adenosin-vermittelten PKA-Aktivierung konnten ebenfalls für das Cx35 (Fisch-Homolog zu Cx36) in der Zebrafischretina erbracht werden (Li et al., 2009). Es ist nicht auszuschließen, dass Adenosin neben den beschriebenen Effekten auch Auswirkungen auf die Kopplungseigenschaften anderer retinaler Neurone, wie z.B. den Horizontalzellen, hat.

Einen weiteren möglichen Kandidaten für die Vermittlung der Dunkelsignale über eine PKA-Aktivierung stellt *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) dar. So konnten Harsanyi *et al.* (1996) zeigen, dass entsprechende NMDA-Rezeptoren u.a. an der Vermittlung neuromodulatorischer Signale beteiligt sind, welche sich ebenfalls in einer reduzierten Gap Junction-vermittelten Kopplung bzw. einer Reduzierung der rezeptiven Feldgröße der Horizontalzellen äußerten. Eindeutige Hinweise auf die Beteiligung der NMDA-vermittelten Modulation in Bezug auf den Dopamin-Signalweg wurden durch die Verwendung von SCH23390 sowie *6-hydroxydopamine* (6-OHDA) erbracht. 6-OHDA führt nachweislich zu einer Inaktivierung der dopaminergen Zellen (dIPCs) in der Retina (Harsanyi und Mangel, 1992). Sowohl eine entsprechende Präinkubation mit SCH23390 als auch mit 6-OHDA führte zur Inhibition jeglicher NMDA-Effekte. Zwar wurde in dieser Studie keine spezifische Wirkung der entsprechenden Effekte während unterschiedlicher adaptiver Stadien der Retinen untersucht, dennoch liefern diese Befunde einen Hinweis darauf, dass die Aktivierung des klassischen Dopamin-DAR<sub>1</sub>-cAMP-PKA-Signalweges durchaus auf einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren beruhen kann.

#### 4.4.2 Retinsäure als Signalmolekül

Retinsäure entsteht als Nebenprodukt während des Phototransduktionszyklus und wird durch das Enzym Aldehyddehydrogenase aus Retinaldehyd lichtkorreliert produziert (Weiler *et al.*, 1998; Pottek und Weiler, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Retinsäure als "Lichtsignal" in der Retina u.a. an der Bildung sog. *Spinules* an den Horizontalzelldendriten beteiligt ist (Weiler *et al.*, 1998; Dirks *et al.*, 2004). Diese sind ein charakteristisches Merkmal lichtadaptierter Retinen und treten entsprechend in dunkeladaptierten Retinen nicht auf. Die Anzahl von *Spinules* stellt demzufolge ein mit dem Adaptationszustand der Retina korreliertes Maß dar. Diese Befunde, sowie die Erkenntnisse der neuromodulatorischen Wirkung von Retinsäure in Bezug auf physiologische Veränderungen der Horizontalzellkopplung (Pottek und Weiler, 2000; Weiler *et al.*, 2000) unterstreichen die Annahme einer Retinsäure-vermittelten Modulation während der Lichtadaptation. Auf Grundlage der spezifischen Inhibition der Retinsäure-vermittelten modulatorischen Effekte durch Staurosporin erscheint in Bezug auf die Licht-induzierte Modulation ein Retinsäure-PKC-Signalweg denkbar und wahrscheinlich.

Eine Retinsäure-vermittelte Aktivierung der PKC-Signalkasakade während andauernder Dunkelheit ist jedoch unter Berücksichtigung der Licht-korrelierten Synthese des Neuromodulators eher unwahrscheinlich. Denkbar ist, dass ein weiteres Signalmolekül bei andauernder Dunkelheit die PKC-Signalkaskade auslöst. In dieser Hinsicht sollte die Möglichkeit der Vermittlung entsprechender Effekte durch das Neurohormon Melatonin in Betracht gezogen werden. Melatonin wurde bislang vor allem in Verbindung eines retinalen zirkadiären Rhythmus beschrieben, welcher nachweislich an einer Vielzahl biochemischer, morphologischer sowie physiologischer Prozesse beteiligt ist (Cahill und Besharse, 1992; Wang und Mangel, 1996; Dmitriev und Mangel, 2000; Mangel, 2001; Ribelayga et al., 2002). Übereinstimmend mit diesen Befunden konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Melatonin ebenfalls einer zirkadiären Rhythmik unterliegt (Besharse und Iuvone, 1983). So sind die Synthese und die Freigabe von Melatonin bei Nacht bzw. bei andauernder Dunkelheit erhöht und am Tag erniedrigt (Tosini und Menaker, 1996; Ligo et al., 1997). Die Wirkungsweise von Melatonin umfasst ein weites Spektrum, welches in Bezug zur zirkadiären Rhythmik u.a. die Regulierung des Schlaf-Wach-Rhythmus beinhaltet und außerdem an einer Vielzahl physiologischer Effekte während der pubertären Entwicklung beteiligt ist (Pandi-Perumal et al., 2008). Die meisten bisher beschriebenen Effekte von Melatonin werden über die Aktivierung entsprechender Melatonin-Rezeptoren (MT1 und MT2 und weiterer Subtypen) gewährleistet (von Gall et al., 2002). Die Expression dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde bereits in unterschiedlichen Bereichen und Zelltypen des ZNS, wie z.B. dem Hippocampus, dem cerebralen- und präfrontalen Cortex, den Basalganglien, der Substantia Nigra sowie dem Nucleus accumbens nachgewiesen. Innerhalb der Retina konnten entsprechende Rezeptoren in Horizontalzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen lokalisiert werden (Pandi-Perumal et al., 2008). Zu den wichtigsten nachgewiesenen Funktionen innerhalb der Retina zählen sicherlich die Regulation der Aktivität Photorezeptoren sowie die Modulation der physiologischen von Antworteigenschaften Zapfen-assoziierter Horizontalzellen (Wiechmann and Sherry, 2013; Huang et al., 2013). Nachgewiesen ist ebenfalls, dass eine Aktivierung von MT1- und MT2-Rezeptoren eine Vielzahl unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege beeinflusst. So konnten Auswirkungen auf die Konzentration bestimmter second messenger Moleküle wie cAMP und cGMP nachgewiesen werden. Weitere Hinweise existieren hinsichtlich einer Aktivierung der Phospholipase C innerhalb der Photorezeptoren (Semple-Rowland et al., 2013) und einer Aktivierung unterschiedlicher PKC-Subtypen (Pandi-Perumal et al., 2008). Auf Grundlage dieser Befunde stellt Melatonin einen möglichen Kandidaten zur Vermittlung von "Dunkel-Signalen" sowohl über den cAMP-PKA- als auch über den PKC-Signalweg dar.

Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass verschiedene Neuromodulatoren neben bereits beschriebenen Effekten auch Auswirkungen auf weitere Signalvorgänge oder Signalmoleküle haben. In welcher Form z.B. NO neben der Aktivierung von PKG auch Auswirkungen auf die PKA oder PKC hat ist bisher nicht beschrieben. Eine entsprechende Aktivierung weiterer Signalwege durch NO kann demnach nicht ausgeschlossen werden. NO fungiert nicht wie ein herkömmlicher Neurotransmitter, da keine Speicherung in Vesikeln vorliegt und auch keine exocytotische Abgabe erfolgt (Pottek *et al.*, 1997). Vielmehr erfolgt eine Diffusion von NO aus dem Cytosol der synthetisierenden Zellen, welche dann zu einer Interaktion unterschiedlichster Signalmoleküle führen kann. Neben der bereits beschriebenen Beteiligung an der Synthese von cGMP sind außerdem direkte Effekte von Stickstoffmonoxid auf NMDA-Rezeptoren und das Enzym ADP-Ribosyltransferase bekannt (Brüne und Lapetina, 1989). Das NO-synthetisierende Enzym NO-Synthase (NOS) konnte in verschiedenen Spezies in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen (Ganglienzellen, Amakrinzellen und Bipolarzellen) lokalisiert werden (Reviewartikel: Vincent, 1994). Außerdem konnte an Retinen verschiedener Teleostier der Nachweis erbracht werden, dass NOS ebenfalls in Horizontalzellen vorkommt (Baldridge et al., 1993; Liepe et al., 1994; Ostholm et al., 1994). Untersuchungen am Karpfen deuten auf die exklusive Lokalisation von NOS in den H1-Zellen hin (Weiler und Kewitz, 1993). Konkrete Hinweise einer adaptivbedingten erhöhten Synthese von NO existieren zwar bislang nur in Bezug auf die Lichtadaptation (DeVries und Schwartz, 1989; 1992; Sekaran et al., 2005), allerdings konnten Neal et al. (1998; 2003) nachweisen, dass auch in dunkeladaptierten Retinen (>1 Stunde) eine spontane Restaktivität von NOS und eine daraus resultierende geringe Freisetzung von NO (1,20 nmol/Minute) gegeben ist. Ob diese geringe Konzentration zur Vermittlung der modulatorischen Signale in den Horizontalzellen ausreicht bzw. ob es tatsächlich zur Aktivierung spezifischer Signalkaskaden kommt kann bislang nur spekulativ diskutiert werden. Zur Klärung dieser Frage wäre es denkbar die Auswirkungen verschiedener Kombinationen von Kinase-Inhibitoren in Kombination mit den unterschiedlichen NO-Donoren (sodium nitroprusside, S-nitroso-N-acetylpenicillamine) zu untersuchen.

Wie aus den hier aufgeführten Befunden hervorgeht, stellt die eindeutige Identifizierung der molekularen Wirkmechanismen der Horizontalzellkopplung nach wie vor eine große Herausforderung dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Erkenntnisse gewonnen werden, die einen Beitrag zum grundsätzlichen Verständnis dieser Mechanismen leisten. Ein allumfassendes und abschließendes Bild der molekularen Hintergründe der Modulationsprozesse kann bislang jedoch nicht gegeben werden. Vielmehr wird anhand der, im Laufe der letzten Jahrzehnte erbrachten Studien zur Horizontalzellkopplung und den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen deutlich, dass die Aufrechterhaltung funktionaler Modulationsprozesse auf einem äußerst komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren und Neuromodulatoren beruht.

Im Folgenden werden die Erkenntnisse, welche im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden graphisch dargestellt. Die Abbildung verdeutlicht die Modulation von cpCx53.8 hinsichtlich

der Aktivierung einer PKA- und einer PKC-Signalkaskade und dem daraus resultierenden veränderten Phosphorylierungszustand des Connexins. Die spezifischen Auswirkungen der entsprechend induzierten Phosphorylierung werden hinsichtlich des *clustering-* und des *gating-*Verhaltens der cpCx53.8-enthaltenden Gap Junctions schematisch dargestellt. In Bezug auf die Aktivierung der Signalkaskaden während der Lichtadaptation werden Dopamin und Retinsäure als jeweils aktivierende Signalmoleküle dargestellt. Unter Berücksichtigung, der in der Diskussion aufgeführten Wahrscheinlichkeiten zur Aktivierung der Signalkaskaden während andauernder Dunkelheit werden zusätzlich weitere potentielle Signalmoleküle berücksichtigt.



Abb. 4.1: Schematische Darstellung zur Modulation von cpCx53.8 über einen PKA- und einen PKC-Signalweg

Die Abb. fasst die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit und vorangegangener Studien zusammen. Es sind beide, in dieser Arbeit identifizierten Signalwege (DA-DAR1-cAMP-PKA und at-RA-PKC) angedeutet. Hinsichtlich der Aktivierung der Signalwege werden in Anbetracht der unterschiedlichen Lichtverhältnisse unterschiedliche Signalmoleküle bzw. Neuromodulatoren in Erwägung gezogen. Eine nachgewiesene Interaktion bzw. eine Aktivierung wird durch einen durchgezogenen Pfeil markiert. Mögliche Interaktionen, die nicht nachgewiesen sind oder bisher nur spekulativ in Betracht gezogen wurden sind in der Abb. mit gestrichelten Pfeilen dargestellt. RAR = Retinsäure-Rezeptor, DAR<sub>1</sub> = D1-Typ Dopamin-Rezeptor, G<sub>s</sub> = stimulierendes G-Protein, PLC = Phospholipase C, AC = Adenylatzyklase, PIP<sub>2</sub> = Phosphatidyl-4,5-Biphosphat, IP<sub>3</sub> = Inositol-1,4,5-Triphosphat, DAG = Diacylglycerin, PKA<sub>c</sub> = Katalytische PKA-Untereinheit, PKA<sub>r</sub> = regulatorische PKA-Untereinheit, CRE = *cAMP response element*, CREB = *cAMP response element binding protein*, ER = Endoplasmatisches Reticulum, GA, Golgi-Apparat, P = Phosphorylierung

#### 4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der molekularen Mechanismen zur Modulation von Horizontalzellconnexinen gewonnen werden. In vielerlei Hinsicht tragen diese Befunde zum grundsätzlichen Verständnis des seit Jahrzehnten untersuchten Phänomens der lichtabhängigen Modulation der Horizontalzellkopplung bei. Nichtsdestotrotz verdeutlichen die hier gezeigten Befunde abermals, dass die vollständige Aufklärung der molekularen Hintergründe zur Modulation von Connexinen eine Vielzahl weiterer Studien bedarf. Im folgenden Abschnitt werden in konkretem Bezug zu cpCx53.8 einige der wichtigsten Ansatzpunkte für solche Studien dargelegt.

Wie aus dem Abschnitt 4.4 hervorgeht, sind bislang noch viele Faktoren hinsichtlich der Modulationsvorgänge von Horizontalzellen unter verschiedenen Adaptationszuständen unverstanden bzw. nicht vollständig geklärt. allem in Bezug Vor auf die Modulationsvorgänge bei andauernder Dunkelheit ist eine präzise Zuordnung spezifisch wirkender Signalmoleküle bzw. Signalwege nicht möglich. Um weitere vertiefende Einblicke in diese Vorgänge zu gewinnen könnten am Beispiel von cpCx53.8 und dessen Phosphorylierungszustand die Auswirkungen weiterer Neuromodulatoren (z.B. Adenosin, Melatonin, NMDA) getestet werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wäre es sinnvoll eine stringente Verknüpfung molekularer (bzw. proteinbiochemischer) und physiologischer Methoden beizubehalten, um somit spezifische Auswirkungen auf Proteinebene mit veränderten physiologischen Eigenschaften der Horizontalzellen zu korrelieren. In Anlehnung an die, in dieser Arbeit durchgeführten Versuche könnte durch den Einsatz spezifischer Kinase-Inhibitoren bzw. verschiedener Antagonisten ein Einblick in die Wirkungsweise dieser Modulatoren gewonnen werden. Außerdem wäre es denkbar, die Untersuchungen entsprechende Konzentrationsmessungen dahingehend auszuweiten, verschiedener Signalmoleküle unter unterschiedlichen adaptiven Stadien der Retinen vorzunehmen. Somit ließen sich weitere konkrete Hinweise auf eine erhöhte bzw. erniedrigte Aktivität eines Modulators unter den jeweiligen Lichtbedingungen gewinnen.

Ein weiterer möglicher Ansatz zukünftiger Studien besteht im Hinblick auf die Modulationsvorgänge durch Retinsäure. Zwar konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der intrazellulären Vermittlung Retinsäure-abhängiger Signale gewonnen werden, eine vollständige Aufklärung der beteiligten Signalkaskade kann jedoch bislang nicht gegeben werden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Retinsäure ähnlich wie Dopamin als Neuromodulator die Kopplungseigenschaften von Horizontalzellen über einen veränderten Phosphorylierungszustand der jeweiligen Connexine beeinflusst. Außerdem scheint der Retinsäure-Signalweg unabhängig vom Dopaminvermittelten PKA-Signalweg die Phosphorylierung über eine spezifische PKC-Aktivierung zu steuern. Ob ggf. eine direkte Interaktion von Retinsäure mit der PKC gegeben ist, oder ob ein spezifischer Retinsäure-Rezeptor an der Vermittlung entsprechender Effekte beteiligt ist, kann bislang nicht eindeutig belegt werden (siehe auch Abb. 4.1). Hinsichtlich der Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Neurobiologie (Universität Oldenburg) in Kooperation mit Frau Apl.-Prof. Dr. Joanna Kolny-Olesiak (AG Energie- und Halbleiterforschung, Nanochemie; Universität Oldenburg) geplant. Das Bestreben dieser Kooperation ist es, mittels Retinsäure-gekoppelter Nanopartikel (sog. "*Nanobeads*") Erkenntnisse zur Lokalisation putativer Retinsäure-Bindedomänen in Horizontalzellen zu gewinnen bzw. mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Aktuell werden im Rahmen der Doktorarbeit von Jasmin Segelken (AG Neurobiologie) erste Vorversuche hinsichtlich der Synthese entsprechender Nanopartikel bzw. deren Biokompatibilität unternommen.

Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Studien ist die Identifikation potentieller Interaktionspartner von Horizontalzellconnexinen (im Speziellen cpCx53.8). Derartige Studien sind unerlässlich im Hinblick auf ein ganzheitliches Verständnis des Lebenszyklus von Connexinen und der physiologischen Eigenschaften entsprechender Gap Junctions. Eine verlässliche und etablierte Methode zur Identifikation interagierender Proteine stellt die Immunpräzipitation (bzw. Co-Immunpräzipitation) dar. Aktuell werden in der Arbeitsgruppe Neurobiologie entsprechende Versuche unter Verwendung des spezifischen anti-Cx53.8 Antikörpers durchgeführt. Als ein vorläufiges Ziel gilt es, die Methode grundsätzlich zu etablieren und eine erfolgreiche Präzipitation von cpCx53.8 aus Totalhomogenaten bzw. Membranfraktionen von Karpfenretinen zu gewährleisten. Zur Überprüfung der Immunpräzipitation wird vorerst standardmäßig eine Analyse über das Western Blot Verfahren und entsprechender Immunonachweise angewandt. Hierbei können durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen potentielle Interaktionspartner (z.B. Zonula ocludens-1 (ZO-1), Caldendrin, Cx55.5 etc.) erste Hinweise hinsichtlich der Co-Präzipitation gewonnen werden. Im weiteren Verlauf ist es vorgesehen eine exakte Bestimmung copräzipitierter Proteine mittels MALDI-TOF Analysen (MALDI = Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation;  $TOF = time \ of \ flight$ ) bzw. massenspektrometrischer Verfahren zu ermitteln. Diese Analysen werden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Allgemeine und Molekulare Mikrobiologie von Prof. Dr. Ralf Rabus (ICBM; Institut für Chemie und Biologie des Meeres; Universität Oldenburg) und der Arbeitsgruppe Neurobiologie durchgeführt. Da diese Analyseverfahren eine präzise Bestimmung interagierender Proteine bzw. Moleküle zulassen, ist es denkbar die Untersuchungen hinsichtlich potentieller Interaktionspartner anderer retinaler Connexine (wie z.B. Cx36) auszuweiten.

### 5. Zusammenfassung

Die Anpassungsfähigkeit des visuellen Systems an sich ändernde Umgebungshelligkeiten wird hauptsächlich durch neuronale Adaptationsmechanismen innerhalb der Retina gewährleistet. Die durch elektrische Kopplung resultierenden Horizontalzellnetzwerke stellen eine der ersten Ebene dar, auf der über zelluläre und molekulare Prozesse ein erheblicher Beitrag zur Lichtadaptationsfähigkeit der Retina geleistet wird (Bloomfield et al., 1995; Joselevitch und Kamermans, 2009). Hierbei spielen vor allem die feedback-Signale von Horizontalzellen zu den Photorezeptoren eine entscheidende Rolle, da über diese die Signalstärke der von den Photorezeptoren über die Bipolar- und Ganglienzellen gesendeten Signale erheblich beeinflusst werden kann. Anhand vorangegangener Studien konnte gezeigt werden, dass die Formierung bzw. die Ausbreitung dieser Netzwerke einer lichtabhängigen Modulierbarkeit unterliegt (Xin und Bloomfield, 1999; Bloomfield und Völgyi, 2004). Unter gemäßigten Lichtintensitäten ist der Grad der Kopplung maximal, während er bei andauernder Dunkelheit und bei hohen Lichtintensitäten stark reduziert ist. Man bezeichnet dies als triphasische Adaptation der Horizontalzellkopplung (Baldridge, 2001). Des Weiteren existieren Hinweise darauf, dass an der Vermittlung adaptiv-bedingter Modulationsvorgänge in Horizontalzellen verschiedene Neuromodulatoren, wie Dopamin (Mangel and Dowling, 1987; Knapp and Dowling, 1987; Yang et al., 1988; Perlmann and Ammermüller, 1994), Stickstoffmonoxid (Pottek et al., 1997; Baldridge et al., 1998; Daniels and Baldridge 2011) und Retinsäure (Weiler et al., 1998; Weiler et al., 2000; Zhang and McMahon, 2001) beteiligt sind. Bislang sind die Signaltransduktionskaskaden, welche durch diese Neuromodulatoren ausgelöst werden jedoch nur unzureichend aufgeklärt.

Innerhalb der Karpfenretina existieren vier Typen von Horizontalzellen (H1-H4), welche jeweils homolog über Gap Junctions gekoppelt sind (Weiler, 1978). Die Typen H1-H3 repräsentieren die Zapfen-assoziierten Horizontalzellen, während die H4 Horizontalzelle mit den Stäbchen assoziiert ist. Analog zu bereits identifizierten Horizontalzellconnexinen der Zebrafischretina (drCx52.6, drCx55.5, drCx52.9) konnten im Rahmen dieser Arbeit vier homologe Connexine in den Horizontalzellen des Karpfens beschrieben werden (cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8, cpCx55.5). Mit Hilfe eines Multi-Methoden-Ansatzes, welcher in-situ-Blot Hybridisierungen, Western Analysen, immunhistologische Analysen an Retinaquerschnitten und dissoziierten retinalen Zellen und Einzelzell-PCR Analysen beinhaltete, war es möglich ein umfassendes Bild der differentiellen Expression dieser vier Connexine innerhalb der verschiedenen Horizontalzelltypen zu erlangen. Nach derzeitigem Kenntnisstand werden die Connexine cpCx52.6, cpCx53.8 und cpCx55.5 in allen vier Horizontalzelltypen exprimiert, während cpCx49.5 ausschließlich in H1, H2 und H4 Horizontalzellen exprimiert wird. Während eine grundsätzliche Beteiligung aller Connexine an der Bildung dendro-dendritischer Gap Junctions zwischen den jeweiligen Zelltypen wahrscheinlich ist, ist davon auszugehen, dass die Bildung axo-axonaler Gap Junctions zwischen den Axon-tragenden Horizontalzellen (H1-H3) ausschließlich durch cpCx53.8 sowie cpCx55.5 gewährleistet wird. Die Expression vieler Connexine innerhalb eines Zelltyps deutet außerdem auf die Bildung heteromer/heterotypischer Gap Junctions hin.

Eingehende Analysen zu den molekularen Mechanismen, welche zur Modulation der Horizontalzellkopplung und ihrer Gap Junctions führen, wurden im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch am Connexin cpCx53.8 durchgeführt. In Bezug zu früheren Studien (Yang et al., 1988; Baldridge et al., 1995) und in Anlehnung an die Modelvorstellung der triphasischen Organisation der Horizontalzellkopplung wurden drei unterschiedliche Adaptationszustände untersucht, welche durch die Inkubation unter skotopischen Verhältnissen (dauerhaft dunkeladaptiert (3 Std.); ca. 0,002 candela/m<sup>2</sup> [cd/m<sup>2</sup>]), mesopischen Verhältnissen (dunkeladaptiert (45 Min); ca. 30 cd/m<sup>2</sup>) und photopischen Verhältnissen (lichtadaptiert (45 Min); ca. 1.000 cd/m<sup>2</sup>) erzeugt wurden. Anhand von Western Blot Analysen wurde gezeigt, dass cpCx53.8 sowohl nach dauerhafter Dunkeladaptation als auch nach Lichtadaptation einen gesteigerten Phosphorylierungsgrad im Vergleich zur Dunkeladaptation aufweist. Außerdem zeigte sich, dass auch die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin oder Retinsäure zu einer erhöhten Phosphorylierung von cpCx53.8 führte. Die Dopaminvermittelte Phosphorylierung wurde durch die Präinkubation mit dem D1-Dopamin-Rezeptor Antagonisten SCH23390 sowie mit dem PKA-Inhibitor H89 gehemmt. Die Retinsäurevermittelte Phosphorylierung wurde durch die Präinkubation mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin blockiert.

Diese proteinbiochemischen Befunde waren übereinstimmend mit den Effekten der Neuromodulatoren und Inhibitoren auf die Kopplungseigenschaften der Horizontalzellen. Die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin oder Retinsäure führte sowohl zu einer Reduzierung der rezeptiven Feldgröße als auch der Gap Junction-Kopplung. Die physiologischen Effekte von Dopamin und Retinsäure, welche vergleichbar sind mit denen der Lichtadaptation bzw. der dauerhaften Dunkeladaptation konnten ebenfalls durch die Präinkubation mit H89, respektive Staurosporin gehemmt werden.

Die gesteigerte Phosphorylierung von cpCx53.8 sowie die Entkopplung der Zellen wurden außerdem durch ein vermehrtes Auftreten cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques innerhalb der OPL und distalen INL der Karpfenretina begleitet. Frühere Studien belegen einen direkten Zusammenhang zwischen der verminderten Kopplung von Horizontalzell-Gap Junctions und der veränderten Dichte der Gap Junction Plaques (Kurz-Isler und Wolburg, 1986; Kurz-Isler *et al.*, 1992). Demnach führt die Entkopplung der Zellen zu einer verminderten Dichte der Gap Junctions, was eine Erklärung für das vermehrte Auftreten der cpCx53.8-immunoreaktiven Plaques darstellt. Zusätzliche Untersuchungen an einem künstlichen Zellsystem (cpCx53.8-transfizierte N2A-Zellen) verdeutlichen außerdem, dass die gesteigerte Phosphorylierung von cpCx53.8 nicht nur die Öffnungs- und Schließeigenschaften der Horizontalzell-Gap Junctions beeinflusst, sondern auch notwendig ist für die Zusammenlagerung von cpCx53.8-enthaltenden Hemikanälen und den Einbau entsprechender Kanäle in die Zellmembranen.

Um zu überprüfen, ob die PKA und PKC tatsächlich an der Vermittlung der adaptivbedingten Modulation beteiligt sind wurden die Effekte von H89 und Staurosporin sowohl an lichtadaptierten als auch an dauerhaft dunkeladaptierten Retinen getestet. Die Befunde verdeutlichen die Beteiligung einer Dopamin-induzierten cAMP-PKA-Signalkaskade sowie einer weiteren, unabhängig von dieser agierenden Retinsäure-PKC-Signalkaskade an der Vermittlung der licht-abhängigen Modulation der Horizontalzellkopplung. Der Einsatz der Inhibitoren bestätigte ebenfalls eine Aktivität von PKA und PKC sowohl während andauernder Dunkelheit als auch während der Lichtadaptation. Aufgrund der nachgewiesenen Licht-korrelierten erhöhten Synthese von Dopamin und Retinsäure kommen beide Neuromodulatoren als putative Signalmoleküle während der Lichtadaptation in Frage (Mangel und Dowling, 1985; 1987; Yang et al., 1988; Weiler et al., 1989; McCaffery und Draeger, 1997; Mey et al., 1997; Weiler et al., 1999). Eine Aktivierung der Kaskaden durch Dopamin bzw. Retinsäure während andauernder Dunkelheit erscheint allerdings unwahrscheinlich. Es kommen eine Vielzahl weiterer modulatorisch aktiver Signalmoleküle zur Vermittlung entsprechender Effekte während andauernder Dunkelheit über die PKA- und die PKC-Signalkaskade in Frage. Zu den wichtigsten dieser Moleküle zählen Adenosin, Melatonin, NMDA und Stickstoffmonoxid.

#### 6. Summary

The ability of the visual system to adapt to different light intensities is provided mostly by distinct neuronal adaptation processes in the retina. The network of gap junction coupled horizontal cells represents one of the first neuronal levels within the retina at which several cellular and molecular processes take place that lead to the adaptation to ambient light levels (Bloomfield et al., 1995; Joselevitch und Kamermans, 2009). One of these processes is the feedback signaling from horizontal cells to photoreceptors by which the strength of the photoreceptor signaling can be modulated. Electrophysiological and tracer-coupling studies have revealed a relationship between the extent of horizontal cell networks and different ambient light levels (Xin and Bloomfield, 1999; Bloomfield and Volgyi, 2004). The degree of horizontal cell coupling as a function of ambient illumination condition is thought to be of triphasic order, showing strong coupling under dim light conditions and decreased coupling in darkness and under bright light (reviewed by Baldridge, 2001). Furthermore there is evidence that light-dependent modulation of horizontal cell coupling is mediated by neuromodulators such as dopamine (Mangel and Dowling, 1987; Knapp and Dowling, 1987; Yang *et al.*, 1988; Perlmann and Ammermüller, 1994), nitric oxide (Pottek et al., 1997; Baldridge et al., 1998; Daniels and Baldridge 2011) and retinoic acid (Weiler et al., 1998; Weiler et al., 2000; Zhang and McMahon, 2001). The signal transduction cascades mediating the effects of the neuromodulators have been elucidated only partially.

Within the carp retina four distinct types of horizontal cells were characterized by morphological and physiological differences and termed H1-H4 (Weiler, 1978). H1, H2, and H3 type cells represent cone horizontal cells which possess an axon, whereas the rod connecting H4 horizontal cell is axonless. Furthermore, four closely related horizontal cell connexins, identified by their molecular weight and termed cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 and cpCx55.5, have been characterized in the carp retina. Their subcellular distribution was analyzed using multiple methods, including RACE-RT-PCR, molecular cloning, *in situ* hybridization, immunohistochemistry, immunoelectron microscopy, western blot analysis and single cell RT-PCR. Data obtained from single cell experiments revealed expression of cpCx52.6, cpCx53.8 and cpCx55.5 in all four horizontal cell subtypes, whereas cpCx49.5 expression appeared restricted to H1, H2 and H4 cells. Furthermore, the data indicate the presence of all four connexins in dendro-dendritic gap junctions, whereas axo-axonal gap junctions appeared to be predominantly consisting of cpCx53.8 and cpCx55.5.

Detailed analyses of the molecular mechanisms leading to modulation of horizontal cell coupling and their gap junctions have been accomplished exemplarily for cpCx53.8. Refering to the model of triphasic adaptation of horizontal cell coupling, the effect of three different light adaptational states on the phosphorylation and distribution of cpCx53.8 were tested. According to previous studies (Yang et al., 1988; Baldridge et al., 1995) the terms prolonged dark-adapted, light-sensitized and light-adapted were used for the appropriate adaptational state of the retina. For light adaptation the retinas were incubated under bright light (photopic range; approx. 1,000 cd/m<sup>2</sup>) for 45 min. For control conditions (light-sensitized) the retinas were subjected to dim red light (mesopic range; approx. 30 cd/ $m^2$ ) for 45 min. Prolonged darkness adaptation was carried out for 3 hours in complete darkness (scotopic range; approx.  $0.002 \text{ cd/m}^2$ ). Western blot analyses showed that cpCx53.8 was phosphorylated when the retina was light-adapted, prolonged dark-adapted or when the light-sensitized retina was incubated with dopamine or retinoic acid. The dopamine-induced phosphorylation was blocked by a D<sub>1</sub>-dopamine receptor antagonist SCH23390 and was also inhibited by the protein kinase A (PKA) inhibitor, H89. The retinoic acid-induced phosphorylation of cpCx53.8 was inhibited by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinase C (PKC).

These biochemical findings were consistent with the effects of the same neuromodulators on gap junction coupling of the horizontal cells, as shown by either intracellular recording or injection of neurobiotin, a gap junction permeable tracer. Incubation of light-sensitized retinas with dopamine or retinoic acid decreased both the receptive-field size and the extent of tracer coupling. The physiological effects of dopamine and retinoic acid, which were comparable to those induced by light adaptation or prolonged dark adaptation, were inhibited by pre-incubation of light-sensitized retinas with the specific PK inhibitors (H89 and staurosporine), respectively.

The increase in cpCx53.8 phosphorylation and the uncoupling of the cells were accompanied by an increase in cpCx53.8-immunoreactive plaques within the OPL and distal INL of the retina. Refereing to previous studies (Kurz-Isler und Wolburg, 1986; Kurz-Isler *et al.*, 1992) it is obvious that uncoupling of the cells leads to changes in the density of the gap junction plaques. Additional studies, using an artificial cell system of cpCx53.8-transfected N2A-cells showed that phosphorylation of cpCx53.8 not only affect the gating properties of the appropriate gap junctions, but also affects the expression of cpCx53.8 and is necessary for the assembly and the integration of cpCx53.8-containing gap junction into the plasma membrane. In order to confirm the involvement of PKA- and PKC-dependent mediation of light adaptation and prolonged darkness the combined and selective effects of H89 and staurosporine on cpCx53.8 phosphorylation, cpCx53.8 immunoreactivity, horizontal cell receptive-field size and the degree of gap junction coupling were examined. The data presented here indicate that adaptation-dependent modulation of horizontal cell coupling, cpCx53.8 phosphorylation and cpCx53.8-immunoreactivity is due to added effects of PKA and PKC during both light adaptation and prolonged darkness. However, inhibition of both did not produce the same phosphorylation pattern, receptive-field size or dye coupling as under control conditions of light-sensitized retinas. The residual effects might be indicative for possible action of other modulatory systems or other neuromodulators of horizontal cells, which are independent of PKA and PKC activity.

The data provide evidence for a dopamine-triggered PKA pathway and a retinoic acidtriggered PKC pathway. However, due to the light-correlated synthesis of dopamine and retinoic acid (Mangel and Dowling, 1985; 1987; Yang *et al.*, 1988; Weiler *et al.*, 1989; McCaffery and Draeger, 1997; Mey *et al.*, 1997; Weiler *et al.*, 1999) their distinct attribution as signal molecules during prolonged periods of darkness is unlikely. Therefore, actions of other neuromodulators, such as melatonin, adenosin or NMDA are conceivable for an activation of either the PKA- and/or the PKC-triggered pathway.

## 7. Literaturverzeichnis

- **Ahmad S**, Martin PEM, Evans WH. 2001. Assembly of gap junction hemichannels. Effects of calmodulin inhibitors and deletion of the cytoplasmatic tail on connexin oligomerisation. Eur J Biochem. 268: 4544-4552
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1995. Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, VCH, Weinheim
- Ayoub GS, Lam DM. 1985. The content and release of endogenous GABA in isolated horizontal cells of the goldfish retina. Vision Res. 25(9): 1187-1193
- **Baldridge WH.** 2001. Triphasic adaptation of teleost horizontal cells. Progress in Brain Research. 131: 437-449
- **Baldridge WH**, Ball AK. 1991. Background illumination reduces horizontal cell receptive field size in both normal and 6-hydroxydopamine-lesioned goldfish retinas. Vis Neurosci. 7: 441-450.
- **Baldridge WH**, Fischer AJ. 2001. Nitric oxide donor stimulated increase of cyclic GMP in the goldfish retina. Visual Neuroscience. 18: 849-856
- **Baldridge WH**, Jamieson MS, Ball AK. 1993. Role of nitric oxide in the control of horizontal cell receptive-field size. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 34: 1382
- **Baldridge WH**, Vaney DI, Weiler R. 1998. The modulation of intracellular coupling in the retina. Cell Dev Biol. 9: 311-318.
- **Baldridge WH,** Weiler R, Dowling JE. 1995. Dark-suppression and light-sensitization of horizontal cell responses in the hybrid bass retina. Vis Neurosci. 12(4): 611-620
- **Bartlett NR.** 1965. Dark and light adaptation. Vision and visual perception. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Baylor D. 1996. How photons start vision. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 560-565
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2012. Biochemistry, 7th ed. New York: W.H. Freeman.
- Berthoud VM, Minogue PJ, Laing JG, Beyer EC. 2004. Pathways for degradation of connexins and gap junctions. Cardiovasc Res. 62: 256-267.
- **Berthoud VM**, Beyer EC, Kurata WE, Lauz AF, Lampe PD. 1997. The gap-junction protein connexin 56 is phosphorylated in the intracellular loop and the carboxy-terminal region. Eur. J. Biochem. 244: 89-97
- **Berthoud VM**, Westphale EM, Grigoryeva A, Beyer EC. 2000. PKC Isoenzymes in the Chicken Lens and TPA-Induced Effects on Intercellular Communication. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 41(3): 850-858
- **Besharse JC**, Iuvone PM. 1983. Circadian clock in Xenopus eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. Nature. 305(5930): 133-135
- **Bevans CG**, Harris AL. 1999. Direct high affinity modulation of connexin channel activity by cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 274:3720-3725
- **Beyer EC**, Paul DL, Goodenough, DA. 1987. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol*. 105: 2621-2629.
- **Bito H**, Deisseroth K, Tsien RW. 1996. CREB Phosphorylation and Dephosphorylation: A Ca<sup>2+</sup>- and Stimulus Duration–Dependent Switch for Hippocampal Gene Expression. Cell 87: 1203–1214
- **Blazynski C.** 1990. Discrete Distributions of Adenosine Receptors in Mammalian Retina Journal of Neurochemistry. 14: 648-655
- **Bloomfield SA**, Völgyi B. 2004. Function and plasticity of homologous coupling between AII amacrine cells. Vision Res. 44(28): 3297-3306
- **Bloomfield SA**, Völgyi B. 2009. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nature*. 10: 495-506.

- **Bloomfield SA,** Xin D, Persky SE. 1995. A comparison of receptive field and tracer coupling size of horizontal cells in the rabbit retina. Vis Neuroscience. 12(5): 985-999
- **Bouzinba-Segard H**, Fan XT, Perderiset M, Castagna M. 1994. Synergy between phorbol esters and retinoic acid in inducing protein kinase C activation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 204: 112-119
- **Boycott BB**, Hopkins JM. 1993. Cone synapses of a flat diffuse cone bipolar cell in the primate retina. J Neurocytol. 22(9): 765-778
- **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254.
- **Brüne B**, Lapetina EG. 1989. Activation of a Cytosolic ADPribosyltransferase by Nitric Oxide-generating Agents. The Journal of Biological Chemistry 264(15): 8455-8458
- Bruzzone R, White TW, Goodenough DA. 1996. The cellular internet: On-line with connexins. BioEssays. 18 No. 9: 709-718
- **Bruzzone R**, White TH, Paul DL. 1996. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. Eur J Biochem. 238: 1-27
- **Burkhardt DA.** 1993. Synaptic feedback, depolarization, and color opponency in cone photoreceptors. Vis Neurosci. 10(6): 981-989
- **Cahill GM**, Besharse JC. 1992. Light-sensitive melatonin synthesis by Xenopus photoreceptors after destruction of the inner retina. Vis Neurosci. 8(5): 487-490
- Cajal R. 1893. La rétine des vertébrés. Cellule 9: 121-255
- Cao F, Eckert R, Elfgang C, Nitsche JM, Snyder SA, Hulser DF, Willecke K, Nicholson BJ. 1998. A quantitative analysis of connexin- specific permeability differences of gap junctions expressed in HeLa transfectants and Xenopus oocytes. J Cell Sci. 111: 31-43
- Cheng HL, Louis CF. 2001. Functional Effects of Casein Kinase I-Catalyzed Phosphorylation on Lens Cell-to-Cell Coupling. J. Membrane Biol. 181: 21–30
- **Church J**, Baimbridge KG. 1991. Exposure to high-pH medium increases the conductance and extent of dye coupling between rat hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. J Neurosci. 11: 3289-3295.
- **Connaughton VP**, Graham D, Nelson R. 2004. Identification and morphological classification of horizontal, bipolar, and amacrine cells within the zebrafish retina. J Comp Neurol. 477(4): 371-85
- **Connaughton VP**, Nelson R. 2000. Axonal stratification patterns and glutamate-gated conductance mechanisms in zebrafish retinal bipolar cells. J Physiol. 524(1): 135-146
- **Connaughton VP**, Nelson R. 2010. Spectral responses in zebrafish horizontal cells include a tetraphasic response and a novel UV-dominated triphasic response. J Neurophysiol. 104(5): 2407-2422
- Cook JE, Becker DL. 1995. Gap junctions in the vertebrate retina. Microscopical research techniques. 31 (5): 408-419
- **Daniels BA**, Baldridge WH. 2011. The light-induced reduction of horizontal cell receptive field size in the goldfish retina involves nitric oxide. Visual Neuroscience 28: 137–144
- **Dacey D**, Packer OS, Diller L, Brainard D, Peterson B, Lee B. 2000. Center surround receptive field structure of cone bipolar cells in primate retina. Vision Research 40 (2000): 1801–1811
- **Delghandi MP,** Johannessen M, Moens U. 2005. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. Cell Signal. 17(11): 1343-1351
- **Dermietzel R**, Kremer M, Paputsoglu G, Stang A, Skerrett IM, Gomes D, Srinivas M, Janssen-Bienhold U, Weiler R, Nicholson BJ, Bruzzone R, Spray DC. 2000. Molecular and functional diversity of neural connexins in the retina. *J Neurosci*. 20: 8331-8343
- **Dermietzel R**, Spray DC. 1993. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? Trends Neuroscience. 16:186-192

- **DeVries SH.** 2001. Exocytosed protons feedback to suppress the Ca2+ current in mammalian cone photoreceptors. Neuron. 32(6): 1107-1117
- **DeVries SH**, Schwartz EA. 1989. Modulation of an electrical synapse between solitary pairs of catfish horizontal cells by dopamine and second messengers. J Physiol (Lond). 414: 351-375
- **DeVries SH**, Schwartz EA 1992. Hemi-Gap-Junction Channels in Solitary Horizontal Cells of the Catfish Retina. Journal of Physiology. 445: 201-230
- **De Vuyst E**, Decrock E, De Bock M, Yamasaki H, Naus CC, Evans WH, Leybaert L. 2007. Connexin Hemichannels and Gap Junction Channels Are Differentially Influenced by Lipopolysaccharide and Basic Fibroblast Growth Factor. Molecular Biology of the Cell. 18: 34-46
- **Dirks P**, Tieding S, Schneider I, Mey J, Weiler R. 2004. Characterization of Retinoic Acid Neuromodulation in the Carp Retina. Journal of Neuroscience Research 78: 177–185
- **Djamgoz MB**, Wagner HJ. 1992. Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. Neurochem Int. 20(2): 139-91
- **Dmitriev AV**, Mangel SC. 2000. Rapid Report A circadian clock regulates the pH of the fish retina Journal of Physiology. 522(1): 77-82
- **Dong CJ**, McReynolds JS. 1991. The relationship between light, dopamine release and horizontal cell coupling in the mudpuppy retina. Journal of Physiology 440: 291-309
- **Dowling JE.** 1991. Retinal neuromodulation: the role of dopamine. Vis Neurosci. 7(1-2): 87-97
- **Dowling JE**, Ehinger B. 1978. The interplexiform cell system I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. Proc. R. Soc. London. 201: 7-26
- **Dowling JE**, Werblin FS. 1969. Organization of retina of the mudpuppy, Necturus maculosus. I. Synaptic structure. J Neurophysiol. 32(3): 315-338
- Dräger UC. 2006. Retinoic acid signaling in the functioning brain. Sci STKE. (324): 10
- **Eastman SD**, Chen TH, Falk MM, Mendelson TC, Iovine MK. 2006. Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. Genomics 87 (2): 265-274
- Engh RA, Girod A, Kinzel V, Huber R, Bossemeyer D. 1996. Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity. *J Biol Chem.* 271: 26157-26164.
- **Evans WH**, Vuyst ED, Leybaert L. 2006. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. Biochem. J. 397: 1-14
- **Evans WH**, Martin PEM. 2002. Gap Junctions: Structure and function (Review). Molecular Membrane Biology. 19: 121-136
- **Fahrenfort I**, Klooster J, Sjoerdsma T, Kamermans M. 2005. The involvement of glutamategated channels in negative feedback from horizontal cells to cones. Prog Brain Res. 147: 219-229
- Fahrenfort I, Steijaert M, Sjoerdsma T, Vickers E, Ripps H, van Asselt J, Endeman D, Klooster J, Numan R, ten Eikelder H, von Gersdorff H, Kamermans M. 2009. Hemichannel-Mediated and pH-Based Feedback from Horizontal Cells to Cones in the Vertebrate Retina. Plos One 4(6): 1-21
- Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y. 2001. Adaptation in vertebrate photoreceptors. Physiol Rev. 81(1): 117-151
- Fain GL. 2011. Adaptation of mamalian photoreceptors to background light: Putative role for direct modulation of Phosphodiesterase. Mol. Neurobiol. 44(3): 374-382
- **Famiglietti EV**, Kaneko A, Tachibana M. 1977. Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina. Science. 198(4323): 1267-1269

- **Frail DE**, Manelli AM, Witte DG, Lin CW, Steffey ME, Mackenzie RG. 1993. Cloning and characterization of a truncated dopamine D1 receptor from goldfish retina: stimulation of cyclic AMP production and calcium mobilization. Mol Pharmacol. 44(6): 1113-1118
- **Friedmann Z**, Hackett SF, Linden J, Campochiaro PA. 1989. Human retinal pigment epithelial cells in culture possess A2-adenosine receptors. Brain Res. 492(1-2): 29-35
- Friedrich MW, Aramuni G, Mank M, Mackinnon JA, Griesbeck O. 2010. Imaging CREB activation in living cells. J Biol Chem. 285(30): 23285-23295
- **Gerido DA**, DeRosa AM, Richard G, White TW. 2007. Aberrant hemichannel properties of Cx26 mutations causing skin disease and deafness. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 293(1): 337-345
- Gilula NB. 1987. Topology of gap junction protein and channel function. Ciba foundation symposium. 125: 128-139
- **Goodenough DA**, Revel JP. 1970. A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. J Cell Biol. 45(2): 272-290
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. 1996. Connexins, Connexons and intercellular communication. Annual Reviews Biochemistry. 65: 475-502
- **Goodenough DA**, Paul DL. 2003. Beyond the gap: Functions of unpaired connexon channels. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 4(4): 285-294
- **Haefliger JA**, Bruzzone R, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Paul DL. 1992. Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. J. Biol. Cem. 267(3): 2057-2064
- **Hallett PE.** 1969. The variations in visual threshold measurement. Journal of Physiol. 202(2): 403–419
- **Harsanyi K**, Mangel SC. 1992. Activation of a D2 receptor increases electrical coupling between retinal horizontal cells by inhibiting dopamine release. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9220-9224
- Harsanyi K, Wang Y, Mangel SC. 1996. Activation of NMDA receptors produces dopaminemediated changes in fish retinal horizontal cell light responses. J Neurophysiol. 75(2): 629-47
- **Hermann S.** 2009. (Diplomarbeit) Modulation der Phosphorylierung von cpCx53.8 und Identifikation potentieller Interaktionspartner. Universität Oldenburg, AG Neurobiologie
- **Hilgen G.** 2007. (Diplomarbeit) Charakterisierung und Lokalisation von Connexin 57 ähnlichen Proteinen in der Vertebratenretina. Universität Oldenburg, AG Neurobiologie
- **Hirasawa H**, Kaneko A. 2003. pH Changes in the Invaginating Synaptic Cleft Mediate Feedback from Horizontal Cells to Cone Photoreceptors by Modulating Ca Channels. The Journal of General Physiology. 122: 657-671
- **Hirasawa H,** Yamada M, Kaneko A. 2012. Acidification of the synaptic cleft of cone photoreceptor terminal controls the amount of transmitter release, thereby forming the receptive field surround in the vertebrate retina. J Physiol Sci. 62(5): 359-375
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büssow H, Ott T, Weiler R, Willecke K. 2004. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. Eur. J. Neurosci 19: 2633-2640
- **Hoyer N.** 2011. (Masterarbeit) Einfluss von Dopamin auf die Modulation von cpCx53.8 in Horizontalzellen der Karpfenretina. Universität Oldenburg, AG Neurobiologie
- **Huang RY**, Laing JG, Kanter EM, Berthoud VM, Bao M, Rohrs HW, Townsend RR, Yamada KA. 2011. Identification of CaMKII phosphorylation sites in Connexin43 by high-resolution mass spectrometry. J. Proteome Res. 10(3): 1098-1109
- Huang H, Wang Z, Weng SJ, Sun XH, Yang XL. 2013. Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. Prog Retin Eye Res. 32: 64-87
- **Huntley GW**, Gil O, Bozdagi O. 2002. The Cadherin Family of Cell Adhesion Molecules: Multiple Roles in Synaptic Plasticity. The Neuroscientist. 8(3): 221-233

- Hyatt GA, Schmitt EA, Fadool JM, Dowling JE. 1993. Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13298–13303
- **Idres N**, Marill J, Flexor MA, Chabot GG. 2002. Activation of retinoic acid receptordependent transcription by all-*trans*-retinoic acid metabolites and isomers. J. Biol. Chem. 277: 31491-31498
- Ishida AT, Stell WK, Lightfoot DO. 1980. Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina. J Comp Neurol. 191(3): 315-335
- Jackman SL, Babai N, Chambers JJ, Thoreson WB, Kramer RH. 2011. A positive feedback synapse from retinal horizontal cells to cone photoreceptors. PloS Biology. 9(5): 1-15
- Janssen-Bienhold U, Buschmann-Gebhardt B, Weiler R. 1995. Phorbol ester binding sites in the fish retina: correlation with stimulation of endogenous phosphorylation and protein kinase C activation. J Neurochem. 65: 744-753
- Jansen-Bienhold U, Dirks P, Ommen G, Hilgen G, Weiler R. 2007. Connexins expressed in horizontal cells of the fish retina. Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2007
- Janssen-Bienhold U, Nagel H, Weiler R. 1993. In vitro phosphorylation in isolated horizontal cells of the fish retina: effects of the state of light adaptation. European Journal of Neuroscience. 5(6):584-593
- Janssen-Bienhold U, Trümpler J, Hilgen G, Schultz K, Perez de Sevilla Müller L, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R. 2009. Connexin57 is expressed in dendrodendritic and axo-axonal gap junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. The Journal of Comparative Neurology. 513:363-374
- John K. 2011. (Masterarbeit) Einfluss von Retinsäure und Phorbolester auf die Phosphorylierung von cpCx53.8 und mmCx57 in Horizontalzellen der Vertebratenretina. Universität Oldenburg, AG Neurobiologie
- Jordan K, Solan J L, Dominguez M, Sia M, Hand A, Lampe PD, Laird DW. 1999. Trafficking, Assembly, and Function of a Connexin43-Green Fluorescent Protein Chimera in Live Mammalian Cells. Mol. Biol. Cell. 10: 2033-2050
- **Joselevitch C**, Kamermans M. 2009. Retinal parallel pathways: seeing with our inner fish. Vision Res. 49(9): 943-959
- **Kamermans M**, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R. 2001. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. Science. 292: 1178-1180
- **Kamermans M**, Spekreijse H. 1999. The feedback pathway from horizontal cells to cones A mini review with a look ahead. Vision Research. 39: 2449-2468
- Kamermans M, Van Dijk BW, Spekreijse H. 1990. Interaction between the soma and the axon terminal of horizontal cells in carp retina. Vision Res. 30(7): 1011-1016
- Kamermans M, Vroman R, Klaassen LJ, Howlett MHC, Cenedese V, Klooster J, Sjoerdsma T. 2014. Poster Faseb Konferenz (Retinale Neurobiologie). Extracellular ATP hydrolysis inhibits synaptic transmission by increasing pH buffering in the synaptic cleft.
- **Kandel ER.** 2012. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. Molecular Brain 5: 14
- **Kaneko A.** 1973. Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina. J Physiol. 235(1): 133-153
- **Kaneko A**, Stuart AE. 1984. Coupling between horizontal cells in the carp retinarevealed by diffusion of Lucifer yellow. Neurosci Lett. 47(1): 1-7
- Kaneko A, Tachibana M. 1986. Blocking effects of cobalt and related ions on the gammaaminobutyric acid-induced current in turtle retinal cones.J Physiol. 373: 463-79
- Kang J, Kang N, Lovatt D, Torres A, Zhao Z, Lin J, Nedergaard M. 2008. Connexin43 hemichannels are permeable to ATP. The Journal of Neuroscience 28(18): 4702-4711

- Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A, Kaneko M. 1987. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 142: 436-440
- Klaassen LJ, Sun Z, Steijaert MN, Bolte P, Fahrenfort I, Sjoerdsma T, Klooster J, Claassen Y, Shields CR, Ten Eikelder HMM, Janssen-Bienhold U, Zoidl G, McMahon DG, Kamermans M. 2011. Synaptic Transmission from Horizontal Cells to Cones Is Impaired by Loss of Connexin Hemichannels. Plos Biology. 9(7): 1-17
- Klebe RJ, Ruddle FH. 1969. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. J Cell Biol. 43: 69a.
- **Kleveman J.** 2013. (Masterarbeit) Die Modulation von cpCx53.8 durch Phosphorylierungen unter Lichtbedingungen und die Etablierung eines IP-Protokolls zum Nachweis möglicher Interaktionspartner. Universität Oldenburg, AG Neurobiologie
- **Knapp AG**, Dowling JE. 1987. Dopamine enhances excitatoy amino acid-gated in cultured retinal horizontal cells. Nature. 325: 437-439
- Kolb H. 1970. Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 258(823): 261-283
- Kolb H, Fernandez E, Nelson R. 1995a. Outer Plexiform Layer. The Organization of the Retina and Visual System. Webvision. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- **Kolb H.** 1995b. Simple Anatomy of the Retina. The Organization of the Retina and Visual System. Webvision. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Kothmann WW, Massey SC, O'Brien J. 2009. Dopamine-Stimulated Dephosphorylation of Connexin 36 Mediates AII Amacrine Cell Uncoupling The Journal of Neuroscience. 29(47): 14903–14911
- Kothmann WW, Trexler EB, Whitaker CM, Li W, Massey SC, O'Brien J. 2012. Nonsynaptic NMDA receptors mediate activity-dependent plasticity of gap junctional coupling in the AII amacrine cell network. J Neurosci. 32(20): 6747-6759
- **Kouvama N**, Watanabe K. 1986. Gap-junctional contacts of luminosity-type horizontal cells in the carp retina a novel pathway of signal conduction from the cell body to the axon terminal. Journal of Comparative Neurology. 249: 404-410
- Kumar NM, Gilula NB. 1996. The gap junction communication channel. Cell. 84: 381-388
- **Kurz-Isler G**, Wolburg H. 1986. Gap junctions between horizontal cells in the cyprinid fish alter rapidly their structure during light and dark adaptation. Neurosci Lett. 67: 7-12
- **Kurz-Isler G**, Wolburg H. 1988. Light-dependent dynamics of gap junctions between horizontal cells in the retina of the crucian carp. Cell Tissue Res. 251: 641-649
- **Kurz-Isler G**, Voigt T, Wolburg H. 1992. Modulation of connexon densities in gap junctions of horizontal cell perikarya and axon terminals in fish retina: effects of light/dark cycles, interruption of the optic nerve and application of dopamine. Cell Tissue Res. 268: 267-275
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-685
- Lampe PD, Lau AF. 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. Arch Biochem Biophys. 384 (2): 205-215
- Lampe PD, Lau AF. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. Int J Biochem Cell Biol. 36: 1171-1186
- Lasater EM, Dowling JE. 1985. Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3025-3029
- Laufer M, Salas R. 1993. Modulation of electrical coupling of horizontal cells of the retina. Acta Cient Venez. 44(2): 81-88
- Laufer M, Salas R, Medina R, Drujan B. 1989. Cyclic Adenosine Monophosphate as a Second Messenger in Horizontal Cell Uncoupling in the Teleost Retina. Journal of Neuroscience. 24: 299-310
- **Levin AA**, Sturzenbecker LJ, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A, Grippo JF. 1992. 9-*cis* retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXRα. Nature. 355: 359-361
- Liepe A, Stone C, Koistinaho J, Copenhagen DR. 1994. Nitric Oxide Synthase in Miiller Cells and Neurons of Salamander and Fish Retina The Journal of Neuroscience. 14(12): 7641-7654
- Ligo M, Hara M, Ohtani-Kaneko R, Hirata K, Tabata M, Aida K. 1997. Photic and circadian regulations of melatonin rhythms in fishes. Biol Signals. 6(4-6): 225-32
- Li H, Chuang AZ, O'Brien J. 2009. Photoreceptor coupling is controlled by connexin 35 phosphorylation in zebrafish retina. J Neurosci. 29(48): 15178–15186
- Li H, Zhang Z, Blackburn MR, Wang SW, Ribelayga CP, O'Brien J. 2013. Adenosine and Dopamine Receptors Coregulate Photoreceptor Coupling via Gap Junction Phosphorylation in Mouse Retina. J Neurosci. 33(7): 3135–3150
- Li X, Kamasawa N, Ciolofan C, Olson CO, Lu S, Davidson KGV, Yasumura T, Shigemoto R, Rash JE, Nagy JI. 2008. Connexin45-containing neuronal gap junctions in rodent retina also contain connexin36 in both apposing hemiplaques, forming bihomotypic gap junctions, with scaffolding contributed by zonula occludens-1. Journal of Neuroscience. 28:9769-9789
- Liu S, Taffet S, Stoner L, Delmar M, Valano ML, Jalife J. 1993. A structural basis for the unequal sensitivity of the major cardiac and liver gap junctions to intracellular acidification: the carboxyl tail length. *Biophysics Journal*. 64: 1422-1433
- Londos C, Cooper DMF, Wolff J. 1980. Subclasses of external adenosine receptors Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77(5): 2551-2554
- Lotan R. 1996. Retinoids and their receptors in modulation of differentiation, development, and prevention of head and neck cancers. Anticancer Res. 16(4C): 2415-2419
- Makovski L, Casper DLD, Phillips WC, Goodenough DA. 1977. Gap junction structures II. Analysis of the X-ray diffraction data. The journal of cell biology. 74: 629-645
- Mangel SC. 2001. Circadian clock regulation of neuronal light responses in the vertebrate retina. Prog Brain Res. 131: 505-18
- **Mangel SC**, Baldridge WH, Weiler R, Dowling JE. 1994. Threshold and chromatic sensitivity changes in fish cone horizontal cells following prolonged darkness. Brain Research. 659: 55-61
- Mangel SC, Dowling JE. 1985. Responsiveness and Receptive Field Size of Carp Horizontal Cells Are Reduced by Prolonged Darkness and Dopamine. Sciencemag: 1107-1108
- **Mangel SC**, Dowling JE. 1987. The interplexiform-horizontal cell system of the fish retina: effects of dopamine, light stimulation and time in the dark. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 231(1262): 91-121
- Marc RE, Stell WK, Bok D, Lam DM. 1978. GABA-ergic pathways in the goldfish retina. J Comp Neurol. 182(2): 221-244
- Mariani AP. 1984. The neuronal organization of the outer plexiform layer of the primate retina. Int Rev Cytol. 86: 285-320
- Martin PEM, Steggles J, Wilson C, Ahmad S, Evans WH. 2000. Targeting motifs and functional parameters governing the assembly of connexins into gap junctions. Biochem. Journal. 349: 281-287
- Matsumoto N, Naka KI. 1972. Identification of intracellular responses in the frog retina. Brain Res. 42(1): 59-71

- **Matsumoto H**, Sasaki Y. 1989. Staurosporine, a protein kinase C inhibitor interferes with proliferation of arterial smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 158: 105-109
- Matthews HR, Murphy RLW, Fain GL, Lamb TD. 1988. Photoreceptor light adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration. Nature. 334: 67-69
- McCaffery P, Dräger UC. 1997. A sensitive bioassay for enzymes that synthesize retinoic acid. Brain Research Protocol. 1(3):232-236
- McMahon DG. 1994. Modulation of electrical synaptic transmission in zebrafish retinal horizontal cells. The Journal of Neuroscience. 14(3):1722-1734
- McMahon DG, Knapp AG, Dowling JE. 1989. Horizontal cell gap junctions: single-channel conductance and modulation by dopamine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:7639-7643
- McMahon DG, Mattson MP. 1996. Horizontal cell electrical coupling in the giant danio: synaptic modulation by dopamine and synaptic maintenance by calcium. Brain Research. 718:89-96
- McNaughton PA. 1990. Light response of vertebrate photoreceptors. Physiological Reviews. 70: No3
- **Mellies N.** 2011. (Masterarbeit) Modulation von cpCx53.8 durch den cAMP/PKA-Signalweg. Universität Oldenburg, AG Neurobiologie
- Mey J, McCaffery P, Dräger UC. 1997. Retinoic Acid Synthesis in the Developing Chick Retina. The Journal of Neuroscience. 17(19): 7441–7449
- Montag-Sallaz M, Montag D, Schachner M. 2003. Altered processing of novel information in N-CAM-deficient mice. Neuroreport 14(10): 1343-1346
- Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK. 1990. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. Trends Neuroscience. 13(5): 184-188
- **Murray, AJ**. 2008. Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems. Science Signalling 1(22): re4
- Naka KI, Carraway NRG. 1975. Morphological and functional identifications of catfish retina neurons. J. Neurophysiol. 38: 53-71
- Neal M, Cunningham J, Lever I, Pezet S, Malcangio M. 2003. Mechanism by which Brain-Derived Neurotrophic Factor Increases Dopamine Release from the Rabbit Retina. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 44(2): 791-798
- Neal M, Cunningham J, Matthews K. 1998. Selective Release of Nitric Oxide from Retinal Amacrine and Bipolar Cells. IOVS. 39(5): 850-853
- **Neijssen J**, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, Neefjes J. 2005. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. Nature. 434: 83-88
- **Nestler EJ**, Greengard P. 1984. Neuron-specific phosphoproteins in mammalian brain. Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res. 17: 483-488
- **O`Brien JJ**, Li W, Pan F, Keung J, O`Brien J, Massey SC. 2006. Coupling between A-type horizontal cells is mediated by connexin 50 gap junctions in the rabbit retina. Journal of Neuroscience. 26(45): 11624-11636
- **Obst-Pernberg K**, Redies C. 1999. Cadherins and synaptic specificity. J Neurosci Res. 58(1): 130-138
- **Okazaki K**, Ishikawa T, Inui M, Tada M, Goshima K, Okamoto T, Hidaka H. 1994. KN-62, a specific Ca++/calmodulin-dependent protein kinase inhibitor, reversibly depresses the rate of beating of cultured fetal mouse cardiac myocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 270 (3): 1319-1324
- **Ommen, G.** 2009. (Diplomarbeit) Identifizierung und Lokalisation von Cx52,6 mRNA in der Karpfenretina mittels RACE-PCR und *in situ* Hybridisierung. Universität Oldenburg, AG Neurobiologie
- **Ostholm T**, Holmqvist BI, Alm P, Ekström P. 1994. Nitric oxide synthase in the CNS of the Atlantic salmon. Neurosci Lett. 168(1-2): 233-237

- **Padecken J.** 2013. (Bachelorarbeit) Einfluss von prolonged darkness und prolonged light Adaptationen von Karpfenretinen auf die Phosphorylierung des cpCx53.8. Universität Oldenburg, AG Neurobiologie
- **Pandi-Perumal SR**, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. 2008. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. Prog Neurobiol. 85(3): 335-353
- **Pan F**, Massey SC. 2007. Rod and cone input to horizontal cells in the rabbit retina. Journal of Comparative Neurology. 500(5): 815-831
- Pan F, Mills SL, Massey SC. 2007. Screening of gap junction antagonists on dye coupling in the rabbit retina. Vis. Neuroscience. 24(4): 609-618
- Paul DL. 1986. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. Journal of cell biology. 103 (1): 123-134
- **Payton BW**, Bennett MVL, Pappas GD. 1969. Permeability and structure of junctional membranes at an electrotonic synapse. Science 166 (3913): 1641-1643
- **Perkins G**, Goodenough DA, Sosinsky G. 1997. Three-dimensional structure of the gap junction connexon. Biophysical Journal. 72: 533-544
- **Perlman I**, Ammermüller J. 1994. Receptive-field size of L1 horizontal cells in the turtle retina: effects of dopamine and background light. J. Neurophysiol. 72(6): 2786-2795
- **Perlman I**, Kolb H, Nelson R. 2007. S-Potentials and Horizontal Cells. Webvision: The organization of the retina and visual system.
- **Phillis JW**, Walter GA, Simpson RE. 1991. Brain adenosine and transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex: effects of the adenosine deaminase inhibitor deoxycoformycin. Journal of Neurochem. 56(2): 644-650
- **Phillis JW**, Wu PH. 1983. Roles of adenosine and adenine nucleotides in the central nervous system. Physiology and Pharmacology of Adenosine Derivatives: 219-236
- **Piccolino M**, Neyton J, Gerschenfeld HM. 1984. Decrease of gap junction permeability induced by dopamine and cyclic adenosine 3`:5`-monophosphate in horizontal cells of turtle retina. The Journal of Neuroscience. 4: 2477-2488
- **Pottek M**, Hoppenstedt W, Janssen-Bienhold U, Schultz K, Perlman I, Weiler R. 2003. Contribution of connexin26 to electrical feedback inhibition in the turtle retina. J Comp Neurol. 466(4): 468-477
- **Pottek M**, Schultz K, Weiler R. 1997. Effects of nitric oxide on the horizontal cell network and dopamine release in the carp retina. Vision Res. 37(9): 1091-1102
- **Pottek M**, Weiler R. 2000. Light-adaptive effects of retinoic acid on receptive field properties of retinal horizontal cells. European Journal of Neuroscience. 12: 437-445
- Radominska-Pandya A, Chen G, Czernik PJ, Little JM, Samokyszyn VM, Carter CA, Nowak G. 2000. Direct interaction of all-*trans*-retinoic acid with protein kinase C (PKC). J. Biol. Chem. 275: 22324-22330
- **Rapley R,** Manning DL. 1998. Methods in molecular biology <sup>TM</sup>: RNA Isolation and Characterization Protocols. Hum Press Inc: 86
- **Reese BE**, Galli-Resta L. 2002. The role of tangential dispersion in retinal mosaic formation. Prog Retin Eye Res. 21(2): 153-168
- **Reese BE**, Raven MA, Stagg SB. 2005. Afferents and homotypic neighbors regulate horizontal cell morphology, connectivity, and retinal coverage. Journal of Neuroscience. 25:2167-2175
- **Revel JP**, Karnovsky MJ. 1967. Hexagonal array of subunits in intracellular junctions of the mouse heart and liver. Communications. C7-C12
- **Rey HL**, Burnside B. 1999. Adenosine Stimulates Cone Photoreceptor Myoid Elongation via an Adenosine A2-Like Receptor. Journal of Neurochemistry. 72: 2345-2355
- **Ribelayga C**, Mangel SC. 2005. A Circadian Clock and Light/Dark Adaptation Differentially Regulate Adenosine in the Mammalian Retina. Journal of Neuroscience. 25(1): 215-222

- **Ribelayga C**, Mangel SC. 2007. Tracer coupling between fish rod horizontal cells: Modulation by light and dopamine but not the retinal circadian clock. Visual Neuroscience. 24: 333–344
- **Ribelayga C**, Wang Y, Mangel SC. 2002. Dopamine mediates circadian clock regulation of rod and cone input to fish retinal horizontal cells. Journal of Physiology. 544.3: 801–816
- **Ribelayga C**, Wang Y, Mangel SC. 2004. A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors. J. Physiol. 554(2): 467-482
- **Rieke F**, Baylor DA. 1996. Molecular origin of continuous dark noise in rod photoreceptors. Biophysical Journal. 71: 2553-2572
- Saito T, Kujiraoka T, Yonaha T. 1983. Connections between photoreceptors and horseradish peroxidase-injected bipolar cells in the carp retina. Vision Research. 23(4): 353-362
- **Sakai Y**, Luo T, McCaffery P, Hamada H, Dräger UC. 2004. CYP26A1 and CYP26C1 cooperate in degrading retinoic acid within the equatorial retina during later eye development. Dev Biol. 276(1): 143-157
- Schorderet M, Nowak JZ. 1990. Retinal Dopamine D 1 and D 2 Receptors: Characterization by Binding or Pharmacological Studies and Physiological Functions. Cellular and Molecular Neurobiology. 10(3): 303-325
- Schwartz EA. 1974. Responses of bipolar cells in the retina of the turtle. J Physiol. 236(1): 211-224
- Schwartz EA. 1978. Calcium-independent release of Gaba from isolated Horizontal cells of the toad retina. J. Physiol. 323: 211-227
- Schwartz EA. 1987. Depolarization without calcium can release gamma-aminobutyric acid from a retinal neuron. Science. 238(4825): 350-355
- Sekaran S, Cunningham J, Neal MJ, Hartell NA, Djamgoz MB. 2005. Nitric oxide release is induced by dopamine during illumination of the carp retina: serial neurochemical control of light adaptation. Eur J Neurosci. 21(8): 2199-2208
- Semple-Rowland S, Madorsky I, Bolch S, Berry J, Smith WC. 2013. Activation of phospholipase C mimics the phase shifting effects of light on melatonin rhythms in retinal photoreceptors. PLoS One. 8(12): 83378
- Sherry DM, Yazulla S. 1993. Goldfish bipolar cells and axon terminal patterns: a Golgi study. J Comp Neurol. 329(2): 188-200
- Shields CR, Klooster J, Claassen Y, Ul-Hussain M, Zoidl G, Dermietzel R, Kamermans M. 2007. Retinal horizontal cell-specific promoter activity and protein expression of zebrafish connexin 52.6 and connexin 55.5. J Comp Neurol. 501(5): 765-779
- Simpson I, Rose B, Loewenstein WR. 1977. Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. Science. 195: 294-296
- Skrzypek J, Werblin F. 1983. Lateral interactions in absence of feedback to cones. J Neurophysiol. 49(4):1007-1016
- Söhl G, Degen J, Teubner B, Willecke K. 1998. The murine gap junction gene connexin 36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. FEBS Letters. 428: 27-31
- Söhl G, Willecke K. 2003. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. Cell Communication Adhes. 10 (4-6): 173-180
- Söhl G, Willecke K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovascular Research 62: 228–232
- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. Nature Reviews Neuroscience. 6 (3): 191-200
- Solan JL, Lampe PD. 2007. Key Connexin43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. Membr Biol. 217(1-3): 35–41
- **Sporn MB**, Roberts AB. 1985. What is a retinoid? Retinoids, Differentiation and Disease. Ciba Foundation Symposium. 113: 1-5

- **Spray DC**, Harris AL, Bennett MV. 1981. Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. Science. 211: 712-715
- Srinivas M, Costa M, Gao Y, Fort A, Fishman GI, Spray DC. 1999. Voltage dependence of macroscopic and unitary currents of gap junction channels formed by mouse connexin50 expressed in rat neuroblastoma cells. J Physiol (Lond). 517:673-689
- Stella SL Jr, Bryson EJ, Cadetti L, Thoreson WB. 2003. Endogenous adenosine reduces glutamatergic output from rods through activation of A2-like adenosine receptors. J Neurophysiol. 90(1): 165-74
- Stella SL Jr, Bryson EJ, Thoreson WB. 2002. A2 adenosine receptors inhibit calcium influx through L-type calcium channels in rod photoreceptors of the salamander retina. J Neurophysiol. 87(1): 351-60
- **Stell WK.** 1967. The Structure and Relationships of Horizontal Cells and Photoreceptorbipolar Synaptic Complexes in Goldfish Retina. American Journal of Anatomy. 121: 401-424
- **Stell WK**, Lightfoot DO. 1975. Color-specific Interconnections of Cones and Horizontal Cells in the Retina of the Goldfish. Journal of Comparative Neurology. 159: 473-502
- Stell WK, Lightfoot DO, Wheeler TG. 1975. Goldfish Retina: Functional Polarization of Cone Horizontal Cell Dendrites and Synapses. Science. 190: 989-990
- **Studholme KM**, Yazulla S. 1988. Localization of GABA and glycine in goldfish retina by electron microscopic postembedding immunocytochemistry: improved visualization of synaptic structures with LR white resin. J of Neurocytology. 17(6): 859-870
- **Suzuki H**, Pinto LH. 1986. Response properties of horizontal cells in the isolated retina of wild-type and pearl mutant mice. Journal of Neuroscience 6(4): 1122-1128
- Suzuki SC, Takeichi M. 2008. Cadherins in neuronal morphogenesis and function. Dev Growth Differ. 1: 119-130
- **Takens-Kwak BR**, Jongsma HJ. 1992. Cardiac gap junctions: three distinct single channel conductances and their modulation by phosphorylating treatments. Pflugers Arch. 422: 198-200
- **Tamaoki T**, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca++dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun. 135: 397-402
- **Tamura K**, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28(10): 2731-2739
- **Tanabe K**, Takahashi Y, Sato Y, Kawakami K, Takeichi M, Nakagawa S. 2006. Cadherin is required for dendritic morphogenesis and synaptic terminal organization of retinal horizontal cells. Development. 133:4085-4096
- **Tanramluk D**, Schreyer A, Pitt WR, Blundell TL. 2009. On the origins of enzyme inhibitor selectivity and promiscuity: a case study of protein kinase binding to staurosporine. Chem. Biol. Drug Des. 74: 16-24
- **Tate BF**, Grippo JF. 1995. Mutagenesis of the ligand binding domain of the human retinoic acid receptor α identifies critical residues for 9-*cis*-retinoic acid binding. J. Biol. Chem. 270: 20258-20263
- **Teranishi T**, Negishi K, Kato S. 1983. Dopamine modulates S-potential amplitude and dyecoupling between external horizontal cells in carp retina. Nature. 301(5897): 243-246
- **Teranishi T**, Negishi K, and Kato S. 1984. Regulatory effect of dopamine on spatial properties of horizontal cells in carp retina. The Journal of Neuroscience. 4(5): 1271-1280
- **Thoreson WB**, Babai N, Bartoletti TM. 2008. Feedback from Horizontal Cells to Rod Photoreceptors inVertebrate Retina. The Journal of Neuroscience. 28(22): 5691-5695

- **Thoreson WB**, Burkhardt DA. 1990. Effects of synaptic blocking agents on the depolarizing responses of turtle cones evoked by surround illumination. Vis Neurosci. 5(6): 571-583
- **Thoreson WB**, Mangel SC. 2012. Lateral interactions in the outer retina. Prog Retin Eye Res. 31(5): 407–441
- **Tornqvist K**, Yang XL, Dowling JE. 1988. Modulation of Cone Horizontal Cell Activity in the Teleost Fish Retina. Ill. Effects of Prolonged Darkness and Dopamine on Electrical Coupling Between Horizontal Cells. The Journal of Neuroscience. 8(7): 2279-2288
- **Tosini G**, Menaker M. 1996. The pineal complex and melatonin affect the expression of the daily rhythm of behavioral thermoregulation in the green iguana. Journal of Comparative Physiology. 179(1): 135-142
- **Towbin H**, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9): 4350-4354
- **Ul-Hussain M**, Zoidl G, Klooster J, Kamermans M, Dermietzel R. 2008. IRES-mediated translation of the carboxy-terminal domain of the horizontal cell specific connexin Cx55.5 in vivo and in vitro. BMC Mol Biol. 9: 52
- **Umino O**, Lee Y, Dowling JE. 1991.Effects of light stimuli on the release of dopamine from interplexiform cells in the white perch retina. Vis Neurosci. 7(5): 451-458
- **Unger VM**, Kumar NM, Gilula NB, Yeager M. 1999. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science*. 283:1176-1180
- Unwin N. 1989. The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron*. 3: 665-676
- Valiunas V. 2002. Biophysical Properties of Connexin-45 Gap Junction Hemichannels Studied in Vertebrate Cells. J. Gen. Physiol. 119: 147-164
- Valiunas V, Weingart R. 2000. Electrical properties of gap junction hemichannels identified in transfected HeLa cells. Pflugers Arch. 440(3): 366-379
- **Vaney DI.** 1993. The coupling pattern of axon-bearing horizontal cells in the mammalian retina. Proc. Biol. Science. 252(1334): 93-101
- **Vaney DI.** 1994. Territorial organization of direction-selective ganglion cells in rabbit retina. J Neurosci. 11(1): 6301-6316
- VanLeeuwen M, Fahrenfort I, Sjoerdsma T, Numan R, Kamermans M. 2009. Lateral gain control in the outer retina leads to potentiation of center responses of retinal neurons. J Neurosci. 29(19): 6358-6366
- **Verweij J**, Hornstein EP, Schnapf JL. 2003. Surround Antagonism in Macaque Cone Photoreceptors. The Journal of Neuroscience. 23(32): 10249 –10257
- Verweij J, Kamermans M, Negishi K, Spekreijse H. 1998. GABA sensitivity of spectrally classified horizontal cells in goldfish retina.Vis Neurosci. 15(1): 77-86
- **Verweij J**, Kamermans M. Spekreijse H. 1996. Horizontal cells feed back to cones by shifting the cone calcium-current activation range. Vision Res. 36(24): 3943-3953
- **Vessey JP**, Stratis AK, Daniels BA, Da Silva N, Jonz MG, Lalonde MR, Baldridge WH, Barnes S. 2005. Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse. J Neurosci. 25(16): 4108-4117
- Vincent SR. 1994. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. Prog Neurobiol. 42(1): 129-160
- von Gall C, Stehle JH, Weaver DR 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. Cell Tissue Res. 309(1): 151-162
- Vroman R, Klaassen LJ, Howlett MH, Cenedese V, Klooster J, Sjoerdsma T, Kamermans M. 2014. Extracellular ATP hydrolysis inhibits synaptic transmission by increasing ph buffering in the synaptic cleft. PLoS Biol. 12(5): 1001864. doi: 10.1371
- Wang TM, Holzhausen LC, Kramer RH. 2014. Imaging an optogenetic pH sensor reveals that protons mediate lateral inhibition in the retina. Nature Neuroscience. 17(2): 262-268

- Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL. 1996. Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. EMBO J. 15: 1012-1020
- Wang YU, Harsanyi K, Mangel SC. 1997. Endogenous Activation of Dopamine D2 Receptors Regulates Dopamine Release in the Fish Retina. The American Physiological Society: 439-449
- Wang YU, Mangel SC. 1996. A circadian clock regulates rod and cone input to fish retinal cone horizontal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 4655-4660
- Wässle H, Boycott BB. 1991. Functional architecture of the mammalian retina. Physiological Reviews. 71 No.2: 447-480
- Weiler R. 1978. Horizontal cells of the carp retina: Golgi impregnations and Procion-Yellow injections. Cell Tissue Research. 195: 515-526
- Weiler R, Baldridge WH, Mangel SC, Dowling JE. 1997. Modulation of endogenous dopamine release in the fish retina by light and prolonged darkness. Vis Neurosci. 14(2): 351-356
- Weiler R, He S, Vaney DI. 1999. Retinoic acid modulates gap junctional permeability between horizontal cells of the mammalian retina. European Journal of Neuroscience. 11: 3346-3350
- Weiler R, Kewitz B. 1993. The marker for nitric oxide synthase, NADPH-diaphorase, colocalizes with GABA in horizontal cells and cells of the inner retina in the carp retina. Neurosci Lett. 158(2): 151-154
- Weiler R, Kolbinger W, Kohler K. 1989. Reduced light responsiveness of the cone pathway during prolonged darkness does not result from an increase of dopaminergic activity in the fish retina. Neurosci Lett. 99(1-2): 214-218
- Weiler R, Pottek M, He S, Vaney DI. 2000. Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. Brain Research Reviews. 32: 121-129
- Weiler R, Pottek M, Schultz K, Janssen-Bienhold U. 2001. Retinoic acid, a neuromodulator in the retina. Prog Brain Res. 131: 309-318
- Weiler R, Schultz K, Pottek M, Tieding S, Janssen-Bienhold U. 1998. Retinoic acid has lightadaptive effects on horizontal cells in the retina Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 7139– 7144
- Wiechmann AF, Sherry DM. 2013. Role of melatonin and its receptors in the vertebrate retina. Int Rev Cell Mol Biol. 300: 211-242
- Witkovsky P. 2004. Dopamine and retinal function. Doc Ophthalmol. 108(1): 17-40
- Witkovsky P, Shi XP. 1990. Slow light and dark adaptation of horizontal cells in the Xenopus retina: a role for endogenous dopamine. Vis Neurosci. 5(4): 405-413
- Wong RO, Ghosh A. 2002. Activity-dependent regulation of dendritic growth and patterning. Nat Rev Neurosci. 3(10): 803-812
- Worley PF, Baraban JM, Snyder SH. 1986. Heterogeneous localization of protein kinase C in rat brain: autoradiographic analysis of phorbol ester receptor binding. J Neurosci. 6: 199-207
- **Wu SM.** 1991. Input-output relations of the feedback synapse between horizontal cells and cones in the tiger salamander retina. J Neurophysiol. 65(5): 1197-1206
- **Wu SM.** 1992. Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. Curr Opin Neurobiol. 2(4): 462-468
- Wu SM. 2010. Synaptic Organization of the Vertebrate Retina: General Principles and Species-Specific Variations. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 51(3): 1264-1274
- Xin D, Bloomfield SA. 1999. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. The Journal of Comparative Neurology. 405:75-87

- **Yagi T.** 1986. Interaction between the soma and the axon terminal of retinal horizontal cells in Cyprinus carpio. J Physiol. 375: 121-135
- Yamada E, Ishikawa T. 1965. The fine structure of the horizontal cells in some vertebrate retinae. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 30: 383-392
- Yanagihara N, Tachikawa E, Izumi F, Yasugawa S, Yamamoto H, Miyamoto E. 1991. Staurosporine: an effective inhibitor for Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J. Neurochem. 56: 294-298
- Yang XL, Tornqvist K, Dowling JE. 1988. Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina. I. Effects of prolonged darkness and background illumination on light responsiveness. The Journal of Neuroscience. 8(7):2259-2268
- **Yazulla S.** 1981. GABAergic synapses in the goldfish retina: an autoradiographic study of 3H-muscimol and 3H-GABA binding. Journal of Comparative Neurology. 200(1):83-93
- **Yazulla S**, Brecha N. 1980. Binding and uptake of the GABA analogue, 3H-muscimol, in the retinas of goldfish and chicken. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 19(12): 1415-1426
- **Yazulla S**, Kleinschmidt J. 1982. Dopamine blocks carrier-mediated release of GABA from retinal horizontal cells. Brain Res. 233(1): 211-215
- **Yazulla S**, Kleinschmidt J. 1983. Carrier-mediated release of GABA from retinal horizontal cells. Brain Res. 263(1): 63-75
- **Yazulla S**, Studholme KM. 1997. Light adaptation affects synaptic vesicle density but not the distribution of GABAA receptors in goldfish photoreceptor terminals. Microsc Res Tech. 36(1):43-56
- **Yazulla S**, Studholme KM, Vitorica J, de Blas AL. 1989. Immunocytochemical localization of GABAA receptors in goldfish and chicken retinas. Journal of Comparative Neurology. 280(1): 15-26
- **Young LHY**, Dowling JE. 1990. A Monoclonal Antibody Specific to Muller Cells and Selective Synoptic Sites in the Retina. Investigative Ophthalmology. 31(4): 607-616
- **Zelent A**, Krust A, Petkovich M, Kastner P, Chambon P. 1989. Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. Nature. 339(6227): 714-717
- **Zhang ZP**, Gambone CJ, Gabriel JL, Wolfgang CL, Soprano KJ, Soprano DR. 1998. Arg<sup>278</sup>, but not Lys<sup>229</sup> or Lys<sup>3,</sup>, plays an important role in the binding of retinoic acid by retinoic acid receptor γ. J. Biol. Chem. 273: 34016-34021
- **Zhang DQ**, McMahon DG. 2001. Gating of retinal horizontal cell hemi gap junction channels by voltage, Ca<sup>2+</sup>, and retinoic acid. Molecular Vision. 7:247-252
- **Zimmer DB**, Green CR, Evans WH, Gilula NB. 1987. Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. J Biol Chem. 262(16): 7751-7763.
- **Zoidl G,** Bruzzone R, Weickert S, Kremer M, Zoidl C, Mitropoulou G, Srinivas M, Spray DC, Dermietzel R. 2004. Molecular cloning and functional expression of zfCx52.6: a novel connexin with hemichannel-forming properties expressed in horizontal cells of the zebrafish retina. J Biol Chem 279: 2913-2921.
- **Zoidl G**, Kremer M, Zoidl C, Bunse S, Dermietzel R. 2008. Molecular diversity of connexin and pannexin genes in the retina of the zebrafish Danio rerio. Cell. Commun. Adhes. 15(1): 169-183

# 8. Anhang

|        | Ring-Stimulus        | Punkt-Stimulus | I |             | Ring-Stimulus        | Punkt-Stimulus |
|--------|----------------------|----------------|---|-------------|----------------------|----------------|
| D      | 13,7 ± 1,8           | 12,9 ± 1,4     |   | D           | 14,0 ± 3,0           | 13,4 ± 3,7     |
| L      | 2,1 ± 0,8            | 15,9 ± 1,7     |   | RA          | 3,8 ± 2,5            | 16,8 ± 2,9     |
| p-Wert | 0,000002             | 0,027          |   | p-Wert      | 0,000001             | 0,043          |
| D      | 13,2 ± 1,2           | 12,8 ± 1,7     |   | D/stau      | 13,5 ± 3,4           | 13,9 ± 2,9     |
| DD     | 7,4 ± 1,4            | 15,1 ± 1,9     |   | RA/stau     | 12,2 ± 3,3           | 13,7 ± 2,5     |
| p-Wert | 0,00018              | 0,104          |   | p-Wert      | 0,458                | 0,827          |
|        |                      |                |   |             |                      |                |
|        | <b>Ring-Stimulus</b> | Punkt-Stimulus |   |             | <b>Ring-Stimulus</b> | Punkt-Stimulus |
| D      | 12,4 ± 1,7           | 11,8 ± 1,9     |   | L           | 2,1 ± 0,8            | 15,9 ± 1,67    |
| DA     | 2,8 ± 2,1            | 15,1 ± 1,7     |   | L/stau      | 9,6 ± 2,01           | 12,6 ± 1,95    |
| p-Wert | 0,000001             | 0,003          |   | p-Wert      | 0,000009             | 0,0047         |
| D/H89  | 13,6 ± 3,7           | $14,0 \pm 3,0$ |   | DD          | 6,3 ± 0,92           | 15,1 ± 1,85    |
| DA/H89 | 12,5 ± 2,7           | 12,9 ± 2,6     |   | DD/stau     | 8,5 ± 1,65           | 10,0 ± 1,85    |
| p-Wert | 0,492                | 0,431          |   | p-Wert      | 0,0092               | 0,0002         |
|        |                      |                |   |             |                      |                |
|        | Ring-Stimulus        | Punkt-Stimulus |   |             | Ring-Stimulus        | Punkt-Stimulus |
| L      | 2,1 ± 0,8            | 15,9 ± 0,8     |   | D           | 13,7 ± 3,56          | 12,9 ± 2,73    |
| L/H89  | 6,8 ± 1,68           | 12,8 ± 1,31    |   | L/stau/H89  | 12,1 ± 2,6           | 12,9 ± 2,74    |
| p-Wert | 0,00002              | 0,002          |   | p-Wert      | 0,356                | 0,992          |
| DD     | 7,4 ± 1,4            | 15,1 ± 1,9     |   | D           | 14,0 ± 3,0           | 13,4 ± 3,7     |
| DD/H89 | 11,5 ± 1,44          | 11,9 ± 1,83    |   | DD/stau/H89 | 12,6 ± 2,23          | 13,9 ± 1,83    |
| p-Wert | 0,000004             | 0,007          |   | p-Wert      | 0,496                | 0,425          |

Tab. 8.1: Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) der Antwortamplituden (mV) der Horizontalzellen auf den Ring-Punkt-Stimulus; (D = dunkeladaptiert, L = lichtadaptiert, DD = dauerhaft dunkeladaptiert, DA = Dopamin, RA = Retinsäure, H89 = H89-Dihydrochloride, stau = Staurosporin)



#### Abb. 8.1: Einfluss von cGMP auf den Phosphorylierungszustand von cpCx53.8

Western Blot Analyse zum Vergleich der cpCx53.8-Immunoreaktivität in Membranfraktionen dunkeladaptierter (D) und lichtadaptierter (L) Retinen mit den Membranfraktionen dunkeladaptierter Retinen, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen von 8-Br-cGMP ( $* = 10 \ \mu$ M;  $** = 100 \ \mu$ M) inkubiert wurden. Der hier gezeigte Doppelansatz der cGMP-Inkubation resultiert aus zwei separat erfolgten Präparationen und Inkubationen; Pfeile = cpCx53.8 Doppelbande bei ca. 60-62 kDa; Pfeilspitze = Detektion einer höhermolekularen phosphorylierten Isoform von cpCx53.8 bei ca. 66 kDa; kDa = kilo Dalton; primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000)

Tab. 8.2: Mittelwerte (± Standardabweichung) der Auszählung cpCx53.8-immunoreaktiver Plaques in Karpfenretinen aus jeweils drei separaten Präparationen. Die gezeigten Werte entsprechen der durchschnittlichen Plaqueanzahl/100  $\mu$ m<sup>2</sup>. D = dunkeladaptiert, DD = dauerhaft dunkeladaptiert, L = lichtadaptiert, DA = Dopamin, SCH = SCHERING23390, H89 = H89-Dihydrochlorid, RA = Retinsäure, stau = Staurosporin

|                     | 1. Präparation | 2. Präparation | 3. Präparation  |
|---------------------|----------------|----------------|-----------------|
| D                   | 1,56 ± 1,00    | 1,74 ± 0,90    | 2,39 ± 1,02     |
| DD                  | 5,01 ± 2,02    | 4,85 ± 2,13    | 4,71 ± 1,34     |
| L                   | 5,11 ± 0,93    | 4,94 ± 2,12    | 4,81 ± 1,89     |
| p-Wert (D/DD)       | 0,000025       | 0,000164       | 0,00052         |
| p-Wert (D/L)        | 0,000018       | 0,000007       | 0,000312        |
| p-Wert (DD/L)       | 0.4252         | 0.9154         | 0.3056          |
| D                   | 1,69 ± 0,54    | 1,58 ± 0,87    | 1,48 ± 1,33     |
| DA                  | 4,65 ± 1,25    | 5,85 ± 1,37    | 5,11 ± 1,70     |
| p-Wert              | 0,000893       | 0,00001        | 0,000362        |
| DA                  | 6,09 ± 1,90    | 6,09 ± 1,90    | 5,82 ± 1,31     |
| DA/SCH              | 1,57 ± 0,93    | 1,56 ± 1,20    | 1,71 ± 0,63     |
| p-Wert              | 0,0000102      | 0,000176       | 0,0000016       |
| DA                  | 5,51 ± 2,14    | 5,79 ± 0,94    | 5,27 ± 1,66     |
| DA/H89              | 2,10 ± 0,76    | 1,65 ± 1,47    | 2,21 ± 0,97     |
| p-Wert              | 0,011290       | 0,000160       | 0,007971        |
| D                   | 1,45 ± 0,49    | 1,74 ± 1,42    | 1,59 ± 1,00     |
| cAMP                | 4,85 ± 1,58    | 5,53 ± 1,46    | 5,53 ± 1,25     |
| p-Wert              | 0,000188       | 0,000018       | 0,000165        |
| cAMP                | 5,75 ± 2,13    | 5,45 ± 1,46    | 5,83 ± 1,90     |
| CAMP/H89            | 1,57 ± 1,31    | 1,87 ± 1,34    | 1,67 ± 0,42     |
| p-Wert              | 0,000028       | 0,000054       | 0,000006        |
| D                   | 1,59 ± 0,80    | 1,48 ± 0,95    | 1,67 ± 1,04     |
| RA                  | 6,26 ± 1,21    | 5,24 ± 1,60    | 5,27 ± 1,22     |
| p-Wert              | 0,000002       | 0,000009       | 0,000627        |
| RA                  | 5,86 ± 2,10    | 5,13 ± 1,32    | 5,23 ± 2,15     |
| RA/stau             | 1,83 ± 1,48    | 1,27 ± 1,19    | 1,57 ± 0,91     |
| p-Wert              | 0,000004       | 0,001530       | 0,000677        |
| L                   | 4,58 ± 2,04    | 5,74 ± 1,70    | 5,23 ± 1,98     |
| L/stau/H89          | 1,85 ± 1,01    | 2,12 ± 1,62    | 1,51 ± 0,86     |
| p-Wert              | 0,000974       | 0,000424       | 0,000050        |
| DD                  | 4,67 ± 1,58    | 5,94 ± 1,94    | 5,51 ± 2,46     |
| DD/stau/H89         | 2,37 ± 1,45    | 1,49 ± 0,89    | 2,82 ± 1,40     |
| p-Wert              | 0,000168       | 0,000001       | 0,000038        |
| L                   | 3,99 ± 0,48    | 6,03 ± 1,07    | 5,59 ± 1,46     |
| L/stau              | 3,05 ± 1,02    | 4,87 ± 1,26    | 4,57 ± 1,20     |
| L/H89               | 2,13 ± 0,59    | 4,75 ± 0,37    | 4,86 ± 1,14     |
| p-Wert (L/L/stau)   | 0.119934       | 0.033543       | 0.027510        |
| p-Wert (L/L/H89)    | 0.027615       | 0.051960       | 0.019710        |
| DD                  | 5,05 ± 1,94    | 5,86 ± 1,80    | 5,63 ± 1,10     |
| DD/stau             | 4,46 ± 0,64    | 4,58 ± 0,81    | $3,50 \pm 0,64$ |
| DD/H89              | 4,31 ± 0,53    | 4,37 ± 2,42    | 4,75 ± 0,57     |
| p-Wert (DD/DD/stau) | 0.363341       | 0.041922       | 0.000801        |
| p-Wert (DD/DD/H89)  | 0.467146       | 0.043189       | 0.034790        |



Abb. 8.2: Einfluss von Microcystin auf die Dopamin- und 8-Br-cAMP-vermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8

In A), B) und C) sind jeweils die Western Blot Analysen von Membranfraktionen dunkeladaptierter, Dopamininkubierter (DA) und 8-Br-cAMP-inkubierter (cAMP) Retinen und entsprechende Präinkubationen mit Microcystin-LR (MC) gezeigt. primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000)



Abb. 8.3: Einfluss der CamKII-Inhibition auf die Dopamin- und Retinsäure-vermittelte cpCx53.8-Phosphorylierung

Eine Präinkubation mit dem CamKII-Inhibitor KN62 hatte keinen erkennbaren Effekt auf die DA- oder at-RAvermittelte Phosphorylierung von cpCx53.8; primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); kDa = kilo Dalton



#### Abb. 8.4: Modulation der Cx53.8-Phosphorylierung in Membranfraktionen von Goldfischretinen

Der Vergleich vonr Membranfraktionen unterschiedlich adaptierter bzw. inkubierter Goldfischretinen belegt, dass Cx53.8, äquivalent zu den Befunden der Karpfenretinen durch einen veränderten Phosphorylierungszustand moduliert wird. In der Membranfraktion der dunkeladaptierten Retinen (D) wurde ebenfalls die charakteristische "Grundbande" (Doppelbande bei ca. 55-57 kDa, Pfeile) detektiert. In der Membranfraktion der lichtadaptierten Retinen (L) kam es zur Verschiebung ("*shift*") des Cx53.8-Immunoreaktivitätsmusters und zur Detektion einer höhermolekularen Isoform bei ca. 59 kDa (Pfeilspitze). Die Inkubation dunkeladaptierter Retinen mit Dopamin bzw. Retinsäure resultierte ebenfalls in der Detektion höhermolekularer phosphorylierter Isoformen des Connexins, welche durch eine entsprechende Präinkubation mit H89 (PKA-Inhibitor), respektive Staurosporin (stau, PKC-Inhibitor) inhibiert wurde. primärer Antikörper = anti-Cx53.8 (1:750), sekundärer Antikörper = Biorad Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (1:3.000); kDa = kilo Dalton

**Tab. 8.3**: **Primäre und sekundäre Antikörper.** Die Endkonzentration der Antikörperlösung ist jeweils für die unterschiedlichen Anwendungen angegeben: Cryoschnitte (c), Western Blot (w), dissoziierte Zellen (d), *in situ* Hybridisierung (h)

| Primäre<br>Antikörper  | Antigen Ursprung,<br>Endkonzentration  |   | Hersteller                                     |
|--|--|---|--|
| anti-digoxigenin-AP  | Digoxigenin  | Schaf, polyklonal, 1:500<br>(h)                                 | Roche, Mannheim,<br>Germany                    |
| anti-digoxigenin-POD   | Digoxigenin  | Schaf, polyklonal, 1:500<br>(h)                                 | Roche, Mannheim,<br>Germany                    |
| anti-fluorescein-POD   | anti-fluorescein-POD Fluorescein   |   | Roche, Mannheim,<br>Germany                    |
| anti-drCx52.9 Zebrafisch Cx52.9 (LRDHCPALRDGPADSSA) (Klaassen <i>et al.</i> , 2011)              |  | Huhn, polyklonal, 1:750<br>(c); 1:1.000 (w) 1:1.000<br>(d)      | Davids Biotechnology<br>(Reynersburg, Germany) |
| anti-drCx52.6 Zebrafisch Cx52.6,<br>(CKDFSEESDSVESGNY)<br>(Shields <i>et al.</i> , 2007)         |  | Kanninchen, polyklonal,<br>1:750 (c); 1:1.000 (w);<br>1:750 (d) | Eurogentec (Seraing,<br>Belgium)               |
| anti-drCx55.5  | nti-drCx55.5 Zebrafisch Cx55.5,<br>(SSRSDTKLSRPTSPD)<br>(Shields <i>et al.</i> , 2007) |   | Eurogentec (Seraing,<br>Belgium)               |
| anti-cpCx53.8 Karpfen Cx53.8,<br>(CSMSMILELSSIMKK)<br>(Janssen-Bienhold <i>et al.</i> ,<br>2009) |  | Kanninchen, polyklonal,<br>1:750 (c); 1:750 (w);<br>1:750 (d)   | Pineda Antibody Service<br>(Berlin, Germany)   |
| Sekundäre<br>Antikörper  | Ursprung   | Endkonzentration  | Hersteller                                     |
| anti-Rabbit-Alexa488 Ziege   |  | 1:600 (c)   | Molecular Probes                               |
| anti-Rabbit-Alexa568 Ziege   |  | 1:650 (c)   | Molecular Probes                               |
| anti-rabbit HRP-<br>konjugiert   | Ziege  | 1:3.000 (w)   | Biorad, München                                |
| anti-chicken FITC-<br>konjugiert Ziege   |  | 1:200 (c)   | Biorad, München                                |

| Connexin       | Primer | Sequence 5'→3'                                |
|----------------|--------|---|
| 52.6/53.8/49.5 | USP    | aagaatgtatgetacgaccaccactteece                |
| 52.6/53.8/49.5 | DSP    | ttttctgtgggcctggaaatgaagcagtcc                |
| 52.6/53.8      | GSP5   | gcagcaaggaacccctcagaggagcct                   |
| 52.6/53.8      | GSP3   | ctggaggagacggaggctttgga(ag)ga(ag)c            |
| 52.6/53.8      | NGSP5  | ag(ct)tc(ct)tccaaagcctccgtctcctccag           |
| 52.6/53.8      | NGSP3  | aggeteetetgaggggtteeteetgetge                 |
| 52.6/53.8      | F1     | tagccgagtcagtaaagacttcaggg                    |
| 52.6           | R1     | ttagtgtgtttttctactcaccat                      |
| 52.6/53.8      | F2     | atac <u>gaattcg</u> ccaccatgggagactggaacttt   |
| 52.6           | R2     | agt <u>gctcgag</u> attagtgtgtttttct           |
| 52.6           | F3     | att <u>ctcgag</u> atcaagcaggcca               |
| 52.6           | R3     | acc <u>gaattcg</u> acattctgcgtc               |
| 53.8           | F1     | gagcagagtcagtcaatgtaaagacttc                  |
| 53.8           | R1     | atgtcactttttcatgattgaaga                      |
| 53.8           | R2     | atgc <u>ctcgagt</u> tcactttttcatgattga        |
| 49.5           | GSP5   | gagcettattcagetteccetgetecage                 |
| 49.5           | GSP3   | ccctggagaaggagcgtcactgcaagag                  |
| 49.5           | NGSP5  | actcttgcagtgacgctccttctccaggg                 |
| 49.5           | NGSP3  | agctggagcaggggaagctgaataaggctc                |
| 49.5           | F1     | acgttcagcgggagaacaaggatgttgttca               |
| 49.5           | R1     | caggtcgctggctgctcgtctgctgct                   |
| 49.5           | F2     | gggt <u>gaattc</u> agcatgggcgactggaactttctggg |
| 49.5           | R2     | atgc <u>ctcgag</u> tcagatctgcaggtcgc          |
| 49.5           | F3     | agc <u>aagctt</u> tgaagaaggggcttctgg          |
| 49.5           | R3     | aat <u>ggatcc</u> agaggctcagatctg             |
| 55.5           | USP    | ctaccgcctccgtgctcttga                         |
| 55.5           | DSP    | ctggtgtggctcgatgactctgat                      |
| 55.5           | GSP5   | cgcgatggcttggtgatgctcgtggac                   |

Tab. 8.4: Sequenzen der verwendeten Primer

| 55.5    | GSP3  | gtccaccctctgcctctgctcaagaaagg                 |
|---------|-------|---|
| 55.5    | NGSP5 | aggagaggtgggcctgctcattttggaat                 |
| 55.5    | NGSP3 | accggcatgggaaagaaaccttggaaggg                 |
| 55.5    | F1    | acaccagggaatcttctcacacatcatccg                |
| 55.5    | R1    | tgtaagtctgtaggagctgctcgtctgcta                |
| 55.5    | F2    | gggtgaattcagcatgggagattggaactttcttgg          |
| 55.5    | R2    | atgc <u>ctcgag</u> tcatatctgtaagtctgtaggagctg |
| 55.5    | F3    | acc <u>aagett</u> accacettgeaactge            |
| 55.5    | R3    | aat <u>ggattc</u> aggagctgctcgtctg            |
| β-actin | F     | gaggtatcctgaccctgaagta                        |
| β-actin | R     | ccatctcctgctcaaagtcaag                        |

## 8.1 Puffer, Lösungen und Medien

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in destilliertem Wasser in der Qualität *pro analysis* angesetzt. Soweit erforderlich, wurden die Lösungen in mit DEPC versetztem Wasser (für RNAse-freie Lösungen) angesetzt, filtriert und autoklaviert (121°C).

 $\frac{3 \text{ x SDS Puffer:}}{3 \text{ ml Glycerin}}$   $0,3 \text{ ml } \beta \text{-Mercapthoethanol}$  0,9 g SDS 3,75 ml 0,5 M Tris-Puffer, pH 6,8mit Aqua bidest auf 10 ml auffüllen

<u>Acrylamid-Lösung:</u> Acrylamid 2% Bisacrylamid 3%

Ammoniumperoxisulfat 10 % (APS): 0,1 g / ml

Bradford-Reagenz: 100 mg Coomassie brilliant blau G-250 in 50 ml Ethanol lösen 100 ml 85% ige Phosphorsäure zufügen mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen, rühren und anschließend filtrieren

<u>DEPC-H<sub>2</sub>O:</u> 0,1 % DEPC (v/v) 1 l ddH<sub>2</sub>O rühren bis die Globuli gelöst sind, anschließend autoklavieren (20, min121°C) Essigsäureanhydrid/Triethanolamin: 10 mM Triethanolamin (pH 8,0) pH mit Essigsäureanhydrid eingestellt

Fischringer für Elektrophysiologie und Injektionsversuche: 100 mM NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgSO<sub>4</sub> 1 mM CaCl<sub>2</sub> 20 mM D-Glucose 20 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 7,4 (mit NaOH einstellen)

#### FM (Farb-Marker):

| (Sigma SDS7B2)                                  |          |
|---|----------|
| $\alpha$ 2-Macroglobulin (Blutplasma Mensch), 1 | 80 kDa   |
| Lactoferrin (Milch Mensch),                     | 90 kDa   |
| $\beta$ -Galactosidase ( <i>E. Coli</i> ),      | 116 kDa  |
| Pyruvat-kinase (Kaninchen Muskel),              | 58 kDa   |
| Fumerase (Schwein Herz),                        | 48,5 kDa |
| Laktat-Dehydrogenase (Kaninchen Muskel),        | 36,5 kDa |
| Triosephosphat-isomerase (Kaninchen Muskel),    | 26,6 kDa |
|   |          |

#### HEPES Fischringer (Proteinbiochemie):

120 mM NaCl 2,6 mM KCl 1 mM MgCl x 6 H<sub>2</sub>O 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> 16 mM D-Glucose 2 mM HEPES pH 7,4 (mit NaOH einstellen)

#### HMW-Marker:

| High Molecular Weight Marker (Sigma SDS6H) |          |
|--|----------|
| Myosin (Kaninchen Muskel),                 | 205 kDa  |
| $\beta$ -Galactosidase ( <i>E. Coli</i> ), | 116 kDa  |
| Phosphorylase B (Kaninchen Muskel),        | 97,4 kDa |
| Albumin (Rind),                            | 66 kDa   |
| Albumin (Ei),                              | 45 kDa   |
| Carboanhydrase (Rind),                     | 29 kDa   |
|  |          |

Homogenisierungspuffer 2 (HP<sub>2</sub>):
50 mM Tris/HCL pH 7,4
2 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
2 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
0,1 mM Orthovanadat
1 mM DTE (Dithioerythritol)
2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
2,5 μg/ml Leupeptin
5 μg/ml Aprotinin
1 μM Protease-Stop (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
1 μM Phosphatase-Stop (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
Auf 10 ml mit Aqua bidest auffüllen

<u>Homogenisierungspuffer (HPAP):</u>
20 mM Tris/HCl pH 7,4
10 mM DTE (Dithioerythritol)
5 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
2 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
10 μM ZnCl<sub>2</sub>
2 % SDS

Leibowitz L15 Medium: L15 Medium von Sigma; 2,968 g / 200ml steriles Aqua bidest; pH 7,4

| 66 kDa   |
|----------|
| 45 kDa   |
| 36 kDa   |
| 24 kDa   |
| 20,1 kDa |
| 14,2 kDa |
|          |

Lösung A:

ad 100 ml mit HBSS, 0,1 mM EDTA, 100 mM Hepes, 100 U Antibiotika

<u>Milchpulver (5%):</u> 5 g Trockenmilchpulver in 100 ml TBSTween lösen

Papain/Cystein-Lösung: 20 U/ml Papain, 1 mM Cystein (pH 7,3), auf 1 ml mit Lösung A auffüllen

peqGOLD 100 bp DNA-Leiter:

Fragmentgröße 10 kb, 8 kb, 6.kb, 5 kb, 4 kb, 3.5 kb, 3 kb, 2.5 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1.2 kb, 1 kb, 0.9 kb, 0.8 kb, 0.7 kb, 0.6 kb, 0.5 kb, 0.4 kb, 0.3 kb, 0.2 kb, 0.1 kb

Phosphatpuffer (PB-Puffer) 0,2 M (pH 7,4): 4 Teile 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit 1 Teil 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 einstellen

#### <u>Phosphatpuffer (PB-Puffer) 0,1 M (pH 7,4):</u> 250 ml 0,2 M PB pH 7,4 250 ml ddH<sub>2</sub>O

PBS-Puffer: 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 7,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf pH 7,4 einstellen

PFA-Fixierlösung 2%: 2 % Paraformaldehyd (PFA) (w/v) 3 % Sucrose (w/v) 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4

Ponceau-Rot-Färbelösung: 0,2% Ponceau S in 3% iger Essigsäure lösen

<u>SDS-Laufpuffer:</u> 28,8 g Glycin 6 g Tris 2 g SDS mit Aqua bidest auf 2 l auffüllen

Strip-Puffer 1:1% SDS10 mM  $\beta$  -Mercatoethanol0,01 M Trisauf pH 8,8 einstellen mit HCl

<u>Strip-Puffer 2:</u> 0,1 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 1% SDS 10 mM  $\beta$ -Mercatoethanol auf pH 3,0 einstellen mit HCl

Sucrose-Lösung 30%: 30 % Sucrose (w/v) in 0,1 M PB pH 7,4

<u>Taq-Reaktions-Puffer:</u> 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs und 0,8 μM der jeweiligen Primer

TBE-Puffer 1x (pH 8,2): 89 mM Tris (w/v) 89 mM Borsäure (w/v) 2 mM EDTA (w/v) <u>TBS + 0,2%Tween 20 (TBSTween):</u> 20 mM Tris 150 mM NaCL 0,2% Tween 20 auf pH 7,4 einstellen

Transferpuffer: 6 g Tris 28,8 g Glycin 2 ml 10% SDS

<u>Tris-Puffer (Trenngel):</u> 1,5 mol Tris / 1 l Aqua bidest; pH 8,8

<u>Tris-Puffer (Sammelgel):</u> 6,06 g Tris / 0,1 l Aqua bidest; pH 6,8

## 8.2 Kollaborationen

Die elektrophysiologischen Daten (Intrazellulärableitungen) von Goldfischhorizontalzellen wurden im Rahmen eines 6-monatigen Forschungsaufenthaltes (Juli-Dezember 2011) an der Dalhousie University in Halifax, Nova Scotia Kanada unter der Leitung von Prof. Dr. William H. Baldridge durchgeführt (Hermann *et al.* II, in Ausarbeitung).

Wesentliche Erkenntnisse zur Modulation der Phosphorylierung und des Immunoreaktivitätsmusters von cpCx53.8 durch unterschiedliche Adaptationszustände sowie die Neuromodulatoren Dopamin und Retinsäure konnten in zahlreichen Master- und Bachelorarbeiten (AG Neurobiologie, Universität Oldenburg) reproduziert werden. Hierzu zählen vor allem die Masterarbeiten von Nadine Mellies (Modulation von cpCx53.8 durch den cAMP/PKA-Signalweg, 2011), Nina Hoyer (Einfluss von Dopamin auf die Modulation von cpCx53.8 in Horizontalzellen der Karpfenretina, 2011), Katharina John (Einfluss von Retinsäure und Phorbolester auf die Phosphorylierung von cpCx53.8 und mmCx57 in Horizontalzellen der Vertebratenretina, 2011) und Jan Kleveman (Die Modulation von cpCx53.8 durch Phosphorylierungen unter Lichtbedingungen und die Etablierung eines IP-Protokolls zum Nachweis möglicher Interaktionspartner, 2013), sowie die Bachelorarbeit von Janina Padecken (Einfluss von prolonged darkness und prolonged light Adaptationen von Karpfenretinen auf die Phosphorylierung des cpCx53.8, 2013). (Hermann et al. II, in Ausarbeitung)

Die Transfektionen von Neuroblastoma Zellen (N2a-Zellen) mit dem cpCx53.8-Konstrukt erfolgten unter der Anleitung von Helena Greb und Susanne Wallenstein. Jasmin Segelken

konnte die Befunde zur Modulation des cpCx53.8-Immunoreaktivitätsmusters durch cAMP und Retinsäure in dem N2a-Zellsystem bestätigen. (Hermann *et al.* III, in Ausarbeitung)

Zur Detektion der Karpfenhorizontalzellconnexine cpCx49.5, cpCx52.6 und cpCx55.5 wurden die Antikörper, welche gegen bestimmte Epitope der entsprechenden homologen Zebrafischconnexine (dr-Cx52.9, drCx52.6, drCx55.5) gerichtet sind verwendet. Diese Antikörper wurden von Prof. Dr. Georg Zoidl (York University, Toronto, Kanada) und Prof. Dr. Maarten Kamermans (Netherlands Institute for Neuroscience (NIN), Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

Zur Identifikation putativer Retinsäure-Bindestellen bzw. Retinsäure-Interaktionspartner wurden im Rahmen einer Kollaboration mit Frau Apl.-Prof. Dr. Joanna Kolny-Olesiak (AG Energie- und Halbleiterforschung, Nanochemie; Universität Oldenburg) Retinsäure-beschichtete Nanobeads hergestellt. In einem ersten Versuchsansatz wurden unterschiedliche Inkubationsbedingungen bzw. Inkubationszeitreihen an mit cpCx53.8-transfizierten N2a-Zellen getestet (unveröffentlicht). Weitere Untersuchungen in dieser Hinsicht sind im Rahmen der Doktorarbeit von Jasmin Segelken geplant.

## 8.3 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen, als die von mir selbst angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Sebastian Hermann

## 8.4 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Reto Weiler für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können sowie für die Bereitstellung eines interessanten Projektes, eingehende und richtungweisende Gespräche und die wissenschaftliche Freiheit, die ich während meiner gesamten Promotionszeit genießen konnte.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau Apl.-Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold. Ich möchte an dieser Stelle nicht nur für die Übernahme des Erstgutachtens danken sondern insbesondere für die umfangreiche und vielseitige Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Koch für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau PD Dr Karin Dedek danke ich ganz herzlich für das kritische Lesen dieser Arbeit und für viele sehr hilfreiche Tipps und Anregungen.

Ich danke außerdem den technischen Assistenten der AG Neurobiologie, Bettina Kewitz, Dr. Konrad Schultz, Nicole Iben, Susanne Wallenstein und Josef "Hoto" Meyer für die vielen Hilfestellungen, Arbeitserleichterungen und die umfangreiche Unterstützung während der Laborarbeiten.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Neurobiologie danke ich für die angenehme und hilfsbereite Atmosphäre. Der Dank gilt vor allem Gerrit Hilgen, Katharina Kranz, Helena Greb, Arndt Meyer, Jasmin Segelken, Sebastian Ströh, Birthe Dorgau, Dr. Mark Pottek, Prof. Dr. Josef Ammermüller, Dr. Petra Bolte und Bianca Brüggen.

Meinen Eltern, Rosemarie und Joachim Hermann möchte ich ganz herzlich für die umfangreiche Unterstützung während meines gesamten Studiums und besonders während meiner Doktorarbeit danken.

Außerdem danke ich meiner Frau Katharina Hermann für die liebevolle Unterstützung.

## 8.4 Lebenslauf

| Persönliche Daten: |                                      |
|--------------------|--------------------------------------|
| Name               | : Sebastian Hermann                  |
| Adresse            | : Häherweg 10, 26188 Edewecht        |
| Geburtsdatum       | : 21.05.1980                         |
| Geburtsort         | : Oldenburg                          |
| Telefon            | : 0176 / 63 12 51 20                 |
| e-mail             | : sebastian.hermann@uni-oldenburg.de |

Ausbildung und Berufserfahrung:

| 1996-1999 | Gymnasium Bad Zwischenahn-Edewecht                              |
|-----------|---|
|           | Abitur  |
| 1999-2000 | Zivildienst, Deutsches Rotes Kreuz                              |
| 2000-2003 | Berufsausbildung, Industriekaufmann; Fa. abopart Viol & Partner |
| 2003      | Berufstätigkeit, Industriekaufmann; Fa. abopart Viol & Partner  |
| 2003-2009 | Diplom Biologie Studium; Carl von Ossietzky Universität         |
|           | Oldenburg; Neurobiologie, Mikrobiologie, Genetik                |
| 2010      | Wissenschaftlicher Mitarbeiter; Carl von Ossietzky Universität  |
|           | Oldenburg; AG Neurobiologie                                     |
| 2010-2013 | Doktorandenstipendium "NEUROSENSES" der Universitäten           |
|           | Oldenburg und Göttingen   |
| Seit 2013 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter; Carl von Ossietzky Universität  |
|           | Oldenburg; AG Neurobiologie                                     |

Symposia:

- European Retina Meeting 2009, Oldenburg (Poster)
- Amsterdam Connexin Meeting 2010 (Vortrag und Poster)
- 9<sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society 2011, Göttingen (Poster)
- European Retina Meeting 2011, Amsterdam (Vortrag und Poster)
- FASEB Science Research Meeting, Steamboat Springs, Colorado, USA (Poster)
- 10<sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society 2013, Göttingen (Poster)
- European Retina Meeting 2013, Alicante, Spanien (Poster)

#### Publikationsliste:

Hermann S, Greb H, Dierks P, Ommen G, Schultz K, Weiler R, Janssen-Bienhold U. Differential connexin expression in horizontal cells of the carp retina. (in Ausarbeitung; Hermann *et al.* I)

Hermann S, Weiler R, Baldridge WH, Janssen-Bienhold. Phosphorylation-induced uncoupling of horizontal cells in the fish retina. (in Ausarbeitung; Hermann *et al.* II)

Hermann S, Segelken J, Mellies N, Weiler R, Janssen-Bienhold U. Structural changes of horizontal cell gap junctions in the fish retina. (in Ausarbeitung; Hermann *et al.* III)

Nachfolgend sind die Manuskripte zu den geplanten Veröffentlichungen Hermann *et al.* I und Hermann *et al.* II angefügt.

# Differential connexin expression in horizontal cells of the carp retina

Hermann S, Greb H, Dierks P, Ommen G, Schultz K, Weiler R, Janssen-Bienhold U

## Abstract

A major feature of retinal horizontal cells (HCs) is their extensive netwok formation via gap junctions. Four of such homologously coupled HC-networks have been identified in the retinas of Cyprinidae, like zebrafish (Danio rerio) (dr) and carp (Cyprinus carpio) (cp). These networks are formed within the distal part of the inner nuclear layer of the retina by the stringent subtype-specific interaction of four morphologically distinct subtypes of HCs (H1-H4). The molecular building blocks of gap junctions are connexins, integral membrane proteins which oligomerize to form gap junction channels. In the zebrafish genome a large family of ~ 37 connexin genes has been identified, of which thirteen genes have been shown to be expressed in the retina and three (drCx52.6, drCx52.9 and drCx55.5) in HCs. Currently, data regarding the subtype-specific expression and distribution profiles of the retinal connexins are rare, and it is not yet known, whether gap junctional coupling within a HC subnetwork is mediated by means of just one type of connexin which would subsequently determines the coupling properties of the network, or whether each HC-subtype reveals a distinct overlapping expression pattern of different connexins. To answer this question, we identified the connexins expressed in HCs of the carp retina and analysed their subcellular distribution by means of a multiple methods approach, including RACE-RT-PCR, molecular cloning, in situ hybridisation, immunohistochemistry, immunoelectron microscopy, Western blot analysis and single cell RT-PCR. In addition to the known zf orthologs cpCx52.6 and cpCx55.5, we identified two new connexins expressed in carp HCs, which according to their molecular weight were termed cpCx49.5 and cpCx53.8. Data obtained from single cell experiments revealed expression of cpCx52.6, cpCx53.8 and cpCx55.5 in all four HC subtypes, whereas cpCx49.5 expression appeared restricted to H1, H2 and H4 cells. The expression level of each connexin in the particular HC subtype varied, showing highest expression levels for cpCx52.6 in H2 and H3 cells, for cpCx53.8 in H3 and H4 cells and for cpCx55.5 in H1 cells. The expression level of cpCx49.5 appeared similar in H1, H2 and H4 cells. Furthermore, our data indicate the presence of all four connexins in dendro-dendritic gap junctions, whereas axo-axonal gap junctions appeared to be predominantly be consisting of cpCx53.8 and cpCx55.5.

In conclusion, our data document the complex and differential connexin expression within HCs of the fish retina and different expression levels for the distinct connexins in each HC subtype. This supports the hypothesis that the formation of homologous coupled HC networks is enabled by selective connexin combinations and heterotypic gap junction channels, where the connexin composition determines the network/ coupling properties.

## Introduction

Electrical coupling via gap junctions plays a keyrole in information processing throughout the whole nervous system and especially in the processing of visual information within the retina. Retinal HCs are known to be extensively coupled via gap junctions, resulting in the formation of large HC networks allowing them to collect light information over a wide area of the retina and adjust the gain of the photoreceptors to different levels of ambient light (Kamermans and Spekreijse, 1999; Thoreson and Mangel, 2012). Through lateral inhibition, feedback interactions to photoreceptors as well as feedforward interactions to bipolar cells, HCs initiate spatial and spectral opponency for receptive field organization of bipolar- and ganglion cells (Dowling and Werblin, 1969; Kaneko, 1973). Within different lower vertebrate species

(turtle, fish) several distinct types of HCs were identified and they are known to possess color-specific connections to cones (Stell *et al.*, 1975; Dacheux and Raviola, 1990; Twig *et al.*, 2003). Within the carp retina four distinct types of HCs were characterized by morphological and physiological differences and termed H1-H4 (Weiler, 1978). H1, H2, and H3 type cells represent cone HCs which possess an axon, whereas the rod connecting HC (H4) is axonless. By means of tracer injections it was shown that each cell type is homologously coupled via gap junctions (Tsukamoto *et al.*, 1987; Teranishi and Negishi, 1993).

Gap junctions represent specialized intercellular cell-to-cell contacts in which several gap junction channels (GJCs) assemble into a macromolecular complex. They enable the exchange of small molecules (> 1kDa) and fast transmission of electrical signals between neighboring cells. GJCs assemble as dodecameric complexes, in which a hexameric connexon (hemichannel) located in the plasma membrane docks to a connexon in the membrane of an apposed cell (Falk, 2000). The synthesis, assembly and trafficking of the GJC protein subunits (connexins) appear to follow the general secretory pathway for membrane proteins (Goodenough *et al.*, 1996). The connexin subunits can assemble into homomeric or heteromeric connexons with different properties (channel characteristics, gating properties etc.) and the assembly is thought to be organized by specific signaling amino acid sequences located within the connexin polypeptides (Evans *et al.*, 1999). Furthermore, the dependency of interactions with scaffolding proteins, like ZO-1 or different cell adhesion molecules, like cadherin is discussed (Laird 1996; Tanabe *et al.*, 2006; Puller *et al.*, 2009).

There is evidence from several species that HCs express different connexins, but relatively little is known in regard to their distinct distribution within paticular HC subtypes. In the murine retina, which posseses one type of HC, so far only the functional expression of connexin57 (mmCx57) in HCs has been described (Hombach et al., 2004; Janssen-Bienhold et al., 2009), suggesting that the formation of HC networks in the mouse retina is enabled by homomeric/ homotypic mmCx57-containing GJCs. On the other hand studies on rabbit HCs provide evidence for the expression of Cx50 in the axonless A-type HC (O'Brien et al., 2006) and exclusive localization of Cx57 immunoreactive gap junctions only within the axons of Btype HCs (Pan et al., 2012). These findings provide evidence for the distinct connexin expression in different compartments of HCs, indicative for another unknown connexin enabling dendro-dendritic gap junctional coupling in B-type HCs (Cha et al., 2012). Studies in the zebrafish (dr) retina showed expression of drCx52.6 and drCx55.5 in HCs located at the very distal part of the INL (Dermietzel et al., 2000; Zoidl et al., 2004; Shields et al., 2007) and recently Klaassen et al. (2011) described the expression of the new drCx52.9 in HCs. But in summary these studies did not consider selective and differential connexin expression within different HC subtypes. However Sun et al. (2012) provided first hints for coexpression of drCx52.6 and drCx55.5 in zebrafish HCs.

In the present study we aimed to clarify the individual HC subtype specific expression patterns of connexins in the carp retina. Our major request focused on the question whether one HC subtype expresses only one specific connexin, resulting in homomeric and homotypic connexons and GJCs, respectively or there is an overlapping expression of connexins in different HC types, indicating formation of heteromeric connexons and heterotypic GJCs.

## Material and methods

#### **Tissue preparation**

All experiments were performed on 1–2 year old carp (*Cyprinus carpio*). They were kept in a covered bassin at 18-20°C under simulation of a 12 hour day and night rhythm with a cold light lamp. All animals were handled in accordance to the institutional guidelines for animal

welfare at the University of Oldenburg and the laws on animal experimentation issued by the German government.

For immunohistochemistry and *in situ* hybridization (ISH), fishes were killed by decapitation, the eyecups were fixed in 2% paraformaldehyde [PFA (Riedel de Haen, Seelze, Germany) in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB, pH 7.4); 20 min], cryoprotected (30% sucrose in PB; overnight, 4°C) and embedded in Cryoblock (Medite GmbH, Burgdorf, Germany). Vertical cryosections (18–20  $\mu$ m) were prepared using a cryomicrotome (Bright Instrument, Huntingdon, UK). For western blot and molecular analysis, retinae from dark-adapted (1h) carp were isolated in Leibovitz L-15 medium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany; pH 7.4). For HC dissociation, extracted retinae were enzymaticaly digested with cysteine-activated papain (23 U/ml, Sigma; 15 min). The enzymatic reaction was stopped by washing the retinae in L15 supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS; 2x5 min), and the cells were dissociated by careful mechanical trituration in L-15 medium. The cell suspension was diluted in L-15 medium, platted on poly-L-lysine-coated slides (50  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) and kept for 1 hour for cell adhesion.

#### **Cloning of different carp connexins**

Total RNA was extracted from adult carp retinal tissues using NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) and the first-strand cDNA was synthesized using SuperScript<sup>®</sup> III reverse transcriptase (Invitrogen, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. As an internal control for the quality and integrity of the cDNA, the expression of  $\beta$ -actin was examined using intron-spanning primers (F/R, table 1). To obtain partial coding sequences of different carp connexins (cpCx), we designed a set of primers (UPS/DPS, table 1) complementary to conserved regions of connexins according to Haefliger et al. (1992). For the detection of cpCx55.5, we designed primers (USP/DSP) based on the zebrafish Cx55.5 (drCx55.5) sequence [GenBank: NP 131812]. Partial cDNA sequences were amplified [2 min at 95°C, 45x (30 s at 95°C, 1 min at 56°C, 1.5 min at 72°C), and 10 min at 72°C] using 1 unit Taq DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Germany) in reaction buffer containing 1.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs and 0.8 µM of each primer. The amplicons were gel purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, reamplified in a second PCR with the same set of primers, and subcloned in the pCR®II vector (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). Selected clones were nucleotide sequenced (LGC Genomics, Berlin, Germany).

To obtain full-length coding sequences of identified connexins, we performed 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) using BD SMART<sup>TM</sup> RACE kit (Clontech, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions. Universal primer mix (UPM; BD SMART<sup>TM</sup> RACE kit) was used in combination with gene-specific primers (GSP5 and GSP3, table 1) designed based on the partial coding sequences. Obtained amplicons were reamplified in a nested PCR according to the manufacturer's instructions using nested universal primer (NUP; BD SMART<sup>TM</sup> RACE kit) in combination with nested gene specific primer (NGSP5 and NGSP3, table 1). PCR products were gel purified and subcloned in the pCR®II vector. Selected clones were nucleotide sequenced and the assembled sequences were analyzed using different bioinformatics tool.

## Sequence analysis

Obtained connexin sequences were analyzed using basic local alignment search tool (BLAST) on the NCBI site (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), bioinformatic tools on the ExPASy server (http://web.expasy.org/compute\_pi/). Amino acid sequence alignments were performed with ClustalW tool (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Full-length amino acid sequences were included into the alignment. Phylogenetic tree was constructed using the MEGA5 program (http://www.megasoftware.net; Tamura *et al.* 2011) with the p-distance

model. Bootstrap values are based on 1000 replicates. Human pannexin 1 [*Homo sapiens* (hsPx1), NP\_056183] was used as outgroup. Connexin protein sequences involved into the alignment were obtained from GenBank: zebrafish connexins [drCx52.6 (NP\_997984), drCx52.7 (NP\_001106974), drCx52.9 (NP\_996976), and drCx55.5 (AAG24878]; human connexins [hsCx62 (NP\_115991) and hsCx59 (AAG09406)]. Mouse connexin57 (mmCx57) described by Hombach *et al.* (2004) was used in this alignment.

#### Single cell RT-PCR

Single dissociated HCs were identified by their morphology (Weiler 1978) and collected using a micropipette filled with 1x DNaseI reaction buffer (Amplification Grade, Invitrogen) containing 20 U RNase inhibitor (RNasin Plus, Promega, Madison, WI). By breaking the tip of the patch pipette the content was expelled into a 0.2 ml PCR tube containing 0.5 U RNase-free DNaseI (Invitrogen) and digested according to manufacturer's guidelines. The mRNA was reverse transcribed as described above. As an internal control for the quality and the quantity of the cDNA, the expression of  $\beta$ -actin was examined. For PCR amplification, a hot-start PCR was performed using specific primers (F1/R1) and the HotStar *Taq* Polymerase (Qiagen) under the following conditions: 15 min at 95°C, 45x (40s at 94°C, 1min at 63°C, and 1 min at 72°C), 10 min at 72°C. Resulting fragments were gel purified and nucleotide sequenced.

#### Transfection

The full-length cDNA sequences of cpCx52.6 (nt 1-1419), cpCx53.8 (nt 1-1443), cpCx49.5 (nt 1-1332), and cpCx55.5 (nt 1-1497) were amplified using specific primers (F2 and R2) containing *Eco*RI and *Xho*I restriction enzyme sites and subcloned into the *Eco*RI-*Xho*I sites of the pCS2+ vector. Neuro2-a cells (N2a) were cultured in Dulbecco's minimal essential medium [DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 4 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and streptomycin (all from Biochrom AG, Berlin, Germany); 37°C, 5% CO<sub>2</sub>]. Cells were seeded (5 x 10<sup>5</sup>) on 6-cm cell culture dishes 24 h prior to transfection. Transient transfections were performed using 4 µg recombinant plasmid DNA and the Attractene transfection reagent (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. To prevent the formation of open hemichannel, the culture medium was exchanged 24 h posttransfection by DMEM containing 5 mM CaCl<sub>2</sub>, and the cells were harvested 48 h posttransfection for western blotting analysis.

#### In situ hybridization (ISH)

For the localization of different connexin transcripts in the carp retina, *in situ* hybridization on retinal cryosections (18-20  $\mu$ m tick) and dissociated retinal cells was performed. To synthesize the Digoxigenin (DIG)- and Fluorescein (FL)-labeled antisense and sense cRNA riboprobes, pBluescript II KS+ plasmid (Stratagene, Waldbronn, Germany) constructs containing partial cDNA sequences of cpCx52.6 (nt 709-1382), 55.5 (nt 1053-1479), and 49.5 (nt 712-1332 + 7 additional nucleotides of the 3'-UTR) were used. Slides with cryosections or dissociated cells were fixed in 4 % PFA in phosphate-buffered saline [PBS (pH 7.2); 20 min, 4°C], rinsed in PBS (3 x 5 min), in 70 % ethanol (5 min), and finally in diethylpyrocarbonate-treated H<sub>2</sub>O (2 x 10 min). After the incubation with 0.1 M HCl (5 min), the slides were acelylated [0.25 % acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine (pH 8.0); 20 min], successively dehydrated in graded concentrations of ethanol, and air dried. The rest of the ISH procedure was conducted according to the method described in detail elsewere (Montag-Sallaz et al., 2003). Briefly, following the prehybridization (3 h, 37°C), sections and cells were hybridized with DIG-cRNA (16-18 h, 55°C). Tissues were rinsed, blocked and incubated with the alkaline phosphatase (AP)-conjugated anti-DIG antibody (Roche, Mannheim, Germany;

overnight, 4°C). The slides were rinsed, developed for several hours and mounted in Fluoromount (Sigma-Aldrich).

## Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

The *in situ* hybridization procedure was conducted as described above for ISH. For the detection of different transcripts in the same section we used a combination of DIG- and FL-labeled cRNA probes. After the hybridization, the endogenous peroxidase activity was quenched with PBS containing 2 %  $H_2O_2$  (15 min). The tissue was rinsed, blocked and incubated with the horseradish peroxidase (POD)-conjugated anti-DIG or anti-FL antibody (Roche; overnight, 4°C). The slides were rinsed and the riboprobes were visualized using the TSA Plus Cyanine 3 & Fluorescein System (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) according to the manufacturer's instructions.

#### Immunohistochemistry

To analyze the expression of different connexin proteins in the carp retina, we performed immunohistochemistry on cryosections and dissociated cells. Dissociated cells were fixed with 2% PFA. The cryosections and the cells were blocked with 10% normal goat serum (NGS, Sigma) in Tris-buffered saline containing 0.3% TritonX-100 (TBST), and incubated with the primary antibodies (table 2; diluted in 10% NGS in TBST; 2 h). Secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 and fluoresceinisothiocyanate (FITC) (Invitrogen, Carlsbad, CA) were applied (diluted in 10% NGS in TBST; 2 h). The slides were washed and mounted with Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Fluorescent image acquisition was performed with a Leica TCS SL confocal microscope. Scanning was accomplished with either a 40x/1.25- or a 63x/1.32- plan apochromat objective at a resolution of 1.024x1.024 pixels. Offset and gain of the channels were adjusted using Leica TCS SL image acquisition software. The scans are presented as projections of 12-16 sections (z-axis increment 0.2 µm for immunohistochemistry and dissociated cells). The intensity and the contrast of images were adjusted by Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, San José CA) and the public domain image processing software ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

For immunoelectron microscopy, isolated retinae were fixed (2% PFA/ 3% sucrose in PB; 30 min) and cryoprotected (30% sucrose in PB; overnight, 4°C). Tangential sections (60  $\mu$ m thick) were prepared, blocked with 10% NGS (in PB; 3 h), and incubated with the primary antibodies (table 2; 5 days, 4°C). After rinsing, the biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody was applied (1:250; Vector Laboratories; overnight, 4°C). The immunoreactivity was detected with the VectaStain<sup>®</sup> Elite ABC Kit (Vector Laboratories) according to the manufacturer's protocol. The sections were treated with 0.1% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) in PB activated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, postfixed (2.6% glutaraldehyde/ 1% PFA/3% sucrose; 1h), subjected to silver intensification and finally fixed in 1% osmium tetroxide. Sections were dehydrated in increasing acetone concentrations and embedded in epoxy resin (Agar 100; Plano, Wetzlar, Germany). Ultrathin sections (100 nm thick) were made and examined with a Zeiss 902 transmission electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### Western blot analysis

The specificity of the antibodies was tested by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis of crude subcellular fractions as previously described by Janssen-Bienhold *et al.* (2009). Transiently transfected N2a cells were washed with ice-cold PBS. Harvested N2a cells and isolated carp retinae were mechanically homogenized in homogenization buffer [HP (pH 7.4): 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.1 M sodium orthovanadate, 1 mM DTE, 1 mM PMSF, Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche); 100 µl/culture dish or 50 µl/retina].

Homogenates were then fractionated by differential centrifugation steps to obtain crude membrane and cytosolic fractions. Protein extracts (30 - 40 µg) were separated via 8-10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Optitran BA-S 85; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). After the membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in TBSTw (pH 7.4; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.2% Tween-20; 1 h, 37°C), primary antibodies were applied (table 2, diluted in TBSTw; overnight, 4°C). The membranes were washed with TBSTw and incubated with the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antirabbit IgG antibody (1:3,000 diluted in TBSTw containing 2% nonfat dry milk; BioRad Laboratories, Munich, Germany; 1.5 h, RT). After rinsing, the immunoreactive proteins were visualized using the Chemiluminescence Detection System (Pierce ECL, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) following the manufacturer's instructions.

| Connexin       | Primer | Sequence 5'→3'                              |
|----------------|--------|---|
| 52.6/53.8/49.5 | USP    | aagaatgtatgctacgaccaccacttcccc              |
| 52.6/53.8/49.5 | DSP    | ttttctgtgggcctggaaatgaagcagtcc              |
| 52.6/53.8      | GSP5   | gcagcaaggaacccctcagaggagcct                 |
| 52.6/53.8      | GSP3   | ctggaggagacggaggctttgga(ag)ga(ag)c          |
| 52.6/53.8      | NGSP5  | ag(ct)tc(ct)tccaaagcctccgtctcctccag         |
| 52.6/53.8      | NGSP3  | aggeteetetgaggggtteeteetge                  |
| 52.6/53.8      | F1     | tagccgagtcagtaaagacttcaggg                  |
| 52.6           | R1     | ttagtgtgtttttctactcaccat                    |
| 52.6/53.8      | F2     | atac <u>gaattcg</u> ccaccatgggagactggaacttt |
| 52.6           | R2     | agt <u>gctcgag</u> attagtgtgtttttct         |
| 52.6           | F3     | att <u>ctcgag</u> atcaagcaggcca             |
| 52.6           | R3     | acc <u>gaattcg</u> acattctgcgtc             |
| 53.8           | F1     | gagcagagtcagtcaatgtaaagacttc                |
| 53.8           | R1     | atgtcactttttcatgattgaaga                    |
| 53.8           | R2     | atgc <u>ctcgagt</u> tcactttttcatgattga      |
| 49.5           | GSP5   | gagcettattcagettcccetgetccage               |
| 49.5           | GSP3   | ccctggagaaggagcgtcactgcaagag                |
| 49.5           | NGSP5  | actcttgcagtgacgctccttctccaggg               |
| 49.5           | NGSP3  | agctggagcaggggaagctgaataaggctc              |
| 49.5           | F1     | acgttcagcgggagaacaaggatgttgttca             |
| 49.5           | R1     | caggtcgctggctgctcgtctgctgct                 |

**Table 1:** Primer sequences used in this study

| 49.5    | F2    | gggt <u>gaattc</u> agcatgggcgactggaactttctggg |
|---------|-------|---|
| 49.5    | R2    | atgc <u>ctcgag</u> tcagatctgcaggtcgc          |
| 49.5    | F3    | agc <u>aagctt</u> tgaagaaggggcttctgg          |
| 49.5    | R3    | aat <u>ggatcc</u> agaggctcagatctg             |
| 55.5    | USP   | ctaccgcctccgtgctcttga                         |
| 55.5    | DSP   | ctggtgtggctcgatgactctgat                      |
| 55.5    | GSP5  | cgcgatggcttggtgatgctcgtggac                   |
| 55.5    | GSP3  | gtccaccctctgcctctgctcaagaaagg                 |
| 55.5    | NGSP5 | aggagaggtgggcctgctcattttggaat                 |
| 55.5    | NGSP3 | accggcatgggaaagaaaccttggaaggg                 |
| 55.5    | F1    | acaccagggaatettetcacacatcatceg                |
| 55.5    | R1    | tgtaagtctgtaggagctgctcgtctgcta                |
| 55.5    | F2    | gggtgaattcagcatgggagattggaactttcttgg          |
| 55.5    | R2    | atgc <u>ctcgag</u> tcatatctgtaagtctgtaggagctg |
| 55.5    | F3    | acc <u>aagett</u> accacettgcaactge            |
| 55.5    | R3    | aat <u>ggattc</u> aggagctgctcgtctg            |
| β-actin | F     | gaggtatcctgaccctgaagta                        |
| β-actin | R     | ccatctcctgctcaaagtcaag                        |

**Table 2**: Primary antibodies and their dilutions used on retinal cryosections (c), western blot (w), dissociated carp retinal cells (d) and *in situ* hybridization (h)

| Antibody             | Antigen  | Host, monoclonal or polyclonal, dilution                      | Manufacturer                                   |
|----------------------|--|---|--|
| anti-digoxigenin-AP  | Digoxigenin  | Sheep, polyclonal, 1:500<br>(h)                               | Roche, Mannheim,<br>Germany                    |
| anti-digoxigenin-POD | Digoxigenin  | Sheep, polyclonal, 1:500<br>(h)                               | Roche, Mannheim,<br>Germany                    |
| anti-fluorescein-POD | Fluorescein  | Sheep, polyclonal, 1:500 (h)                                  | Roche, Mannheim,<br>Germany                    |
| anti-drCx52.9        | zebrafish Cx52.9<br>(LRDHCPALRDGPADSSA)<br>(Klaassen <i>et al.</i> , 2011) | Chicken, polyclonal,<br>1:750 (c); 1:1,000 (w)<br>1:1,000 (d) | Davids Biotechnology<br>(Reynersburg, Germany) |

| anti-drCx52.6 | zebrafish Cx52.6,<br>(CKDFSEESDSVESGNY)<br>(Shields <i>et al.</i> , 2007) | Rabbit, polyclonal,<br>1:750 (c); 1:1,000 (w);<br>1:750 (d) | Eurogentec (Seraing,<br>Belgium)             |
|---------------|---|---|--|
| anti-drCx55.5 | zebrafish Cx55.5,<br>(SSRSDTKLSRPTSPD)<br>(Shields <i>et al.</i> , 2007)  | Rabbit, polyclonal,<br>1:750 (c); 1:1,000 (w);<br>1:750 (d) | Eurogentec (Seraing,<br>Belgium)             |
| anti-cpCx53.8 | mouse Cx57,<br>(CSMSMILELSSIMKK)<br>(Janssen-Bienhold et al.,<br>2009)    | Rabbit, polyclonal,<br>1:750 (c); 1:750 (w);<br>1:750 (d)   | Pineda Antibody Service<br>(Berlin, Germany) |

## **Results**

#### Identification of connexins expressed in horizontal cells of the carp retina

In order to identify connexins expressed in HCs of the carp retina, we have cloned four connexin transcripts with characteristic features of connexin proteins. According to their predicted molecular weight, these connexins were termed cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 and cpCx55.5. BLAST searches of the GenBank database revealed high homology to the zebrafish connexins drCx52.6 (NP\_997984), drCx55.5 (NP\_571887), drCx52.9 (NP\_996976) and drCx52.7 (NP\_001106974).



**Fig. 1: Phylogenetic relationship of carp and zebrafish connexins.** Connexin amino acid sequences were aligned using ClustalW. The neighbour-joining tree based on complete amino acid sequences was generated using MEGA5 program (Tamura *et al.* 2011). Bootstrap values >95% are shown at the nodes. Scale bar indicates the sequence divergence of 5%.

Alignments of aa sequences and phylogenetic relationship analyses (Fig. 1) identified cpCx49.5 and cpCx55.5 as orthologues to drCx52.9 (68%; Zoidl *et al.*, 2008) and drCx55.5 (89%; Dermietzel *et al.*, 2000), respectively. Both, cpCx52.6 and cpCx53.8 showed the highest degree of identity to drCx52.6 (87% and 88%, respectively; Zoidl *et al.*, 2004). Identity scores calculated relative to drCx52.7 showed for cpCx52.6 and cpCx53.8 values of 48% and 57%, respectively. Alignments of the four carp connexin sequences with human and mouse connexins revealed that cpCx49.5 and cpCx55.5 are homologues to human Cx59 (49% and 46%, respectively; NP\_110399), whereas cpCx52.6 and cpCx53.8 are most similar to human Cx62 (46% and 47%, respectively; NP\_115991) and retinal mouse Cx57 (48% and 50%, respectively; Hombach *et al.* 2004).

#### Expression of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5 in the carp retina

In order to analyze the mRNA distribution of the zebrafish orthologous carp connexins cpCx49.5, cpCx52.6, and cpCx55.5 we performed conventional, alcaline phosphatase-based *in situ* hybridization (ISH) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on vertical sections of the carp retina.



**Fig. 2: Expression of cpCx49.5, cpCx52.6- and Cx55.5-mRNA in vertical sections of the carp retina A)** cpCx49.5 sense-riboprobe; **B)** cpCx49.5 in situ hybridization (antisense-riboprobe); **C)** cpCx52.6 sense-riboprobe; **D)** cpCx52.6 in situ hybridization (antisense-riboprobe); **E)** cpCx52.6 fluorescence in situ hybridization (antisense-riboprobe); **F)** cpCx55.5 sense-riboprobe; **G)** cpCx55.5 in situ hybridization (antisense-riboprobe); **I)** co-localisation of cpCx52.6- and cpCx55.5-mRNA

When compared, the results shown in Fig. 2 revealed a different and diverse mRNA expression pattern of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5 in the carp retina. Anti-sense riboprobes of cpCx49.5-mRNA revealed expression within the outer plexiform layer (OPL), the inner nuclear layer (INL) and the ganglion cell layer (GCL). Its expression within the very distal part of the INL indicated the presence of cpCx49.5 in HCs. The ubiquitous allocation suggests its expression within other retinal cell types, like bipolar cells and ganglion cells. In comparison to cpCx49.5, anti-sense riboprobes of cpCx52.6 and cpCx55.5 revealed a much more intensive expression pattern, which detection was exclusively restricted between the very distal INL and the OPL. These findings provide first evidence for HC specific expression of cpCx52.6 and cpCx55.5. In case of cpCx52.6 the mRNA detection followed a strict and distinct pattern, showing areas with marginal staining and oval shaped parts of much more intensive staining (Fig. 2D, arrows). In general, the detection of cpCx55.5 mRNA followed this subdivided structure, but with much weaker staining intensity. Based on these findings we assumed a potential expression of cpCx52.6 and cpCx55.5 only within particular HC-types. The somata of carp HC subtypes are known to be localized within distinct sublayers of the

INL and the precise detection of cpCx52.6- and cpCx55.5-mRNA in the very distal INL point to potential expression within H1- and H2-type HCs. Additional FISH confirmed the distinct expression pattern of cpCx52.6 and cpCx55.5 in the distal INL and their potential expression within H1- and H2-type cells. As shown in Fig. 2I the expression pattern for both connexins partly overlap (Fig. 2I, arrows). This colocalisation represents first hint of potential coexpression of cpCx52.6 and cpCx55.5 within the same types of HCs. In all experiments we used sense-riboprobes as negative controls and no such expression pattern was detected for any connexin (Fig. 2A, C, F).

The next approach was dedicated to the investigation of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5 distribution within the carp retina on the protein level. We performed additional immunohistochemical experiments with specific antibodies directed against the known zebrafish homologs (drCx52.9, drCx52.6, drCx55.5) of the carp connexins. To test the specificity of the used antibodies, membrane fractions of subcellular fractionized N2a cells, transfected with appropriate connexin transcripts, were analyzed by western blot (Fig. 3 A, C, E).



Fig. 3: Western blot analysis of cpCx49.5-, cpCx52.6- and cpCx55.5-transfected N2a cells. Immunoreactivity of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5 on vertical sections of the carp retina A) C), E) Western blots of membrane fractions from N2a cells, transfected with transcripts for cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5. The blots were incubated with the approriate antibodies against the zebrafish homologs drCx52.9 (1:1,000), drCx52.6 (1:1,000) and drCx55.5 (1:1,000); secondary antibodies = goat anti chicken IgG hrp conjugated (1:2,000); goat anti rabbit IgG hrp conjugated (1:3,000) **B**); **D**), **E**) immnoreactivity pattern of cpCx49.5 (anti-drCx52.9; 1:750), cpCx52.6 (anti-drCx52.6; 1:750) and cpCx55.5 (anti-drCx55.5; 1:750); cone photoreceptors were visualized by incubation with anti-Fret43 (1:1,000); secondary antibodies = goat anti chicken FITC conjugated (1:200); goat anti rabbit ALEXA488 conjugated (1:600); HMW = high molecular weight (protein marker; kDa); OPL = outer plexiform layer; INL = inner nuclear layer

As shown in Fig. 3, incubation of the western blot with the specific antibodies directed against drCx52.9, drCx52.6 and drCx55.5 resulted in a prominent detection of specific protein bands for the appropriate carp connexin homologs (Fig. 3A, C, E arrows). In case of cpCx49.5 and cpCx55.5 the antibodies exclusively labeled one specific protein band within the appropriate lane. In both cases no crossreaction of the antibody with other proteins was detected.

The immunohistochemical analysis on vertical sections of the carp retina revealed a different distribution pattern of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5. Fig. 3 shows the incubation with anti-FRet43 (magenta, a label for double cones) and the appropriate connexin antibodies (green) (Fig. 3B, D, F). In case of cpCx49.5 and cpCx52.6 the immunoreactivity appeared in a rather consistent and diffused punctual pattern. The major detection of cpCx49.5 was localized within the OPL, but also showed weak diffusion into the distal part of the INL. In comparison to that, the immunoreactivity of cpCx52.6 showed a more defined pattern, which was restricted to the OPL. In both cases the distribution of immnoreactive spots was mostly concentrated around distinct oval shaped spots (fig. 3 B, D, F; marked with stars), which appeared intermittently throughout the border between OPL and INL and most likely represent HC somata. The labeling within the OPL might indicate the attendance of both connexins in dendro-dendritic gap junctions between homologously coupled HCs, since their dendritic expansion is known to be restricted to the OPL. In comparison to cpCx49.5 and cpCx52.6 the immunohistochemical analysis of cpCx55.5 revealed remarkable differences in the appearance and the distribution of cpCx55.5 positive staining. The labeling appeared in the detection of broad and elongated spots which showed the gap junction typical patch-like fashion. Another major difference to the labeling of cpCx49.5 and cpCx52.6 consists in the fact that cpCx55.5 detection was not restricted to the OPL but showed extensive expansion into the distal INL (Fig. 3F, arrow). Besides the denritic spreading of HCs into the OPL, the axon terminals of HCs are known to expand into the INL and this might indicate the existence of cpCx55.5 containing axo-axonal gap junctions.

#### Localisation of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5 in the different horizontal cell types

The findings obtained from in situ hybridization as well as immunohistochemistry revealed distinct mRNA expression and precise protein distribution of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5 within the outer part of the INL and the OPL (Fig. 2; Fig. 3), indicating their expression within HCs. Based on different criteria (size, number and morphology of dendrites, relative proportions of soma and dendrites, presence or absence of an axon and position of the soma) it has been shown that there are four morphological and functional distinct types of HCs in the carp retina. According to their increasing degree of dendritic branching these cells are termed H1-H4. Due to determine the exact distribution of these connexins within the different HC types the next approach of this study was dedicated to examine the appropriate expression of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5 on the single cell level.



**Fig. 4: Distribution of cpCx49.5, cpCx52.6 and cpCx55.5 within the different HC types** Dissociated HCs of the carp retina, fluorescence *in situ* hybridisation (FisH) and immunoreactivity (IR) in the four carp HC subtypes (H1-H4) and axon terminals (AT); antibodies: anti-Cx52.9 (1:750), secondary antibody: goat anti-chicken (FITC conjugated) (1:200); anti-Cx52.6 (1:750), secondary antibody: goat anti-rabbit (Alexa 488) (1:600); anti-Cx55.5 (1:1,000), secondary antibody: goat anti-rabbit (Alexa 488) (1:600); scale bar = 10 μm

The identified connexins (cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx55.5) show distinct and overlapping mRNA expression and protein patterns in HCs of the carp retina. The results of FISH, shown in Fig. 4 document mRNA expression of cpCx49.5 and cpCx55.5 within H1, H2 and H4 type HCs and expression of cpCx52.6 within all four HC types (H1-H4). The mRNA detection of the shown connexins was exclusively localized around the nuclei and weakly spreaded into the soma of the cells. These data mostly match with those derived from immunocytochemistry (Fig. 4, antibody), which revealed expression of cpCx49.5 within H1, H2, and H4 type HCs and expression of cpCx52.6 and cpCx55.5 within all types. Incubation of the cells with anti-drCx52.6 and anti-drCx55.5 resulted in a distinct patched-like pattern at the dendritic tips of the cells and marginal staining around the nuclei, whereas incubation with anti-Cx49.5 showed more distributed staining within the whole soma of the cells. Furthermore, cpCx55.5 was detectable in isolated axon terminals (AT), whereas incubation with anti-drCx52.9 and anti-drCx52.6 revealed no detection of cpCx49.5 and cpCx52.6 in ATs.

#### Distribution of the new identified connexin53.8

As an ortholog of the previous described drCx52.6, we identified the new carp connexin53.8 (cpCx53.8). To examine its precise distribution within the retina and furthermore its exact allocation within the different HC subtypes we generated an antibody (anti-Cx53.8) directed against the C-terminal region of the protein. The specificity of anti-Cx53.8 was tested by

western blot analysis of both, subcellular fractionized carp retinas and membrane fractions of cpCx53.8-transfected N2a cells.



#### Fig. 5: Expression of cpCx53.8 within the carp retina

A) Western blot analysis of subcellular fractionized carp retina (TH = total homogenate; M = membrane fraction; C = cytosolic fraction), incubation with the cpCx53.8 pre-immune serum (1:10,000); secondary antibody: Biorad goat anti-rabbit hrp conjugated (1:3,000); HMW= high molecular weight (protein marker, kDa) **B**) Equivalent western blot as shown in **A**, incubation with anti-Cx53.8 (1:750); secondary antibody: Biorad goat anti-rabbit hrp conjugated (1:3,000) **C**) western blot of membrane fractions, obtained from cpCx53.8-transfected N2a cells, anti-Cx53.8 incubation **D**) Immunohistochemistry with anti-Cx53.8 (1:750) and anti-Fret43 (1:1,000) on vertical section of the carp retina **E**), **F**), **G**), **H**), **I**) Immunocytochemical analysis of cpCx53.8 on dissociated carp HCs (H1-H4) and axon terminals (AT), scale bar = 10  $\mu$ m

The western blot analysis of subcellular fractionized carp retinas revealed prominent detection of cpCx53.8 within the total homogenate and the membrane fraction. No such detection was found within the cytosolic fraction. The pre-immune serum detected proteins in all tested fractions but showed no specific protein banner at the expected molecular weight (~ 55 kDa) within the membrane fraction. Incubation of the western blot of seperated membrane fractions of transfected N2a cells also revealed a prominent protein detection exclusively within the

cpCx53.8 lane (Fig. 5C, arrow). There was no detectable crossreaction of anti-Cx53.8 with any other protein.

According to its high specificity we used anti-Cx53.8 to investigate the distribution pattern of cpCx53.8 in the carp retina. The immunohistochemical analysis revealed distinct patched-like staining within the OPL and the distal INL (Fig. 5D). Again potential HC somata, visible in form of oval shaped regions (Fig. 5D, stars) were cognizable. In general, the immuno detection followed a comparable adjustment to the distribution pattern of cpCx55.5 (see Fig. 3F), however the detected cpCx53.8 immunoreactive spots appeared much more defined in a rounded form and less diffused background staining. The far-reaching distribution of cpCx53.8 into parts of the distal INL provides first hints for potential coexpression of cpCx53.8 within several HC subtypes. Immunohistochemical analysis on isolated HCs confirmed this assumption, since cpCx53.8 was detectable in all four types of carp HCs (Fig. 5E, F, G, H) and in isolated axon terminals (AT) (Fig. 5I). The immunoreactivity pattern appeared in a patched-like fashion and was mainly localized at the dendritic tips of the cells. In addition, weaker immunoreactive staining was detected within the cells, which appeared in a much more diffused and small spotted pattern in or near by the cells nuclei.

#### Single cell PCR

Due to define and verify the results obtained from immunohistochemistry, *in situ* hybridisation and fluorescence *in situ* hybridisation on dissociated HCs (see Fig. 4 and 5) we investigated the expression of the four connexin genes within the different HC subtypes by using semi-quantitative single cell RT-PCR.





A) PCR results (agarose gel) for  $\beta$ -actin, cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx55.5 and cpCx53.8; 3  $\mu$ l cDNA template/ sample; negative control (-) = H<sub>2</sub>O, positive control (+) = carp 5`-RACE cDNA, PR = photoreceptor **B**) middle values of the optical density of the lanes in the agarose gel for all tested HCs (23); **C**) ratio of the optical density between each connexin and  $\beta$ -actin, **D**) bar diagram for all HC types and the ratio of expression patterns of each connexin and  $\beta$ -actin
We picked 23 HCs (5 x H1; 6 x H2; 6 x H3; 6 x H4) and performed reverse transcription reaction to obtain the copyDNA (cDNA) of each of these cells. PCR was performed with specific primers against all four connexins for every cell (see material & methods). The results shown in fig. 8A represent an example of 13 HCs and 1 photoreceptor (PR) (obtained from the first approach). We used one sample with water as a negative control (-) and a positive control (+) containing carp 5'-RACE cDNA. To prove the amount of cDNA within every sample we first tested the expression of the house keeping gene ß-actin and revealed a comparable amount of ß-actin in all tested samples (Fig. 6A, ß-actin). In order to testify the expression of the different connexin genes, the optical density of each sample was measured (ImageJ). The middle values of the optical density for each connexin and each cell type are shown in fig. 8B and the ratio of connexin cDNA and the analogous ß-actin expression is represented by the values shown in Fig. 6C. The determined values permit precise predictions about the different expression levels of the connexins in each HC subtype. The results revealed different expression levels of the four connexins within the HC subtypes. cpCx49.5 showed relatively consistent expression in H1 (1.11), H2 (1.11) and H4 (1.19) cells but there was merely no detectable expression in H3 (0.09) types cells. These findings match with those derived from immuno incubation on dissociated HCs (fig. 4), where no cpCx49.5-positive H3 cells was found. In case of cpCx52.6 the analysis revealed highest expression within H2 (2.15) cells and expression of lower states within H3 (1.75), H4 (1.40) and H1 (0.87). Cx55.5 showed highest expression within H1 (1.45), lower but relatively constant expression within H2 (0.98) and H4 (0.89) and very low detection within H3 (0.18). As assumed, cpCx53.8 was expressed in all tested cells with very high scores for H3 (2.09) and H4 (1.81) and lower scores for H1 (1.11) and H2 (1.43).

### Ultrastructural analysis of cpCx53.8 and cpCx55.5 in the carp retina

The precise immuno detection of cpCx53.8 and cpCx55.5 at the dendritic tips of dissociated HCs (see Fig. 4 and 5) provided first hints for their relevance in forming dendro-dendritic gap junctions between homologous HCs. Furthermore, the distribution pattern for both connexins on vertical sections of the carp retina (Fig. 3F and 5D), which revealed extensive expansion of cpCx53.8 and cpCx55.5 immunoreactivity in far reaching parts of the INL, point to their attendance in axo-axonal gap junctions. To verify this hypothesis we examined the ultrastructural distribution of cpCx53.8 and cpCx55.5 by immunoelectron microscopy. It emphasizes that anti-cpCx53.8 and anti-drCx55.5 label distinct gap junction structures within the OPL (fig. 7, marked by arrows) and the INL (fig. 7, marked by arrowheads). Magnification of the appropriated areas identified the immunoreactive spots in the OPL and the INL as gap junctions between HC dendrites (fig. 7B) and axon terminals (fig. 7C), respectively. In accordance to the immunohistochemical data, showing prominent immunoreactivity of cpCx53.8 and cpCx55.5 plaques in the OPL and INL the electron microscopical analysis also revealed clear defined patch-like pattern. In summary these data confirmed the abundance of cpCx53.8 and cpCx55.5 as components of dendro-dendritic and axo-axonal gap junctions between carp HCs.



Fig. 7: Immunoelectron microscopy of cpCx53.8 and cpCx55.5 in the carp retina

## Discussion

HC network formation in the carp retina is enabled by homologous coupling of the four known HC subtypes (H1-H4). In this study we show for the first time the detailed distribution of four newly identified connexins (cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 and cpCx55.5) within carp HCs. By a multiple methods approach we examined the opposed hypotheses, of consistent subtype specific connexin expression on the one hand and potential overlapping connexin expression in different HC subtypes on the other hand.

The developmental processes and mechanisms leading to HC network formation are rather undefined. Even though, previous studies assumed that regulation of HC morphology, connectivity (gap junctional coupling) and retinal coverage is mainly organized by local density of the different HC subtypes as well as their specific homotypic neighbors (Reese *et al.*, 2005). Furthermore, the role of the gap junction forming proteins (connexins) and specific scaffolding proteins, like cadherin in processes like synaptic terminal organization and intercellular spacing of HCs is discussed (Tanabe et al., 2006). Up to now the precise mechanisms and processes contributing to HC network formation still remains unclear. In large parts this is due to the fact that it is still a matter of debate how gap junctions of independent HC circuits are composed.

### Expression of Cx49.5, Cx52.6, Cx53.8 and Cx55.5 in the retina

The data obtained from immunohistochemistry and in situ hybridization experiments on cryosections of the carp retina indicated expression of all four connexins in HCs. However, the immuno incubation revealed remarkable differences in the appearance of the immunoreactive puncta; cpCx49.5 and cpCx52.6 detection was rather restricted to the OPL

and the very distal INL, whereas detection of cpCx53.8 and cpCx55.5 appeared in huge gap junction like plaques, reaching far into proximal parts of the INL. The anatomical arrangement of HC somata in the carp retina follow distinct seperation into four sublayers of the INL, correspondent to the four HC subtypes and their degree of branching, going from distal (H1 cells) to proximal (H4 cells). The cells are subdivided into two groups, those with an axon (H1-H3) and those without an axon (H4). The two different compartments (dendrites and axon terminals) of these cells form seperated networks, which also show distinct spatial seperation. The dendro-dendritic network formation of each subtype correspond more or less with their localization in the INL sublayers. The axo-axonal networks of the axon bearing HC subtypes (H1-H3) are located beneath the cell somata and reach far into proximal parts of the INL. Based on our data, it seems obvious that dendro-dendritic network formation of the external located horizontal cells (H1 and H2) is enabled by distinct assembly of all four connexins to either homotypic or heterotypic gap junctions. Whereas dendritic networks of the proximal located subtypes (H3 and H4) are organized by cpCx53.8 and cpCx55.5 containing gap junctions. Moreover, our data suggest that the axo-axonal network formation is exclusively arranged by cpCx53.8 and cpCx55.5.

## Differential connexin expression in horizontal cell subtypes

Based on the data obtained from immunohistochemistry and in situ hybridization on sections of the carp retina, we examined the precise distribution of the four connexins in the horizontal cell subtypes and their axon terminals, respectively. Our results revealed ubiquitous mRNA and protein distribution of the four connexins within the different horizontal cell subtypes. whereby the first hypothesis of consistent individual connexin expression in each horizontal cell subtypes was disproved. Obviously the formation of gap junction channels in carp horizontal cells is organized in a more complex way than previously thought. Thus our data assume cpCx49.5-expression in H1, H2 and H4 cells and cpCx52.6-, cpCx53.8- and cpCx55.5-expression in all four subtypes. This coexpression strongly indicates that homologous coupling of horizontal cells is organized by heterotypic gap junctions. Coincident with the findings obtained from immunohistochemistry, dissociated axon terminals showed positive immunoreactive detection only for cpCx53.8 and cpCx55.5, indicating once more, that axo-axonal network formation of carp horizontal cells is exclusively organized by these connexins. Ultrastructural analysis using immunoelectron microscopy confirmed the distribution of cpCx53.8 and cpCx55.5 gap junctions within horizontal cell dendrites and axon terminals. Furthermore, cpCx53.8 and cpCx55.5 staining was not observed inside the rod spherules or cone pedicles. Coincident with previous studies on mouse connexin57, which shows high homology to the carp connexins, this supports the hypothesis that these connexins are not involved in mediating ephaptic feedback to photoreceptors (Dedek et al., 2008; Janssen-Bienhold et al., 2009).

Additional investigations revealed quantitative differences in the expression levels of the four connexins within each horizontal cell subtype. The data obtained from single cell RT PCR confirmed that cpCx49.5 is merely absent in H3-type cells. Therefore it is most likely that coupling of H3 cells is organized by the distinct assembly of gap junction channels composed of cpCx52.6, cpCx53.8 and cpCx55.5. The appropriate expression levels of the other three connexins in the particular HC subtypes varied, showing highest values of cpCx52.6 in H2 and H3 cells, cpCx53.8 in H3 and H4 cells and cpCx55.5 in H1 cells. The expression of cpCx49.5 in H1, H2 and H4 cells appeared to be on a constant level.

In conclusion, these findings indicate overlapping connexin expression in different HC subtypes and furthermore support the hypothesis of distinct connexin expression within different compartments of HCs, like previously described by Cha *et al.*, 2012 in rabbit B-type HCs. It is most likely, that dendro-dendritic gap junctions in carp HCs are formed by distinct

combinations of cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 and cpCx55.5, whereas the axo-axonal gap junctions seem to be exclusively composed of cpCx53.8 and/ or cpCx55.5.

#### Literature cited

- Cha J, Kim HL, Pan F, Chun MH, Massey SC, Kim IB. 2012. Variety of horizontal cell gap junctions in the rabbit retina. Neuroscience Letter. 510:99-103.
- Dacheux RF, Raviola E. 1990. Physiology of H1 horizontal cells in the primate retina. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1295:213-230.
- Dermietzel R, Kremer M, Paputsoglu G, Stang A, Skerrett IM, Gomes D, Srinivas M, Janssen-Bienhold U, Weiler R, Nicholson BJ, Bruzzone R, Spray DC. 2000. Molecular and functional diversity of neural connexins in the retina. J Neuroscience. 22:8331-8343.
- Dowling JE. 1991. The Charles F. Prentice Medal Award Lecture 1991: dopamine; a retinal neuromodulator. Optom Vis Science. 69:507-513.
- Dowling JE, Werblin FS. 1969. Organization of retina of the mudpuppy, Necturus maculosus. I. Synaptic structure. J. Neurophysiol. 32:315-338.
- Evans WH, Ahmad S, Diez J, George CH, Kendall JM, Martin PE. Trafficking pathways leading to the formation of gap junctions. Novartis Found Symp. 219:44-54.
- Falk MM. 2000. Biosynthesis and structural composition of gap junction intercellular membrane channels. Eur J Cell Biol. 8:564-574
- Goodenough DA. 1996. Connexins, connexons and intercellular communication. Annu Rev Biochem. 65:475-502.
- Hombach s, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schuber T, Büssow H, Ott T, Weiler R, Willecke K. 2004. Functionl expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. European Journal of Neuroscience. 19:2633-2640.
- Janssen-Bienhold U, Nagel H, Weiler R. 1993. In vitro phosphorylation in isolated horizontal cells of the fish retina: effects of the state of light adaptation. European Journal of Neuroscience. 5:584-593
- Janssen-Bienhold U, Trümpler J, Hilgen G, Schultz K, de Sevilla Müller LP, Sonntag S, Dedek K, Dierks P, Willecke K, Weiler R. 2009. Connexin57 is expressed in dendrodendritic and axo-axonal gap junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. The Journal of Comparative Neurology. 513:363-374.
- Kamermans M, Spekreijse H. 1999. The feedback pathway from horizontal cells to cones. A mini review with a look ahead. Vision Res. 15:2449-68.
- Kaneko A. 1973. Receptive field organization of bipolar and amacrine cells in the goldfish retina. J. Physiol. 1:133-153.
- Klaassen LJ, Sun Z, Steijaert MN, Bolte P, Fahrenfort I, Sjoerdsma T, Klooster J, Claassen Y, Shields CR, Ten Eikelder HMM, Janssen-Bienhold U, Zoidl G, McMahon DG, Kamermans M. 2011. Synaptic transmission from horizontal cells to cones is impaired by loss of connexin hemichannels. Plos Biology. 9.
- Laird DW. 1996. The life cycle of a connexin: Gap junction formation, removal, and degradation. J. Bioernerg. Biomembr. 4:311-8.
- O'Brien J, Wei L, Pan F, Keung J, O'Brien J, Massey SC. 2006. Coupling between A-type horizontal cells is mediated by connexin 50 gap junctions in the rabbit retina. J Neuroscience. 45:11624-11636.
- Pan F, Keung J, Kim IB, Snuggs MB, Mills SL, O'Brien J, Massey SC. 2012. Journal of Comparative Neurology. 520:2256-2274.
- Puller C, de Sevilla Müller LP, Janssen-Bienhold U, Haverkamp S. 2009. ZO1 and the spatial organization of gap junctions and glutamate receptors in the outer plexiform layer of the mammalian retina. J. Neuroscience. 19:6266-6275.

- Reese BE, Raven MA, Stagg SB. 2005. Afferents and homotypic neighbors regulate horizontal cell morphology, connectivity, and retinal coverage. Journal of Neuroscience. 25:2167-2175.
- Shields CR, Kloosters J, Claassen Y, Ul-Hussain M, Zoidl G, Dermietzel R, Kamermans M. 2007. Retinal horizontal cell-specific promoter activity and protein expression of zebrafish connexin 52.6 and connexin 55.5. Journal of Comparative Neurology. 501:765-779.
- Stell WK, Lightfoot DO, Wheeler TG. 1975. Goldfish retina: Functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses. Science. 190:989-990.
- Sun Z, Risner ML, van Asselt JB, Zhang DQ, Kamermans M, McMahon DG. 2012. Physiological and molecular characterization of connexin hemichannels in zebrafish retinal horizontal cells. J Neurophysiol. 107:2624-2632.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739.
- Tanabe K, Takahashi Y, Sato Y, Kawakami K, Takeichi M, Nakagawa S. 2006. Cadherin is required for dendritic morphogenesis and synaptic terminal organization of retinal horizontal cells. Development. 133:4085-4096.
- Teranishi T, Negishi K. 1993. Double-staining of horizontal and amacrine cells by intracellular injections with Lucifer Yellow and Biocytin in carp retina. Neuroscience 1:217-226.
- Thoreson W, Mangel SC. 2012. Lateral interactions in the outer retina. Prog Retin Eye Res. 5:407-41.
- Twig G, Levy H, Pearlman I. 2003. Color opponency in horizontal cells of the vertebrate retina. Progress in Retinal and Eye Research. 22:31-68.
- Weiler R. 1978. Horizontal cells of the carp retina: Golgi impregnations and Procion-Yellow injections. Cell Tissue Res. 195:515-526.
- Zoidl G, Bruzzone R, Weickert S, Kremer M, Zoidl C, Mitropoulou G, Srinivas M, Spray DC, Dermietzel R. 2004. Molecular cloning and functional expression of zfCx52.6: a novel connexin with hemichannel-forming properties expressed in horizontal cells of the zebrafish retina. J Biol Chem. 279:2913-2921.

# Phosphorylation of the horizontal cell-specific connexin Cx53.8 in the fish retina: effects of light, prolonged darkness, dopamine and all-trans retinoic acid

Sebastian Hermann<sup>1</sup>, William H. Baldridge<sup>2</sup>, Reto Weiler<sup>1</sup>, and Ulrike Janssen-Bienhold<sup>1</sup> <sup>1</sup>Neurobiology, University of Oldenburg, 26111 Oldenburg, Germany, <sup>2</sup>Department of Anatomy and Neurobiology, Laboratory for Retina and Optic Nerve Research, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada

## Abstract

Carp horizontal cells are homologously coupled by gap junction channels. Prior studies revealed that horizontal cell coupling is modulated by ambient light levels and several neuromodulators, including dopamine (DA) and *all-trans* retinoic acid (at-RA). However it is not clear how these neuromodulators exert their effects on the channel-forming connexins. In a previous study, we showed that carp horizontal cells express four homologous connexins and generated an antibody against one of them, termed cpCx53.8. Immunoblotting showed that cpCx53.8 was phosphorylated when the retina was light-adapted, prolonged dark-adapted or when the light-sensitized retina was incubated with DA or at-RA. The DA-induced phosphorylation was blocked by D1-dopamine-receptor (DAR<sub>1</sub>) antagonist SCH23390 and protein kinase A (PKA) inhibitor H89. The at-RA-induced phosphorylation was blocked by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinase C (PKC).

These findings were consistent with the effects of the same neuromodulators on gap junction coupling of horizontal cells, shown by intracellular recording or neurobiotin-injection. Incubation of light-sensitized retinas with DA or at-RA decreased both the receptive-field size and the extent of tracer coupling. The physiological effects of DA and at-RA, which were comparable to those induced by light adaptation or prolonged darkness were inhibited by pre-incubation of light-sensitized retinas with the inhibitors, respectively.

Our data show that the horizontal cell-specific cpCx53.8 is a substrate for PKA and PKC. Thus, we propose that light- and dark-induced reduction of horizontal cell coupling is accompanied by increased connexin phosphorylation mediated by various signal pathways including a DA-cAMP-PKA-pathway and a RA-PKC-pathway.

## Introduction

The ability of the visual system to adapt to different light intensities is provided mostly by distinct neuronal adaptation processes in the retina. The network of electrically coupled horizontal cells represents the first neuronal network within the vertebrate retina in which cellular and molecular processes take place that lead to the adaptation to ambient light level (Mangel and Dowling, 1985; Bloomfield *et al.*, 1995). Electrophysiological and tracer-coupling studies have revealed a relationship between the extent of horizontal cell networks and different ambient light levels (Xin and Bloomfield, 1999; Bloomfield and Volgyi, 2004). Furthermore there is evidence that light-dependent modulation of horizontal cell coupling is mediated by neuromodulators such as DA (Mangel and Dowling, 1987; Knapp and Dowling, 1987; Yang *et al.*, 1998; Deniels and Baldridge 2011) and at-RA (Weiler *et al.*, 1998; Weiler *et al.*, 2000; Zhang and McMahon, 2001).

The signal transduction cascades mediating the effects of the neuromodulators have been elucidated only partially. DA exerts its uncoupling effect on horizontal cells via the DAR<sub>1</sub> (Piccolino *et al.*, 1984; Witkovsky, 2004) and other studies point to the participation of different second messengers (cAMP, cGMP, Ca<sup>2+</sup>), protein kinases, and changes of intracellular pH in the regulation of horizontal cell gap junction coupling (Lasater and

Dowling, 1985; McMahon, 1994; McMahon and Mattson, 1996; Lampe and Lau, 2000; Baldridge and Fischer, 2001). Second messengers can influence proteins via activation of protein phosphorylation systems, and several connexins have been characterized as substrates of protein kinases in different tissues, including the nervous system (Lampe and Lau, 2000; Lampe and Lau, 2004) and the retina (Urschel *et al.*, 2006).

There are four types of horizontal cells (H1-H4) in the carp retina, each of which is coupled homologously by gap junctions, resulting in the formation of four independent neuronal networks (Weiler, 1978). Furthermore, four closely related horizontal cell connexins, identified by their molecular weight and termed cpCx49.5, cpCx52.6, cpCx53.8 and cpCx55.5, have been characterized in the carp retina. In a seperate study we generated an antibody against cpCx53.8 and showed immunohistochemically that this connexin is found exclusively in horizontal cells in the carp retina, being localized to gap junctions in all four subtypes of horizontal cells (unpublished data). The antibody also detects phosphorylated isoforms of cpCx53.8, enabling us to investigate how changes of the light adaptational state of the retina and different neuromodulators, implicated in the modulation of horizontal cell coupling, affect the phosphorylation of cpCx53.8 we also tested the effect of specific protein kinase blockers. The physiological relevance of connexin phosphorylation was approved by combining the molecular based findings with tracer coupling and receptive field size assessment.

# Material & Methods

## **Test animals**

All experiments were performed on *Cypriniformes*. The western blot analyses were performed on 1-2 year old carp (*Cyprinus carpio*) supplied by a fish farm at Visbek, near Oldenburg. The animals were kept in an aerated basin at 18-20°C under a 12-h dark and light cycle. Intracellular recordings and tracer injections were performed on 1 year old goldfish (*Carassius auratus*) obtained from the Dalhousie University (Aquatron). The fish were kept in a tank at 16°C under a 12-h dark and light cycle. For experiments, the animals were transferred to a smaller tank and kept under the appropriate light condition. All animals were handled in accordance with the institutional guidelines for animal welfare at the University of Oldenburg and Dalhousie University and the laws on animal experimentation issued by the German and the Canadian governments, respectively.

## Preparation and incubation of the retina

Fish were dark adapted for 1 hour and exsanguinated by decapitation. The eyes were enucleated and the cornea, lens and vitreous were removed from the evecup. Isolation of the retina was accomplished as described by Janssen-Bienhold et al., 1993. The retina was isolated from the eyecup in a petri dish filled with either Leibowitz L15 medium (L15) or Ringer's solution (HEPES fishringer; 120 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1mM MgCl x 6 H<sub>2</sub>O, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 16 mM D-glucose, 2 mM HEPES; pH 7.4). After 30 min of equilibration the isolated retinas were incubated for 1 hour under the appropriate conditions (see Table 1). Where indicated the retinas were pre-incubated with kinase blockers or antagonists for 15 min prior to the application of the appropriate modulator. Besides the effects of different neuromodulators, we also examined the influence of different light adaptational states of the retina on gap junction coupling, receptive field size and connexin phosphorylation. According to previous studies (Yang et al., 1988; Baldridge et al., 1995), we used the terms prolonged dark-adapted, light-sensitized and light-adapted for the appropriate adaptational state of the retina. For light adaptation the retinas were incubated in L15 under bright light (photopic range; approx.  $1,000 \text{ cd/m}^2$ ), obtained by a cold light lamp for 45 min at roomtemperature (RT). For control conditions (light-sensitized) the retinas were subjected to dim red light (mesopic range; approx. 30 cd/ m<sup>2</sup>) for 45 min at RT. Prolonged darkness adaptation was carried out for 3 hours in complete darkness (scotopic range; approx. 0.002 cd/ m<sup>2</sup>). The retinas were homogenized in buffer (HP<sub>2</sub>; 50 mM Tris, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1mM DTE, 1mM PMSF, 2  $\mu$ M Leupeptin, 5  $\mu$ M Aprotinin, 0,1 mM Orthovanadate), containing 1  $\mu$ M protease-blocker and 1  $\mu$ M phosphatase-blocker (ProtStop, PhosStop; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

| Drug/ neuromodulator               | final concentration | Manufacturer             |
|------------------------------------|---------------------|--------------------------|
|                                    |                     | Sigma-Aldrich Chemie     |
| dopamine (DA)                      | 500 µM              | GmbH, Steinheim, Germany |
|                                    |                     | Promega GmbH, Mannheim,  |
| 8-bromo-cyclic AMP (8-Br-cAMP)     | 10 µM               | Germany                  |
|                                    |                     | Sigma-Aldrich Chemie     |
| all-trans retinoic acid (at-RA)    | 10 µM               | GmbH, Steinheim, Germany |
| H89 (Dihydrochloride Hydrate) (PKA |                     | Sigma-Aldrich Chemie     |
| inhibitor)                         | 2 µM                | GmbH, Steinheim, Germany |
|                                    |                     | Sigma-Aldrich Chemie     |
| staurosporine (PKC inhibitor)      | 1 µM                | GmbH, Steinheim, Germany |
|                                    |                     | Promega GmbH, Mannheim,  |
| UO126 (MAP kinase inhibitor)       | 5 μΜ                | Germany                  |
| SCH23390 (D1-type dopamine         |                     | Sigma-Aldrich Chemie     |
| receptor antagonist)               | 10 µM               | GmbH, Steinheim, Germany |

Table 1: Neuromodulators and kinase inhibitors used for biochemical and electrophysiological experiments

## SDS PAGE and Western-Blot analysis

Crude subcellular fractionation was performed as described previously by Janssen-Bienhold et al. (2009). The total protein lysates of the homogenized retinas were fractionated by differential centrifugation steps, providing total homogenate (TH), membrane fraction (M) and cytosolic fraction (C). The total protein concentration of each fraction was assayed by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. 40 µg of protein fraction were sodium-dodecylsulfate separated by (SDS) polyacrylamide per gelelectrophoresis (SDS-PAGE) on 8-10% polyacrylamide gradient gels and transferred to a nitrocellulose membrane (Optitran BA-S 85; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) overnight at 4°C. The blot was then incubated with 5% powdered milk in Tris-buffered saline-Tween (TBST; 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20, pH 7.4) at 37°C for 1 hour to block nonspecific binding sites. Incubation with the primary antibody (anti-Cx53.8; 1:750 in TBST) was performed overnight at 4°C. Unbound primary antibodies were removed by several washes with TBST before the blot was incubated with the secondary antibody (goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (BioRad Laboratories, Munich, Germany; 1:3,000 in TBST) for 2 hours at RT. After washing, the immunoreactive proteins were visualized using a chemiluminescence detection system (Pierce ECL; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) following the manufacturer's instructions.

### **Dephosphorylation of cpCx53.8**

Due to refer changes in cpCx53.8 immunoreactivity on western blots to different phosphorylated isoforms of cpCx53.8 we used alkaline phosphatase (AP) to induce dephosphorylation. Therefore, the retinas were homogenized in a modified homogenization buffer (HPAP; 20 mM Tris, 10 mM DTE, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, pH 7.4) containing 1  $\mu$ M protease-blocker (ProtStop, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The appropriate samples (40  $\mu$ g protein of the membrane fraction) were incubated for 2 min in a microwave to block any enzymatic activity. Afterwards, 6  $\mu$ l of AP (Boehringer Mannheim,

Germany) were added to the samples and incubated for ~19 hours at 37°C. Samples were analyzed by western blot analysis as descired in the previous section.

## Intracellular recordings

The intracellular recordings on isolated goldfish retinas were performed as described by Daniels and Baldridge (2011). Thin-wall borosilicate glass electrodes (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL) were pulled using a Flaming–Brown P-97 microelectrode puller (Sutter Instruments, Novato, CA) and filled with 2.5 M KCl, yielding electrode resistance between 80–120 MΩ. Isolated retinas were superfused with bicarbonate-buffered Ringer's solution (100 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, aerated with carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) to maintain a pH of 7.4). Light stimulation was accomplished by a modified Powerlite S1+ digital projector (Epson Canada, Toronto, Canada) controlled by ACME 500i software. Intracellular recordings were amplified using a Dagan 8700 Cell Explorer amplifier (Dagan Corporation, Minneapolis, MN) and recorded and analyzed using Axoscope 9.0 (Axon Instruments Inc., Union City, CA).

The specific types of horizontal cells were identified based upon their characteristic responses to chromatic stimuli (Stell *et al.*, 1975; Stell & Lightfoot, 1975). For the assessment of receptive-field size, the peak response to a centered spot of white light (100  $\mu$ m diameter) was compared to the peak response to an annulus stimulus (1.0 mm inner diameter and 1.5 mm outer diameter). Due to differentiate between spot and annulus stimuli, the spot stimuli were presented for 500 ms and the annulus stimuli were presented for 1,000 ms each with a gap of 500 ms between. Where indicated, the retina was superfused for 15 min in Ringer's solution containing either a PKA inhibitor (H89, 2  $\mu$ M; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) or a PKC inhibitor (staurosporine, 1  $\mu$ M; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), prior to the application of the same superfusate containing DA or at-RA.

### **Neurobiotin injections**

The tracer coupling experiments were performed on an inverted eyecup preparation, as first described by Weiler *et al.* (1998). After decapitation, the eye was enucleated and hemisected under dim red light. The eycup was inverted on a wooden dome and fixed with small pieces of tissue paper that also served as a conduit for drainage. The eyecup was superfused continuously with a Ringer solution containing 102 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM D-glucose, 28 mM NaHCO<sub>3</sub>, and aerated with carbogen (pH 7.4). Neurobiotin injections were carried out for 8 min by means of rectangular pulses of +2 nA amplitude and 1 s duration every 3 s. For diffusion of the tracer, the retinas were left on the dome for 20 min. Afterwards, the eyecup was fixed in 0.1 M PB containing 2% paraformaldehyde (PFA) at RT (2 x 10 min), rinsed with 0.1 M PB (pH 7.4), and incubated overnight with 1% streptavidin conjugated to Alexa 488 (1% Triton X-100 in 0.1 M PB, 4°C). The retina was then gently removed from the eyecup and placed vitreous side-up on a glass slide and examined with a Leica TCS SL confocal microscope.

## Results

The precise mechanisms that regulate gap junction permeability and gating properties of horizontal cells are undefined. By combining protein biochemical and physiological experiments we gained insight into light dependent modulation of the horizontal cell specific connexin cpCx53.8 and its impact on physiological properties of gap junction communication. Due to the idea of a triphasic organization of horizontal cell adaptation we tested three different ambient light conditions of mesopic-, scotopic- and photopic-range intensities. In accordance with prior studies of the light dependent reduction of horizontal cell coupling (Yang *et al.*, 1988; Baldridge *et al.*, 1995) we adapted the terms *prolonged dark-adapted*,

*light-sensitized* and *light-adapted* for the appropriate ambient light conditions (see methods). We first investigated the effects of light adaptation and prolonged darkness on the phosphorylation state of cpCx53.8 in comparison to light-sensitized conditions.



#### Fig. 1: Phosphorylation and dephosphorylation of cpCx53.8

Western blot analysis of membrane fractions obtained from prolonged dark-adapted (PD), light-sensitized (LS) and light-adapted (LA) carp retinas and subsequent treatment of the appropriate samples with alkaline phosphatase (AP).

Different adaptation paradigms resulted in distinctive changes of the molecular weight of cpCx53.8 protein detection. Samples obtained from light-sensitized retinas showed two prominent immunoreactive bands at ~55-57 kD (Fig. 1, asterisks), indicating the presence of different isoforms of cpCx53.8 showing marginal differences in molecular weight. Light adaptation, as well as prolonged darkness, led to a shift in cpCx53.8 immunoreactivity and to the appearance of prominent bands at ~60-64 kD (Fig. 1, arrows). To test whether these higher molecular weight protein bands represent phosphorylated isoforms of cpCx53.8, we treated the samples with alkaline phosphatase (AP), which should reverese the shift in molecular weight by removing phosphate groups. After AP treatment, cpCx53.8 immunoreactivity was consistently located at ~50 kD (Fig. 1, arrow heads), representing the unphosphorylated (native) protein. The fact that the adaptation-induced shifts of cpCx53.8 immunoreactivity were eliminated by incubation of the samples with AP indicates that the higher molecular weight bands represent phosphorylated isoforms of cpCx53.8. These findings clearly identified cpCx53.8 as a phosphoprotein showing different states of phosphorylation as a function of the adaptation state of the retina. Next we assessed the effects of DA and the membrane permeable form of cAMP (8-Br-cAMP) on cpCx53.8 phosphorylation.



**Fig. 2: Effects of DA, 8-Br-cAMP and protein kinase inhibitors on cpCx53.8 phosphorylation A)** Membrane fractions obtained from light-sensitized (LS) and light-adapted (LA) carp retinas and lightsensitized retinas incubated with dopamine (DA). Effect of the DAR<sub>1</sub> antagonist SCH23390 (SCH) and protein kinase A inhibitor H89 on DA-treated retinas and cpCx53.8 phosphorylation; **B)** Effect of protein kinase C inhibitor staurosporine (stau) and MAP kinase inhibitor (UO126) on DA-treated retinas; **C)** Effect of 8-BrcAMP (cAMP) on light-sensitized retinas and the influence of H89 on 8-Br-cAMP treatment; In all experiments, membrane fractions of light-sensitized and light-adapted carp retinas were used as controls

We found that incubation of light-sensitized retinas with DA resulted in a shift of cpCx53.8 immunoreactivity with additional immunoreactive protein bands at ~60-64 kD (Fig. 2A, 2B, arrow heads). Within the light-sensitized samples, the immuno detection was restricted to a protein band at ~55 kD and a shift of immunoreactivity up to ~58 kD (Fig. 2A and 2B, arrows). This immunoreactive pattern is equivalent to the protein double layer (~55-57 kD), as described before for the light-sensitized condition (Fig. 1). Differences in the appearance of the immunoreactive protein bands result from methodic variabilites, e.g. the polyacrylamide concentration, marginal differences in the polyacrylamide gradient used for the SDS-PAGE or the elapsed time of the SDS-PAGE. To determine the mechanism of the DA-induced phosphorylation of cpCx53.8 we tested the effect of several protein kinase inhibitors as well as the DAR<sub>1</sub> antagonist SCH23390. We pre-incubated light-sensitized retinas with the appropriate inhibitor or antagonist prior to application of DA. To enhance visualization of the phosphorylation shifts within the different samples, membrane fractions of light-sensitized and light-adapted retinas were used as controls in every single experiment. As shown in Fig. 2A and 2B, incubation of light-sensitized retinas with DA always resulted in a phosphorylation shift similar to that found in light-adapted retinas of each experiment (similar results were obtained in 5 retinas). We also found that the effect of DA was inhibited by preincubation with SCH23390 (Fig. 2A; n = 4) and the specific PKA inhibitor H89 (Fig. 2A; n =5). In both cases there was no detectable increase in cpCx53.8 phosphorylation compared to the light-sensitized samples. Pre-incubation of retinas with the PKC inhibitor staurosporine or

the MAP kinase inhibitor UO126 had no effect on the DA-induced phosphorylation of cpCx53.8 (Fig. 2B; n = 4).

As the inhibition of DA-induced phosphorylation of cpCx53.8 by H89 suggested the involvement of PKA, we tested the influence of the second messenger cAMP, which is known to be part of the intracellular PKA signal transduction cascade. As shown in Fig. 2C, incubation of light-sensitized retinas with the membrane-permeable analogue of cAMP, 8-Br-cAMP, resulted in increased cpCx53.8 phosphorylation (n = 3), indicated by immunoreactive protein bands at ~59-66 kD (Fig. 2C, arrow heads), bands of greater molecular weight than those detected in the light-sensitized samples (limited to ~55 and 58 kD, Fig. 2C, arrows). The effect of 8-Br-cAMP on cpCx53.8 phosphorylation was completely inhibited by pre-incubation with H89 (n = 3).

Next we wanted to determine if the findings obtained from western blot analysis corresponded to changes of gap junction coupling and horizontal cell receptive-field size. Adding to previously described effects of DA on horizontal cells we expanded the investigation to test the influence of H89 on DA-induced decreases of horizontal cell receptive-field size and gap junction coupling. The following intracellular recordings and tracer coupling experiments were obtained from goldfish retinas. Western blot analysis of membrane fractions of goldfish retinas demonstrated that Cx53.8 is expressed and modulated (phosphorylated) in the same way as in carp retinas (data not shown).



Fig. 3: Effect of light adaptation, prolonged darkness and DA incubation on horizontal cell responses to annulus and spot stimulation and horizontal cell tracer coupling

A) Representative recording of a H2 horizontal cell to annulus and spot stimuli in a light-sensitized (LS) retina and after light adaptation (LA); B), C), D), E) Comparison of mean response amplitudes to annulus and spot stimulation of H2 horizontal cells in light-sensitited, light-adapted, prolonged dark-adapted (PD), DA-incubated (DA) and H89 pre-incubated (H89) retinas F), G), H) Representative images of neurobiotin tracer coupling of H2 horizontal cells in prolonged dark-adapted (F), light-sensitized (G), and light-adapted (H) retinas. I), J) Effect of dopamine (DA) on H2 horizontal cell tracer coupling in a light-sensitited retina (I) and preincubation with H89 prior to dopamine treatment (J); K) Mean numbers of tracer-coupled H2 horizontal cells in prolonged dark-adapted, light-sensitized, light-adapted, DA-incubated and H89 pre-incubated retinas prior to DA-application; (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; n.s. P > 0.05); scale bar = 50  $\mu$ m

Light adaptation resulted in decreased responses to annulus stimulation relative to the response to spot stimulation (Fig. 3A), reflecting decreased receptive-field size of the horizontal cells. The dependency of the receptive-field size and the permeability of the horizontal cell gap junctions is not necessarily direct (Baldridge *et al.*, 1998). Jack *et al.*, 1975 were the first to show that the electrical properties of horizontal cell networks and the extent of their receptive fields can be described by a decay of voltage (V) with distance (x) as  $V_x = V_{(0)} K_0 (x/\lambda)$  (K<sub>0</sub> is a modified Bessel function of zero order). The space constant ( $\lambda$ ) of the appropriate receptive-field is given by  $\lambda = \sqrt{R_m/R_i}$ , in which R<sub>m</sub> (ohms in cm<sup>2</sup>) describes the

resistance of the membrane (membrane leakage resistance), while  $R_i$  describes the coupling resistance (gap junction resistance) of the network, including the junctional and the cytoplasmic resistance (Piccolino *et al.*, 1984). Based on this model, reduced receptive-fields can be due to either a decrease of the membrane resistance or an increase of the gap junction resistance. The use of the annulus/spot-stimulation represents an elegant tool to asses the effect of different light conditions and neuromodulators, e.g. DA on the gap junction resistance ( $R_i$ ), indicating its relevance on reduced receptive-field size.

Even though these charateristic responses (decreased responses to annulus stimulation and increased response to spot stimulation) were found for all three subtypes of axon-bearing, cone-connected horizontal cells (H1, H2 and H3 horizontal cells), H2 cells predominated and therefore the data presented here are from this subtype only. On average, response amplitude to annulus stimulation decreased from  $13.7 \pm 3.6$  mV (mean  $\pm$  S.D.) in light-sensitized retinas to  $2.1 \pm 0.8$  mV after light adaptation (P = 0.0000022; n = 7) (Fig. 3B). In contrast, the mean response amplitude to the spot stimulation increased from 12.9  $\pm$  2.7 mV to 15.9  $\pm$  1.7 mV after illumination (P = 0.0266634; n = 7) (Fig. 3B). Incubation of retinas under prolonged periods of darkness also revealed decreased receptive-field size. On average, response amplitude to annulus stimulation decreased from  $13.2 \pm 1.2$  mV in light-sensitized retinas to  $6.3 \pm 0.9$  mV after prolonged darkness (P = 0.0000001; n = 7). The mean response amplitude to the spot stimulation increased from  $12.8 \pm 1.7$  mV in light-sensitized retinas to  $15.1 \pm 1.9$ mV after prolonged darkness (P = 0.0316235; n = 7) (Fig. 3C). Incubation of light-sensitized retinas with DA had similar effects on horizontal cell responses as light adaptation. On average, the response amplitude to annulus stimuli was decreased from  $12.4 \pm 1.7$  mV (lightsensitized) to  $2.8 \pm 2.1$  mV after DA-incubation (P = 0.0000001; n = 7) (Fig. 3D). Mean amplitude of the response to spot stimulation increased from  $11.8 \pm 1.9$  mV (light-sensitized) to  $15.1 \pm 1.7$  mV after DA-treatment (P = 0.0027755; n = 7). Next, we demonstrated that the specific PKA blocker H89 inhibited the effect of DA on horizontal cell receptive-field size. There was no significant difference between response amplitudes to annulus stimulation of light-sensitized retinas incubated with H89 (13.6  $\pm$  3.7 mV) and DA-incubation in combination with H89 (12.5  $\pm$  2.7 mV) (P = 0.4921734; n = 8) (Fig. 3E) or between the spot stimulated responses (light-sensitized/H89 =  $14.0 \pm 2.9$  mV; DA/H89 =  $12.9 \pm 2.8$  mV; P = 0.4313659; n = 8) (Fig. 3E).

In addition to the intracellular recordings, which provide indirect correlation between receptive-field size and gap junction permeability a more direct approach is to examine the spread of gap junction permeable tracer in horizontal cells under different incubation conditions. The extent of gap junction coupling was assessed using neurobiotin tracer coupling. In light-sensitized retinas horizontal cells showed strong tracer coupling (Fig. 3G) labelling  $41 \pm 9$  coupled cells (mean  $\pm$  S.D.; n = 8) (Fig. 3K). In contrast, horizontal cells showed little tracer coupling after light adaptation (Fig. 3H) (4  $\pm$  2 coupled cells; P = 0.0000022; n = 8) or subject to prolonged darkness (Fig. 3F) (15  $\pm$  4 coupled cells; P = 0.0002014 n = 5). Incubation of light-sensitized retinas with DA resulted in weak horizontal cell tracer coupling with mean values of  $7 \pm 5$  coupled cells (P = 0.0000130; n = 8) (Fig. 3I and 3K). Pre-incubation of light-sensitized retinas with H89 inhibited the effect of DA and tracer coupling was close to that under light-sensitized conditions (31  $\pm$  7 coupled cells; P = 0.0625827; n = 8) (Fig. 3J and 3K). We also tested the effect of staurosporine and UO126 on the DA-induced reduction of horizontal cell receptive-field size and tracer coupling. In both cases there was no significant effect on either the response amplitudes or the tracer coupling (data not shown).

#### **Retinoic acid-induced modulation**

Given the potential role of at-RA as a light signal in the retina, we examined its effects on phosphorylation of cpCx53.8 by means of western blot analysis.



#### Fig. 4: Effects of at-RA and protein kinase inhibitors on cpCx53.8 phosphorylation

**A)** Western blot analysis of membrane fractions obtained from light-sensitized (LS) and light-adapted (LA) carp retinas in comparison to light-sensitized retinas incubated with derivatives of retinoic acid (9*cis*-RA, 13*cis*-RA, at-RA); **B)** Influence of staurosporine (PKC-inhibitor), UO126 (MAP kinase inhibitor) and H89 (PKA-inhibitor) on at-RA induced phosphorylation of cpCx53.8, membrane fractions of light-sensitized and light-adapted retina samples were used as controls; stau = staurosporine

Phosphorylation of cpCx53.8 was enhanced following the incubation of light-sensitized retinas with at-RA as evidenced by a shift of immunoreactive bands from ~ 55-57 kD to ~60-64 kD (Fig. 5A, arrowheads; n = 6). No such shift in immunoreactive protein bands was detected after incubation of light-sensitized retinas with the retinoic acid derivatives 9*cis*-RA and 13*cis*-RA (Fig. 5A, arrows). Again, we used membrane fractions of light-sensitized and light-adapted retinas as controls within each experiment. We also tested the influence of several protein kinase inhibitors on the at-RA-induced phosphorylation. As shown in Fig. 5B, the at-RA-induced phosphorylation of cpCx53.8 was inhibited by pre-incubation with staurosporine (PKC inhibitor) (Fig. 5B, arrowhead; n = 6), but was not affected by the MAP kinase inhibitor UO126 or the PKA inhibitor H89.

To assess the physiological impact of cpCx53.8 phosphorylation by at-RA we again performed intracellular recordings of horizontal cells as well as neurobiotin injections. We tested the effects of at-RA in combination with H89, UO126 and staurosporine on horizontal cell responses to annulus and centered spot stimulation.



Fig. 5: at-RA effects on horizontal cell responses to annulus and spot stimulation and the effect on horizontal cell tracer coupling

A) Representative recording of a H2 horizontal cell to annulus and spot stimulation in a light-sensitized (LS) retina and after at-RA incubation; B), C) Comparison of mean response amplitude to annulus and spot stimulation obtained from light-sensitized and at-RA-incubated retinas and preincubation of light-sensitized and at-RA-incubated retinas with staurosporine (stau); D), E) Representative images of neurobiotin injected H2 horizontal cells in at-RA-incubated retinas and preincubation of at-RA-incubated retinas with staurosporine, scale bar = 50  $\mu$ m; F) Mean number of tracer-coupled H2 horizontal cells from at-RA-incubated retinas and preincubation of at-RA-incubated retinas with staurosporine; (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; n.s. P > 0.05)

Incubation of light-sensitized retinas with at-RA resulted in a decrease of the response amplitude of horizontal cells to annulus stimulation and increased responses to centered spot stimulation (Fig. 7A). The mean value of the response amplitude to the annulus stimulus obtained from 8 horizontal cells was decreased from  $14.0 \pm 3.0 \text{ mV}$  under light-sensitized conditions, to  $3.8 \pm 2.6 \text{ mV}$  after incubation with at-RA (Fig. 7B; P = 0.0000009; n = 8). In the case of the centered spot stimulus, mean response amplitude of the same cells increased from  $13.4 \pm 3.7 \text{ mV}$  to  $16.8 \pm 2.9 \text{ mV}$  after at-RA incubation (Fig. 7B; P = 0.0433110). In Fig. 7C we show the effect of at-RA on horizontal cell responses was inhibited by staurosporine. On average, the response amplitude to the annulus stimulus was  $13.5 \pm 3.4 \text{ mV}$  after pre-incubation with staurosporine and  $12.2 \pm 3.3 \text{ mV}$  after additional at-RA treatment in the presence of staurosporine (Fig. 7C; P = 0.4582151; n = 7). Neurobiotin injections were used to visualize the extent of gap junction coupling (Fig. 7D, 7E). We observed a strong decrease of the number of coupled cells after at-RA incubation (6 ± 4 coupled cells; n = 6) (Fig. 7F). Pre-incubation with staurosporine inhibited the effect of at-RA with the number of coupled cells after at-RA incubation (6 ± 0.0000067; n = 6).

#### Effects of PKA and PKC inhibition on light- and dark-induced modulation

Based on the data presented, we postulated that DA and at-RA represent signal molecules that act as neuromodulators mediating adaptation-induced changes in gap junction permeability via connexin phosphorylation. Furthermore, the results indicate that the DA-PKA-pathway and the at-RA-PKC-pathway act independently since DA and at-RA effects were exclusively blocked by PKA and PKC inhibition, respectively. Consequentially, the next experiments assessed the impact of H89 and staurosporine on adaptation-induced changes of cpCx53.8 phosphorylation and the effect on receptive-field size and gap junction coupling.



Fig. 6: Effects of PKA- and PKC-inhibition on light induced changes in cpCx53.8 phosphorylation, cpCx53.8 immunoreactivity and horizontal cell coupling

**A)** Western blot analysis of membrane fractions obtained from light-sensitized (LS), light-adapted (LA) and prolonged dark-adapted (PD) carp retinas and membrane fractions of light-adapted and prolonged dark-adapted retinas pre-incubated with staurosporine (stau) and H89; **B**) Comparison of mean response amplitudes to annulus and spot stimulation after light adaptation and effects of pre-incubation with staurosporine and H89; **C**) Comparison of mean response amplitudes to annulus and spot stimulation after prolonged darkness and effects of pre-incubation with staurosporine and H89; **D**) Mean number of tracer-coupled H2 horizontal cells of light-adapted retinas and the effect of preincubation with staurosporine and H89; **E**) Mean number of tracer-coupled H2 horizontal cells of prolonged dark-adapted retinas and the effect of preincubation with staurosporine and H89; **E**) Mean number of tracer-coupled H2 horizontal cells of prolonged dark-adapted retinas and the effect of preincubation with staurosporine and H89; **E**) Mean number of tracer-coupled H2 horizontal cells of prolonged dark-adapted retinas and the effect of preincubation with staurosporine and H89; **E**) Mean number of tracer-coupled H2 horizontal cells of prolonged dark-adapted retinas and the effect of preincubation with staurosporine and H89; **(\***P < 0.05; **\*\***P < 0.01; **\*\***\*P < 0.001; n.s. P > 0.05)

The membrane fraction collected from light-sensitized retinas revealed immunoreactive bands at ~55 and ~58 kD (Fig. 6A, arrows). In the light-adapted sample, as well as in the prolonged dark-adapted sample, there was an upward shift in cpCx53.8 immunoreactivity associated with phosphorylation with isoforms at ~61–63 kD (Fig. 6A, asterisks). Pre-incubation of light-adapted and prolonged dark-adapted retinas with H89 and staurosporine largely abolished the upward shift. In both cases there was again precise detection of the protein bands of lower molecular weight (~55 and ~58 kD; Fig. 6A, arrowheads), whereas the higher molecular weight bands almost completely dissapeared. Similar results were obtained in 3 trials. To determine if the dark- and light-induced effects were mediated by different second messenger pathways, we tested the selective effect of H89 and staurosporine on both light-adapted and prolonged dark-adapted retinas. Neither staurosporine nor H89-incubation led to considerable reduction of the light- or dark-induced phosphorylation (data not shown), indicating that the modulatory influence of light and prolonged darkness are based on added effects of at least a PKA and a PKC signal pathway.

The physiological relevance of PKA- and PKC-inhibition was again tested by receptive field assessment (intracellular recordings) and neurobiotin injections. In both cases (light adaptation and prolonged darkness), the inhibition of PKA and PKC led to an increase in receptive-field size, which was reflected by a significant increase of the response amplitude to the annulus stimulation (Fig. 6B, 6C) (light-adapted =  $2.1 \pm 0.8$  mV; light-adapted/stau/H89 =  $12.1 \pm 2.6 \text{ mV}$ ; P = 0.0000005; n = 5) (prolonged darkness =  $6.3 \pm 0.9 \text{ mV}$ ; prolonged darkness/stau/H89 =  $12.6 \pm 2.2$  mV; P = 0.0000169; n = 5). The response amplitude to the spot stimulation was reduced from  $15.9 \pm 1.7$  mV to  $12.9 \pm 2.7$  mV (P = 0.0272824; n = 5) in light-adapted retinas pre-incubated with staurosporine and H89. In the case of prolonged darkadapted retinas pre-incubated with the inhibitors, the response amplitude to the spot stimulus was reduced from  $15.1 \pm 1.9$  mV to  $13.9 \pm 1.8$  mV (P = 0.2578033; n = 5) (Fig. 6B, 6C). We also tested for selective effects of staurosporine and H89 on light adaptation and prolonged dark adaptation. Both inhibitors had effects on light- and prolonged darkness-induced changes of receptive-field size, although the effect of staurosporine was greater on light adaptation and the effect of H89 was greater on prolonged dark adaptation. Pre-incubation of light-adapted retinas with staurosporine led to a significant increase of the response amplitude to annulus stimulation (9.6  $\pm$  2.0 mV; P = 0.0000009) and a decreased response amplitude to the spot stimulus  $(12.6 \pm 1.9 \text{ mV}; P = 0.0047280)$  (Fig. 6B), when compared to the response amplitude of the light-adapted retinas. H89 incubation prior to light adaptation also resulted in a significant increase of the response amplitude to the annulus stimulation (6.8  $\pm$  1.7 mV; P = 0.0000194) and a decreased response amplitude to the spot stimulation (12.8  $\pm$  1.3 mV; P = 0.0019735) (Fig. 6B). In case of prolonged dark-adapted retinas pre-incubation with staurosporine led to an increased response amplitude to the annulus stimulation (8.5  $\pm$  1.7 mV; P = 0.0092572) and a decreased response amplitude to the spot stimulation (10.0 ± 1.8) mV; P = 0.0002089) (Fig. 6C). In case of H89 the response amplitude to the annulus stimulus increased to  $11.5 \pm 1.4$  mV (P = 0.0000038) and the response amplitude to the spot stimulus decreased to  $11.9 \pm 1.8 \text{ mV}$  (P = 0.0074893) (Fig. 6C).

The changes in receptive-field size correlated with the number of tracer-coupled cells revealed by neurobiotin injections. On average, light adaptation yielded  $4 \pm 2$  (n = 6) coupled cells and pre-incubation with the inhibitors increased the number of coupled cells to  $27 \pm 6$  (P = 0.0000070; n = 6) (Fig. 6D), which is similar to the number of coupled cells identified under light-sensitized conditions (see Fig. 3K;  $41 \pm 9$  coupled cells). Pre-incubation of light-adapted retinas with staurosporine resulted in  $16 \pm 3$  coupled cells (P = 0.0000110) and H89 pre-incubation revealed  $14 \pm 3$  coupled cells (P = 0.0000497) (Fig. 6D). In the case of the prolonged dark-adapted retinas, neurobiotin injections revealed increased tracer coupling,

from  $8 \pm 3$  coupled cells (n = 5) to  $29 \pm 5$  coupled cells (n = 7) after pre-incubation with staurosporine and H89 (P = 0.0000461) (Fig. 6E). Pre-incubation of prolonged dark-adapted retinas with staurosporine resulted in  $17 \pm 4$  coupled cells (P = 0.0057921) and H89 pre-incubation revealed increased coupling to  $21 \pm 2$  cells (P = 0.0000489) (Fig. 6E).

## Discussion

The degree of horizontal cell coupling as a function of ambient illumination condition is thought to be of triphasic order, showing strong coupling under dim light conditions and decreased coupling in darkness and under bright light (reviewed by Baldridge, 2001). The data presented here are coincident with this hypothesis, since we found strong gap junction coupling of horizontal cells in light-sensitized retinas, with coupling reduced after light adaptation or prolonged darkness. Even though, the effect of adaptation on the physiological properties of horizontal cells has been studied intensively over the years, little is known about the precise molecular mechanisms underlying these effects. Changes in the phosphorylation state of the connexins have been implicated as putative regulatory mechanisms for a variety of retinal neurons. However, there are partially opposed studies, reporting on either positive or negative correlation of cell coupling and altered connexin phosphorylation. Evidence for phosphorylation-induced reduction of gap junction communication has been reported for several connexins in different species (reviewed by Lampe and Lau, 2004). The sheep homologue of human Cx50 has been shown to be phosphorylated by casein kinase I (Cheng and Louis, 2001), leading to reduction in gap junction communication. Furthermore, the chicken homologue of human Cx46 can be phosphorylated at S118 and S493 by PKCy, resulting in decreased cell-to-cell communication (Berthoud et al., 1997, 2000). Inconsistent with this hypothesis are findings from different retinal neurons, which document on positive correlation between increased cell coupling and connexin phosphorylation. For example, Li et al. (2009) showed that increased photoreceptor coupling in zebrafish retina is driven by Cx35 phosphorylation. Supporting this hypothesis, Kothmann et al. (2009) corresponded uncoupling of AII-amacrine cells in rabbit retina with decreased Cx36 phosphorylation. They introduce a signal pathway, which is triggered by DA and mediates dephosphorylation of Cx36 via PKA-dependent activation of protein phosphatase 2A. Here we present molecular findings that illustrate the light dependent modulation of cpCx53.8 and correlate it with horizontal cell coupling. Our data indicate that decreased gap junction coupling is accompanied by increased phosphorylation of cpCx53.8. In general, reduced horizontal cell coupling could be due to either changes of the open propabilities of the gap junction channels or a reduction in gap junction conductance. McMahon et al. (1989) provided first evidence that, for example DA does not affect the conductance, but reduces open propability by decreasing open duration of gap junction channels from white perch (Roccus americana) horizontal cells. Similar results were obtained from zebrafish horizontal cell gap junctions, showing unitary conductance but exhibit changes in open-time kinetics induced by DA or appropriate agonist (+/-)-6,7-dihydroxy-2-amino-tetralin (ADTN) (McMahon, 1994: McMahon and Brown, 1994). Hence, changes in the phosphorylation state of the horizontal cell connexins could represent a conceivable mechanism to regulate the gating properties of appropriate gap junctions.

By means of tracer coupling studies it has been shown that the receptive-field size of horizontal cells in the fish retina is narrowed by DA and at-RA (Mangel and Dowling, 1985; Pottek and Weiler, 2000). To adress the question of how DA and at-RA uncouple horizontal cells we tested the effect of DA and at-RA on the phosphorylation state of cpCx53.8. We found that light- and dark-induced increase in phosphorylation was mimicked by incubation with DA or at-RA. Dopaminergic interplexiform cells (dIPCs) have processes that branch in the outer plexiform layer enabling direct dopaminergic action via activation of DAR<sub>1</sub> (Dowling and Ehinger, 1978). Blockage of DAR1 by SCH23390 resulted in the absence of

increased cpCx53.8 phosphorylation. Similar results, obtained after pre-incubation with H89, indicate an intracellular signal pathway that mediates cpCx53.8 phosphorylation via PKA. Furthermore, our data indicate that at-RA exerts its effect via activation of a signal cascade, involving PKC. Coincident with previous studies (Weiler *et al.*, 1999) we report that both the dopaminergic and the at-RA systems were independent, as there is exclusive inhibition of the DA and at-RA effects only by H89 and staurosporine, respectively.

To provide evidence for PKA- and PKC-dependent mediation of light adaptation and prolonged darkness we tested for combined and selective effects of H89 and staurosporine on cpCx53.8 phosphorylation, receptive-field size and gap junction coupling. Our data indicate that adaptation-dependent modulation of horizontal cell coupling and cpCx53.8 phosphorylation is due to added effects of PKA and PKC during both light adaptation and prolonged darkness. However, the blockade of both did not produce the same phosphorylation pattern, receptive-field size or dye coupling as under control conditions. The residual effects might be indicative for possible action of other modulatory systems. Supporting this hypothesis, Pottek et al. (1997) showed that the nitric oxide (NO) donor sodium-nitroprusside reduced horizontal cell coupling in teleosts. Furthermore, Baldridge et al., (1998) and Daniels and Baldridge (2011) suggested that NO is involved with the light-induced reduction of the horizontal cell receptive field size in the goldfish retina. Moreover, Baldridge and Fischer (2001) showed that the NO donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) increased the level of cGMP in several retinal neurons including horizontal cells. cGMP has been described as a second messenger, activating cGMP-dependent protein kinase (PKG) (Portugal et al., 2012; Blom et al., 2012). This may be indicative for the presence of a NO-cGMP-PKG pathway mediating cpCx53.8 phosphorylation in an adaptation-dependent manner.

Although our data provide evidence for a DA-triggered PKA pathway and a at-RA-triggered PKC pathway, distinct attribution of DA and at-RA as signal molecules to either light-induced or prolonged darkness-induced modulation remains uncertain. Several studies associate prolonged darkness-induced modulation of horizontal cell coupling with a DA-triggered pathway (Mangel and Dowling, 1985; 1987; Yang et al., 1988). However, Weiler et al. (1989) were the first to analyze dopaminergic activity in the fish retina by monitoring total DA content, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and endogenous release of DA. They assumed that the sensitivity reduction of horizontal cells during prolonged darkness is not due to an increase of dopaminergic activity, since DOPAC values drop to about 30% within the first 90 min of darkness and the endogenous release of DA drops to about 25% within the first 30 min. Additional studies document on a circadian rhythmn of endogenous DA release in isolated goldfish retinas with high values corresponding to light adaptation and low values during darkness (Ribelayga et al., 2002; Ribelayga et al., 2004). In addition, at-RA production has been shown to be correlated with light exposure, as well (McCaffery and Draeger, 1997; Mey et al., 1997). In summary, these studies support the hypothesis that DA and at-RA act as light-signal molecules but not during prolonged darkness.

Therefore, we can not rule out actions of other neuromodulators, mediating PKA- and PKCdependent modulation during prolonged darkness. One putative candidate is the purine adenosine. The circadian rhythm of adenosine displays increased concentration in darkness and decreased levels after illumination (Ribelayga and Mangel, 2005). Adenosine is known to regulate different photoreceptor functions in the opposite manner as does DA (Rey and Burnside, 1999). Li *et al.* (2013) showed, that photoreceptor coupling is coregulated by opposite action of DA and adenosine on the PKA-pathway and phosphorylation of Cx36. Due to its increasing level in darkness, adenosine may serve as an adequate dark signal, mediating horizontal cell coupling via activation of PKA and cpCx53.8 phosphorylation. So far, adenosine-mediated activation of PKC has not been documented.

Besides adenosine, another putative candidate is melatonin. Melatonin synthesis has been documented to underlie a circadian rhythmn with high values in darkness and low values

under bright light (Besharse und Iuvone, 1983; Tosini und Menaker, 1996). Melatonin is mainly synthesized in photoreceptors and is implicated in a variety of modulatory mechanisms and processes like the reduction of the light responsiveness of cone-driven horizontal cells (Wiechmann and Sherry, 2013; Huang *et al.*, 2013). The melatonin receptors are G protein coupled receptors which are expressed in retinal horizontal, amacrine and ganglion cells and their activation has been reported to be involved in a variety of processes by affecting intracellular cyclic nucleotide (cAMP, cGMP) levels and activation of PKC subtypes (von Gall *et al.*, 2002; Pandi-Perumal *et al.*, 2008). Based on these findings, putative actions of melatonin during prolonged darkness are conceivable for both, the cAMP-PKA-pathway and the PKC-pathway.

Another putative candidate in mediating dark signals is *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), which has been described to modulate horizontal cell coupling and receptive field size in goldfish retina (Harsanyi *et al.*, 1996). Direct correlation of NMDA-activation and DA signaling was proven by application of SCH23390, which blocked the uncoupling action of NMDA, as did pre-incubation of the retinas with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a procedure that destroys dopaminergic neurons. Even though, there is no direct correlation of the NMDA effects in regard to different adaptation states so far, they may serve as an explanation for PKA-mediated phosphorylation during darkness.

In summary, our results indicate that uncoupling of horizontal cells is accompanied by increased connexin phosphorylation. It is most likely that this modulation leads to conformational changes of gap junction channels, resulting in decreased permeability of these channels. Furthermore we identifed two independent signal pathways involved in mediating adaptation-induced changes of horizontal cell coupling: (1) the DA-DAR<sub>1</sub>-cAMP-PKA pathway (2) the at-RA-PKC pathway.

## Literature

- Baldridge WH. 2001. Triphasic adaptation of teleost horizontal cells. Progress in Brain Research. 131:437-449
- Baldridge WH, Fischer AJ. 2001. Nitric oxide donor stimulated increase of cyclic GMP in the goldfish retina. Visual Neuroscience. 18:849-856
- Baldridge WH, Vaney DI, Weiler R. 1998. The modulation of intercellular coupling in the retina. Cell and Developmental Biology. 9:311-318
- Baldridge WH, Weiler R, Dowling JE. 1995. Dark-suppression and light-sensitization of horizontal cell responses in the hybrid bass retina. Vis Neuroscience. 12(4):611-620
- Berthoud VM, Beyer EC, Kurata WE, Lau AF, Lampe PD. 1997. The gap junction protein connexin56 is phosphorylated in the intracellular loop and the carboxyterminal region. European Journal of Biochemistry. 244:89–97
- Berthoud VM, Westphale EM, Grigoryeva A, Beyer EC. 2000. PKC isoenzymes in the chicken lens and TPA-induced effects on intercellular communication. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 41:850–858
- Besharse JC, Iuvone PM. 1983. Circadian clock in Xenopus eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. Nature. 305(5930):133-135
- Blom J, Giove T, Deshpande M, Eldred WD. 2012. Characterization of Nitric Oxide Signaling Pathways in the Mouse Retina. The Journal of Comparative Neurology. 520:4204-4217
- Bloomfield SA, Xin D, Persky SE. 1995. A comparison of receptive field and tracer coupling size of horizontal cells in the rabbit retina. Vis. Neuroscience. 12:985-999
- Bloomfield SA, Völgyi B. 2004. Function and plasticity of homologous coupling between AII Amacrine cells. Vis. Neuroscience. 44 (28):3297-3306

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72:248-254
- Cheng HL, Louis CF. 2001. Functional effects of Casein Kinase 1-catalyzed phosphorylation on lens cell-to-cell coupling. Journal of Membrane Biology. 181:21-30
- Daniels BA, Baldridge WH. 2011. The light-induced reduction of horizontal cell receptive field size in the goldfish retina involves nitric oxide. Visual Neuroscience. 28:137-144
- Dowling JE, Ehinger B. 1978. The interplexiform cell system. I. Synapses of the dopaminergic neurons of the goldfish retina. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 201:7-26
- Harsanyi K, Wang Y, Mangel SC. 1996. Activation of NMDA receptors produces dopaminemediated changes in fish retinal horizontal cell light responses. J Neurophysiol. 75(2):629-47
- Huang H, Wang Z, Weng SJ, Sun XH, Yang XL. 2013. Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. Prog Retin Eye Res. 32:64-87
- Jack JJB, Noble D, Tsien RW. 1975. Electrical current flow in excitable cells. Clarendon Press Oxford.
- Janssen-Bienhold U, Nagel H, Weiler R. 1993. In vitro phosphorylation in isolated horizontal cells of the fish retina: effects of the state of light adaptation. European Journal of Neuroscience. 5(6):584-593
- Janssen-Bienhold U, Trümpler J, Hilgen G, Schultz K, Perez de Sevilla Müller L, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R. 2009. Connexin57 is expressed in dendrodendritic and axo-axonal gap junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. The Journal of Comparative Neurology. 513:363-374
- Knapp AG, Dowling JE. 1987. Dopamine enhances excitatory amino acid-gated conductances in cultured retinal horizontal cells. Nature. 325:437-439
- Kothmann WW, Massey SC, O'Brien J. 2009. Dopamine-Stimulated Dephosphorylation of Connexin 36 Mediates AII Amacrine Cell Uncoupling. The Journal of Neuroscience. 29(47):14903–14911
- Lampe PD, Lau AF. 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. Archives of Biochemistry and Biophysics. 384:205-215
- Lampe PD, Lau AF. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. Int J Biochem Cell Biol. 36(7):1171-1186
- Lasater EM, Dowling JE. 1985. Dopamine decreases conductance of the electrical junctions between cultured retinal horizontal cells. Proc Natl Acad Sci USA. 82:3025-3029
- Li H, Chuang AZ, O'Brien J. 2009. Photoreceptor coupling is controlled by connexin 35 phosphorylation in zebrafish retina. J Neurosci. 29(48): 15178–15186.
- Li H, Zhang Z, Blackburn MR, Wang SW, Ribelayga CP, O'Brien J. 2013. Adenosine and Dopamine Receptors Coregulate Photoreceptor Coupling via Gap Junction Phosphorylation in Mouse Retina. J Neurosci. 33(7):3135–3150
- Mangel SC, Dowling JE. 1985. Responsiveness and Receptive Field Size of Carp Horizontal Cells Are Reduced by Prolonged Darkness and Dopamine. Science. 229(4718):1107-1109
- Mangel SC, Dowling JE. 1987. The interplexiform-horizontal cell system of the fish retina: effects of dopamine, light stimulation and time in the dark. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 231(1262):91-121
- McCaffery P, Dräger UC. 1997. A sensitive bioassay for enzymes that synthesize retinoic acid. Brain Research Protocol. 1(3):232-236
- McMahon DG. 1994. Modulation of electrical synaptic transmission in zebrafish retinal horizontal cells. The Journal of Neuroscience. 14(3):1722-1734
- McMahon DG, Brown DR. 1994. Modulation of gap-junction channel gating at zebrafish retinal electrical synapses. Journal of Neurophysiology. 72(5):2257-2268

- McMahon DG, Knapp AG, Dowling JE. 1989. Horizontal cell gap junctions: single-channel conductance and modulation by dopamine. Proc Natl Acad Sci USA. 86:7639-7643
- McMahon DG, Mattson MP. 1996. Horizontal cell electrical coupling in the giant danio: synaptic modulation by dopamine and synaptic maintenance by calcium. Brain Research. 718:89-96
- Mey J, McCaffery P, Dräger UC. 1997. Retinoic acid synthesis in the developing chick retina. The Journal of Neuroscience. 17(19):7441-7449
- Negishi K, Drujan B. 1978. Effects of catecholamines on the horizontal cell membrane potential in the fish retina. Sens Process. 2:388-395
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP. 2008. Prog Neurobiol. 85(3):335-353
- Perlmann I, Ammermüller J. 1994. Receptive-field size of L1 horizontal cells in the turtle retina: effects of dopamine and background light. Journal of Neurophysiology. 72:2786-2795
- Piccolino M, Neyton J, Gerschenfeld HM. 1984. Decrease of gap junction permeability induced by dopamine and cyclic adenosine 3`:5`-monophosphate in horizontal cells of turtle retina. The Journal of Neuroscience. 4:2477-2488
- Portugal CC, da Encarnação TG, Socodato R, Moreira SR, Brudzewsky D, Ambrósio AF, Paes-de-Carvalho R. 2012. Nitric Oxide Modulates Sodium Vitamin C Transporter 2 (SVCT-2) Protein Expression via Protein Kinase G (PKG) and Nuclear Factor-κB (NFκB). The Journal of Biological Chemistry. 287:3860-3872
- Pottek M, Schultz K, Weiler R. 1997. Effects of nitric oxide on horizontal cell network and dopamine release in the carp retina. Vision Research. 37(9):1091-1102
- Pottek M, Weiler R. 2000. Light-adaptive effects of retinoic acid on receptive field properties of retinal horizontal cells. European Journal of Neuroscience. 12:437-445
- Rey HL, Burnside B. 1999. Adenosine Stimulates Cone Photoreceptor Myoid Elongation via an Adenosine A2-Like Receptor. Journal of Neurochemistry. 72:2345-2355
- Ribelayga C, Mangel SC. 2005. A Circadian Clock and Light/Dark Adaptation Differentially Regulate Adenosine in the Mammalian Retina. Journal of Neuroscience. 25(1):215-222
- Ribelayga C, Wang Y, Mangel SC. 2002. Dopamine mediates circadian clock regulation of rod and cone input to fish retinal horizontal cells. Journal of Physiology. 544.3:801–816
- Ribelayga C, Wang Y, Mangel SC. 2004. A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors. J. Physiol. 554(2):467-482
- Stell WK, Lightfoot DO. 1975. Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. Journal of Comparative Neurology. 195:473-502
- Stell WK, Lightfoot DO, Wheeler TG, Leeper HF. 1975. Goldfish retina: functional polarization of cone horizontal cell dendrites and synapses. Science. 190(4218):989-990
- Tosini G, Menaker M. 1996. The pineal complex and melatonin affect the expression of the daily rhythm of behavioral thermoregulation in the green iguana. Journal of Comparative Physiology. 179(1):135-142
- Urschel S, Höher T, Schubert T, Alev C, Söhl G, Wörsdörfer P, Asahara T, Dermietzel R, Weiler R, Willecke K. 2006. Protein kinase A-mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between AII Amacrine cells. The Journal of Biological Chemistry. 281:33163-33171
- von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. 2002. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. Cell Tissue Res. 309(1):151-162
- Weiler R. 1978. Horizontal cells of the carp retina: Golgi impregnations and Procion-Yellow injections. Cell Tissue Research. 195:515-526
- Weiler R, He S, Vaney DI. 1999. Retinoic acid modulates gap junctional permeability between horizontal cells of the mammalian retina. European Journal of Neuroscience. 11:3346-3350

- Weiler R, Kolbinger W, Kohler K. 1989. Reduced light responsiveness of the cone pathway during prolonged darkness does not result from an increase of dopaminergic activity in the fish retina. Neurosci Lett. 99(1-2):214-218
- Weiler R, Pottek M, He S, Vaney DI. 2000. Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. Brain Research Reviews. 32:121-129
- Weiler R, Schultz K, Pottek M, Tieding S, Janssen-Bienhold U. 1998. Retinoic acid has lightadaptive effects on horizontal cells in the retina. Neurobiology. 95:7139-7144
- Wiechmann AF, Sherry DM. 2013. Role of melatonin and its receptors in the vertebrate retina. Int Rev Cell Mol Biol. 300:211-242
- Witkovsky P. 2004. Dopamine and retinal function. Doc Ophthalmol. 108(1):17-40
- Xin D, Bloomfield SA. 1999. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. The Journal of Comparative Neurology. 405:75-87
- Yang XL, Tornqvist K, Dowling JE. 1988. Modulation of cone horizontal cell activity in the teleost fish retina. I. Effects of prolonged darkness and background illumination on light responsiveness. The Journal of Neuroscience. 8(7):2259-2268
- Zhang DQ, McMahon DG. 2001. Gating of retinal horizontal cell hemi gap junction channels by voltage, Ca<sup>2+</sup>, and retinoic acid. Molecular Vision. 7:247-252