



# **Die Rolle von Horizontalzellen und N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse**

Von der Fakultät für Medizin und Gesundheitswissenschaften  
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
zur Erlangung des Grades und Titels eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

angenommene Dissertation von

Frau Lena Nemitz

geboren am 26. Mai 1991 in Goch

Gutachterin: Apl. Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold

Weitere Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. Silke Haverkamp

Tag der Disputation: 22.03.2021

## Zusammenfassung

An der ersten Synapse des visuellen Systems, der Photorezeptor-Bandsynapse, werden die Lichtinformationen der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) auf Horizontalzellen und Bipolarzellen übertragen. Die Endfüßchen der Photorezeptoren enthalten spezialisierte Strukturen, sogenannte präsynaptische Proteinbänder, die von synaptischen Vesikeln umgeben sind und eine schnelle und anhaltende Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat ermöglichen. Während die Horizontalzellfortsätze und ON-Bipolarzellendriten in das Photorezeptor-Endfüßchen invaginieren, bilden die OFF-Bipolarzellendriten flache Kontakte an der Basis des Photorezeptor-Endfüßchens aus. Elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, dass die Horizontalzellfortsätze vor den ON-Bipolarzellendriten in das Photorezeptor-Endfüßchen invaginieren. Die molekularen Mechanismen, die der Ausbildung der Photorezeptor-Bandsynapse während der frühen postnatalen Entwicklung zugrunde liegen, sind bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Um zu einem besseren Verständnis der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse beizutragen, wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht, welche Bedeutung die Horizontalzellen und das Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin für diesen Prozess haben.

Im Rahmen des ersten Projekts wurde die Rolle der Horizontalzellen für die Ausbildung der Stäbchen-Bandsynapse in der Mausretina untersucht. Dazu wurden die Horizontalzellen durch Diphtherietoxinrezeptor-vermittelten Zell-Knock-Out am postnatalen Tag 4 (P4)/P5 ablatiert und die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse in Abwesenheit der Horizontalzellen elektronenmikroskopisch und immunhistochemisch verfolgt (P8, P11, P15, P21). Die Untersuchungen zeigten, dass in den Stäbchenterminalien der Horizontalzell-ablatierten Mäuse nicht nur die invaginierenden Horizontalzellfortsätze, sondern auch die invaginierenden ON-Bipolarzellendriten fehlten, was darauf hindeutet, dass die Horizontalzellen für die Invagination der ON-Bipolarzellen in das Stäbchen-Endfüßchen benötigt werden. Zudem wiesen die Stäbchenterminalien weniger und kürzere Proteinbänder auf und die Expression der postsynaptischen Proteine mGluR6 und GPR179 an den dendritischen Spitzen der ON-Bipolarzellen war signifikant reduziert. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Horizontalzellen für die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Stäbchen und ON-Bipolarzellen unerlässlich sind.

Das Ziel des zweiten Projekts war es, die Auswirkungen der frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation auf die Entwicklung der Zapfen und deren synaptischen Verbindungen mit den

Bipolarzellen zu untersuchen. Immunhistochemische und elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass die Zapfen zunächst eine normale Morphologie aufwiesen und flache Kontakte mit OFF-Bipolarzellen, jedoch kaum invaginierende Kontakte mit ON-Bipolarzellen ausbildeten. In der adulten Retina wiesen die Zapfen dagegen verzweigte Axone mit zahlreichen Terminalien auf, in denen präsynaptische Proteinbänder enthalten waren. Darüber hinaus wuchsen Typ 3a-, Typ 3b- und Typ 4-OFF-Bipolarzeldendriten in die äußere nukleäre Schicht aus und exprimierten Glutamatrezeptoren an der Basis der neu gebildeten Zapfenterminalien, was darauf hinweist, dass die adulten Zapfen in der Lage sind, neue Synapsen mit OFF-Bipolarzellen zu bilden. Im Gegensatz dazu verloren die Zapfen alle invaginierenden Kontakte mit ON-Bipolarzellen. Zusammengefasst lassen die Befunde darauf schließen, dass die Synapsenbildung und der -erhalt für flache und invaginierende Kontakte unterschiedlich reguliert wird.

Im dritten Projekt wurde die Rolle von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse näher beleuchtet. Zunächst wurde die Expression von N-Cadherin in der Mausretina analysiert. Sowohl durch Einzelzell-PCR als auch Immunhistochemie konnte nachgewiesen werden, dass N-Cadherin in murinen Horizontalzellen exprimiert wird. Um herauszufinden, welche Bedeutung die N-Cadherin-Expression in Horizontalzellen für die Ausbildung der Photorezeptor-Bandsynapse hat, wurden mithilfe des Cre/loxP-Systems konditionale N-Cadherin-Knock-Out-Mäuse erzeugt. Dazu wurden N-cad<sup>flox</sup>-Mäuse mit Cx57-Cre-Mäusen gekreuzt, sodass N-Cadherin in Horizontalzellen ausgeknockt wird. Unglücklicherweise wurden homozygote N-Cadherin-Knock-Out-Mäuse nicht geboren oder verstarben in den ersten Lebenstagen, weshalb die N-cad<sup>flox</sup>-Cx57-Cre-Mauslinie nicht dazu geeignet war, die Ausbildung der Photorezeptor-Bandsynapse in Abwesenheit der N-Cadherin-Expression in Horizontalzellen zu untersuchen.

## Summary

At the first synapse of the visual system, the photoreceptor ribbon synapse, photoreceptors (rods and cones) transfer light information to horizontal cells and bipolar cells. Photoreceptor terminals contain specialized structures, so-called presynaptic ribbons, which are surrounded by synaptic vesicles and enable a fast and sustained release of the neurotransmitter glutamate. While horizontal cell processes and ON bipolar cell dendrites invaginate into the photoreceptor terminal, OFF bipolar cell dendrites form flat contacts at the base of the photoreceptor terminal. Electron microscopic studies revealed that horizontal cell processes invaginate into the photoreceptor terminal prior to ON bipolar cell dendrites. However, the molecular mechanisms underlying the formation of the photoreceptor ribbon synapse during early postnatal development are not fully understood. To contribute to a better understanding of the development of the photoreceptor ribbon synapse, the present dissertation investigated the importance of horizontal cells and the cell adhesion molecule N-cadherin in this process.

In the first project, the role of horizontal cells in the formation of the rod photoreceptor ribbon synapse in the mouse retina was studied. To this end, horizontal cells were ablated at postnatal day 4 (P4)/P5 via diphtheria toxin receptor-mediated cell knock-out and the development of the rod photoreceptor ribbon synapse in the absence of horizontal cells was monitored using electron microscopy and immunohistochemistry (P8, P11, P15, P21). The examinations showed that in rod terminals of horizontal cell-ablated mice, not only invaginating horizontal cell processes but also invaginating ON bipolar cell processes were lacking, suggesting that ON bipolar cells require horizontal cells for the invagination into the terminals of rod photoreceptors. Furthermore, rod terminals displayed fewer and shorter ribbons and the expression of postsynaptic proteins (mGluR6, GPR179) at the dendritic tips of ON bipolar cells was significantly reduced. These results demonstrate that horizontal cells are indispensable for the formation of synaptic contacts between rods and ON bipolar cells.

The second project aimed to investigate the effects of early horizontal cell ablation on the development of cone photoreceptors and their synaptic connections with bipolar cells. Immunohistochemical and electron microscopic analyses revealed that cones initially exhibited a normal morphology and formed flat contacts with OFF bipolar cells, but hardly any invaginating contacts with ON bipolar cells. In the adult retina, however, cones displayed branched axons with numerous ribbon-containing terminals. Moreover, type 3a, type 3b and type 4 OFF bipolar cell dendrites sprouted into the outer nuclear layer and expressed glutamate

receptors at the base of newly formed cone terminals, suggesting that adult cones are able to establish new synapses with OFF bipolar cells. By contrast, cones lost all invaginating contacts with ON bipolar cells. Taken together, the findings indicate that synapse formation and maintenance are differentially regulated for flat and invaginating contacts.

In the third project, the role of N-cadherin in the development of the photoreceptor ribbon synapse was investigated. First, the expression of N-cadherin in the mouse retina was analyzed by single-cell PCR and immunohistochemistry revealing that N-cadherin is expressed in murine horizontal cells. To study the function of N-cadherin expression in horizontal cells for the formation of the photoreceptor ribbon synapse, conditional N-cadherin knock-out mice were generated with the help of the Cre/loxP system. For this purpose, N-cad<sup>fllox</sup> mice were crossed with Cx57-Cre mice, so that N-cadherin is knocked out in horizontal cells. Unfortunately, homozygous N-cadherin knock-out mice were not born or died in the first days of life. Thus, the N-cad<sup>fllox</sup>-Cx57-Cre mouse line was not suitable to investigate the formation of the photoreceptor ribbon synapse in the absence of N-cadherin expression in horizontal cells.

---

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	III
Summary .....	V
Abkürzungen .....	IX
Abbildungsverzeichnis .....	XII
Tabellenverzeichnis.....	XIV
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Säugetierretina .....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion der Retina .....	1
1.1.2 Entwicklung der Retina .....	2
1.1.3 Photorezeptoren .....	5
1.1.4 Horizontalzellen .....	6
1.1.5 Bipolarzellen .....	9
1.2 Die Photorezeptor-Bandsynapse .....	10
1.2.1 Aufbau und Funktion der Photorezeptor-Bandsynapse.....	10
1.2.2 Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse.....	11
1.3 Cadherine.....	14
1.4 N-Cadherin .....	16
1.5 Zielsetzung .....	17
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Versuchstiere .....	20
2.2 Diphtherietoxin-Injektion .....	21
2.3 Gewebepräparation.....	21
2.4 Immunhistochemie .....	21

---

2.5	Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung .....	22
2.6	Transmissionselektronenmikroskopie .....	22
2.7	Retina-Dissoziation .....	23
2.8	RNA-Isolierung .....	23
2.9	DNA-Verdau .....	23
2.10	Reverse Transkription .....	24
2.11	Polymerase-Kettenreaktion .....	25
2.12	Quantifizierungen und statistische Auswertung.....	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
3.1	Auswirkungen einer frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation auf die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse .....	28
3.1.1	Ablation der Horizontalzellen während der frühen postnatalen Entwicklung .....	28
3.1.2	Allgemeine Morphologie der Retina .....	30
3.1.3	Invagination von Stäbchen-Bipolarzellen und Proteinband-Aufbau.....	32
3.1.4	Lokalisation der Photorezeptorterminalien .....	34
3.1.5	Verteilung der präsynaptischen Proteinbänder in der äußeren Retina .....	36
3.1.6	Morphologie der Stäbchen-Bipolarzellen und Lokalisation der postsynaptischen Proteine mGluR6 und GPR179.....	37
3.2	Auswirkungen einer frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation auf die weitere Entwicklung und den Erhalt der Zapfen-Bandsynapse .....	41

3.2.1 Morphologie der Zapfen.....	41
3.2.2 Lokalisation der Proteinbänder innerhalb der Zapfen.....	43
3.2.3 Invagination von ON-Bipolarzellen und Proteinband-Aufbau und -Erhalt .....	44
3.2.4 Morphologie der OFF-Bipolarzellen.....	47
3.2.5 Flache Kontakte mit OFF-Bipolarzellen .....	48
3.3 Expression von N-Cadherin in den Horizontalzellen der Mausretina und Auswirkungen eines konditionalen N-Cadherin-Knock-Outs auf die Überlebensfähigkeit von Mäusen .....	50
3.3.1 Expression von N-Cadherin in den Horizontalzellen der Mausretina.....	50
3.3.2 Auswirkungen eines konditionalen N-Cadherin-Knock-Outs auf die Überlebensfähigkeit von Mäusen.....	52
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>54</b>
4.1 Die Cx57/DTR-Mauslinie als Werkzeug zur Untersuchung der Rolle von Horizontalzellen in der Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse.....	54
4.2 Die Rolle von Horizontalzellen in der Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse ....	56
4.3 Die Rolle von Horizontalzellen in der Entwicklung und dem Erhalt der Zapfen- Bandsynapse .....	60
4.4 Synaptische Remodellierung im OFF-Zapfen-Signalweg infolge der frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation.....	61
4.5 Die N-cad <sup>fllox</sup> /Cx57-Cre-Mauslinie als Werkzeug zur Untersuchung der Rolle von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse.....	64
4.6 Die Rolle von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse .....	66
<b>5 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>68</b>
<b>6 Anhang</b> .....	<b>83</b>
6.1 Material.....	83

6.1.1 Mauslinien .....	83
6.1.2 Geräte .....	83
6.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	84
6.1.4 Chemikalien, Enzyme und Kits.....	84
6.1.5 Antikörper .....	86
6.1.6 Primer .....	87
6.1.7 Programme .....	88
6.1.8 Lösungen und Puffer .....	88
6.2 Publikationen.....	90
6.2.1 Übersicht .....	90
6.2.2 Rod bipolar cells require horizontal cells for invagination into the terminals of rod photoreceptors.....	91
6.2.3 Synaptic remodeling in the cone pathway after early postnatal horizontal cell ablation .....	104
6.2.4 Phosphorylation of connexin36 near the C-terminus switches binding affinities for PDZ-domain and 14–3–3 proteins in vitro.....	125
Lebenslauf .....	137
Danksagung .....	140
Erklärung.....	141

---

**Abkürzungen**

°C	Grad Celsius
$\alpha\delta 4$	<i>voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-4</i>
Abb.	Abbildung
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CaBP4	<i>calcium binding protein 4</i>
CAST	<i>CAZ-associated structural protein</i>
Ca <sub>v</sub> 1.1	<i>voltage-dependent calcium L-type channel subunit alpha-1F</i>
Ca <sub>v</sub> 1.4	<i>voltage-dependent calcium L-type channel subunit alpha-2/delta-4</i>
CAZ	Zytomatrix der aktiven Zone (engl.: <i>cytomatrix of the active zone</i> )
Cdh2	N-Cadherin, Cadherin-2
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
ChAT	Cholinacetyltransferase
CNG	durch zyklische Nukleotide gesteuert (engl. <i>cyclic nucleotide-gated</i> )
CNGA3	<i>cyclic nucleotide-gated cation channel alpha-3</i>
CNGB1	<i>cyclic nucleotide-gated cation channel beta-1</i>
Cre	Cre-Rekombinase
Csen	Calsenilin
CtBP2	<i>C-terminal binding protein 2</i>
Cx57	Connexin57
d	Tag (engl.: <i>day</i> )
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
E	embryonaler Tag
ELFN1	<i>extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1</i>

---

engl.	englisch
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i> )
flox	von loxP-Stellen flankiert (engl.: <i>floxed</i> )
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure (engl.: <i>gamma-aminobutyric acid</i> )
GCL	Ganglienzellschicht (engl.: <i>ganglion cell layer</i> )
GluK	Kainat-Glutamatrezeptor
GluA	AMPA-Glutamatrezeptor
GRP179	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 179
h	Stunde (engl.: <i>hour</i> )
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCN4	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4</i>
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
INBL	innere neuroblastische Schicht (engl. <i>inner neuroblastic layer</i> )
INL	innere nukleäre Schicht (engl.: <i>inner nuclear layer</i> )
IPL	innere plexiforme Schicht (engl.: <i>inner plexiform layer</i> )
lat.	lateinisch
Lim1	<i>LIM homeobox 1</i>
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ m <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
mg	Milligramm
mGluR6	metabotroper Glutamatrezeptor 6
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> )
N-cad	N-Cadherin, Cadherin-2
nm	Nanometer
NGL-2	<i>netrin-G2 ligand</i>
n.s.	nicht signifikant

---

Oc1	<i>one cut homeobox 1</i>
ONBL	äußere neuroblastische Schicht (engl. <i>outer neuroblastic layer</i> )
ONL	äußere nukleäre Schicht (engl.: <i>outer nuclear layer</i> )
OPL	äußere plexiforme Schicht (engl.: <i>outer plexiform layer</i> )
P	postnataler Tag
PB	Phosphatpuffer (engl.: <i>phosphate buffer</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PKARII $\beta$	regulatorische $\beta$ -Untereinheit der Proteinkinase A
PKC $\alpha$	$\alpha$ -Isoform der Proteinkinase C
PlexA4	Plexin A4
PNMT	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase
PSD-95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
<i>rd1</i>	<i>retinal degeneration 1</i>
RGC	retinale Ganglienzelle (engl.: <i>retinal ganglion cell</i> )
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
s	Sekunde
Sema6A	Semaphorin 6A
SV40	Simian-Virus 40
SynCAM1	synaptisches Zelladhäsionsmolekül 1 (engl.: <i>synaptic cell adhesion molecule 1</i> )
Tab.	Tabelle
U	Enzymeinheit (engl.: <i>unit</i> )
u. a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen (engl.: <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i> )
z. B.	zum Beispiel

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Säugetierretina. ....	2
Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Zellgenese in der Mausretina. ....	3
Abbildung 3: Entwicklung der Mausretina. ....	4
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Photorezeptoren. ....	5
Abbildung 5: Morphologie und Verschaltung der A-Typ- und B-Typ-Horizontalzellen am Beispiel der Katzenretina. ....	7
Abbildung 6: Konnektivität der Photorezeptoren und Bipolarzellen in der Mausretina.....	10
Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Photorezeptor-Bandsynapse. ....	11
Abbildung 8: Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse. ....	12
Abbildung 9: Struktur der Typ I klassischen Cadherine. ....	15
Abbildung 10: Horizontalzell-Ablation während der frühen postnatalen Entwicklung.....	29
Abbildung 11: Die frühe postnatale Horizontalzell-Ablation hat keine Auswirkungen auf die grobe Morphologie der <i>starburst</i> -Amakrinzellen und Müllerzellen. ....	30
Abbildung 12: Verringerte OPL-Dicke nach früher postnataler Horizontalzell-Ablation.....	31
Abbildung 13: Fehlende Invaginationen von ON-Bipolarzellen und reduzierte Häufigkeit und Länge von Proteinbändern in Stäbchenterminalien von Horizontalzell-ablatierten Mäusen...	34
Abbildung 14: Retraktion von Stäbchenterminalien infolge der frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation.....	35
Abbildung 15: Ektopische Proteinbänder in der ONL von Horizontalzell-ablatierten Mäusen. ....	37
Abbildung 16: Auswachsen von Stäbchen-Bipolarzeldendriten und beeinträchtigte mGluR6-Rekrutierung nach früher postnataler Ablation der Horizontalzellen. ....	38

---

Abbildung 17: Die frühe postnatale Horizontalzell-Ablation hemmt die Rekrutierung von GPR179 zu den dendritischen Spitzen der Stäbchen-Bipolarzellen. ....	40
Abbildung 18: Abnormale Morphologie von adulten Zapfen nach früher postnataler Horizontalzell-Ablation.....	42
Abbildung 19: Proteinbänder in neu gebildeten Zapfenterminalien von Horizontalzell-ablatierten Mäusen. ....	44
Abbildung 20: Verlust von ON-Bipolarzell-Invaginationen in Zapfenterminalien infolge der frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation. ....	46
Abbildung 21: Fehlende funktionale Synapsen zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen in adulten Horizontalzell-ablatierten Mäusen. ....	47
Abbildung 22: Auswachsen von OFF-Bipolarzellendriten nach früher postnataler Ablation der Horizontalzellen. ....	48
Abbildung 23: Zapfen bilden neue Synapsen mit OFF-Bipolarzellen in adulten Horizontalzell-ablatierten Mäusen. ....	50
Abbildung 24: Expression von N-Cadherin-mRNA in murinen Horizontalzellen. ....	51
Abbildung 25: N-Cadherin-Proteinexpression in den Horizontalzellen der Mausretina. ....	52
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse in An- und Abwesenheit der Horizontalzellen. ....	57

---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Pipettierschema für den DNA-Verdau (Gesamt-Retina-RNA).....	24
Tabelle 2: Pipettierschema für den DNA-Verdau (Einzelzell-RNA).....	24
Tabelle 3: Pipettierschema für die reverse Transkription .....	25
Tabelle 4: Pipettierschema für die PCR .....	25
Tabelle 5: PCR-Programm .....	25
Tabelle 6: Quantifizierung mGluR6-positiver Partikel in Cx57 <sup>+/+</sup> - und Cx57 <sup>+/DTR</sup> -Mäusen an P15.....	39
Tabelle 7: Quantifizierung GPR179-positiver Partikel in Cx57 <sup>+/+</sup> - und Cx57 <sup>+/DTR</sup> -Mäusen an P15.....	40
Tabelle 8: Quantifizierung korrekt positionierter und mislokalisierter Zapfensomata in Cx57 <sup>+/+</sup> - und Cx57 <sup>+/DTR</sup> -Mäusen an P56.....	43
Tabelle 9: Verwendete Mauslinien .....	83
Tabelle 10: Verwendete Geräte.....	83
Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	84
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits .....	84
Tabelle 13: Verwendete primäre Antikörper .....	86
Tabelle 14: Verwendete sekundäre Antikörper.....	87
Tabelle 15: Verwendete Primer.....	87
Tabelle 16: Verwendete Programme.....	88
Tabelle 17: Verwendete Lösungen und Puffer.....	88

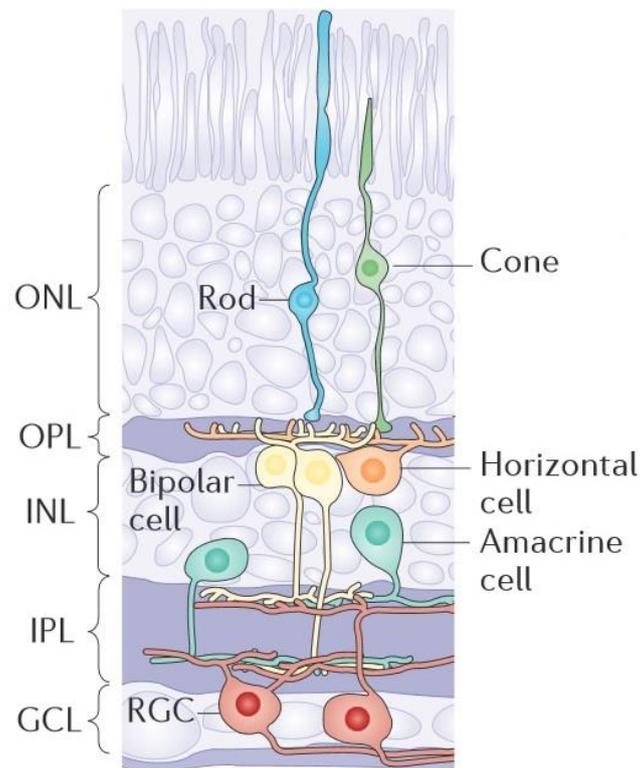
# 1 Einleitung

## 1.1 Die Säugetierretina

### 1.1.1 Aufbau und Funktion der Retina

Die Retina (Netzhaut) ist ein mehrschichtiges Nervengewebe, das die Innenseite des Auges auskleidet. Sie wandelt das Licht in ein elektrisches Signal um, verarbeitet die visuellen Informationen und leitet sie an das Gehirn weiter (Wässle 2004). In der Retina kommen fünf verschiedene neuronale Zellklassen vor: Photorezeptoren, Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen (Abb. 1). Die Somata dieser Zellen sind in drei nukleären Schichten angeordnet: der äußeren nukleären Schicht (ONL), der inneren nukleären Schicht (INL) und der Ganglienzellschicht (GCL). Die ONL beinhaltet die Zellkörper der Photorezeptoren, die INL umfasst die Zellkörper der Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und deplatzierten Ganglienzellen und die GCL enthält die Zellkörper der Ganglienzellen und deplatzierten Amakrinzellen. Zwischen diesen drei nukleären Schichten befinden sich zwei plexiforme Schichten: die äußere plexiforme Schicht (OPL) und die innere plexiforme Schicht (IPL). Während in der OPL die synaptischen Kontakte zwischen den Photorezeptorterminalien, Horizontalzellfortsätzen und Bipolarzellendriten lokalisiert sind, befinden sich in der IPL die synaptischen Verbindungen zwischen den Bipolarzellaxonterminalien, Amakrinzellneuriten und Ganglienzellendriten. Neben den neuronalen Zelltypen kommen in der Retina auch drei Gliazelltypen vor (Müllerzellen, Astrozyten und Mikroglia), die für die Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase zuständig sind (Vecino et al. 2016).

Die Säugetierretina ist invers aufgebaut, was bedeutet, dass das einfallende Licht zunächst alle retinalen Schichten passieren muss, bevor es auf die Photorezeptoren trifft. Die Photorezeptoren wandeln das Licht in ein neuronales Signal um und übertragen dieses in der OPL auf Bipolarzellen. Die Bipolarzellen leiten das Signal wiederum in der IPL an Ganglienzellen weiter. Über die Axone der Ganglienzellen, die den optischen Nerv bilden, wird die Informationen schließlich an die visuellen Zentren im Gehirn gesendet (Wässle 2004). Dieser vertikale Informationsfluss wird in der äußeren Retina durch Horizontalzellen und in der inneren Retina durch Amakrinzellen moduliert (Diamond 2017).

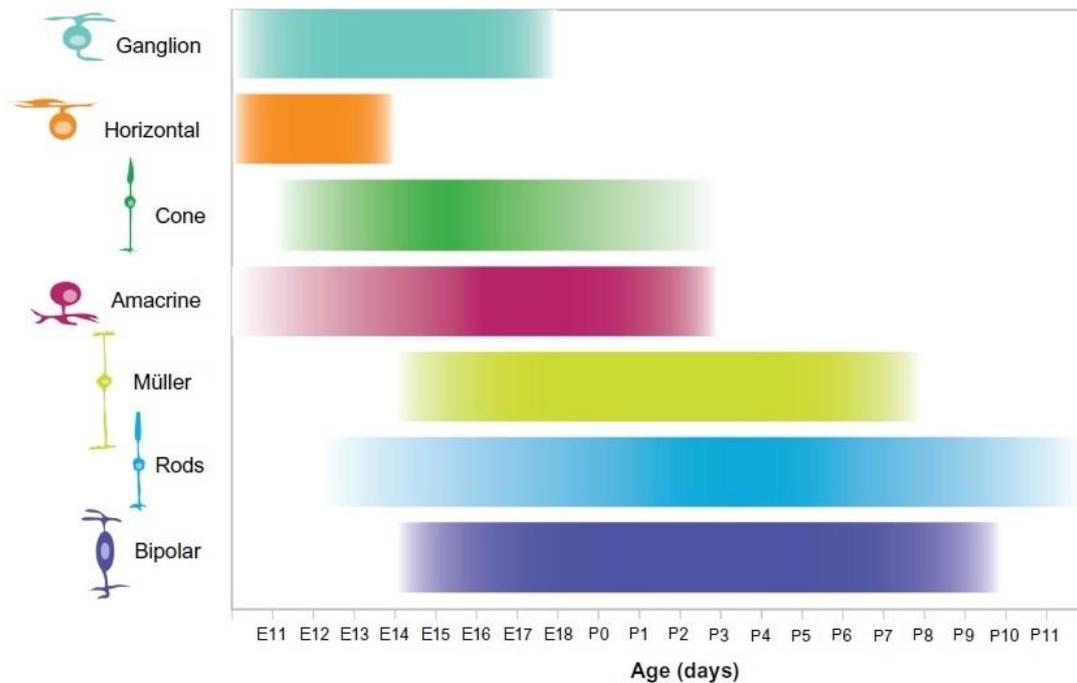


**Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Säugetierretina.** Die Retina besitzt fünf neuronale Zellklassen: Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen), Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen (RGC). Die Zellkörper der Neurone sind in drei nukleären Schichten angeordnet. In der äußeren nukleären Schicht (ONL) liegen die Zellkörper der Photorezeptoren, in der inneren nukleären Schicht (INL) befinden sich die Zellkörper der Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und deplazierten Ganglienzellen und in der Ganglienzellschicht (GCL) sind die Zellkörper der Ganglienzellen und deplazierten Amakrinzellen lokalisiert. Diese drei nukleären Schichten sind durch zwei plexiforme Schichten voneinander getrennt. Die äußere plexiforme Schicht (OPL) beinhaltet die Synapsen zwischen den Photorezeptoren, Horizontalzellen und Bipolarzellen, wohingegen die innere plexiforme Schicht (IPL) die Synapsen zwischen den Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen enthält (Euler et al. 2014).

### 1.1.2 Entwicklung der Retina

Die Retina entwickelt sich aus einem pseudostratifiziertem Neuroepithel, das aus multipotenten retinalen Vorläuferzellen besteht. Aus diesen Vorläuferzellen gehen alle retinalen Neurone und die Müllerzellen hervor, wobei das Zellschicksal sowohl durch intrinsische als auch extrinsische Faktoren bestimmt wird (Livesey und Cepko 2001; Bassett und Wallace 2012). Die Reihenfolge, in der die retinalen Zellklassen geboren werden, ist in Vertebraten

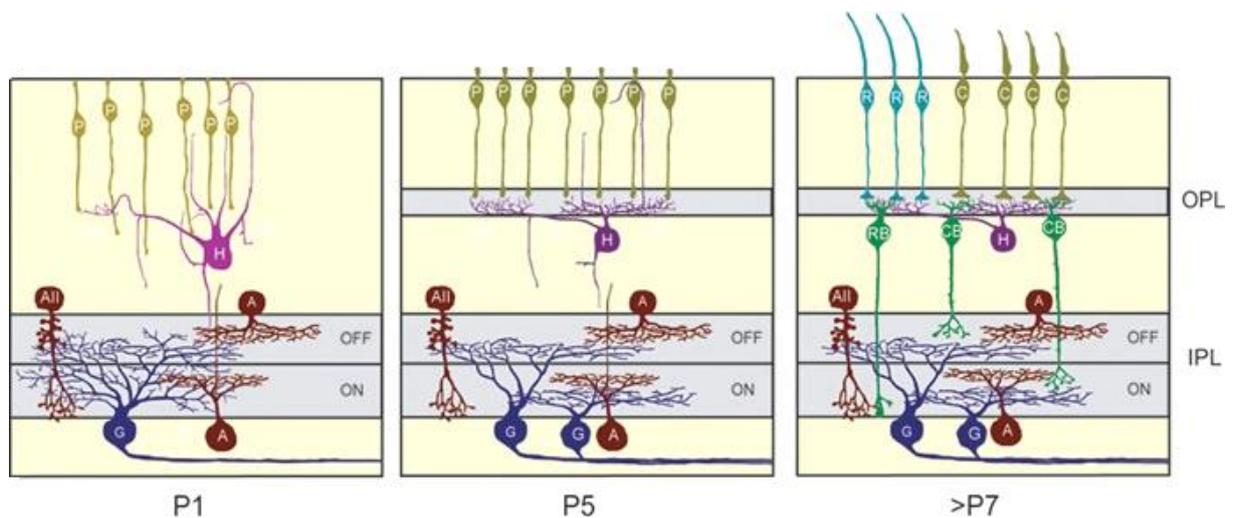
weitgehend konserviert (Young 1985; La Vail et al. 1991; Prada et al. 1991; Rapaport et al. 2004; Wong und Rapaport 2009). In der Maus findet die retinale Zellgenese zwischen E10 und P11 statt (Young 1985). Die ersten Zellen, die den Zellzyklus verlassen, sind die Ganglienzellen. Anschließend werden Horizontalzellen, Zapfen und Amakrinzellen gebildet. Stäbchen, Bipolarzellen und Müllerzellen werden zuletzt generiert (Abb. 2).



**Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Zellgenese in der Mausretina.** In der Maus beginnt die retinale Zellgenese an E10 mit der Geburt der Ganglienzellen. Danach verlassen die Horizontalzellen, Zapfen, Amakrinzellen und Stäbchen den Zellzyklus. Zum Schluss werden Stäbchen, Bipolarzellen und Müllerzellen generiert. An P11 ist die Zellbildung im Wesentlichen abgeschlossen (modifiziert nach Zhang et al. 2011).

Nach ihrer Geburt wandern die retinalen Zellen zu ihrem Bestimmungsort in einer der drei nukleären Schichten (Amini et al. 2018). Die retinale Synaptogenese erfolgt in drei Schritten (Abb. 3). Im ersten Schritt werden die synaptischen Kontakte zwischen den Amakrin- und Ganglienzellen gebildet. Die dadurch entstehende IPL ist ab E17 elektronenmikroskopisch sichtbar und unterteilt das Neuroepithel in eine äußere neuroblastische Schicht (ONBL) und eine innere neuroblastische Schicht (INBL) (die zukünftige GCL) (Hinds und Hinds 1978). Der zweite Schritt umfasst die Bildung der Kontakte zwischen Photorezeptoren und

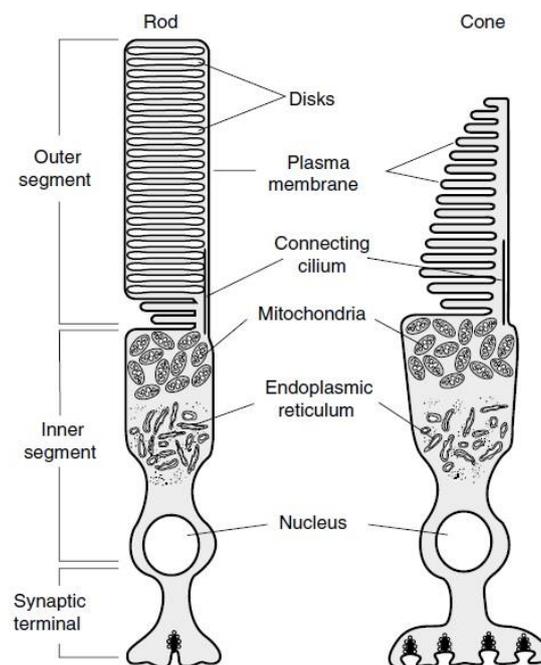
Horizontalzellen. Durch die damit verbundene Entstehung der OPL an P4/P5 wird die ONBL in die ONL und die INL aufgetrennt (Blanks et al. 1974; Rich et al. 1997; Sherry et al. 2003). Im dritten und letzten Schritt werden die Photorezeptoren und Ganglienzellen miteinander verbunden, indem sie Synapsen mit den dendritischen bzw. axonalen Endigungen der Bipolarzellen ausbilden. Während die Bandsynapsen zwischen den Photorezeptoren, Horizontalzellen und Bipolarzellen ab P7/8 vervollständigt werden (Blanks et al. 1974; Sherry et al. 2003), sind die ersten Bandsynapsen zwischen Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen erst ab P11 zu beobachten (Fisher 1979). Die Retina ist ausgereift, wenn an P21 die höchste Dichte an Bandsynapsen in der IPL erreicht ist (Fisher 1979).



**Abbildung 3: Entwicklung der Mausretina.** Die ersten Synapsen, die während der retinalen Entwicklung gebildet werden, sind die Synapsen zwischen Amakrin- und Ganglienzellen. Durch die Entstehung der IPL an E17 wird das Neuroepithel in die ONBL und die INBL, die zukünftige GCL, aufgespalten. An P4/P5 beginnt die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und Horizontalzellen. Die entstehende OPL unterteilt die ONBL in die ONL und die INL. Zum Schluss werden die Photorezeptoren und Ganglienzellen ab P7/P8 durch die Synapsenbildung mit den Bipolarzellen miteinander verbunden (Morgan und Wong 2018).

### 1.1.3 Photorezeptoren

In der Retina kommen zwei verschiedenen Arten von Photorezeptoren vor: Stäbchen, die auf das Sehen bei Dämmerungslicht spezialisiert sind, und Zapfen, die für das Sehen bei Tageslicht und das Farbsehen zuständig sind. Die Mausretina besitzt drei Photorezeptortypen: Stäbchen, S-Zapfen und M-Zapfen. Dabei machen die Stäbchen mit 97 % den Großteil der Photorezeptoren aus (Carter-Dawson und LaVail 1979). Beide Photorezeptorarten besitzen einen ähnlichen Aufbau (Abb. 4). Sie bestehen aus einem Außensegment, einem Innensegment, einem Zellkörper und einem Axon mit einem synaptischen Endfüßchen. Das Außensegment beinhaltet die Komponenten für die Signaltransduktion, das Innensegment enthält das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und Mitochondrien und der Zellkörper beherbergt den Zellkern (Fu und Yau 2007). An dem synaptischen Endfüßchen werden die Kontakte zu Horizontalzellen und Bipolarzellen hergestellt (siehe Kapitel 1.2).



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Photorezeptoren.** Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) sind aus einem Außensegment, einem Innensegment, einem Zellkörper und einem Axon mit einem synaptischen Endfüßchen aufgebaut. Das Außensegment enthält membranöse Disks oder Membraneinstülpungen, in die Sehpigmente eingelagert sind, und ist durch ein Cilium mit dem Innensegment verbunden. In dem Innensegment sind das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien lokalisiert. Der Zellkörper beinhaltet den Zellkern (Cote 2006).

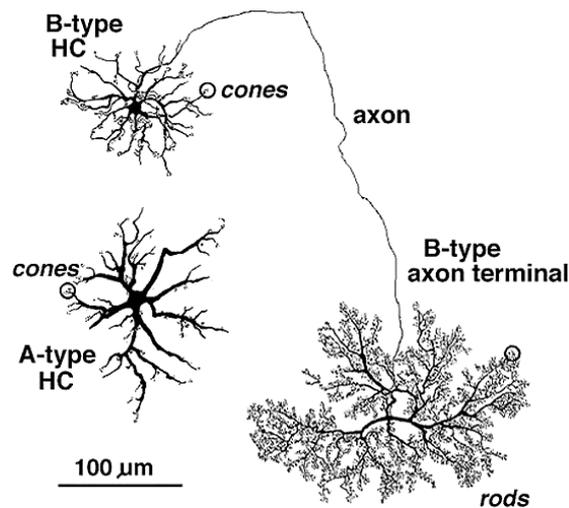
Die funktionalen Unterschiede zwischen Stäbchen und Zapfen beruhen auf der Expression verschiedener Sehpigmente in den Außensegmenten der Photorezeptoren. Die Stäbchen exprimieren das Sehpigment Rhodopsin, das eine hohe Photosensitivität aufweist und einzelne Photonen detektieren kann (Baylor et al. 1979). In den Zapfen der Mausretina kommen zwei Sehpigmente mit unterschiedlichen Absorptionsspektrum vor: S-Opsin (maximale spektrale Sensitivität von 360 nm) und M-Opsin (maximale spektrale Sensitivität von 508 nm) (Fu und Yau 2007). S-Zapfen exprimieren ausschließlich S-Opsin, während M-Zapfen S- und M-Opsin in einem dorsoventralen Gradienten koexprimieren (Röhlich et al. 1994; Applebury et al. 2000; Haverkamp et al. 2005).

Die Umwandlung des Lichts in ein elektrisches Signal findet in den Außensegmenten der Photorezeptoren statt. Dieser Prozess wird auch als Phototransduktion bezeichnet. In der Membran der Photorezeptor-Außensegmente befinden sich durch zyklische Nukleotide gesteuerte (CNG)-Kanäle, die bei Dunkelheit geöffnet sind und für einen stetigen Einstrom von  $\text{Na}^+$ -  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen sorgen. Dies hat zur Folge, dass die Photorezeptoren im Ruhezustand depolarisiert sind und am synaptischen Endfüßchen kontinuierlich Glutamat ausschütten. Werden die Sehpigmente durch eine Absorption von Photonen aktiviert, wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die in einer Schließung der CNG-Kanäle resultiert. Infolgedessen kommt es zu einer Hyperpolarisation des Photorezeptors und einer verringerten Glutamatfreisetzung am synaptischen Endfüßchen (Fu und Yau 2007).

#### **1.1.4 Horizontalzellen**

Horizontalzellen sind Interneurone der äußeren Retina, die mit Photorezeptoren und Bipolarzellen verschaltet sind (siehe Kapitel 1.2). Die meisten Säugetierarten besitzen zwei Typen von Horizontalzellen, die Axon-losen A-Typ-Horizontalzellen und die Axon-tragenden B-Typ-Horizontalzellen (Kolb 1974; Kolb et al. 1980; Dacheux und Raviola 1982; Peichl und González-Soriano 1994; Chan et al. 1997). In der Mausretina kommen hingegen ausschließlich B-Typ-Horizontalzellen vor, die mit ihren Dendriten die Zapfen-Endfüßchen und mit ihren Axonterminalien die Stäbchen-Endfüßchen kontaktieren (Peichl und González-Soriano 1994) (Abb. 5). Aufgrund einer extensiven Kopplung durch *gap junctions*, welche den interzellulären Austausch von Ionen und kleinen Molekülen ermöglichen (Bloomfield und Völgyi 2009), sind die rezeptiven Felder der Horizontalzellen wesentlich größer als ihre dendritischen Felder (Dacheux und Raviola 1982; Bloomfield et al. 1995; Shelley et al. 2006). Dabei ist das Ausmaß der elektrischen Kopplung von der Intensität des Umgebungslicht abhängig (Baldrige und Ball

1991; Xin und Bloomfield 1999; Baldrige 2001). In murinen Horizontalzellen werden zwei verschiedene *gap junction*-Proteine exprimiert: Connexin57 (Cx57), das sowohl die Dendriten als auch die Axonterminalien untereinander koppelt (Janssen-Bienhold et al. 2009), und Connexin50, das ebenfalls an der Kopplung der Axonterminalien beteiligt ist (Dorgau et al. 2015).



**Abbildung 5: Morphologie und Verschaltung der A-Typ- und B-Typ-Horizontalzellen am Beispiel der Katzenretina.** In den meisten Säugetierarten kommen zwei Typen von Horizontalzellen vor, die sich morphologisch unterscheiden: Axon-lose A-Typ-Horizontalzellen und Axon-tragende B-Typ-Horizontalzellen. Die A-Typ-Horizontalzellen sind ausschließlich mit den Zapfen verschaltet, während die B-Typ-Horizontalzellen mit ihren Dendriten die Zapfen und mit ihren Axonterminalien die Stäbchen kontaktieren (Kolb 2011).

Die funktionale Rolle der Horizontalzellen besteht in der Modulation der Signaltransmission zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen. Horizontalzellen erhalten über die  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptor-Untereinheiten GluA2 und GluA4 glutamaterge Eingänge von Photorezeptoren (Hack et al. 2001; Ströh et al. 2018) und senden negative Feedback-Signale an Photorezeptoren (Mangel 1991; Wu 1991; Thoreson et al. 2008) und negative Feedforward-Signale an Bipolarzellen (Yang und Wu 1991; Fahey und Burkhardt 2003). Es wird angenommen, dass die Horizontalzellen dadurch zu einer Anpassung der Photorezeptor-Signale an verschiedene Lichtintensitäten, einer Kontrastverstärkung sowie der antagonistischen Organisation der rezeptiven Felder von Bipolar- und Ganglienzellen

beitragen (Thoreson und Mangel 2012). Darüber hinaus wurde auch eine Übertragung von positiven Feedback-Signalen auf die Photorezeptoren beschrieben (Jackman et al. 2011). Im Gegensatz zu dem negativen Horizontalzell-Feedback, das sich über die *gap junctions* ausbreitet, ist das positive Horizontalzell-Feedback lokal begrenzt. Es dient vermutlich dazu, das Photorezeptor-Signal zu amplifizieren, ohne gleichzeitig die Kontrastverstärkung zu verlieren.

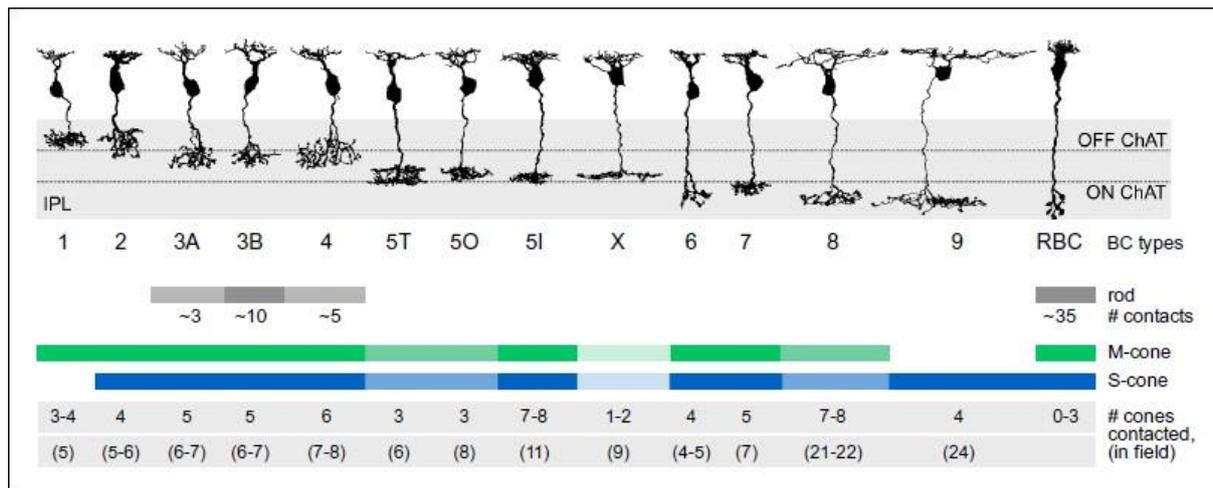
Der Mechanismus, der dem negativen Feedback der Horizontalzellen zugrunde liegt, ist bis heute Gegenstand kontroverser Diskussionen. Es wurden drei verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen: (1) eine GABA-Ausschüttung der Horizontalzellen (Wu 1992; Tatsukawa et al. 2005), (2) eine Änderung des pH-Werts im synaptischen Spalt (Hirasawa und Kaneko 2003; Vessey et al. 2005) und (3) eine Hemikanal-vermittelte, ephaptische Modulation des Photorezeptor-Membranpotentials (Kamermans 2001). Aktuelle Studien deuten jedoch darauf hin, dass alle drei Mechanismen am negativen Horizontalzell-Feedback beteiligt sind. Es wird spekuliert, dass GABA an GABA-Autorezeptoren der Horizontalzellen bindet (Liu Xue et al. 2013; Grove et al. 2019), wodurch das pH- und Hemikanal-vermittelte Feedback moduliert wird (Kemmler et al. 2014). Die Feedforward-Signale werden möglicherweise ebenfalls über GABA vermittelt (Yang und Wu 1991; Puller et al. 2014). Sowohl ON- als auch OFF-Bipolarzellen exprimieren GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an den Spitzen ihrer Dendriten, welche für Cl<sup>-</sup>-Ionen permeabel sind (Greferath et al. 1994; Vardi und Sterling 1994; Shields et al. 2000). Aufgrund unterschiedlicher dendritischer Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen resultiert die Aktivierung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermutlich in einer Depolarisation der ON-Bipolarzellen und einer Hyperpolarisation der OFF-Bipolarzellen (Vardi et al. 2000; Duebel et al. 2006).

Neben ihrer Funktion in der Modulation der Signaltransmission zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen spielen die Horizontalzellen auch eine entscheidende Rolle für den strukturellen Erhalt der Photorezeptor-Bandsynapsen (siehe Kapitel 1.2). Vorherige Studien haben anhand verschiedener transgener Mausmodelle gezeigt, dass ein Verlust der Horizontalzellen zu einer Degeneration der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen führt (Hammang et al. 1993; Sonntag et al. 2012; Keeley et al. 2013; Wu et al. 2013). Ob die Horizontalzellen auch für die Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapsen von Bedeutung sind, bleibt jedoch ungeklärt (siehe Kapitel 1.2.2).

### 1.1.5 Bipolarzellen

Bipolarzellen sind glutamaterge Interneurone, welche die visuellen Informationen der Photorezeptoren auf Amakrin- und Ganglienzellen übertragen. In der Mausretina kommen 15 verschiedene Typen von Bipolarzellen vor, von denen ein Typ hauptsächlich Stäbchen kontaktiert (Stäbchen-Bipolarzelle) und 13 Typen überwiegend Zapfen kontaktieren (Zapfen-Bipolarzellen) (Shekhar et al. 2016; Tsukamoto und Omi 2017) (Abb. 6). Die Typ 1-Zapfen-Bipolarzellen sind ausschließlich mit den M-Zapfen, die Typ 9-Zapfen-Bipolarzellen ausschließlich mit den S-Zapfen und die übrigen Typen von Zapfen-Bipolarzellen mit beiden Zapfentypen verschaltet (Behrens et al. 2016). Für die Typ 3a-, Typ 3b- und Typ 4-Zapfen-Bipolarzellen wurden zusätzliche Kontakte mit den Stäbchen (Mataruga et al. 2007; Haverkamp et al. 2008; Behrens et al. 2016) und für die Stäbchen-Bipolarzellen zusätzliche Kontakte mit den S- und M-Zapfen beschrieben (Behrens et al. 2016). Bei dem zuletzt identifizierten Bipolarzelltyp (Typ 1b) handelt es sich um ein monopolares Interneuron, das keine direkten Eingänge von Photorezeptoren erhält (Della Santina et al. 2016).

Basierend auf ihren Lichtantworten können Bipolarzellen in ON- und OFF-Bipolarzellen unterteilt werden. ON-Bipolarzellen (Typ 5t, 5o, 5i, X, 6, 7, 8, 9 und Stäbchen-Bipolarzellen) depolarisieren in Reaktion auf Licht, wohingegen OFF-Bipolarzellen (Typ 1a, 1b, 2, 3a, 3b und 4) hyperpolarisieren. Die entgegengesetzte Polarität der Lichtantworten beruht auf der Expression unterschiedlicher Glutamatrezeptoren an den dendritischen Endigungen der Bipolarzellen. ON-Bipolarzellen exprimieren den metabotropen Glutamatrezeptor 6 (mGluR6) (Nomura 1994; Masu et al. 1995). Durch die verringerte Glutamatausschüttung der Photorezeptoren bei Licht wird mGluR6 deaktiviert, was zu einer Öffnung eines nicht-selektiven Kationen-Kanals (*transient receptor potential cation channel subfamily M member 1*) führt (Morgans et al. 2010). OFF-Bipolarzellen exprimieren dagegen ionotrope Glutamatrezeptoren (AMPA- und Kainat-Rezeptoren) (DeVries 2000; Hack et al. 2001; Puller et al. 2013). Ionotrope Glutamatrezeptoren sind tetramere Kationen-Kanäle, die bei einer reduzierten Glutamatfreisetzung der Photorezeptoren geschlossen werden. Ein weiterer Unterschied zwischen ON- und OFF-Bipolarzellen besteht in der axonalen Stratifizierung innerhalb der IPL. Während die Axonterminalien der ON-Bipolarzellen in der inneren Hälfte der IPL stratifizieren, in der sie Synapsen mit ON-Ganglienzellen bilden, stratifizieren die Axonterminalien der OFF-Bipolarzellen in der äußeren Hälfte der IPL, in der sie Synapsen mit OFF-Ganglienzellen bilden (Euler et al. 1996).



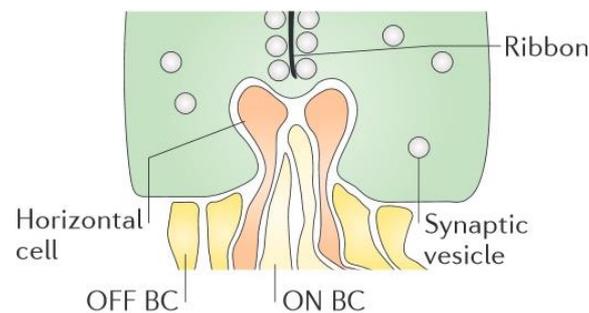
**Abbildung 6: Konnektivität der Photorezeptoren und Bipolarzellen in der Mausretina.** In der Maus sind drei Photorezeptortypen (Stäbchen, S-Zapfen und M-Zapfen) mit 14 verschiedenen Typen von Bipolarzellen (BC) verschaltet. Die Stäbchen werden von Typ 3a-, Typ 3b- und Typ 4-OFF-Bipolarzellen und Stäbchen-Bipolarzellen (RBC), die S-Zapfen von allen Bipolarzelltypen außer Typ 1-OFF-Bipolarzellen und die M-Zapfen von allen Bipolarzelltypen außer Typ 9-ON-Bipolarzellen kontaktiert (Behrens et al. 2016).

## 1.2 Die Photorezeptor-Bandsynapse

### 1.2.1 Aufbau und Funktion der Photorezeptor-Bandsynapse

Die Photorezeptor-Bandsynapse ist eine komplexe, chemische Synapse zwischen Photorezeptoren, Horizontalzellen und Bipolarzellen. Ähnlich wie bei konventionellen Synapsen wird der Neurotransmitter der Photorezeptoren, das Glutamat, durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Exozytose von synaptischen Vesikeln freigesetzt (Morgans 2000). Ein besonderes Merkmal der Photorezeptor-Bandsynapse ist das Vorhandensein von elektronendichten Strukturen, sogenannten präsynaptischen Proteinbändern, die an den aktiven Zonen der Photorezeptor-Endfüßchen verankert sind. Diese binden mit Glutamat gefüllte Vesikel und ermöglichen eine schnelle und anhaltende Freisetzung des Neurotransmitters, welche kontinuierlich an die Veränderung des Membranpotentials angepasst werden kann (Sterling und Matthews 2005). Während die Stäbchen-Endfüßchen in der Mausretina typischerweise ein Proteinband aufweisen, besitzen die Zapfen-Endfüßchen ~ zehn Proteinbänder (Tsukamoto et al. 2001). Eine weitere Besonderheit der Photorezeptor-Bandsynapse ist die charakteristische Anordnung der postsynaptischen Elemente: zwei invaginierende Horizontalzellfortsätze sind

lateral vom Proteinband positioniert und ein oder zwei invaginierende ON-Bipolarzellendriten befinden sich unterhalb des Proteinbands (Rao-Mirotnik et al. 1995; Haverkamp et al. 2000; Li et al. 2016). Diese postsynaptische Anordnung wird auch als Triade bezeichnet. Im Gegensatz dazu bilden OFF-Bipolarzellen nicht-invaginierende, flache Kontakte an der Basis des Photorezeptor-Endfüßchens aus (Haverkamp et al. 2000; Mataruga et al. 2007; Haverkamp et al. 2008) (Abb. 7).

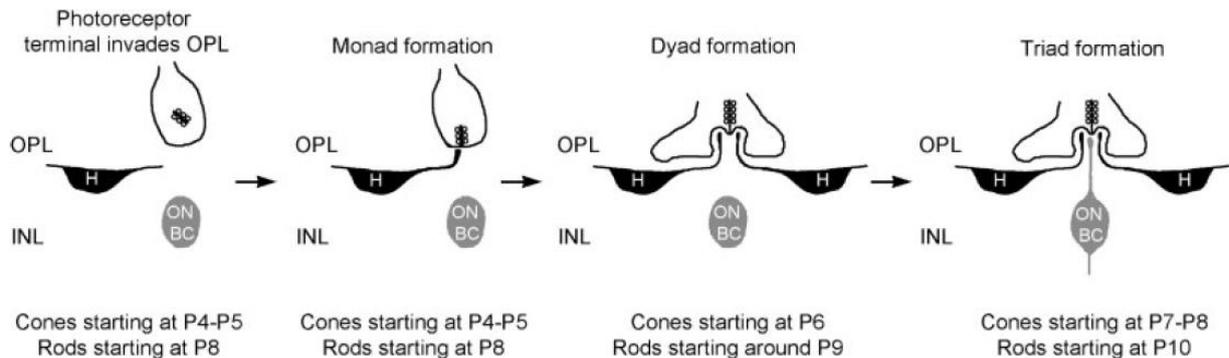


**Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Photorezeptor-Bandsynapse.** Die Photorezeptor-Bandsynapse besteht aus einem Photorezeptor-Endfüßchen mit einem präsynaptischen Proteinband, das von synaptischen Vesikeln umgeben ist, und drei bis vier postsynaptischen invaginierenden Elementen: zwei lateralen Horizontalzellfortsätzen und ein bis zwei zentralen ON-Bipolarzellendriten (ON BC). Die OFF-Bipolarzellen (OFF BC) bilden hingegen flache Kontakte an der Basis des Photorezeptor-Endfüßchens aus (Euler et al. 2014).

### 1.2.2 Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse

Der zeitliche Verlauf der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse wurde durch elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen weitgehend aufgeklärt (Olney 1968; Blanks et al. 1974; Rich et al. 1997; Sherry et al. 2003) (Abb. 8). In der Mausretina wird die Ausbildung der Zapfen-Bandsynapse an P4/P5 durch das Einwandern der Zapfenterminalien in die OPL initiiert. Zu dieser Zeit wird das präsynaptische Proteinband an der Membran verankert und ein Kontakt mit einem einzelnen Horizontalzellfortsatz gebildet (Monade). Ab P6 wird ein zweiter Horizontalzellfortsatz rekrutiert, der gemeinsam mit dem ersten Horizontalzellfortsatz in das Zapfen-Endfüßchen invaginiert (Dyade). An P7/P8 beginnt die Invagination der ein bis zwei ON-Bipolarzellendriten, welche die zentrale Position zwischen den beiden lateralen Horizontalzellendriten einnehmen (Triade). Es bleibt allerdings unklar, wann die Ausbildung der flachen Kontakte mit den OFF-Bipolarzellen stattfindet. Die

Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse erfolgt in derselben Reihenfolge wie die der Zapfen-Bandsynapse, wird aber drei bis vier Tage später initiiert. Zum Zeitpunkt des Augenöffnens (P14) ist die Ausbildung der Triaden für beide Photorezeptortypen im Wesentlichen abgeschlossen.



**Abbildung 8: Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse.** Die Zapfen-Synaptogenese wird an P4/P5 initiiert, wenn die Zapfenterminalien in die OPL einwandern. Zu diesem Zeitpunkt wird das präsynaptische Proteinband an der Membran verankert und das Endfüßchen von einem einzelnen Horizontalzellfortsatz kontaktiert (Monade). Ab P6 kommt ein weiterer Horizontalzellfortsatz hinzu und beide Fortsätze invaginieren in das Zapfenterritorial, wobei sie die Positionen lateral zum Proteinband einnehmen (Dyade). Am darauffolgenden Tag beginnt die Invagination von ein oder zwei ON-Bipolarzellsfortsätzen, welche die zentralen Elemente der Synapse bilden (Triade). Die Stäbchen-Synaptogenese wird drei bis vier Tage später initiiert als die Zapfen-Synaptogenese, verläuft jedoch in der gleichen Reihenfolge (Sherry et al. 2003).

In vorherigen Studien sind bereits einige Moleküle identifiziert worden, die an der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapsen beteiligt sind. Ein wichtiges Element für die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen ist die transsynaptische Interaktion zwischen einem Dystroglycan-Pikachurin-Proteinkomplex am Photorezeptor-Endfüßchen und dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor 179 (GPR179), der in ON-Bipolarzellen als Membran-Anker für die Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion dient (Orlandi et al. 2012; Orlandi et al. 2018). Durch einen Knock-Out von Dystroglycan (Omori et al. 2012) oder Pikachurin (Sato et al. 2008) wird die Invagination der ON-Bipolarzellen in die Photorezeptorterminalien verhindert. Das Zelladhäsionsmolekül *extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1*

(ELFN1), das von Stäbchen exprimiert wird, interagiert transsynaptisch mit mGluR6 und ist für die Bildung der synaptischen Kontakte zwischen Stäbchen und Stäbchen-Bipolarzellen essenziell (Cao et al. 2015). Zudem ist das synaptische Zelladhäsionsmolekül 1 (SynCAM1) in Stäbchen nachgewiesen worden, das ebenfalls die Invagination der Stäbchen-Bipolarzellen unterstützt. Auch in Horizontalzellen sind durch Knock-Out-Studien mehrere Moleküle identifiziert worden, die für die Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapsen von Bedeutung sind. Das Zelladhäsionsmolekül *netrin-G2 ligand* (NGL-2) (Soto et al. 2013; Soto et al. 2018) sowie das Semaphorin 6A (Sema6A) und sein Rezeptor Plexin A4 (PlexA4) (Matsuoka et al. 2012) fördern die Invagination der Horizontalzellen in das Stäbchenterminal. Darüber hinaus exprimieren die Horizontalzellen der Hühnerretina N-Cadherin, das möglicherweise ebenfalls in die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und Horizontalzellen involviert ist (Tanabe et al. 2006) (siehe Kapitel 1.2.2).

Neben diesen Molekülen spielt auch die neuronale Transmission für die Entwicklung und/oder den Erhalt der Photorezeptor-Bandsynapse eine entscheidende Rolle. Mutationen in den präsynaptischen Proteinen Bassoon (Dick et al. 2003; Specht et al. 2009), *calcium binding protein 4* (CaBP4) (Haeseleer et al. 2004), *voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1F* (Cav1.4) (Mansergh et al. 2005; Chang et al. 2006; Bayley und Morgans 2007; Liu Xiaoni et al. 2013; Zabouri und Haverkamp 2013), *voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-4* ( $\alpha 2\delta 4$ ) (Wycisk et al. 2006; Wang et al. 2017; Kerov et al. 2018), *CAZ-associated structural protein* (CAST) (tom Dieck et al. 2012) und *cyclic nucleotide-gated cation channel alpha-3* (CNGA3)/*cyclic nucleotide-gated cation channel beta-1* (CNGB1) (Michalakis et al. 2013), welche an der Glutamatausschüttung der Photorezeptoren beteiligt sind, führen zu einem Verlust der Synapsen in der OPL, einer Retraktion von Stäbchenterminalien sowie einem abnormalen Auswachsen von Horizontalzell- und Bipolarzellneuriten.

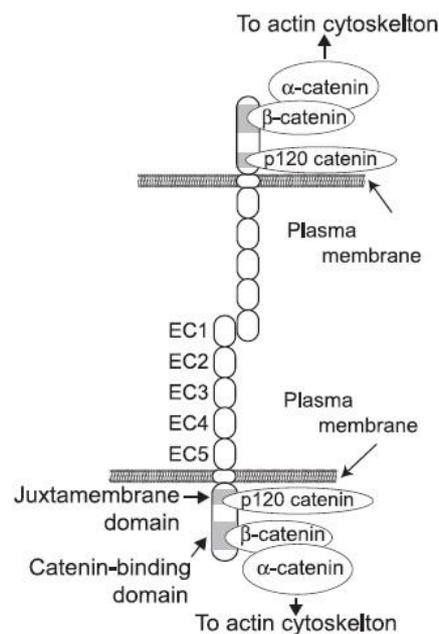
Eine Frage, die bislang nicht vollständig aufgeklärt wurde, ist, welche Bedeutung die Horizontalzellen für die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen haben. In zwei vorherigen Studien wurde bereits untersucht, wie sich eine teilweise Eliminierung der Horizontalzellen aus der äußeren Retina auf die Entwicklung der OPL auswirkt. Keeley et al. (2013) demonstrierten anhand von konditionalen *LIM homeobox 1*-(*Lim1*-)Knock-Out-Mäusen, bei denen bis zu 65 % der Horizontalzellen während der Entwicklung in der inneren Retina verbleiben, dass die Horizontalzellen nicht für die korrekte

Wegfindung der Photorezeptorterminalien und Bipolarzellendendriten in die OPL notwendig sind. Zudem wurde in einer Studie von Wu et al. (2013) gezeigt, dass die Photorezeptorterminalien von *one cut homeobox 1 (Oc1)*-Knock-Out-Mäusen, in denen nur ~ 20 % der Horizontalzellen gebildet werden, weniger Proteinbänder enthalten und nicht die typische Anordnung der postsynaptischen Elemente aufweisen. Diese Defekte traten schon an P16 auf, was darauf hindeutet, dass die Horizontalzellen für die Ausbildung der Synapsen in der OPL wichtig sein könnten. Da in beiden Studien jedoch keine vollständige Eliminierung der Horizontalzellen erreicht wurde und die Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse nicht im Detail verfolgt wurde, bleibt die exakte Bedeutung der Horizontalzellen für die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen weiter unklar.

### 1.3 Cadherine

Cadherine sind eine Superfamilie von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Zelladhäsionsmolekülen, welche durch extrazelluläre Cadherin (EC)-Domänen („*cadherin repeats*“) mit einer Länge von ~ 110 Aminosäuren gekennzeichnet sind. Sie spielen neben der mechanischen Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten auch bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellsortierung, Zellmigration und Synapsenbildung eine wichtige Rolle (Halbleib und Nelson 2006). Bislang sind mehr als 100 verschiedene Cadherine identifiziert worden, die in mehrere Unterfamilien eingeteilt werden können: Typ I klassische Cadherine, Typ II klassische Cadherine, desmosomale Cadherine, 7-Transmembran-Proteine, *FAT* und *Dachsous*-Gruppe und Protocadherine (Yu et al. 2019). Die am besten untersuchten Cadherine sind die Vertreter der Typ I klassischen Cadherine. Sie wurden ursprünglich nach den Geweben benannt, in denen sie entdeckt wurden, wie z. B. das epitheliale (E)-Cadherin, das neuronale (N)-Cadherin, das plazentare (P)-Cadherin und das retinale (R)-Cadherin. Der Aufbau der Typ I klassischen Cadherine besteht aus fünf aufeinanderfolgenden EC-Domänen, einer *single-pass*-Transmembrandomäne und einer intrazellulären Region (Abb. 9). Dabei werden die Linker-Regionen der EC-Domänen durch die Bindung von jeweils drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen stabilisiert (Boggon et al. 2002; Harrison et al. 2011). Die EC-Domänen sind für die Interaktionen zwischen den Cadherin-Molekülen und somit für die adhäsive Funktion der Cadherine verantwortlich (Brasch et al. 2012). Cadherin-Cadherin-Interaktionen treten sowohl zwischen zwei Molekülen derselben Zelle (*cis*-Interaktion) als auch zwischen zwei Molekülen gegenüberliegender Zellen (*trans*-Interaktion) auf. Obwohl die Bindung typischerweise zwischen Cadherinen desselben Typs (homophile Bindung) erfolgt, wurden auch Bindungen zwischen Cadherinen eines

unterschiedlichen Typs (heterophile Bindung) beschrieben (Shan et al. 2000; Katsamba et al. 2009; Vendome et al. 2014). Die intrazelluläre Region ist hochkonserviert und enthält eine Juxtamembran-Domäne, die p120-Catenin bindet, und eine Catenin-Bindungsdomäne, die mit  $\beta$ -Catenin interagiert. p120-Catenin ist an der Stabilisierung des Cadherins an der Zellmembran (Davis et al. 2003; Xiao et al. 2003), der Kontrolle der Gentranskription (Daniel und Reynolds 1999; Prokhortchouk et al. 2001) sowie der Reorganisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts (Noren et al. 2000; Grosheva et al. 2001; Yanagisawa et al. 2004; Meng et al. 2008) beteiligt.  $\beta$ -Catenin bindet wiederum  $\alpha$ -Catenin, welches den Cadherin-Catenin-Komplex mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet (Mège und Ishiyama 2017). Darüber hinaus ist  $\beta$ -Catenin in den Wnt-Signalweg involviert, der verschiedene biologische Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung und Geweberegeneration reguliert (Clevers 2006; MacDonald et al. 2009; Heuberger und Birchmeier 2010).



**Abbildung 9: Struktur der Typ I klassischen Cadherine.** Die Typ I klassischen Cadherine sind aus fünf sich wiederholenden extrazellulären Cadherin-Domänen (EC1-EC5), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Region aufgebaut. Während die extrazelluläre Region für die Ausbildung der *trans*-Interaktionen zwischen Cadherin-Molekülen benachbarter Zellen zuständig ist, interagiert die intrazelluläre Region mit p120-Catenin, das an die Juxtamembran-Domäne bindet, und  $\beta$ -Catenin, das an die Catenin-Bindungsdomäne bindet.  $\beta$ -Catenin interagiert wiederum mit  $\alpha$ -Catenin, welches eine Verbindung zwischen dem Cadherin-Catenin-Komplex und dem Aktin-Zytoskelett herstellt (modifiziert nach Suzuki und Takeichi 2008).

## 1.4 N-Cadherin

N-Cadherin (Cadherin-2, Cdh2) gehört zur Unterfamilie der Typ I klassischen Cadherine und wurde 1982 in der Hühnerretina entdeckt (Grunwald et al. 1982). Homozygote N-Cadherin-Knock-Out-Mäuse versterben an E10, was die essenzielle Bedeutung von N-Cadherin für die embryonale Entwicklung demonstriert (Radice et al. 1997). N-Cadherin spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Neuralleiste (Nakagawa und Takeichi 1998; Pla et al. 2001; Taneyhill 2008), der Skelettmuskel-Differenzierung (George-Weinstein et al. 1997; Goichberg und Geiger 1998), der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie (García-Castro et al. 2000), der Entwicklung und dem Erhalt der strukturellen Integrität des Herzens (Radice et al. 1997; Kostetskii et al. 2005; Piven et al. 2011) sowie der Tumormetastasierung (Nakajima et al. 2004; Hult et al. 2007). Des Weiteren ist N-Cadherin in verschiedene Schritte der Synapsenbildung involviert. Erstens fördert N-Cadherin das Auswachsen von Axonen und Dendriten. *In vitro*-Versuche haben gezeigt, dass N-Cadherin ein exzellentes Substrat für das Neuritenwachstum von N-Cadherin-exprimierenden Neuronen ist (Matsunaga et al. 1988; Bixby und Zhang 1990; Paradies und Grunwald 1993; Esch et al. 2000). Eine Überexpression von N-Cadherin in hippocampalen Neuronen führt ebenfalls zu einem verstärkten Auswachsen von Dendriten (Yu und Malenka 2003). Umgekehrt wird durch die *in vivo*-Expression einer dominant-negativen Form von N-Cadherin, welche die Funktion der endogenen Cadherine blockiert, das Neuritenwachstum von retinalen Ganglienzellen gehemmt (Riehl et al. 1996). Zudem demonstrieren sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien, dass N-Cadherin bei der Neuriten-Faszikulation eine wichtige Rolle spielt (Drazba und Lemmon 1989; Redies et al. 1992; Honig und Rutishauser 1996; Masai et al. 2003). Auch für die neuronale Zielerkennung ist N-Cadherin von Bedeutung. Cadherine tragen durch ihre Bindungsspezifität und differenzielle Expression zur Ausbildung spezifischer neuronaler Verbindungen bei (Obst-Pernberg und Redies 1999; Shapiro und Colman 1999; Ranscht 2000; Basu et al. 2015). In Kokultur-Experimenten mit N-Cadherin-blockierenden Antikörpern wurde gezeigt, dass N-Cadherin für die axonale Zielfindung von retinalen Ganglienzellen im optischen Tectum des Huhns (Inoue und Sanes 1997) sowie thalamischen Axonen im Cortex der Maus (Poskanzer et al. 2003) essenziell ist. Darüber hinaus unterstützt N-Cadherin die prä- und postsynaptische Differenzierung. Auf der präsynaptischen Seite ist N-Cadherin in die Rekrutierung von synaptischen Vesikeln involviert (Togashi et al. 2002; Jüngling et al. 2006; Stan et al. 2010). Postsynaptisch reguliert N-Cadherin die Morphogenese von kleinen Fortsätzen auf den Dendriten von Nervenzellen, sogenannten dendritischen Dornen, an denen mehr als 90 % der

exzitatorischen Signalübertragung im zentralen Nervensystem stattfinden (Nimchinsky et al. 2002). Eine Inhibition der Cadherin-Funktion in kultivierten hippocampalen Neuronen resultiert in einer abnormalen, Filopodien-ähnlichen Morphologie (Togashi et al. 2002; Mendez et al. 2010) oder auch einem Verlust (Mysore et al. 2007) der dendritischen Dornen. Zusätzlich ist N-Cadherin an der Rekrutierung von postsynaptischen Komponenten wie dem *postsynaptic density protein 95* (PSD-95) (Togashi et al. 2002; Nikitczuk et al. 2014) und AMPA-Rezeptoren (Nuriya und Huganir 2006; Saglietti et al. 2007) beteiligt.

In einer Studie von Tanabe et al. (2006) wurde gezeigt, dass N-Cadherin in den Horizontalzellen der Hühnerretina exprimiert wird und die Cadherin-Funktion für die dendritische Morphogenese der Horizontalzellen sowie die Synapsenbildung zwischen Photorezeptoren und Horizontalzellen notwendig ist. Eine Expression von dominant-negativem N-Cadherin in Horizontalzellen führte zu einer reduzierten Größe der dendritischen Felder, einer verringerten Anzahl an dendritischen Terminalien sowie einer Beeinträchtigung der postsynaptischen Akkumulierung von GluA4. Darüber hinaus wurde in einer Untersuchung von Xiang et al. (2017) ein Antikörper gegen N-Cadherin zur Visualisierung der Horizontalzellmorphologie in der Mausretina eingesetzt, was demonstriert, dass N-Cadherin auch in murinen Horizontalzellen exprimiert wird. Es bleibt jedoch unklar, welche Rolle N-Cadherin für die Ausbildung der Photorezeptor-Bandsynapse in der Maus spielt.

## **1.5 Zielsetzung**

Die Photorezeptor-Bandsynapse ist die erste Synapse im visuellen System. Sie besteht aus einem Photorezeptor-Endfüßchen mit einem präsynaptischen Proteinband, das von synaptischen Vesikeln umgeben ist, und drei oder vier postsynaptischen invaginierenden Elementen: zwei lateralen Horizontalzellfortsätzen und ein oder zwei zentralen ON-Bipolarzellendriten. Darüber hinaus bilden OFF-Bipolarzellen flache Kontakte an der Basis des Photorezeptor-Endfüßchens aus. Im Gegensatz zum zeitlichen Ablauf der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse, der bereits größtenteils aufgeklärt ist, sind die detaillierten molekularen Mechanismen, die mit dem Aufbau der Photorezeptor-Bandsynapse einhergehen, noch weitestgehend ungeklärt. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, mithilfe verschiedener transgener Mausmodelle sowie molekularbiologischer und histologischer Untersuchungen die Rolle von Horizontalzellen und N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse näher zu beleuchten.

**Projekt 1: Auswirkungen einer frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation auf die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse**

Im Verlauf der Entwicklung invaginieren die Horizontalzellfortsätze vor den ON-Bipolarzellendriten in das Photorezeptor-Endfüßchen (Olney 1968; Blanks et al. 1974; Sherry et al. 2003), was die Frage aufwirft, ob die Horizontalzellen für die Invagination der ON-Bipolarzellen benötigt werden. In einer Studie von Wu et al. (2013) wurde außerdem gezeigt, dass die Photorezeptorterminalien von *Oc1*-Knock-Out-Mäusen, in denen nur ~ 20 % der Horizontalzellen gebildet werden, bereits an P16 weniger postsynaptische Invaginationen aufwiesen und weniger oder kürzere Proteinbänder enthielten, was ebenfalls darauf hindeutet, dass die Horizontalzellen für die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen wichtig sein können. Um die Rolle der Horizontalzellen für die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse genauer zu untersuchen, sollten die Horizontalzellen im ersten Projekt dieser Arbeit ablatiert werden. Dazu wurden *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäuse eingesetzt, die den Diphtherietoxinrezeptor eines Primaten unter der Kontrolle des *Cx57*-Promotors exprimieren (Sonntag et al. 2012). Da der *Cx57*-Promotor in der Mausretina nur in den Horizontalzellen aktiv ist (Hombach et al. 2004), kann durch eine Injektion von Diphtherietoxin eine selektive Ablation der Horizontalzellen erreicht werden. Um mögliche Nebeneffekte der Horizontalzell-Ablation auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die Diphtherietoxin-Injektionen an P4 und P5 (kurz vor Beginn der Synapsenbildung) durchgeführt. Anschließend wurde die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse in Abwesenheit der Horizontalzellen mittels Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie analysiert.

**Projekt 2: Auswirkungen einer frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation auf die weitere Entwicklung und den Erhalt der Zapfen-Bandsynapse**

Im zweiten Projekt der vorliegenden Dissertation sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die an P4/P5 induzierte Horizontalzell-Ablation auf die weitere Entwicklung und den Erhalt der synaptischen Kontakte zwischen Zapfen und Bipolarzellen hat. Hierzu wurde die Ausbildung der Zapfen-Bandsynapse analog zu der Ausbildung der Stäbchen-Bandsynapse elektronenmikroskopisch und immunhistochemisch verfolgt.

---

### **Projekt 3: Expression von N-Cadherin in den Horizontalzellen der Mausretina und Auswirkungen eines konditionalen N-Cadherin-Knock-Outs auf die Überlebensfähigkeit von Mäusen**

N-Cadherin ist ein transmembranes Glykoprotein, das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zell-Zell-Adhäsion vermittelt. In einer vorherigen Studie wurde gezeigt, dass N-Cadherin in den Horizontalzellen der Hühnerretina exprimiert wird und die Cadherin-Funktion für die korrekte Synapsenbildung zwischen Zapfen und Horizontalzellen notwendig ist (Tanabe et al. 2006). Zudem weist eine Studie, in der ein N-Cadherin-Antikörper zur Markierung von Horizontalzellen in der Mausretina genutzt wurde (Xiang et al. 2017), darauf hin, dass N-Cadherin auch in murinen Horizontalzellen exprimiert wird. Es bleibt jedoch unklar, ob N-Cadherin auch für die Ausbildung der Photorezeptor-Bandsynapse in der Mausretina von Bedeutung ist. Im Rahmen des dritten Projekts dieser Arbeit sollte als erstes die Expression von N-Cadherin in murinen Horizontalzellen mittels Einzelzell-PCR und Immunhistochemie überprüft werden. Darüber hinaus sollten zur Erforschung der Funktion von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse konditionale N-Cadherin-Knock-Out-Mäuse erzeugt werden. Dazu wurden  $\text{N-cad}^{\text{fllox}}$ -Mäuse, in denen das Exon 1 des N-Cadherin-Gens von loxP-Stellen flankiert ist (Kostetskii et al. 2005), mit  $\text{Cx57-Cre}$ -Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des  $\text{Cx57}$ -Promotors exprimieren (Ströh et al. 2013), gekreuzt. In Nachkommen, die beide genetischen Veränderungen aufweisen, wird das Exon 1 des N-Cadherin-Gens in den Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen herausgeschnitten und N-Cadherin selektiv in Horizontalzellen ausgeknockt. Da ein vollständiger Knock-Out von N-Cadherin zum embryonalen Tod von Mäusen führt (Radice et al. 1997), sollte zunächst untersucht werden, ob homozygote  $\text{Cdh2}^{\text{fl/fl}};\text{Cx57}^{+/+\text{Cre}}$ -Knock-Out-Mäuse überlebensfähig sind und sich somit zur Untersuchung der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse in Abwesenheit der N-Cadherin-Expression in Horizontalzellen eignen.

## 2 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mauslinien, Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Enzyme, Kits und Programme sind in Kapitel 6.1 aufgeführt.

### 2.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt (Aktenzeichen: 33.19-42502-04-12/0995). Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen (12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus, Futter und Wasser *ad libitum*) gehalten. Für die Experimente wurden Tiere beider Geschlechter eingesetzt. Alle Mauslinien besitzen den genetischen Hintergrund des C57BL/6J-Inzuchtstamms oder wurden über mindestens drei Generationen in den C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt.

Zur Ablation der Horizontalzellen wurde die Cx57/DTR-Mauslinie verwendet, bei der durch homologe Rekombination ein Teil von Exon 2 des Cx57-Gens durch die kodierende Sequenz eines Fusionsproteins aus dem Diphtherietoxinrezeptor der Äthiopischen Grünmeerkatze (*Chlorocebus aethiops*) und dem *enhanced green fluorescent protein* ersetzt wurde (Sonntag et al., 2012). Im Gegensatz zu Primaten besitzen Mäuse von Natur aus keinen funktionalen Diphtherietoxinrezeptor, weshalb sie resistent gegenüber Diphtherietoxin sind (Mitamura et al. 1995). Durch die Expression des Primaten-Diphtherietoxinrezeptors unter der Kontrolle des Cx57-Promotors erlangen die Horizontalzellen der Cx57/DTR-Maus Diphtherietoxin-Sensitivität und können durch eine Injektion des Toxins selektiv ablatiert werden. Um mögliche Nebeneffekte der Cx57-Defizienz zu minimieren, wurden ausschließlich heterozygote Cx57<sup>+DTR</sup>-Mäuse, die noch ein Cx57-Wildtyp-Allel besitzen, eingesetzt.

Die Expression von N-Cadherin wurde anhand von Wildtyp-Mäusen analysiert. Zur Untersuchung der Rolle von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse sollten mithilfe des Cre/loxP-Systems konditionale N-Cadherin-Knock-Out-Mäuse generiert werden. Dazu wurden N-cad<sup>fllox</sup>-Mäuse, bei denen das Exon 1 des N-Cadherin-Gens von loxP-Stellen flankiert ist (Kostetskii et al. 2005), mit Cx57-Cre-Mäusen, die das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen Cx57-Promotors exprimieren (Ströh et al. 2013), verpaart. In Nachkommen, die beide genetischen Veränderungen in sich tragen, wird das Exon 1 des N-Cadherin-Gens in den Cre-Rekombinase-exprimierenden Horizontalzellen herausgeschnitten und N-Cadherin somit ausgeschaltet.

## 2.2 Diphtherietoxin-Injektion

Um eine Ablation der Horizontalzellen zu induzieren, wurden den  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen an P4 und P5 jeweils zwischen 12,5 und 20  $\mu$ l einer sterilen Diphtherietoxin-Lösung in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Tab. 17) (1  $\mu$ g/ml) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle dienten Wildtyp( $Cx57^{+/+}$ )-Wurfgeschwister, die auf die gleiche Weise behandelt wurden. Die Injektionen wurden von Frau Apl. Prof. Dr. Janssen-Bienhold durchgeführt.

## 2.3 Gewebepräparation

Die Mäuse wurden entweder durch Dekapitation (P8, P11) oder durch zervikale Dislokation nach CO<sub>2</sub>-Narkotisierung (P15 und älter) getötet. Anschließend wurden die Augen enukleiert, in PBS (für Immunhistochemie und Transmissionselektronenmikroskopie) oder Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit Zusätzen (Tab. 17) (für die Retina-Dissoziation) überführt und Cornea, Linse und Glaskörper entfernt. Für die Immunhistochemie an retinalen Kryoschnitten wurden die Augenbecher für 20 min in 2 % Paraformaldehyd und 3 % Sucrose in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, Tab. 17) fixiert, in 0,1 M PB gewaschen (3 x 10 min) und zum Gefrierschutz über Nacht bei 4°C in 30 % Sucrose in 0,1 M PB inkubiert. Danach wurden die Augenbecher auf einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Aluminiumblock in Tissue-Tek O.C.T. Compound eingebettet und mithilfe eines Kryostats vertikal geschnitten (20  $\mu$ m). Die Gefrierschnitte wurden auf Objektträger aufgenommen, die zuvor mit einer Beschichtungslösung (Tab. 17) überzogen wurden, für 1 h bei 37°C getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Für die Immunhistochemie an Retina-Ganzpräparaten wurden die Retinen aus dem Augenbecher isoliert, mit der Ganglienzellseite nach oben auf Filterpapier aufgebracht und für 20 min in 2 % Paraformaldehyd und 3 % Sucrose in 0,1 M PB fixiert. Im Anschluss wurden die Ganzpräparate in 0,1 M PB gewaschen (4 x 15 min), über Nacht bei 4°C in 30 % Sucrose in 0,1 M PB inkubiert und 3 x eingefroren und aufgetaut. Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Retinen aus dem Augenbecher isoliert, über Nacht bei 4°C in 1 % Paraformaldehyd, 3 % Sucrose und 2,5 % Glutaraldehyd in 0,05 M PB fixiert, in 0,1 M PB gewaschen (3 x 30 min) und für 1 h in 1 % OsO<sub>4</sub> in 0,1 M PB nachfixiert.

## 2.4 Immunhistochemie

Zum immunhistochemischen Nachweis von Proteinen wurden die Kryoschnitte und Retina-Ganzpräparate in 0,1 M PB gewaschen (3 x 10 min für Kryoschnitte, 4 x 15 min für Retina-

Ganzpräparate) und in Blockierlösung (Tab. 17) inkubiert (1 h bei Raumtemperatur für Kryoschnitte, über Nacht bei 4°C für Retina-Ganzpräparate). Danach erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (Tab. 13) in Blockierlösung (über Nacht bei 4°C für Kryoschnitte, 5 d bei 4°C für Retina-Ganzpräparate). Nach anschließendem Waschen in 0,1 M PB (3 x 10 min für Kryoschnitte, 4 x 15 min für Retina-Ganzpräparate) wurde das Gewebe mit den sekundären Antikörpern (Tab. 14) in Blockierlösung inkubiert (2 h bei Raumtemperatur für Kryoschnitte, 2 d bei 4°C für Retina-Ganzpräparate), erneut in 0,1 M PB gewaschen (3 x 10 min für Kryoschnitte, 4 x 15 min für Retina-Ganzpräparate) und in VECTASHIELD Mounting Medium eingedeckelt. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung bei 4°C aufbewahrt.

Für die Verwendung des N-Cadherin-Antikörpers wurden die immunhistochemischen Versuche wie zuvor beschrieben durchgeführt, jedoch wurden die Gefrierschnitte in TRIS-gepufferter Salzlösung mit Triton X-100 (TBSTX, Tab. 17) gewaschen, mit 10 % Ziegen- Normalserum in TBSTX blockiert und mit primären und sekundären Antikörpern in TBSTX inkubiert.

## **2.5 Konfokale Mikroskopie und Bildbearbeitung**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ausgewertet. Das Scannen erfolgte mit einem 63x/1.4-Plan-Apochromat-Öl-Objektiv (für Kryoschnitte) oder einem 40x/1.3-Plan-Apochromat-Öl-Objektiv (für Retina-Ganzpräparate) und einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji (Schindelin et al. 2012) wurden aus den Konfokal-Stapeln (200 nm Einzelscans) Maximum-Projektionen erstellt sowie die Helligkeit und der Kontrast der Bilder angepasst.

## **2.6 Transmissionselektronenmikroskopie**

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die fixierten Retinen in 0,1 M PB gewaschen (3 x 10 min) und für jeweils 10 min in 50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 100 % Aceton in H<sub>2</sub>O entwässert. Anschließend wurde das Gewebe für 1 h in einem 1:1-Gemisch aus Aceton und Agar 100 Resin (Tab. 17) und über Nacht in reinem Agar 100 Resin inkubiert. Nach dem Aushärten des Einbettmediums für 48 h bei 60°C wurden mit einem Ultramikrotom vertikale Semidünn- (0,5 µm) und Ultradünnschnitte (90 nm) angefertigt. Die Semidünnschnitte wurden auf Objektträger aufgenommen, mit 2 % Toluidinblau und 0,5 % Natriumborat in H<sub>2</sub>O gefärbt und mit einem digitalen Forschungsmikroskop ausgewertet, während die Ultradünnschnitte auf

Kupfer-Netzchen aufgenommen und mit einem Transmissionselektronenmikroskop analysiert wurden. Helligkeit und Kontrast der Aufnahmen wurden in Adobe Photoshop CS6 Extended bearbeitet.

## **2.7 Retina-Dissoziation**

Um retinale Neurone zu isolieren, wurde eine Gewebe-Dissoziation durchgeführt. Dazu wurden die isolierten Retinen für 10 min bei 37°C in HBSS mit Zusätzen vorinkubiert und für 23 min bei 37°C in Papain-Lösung (Tab. 17) enzymatisch verdaut. Im Anschluss wurde das Gewebe für 5 min bei 37°C in Desoxyribonuklease I-(DNase I)-Lösung (Tab. 17) inkubiert, für 2 min bei 900 rpm abzentrifugiert und in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Zusätzen (Tab. 17) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 900 rpm wurde das Medium abgenommen und durch 1 ml frisches DMEM mit Zusätzen ersetzt. Im Anschluss folgte die Trituration des Gewebes. Hierzu wurde das Medium mit den Retinen 3 x mithilfe einer weitlumigen Pasteurpipette auf- und abgezogen und der Überstand nach einer Absetzzeit von 2 min verworfen. Dieser Vorgang wurde 3 x mit einer englumigen Pasteurpipette wiederholt. Die drei Überstände wurden gepoolt und auf Deckgläser ausgebracht, die zuvor für 1 h mit Concanavalin-Lösung in PBS (1 mg/ml) beschichtet und 3 x in PBS gewaschen wurden. Nachdem sich die Zellen für 30 min bei 37°C im Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 55 % O<sub>2</sub>) abgesetzt hatten, wurden sie zur RNA-Gewinnung weiterverwendet.

## **2.8 RNA-Isolierung**

Für die Isolierung der RNA aus gesamten Retinen wurde das NucleoSpin RNA XS-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Um die RNA aus einzelnen Neuronen zu erhalten, wurde das Cytoplasma der Zelle in eine Glaselektrode mit 7,5 µl Elektrodenlösung (Tab. 17) aufgenommen. Der Inhalt der Elektrode wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß entleert, das sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurde.

## **2.9 DNA-Verdau**

Zur Entfernung der genomischen DNA wurde ein DNA-Verdau mithilfe des Desoxyribonuclease I, Amplification Grade-Kits durchgeführt. Die Pipettierschemata für den DNA-Verdau sind in Tab. 1 (für die Gesamt-Retina-RNA) und Tab. 2 (für die Einzelzell-RNA) aufgeführt. Die Ansätze wurden für 15 min inkubiert. Im Anschluss wurde die DNase I durch die Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und eine Inkubation für 10 min bei 65°C inaktiviert.

**Tabelle 1: Pipettierschema für den DNA-Verdau (Gesamt-Retina-RNA)**

<b>Volumen</b>	<b>Komponente</b>
5 µl	RNA-Lösung
1 µl	RiboLock RNase-Inhibitor
1 µl	10X DNase I Reaction Buffer
1 µl	Deoxyribonuclease I, Amplification Grade
2 µl	Nuklease-freies Wasser

**Tabelle 2: Pipettierschema für den DNA-Verdau (Einzelzell-RNA)**

<b>Volumen</b>	<b>Komponente</b>
7,5 µl	RNA-enthaltende Elektrodenlösung
0,5 µl	RiboLock RNase-Inhibitor
0,25 µl	10X DNase I Reaction Buffer
1 µl	Deoxyribonuclease I, Amplification Grade
0,75 µl	Nuklease-freies Wasser

## 2.10 Reverse Transkription

Um die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, wurde das SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase-Kit verwendet. Das Pipettierschema für die reverse Transkription ist Tab. 3 zu entnehmen. Nachdem der RNA-Lösung Oligo(dT)15 Primer, Random Primer und Roti®Mix PCR3 zugefügt wurden, erfolgte zunächst eine Inkubation für 5 min bei 65°C und 1 min auf Eis. Anschließend wurden die restlichen Komponenten hinzugegeben und der Ansatz für 5 min bei 25°C, 50 min bei 50°C und 15 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert.

**Tabelle 3: Pipettierschema für die reverse Transkription**

Volumen	Komponente
10 µl	RNA-Lösung
1 µl	Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer
1 µl	Random Primers
1 µl	Roti®Mix PCR3
1 µl	RiboLock RNase-Inhibitor
4 µl	5X First-Strand Buffer
1 µl	0,1 M DTT
1 µl	SuperScript™ III Reverse Transcriptase

## 2.11 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde das KAPA HotStart Mouse Genotyping Kit eingesetzt. Das Pipettierschema ist in Tab. 4 und das PCR-Programm in Tab. 5 aufgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 15 aufgelistet.

**Tabelle 4: Pipettierschema für die PCR**

Volumen	Komponente
4 µl	cDNA-Lösung
12,5 µl	KAPA2G Fast HS Genotyping Mix (2X)
1 µl	10 µM <i>forward</i> Primer
1 µl	10 µM <i>reverse</i> Primer
6,5 µl	Nuklease-freies Wasser

**Tabelle 5: PCR-Programm**

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	} 45
Primerhybridisierung	59°C	15 s	
Elongation	72°C	20 s	
Finale Elongation	72°C	10 min	1

## 2.12 Quantifizierungen und statistische Auswertung

Zur Quantifizierung der OPL-Dicke in Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitten von  $Cx57^{+/+}$ - ( $n = 3$  für P8,  $n = 4$  für P11,  $n = 5$  für P15,  $n = 3$  für P21) und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen ( $n = 3$  für P8,  $n = 4$  für P11,  $n = 3$  für P15,  $n = 2$  für P21) wurde unter Einsatz des *Line Tools* in Fiji die Distanz zwischen den Somata der ONL und den Somata der INL bestimmt. Die Messung wurde an 10 verschiedenen Stellen pro Tier durchgeführt.

Um die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse zwischen  $Cx57^{+/+}$ - (P11:  $n = 4$ , P15:  $n = 3$ ) und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen (P11:  $n = 4$ , P15:  $n = 5$ ) zu vergleichen, wurden anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen für jeden Genotyp und jedes Entwicklungsstadium zwischen 746 und 1177 Profile von Stäbchenterminalien analysiert und in folgende Kategorien eingeordnet: (1) leere Stäbchenterminalien (Profile ohne Invaginationen), (2) Monaden (Profile mit einem invaginierenden Horizontalzellfortsatz), (3) Dyaden (Profile mit zwei invaginierenden Horizontalzellfortsätzen), (4) Triaden (Profile mit mindestens einem invaginierenden ON-Bipolarzellendriten) und (5) unklassifiziert (Profile, die nicht eindeutig einer der anderen Gruppen zugeordnet werden konnten). Zur Ermittlung der Häufigkeit von Stäbchenterminalien mit und ohne Proteinbändern wurde derselbe Satz an Stäbchenterminalien-Profilen ausgewertet. Um die Größe der Proteinbänder in  $Cx57^{+/+}$ - ( $n = 3$ ) und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen ( $n = 5$ ) an P15 zu bestimmen, wurde mithilfe des *Line Tools* in Fiji die Länge von 30 Proteinbändern pro Tier gemessen.

Für die Quantifizierung mGluR6- und GPR179-positiver Partikel in  $Cx57^{+/+}$ - ( $n = 3$ ) und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen ( $n = 5$ ) an P15 wurden die Konfokal-Stapel mit einer theoretischen Punktspreizfunktion in der Huygens Software dekonvolviert und in Fiji weiterverarbeitet. Nach dem Entfernen des Hintergrunds durch die *Subtract Background*-Funktion (*rolling ball radius*: 50 Pixel) wurden manuell Intensitäts-Schwellenwerte festgelegt, die für beide Genotypen konstant gehalten wurden. Anschließend wurde unter Verwendung der *Analyze Particles*-Funktion für jedes Tier die Anzahl und durchschnittliche Größe der Partikel für 9 unterschiedliche Regionen (je  $46,08 \times 25,25 \mu\text{m}$ ) bestimmt. Um zu verhindern, dass Rauschen und Blutgefäße in die Auswertung miteinbezogen werden, wurden Partikel mit einer Größe von  $< 0,81$  oder  $> 22,50 \mu\text{m}^2$  von der Analyse ausgeschlossen.

Zur Ermittlung der Anzahl der Zapfen in  $Cx57^{+/+}$ - ( $n = 3$ ) und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen ( $n = 3$ ) (P56) wurden in *cone arrestin*-gefärbten Vertikalschnitten manuell die Zapfensomata gezählt. Pro Tier wurden 12 Aufnahmen (je  $198,39 \times 198,39 \mu\text{m}$ ) ausgewertet. Um Unterschiede in der

Verteilung der Zapfensomata innerhalb der äußeren Retina festzustellen, wurden die Zapfensomata in zwei Kategorien eingeteilt. Zapfensomata, die in der distalen Hälfte der ONL lokalisiert waren, wurden als korrekt positioniert und Zapfensomata, die in der proximalen Hälfte der ONL lokalisiert waren, wurden als mislokalisiert klassifiziert.

Die statistische Analyse wurde in GraphPad Prism 5 durchgeführt. Zum Vergleich der OPL-Dicke, der Proteinband-Größe in Stäbchenterminalien sowie der Anzahl und durchschnittlichen Größe mGluR6- und GPR179-positiver Partikel zwischen Wildtyp- und Horizontalzell-ablatierten Mäusen wurde ein Wilcoxon-Rangsummentest verwendet. Die Verteilungen der verschiedenen Entwicklungsstadien von Stäbchenterminalien wurden mittels  $\chi^2$ -Test auf statistische Signifikanz getestet. Zur Analyse der Häufigkeiten von Stäbchenterminalien mit und ohne Proteinbändern sowie der Verteilung der Zapfensomata wurde ein exakter Fisher-Test durchgeführt. Um die Anzahl der Zapfen zwischen den beiden Genotypen zu vergleichen, wurde ein *t*-Test für unabhängige Stichproben angewandt (Daten normalverteilt, D'Agostino-Pearson-Test). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ein *p*-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

## 3 Ergebnisse

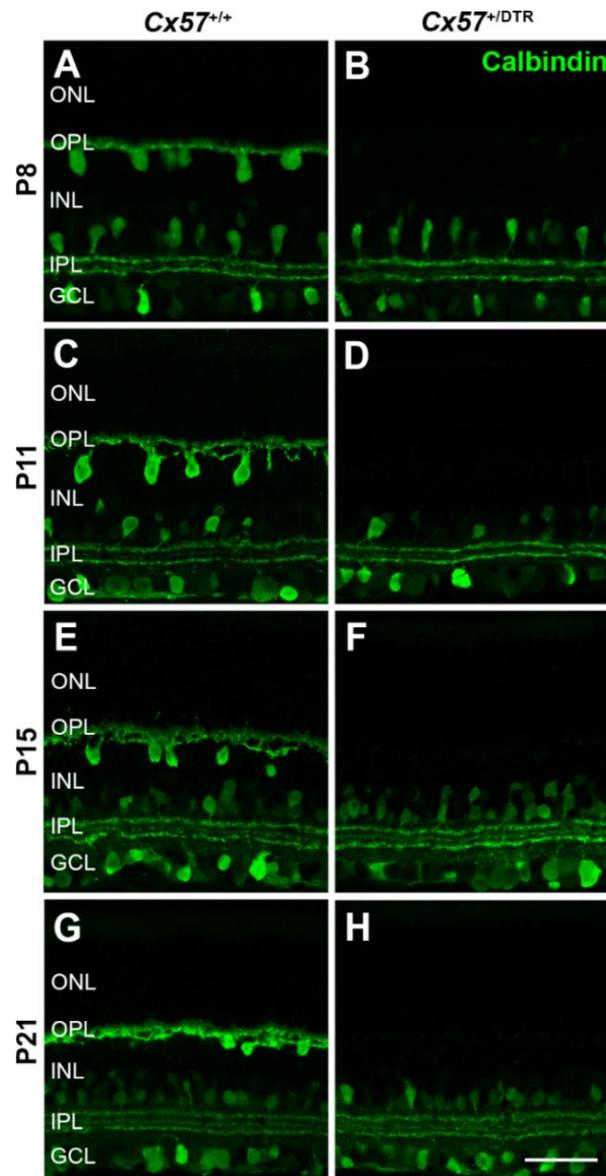
### 3.1 Auswirkungen einer frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation auf die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse

#### 3.1.1 Ablation der Horizontalzellen während der frühen postnatalen Entwicklung

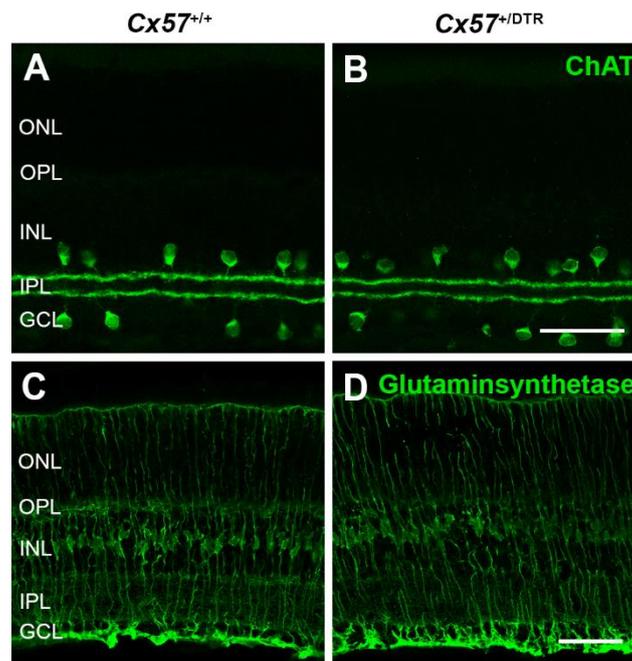
Um die Rolle der Horizontalzellen für die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse in der Mausretina zu untersuchen, wurde dieser Zelltyp im Rahmen des ersten Projekts dieser Arbeit während der frühen postnatalen Entwicklung ablatiert. Dazu wurden transgene  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäuse verwendet, die einen Primaten-Diphtherietoxinrezeptor unter der Kontrolle des Horizontalzell-spezifischen  $Cx57$ -Promotors exprimieren (Sonntag et al. 2012). Die Ablation der Horizontalzellen wurde durch eine Injektion von Diphtherietoxin an P4 und P5 induziert. Zu dieser Zeit befinden sich die Somata der Horizontalzellen bereits an ihrem Zielort, der distalen INL (Poche et al. 2007), aber die Axonterminalien haben noch nicht damit begonnen, Kontakte mit den Stäbchenterminalien auszubilden (Sherry et al. 2003). Durch diesen späten Injektionszeitpunkt (kurz vor der Invagination der Horizontalzellfortsätze in die Stäbchenterminalien) sollten mögliche Nebeneffekte der Horizontalzell-Ablation auf die retinale Zelldifferenzierung und Laminierung minimiert werden.

Zur Kontrolle der Vollständigkeit und Spezifität der Horizontalzell-Ablation wurden retinale Kryoschnitte von Diphtherietoxin-behandelten  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen verschiedenen Alters (P8, P11, P15, P21) mit einem Antikörper gegen Calbindin gefärbt. Dieser markiert sowohl Horizontalzellen als auch einige Typen von Amakrin- und Ganglienzellen (Haverkamp und Wässle 2000). Bereits an P8 war die Calbindin-Immunoreaktivität in den Horizontalzellen der  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäuse stark reduziert (Abb. 10 B) und von P11 an waren keine Calbindin-positiven Horizontalzellen mehr in der Retina erkennbar (Abb. 10 D, F, H). Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Calbindin-positiven Amakrin- und Ganglienzellen keine Veränderungen (Abb. B, D, F, H). Um die Spezifität der Horizontalzell-Ablation weiter zu überprüfen, wurden die beiden spiegelsymmetrischen Populationen von ON- und OFF-*starburst*-Amakrinzellen mit einem Antikörper gegen die Cholinacetyltransferase (ChAT) und die Müllerzellen mit einem Antikörper gegen die Glutaminsynthetase markiert. Sowohl bei den *starburst*-Amakrinzellen als auch bei den Müllerzellen konnten an P15 keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Wildtyp- und Horizontalzell-ablatierten Mäusen festgestellt werden (Abb. 11 A-D), was darauf hindeutet, dass die Zellablation tatsächlich auf die Horizontalzellen beschränkt ist.

Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse, dass die gesamte Population der Horizontalzellen selektiv ablatiert wurde und die *Cx57/DTR*-Mauslinie somit ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung der Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse in Abwesenheit der Horizontalzellen darstellt.



**Abbildung 10: Horizontallzell-Ablation während der frühen postnatalen Entwicklung.** (A-H) Retinale Vertikalschnitte von Diphtherietoxin-behandelten *Cx57*<sup>+/+</sup>- und *Cx57*<sup>+/DTR</sup>-Mäusen wurden mit einem Antikörper gegen Calbindin gefärbt. Die Calbindin-Immunoreaktivität in den Horizontalzellen der *Cx57*<sup>+/DTR</sup>-Mäuse war an P8 drastisch reduziert (B) und ab P11 vollständig verschwunden (D, F, H). Die Calbindin-positiven Amakrin- und Ganglienzellen zeigten dagegen keine Veränderungen (B, D, F, H). Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

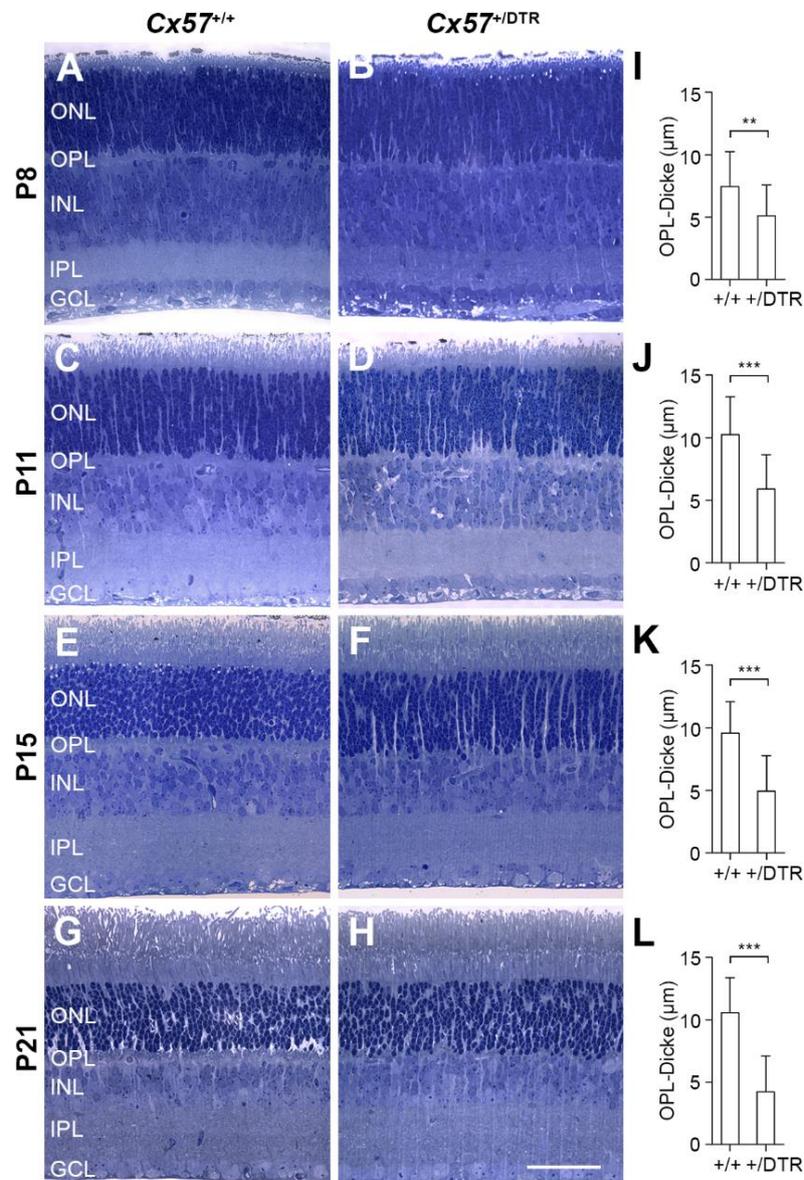


**Abbildung 11: Die frühe postnatale Horizontalzell-Ablation hat keine Auswirkungen auf die grobe Morphologie der *starburst*-Amakrinzellen und Müllerzellen.** (A, B) Immunhistochemische Färbung von *Cx57*<sup>+/+</sup>- und *Cx57*<sup>+/DTR</sup>-Retinen (P15) mit einem ChAT-Antikörper. Die Morphologie der ChAT-positiven *starburst*-Amakrinzellen war in den Wildtyp- und Horizontalzell-ablatierten Mäusen vergleichbar. (C, D) Vertikale Kryoschnitte von *Cx57*<sup>+/+</sup>- und *Cx57*<sup>+/DTR</sup>-Retinen (P15) wurden mit einem Antikörper gegen die Glutaminsynthetase, ein Markerprotein für Müllerzellen, gefärbt. Es konnten keine erkennbaren Unterschiede in der Morphologie der Müllerzellen von Wildtyp- und Horizontalzell-ablatierten Mäusen festgestellt werden. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

### 3.1.2 Allgemeine Morphologie der Retina

Zur Beurteilung der Auswirkungen der Horizontalzell-Ablation auf die Entwicklung der allgemeinen Morphologie der Retina wurden retinale Semidünnschnitte von *Cx57*<sup>+/+</sup>- und *Cx57*<sup>+/DTR</sup>-Mäusen mit Toluidinblau gefärbt (Abb. 12 A-H). Während die ONL, INL, IPL und GCL eine vergleichbare Breite aufwiesen, war die Dicke der OPL in den Horizontalzell-ablatierten Tieren zwischen P8 und P21 signifikant reduziert (Abb. 12 I-L; P8: *Cx57*<sup>+/+</sup>:  $7,45 \pm 2,81 \mu\text{m}$ , *Cx57*<sup>+/DTR</sup>:  $5,09 \pm 2,50 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,01$ ; P11: *Cx57*<sup>+/+</sup>:  $10,26 \pm 3,02 \mu\text{m}$ , *Cx57*<sup>+/DTR</sup>:  $5,90 \pm 2,75 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ; P15: *Cx57*<sup>+/+</sup>:  $9,58 \pm 2,51 \mu\text{m}$ , *Cx57*<sup>+/DTR</sup>:  $4,93 \pm 2,85 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ; P21: *Cx57*<sup>+/+</sup>:  $10,58 \pm 2,78 \mu\text{m}$ , *Cx57*<sup>+/DTR</sup>:  $4,22 \pm 2,89 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ; Wilcoxon-Rangsummentest). Da in dieser Schicht die Photorezeptor-Bandsynapsen lokalisiert sind, deutet

dieser Befund darauf hin, dass die korrekte Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen in Abwesenheit der Horizontalzellen beeinträchtigt ist.



**Abbildung 12: Verringerte OPL-Dicke nach früher postnataler Horizontalzell-Ablation. (A-H)** Toluidinblau-Färbung vertikaler Semidünnschnitte von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen. Im Vergleich zur OPL-Dicke der Wildtyp-Mäuse war die OPL-Dicke der Horizontalzell-ablatierten Mäuse von P8 bis P21 deutlich reduziert. Die übrigen Schichten (ONL, INL, IPL, GCL) wiesen hingegen eine ähnliche Breite auf. **(I-L)** Quantifizierung der OPL-Dicke von  $Cx57^{+/+}$ - (P8:  $n = 3$ , P11:  $n = 4$ , P15:  $n = 5$ , P21:  $n = 3$ ) und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen (P8:  $n = 3$ , P11:  $n = 4$ , P15:  $n = 3$ , P21:  $n = 2$ ).  $p < 0,01$  (P8),  $p < 0,0001$  (P11, P15, P21), Wilcoxon-Rangsummentest. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ . Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3 Invagination von Stäbchen-Bipolarzellen und Proteinband-Aufbau

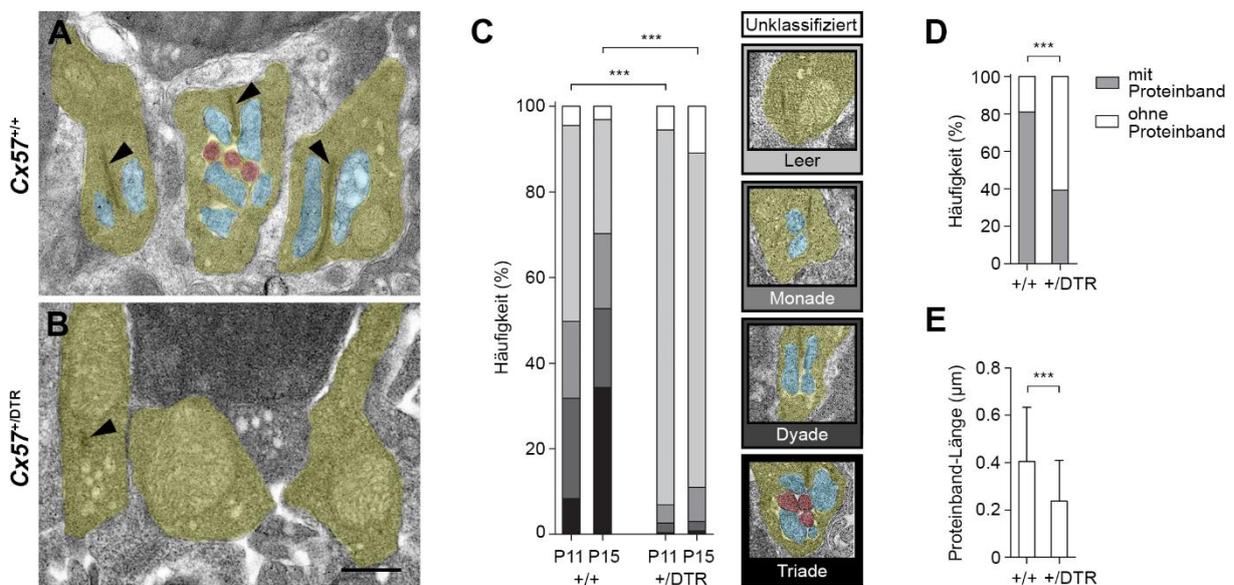
Um zu überprüfen, ob die ON-Bipolarzellendriten in Abwesenheit der Horizontalzellen in der Lage sind in die Stäbchenterminalien zu invaginieren, wurde eine ultrastrukturelle Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Stäbchenterminalien von *Cx57<sup>+/-</sup>*- und *Cx57<sup>+/DTR</sup>*-Mäusen an P11 (einen Tag nach Beginn der ON-Bipolarzell-Invagination) und P15 (einen Tag nach Abschluss der Synapsenbildung) elektronenmikroskopisch untersucht und nach ihrem Entwicklungsstadium in folgende Kategorien eingeordnet: (1) leere Stäbchenterminalien (Stäbchenterminalien-Profile ohne Invaginationen), (2) Monaden (Stäbchenterminalien-Profile mit einem invaginierenden Horizontalzellfortsatz), (3) Dyaden (Stäbchenterminalien-Profile mit zwei invaginierenden Horizontalzellfortsätzen), (4) Triaden (Stäbchenterminalien-Profile mit mindestens einem invaginierenden ON-Bipolarzellendriten) und unklassifiziert (Profile, die nicht eindeutig einer der anderen Gruppen zugeordnet werden konnten).

Die elektronenmikroskopische Analyse zeigte, dass an P11 fast die Hälfte der Stäbchenterminalien-Profile in den Wildtyp-Retinen noch keine Invaginationen aufwies. Einige Profile enthielten einen oder zwei invaginierende Horizontalzellfortsätze, aber nur wenige besaßen bereits einen invaginierenden Bipolarzellendriten (Abb. 13 C; 46 % leer, 18 % Monaden, 23 % Dyaden, 8 % Triaden, 5 % unklassifiziert, 849 Stäbchenterminalien-Profile von  $n = 4$  Mäusen). Verglichen mit P11 hatte sich der Anteil an leeren Stäbchenterminalien-Profilen in den Kontroll-Mäusen an P15 verringert und der Anteil an Triaden erhöht (Abb. 13 A, C; 27 % leer, 18 % Monaden, 18 % Dyaden, 34 % Triaden, 3 % unklassifiziert, 746 Stäbchenterminalien-Profile von  $n = 3$  Mäusen).

Im Gegensatz zu den Stäbchenterminalien-Profilen der Wildtyp-Retinen beinhalteten die Stäbchenterminalien-Profile der *Cx57<sup>+/DTR</sup>*-Retinen zu beiden Untersuchungszeitpunkten meist keine Invaginationen. Vereinzelt wurden Profile mit Überresten von ein oder zwei Horizontalzellfortsätzen gefunden, was zeigt, dass ein geringer Anteil an Horizontalzellen trotz der Diphtherietoxin-Injektionen an P4 und P5 noch in der Lage war in die Stäbchenterminalien zu invaginieren. Vollständige Triaden traten jedoch nur in sehr seltenen Fällen auf und Stäbchenterminalien-Profile mit invaginierenden ON-Bipolarzellendriten, aber ohne invaginierende Horizontalfortsätze, wurden überhaupt nicht beobachtet (Abb. 13 B, C; P11: 88 % leer, 4 % Monaden, 2 % Dyaden, < 1 % Triaden, 6 % unklassifiziert, 824 Stäbchenterminalien-Profile von  $n = 4$  Mäusen; P15: 78 % leer, 8 % Monaden, 2 % Dyaden, < 1 % Triaden, 11 % unklassifiziert, 1177 Stäbchenterminalien-Profile von  $n = 5$  Mäusen). Die

Verteilung der verschiedenen Entwicklungsstadien in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen unterschied sich für beide Altersstufen signifikant von der Verteilung der Entwicklungsstadien in den Wildtyp-Mäusen (P11, P15:  $p < 0,0001$ ,  $\chi^2$ -Test). Da in dem gesamten Untersuchungszeitraum (in dem normalerweise die Invagination der Stäbchen-Bipolarzellen in das Stäbchenterminal stattfindet) keine Stäbchenterminalien-Profile gefunden wurden, die ausschließlich invaginierende ON-Bipolarzellendriten enthielten, ist davon auszugehen, dass die Horizontalzellen für die Invagination der Stäbchen-Bipolarzellen in die Stäbchenterminalien zwingend erforderlich sind.

Neben den Invaginationen wurden auch die präsynaptischen Proteinbänder der Stäbchenterminalien genauer betrachtet (Abb. 13 A, B, Pfeile). Eine Analyse der Proteinband-Häufigkeiten an P15 ergab, dass in den Stäbchenterminalien-Profilen der  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäuse signifikant weniger Proteinbänder vorhanden waren als in den Stäbchenterminalien-Profilen der  $Cx57^{+/+}$ -Mäuse (Abb. 13 D;  $Cx57^{+/+}$ : 81 % mit Proteinband, 19 % ohne Proteinband, 746 Stäbchenterminalien-Profile von  $n = 3$  Mäusen;  $Cx57^{+/DTR}$ : 39 % mit Proteinband, 61 % ohne Proteinband, 1177 Stäbchenterminalien-Profile von  $n = 5$  Mäusen;  $p < 0,0001$ , exakter Fisher-Test). Darüber hinaus war die Länge der vorhandenen Proteinbänder in den Horizontalzell-ablatierten Retinen an P15 signifikant reduziert (Abb. 13 E;  $Cx57^{+/+}$ :  $0,40 \pm 0,23 \mu\text{m}$ ,  $n = 3$ ;  $Cx57^{+/DTR}$ :  $0,24 \pm 0,17 \mu\text{m}$ ,  $n = 5$ ;  $p < 0,0001$ , Wilcoxon-Rangsummentest). Diese beiden Befunde liefern Hinweise darauf, dass der Proteinband-Aufbau in Abwesenheit der Horizontalzellen gestört ist.

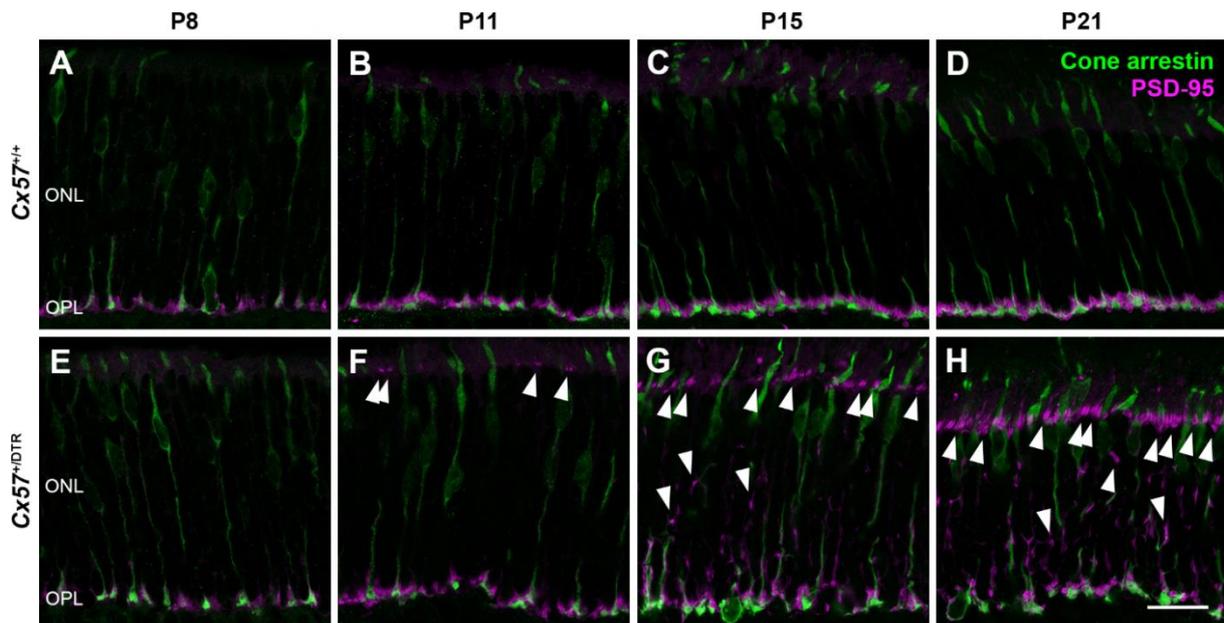


### 3.1.4 Lokalisation der Photorezeptorterminalien

Da die verringerte OPL-Dicke in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen (Abb. 12 I-L) auf eine reduzierte Anzahl an Photorezeptorterminalien in dieser Schicht hindeutet, wurde die Verteilung der Zapfen- und Stäbchen-Endfüßchen innerhalb der Retina näher untersucht. Dazu wurden retinale Kryoschnitte mit einem Antikörper gegen PSD-95, ein Markerprotein für Zapfen- und Stäbchenterminalien (Koulen et al., 1998), und einem Antikörper gegen *cone arrestin*, ein Markerprotein für Zapfen (Zhu et al., 2002), doppelmarkiert. Auf diese Weise konnte zwischen den Terminalien von Zapfen und Stäbchen unterschieden werden. In den *Cx57<sup>+/+</sup>*-Retinen waren bereits an P8 einige Stäbchenterminalien in der OPL zu finden (Abb. 14 A). Die Zahl der Stäbchen-Endfüßchen innerhalb dieser Schicht stieg mit fortschreitendem Alter an (Abb. 14 A-D). Auch in den *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Retinen war von P8 bis P11 eine Zunahme der Anzahl an Stäbchenterminalien in der OPL zu beobachten (Abb. 14 E, F). Dieser Befund ist konsistent mit vorherigen Studien, die darauf hindeuten, dass die Horizontalzellen nicht für die

**Abbildung 13: Fehlende Invaginationen von ON-Bipolarzellen und reduzierte Häufigkeit und Länge von Proteinbändern in Stäbchenterminalien von Horizontalzell-ablatierten Mäusen. (A, B)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stäbchenterminalien in *Cx57<sup>+/+</sup>*- und *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäusen an P15. Während die Stäbchenterminalien-Profile (gelb) der Wildtyp-Retinen deutlich erkennbare präsynaptische Proteinbänder (Pfeile) und Invaginationen von Horizontalzellen (blau) und ON-Bipolarzellen (rot) aufwiesen (**A**), zeigten die Stäbchenterminalien-Profile der Horizontalzell-ablatierten Retinen meist keine Invaginationen und Proteinbänder waren häufig nicht vorhanden oder kürzer (Pfeil) (**B**). (**C**) Quantifizierung verschiedener Entwicklungsstadien von Stäbchenterminalien in *Cx57<sup>+/+</sup>*- (P11:  $n = 4$ , P15:  $n = 3$ ) und *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäusen (P11:  $n = 4$ , P15:  $n = 5$ ) an P11 und P15. Zwischen 746 und 1177 Stäbchenterminalien-Profile wurden für jeden Genotyp und jedes Altersstadium analysiert. Profile ohne Invaginationen wurden als leer, Profile mit einem invaginierenden Horizontalzellfortsatz als Monade, Profile mit zwei invaginierenden Horizontalzellfortsätzen als Dyade und Profile mit mindestens einem invaginierenden Bipolarzellfortsatz als Triade klassifiziert.  $p < 0,0001$ ,  $\chi^2$ -Test. (**D**) Häufigkeiten von Stäbchenterminalien-Profilen mit und ohne Proteinband in *Cx57<sup>+/+</sup>* ( $n = 3$ ) und *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Retinen ( $n = 5$ ) an P15.  $p < 0,0001$ , exakter Fisher-Test. (**E**) Quantifizierung der Proteinband-Länge in Stäbchenterminalien-Profilen von Wildtyp- ( $n = 3$ ) und Horizontalzell-ablatierten Mäusen ( $n = 5$ ) an P15.  $p < 0,0001$ , Wilcoxon-Rangsummentest. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. \*\*\*  $p < 0,001$ . Maßstabsbalken: 500 nm.

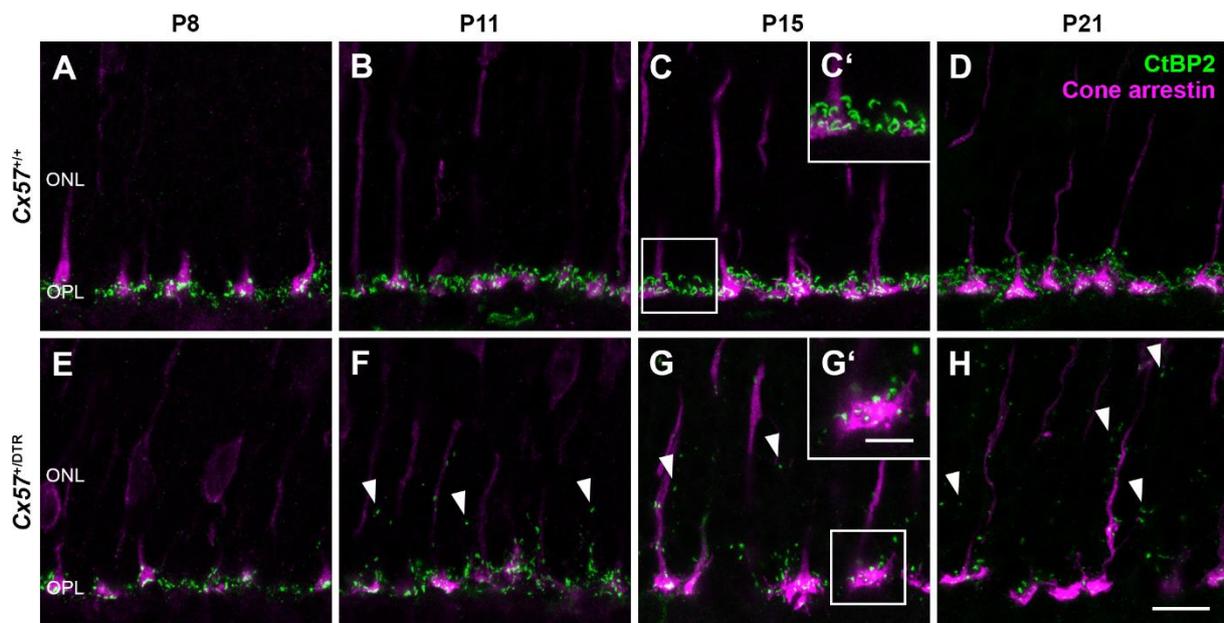
korrekte Wegfindung der Stäbchenterminalien in die OPL notwendig sind (Messersmith and Redburn, 1990; Keeley et al., 2013). Allerdings zeigten sich ab P11 auch zunehmend ektopische Stäbchen-Endfüßchen in der ONL (Abb. 14 F-H, Pfeile), was vermuten lässt, dass die Stäbchen ihre Terminalien infolge der gescheiterten Synapsenbildung aus der OPL zurückziehen. Im Gegensatz zu den Stäbchenterminalien verblieben die Zapfenterminalien in der OPL (Abb. 14 E-H).



**Abbildung 14: Retriktion von Stäbchenterminalien infolge der frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation.** (A-H) Vertikale Kryoschnitte von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen wurden mit Antikörpern gegen *cone arrestin* (grün), ein Markerprotein für Zapfen, und PSD-95 (magenta), ein Markerprotein für Zapfen- und Stäbchenterminalien, gefärbt. Während die PSD-95-positiven Photorezeptorterminalien in den Wildtyp-Mäusen ausschließlich in der OPL lokalisiert waren (A-D), konnte in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen zwischen P11 und P21 eine steigende Anzahl an ektopischen Stäbchenterminalien in der ONL beobachtet werden (Pfeile) (F, G, H). Die Zapfenterminalien der  $Cx57^{+/DTR}$ -Tiere blieben dagegen auf die OPL beschränkt (E-H). Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.5 Verteilung der präsynaptischen Proteinbänder in der äußeren Retina

Durch die elektronenmikroskopische Analyse konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit und Länge der präsynaptischen Proteinbänder in den Stäbchenterminalien der Horizontalzell-ablatierten Mäusen signifikant reduziert sind (Abb. 13 D, E). Zur zusätzlichen Untersuchung der Verteilung der Proteinbänder in der äußeren Retina wurden vertikale Kryoschnitte von *Cx57<sup>+/+</sup>*- und *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Retinen mit einem Antikörper gegen das *C-terminal-binding protein 2* (CtBP2), das identisch mit der B-Domäne der Proteinband-Komponente RIBEYE ist (Schmitz et al. 2000), gefärbt. Darüber hinaus wurde ein Antikörper gegen *cone arrestin* eingesetzt, um zwischen den Proteinbändern von Zapfen und Stäbchen unterscheiden zu können. Während die CtBP2-positiven Strukturen in den Wildtyp-Mäusen hauptsächlich auf die OPL beschränkt waren (Abb. 15 A-D), wurden in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen ab P11 zahlreiche ektopische CtBP2-positive Strukturen in der ONL gefunden, die nicht mit den *cone arrestin*-immunoreaktiven Zapfen kolokalisierten (Abb. 15 F, G, H, Pfeile). Dieser Befund ist konsistent mit der Beobachtung, dass die Stäbchen ihre Terminalien aus der OPL zurückziehen (Abb. 15 F, G, H, Pfeile). Die klassische Hufeisenform der Proteinbänder, die in den *Cx57<sup>+/+</sup>*-Retinen von P15 an deutlich erkennbar war (Abb. 15 C, C', D), wurde in den *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Retinen selten vorgefunden. In Übereinstimmung mit den ultrastrukturellen Aufnahmen waren die CtBP2-positiven Strukturen in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen in der Regel punktförmig und kürzer als in den Wildtyp-Mäusen (Abb. 15 G, G', H), was einen gestörten Proteinband-Aufbau bestätigt.

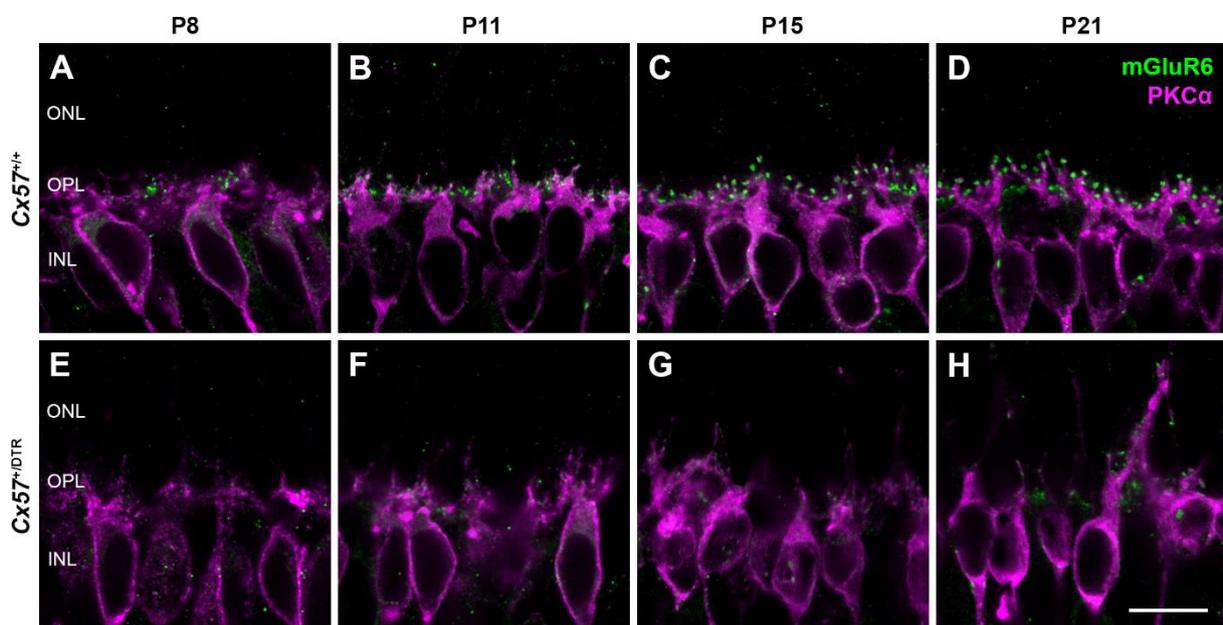


**Abbildung 15: Ektopische Proteinbänder in der ONL von Horizontalzell-ablatierten Mäusen. (A-H)** Doppelmarkierung retinaler Kryoschnitte von *Cx57<sup>+/+</sup>*- und *Cx57<sup>+/DTR</sup>*-Mäusen mit Antikörpern gegen CtBP2 (grün) und *cone arrestin* (magenta). Die CtBP2-positiven Proteinbänder der Wildtyp-Retinen waren hauptsächlich in der OPL lokalisiert (A-D) und zeigten ab P15 die charakteristische Hufeisenform (C, C', D). Im Gegensatz dazu waren in den Horizontalzell-ablatierten Retinen von P11 bis P21 zunehmend ektopische Proteinbänder in der ONL erkennbar (Pfeile) (F-H), die häufig kürzer waren als in den Kontroll-Mäusen (G, G', H). Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m (H), 5  $\mu$ m (G').

### 3.1.6 Morphologie der Stäbchen-Bipolarzellen und Lokalisation der postsynaptischen Proteine mGluR6 und GPR179

Um die Auswirkungen der Horizontalzell-Ablation auf die postsynaptischen Elemente der Photorezeptor-Bandsynapse genauer zu untersuchen, wurden retinale Kryoschnitte mit einem Antikörper gegen die  $\alpha$ -Isoform der Proteinkinase C ( $PKC\alpha$ ), einen Stäbchen-Bipolarzell-Marker, und einem Antikörper gegen mGluR6, den Haupt-Glutamatrezeptor von ON-Bipolarzellen (Nomura 1994; Masu et al. 1995), gefärbt. Die Dendriten der ON-Bipolarzellen erwachsen aus apikalen, neuroepithelial-ähnlichen Fortsätzen, die sich bis zur äußeren limitierenden Membran erstrecken (Morgan et al. 2006). An P8 hatten die Stäbchen-Bipolarzellen der *Cx57<sup>+/+</sup>*-Mäuse bereits ein dendritisches Netzwerk in der OPL ausgebildet und vereinzelt waren kleine mGluR6-positive Punkte an den Spitzen der Dendriten erkennbar (Abb. 16 A). Die Anzahl und Größe der mGluR6-immunoreaktiven Punkte an den dendritischen Endigungen der Stäbchen-Bipolarzellen nahm zwischen P8 bis P21 deutlich zu

(Abb. 16 A-D). Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen war das dendritische Netzwerk der Stäbchen-Bipolarzellen in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen weniger stark verzweigt und einzelne Stäbchen-Bipolarzellendriten wuchsen in die ONL aus (Abb. 16 E-H). Zudem schienen weniger und kleinere mGluR6-positive Partikel an den Spitzen der Stäbchen-Bipolarzellendriten lokalisiert zu sein (Abb. 16 E-H). Um diesen Befund zu bestätigen, wurde eine Analyse der mGluR6-immunoreaktiven Partikel an P15 durchgeführt. Diese zeigte, dass sowohl die Anzahl als auch die durchschnittliche Größe der mGluR6-positiven Partikel in den  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen signifikant reduziert war (Tab. 6).



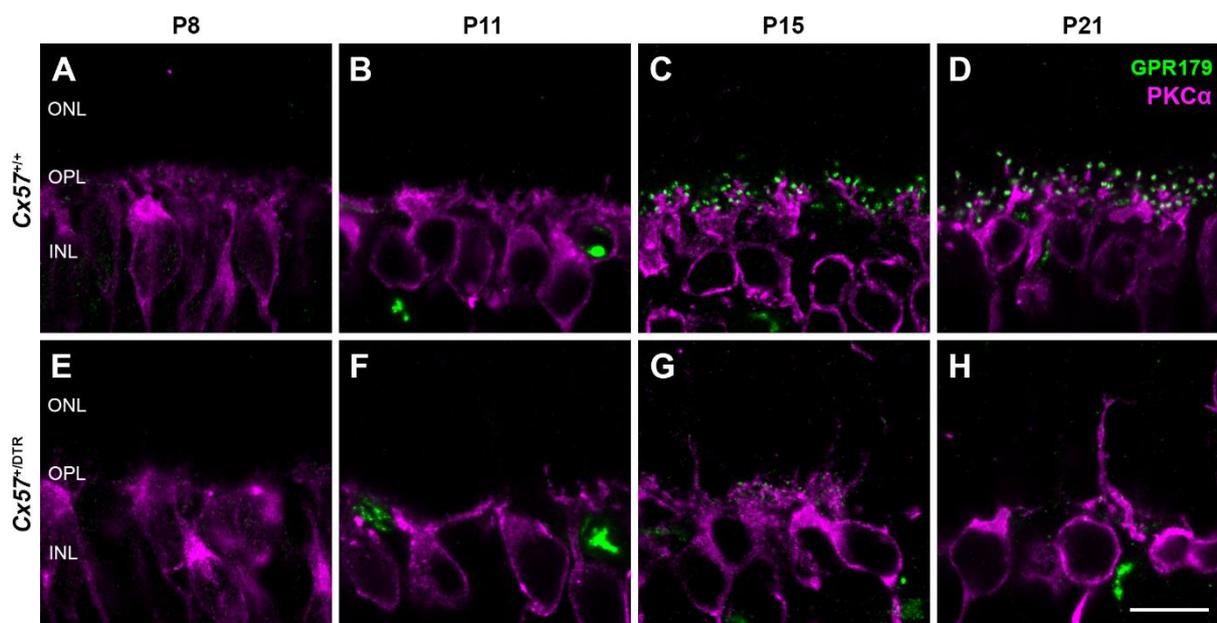
**Abbildung 16: Auswachsen von Stäbchen-Bipolarzellendriten und beeinträchtigte mGluR6-Rekrutierung nach früher postnataler Ablation der Horizontalzellen.** (A-H) Immunhistochemische Färbung von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen mit Antikörpern gegen mGluR6 (grün) und PKC $\alpha$  (magenta). Während die dendritischen Endigungen der PKC $\alpha$ -positiven Stäbchen-Bipolarzellen in den Wildtyp-Mäusen auf die OPL beschränkt waren (A-D), zeigte sich in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen ein fortschreitendes Auswachsen der Stäbchen-Bipolarzellendriten in die ONL (E-H). Im Vergleich zu den  $Cx57^{+/+}$ -Retinen (A-D) war die mGluR6-Expression an den Spitzen der Stäbchen-Bipolarzellendriten in den  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen deutlich reduziert (E-F). Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

**Tabelle 6: Quantifizierung mGluR6-positiver Partikel in Cx57<sup>+/+</sup>- und Cx57<sup>+DTR</sup>-Mäusen an P15.**

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben und wurden mit einem Wilcoxon-Rangsummentest auf statistische Signifikanz getestet.

	<i>Cx57<sup>+/+</sup></i>	<i>Cx57<sup>+DTR</sup></i>	<i>p</i> -Wert
Anzahl mGluR6-positiver Partikel pro 100 $\mu\text{m}$	93,7 $\pm$ 25,4	26,14 $\pm$ 16,0	< 0,0001
Durchschnittliche Größe mGluR6-positiver Partikel (in $\mu\text{m}^2$ )	0,12 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,02	< 0,0001

Zur weiteren Untersuchung möglicher postsynaptischer Veränderungen kam ein Antikörper gegen Ca<sub>v</sub>1.1, eine Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals, zum Einsatz. Dieser Antikörper kreuzreagiert mit GPR179 (Hasan et al. 2016), einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der an den Spitzen der ON-Bipolarzeldendriten exprimiert wird und als Membran-Anker für Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion fungiert (Orlandi et al. 2012) und transsynaptisch mit dem Dystroglycan-Pikachurin-Komplex der Photorezeptoren interagiert (Orlandi et al. 2018). Im Gegensatz zur mGluR6-Immunoreaktivität, die bereits ab P8 in der OPL von Wildtyp-Mäusen detektierbar war, konnten die ersten GPR179-positiven Punkte an den dendritischen Spitzen der Stäbchen-Bipolarzellen erst ab P15 nachgewiesen werden (Abb. 17 A-D). Da die GPR179-Expression in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen stark reduziert wirkte (Abb. 17 G, H), wurden die GPR179-positiven Partikel in den Cx57<sup>+/+</sup>- und Cx57<sup>+DTR</sup>-Retinen an P15 quantifiziert. Die Analyse bestätigte eine signifikante Reduktion der Anzahl und durchschnittlichen Größe der GPR179-immunoreaktiven Partikel in den Horizontalzell-ablatierten Tieren (Tab. 7). Zusammen mit der verringerten mGluR6-Expression deutet dieser Befund darauf hin, dass die Rekrutierung von Komponenten der mGluR6-Signaltransduktionskaskade zu den Spitzen der Stäbchen-Bipolarzeldendriten infolge der fehlgeschlagenen Invagination ins Stäbchenterminal gehemmt ist.



**Abbildung 17: Die frühe postnatale Horizontalzell-Ablation hemmt die Rekrutierung von GPR179 zu den dendritischen Spitzen der Stäbchen-Bipolarzellen.** (A-H) Vertikale Kryoschnitte von *Cx57<sup>+/+</sup>*- und *Cx57<sup>+/DTR</sup>*-Retinen wurden mit einem Antikörper gegen  $Ca_v1.1$  (grün), der mit GPR179 kreuzreagiert, und einem Antikörper gegen PKC $\alpha$  (magenta) gefärbt. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen, die ab P15 deutlich erkennbare GPR179-positive Punkte an nahezu allen dendritischen Endigungen der Stäbchen-Bipolarzellen aufwiesen (C, D), waren in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen nur sehr wenige und kleine GPR179-immunoreaktive Punkte an den Spitzen der Stäbchen-Bipolarzellendriten erkennbar (G, H). Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

**Tabelle 7: Quantifizierung GPR179-positiver Partikel in *Cx57<sup>+/+</sup>*- und *Cx57<sup>+/DTR</sup>*-Mäusen an P15.**

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben und wurden mit einem Wilcoxon-Rangsummentest auf statistische Signifikanz getestet.

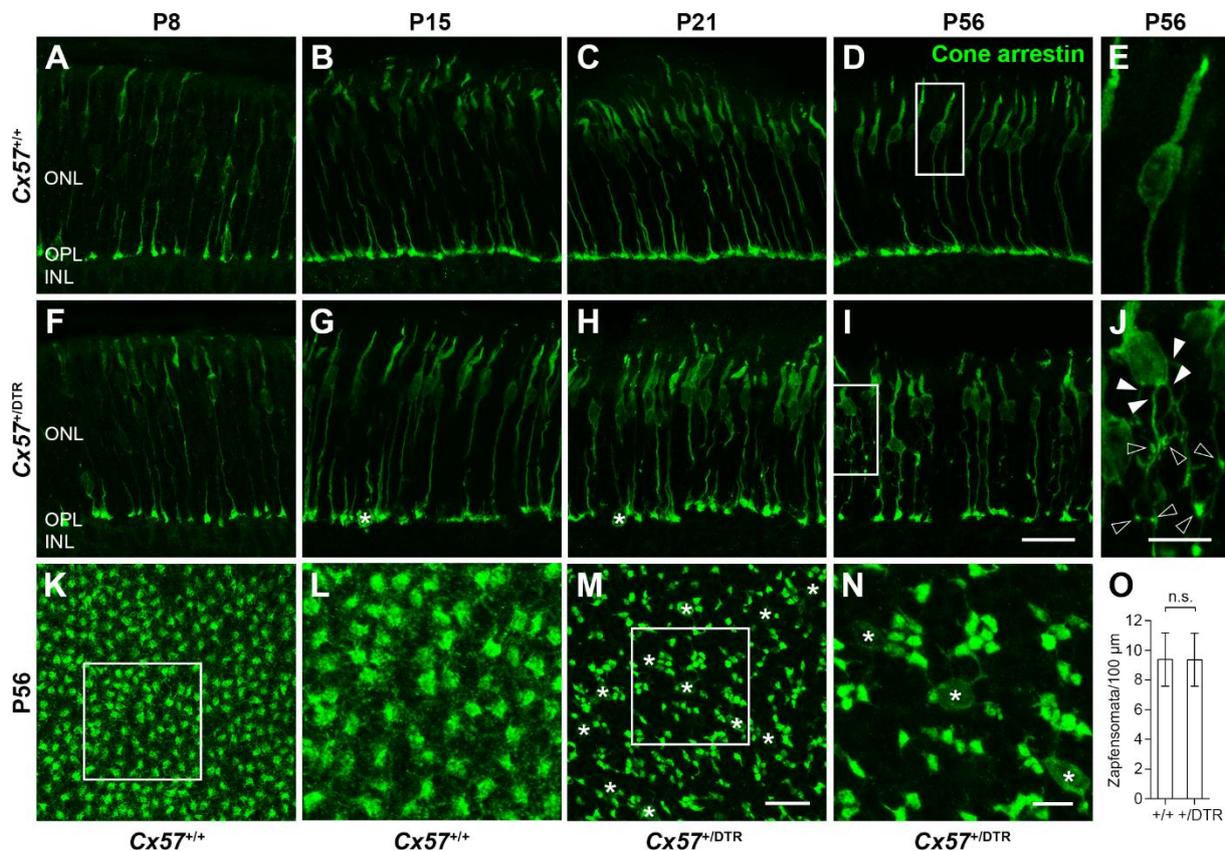
	<i>Cx57<sup>+/+</sup></i>	<i>Cx57<sup>+/DTR</sup></i>	<i>p</i> -Wert
Anzahl GPR179-positiver Partikel pro 100 $\mu$ m	82,9 $\pm$ 25,6	36,5 $\pm$ 27,5	< 0,0001
Durchschnittliche Größe GPR179-positiver Partikel (in $\mu$ m <sup>2</sup> )	0,12 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,01	< 0,0001

## 3.2 Auswirkungen einer frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation auf die weitere Entwicklung und den Erhalt der Zapfen-Bandsynapse

### 3.2.1 Morphologie der Zapfen

Im zweiten Projekt dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen die an P4/P5 induzierte Horizontalzell-Ablation auf die weitere Entwicklung der Zapfen sowie deren synaptischen Kontakte mit Bipolarzellen hat. Um die Morphologie der Zapfen über die Zeit zu verfolgen, wurden retinale Vertikalschnitte von *Cx57<sup>+/+</sup>*- und *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäusen verschiedenen Alters (P8, P15, P21, P56) mit einem *cone arrestin*-Antikörper gefärbt. In den Wildtyp-Retinen zeigten die Zapfen während des gesamten Untersuchungszeitraums den klassischen Aufbau bestehend aus einem Außensegment, einem Innensegment, einem Soma und einem Axon mit einem synaptischen Endfüßchen. Die synaptischen Endfüßchen waren in der OPL lokalisiert und wiesen eine regelmäßige Verteilung innerhalb dieser Schicht auf (Abb. 18 A-E). Während der zweiten postnatalen Woche durchlaufen die Zellkerne der Zapfen eine Phase der Migration, bevor sie ihre endgültige Position im äußersten Bereich der ONL einnehmen (Rich et al. 1997). Im Einklang mit diesem Befund waren die Zapfensomata der *Cx57<sup>+/+</sup>*-Mäuse an P8 über die gesamte ONL-Breite verstreut (Abb. 18 A), während sie ab P15 ausschließlich in der distalen ONL positioniert waren (Abb. 18 B-E). In den Horizontalzell-ablatierten Retinen wurden zunächst (P8) keine offensichtlichen Veränderungen in der Morphologie der Zapfen festgestellt (Abb. 18 F). Von P15 an waren jedoch einige mispositionierte Zapfensomata auf Höhe der OPL zu beobachten (Abb. 18 G-I, Sternchen) und die räumliche Anordnung der Zapfenterminalien in der OPL wirkte ungleichmäßig (Abb. 18 G-I). An P56 zeigten die Zapfen der *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäuse schließlich eine deutlich von der Norm abweichende Morphologie. Die Zapfenaxone waren stark verzweigt und besaßen jeweils ein synaptisches Terminal am Ende eines Seitenastes (Abb. 18 J, offene Pfeile). Darüber hinaus gingen in manchen Fällen mehrere Axone aus einem Zellkörper hervor (Abb. 18 I, J, weiße Pfeile). Zur genaueren Beurteilung der Verteilung der Zapfenterminalien in der OPL wurde eine *cone arrestin*-Färbung von Retina-Ganzpräparaten (P56) durchgeführt. Während die Zapfen-Endfüßchen der Wildtyp-Retinen ein regelmäßiges Mosaik formten und eine große Zahl an divergierenden Telodendrien aufwiesen (Abb. 18 K, L), bildeten die Zapfen-Endfüßchen der Horizontalzell-ablatierten Retinen Cluster und das Telodendrien-Netzwerk war weniger stark ausgeprägt (Abb. 18 M, N). Wie auch in den retinalen Vertikalschnitten wurden in den Retina-Ganzpräparaten der *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäuse einige falsch positionierte Zapfensomata in der OPL beobachtet (Abb. 18 M, N, Sternchen).

Eine Quantifizierung der korrekt und mislokalisierten Zapfenzellkörper bestätigte, dass sich die Verteilungen der Zapfensomata innerhalb der ONL signifikant unterschieden (Tab. 8). Trotz der enormen strukturellen Veränderungen wurden an P56 keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Zapfen zwischen den  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen festgestellt (Abb. 18, O;  $Cx57^{+/+}$ :  $9,38 \pm 1,80$  Zapfensomata/100  $\mu\text{m}$ ,  $Cx57^{+/DTR}$ :  $9,37 \pm 1,78$  Zapfensomata/100  $\mu\text{m}$ ,  $p = 0,9736$ ,  $t$ -Test für unabhängige Stichproben), was darauf hindeutet, dass die aberrante Zapfenmorphologie kein Anzeichen einer Degeneration darstellt.



**Abbildung 18: Abnormale Morphologie von adulten Zapfen nach früher postnataler Horizontalzell-Ablation.** (A-J) Immunhistochemische Färbung von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen (P56) mit einem Antikörper gegen *cone arrestin*. In den Wildtyp-Mäusen wiesen die Zapfen die typische Morphologie bestehend aus einem Außen- und Innensegment, einem Zellkörper und einem Axon mit einem synaptischen Terminal auf. Die Terminalien der Zapfen waren ausschließlich in der OPL lokalisiert und regelmäßig in dieser Schicht verteilt (A-E). Während die Zapfensomata an P8 über die gesamte ONL verstreut waren (A), hatten sie ab P15 ihre finale Position in der distalen ONL eingenommen (B-E). In den  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen war die Morphologie der Zapfen an P8 noch nicht von der in den  $Cx57^{+/+}$ -Mäusen zu unterscheiden (A, F). Von P15 an (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

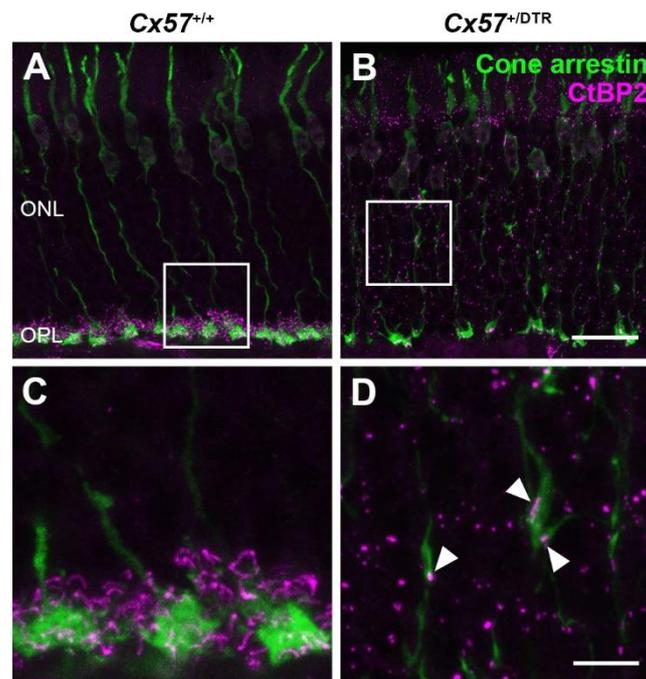
**Tabelle 8: Quantifizierung korrekt positionierter und mislokalisierter Zapfensomata in *Cx57<sup>+/+</sup>*- und *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäusen an P56.** Die Daten wurden mit einem exakten Fisher-Test auf statistische Signifikanz getestet.

	<i>Cx57<sup>+/+</sup></i>	<i>Cx57<sup>+DTR</sup></i>	<i>p</i> -Wert
Anzahl korrekt positionierter Zapfensomata	670 (100,0 %)	664 (99,3 %)	0,0309
Anzahl mislokalisierter Zapfensomata	0 (0,0 %)	5 (0,7 %)	

### 3.2.2 Lokalisation der Proteinbänder innerhalb der Zapfen

Um zu überprüfen, ob die neu gebildeten Zapfenterminalien in den adulten *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäusen (P56) präsynaptische Proteinbänder und somit potenzielle Glutamat-Freisetzungstellen besitzen, wurde eine Doppelmarkierung von *cone arrestin* und CtBP2 durchgeführt. In den Wildtyp-Retinen wiesen die CtBP2-positiven Proteinbänder der Zapfen die typische Hufeisenform auf und waren ausschließlich in den Terminalien innerhalb der OPL lokalisiert (Abb. 19 A, C). Im Vergleich dazu waren die Proteinbänder der Zapfen in den Horizontalzell-ablatierten Retinen in der Regel kürzer (Abb. 19 B, D) und nicht nur in den ursprünglichen Zapfenterminalien innerhalb der OPL, sondern auch in den neu gebildeten Zapfenterminalien innerhalb der ONL zu finden (Abb. 19 D, Pfeile), was darauf hindeutet, dass die neuen Terminalien tatsächlich in der Lage sind Glutamat freisetzen.

**Abbildung 18: Abnormale Morphologie von adulten Zapfen nach früher postnataler Horizontalzell-Ablation.** (Fortsetzung) waren dagegen mislokalisierte Zapfensomata in der OPL erkennbar (Sternchen) (**G, H**) und die Zapfenterminalien waren ungleichmäßig in der OPL angeordnet (**G, H, I**). An P56 zeigten die Zapfen der Horizontalzell-ablatierten Retinen eine deutlich aberrante Morphologie mit verzweigten Axonen und einer Vielzahl an synaptischen Endfüßchen (offene Pfeile) (**J**). In einigen Fällen gingen zwei oder mehr Axone aus einem Soma hervor (weiße Pfeile) (**J**). (**K-N**) Retina-Ganzpräparate von *Cx57<sup>+/+</sup>*- und *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäusen (P56) wurden mit einem *cone arrestin*-Antikörper markiert. Während in der OPL der Wildtyp-Retinen ein regelmäßiges Mosaik der Zapfenterminalien sichtbar war (**K, L**), waren in der OPL der Horizontalzell-ablatierten Retinen Cluster von Zapfen-Endfüßchen sowie mispositionierte Zapfensomata zu beobachten (Sternchen) (**M, N**). (**O**) Quantifizierung der Zapfensomata pro 100  $\mu\text{m}$  in *Cx57<sup>+/+</sup>*- ( $n = 3$ ) und *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäusen ( $n = 3$ ) (P56).  $p = 0,9736$ ,  $t$ -Test für unabhängige Stichproben. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Maßstabsbalken: 25  $\mu\text{m}$  (**I, M**), 10  $\mu\text{m}$  (**J, N**).

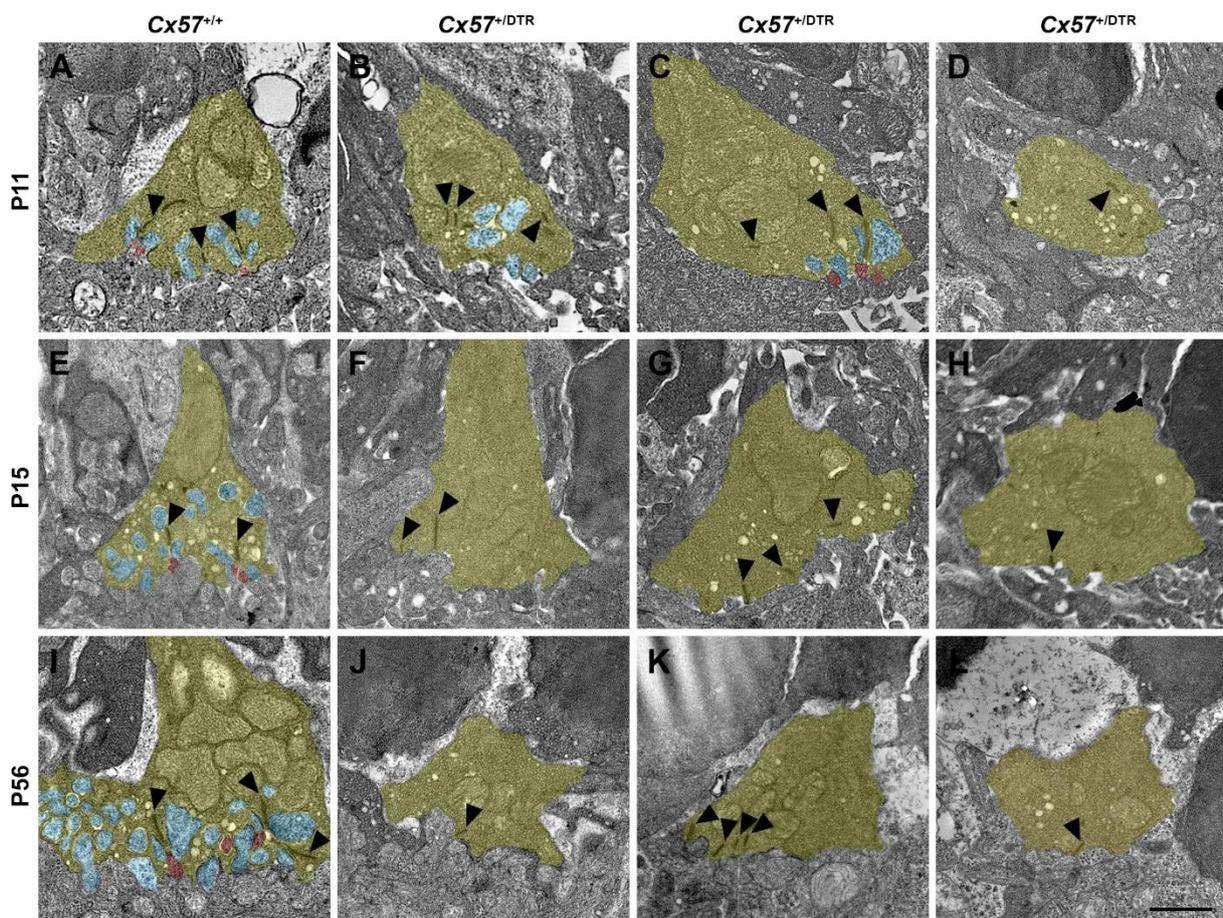


**Abbildung 19: Proteinbänder in neu gebildeten Zapfenterminalien von Horizontalzell-ablatierten Mäusen.** (A-D) Vertikale Krioschnitte von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen (P56) wurden mit Antikörpern gegen *cone arrestin* (grün) und CtBP2 (magenta) doppelmarkiert. In den Zapfen der Kontroll-Mäuse waren die CtBP2-immunoreaktiven Proteinbänder hufeisenförmig und auf Terminalien in der OPL beschränkt (A, C). Im Gegensatz dazu wiesen die Proteinbänder in den Zapfen der Horizontalzell-ablatierten Mäuse eine punktförmige Struktur auf und befanden sich sowohl in den ursprünglichen Zapfenterminalien in der OPL als auch in den neu gebildeten Zapfenterminalien in der ONL (Pfeile) (D). Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$  (B), 5  $\mu\text{m}$  (D).

### 3.2.3 Invagination von ON-Bipolarzellen und Proteinband-Aufbau und -Erhalt

Zur Untersuchung der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zapfen-Bandsynapsen wurden die Zapfen-Endfüßchen von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen an P11, P15 und P56 elektronenmikroskopisch analysiert. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien (Olney 1968; Blanks et al. 1974; Sherry et al. 2003) lagen in den Zapfenterminalien-Profilen der Wildtyp-Retinen in allen drei Altersstadien vollständige Triaden vor (Abb. 20 A, E, I). Ähnlich wie in den Stäbchenterminalien-Profilen der  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäuse (Abb. 13) waren auch in den Zapfenterminalien-Profilen der  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäuse an P11 vereinzelt Überreste von Horizontalzellen zu beobachten, was nicht verwunderlich ist, da die Horizontalzellen zum Zeitpunkt der Diphtherietoxin-Injektionen (P4/P5) bereits damit beginnen, Kontakte mit den Zapfen auszubilden (Olney 1968; Blanks et al. 1974; Sherry et al. 2003). Invaginierende ON-

Bipolarzellendendriten traten in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen an P11 jedoch nur sehr selten und ausschließlich in Kombination mit Horizontalzell-Resten auf (Abb. 20 C). Der Großteil der Zapfenterminalien-Profile wies zu diesem Untersuchungszeitpunkt keine postsynaptischen Invaginationen auf (Abb. 20 D). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Horizontalzellen sowohl für die Invagination der Stäbchen-Bipolarzellen in die Stäbchen-Endfüßchen (siehe Kapitel 3.1.3) als auch die Invagination der Zapfen-ON-Bipolarzellen in die Zapfen-Endfüßchen essenziell sind. An P15 und P56 waren in den Zapfenterminalien-Profilen der *Cx57<sup>+/-DTR</sup>*-Retinen keine invaginierenden Kontakte mehr vorhanden (Abb. 20 F-H, J-L), was auf eine Degeneration der wenigen gebildeten Kontakte mit ON-Bipolarzellen hinweist. Im Einklang mit den kleineren CtBP2-immunoreaktiven Strukturen (Abb. 19 B, D) zeigte die elektronenmikroskopische Analyse, dass die präsynaptischen Proteinbänder in den Zapfenterminalien-Profilen der Horizontalzell-ablatierten Mäuse häufig kürzer und nicht an der Membran verankert waren (Abb. 20 B-D, F-H, J-L, Pfeile).

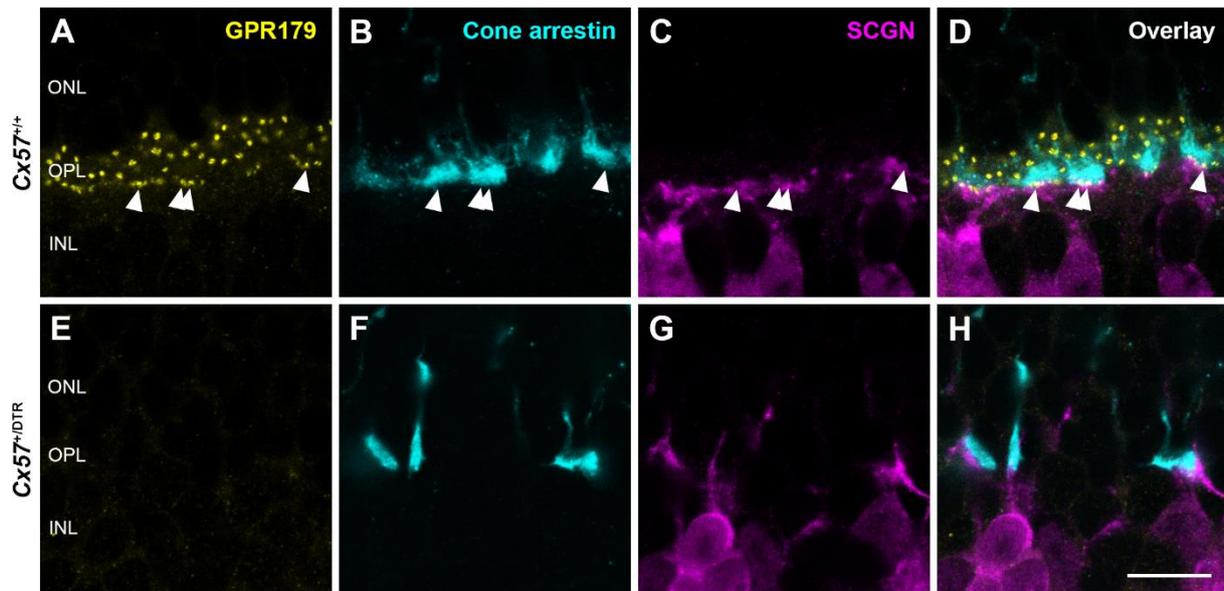


Leider war es nicht möglich, die neu gebildeten Zapfenterminalien in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zweifelsfrei zu identifizieren, da die Kriterien, die üblicherweise zur Unterscheidung von Stäbchen- und Zapfenterminalien herangezogen werden, wie z. B. die Endfüßchen-Größe oder die Anzahl an Proteinbändern, Invaginationen und Mitochondrien, nicht auf die neu gebildeten Zapfenterminalien und zurückgezogenen Stäbchenterminalien anwendbar waren.

Um den Verlust der synaptischen Kontakte zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen in den  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen (P56) zu überprüfen, wurde der makromolekulare mGluR6-Komplex mit einem Antikörper gegen  $Ca_v1.1$ , der in der Mausretina GPR179 detektiert (Hasan et al. 2016), die Zapfen mit einem Antikörper gegen *cone arrestin* und einige Zapfen-Bipolarzelltypen mit einem Antikörper gegen Secretagogin (Puthussery et al. 2010) gefärbt. In den Wildtyp-Retinen waren zahlreiche GPR179-positive Punkte in der OPL zu erkennen, die zum Teil an den Kontaktstellen zwischen Zapfenterminalien und Zapfen-Bipolarzellendriten lokalisiert waren (Abb. 21, A-D, Pfeile). Im Gegensatz dazu war die GPR179-Immunoreaktivität in den Horizontalzell-ablatierten Retinen vollständig verschwunden (Abb. 21 E-H). Da GPR179 für die Signaltransmission zwischen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen essenziell ist (Orlandi et al. 2012; Peachey et al. 2012; Orlandi et al. 2013; Ray et al. 2014; Orlandi et al. 2018), deutet dieser Befund darauf hin, dass die adulten  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäuse keine funktionalen Synapsen zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen besitzen.

---

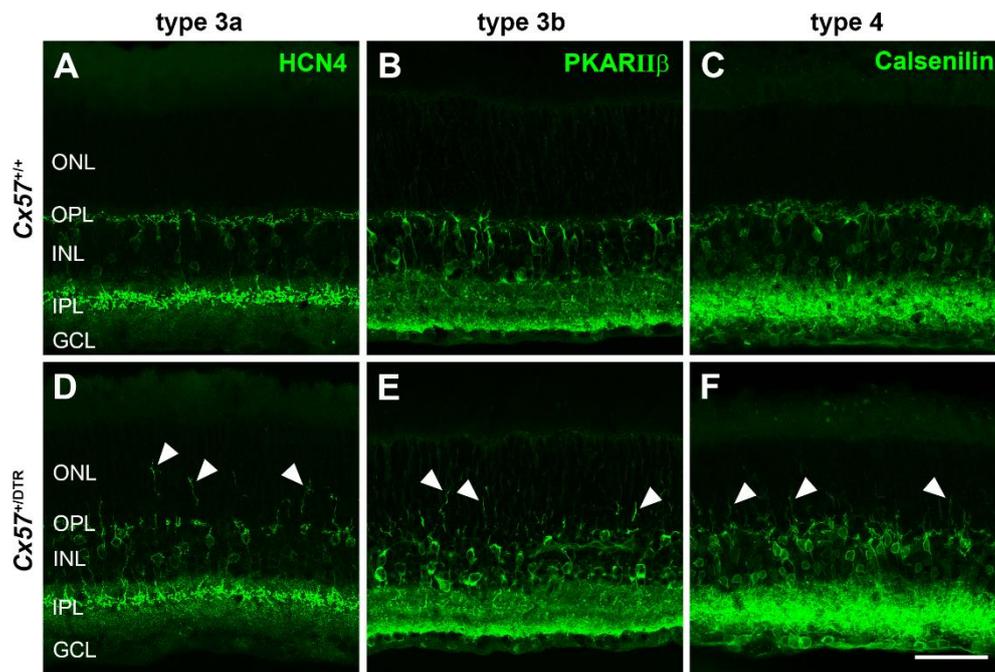
**Abbildung 20: Verlust von ON-Bipolarzell-Invaginationen in Zapfenterminalien infolge der frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation.** (A-L) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zapfenterminalien in  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen an P11, P15 und P56. In den Zapfenterminalien-Profilen (gelb) der Wildtyp-Retinen waren zu allen drei Untersuchungszeitpunkten eine Vielzahl an invaginierenden Horizontalzell- (blau) und ON-Bipolarzellendriten (rot) erkennbar (A, E, I). Die Zapfenterminalien-Profile der Horizontalzell-ablatierten Retinen wiesen an P11 vereinzelt Überreste von invaginierenden Horizontalzellendriten (B) oder vollständige Triaden auf (C). In den meisten Fällen zeigten die Zapfenterminalien-Profile allerdings keine Invaginationen (D). An P15 und P56 waren keine invaginierenden Elemente mehr vorhanden (F-H, J-L). Die präsynaptischen Proteinbänder in den Zapfenterminalien-Profilen der  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäuse waren oft kürzer als in den Zapfenterminalien-Profilen der  $Cx57^{+/+}$ -Mäuse und lagen teilweise freischwimmend im Cytoplasma vor (Pfeile) (B-D, F-H, J-L). Maßstabsbalken: 1  $\mu$ m.



**Abbildung 21: Fehlende funktionale Synapsen zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen in adulten Horizontalzell-ablatierten Mäusen.** (A-H) Retinale Vertikalschnitte von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen (P56) wurden mit einem Antikörper gegen Ca<sub>v</sub>1.1, der mit GPR179 (gelb) kreuzreagiert, einem Antikörper gegen *cone arrestin* (blau) und einem Antikörper gegen SCGN (magenta) markiert. Während in den Wildtyp-Retinen GPR179-positive Punkte an Kontaktstellen zwischen Zapfen und SCGN-positiven Zapfen-Bipolarzellen zu finden waren (Pfeile) (A-D), war die GPR179-Immunoreaktivität in den Horizontalzell-ablatierten Retinen abwesend (E-H), was darauf hinweist, dass keine funktionalen Synapsen zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen vorhanden sind. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

### 3.2.4 Morphologie der OFF-Bipolarzellen

Die Mausretina besitzt fünf Typen von OFF-Bipolarzellen, die Kontakte mit Zapfen bilden (Behrens et al. 2016; Shekhar et al. 2016; Tsukamoto und Omi 2017). Zur Untersuchung der Morphologie der OFF-Bipolarzellen in adulten Wildtyp- und Horizontalzell-ablatierten Mäusen (P56) wurden Typ 3a-OFF-Bipolarzellen mit einem Antikörper gegen *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4* (HCN4), Typ 3b-OFF-Bipolarzellen mit einem Antikörper gegen die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit der Proteinkinase A (PKARII $\beta$ ) und Typ 4-OFF-Bipolarzellen mit einem Antikörper gegen Calsenilin markiert. Während die Dendriten der Typ 3a-, Typ 3b- und Typ 4-OFF-Bipolarzellen in den  $Cx57^{+/+}$ -Mäusen in der OPL stratifizierten (Abb. 22 A-C), zeigte sich in den  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen bei allen drei analysierten OFF-Bipolarzelltypen ein Auswachsen der Dendriten in die ONL (Abb. 22 D-F, Pfeile).

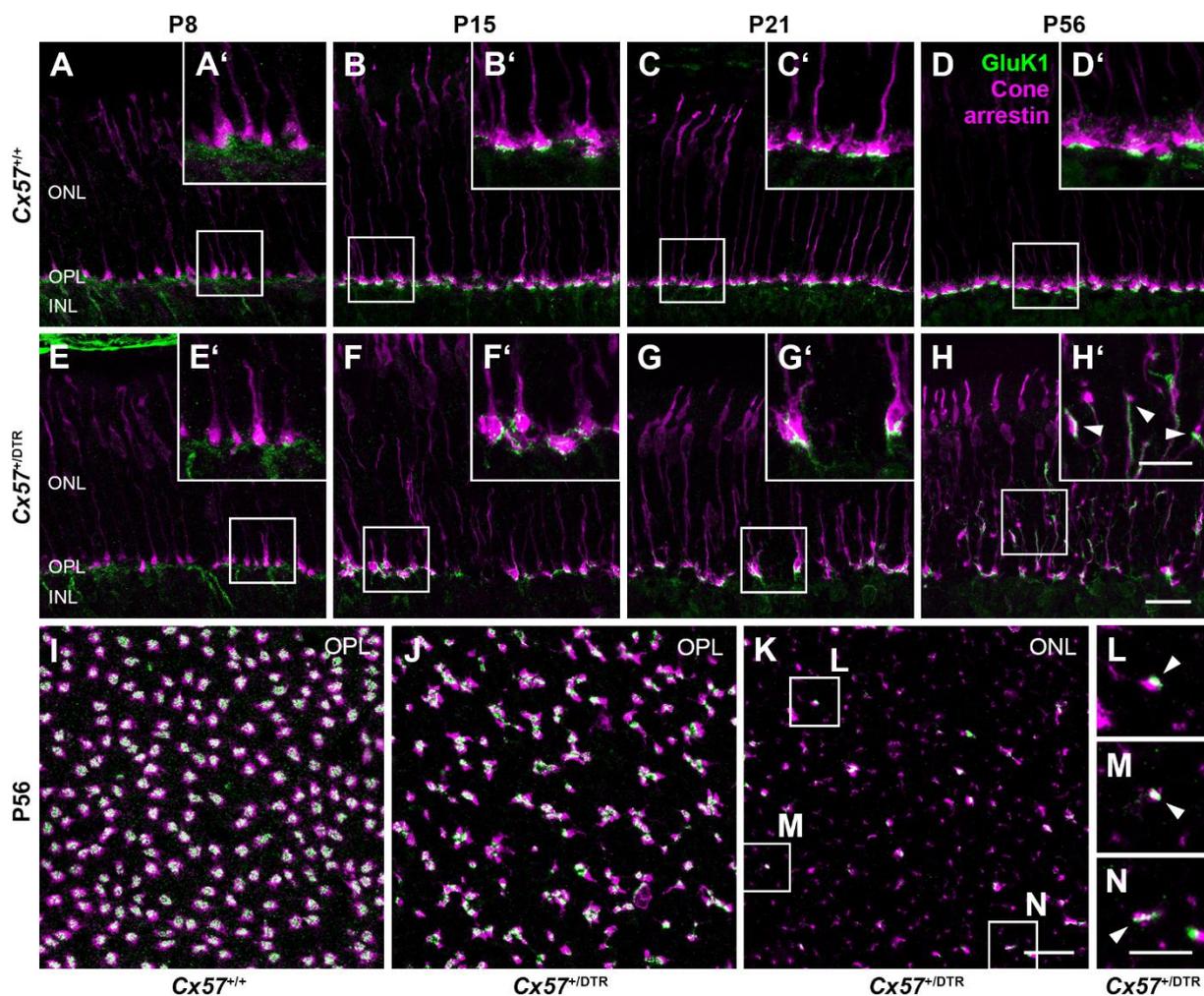


**Abbildung 22: Auswachsen von OFF-Bipolarzellendendriten nach früher postnataler Ablation der Horizontalzellen.** (A-F) Immunhistochemische Färbung von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Retinen (P56) mit Antikörpern gegen HCN4, ein Markerprotein für Typ 3a-OFF-Bipolarzellen, PKARII $\beta$ , ein Markerprotein für Typ 3b-OFF-Bipolarzellen, und Calsenilin, ein Markerprotein für Typ 4-OFF-Bipolarzellen. In den Wildtyp-Mäusen waren die dendritischen Endigungen der Typ 3a-, Typ 3b- und Typ 4-OFF-Bipolarzellen auf die OPL begrenzt (A-C). Im Gegensatz dazu wuchsen die Dendriten der drei untersuchten OFF-Bipolarzelltypen in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen in die ONL aus (Pfeile) (D-F). Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

### 3.2.5 Flache Kontakte mit OFF-Bipolarzellen

Da Typ 3a-, Typ 3b- und Typ 4-OFF-Bipolarzellen nicht nur Zapfen-, sondern auch Stäbchenterminalien kontaktieren (Mataruga et al. 2007; Haverkamp et al. 2008), welche in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen in die ONL zurückgezogen werden (siehe Kapitel 3.1.4), liegt das Auswachsen der OFF-Bipolarzellendendriten möglicherweise darin begründet, dass die Dendriten der OFF-Bipolarzellen in der ONL nach Kontakten mit Stäbchen suchen. Um zu überprüfen, ob die auswachsenden OFF-Bipolarzellendendriten auch Synapsen mit den neuen Zapfenterminalien bilden, wurden retinale Vertikalschnitte und Ganzpräparate mit einem Antikörper gegen die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluK1, die von Typ 3a-, Typ 3b- und Typ 4-OFF-Bipolarzellen exprimiert wird (Puller et al. 2013), und einem Antikörper gegen den Zapfen-Marker *cone arrestin* gefärbt. In den  $Cx57^{+/+}$ -Retinen war von P8 bis P56 GluK1-

Immunoreaktivität direkt unterhalb der Zapfenterminalien erkennbar (Abb. 23 A-D', I), was auf das Vorhandensein von synaptischen Kontakten zwischen Zapfen und OFF-Bipolarzellen hindeutet. Auch in den *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Retinen waren während des gesamten Untersuchungszeitraums GluK1-positive Strukturen an der Basis der Zapfen-Endfüßchen in der OPL zu finden (Abb. 23 E-H', J). Darüber hinaus wurden an P56 einige GluK1-immunoreaktive Dendriten beobachtet, die in die ONL auswuchsen und neu gebildete Zapfenterminalien kontaktierten (Abb. 23 H, H', K-N). Diese Befunde zeigen zum einen, dass flache Kontakte zwischen Zapfen und OFF-Bipolarzellen in Abwesenheit der Horizontalzellen normal ausgebildet werden und erhalten bleiben, und zum anderen, dass adulte Zapfen in der Lage sind neue Synapsen mit OFF-Bipolarzellen zu etablieren.

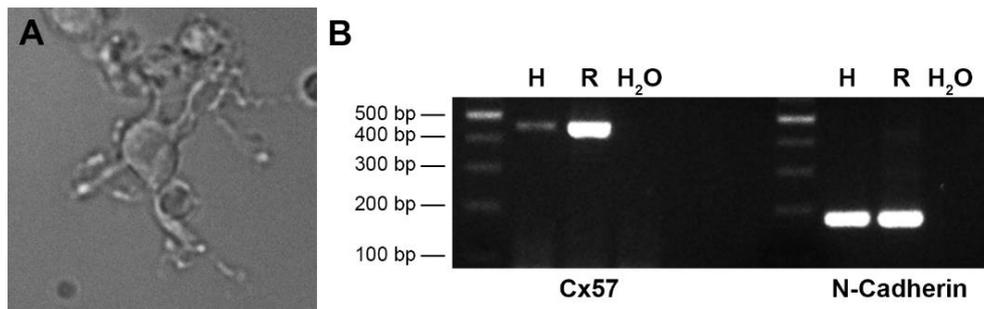


### 3.3 Expression von N-Cadherin in den Horizontalzellen der Mausretina und Auswirkungen eines konditionalen N-Cadherin-Knock-Outs auf die Überlebensfähigkeit von Mäusen

#### 3.3.1 Expression von N-Cadherin in den Horizontalzellen der Mausretina

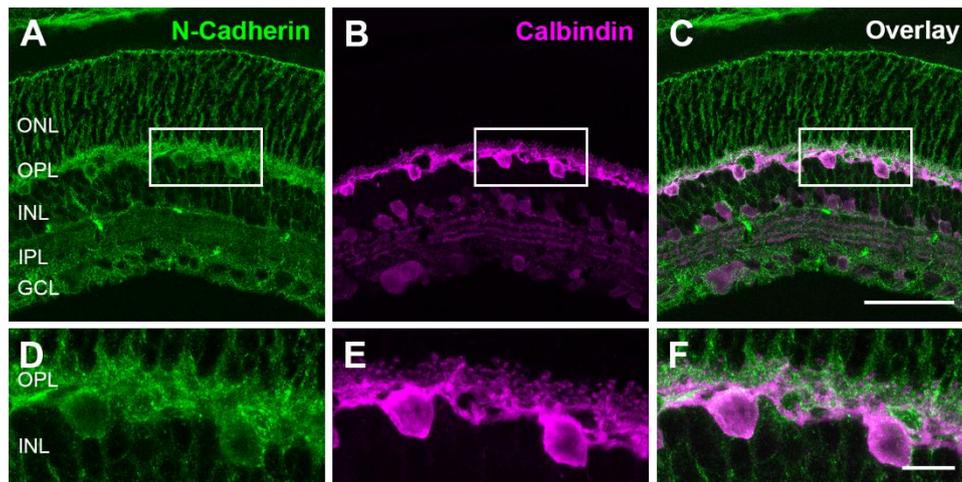
N-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das an verschiedenen Prozessen der Synapsenbildung wie dem Neuritenwachstum, der neuronalen Zielfindung und der prä- und postsynaptischen Differenzierung beteiligt ist (Redies 2000; Hirano et al. 2003; Salinas und Price 2005; Brusés 2006; Suzuki und Takeichi 2008). Um zu untersuchen, ob N-Cadherin eine Rolle in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse spielt, wurde im dritten Projekt dieser Arbeit zunächst die Expression von N-Cadherin in den Horizontalzellen der Mausretina überprüft. Dazu wurde eine Reverse Transkriptase-PCR-(RT-PCR-)Analyse mit der Einzelzell-RNA von isolierten Horizontalzellen durchgeführt. Die Identifizierung der Horizontalzellen erfolgte anhand ihrer charakteristischen Morphologie (Abb. 24 A) und wurde durch eine RT-PCR mit Cx57-Primern (Amplikon-Größe: 451 bp) kontrolliert (Abb. 24 B). Um eine Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen, wurden zum Nachweis der N-Cadherin-mRNA Intron-überspannende Primer verwendet (Amplikon-Größe: 176 bp). Die RT-PCR-Analyse bestätigte, dass N-Cadherin in murinen Horizontalzellen exprimiert wird (Abb. 24 B).

**Abbildung 23: Zapfen bilden neue Synapsen mit OFF-Bipolarzellen in adulten Horizontalzell-ablatierten Mäusen.** (A-H') Doppelmarkierung retinaler Kryoschnitte von  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen mit Antikörpern gegen die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluK1 (grün) und den Zapfen-Marker *cone arrestin* (magenta). Sowohl in den Wildtyp- als auch den Horizontalzell-ablatierten Retinen war zwischen P8 und P56 GluK1-Immunoreaktivität an der Basis der Zapfenterminalien in der OPL zu beobachten (A-H'), was darauf hinweist, dass flache Kontakte zwischen Zapfen und OFF-Bipolarzellen vorhanden sind. Zudem bildeten auswachsende GluK1-positive OFF-Bipolarzellendriten an P56 Kontakte mit neuen Zapfenterminalien in der ONL (H, H'). Retina-Ganzpräparate von adulten  $Cx57^{+/+}$ - und  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen (P56) wurden mit Antikörpern gegen GluK1 und *cone arrestin* gefärbt. Auf Höhe der OPL waren die Zapfen-Endfüßchen in den Wildtyp- und Horizontalzell-ablatierten Retinen stark mit den GluK1-immunoreaktiven Clustern assoziiert (I, J). Auch in der ONL der  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäuse zeigte sich eine Verknüpfung von GluK1-positiven OFF-Bipolarzellendriten und neu gebildeten Zapfenterminalien (K-N), was darauf hindeutet, dass neue Synapsen zwischen Zapfen und OFF-Bipolarzellen gebildet wurden. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$  (H, K), 10  $\mu\text{m}$  (H', N).



**Abbildung 24: Expression von N-Cadherin-mRNA in murinen Horizontalzellen.** (A) Mikroskopische Aufnahme einer isolierten Horizontalzelle der Mausretina. (B) RT-PCR-Analyse mit Einzelzell-RNA aus Horizontalzellen (H) und Gesamt-Retina-RNA (R). Um zu überprüfen, ob es sich bei den untersuchten Zellen um Horizontalzellen handelt, wurde eine RT-PCR mit Cx57-Primern (Amplikon-Größe: 451 bp) durchgeführt. Eine RT-PCR mit Intron-überspannenden N-Cadherin-Primern (Amplikon-Größe: 176 bp) zeigte, dass sowohl in der Retina als auch in einzelnen Horizontalzellen N-Cadherin-mRNA vorhanden ist.

Zur zusätzlichen Untersuchung der N-Cadherin-Proteinexpression wurden retinale Kryoschnitte von adulten Wildtyp-Mäusen mit einem Antikörper gegen N-Cadherin und einem Antikörper gegen den Horizontalzell-Marker Calbindin doppelmarkiert. Die analysierten Retinen wiesen eine starke N-Cadherin-Immunoreaktivität in der OPL, der proximalen und distalen IPL sowie der äußeren limitierenden Membran auf (Abb. 25 A). Darüber hinaus war in Übereinstimmung mit der Studie von Xiang et al. (2017), in der ein N-Cadherin-Antikörper zur Visualisierung der Morphologie der Horizontalzellen eingesetzt wurde, eine deutliche Färbung der Horizontalzellmembranen erkennbar (Abb. 25 D-F). Die starke N-Cadherin-Immunoreaktivität in der OPL kolokalisierte jedoch nur geringfügig mit den dendritischen und axonalen Endigungen der Horizontalzellen (Abb. 25 F), was darauf schließen lässt, dass N-Cadherin nicht nur von Horizontalzellen, sondern auch von mindestens einem weiteren Zelltyp der äußeren Retina exprimiert wird. Aufgrund der überwiegenden Lokalisierung der N-Cadherin-Immunoreaktivität in der distalen OPL handelt es sich bei diesem Zelltyp möglicherweise um Stäbchen, deren Terminalien in diesem Bereich stratifizieren (Abb. 22 C, F).



**Abbildung 25: N-Cadherin-Proteinexpression in den Horizontalzellen der Mausretina.** (A-F) Immunhistochemische Färbung von adulten Wildtyp-Retinen mit Antikörpern gegen N-Cadherin (grün) und Calbindin (magenta). Die OPL, die proximalen und distalen Bereiche der IPL sowie die äußere limitierende Membran wiesen eine starke N-Cadherin-Immunoreaktivität auf (A). Zudem war eine intensive Markierung der Membranen der Calbindin-positiven Horizontalzellen zu beobachten (D-F). In dem Overlay zeigte sich, dass die N-Cadherin-Immunoreaktivität in der OPL kaum mit den dendritischen und axonalen Spitzen der Horizontalzellen kolokalisierte, was darauf hindeutet, dass N-Cadherin in dieser Schicht von einem anderen Zelltyp exprimiert wird (F). Maßstabsbalken: 50 µm (C), 10 µm (F).

### 3.3.2 Auswirkungen eines konditionalen N-Cadherin-Knock-Outs auf die Überlebensfähigkeit von Mäusen

Um zu untersuchen, welche Rolle die N-Cadherin-Expression in Horizontalzellen für die Wegfindung der ON-Bipolarzellendriten in das Photorezeptor-Endfüßchen und die sonstige Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse spielt, wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation mithilfe des Cre/loxP-Systems konditionale N-Cadherin-Knock-Out-Mäuse erzeugt. Dazu wurden N-cad<sup>fllox</sup>-Mäuse, in denen das Exon 1 des N-Cadherin-Gens von loxP-Stellen flankiert ist (Kostetskii et al. 2005), mit Cx57-Cre-Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des endogenen Cx57-Promotors exprimieren (Ströh et al. 2013), gekreuzt. In Nachkommen, die beide genetischen Veränderungen tragen, wird das Exon 1 des N-Cadherin-Gens in den Cre-Rekombinase-exprimierenden Zellen herausgeschnitten. Der Cx57-Promotor ist in retinalen Horizontalzellen (Hombach et al. 2004), in medullären Thymus-Epithelzellen (Tykocinski et al. 2010), im olfaktorischen Epithel und *Bulbus*

---

*olfactorius* (Zhang 2011) sowie in einigen Regionen des Hirnstamms, Cerebellums und Rückenmarks (Zappalà et al. 2010) aktiv. Demzufolge wird N-Cadherin auch in Horizontalzellen ausgeknockt. Bei der Verpaarung von *Cdh2<sup>+/fl</sup>:Cx57<sup>+/Cre</sup>*-Mäusen mit *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+/+</sup>*- oder *Cdh2<sup>+/fl</sup>:Cx57<sup>+/+</sup>*-Mäusen wurde jedoch festgestellt, dass die Genotypen-Verteilung der Nachkommen nicht mit der erwarteten Mendelschen Verteilung übereinstimmte. Homozygote *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+/Cre</sup>*-Knock-Out-Mäuse traten nur sehr selten auf, was vermuten lässt, dass die Embryonen im Uterus versterben und resorbiert werden. Die wenigen *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+/Cre</sup>*-Mäuse, die lebend geboren wurden, verstarben in der Regel innerhalb der ersten Tage nach der Geburt. Da die Photorezeptor-Bandsynapse zwischen P4/P5 und P14 gebildet wird (Olney 1968; Blanks et al. 1974; Sherry et al. 2003), eignet sich die *N-cad<sup>fllox</sup>-Cx57-Cre*-Mauslinie somit nicht zur Untersuchung der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse in Abwesenheit der N-Cadherin-Expression in Horizontalzellen.

## 4 Diskussion

An der ersten Synapse der Retina, der Photorezeptor-Bandsynapse, werden die visuellen Informationen der Photorezeptoren auf Horizontalzellen und Bipolarzellen übertragen. Die Endfüßchen der Photorezeptoren besitzen präsynaptische Proteinbänder, die von synaptischen Vesikeln umgeben sind und eine schnelle und kontinuierliche Ausschüttung von Glutamat ermöglichen. Während die Horizontalzellfortsätze und ON-Bipolarzellendriten in das Photorezeptor-Endfüßchen invaginieren, bilden die OFF-Bipolarzellendriten nicht-invaginierende Kontakte an der Basis des Photorezeptor-Endfüßchens aus. Vorherige Studien haben gezeigt, dass im Verlauf der Entwicklung zuerst die Horizontalzellfortsätze und danach die ON-Bipolarzellendriten in das Photorezeptor-Endfüßchen invaginieren (Blanks et al. 1974; Sherry et al. 2003). Die molekularen Mechanismen, die der Ausbildung der Photorezeptor-Bandsynapse unterliegen, sind bisher jedoch nicht vollständig verstanden. Um zu einem besseren Verständnis der Synapsenbildung beizutragen, wurde in der vorliegenden Dissertation zum einen die Rolle der Horizontalzellen und zum anderen die Rolle von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse untersucht.

### 4.1 Die Cx57/DTR-Mauslinie als Werkzeug zur Untersuchung der Rolle von Horizontalzellen in der Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse

Zur Erforschung der Rolle von Horizontalzellen in der Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen einer frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation auf die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Stäbchen und Stäbchen-Bipolarzellen untersucht. Bisherige Versuche, die Horizontalzellen während der retinalen Entwicklung zu ablatieren, waren entweder nicht Zelltyp-spezifisch oder resultierten in einer unvollständigen Eliminierung der Horizontalzellpopulation. Messersmith und Redburn (1990) injizierten Kainsäure in den Glaskörper von neonatalen Kaninchen, wodurch sowohl A-Typ-Horizontalzellen als auch Amakrin- und Ganglienzellen abgetötet wurden (Messersmith und Redburn 1990). Transgene Mäuse, die das Simian-Virus 40-(SV40-)T-Antigen unter der Kontrolle des humanen Phenylethanolamin-N-Methyltransferase-(PNMT-)Promotors exprimieren, weisen ebenfalls eine Degeneration von Horizontal- und Amakrinzellen auf (Hammang et al. 1993). In einer Studie von Keeley et al. (2013) wurden konditionale *LIM homeobox 1* (*Lim1*)-Knock-Out-Mäuse generiert, in denen die Horizontalzellen während der Entwicklung in der inneren Retina verbleiben und in die IPL projizieren. Aufgrund einer unvollständigen Rekombination konnten durch diesen Ansatz allerdings nur bis zu 65 % der

Horizontalzellen aus der äußeren Retina entfernt werden. Auch ein Knock-Out des Transkriptionsfaktors *Oc1* führt zu einer Eliminierung von nur ~ 80 % der Horizontalzellen (Wu et al. 2013).

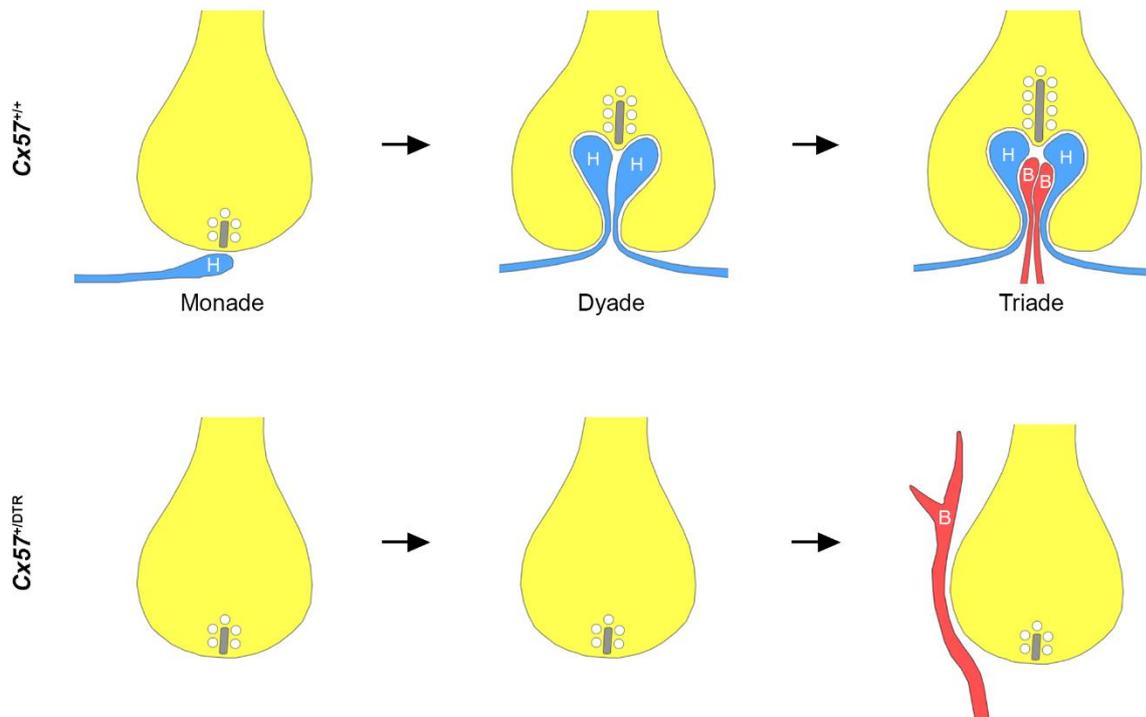
In der vorliegenden Dissertation wurden die Horizontalzellen der Mausretina mittels Diphtherietoxinrezeptor-vermitteltem Zell-Knock-Out ablatiert (Saito et al. 2001). Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass Mäuse von Natur aus keinen funktionalen Diphtherietoxinrezeptor besitzen (Mitamura et al. 1995). Der membranständige Vorläufer des Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors, der in Primaten als Diphtherietoxinrezeptor fungiert (Naglich et al., 1992), ist in Mäusen nicht in der Lage, das Diphtherietoxin zu binden, wodurch es nicht von der Zelle aufgenommen wird. Aus diesem Grund sind Mäuse resistent gegenüber Diphtherietoxin (Mitamura et al., 1995). Die verwendete Cx57/DTR-Mauslinie exprimiert den Primaten-Diphtherietoxinrezeptor unter der Kontrolle des endogenen Cx57-Promotors (Sonntag et al. 2012). Da der Cx57-Promotor in der Mausretina ausschließlich in Horizontalzellen aktiv ist (Hombach et al. 2004), kann dieser Zelltyp durch eine Injektion von Diphtherietoxin selektiv ablatiert werden (Sonntag et al. 2012). Ein weiterer Vorteil des Diphtherietoxinrezeptor-vermittelten Zell-Knock-Outs ist, dass die Ablation zu einem beliebigen Zeitpunkt induziert werden kann. In der Kaninchenretina wird durch eine Eliminierung der Horizontalzellen an P0 die Auftrennung der retinalen Zellen in die verschiedenen Schichten sowie das Verhältnis von Stäbchen zu Zapfen verändert (Messersmith und Redburn 1990). Um mögliche Nebeneffekte der Horizontalzell-Ablation auf die retinale Laminierung und Zelldifferenzierung der *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäuse zu minimieren, wurden die Diphtherietoxin-Injektionen an P4 und P5 vorgenommen. Zu diesem Zeitpunkt haben die Horizontalzellsomata ihre endgültige Position in der distalen INL eingenommen (Poche et al. 2007) und die Horizontalzellaxonterminalien sind kurz davor, Kontakte mit den Stäbchenterminalien auszubilden (Sherry et al. 2003). Zur Überprüfung der Horizontalzell-Ablation wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Calbindin-Antikörper durchgeführt. Die Calbindin-Immunoreaktivität in den Horizontalzellen der *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäuse war bereits an P8 kaum noch erkennbar und von P11 an vollständig verschwunden. Diese Befunde zeigen, dass durch den Diphtherietoxinrezeptor-vermittelten Zell-Knock-Out eine Ablation der gesamten Horizontalzellpopulation erreicht werden kann. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden allerdings vereinzelt Stäbchenterminalien mit Überresten von Horizontalzellfortsätzen beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Diphtherietoxin-Injektionen etwas zu spät durchgeführt wurden, um eine Invagination der

Horizontalzellen vor der Ablation komplett zu verhindern. Im Gegensatz zu den Horizontalzellen wiesen die weiteren untersuchten Zelltypen (Stäbchen, Zapfen, Stäbchen-Bipolarzellen, Typ 3a- Typ 3b- und Typ 4-OFF-Bipolarzellen, Secretagogin-positive Bipolarzellen, Calbindin-positive Amakrin- und Ganglienzellen, *starburst*-Amakrinzellen und Müllerzellen) keine offensichtlichen Anzeichen einer Degeneration auf, wodurch die Spezifität der Horizontalzell-Ablation bestätigt wird (Nemitz et al. 2019).

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass die Horizontalzellen durch einen Diphtherietoxin-vermittelten Zell-Knock-Out selektiv und vollständig während der frühen postnatalen Entwicklung ablatiert werden können und die Cx57/DTR-Mauslinie daher ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung der Ausbildung der Stäbchen-Bandsynapse in Abwesenheit der Horizontalzellen darstellt.

#### **4.2 Die Rolle von Horizontalzellen in der Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse**

Die Entwicklung der Stäbchensynapse wird in der Mausretina an P8 durch das Einwandern der Stäbchenterminalien in die OPL initiiert. Zu diesem Zeitpunkt wird das präsynaptische Proteinband an der Membran verankert und ein Kontakt mit einem einzelnen Horizontalzellfortsatz ausgebildet. Am darauffolgenden Tag wird ein zweiter Horizontalzellfortsatz rekrutiert, der zusammen mit dem ersten Fortsatz in das Stäbchen-Endfüßchen invaginiert. Die beiden Horizontalzellfortsätze nehmen dabei die Positionen lateral zum Proteinband ein. Ab P10 wird die Synapse durch die Invagination von ein oder zwei zentralen Stäbchen-Bipolarzellendriten vervollständigt (Sherry et al. 2003). Dieser Prozess war in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen erheblich gestört (Abb. 26). Durch die immunhistochemische und elektronenmikroskopische Analyse konnte gezeigt werden, dass ON-Bipolarzellendriten in Abwesenheit der Horizontalzellen nicht in der Lage waren in die Stäbchenterminalien zu invaginieren, der präsynaptische Proteinband-Aufbau beeinträchtigt war und die postsynaptische Rekrutierung von mGluR6 und GPR179 gehemmt wurde. Diese Befunde demonstrieren, dass die Horizontalzellen für die Ausbildung der synaptischen Kontakte zwischen Stäbchen und Stäbchen-Bipolarzellen unverzichtbar sind (Nemitz et al. 2019).



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse in An- und Abwesenheit der Horizontalzellen.** In Wildtyp-Mäusen beginnt die Entwicklung der Stäbchen-Bandsynapse mit der Verankerung des Proteinbands an der Membran und der Bildung eines Kontakts mit einem einzelnen Horizontalzellfortsatz (H). Im Anschluss wird ein zweiter Horizontalzellfortsatz rekrutiert und beide Fortsätze invaginieren in das Stäbchenterminal, wobei sie die Positionen lateral zum Proteinband einnehmen. Im letzten Schritt werden ein oder zwei invaginierende Stäbchen-Bipolarzellendriten (B) hinzugefügt, welche die zentralen Elemente der Stäbchen-Bandsynapse bilden. In den Horizontalzell-ablatierten Mäusen sind die Stäbchen-Bipolarzellen nicht in der Lage in das Stäbchen-Endfüßchen zu invaginieren und wachsen in die ONL aus. Präsynaptische Proteinbänder sind entweder nicht vorhanden oder kürzer im Vergleich zu denen der Wildtyp-Mäuse (Nemitz et al. 2019).

Die Auswirkungen eines Verlusts der Horizontalzellen auf die retinale Entwicklung wurden bereits mittels verschiedener Ansätze in vorherigen Studien untersucht. Messersmith und Redburn (1990) ablatierten die A-Typ-Horizontalzellen der neonatalen Kaninchenretina durch eine intravitreale Injektion von Kainsäure. Während die Retina der Kontroll-Kaninchen an P1 in drei Schichten (ONBL, IPL, GCL) organisiert war, wies die Retina der Kainsäure-behandelten Kaninchen nahezu keine Laminierung auf. An P5 hatten sich die retinalen Zellen der Horizontalzell-ablatierten Tiere zwar in einer ONL, OPL, INL, IPL und GCL angeordnet, aber die Dicke der INL war um die Hälfte reduziert und das Verhältnis von Stäbchen zu Zapfen

erhöht. Trotz dieser Veränderungen deutet das Vorhandensein einer OPL als dünne, irreguläre Schicht zwischen der ONL und INL darauf hin, dass die A-Typ-Horizontalzellen keine absolute Voraussetzung für die Ausbildung der OPL darstellen. In einer Studie von Hammang et al. (2003) wurde eine transgene Maus untersucht, die das SV40-T-Antigen unter der Kontrolle des humanen PNMT-Promotors exprimiert. Eine immunhistochemische Analyse zeigte, dass die T-Antigen-Expression zu einem fortschreitenden Verlust der Horizontalzellen ab der zweiten postnatalen Woche führt. Im Einklang mit den Beobachtungen aus dieser Arbeit war die OPL-Dicke in den transgenen Mäusen bereits in der zweiten postnatalen Woche verringert, während in der zehnten postnatalen Woche fast alle synaptischen Kontakte in der OPL verschwunden waren. Keeley et al. (2013) erforschten die Rolle der Horizontalzellen für die Ausbildung und den Erhalt der OPL anhand von konditionalen *Lim1*-Knock-Out-Mäusen, bei denen bis zu 65 % der Horizontalzellen in der inneren Retina lokalisiert sind. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit demonstrierten sie, dass die Horizontalzellen nicht für die korrekte Wegfindung der Photorezeptorterminalien und Bipolarzellendriten in die OPL notwendig sind. Ab P13 war in den konditionalen *Lim1*-Knock-Out-Mäusen jedoch eine Entkopplung von Stäbchenterminalien und Stäbchen-Bipolarzellen zu beobachten, was darauf hinweist, dass die Horizontalzellen eine wichtige Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Stäbchen-Bandsynapse haben. In einer Studie von Wu et al. (2013) wurden zur Untersuchung der Auswirkungen einer Horizontalzell-Eliminierung auf die Entwicklung und den Erhalt der synaptischen Kontakte in der OPL *Ocl*-Knock-Out-Mäuse verwendet, in denen die Anzahl der Horizontalzellen um ~ 80 % reduziert ist. Ähnlich wie die Photorezeptorterminalien der *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mäuse, wiesen die Stäbchen- und Zapfen-Endfüßchen der *Ocl*-defizienten Mäuse an P16 und P30 selten postsynaptische Invaginationen auf und enthielten weniger oder kürzere Proteinbänder. Das vereinzelte Auftreten von invaginierenden Elementen in den Photorezeptorterminalien der *Ocl*-Knock-Out-Mäuse könnte darin begründet liegen, dass in dieser Mauslinie noch ~ 20 % der Horizontalzellen gebildet werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Diphtherietoxinrezeptor-vermittelte Ablation der Horizontalzellen in der adulten Mausretina ebenfalls zu einem Verlust der synaptischen Kontakte zwischen Photorezeptoren und ON-Bipolarzellen führt (Sonntag et al. 2012).

Diese Studien demonstrieren gemeinsam mit der vorliegenden Arbeit (Nemitz et al. 2019) die essenzielle Rolle der Horizontalzellen für die Ausbildung und dem Erhalt der Stäbchen-Bandsynapse (Messersmith und Redburn 1990; Hammang et al. 1993; Sonntag et al. 2012; Keeley et al. 2013; Wu et al. 2013). Der molekulare Mechanismus, der diesem Sachverhalt

zugrunde liegt, bleibt jedoch ungeklärt. Eine Möglichkeit, wie Horizontalzellen zur Entwicklung und Aufrechterhaltung der synaptischen Kontakte zwischen Stäbchen und Stäbchen-Bipolarzellen beitragen könnten, ist die Expression von Membran-gebundenen oder sekretierten Wegweiser-molekülen, die den Stäbchen-Bipolarzellendriten helfen, den Weg ins Stäbchenterminal zu finden. Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass ON-Bipolarzellendriten in der ersten postnatalen Woche eng mit Horizontalzellneuriten assoziiert sind (Morgan et al. 2006) und Stäbchen-Bipolarzellendriten in Bassoon-mutanten (Specht et al. 2009) und CNGA3/CNGB1-Knock-Out-Mäusen (Michalakis et al. 2013) mit auswachsenden Horizontalzellfortsätzen kofaszikulieren. Wegweiser-moleküle beeinflussen die Wuchsrichtung von Wachstumskegeln, indem sie an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und so intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, die in Veränderungen der Dynamiken des Zytoskeletts resultieren (O'Donnell et al. 2009). Bislang sind nur wenige Wegweiser-moleküle bekannt, die von Horizontalzellen exprimiert werden. In einer Studie von Soto et al. (2013) wurde das synaptische Adhäsionsprotein NGL-2 an den Spitzen von Horizontalzellaxonen identifiziert, das an der Zielfindung von Horizontalzellaxonen und der Synapsenbildung zwischen Stäbchen und Horizontalzellen beteiligt ist. *Ngl-2*-Knock-Out-Mäuse weisen jedoch eine normale Stratifizierung der Photorezeptorterminalien und Bipolarzellendriten in der OPL auf, was darauf hindeutet, dass NGL-2 nicht für die gescheiterte Invagination der Stäbchen-Bipolarzellen in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen verantwortlich ist. Matsuoka und Kollegen (2012) zeigten darüber hinaus, dass Horizontalzellen das Wegweiser-molekül Semaphorin 6A (Sema6A) und seinen Rezeptor PlexinA4 (PlexA4) exprimieren. Sema6A und PlexA4 sind ebenfalls in die Zielfindung der Horizontalzellaxone involviert, werden aber nicht für die Invagination der Stäbchen-Bipolarzellen benötigt. Ein weiteres Zelladhäsionsmolekül, das in den Horizontalzellen der Hühnchen- (Tanabe et al. 2006) und Mausretina (Xiang et al. 2017) nachgewiesen wurde, ist N-Cadherin. Die Rolle von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse wird in Kapitel 4.6 ausführlich diskutiert. Darüber hinaus könnten die Horizontalzellen die Expression von extrazellulären Matrixproteinen oder Zelladhäsionsproteinen wie Pikachurin (Sato et al. 2008), Dystroglycan (Omori et al. 2012), SynCAM1 (Ribic et al. 2014) oder ELFN1 (Cao et al. 2015) beeinflussen, die von Stäbchen exprimiert werden und für die Invagination der Stäbchen-Bipolarzellen von Bedeutung sind.

Eine weitere Möglichkeit, wie Horizontalzellen die Bildung und den Erhalt der Stäbchen-Bandsynapse unterstützen könnten, ist ihre synaptische Aktivität (siehe Kapitel 1.1.4). Mehrere Studien haben gezeigt, dass die neuronale Transmission in der äußeren Retina für die

Entwicklung und/oder den Erhalt der Photorezeptor-Bandsynapsen essenziell ist. Mäuse mit Mutationen in Bassoon (Dick et al. 2003; Specht et al. 2009), CaBP4 (Haeseleer et al. 2004), Ca<sub>v</sub>1.4 (Mansergh et al. 2005; Chang et al. 2006; Bayley und Morgans 2007; Liu Xiaoni et al. 2013; Zabouri und Haverkamp 2013),  $\alpha 2\delta 4$  (Wycisk et al. 2006; Wang et al. 2017; Kerov et al. 2018), CAST (tom Dieck et al. 2012) oder CNGA3/CNGB1 (Michalakis et al., 2013), welche die Glutamatausschüttung der Photorezeptoren regulieren, weisen einen Verlust der synaptischen Kontakte in der OPL, eine Retraktion von Stäbchenterminalien sowie ein abnormales Auswachsen von Horizontalzell- und Bipolarzellfortsätzen auf. Eine Horizontalzell-spezifische Deletion der Glutamatrezeptor-Untereinheiten GluA2 und GluA4 (und die damit verbundene Eliminierung der Licht-abhängigen Modulation des Feedbacks und Feedforwards der Horizontalzellen) verhindert jedoch nicht die Ausbildung der Synapsen zwischen Stäbchen und Stäbchen-Bipolarzellen (Ströh et al. 2018). Auch ein Knock-Out des Enzyms GAD67, welches für die Synthese von GABA zuständig ist, hat keinen Einfluss auf die Struktur der Stäbchen-Bandsynapse (Schubert et al. 2010). Da GABA vermutlich an dem Horizontalzell-Feedback (Kemmler et al. 2014; Grove et al. 2019) und -Feedforward (Yang und Wu 1991; Puller et al. 2014) beteiligt ist, spricht dieser Befund ebenfalls dagegen, dass die gescheiterte Synapsenbildung in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen auf die Abwesenheit der Horizontalzell-Signale zurückzuführen ist.

Um den molekularen Mechanismus, durch den die Horizontalzellen zum Aufbau und Erhalt der Stäbchen-Bandsynapsen beitragen, letztendlich aufzuklären, werden weitere Experimente benötigt, wie z. B. eine Analyse der Expression von Wegweiser-molekülen zur Identifizierung potenzieller molekularer Kandidaten und die Generierung von entsprechenden Knock-Out-Mäusen zur Untersuchung der Funktion der ausgeschalteten Moleküle.

### **4.3 Die Rolle von Horizontalzellen in der Entwicklung und dem Erhalt der Zapfen-Bandsynapse**

Die Entwicklung der Zapfen-Bandsynapse erfolgt in derselben Reihenfolge wie die der Stäbchen-Bandsynapse. Zuerst invaginieren zwei Horizontalzellfortsätze in das Zapfen-Endfüßchen und anschließend wird die Triade durch das Einwandern von ein oder zwei ON-Bipolarzellendriten vervollständigt. Während die Stäbchen-Synaptogenese an P8 initiiert wird, beginnt die Zapfen-Synaptogenese jedoch bereits an P4/P5 (Blanks et al. 1974; Sherry et al. 2003). Da zu diesem Zeitpunkt auch die Ablation der Horizontalzellen induziert wurde, ist es nicht überraschend, dass in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von P11 einige

Zapfenterminalien mit Überresten von Horizontalzellfortsätzen gefunden wurden, die offenbar noch in der Lage waren, in das Endfüßchen einzuwandern. Invaginierende ON-Bipolarzellendriten traten allerdings sehr selten und nur gemeinsam mit Horizontalzell-Überresten auf, was darauf hinweist, dass die Horizontalzellen nicht nur für die Invagination der Stäbchen-Bipolarzellen in das Stäbchenterminal (siehe Kapitel 4.2), sondern auch für die Invagination der Zapfen-ON-Bipolarzellen in das Zapfenterminal notwendig sind. Aufgrund der Tatsache, dass ON-Bipolarzellen schon an P7/P8 mit der Invagination in das Zapfen-Endfüßchen beginnen, kann allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass zu einem früheren Zeitpunkt ON-Bipolarzell-Invaginationen vorgelegen haben.

In den adulten Horizontalzell-ablatierten Mäusen (P56) waren sowohl die ON-Bipolarzell-Invaginationen als auch die GPR179-Expression an den Spitzen der ON-Bipolarzellendriten vollständig verschwunden, was auf einen kompletten Verlust der synaptischen Kontakte zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen hindeutet. Dieser Befund ist konsistent mit der Studie von Sonntag et al. (2012), in der gezeigt wurde, dass eine Ablation der Horizontalzellen in der adulten Mausretina ebenfalls zu einer Degeneration der Zapfen-Bandsynapsen führt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation deuten auf eine essenzielle Rolle der Horizontalzellen für die Entwicklung und den Erhalt der synaptischen Kontakte zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen hin. Wie für die Stäbchen-Bandsynapse bleibt jedoch auch für die Zapfen-Bandsynapse unklar, ob die Horizontalzellen durch die Expression von bisher unidentifizierten Wegweiser-molekülen oder durch ihre synaptische Aktivität zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der synaptischen Kontakte zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen beitragen (siehe Kapitel 4.2). Da die Zapfenterminalien von Horizontalzellendriten und die Stäbchenterminalien von Horizontalzellaxonen kontaktiert werden (Peichl und González-Soriano 1994), unterliegen die Entwicklung und der Erhalt der Zapfen-Bandsynapse möglicherweise einem anderen Mechanismus als die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Stäbchen-Bandsynapse.

#### **4.4 Synaptische Remodellierung im OFF-Zapfen-Signalweg infolge der frühen postnatalen Horizontalzell-Ablation**

Zapfen sind typischerweise aus einem Augensegment, einem Innensegment, einem Soma und einem Axon mit einem synaptischen Endfüßchen aufgebaut. Die Somata der Zapfen sind in der distalen ONL lokalisiert und die Zapfenterminalien formen ein regelmäßiges Mosaik in der

OPL, wo sie invaginierende Kontakte mit Horizontalzellen und ON-Bipolarzellen und flache Kontakte mit OFF-Bipolarzellen ausbilden. In den Horizontalzell-ablatierten Mäusen war die Morphologie, Stratifizierung und Verschaltung der Zapfen drastisch verändert. Zu Beginn der dritten postnatalen Woche wiesen die Zapfen einige mislokalisierte Somata in der OPL sowie einen Verlust der regelmäßigen Anordnung ihrer Endfüßchen auf. Adulte Zapfen zeigten schließlich ein abnormales Aussprossen von Neuriten und eine Bildung von zusätzlichen Terminalien. Während synaptische Kontakte zwischen Zapfen und ON-Bipolarzellen gar nicht erst entstanden oder degenerierten (siehe Kapitel 4.3), wurden neue Synapsen zwischen Zapfen und OFF-Bipolarzellen gebildet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Synapsenbildung bzw. der -erhalt für invaginierende und flache Kontakte unterschiedlich reguliert wird.

Vorherige Studien haben gezeigt, dass verschiedene retinale Erkrankungen im Menschen und im Tiermodell ebenfalls zu einem abnormalen Auswachsen von Photorezeptorneuriten führen. Ein aberrantes Aussprossen von Stäbchenneuriten wurde in Menschen mit Retinitis pigmentosa (Li et al. 1995; Milam und Li 1996), Schweinen mit einer Rhodopsin-Mutation (Li et al. 1998) und Katzen mit autosomal-dominanter Stäbchen-Zapfen-Dysplasie (Chong et al. 1999) beobachtet. Auch nach einer Ablösung (Sethi et al. 2005) und Wiederanlage (Lewis et al. 2002) der Netzhaut weisen die Stäbchen eine Bildung von zahlreichen Varikositäten und ein axonales Auswachsen in die innere Retina auf. Ein abnormales Aussprossen von Zapfenneuriten wurde bislang für Menschen mit Retinitis pigmentosa (Milam und Li 1996) und altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) (Pow und Sullivan 2007) sowie für *retinal degeneration 1*-(*rd1*-) (Fei 2002; Lin et al. 2009) und  $Ca_v1.4$ -Knock-Out-Mäuse (Raven et al. 2008; Zabouri und Haverkamp 2013) beschrieben. *Rd1*-Mäuse besitzen eine Mutation in der  $\beta$ -Untereinheit der Stäbchen-spezifischen cGMP-Phosphodiesterase und sind durch eine primäre Degeneration von Stäbchen, eine sekundäre Degeneration von Zapfen und eine Remodellierung von Horizontal- und Bipolarzellen gekennzeichnet (Strettoi und Pignatelli 2000; Strettoi et al. 2002; Lin et al. 2009). Im Einklang mit den Befunden dieser Arbeit enthalten die aussprossenden Zapfenneuriten der *rd1*-Mäuse häufig präsynaptische Proteinbänder (Lin et al. 2009). In Mäusen, denen die  $Ca_v1.4$ -Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals fehlt, wird der  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Endfüßchen der Photorezeptoren und somit die Glutamatfreisetzung der Stäbchen und Zapfen verhindert. Ähnlich wie Horizontalzell-ablatierte Mäuse zeigen  $Ca_v1.4$ -Knock-Out-Mäuse einen Verlust von präsynaptischen Proteinbändern und postsynaptischen Invaginationen in Photorezeptorterminalien, eine Retraktion von Stäbchen-Endfüßchen, ein Auswachsen von Bipolarzellendriten sowie ein aberrantes

Aussprossen von Zapfenneuriten (Mansergh et al. 2005; Raven et al. 2008; Zabouri und Haverkamp 2013). Während in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen neue Synapsen zwischen Zapfen und OFF-Bipolarzellen gebildet wurden, werden in den  $Ca_v1.4$ -Knock-Out-Mäusen neue Kontakte zwischen Zapfen und Horizontalzellen geknüpft (Zabouri und Haverkamp 2013). Überraschenderweise wurde für konditionale *Lim1*-Knock-Out-Mäuse, in denen die Horizontalzellen während der retinalen Entwicklung in der inneren Retina verbleiben, kein abnormales Auswachsen von Zapfenneuriten berichtet (Keeley et al. 2013). Aufgrund einer unvollständigen Rekombination sind in dieser Mauslinie jedoch noch einige Horizontalzellen in der äußeren Retina vorhanden, was möglicherweise ausreichend ist, um die Zapfenmorphologie aufrechtzuerhalten oder die Auswirkungen so sehr verringert, dass diese unentdeckt blieben. Auch in Mäusen, in denen die Horizontalzellen im adulten Stadium ablatiert wurden, wurde kein Aussprossen von Zapfenaxonen beobachtet (Sonntag et al. 2012).

Obwohl bereits mehrere Studien ein aberrantes Auswachsen von Zapfenneuriten beschrieben haben, bleibt es unklar, wodurch die abnormale Morphologie verursacht wird. Eine Möglichkeit ist, dass die morphologischen Veränderungen der Zapfen ein Anzeichen einer Degeneration darstellen. Im Einklang mit dieser Hypothese beginnt das Aussprossen der Zapfenaxone in *rd1*-Mäusen gleichzeitig mit der Degeneration der Zapfen-Außensegmente an P8 (Fei 2002; Lin et al. 2009). In den  $Ca_v1.4$ -Knock-Out-Mäusen tritt der Verlust der Zapfen jedoch erst mehrere Monate nach den ersten morphologischen Veränderungen ein (Zabouri und Haverkamp 2013) und in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen war die Anzahl der Zapfen an P56 nicht reduziert, was dagegen spricht, dass die aberrante Morphologie der Zapfen ein Merkmal für eine Degeneration repräsentiert. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Zapfen in den  $Cx57^{+/DTR}$ -Mäusen zu einem späteren Zeitpunkt sterben.

Eine andere Möglichkeit ist, dass der Verlust der synaptischen Kontakte mit Horizontal- und ON-Bipolarzellen intrazelluläre Signalwege aktiviert, die das abnormale Auswachsen der Neurite und die Suche nach neuen Kontakten initiieren. Bisher sind die molekularen Mechanismen, die dem axonalen Wachstum der Zapfen und der Synapsenbildung zwischen Zapfen und OFF-Bipolarzellen unterliegen, kaum verstanden. Vorherige Versuche haben gezeigt, dass Semaphorin 3A das Aussprossen von kultivierten Salamander-Stäbchen reduziert (Kung et al. 2017). In den Horizontalzellen der Mausretina wurde *Sema6A* nachgewiesen. Ein Knock-Out von *Sema6A* führt jedoch nicht zu einem abnormalen Auswachsen von Zapfenneuriten (Matsuoka et al. 2012), was dagegen spricht, dass die Abwesenheit dieses

Moleküls für die aberrante Morphologie der Zapfen in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen verantwortlich ist. In einer weiteren Studie wurde demonstriert, dass eine Blockierung von cGMP-gesteuerten Kanälen mittels Cobaltbromid oder L-cis-Diltiazem das Neuritenwachstum und die Varikositätenbildung der Zapfen inhibiert, während eine Aktivierung der cGMP-gesteuerten Kanäle durch den Agonisten 8Br-cGMP die Varikositätenbildung der Zapfen fördert (Zhang und Townes-Anderson 2002). Des Weiteren wurde in den aussprossenden Zapfen von Menschen mit AMD eine starke Expression des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2) beobachtet, welches an dem Auswachsen von Neuriten beteiligt ist (Pow und Sullivan 2007). Es bleibt jedoch abzuwarten, ob MAP2 auch in das abnormale Auswachsen der Zapfenneuriten in den Horizontalzell-ablatierten Mäusen involviert ist. Um die molekularen Mechanismen, die dem Neuritenwachstum und der Synapsenbildung der Zapfen unterliegen, vollständig aufzuklären, werden weitere Untersuchungen benötigt.

#### **4.5 Die N-cad<sup>flox</sup>/Cx57-Cre-Mauslinie als Werkzeug zur Untersuchung der Rolle von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse**

N-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das an verschiedenen Schritten der Synapsenbildung wie dem Neuritenwachstum (Bixby und Zhang 1990; Paradies und Grunwald 1993; Riehl et al. 1996; Esch et al. 2000; Yu und Malenka 2003), der axonalen Zielfindung (Inoue und Sanes 1997; Poskanzer et al. 2003) und der prä- und postsynaptischen Differenzierung (Togashi et al. 2002; Jüngling et al. 2006; Stan et al. 2010) beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde mittels RT-PCR und Immunhistochemie nachgewiesen, dass N-Cadherin in murinen Horizontalzellen exprimiert wird. Dieser Befund ist konsistent mit einer Studie von Xiang et al. (2017), in der ein Antikörper gegen N-Cadherin zur Visualisierung der Horizontalzellmorphologie in der Mausretina eingesetzt wurde. Um zu überprüfen, ob die Expression von N-Cadherin in den Horizontalzellen für die Wegfindung der ON-Bipolarzellendriten in das Photorezeptor-Endfüßchen oder die sonstige Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse von Bedeutung ist, wurden in der vorliegenden Dissertation mithilfe des Cre/loxP-Systems konditionale N-Cadherin-Knock-Out-Mäuse erzeugt. Hierzu wurden N-cad<sup>flox</sup>-Mäuse, in denen das Exon 1 des N-Cadherin-Gens von loxP-Stellen flankiert ist (Kostetskii et al. 2005), mit Cx57-Cre-Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Cx57-Promotors exprimieren (Ströh et al. 2013), verpaart. In Nachkommen mit beiden genetischen Veränderungen wird das Exon 1 des N-Cadherin-Gens in den Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen herausgeschnitten und N-Cadherin dadurch ausgeknockt. Unglücklicherweise zeigte sich bei der Verpaarung von

*Cdh2<sup>+/fl</sup>:Cx57<sup>+Cre</sup>*-Mäusen mit *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+/-</sup>*- oder *Cdh2<sup>+/fl</sup>:Cx57<sup>+/+</sup>*-Mäusen, dass die Genotypen-Verteilung der Nachkommen nicht der erwarteten Mendelschen Verteilung entsprach. Homozygote *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+Cre</sup>*-Knock-Out-Mäuse wurden nur sehr selten geboren, was darauf hindeutet, dass die Embryonen im Uterus versterben. Die *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+Cre</sup>*-Mäuse, die lebend geboren wurden, starben in der Regel innerhalb weniger Tage nach der Geburt. Da die Bildung der Photorezeptor-Bandsynapse erst zwischen P4/P5 und P14 stattfindet (Olney 1968; Blanks et al. 1974; Sherry et al. 2003), war die *N-cad<sup>fllox</sup>-Cx57-Cre*-Mauslinie somit nicht dazu geeignet, die Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse in Abwesenheit der N-Cadherin-Expression in Horizontalzellen zu untersuchen.

Die embryonale bzw. frühe postnatale Letalität der *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+Cre</sup>*-Mäuse demonstriert, dass die N-Cadherin-Expression in den Zellen, in denen der *Cx57*-Promotor aktiv ist, für die Entwicklung von Mäusen essenziell ist. Neben der Expression von *Cx57* in retinalen Horizontalzellen (Hombach et al. 2004) wurde in der Maus auch eine *Cx57*-Expression in medullären Thymus-Epithelzellen (Tykocinski et al. 2010), im olfaktorischen Epithel und *Bulbus olfactorius* (Zhang 2011) sowie in einigen Regionen des Hirnstamms, Cerebellums und Rückenmarks (Zappalà et al. 2010) beschrieben. Darüber hinaus wurde *Cx57*-mRNA in geringem Maß in dem Herzen, dem Darm, den Hoden, der Niere, der Lunge, der Haut und den Eierstöcken von embryonalen Mäusen nachgewiesen (Manthey et al. 1999). Der Thymus ist ein primäres lymphatisches Organ, das einen Bestandteil des Immunsystems darstellt und für die Reifung von T-Lymphozyten zuständig ist. Wie *Cx57* wird auch N-Cadherin in medullären Thymus-Epithelzellen exprimiert (Martins et al. 2008). Aufgrund der Tatsache, dass eine vollständige Entfernung des Thymus am Tag der Geburt jedoch erst nach zwei bis vier Monaten zu einem Tod von Mäusen führt (Miller 1962), ist die fehlende N-Cadherin-Expression in medullären Thymus-Epithelzellen vermutlich nicht für die Letalität der *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+Cre</sup>*-Mäuse verantwortlich. Es ist ebenfalls unwahrscheinlich, dass die Abwesenheit von N-Cadherin im olfaktorischen System ein embryonales Versterben von Mäusen verursacht. Auch die Aktivität des *Cx57*-Promotors im Hirnstamm, Cerebellum und Rückenmark liefert keine Erklärung für die frühe Letalität der *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+Cre</sup>*-Mäuse, da eine *Cx57*-Expression in diesen Regionen erst ab P12 bzw. P28 nachgewiesen werden konnte (Zappalà et al. 2010). Vorherige Studien haben bereits gezeigt, dass N-Cadherin für die embryonale Entwicklung des Herzens unerlässlich ist. Sowohl ein konventioneller (Radice et al. 1997) als auch ein Herzspezifischer (Piven et al. 2011) Knock-Out von N-Cadherin resultiert in einer embryonalen Letalität aufgrund einer Fehlbildung des Herzens. Um letztendlich herauszufinden, ob eine

mangelnde Expression von N-Cadherin im Herzen oder in einem anderen Gewebe für den Tod der *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+Cre</sup>*-Mäuse verantwortlich ist, müssen weitere Untersuchungen an den konditionalen Knock-Out-Tieren vorgenommen werden.

Das Problem des frühzeitigen Versterbens der Mäuse könnte vermutlich umgangen werden, indem die N-cad<sup>fl<sup>ox</sup></sup>-Mauslinie mit einer Mauslinie gekreuzt wird, die eine Liganden-abhängige Cre-Rekombinase (Feil et al. 1996) unter der Kontrolle des Cx57-Promotors exprimiert. Dadurch wäre es möglich, N-Cadherin erst zu einem späteren Zeitpunkt durch die Verabreichung des entsprechenden Liganden auszuknocken. Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass eine Ablation der Cx57-exprimierenden Zellen während der frühen postnatalen Entwicklung nicht zu einem Tod der Mäuse führt. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Tiere auch einen an P4/P5 induzierten Knock-Out von N-Cadherin in Cx57-exprimierenden Zellen überleben würden.

#### **4.6 Die Rolle von N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse**

Eine Vielzahl von Studien haben gezeigt, dass N-Cadherin an verschiedenen Prozessen der Synapsenbildung wie dem Neuritenwachstum (Bixby und Zhang 1990; Paradies und Grunwald 1993; Riehl et al. 1996; Esch et al. 2000; Yu und Malenka 2003), der neuronalen Zielfindung (Inoue und Sanes 1997; Poskanzer et al. 2003) und der Morphogenese von dendritischen Dornen (Togashi et al. 2002; Mysore et al. 2007; Mendez et al. 2010) beteiligt ist. Des Weiteren ist N-Cadherin in die Rekrutierung von synaptischen Vesikeln (Togashi et al. 2002; Jüngling et al. 2006; Stan et al. 2010) und postsynaptischen Komponenten wie PSD-95 (Togashi et al. 2002; Nikitczuk et al. 2014) und AMPA-Rezeptoren (Nuriya und Huganir 2006; Saglietti et al. 2007) involviert. In einer Studie von Tanabe et al. (2006) wurde nachgewiesen, dass N-Cadherin in den Horizontalzellen der Hühnerretina exprimiert wird. Darüber hinaus wurde in dieser Studie untersucht, welche Rolle die Cadherin-Funktion für die Morphogenese und Synapsenbildung der Horizontalzellen spielt. Dazu wurde mithilfe eines Transposon-vermittelten Gentransfer-Systems eine dominant-negative Form von N-Cadherin in den Horizontalzellen der Hühnerretina exprimiert, welche die Funktion der endogenen Cadherine blockiert. Die Inhibition der Cadherin-Funktion führte zu einer reduzierten Größe der dendritischen Felder, einer verringerten Anzahl an dendritischen Terminalien und einer beeinträchtigten postsynaptischen Akkumulierung von GluA4. Diese Befunde deuten darauf hin, dass N-Cadherin in der Hühnerretina für die dendritische Morphogenese der

---

Horizontalzellen und die Synapsenbildung zwischen Photorezeptoren und Horizontalzellen wichtig sein könnte.

In der vorliegenden Dissertation wurde durch RT-PCR und Immunhistochemie bestätigt, dass N-Cadherin auch in den Horizontalzellen der Mausretina exprimiert wird. Zudem wurde eine starke N-Cadherin-Immunoreaktivität in der distalen OPL nachgewiesen, die nur geringfügig mit den dendritischen und axonalen Endigungen der Horizontalzellen kolokalisierte, was darauf schließen lässt, dass N-Cadherin von mindestens einem weiteren Zelltyp der äußeren Retina exprimiert wird. Eine Analyse der N-Cadherin-Expression mittels *in-situ*-Hybridisierung weist außerdem darauf hin, dass N-Cadherin in Müllerzellen exprimiert wird (Honjo et al. 2000). Um ein vollständiges Bild von allen N-Cadherin-exprimierenden Zelltypen in der Mausretina zu erhalten, sollten weitere Untersuchungen, wie z. B. Doppelmarkierungen von N-Cadherin und Zell-Markerproteinen oder immunelektronenmikroskopische Analysen, durchgeführt werden.

Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Rolle von N-Cadherin für die Ausbildung der Photorezeptor-Bandsynapse anhand der N-cad<sup>fl<sup>ox</sup></sup>/Cx57-Cre-Mauslinie zu untersuchen. Homozygote *Cdh2<sup>fl/fl</sup>:Cx57<sup>+Cre</sup>*-Knock-Out-Mäuse wurden entweder nicht geboren wurden oder verstarben während der ersten Lebensstage, was die essenzielle Bedeutung von N-Cadherin für die Entwicklung von Mäusen unterstreicht (Radice et al. 1997) (siehe Kapitel 4.5). Um die Bedeutung von N-Cadherin für die Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse in der Mausretina aufzuklären, bedarf es daher weiterer Studien.

---

## 5 Literaturverzeichnis

- Amini R, Rocha-Martins M, Norden C (2018): Neuronal Migration and Lamination in the Vertebrate Retina. *Front Neurosci* 11, 742
- Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LL, Falk JD, Farhangfar F, Kage K, Krzystolik MG, Lyass LA, Robbins JT (2000): The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron* 27, 513–523
- Baldrige WH (2001): Triphasic adaptation of teleost horizontal cells. *Prog Brain Res* 131, 437–449
- Baldrige 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
- Bassett EA, Wallace VA (2012): Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci* 35, 565–573
- Basu R, Taylor MR, Williams ME (2015): The classic cadherins in synaptic specificity. *Cell Adh Migr* 9, 193–201
- Bayley PR, Morgans CW (2007): Rod bipolar cells and horizontal cells form displaced synaptic contacts with rods in the outer nuclear layer of the nob2 retina. *J Comp Neurol* 500, 286–298
- Baylor DA, Lamb TD, Yau KW (1979): Responses of retinal rods to single photons. *J Physiol* 288, 613–634
- Behrens C, Schubert T, Haverkamp S, Euler T, Berens P (2016): Connectivity map of bipolar cells and photoreceptors in the mouse retina. *eLife* 5, e20041.
- Bixby JL, Zhang R (1990): Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* 110, 1253–1260
- Blanks JC, Adinolfi AM, Lolley RN (1974): Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retina. *J Comp Neurol* 156, 81–93
- Bloomfield SA, Völgyi B (2009): The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci* 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 Neurosci* 12, 985–999
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner BM, Shapiro L (2002): C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296, 1308–1313
- Brasch J, Harrison OJ, Honig B, Shapiro L (2012): Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol* 22, 299–310

- 
- Brusés JL (2006): N-Cadherin signaling in synapse formation and neuronal physiology. *Mol Neurobiol* 33, 237–252
- Cao Y, Posokhova E, Martemyanov KA (2011): TRPM1 Forms Complexes with Nyctalopin In Vivo and Accumulates in Postsynaptic Compartment of ON-Bipolar Neurons in mGluR6-Dependent Manner. *J Neurosci* 31, 11521–11526
- Cao Y, Sarria I, Fehlhauer KE, Kamasawa N, Orlandi C, James KN, Hazen JL, Gardner MR, Farzan M, Lee A, et al. (2015): Mechanism for Selective Synaptic Wiring of Rod Photoreceptors into the Retinal Circuitry and Its Role in Vision. *Neuron* 87, 1248–1260
- Chan TL, Goodchild AK, Martin PR (1997): The morphology and distribution of horizontal cells in the retina of a New World monkey, the marmoset *Callithrix jacchus*: a comparison with macaque monkey. *Vis Neurosci* 14, 125–140
- Chang B, Heckenlively JR, Bayley PR, Brecha NC, Davisson MT, Hawes NL, Hirano AA, Hurd RE, Ikeda A, Johnson BA, et al. (2006): The nob2 mouse, a null mutation in *Cacna1f*: Anatomical and functional abnormalities in the outer retina and their consequences on ganglion cell visual responses. *Vis Neurosci* 23, 11–24
- Chong NH, Alexander RA, Barnett KC, Bird AC, Luthert PJ (1999): An Immunohistochemical Study of an Autosomal Dominant Feline Rod/Cone Dysplasia (Rdy Cats). *Exp Eye Res* 68, 51–57
- Clevers H (2006): Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469–480
- Cote RH: Photoreceptor Phosphodiesterase (PDE6): A G-Protein-Activated PDE Regulating Visual Excitation in Rod and Cone Photoreceptor Cells. In: *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*. CRC Press 2006, 165–193
- Dacheux RF, Raviola E (1982): Horizontal cells in the retina of the rabbit. *J Neurosci* 2, 1486–1493
- Daniel JM, Reynolds AB (1999): The Catenin p120ctn Interacts with Kaiso, a Novel BTB/POZ Domain Zinc Finger Transcription Factor. *Mol Cell Biol* 19, 3614–3623
- Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB (2003): A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *Journal of Cell Biology* 163, 525–534
- Della Santina L, Kuo SP, Yoshimatsu T, Okawa H, Suzuki SC, Hoon M, Tsuboyama K, Rieke F, Wong ROL (2016): Glutamatergic Monopolar Interneurons Provide a Novel Pathway of Excitation in the Mouse Retina. *Curr Biol* 26, 2070–2077
- DeVries SH (2000): Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron* 28, 847–856
- Diamond JS (2017): Inhibitory Interneurons in the Retina: Types, Circuitry, and Function. *Annu Rev Vis Sci* 3, 1–24

- Dick O, tom Dieck S, Altrock WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2003): The Presynaptic Active Zone Protein Bassoon Is Essential for Photoreceptor Ribbon Synapse Formation in the Retina. *Neuron* 37, 775–786
- Dorgau B, Herrling R, Schultz K, Greb H, Segelken J, Ströh S, Bolte P, Weiler R, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2015): Connexin50 couples axon terminals of mouse horizontal cells by homotypic gap junctions: Distribution of cx50 in mouse horizontal cell. *J Comp Neurol* 523, 2062–2081
- Drazba J, Lemmon V (1989): The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Müller cells. *Dev Biol* 138, 82–93
- Duebel J, Haverkamp S, Schleich W, Feng G, Augustine GJ, Kuner T, Euler T (2006): Two-Photon Imaging Reveals Somatodendritic Chloride Gradient in Retinal ON-Type Bipolar Cells Expressing the Biosensor Clomeleon. *Neuron* 49, 81–94
- Esch T, Lemmon V, Banker G (2000): Differential effects of NgCAM and N-cadherin on the development of axons and dendrites by cultured hippocampal neurons. *J Neurocytol* 29, 215–223
- Euler T, Schneider H, Wässle H (1996): Glutamate Responses of Bipolar Cells in a Slice Preparation of the Rat Retina. *J Neurosci* 16, 2934–2944
- Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T (2014): Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* 15, 507–519
- Fahey PK, Burkhardt DA (2003): Center-surround organization in bipolar cells: Symmetry for opposing contrasts. *Vis Neurosci* 20, 1–10
- Fei Y (2002): Cone neurite sprouting: An early onset abnormality of the cone photoreceptors in the retinal degeneration mouse. *Mol Vis* 8, 306–314
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, Lemeur M, Metzger D, Chambon P (1996): Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10887–10890
- Fisher LJ (1979): Development of synaptic arrays in the inner plexiform layer of neonatal mouse retina. *J Comp Neurol* 187, 359–372
- Fu Y, Yau K-W (2007): Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch* 454, 805–819
- García-Castro MI, Vielmetter E, Bronner-Fraser M (2000): N-Cadherin, a cell adhesion molecule involved in establishment of embryonic left-right asymmetry. *Science* 288, 1047–1051
- George-Weinstein M, Gerhart J, Blitz J, Simak E, Knudsen KA (1997): N-cadherin promotes the commitment and differentiation of skeletal muscle precursor cells. *Dev Biol* 185, 14–24
- Goichberg P, Geiger B (1998): Direct Involvement of N-Cadherin–mediated Signaling in Muscle Differentiation. *Mol Biol Cell* 9, 3119–3131

- Greferath U, Grünert U, Wässle H (1994): Localization of GABAA receptors in the rabbit retina. *Cell Tissue Res* 276, 295–307
- Grosheva I, Shtutman M, Elbaum M, Bershadsky AD (2001): p120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J Cell Sci* 114, 695–707
- Grove JCR, Hirano AA, de los Santos J, McHugh CF, Purohit S, Field GD, Brecha NC, Barnes S (2019): Novel hybrid action of GABA mediates inhibitory feedback in the mammalian retina. *PLoS Biol* 17, e3000200
- Grunwald GB, Pratt RS, Lilien J (1982): Enzymic dissection of embryonic cell adhesive mechanisms. III. Immunological identification of a component of the calcium-dependent adhesive system of embryonic chick neural retina cells. *J Cell Sci* 55, 69–83
- Hack I, Frech M, Dick O, Peichl L, Brandstätter JH (2001): Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina. *Eur J Neurosci* 13, 15–24
- Haeseleer F, Imanishi Y, Maeda T, Possin DE, Maeda A, Lee A, Rieke F, Palczewski K (2004): Essential role of Ca<sup>2+</sup>-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function. *Nat Neurosci* 7, 1079–1087
- Halbleib JM, Nelson WJ (2006): Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20, 3199–3214
- Hammang JP, Behringer RR, Baetge EE, Palmiter RD, Messing A (1993): Oncogene Expression in Retinal Horizontal Cells of Transgenic Mice Results in a Cascade of Neurodegeneration. *Neuron* 10, 1197–1209
- Harrison OJ, Jin X, Hong S, Bahna F, Ahlsen G, Brasch J, Wu Y, Vendome J, Felsovalyi K, Hampton CM, et al. (2011): The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Structure* 19, 244–256
- Hasan N, Ray TA, Gregg RG (2016): CACNA1S expression in mouse retina: Novel isoforms and antibody cross-reactivity with GPR179. *Vis Neurosci* 33, E009
- Haverkamp S, Wässle H (2000): Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424, 1–23
- Haverkamp S, Grünert U, Wässle H (2000): The Cone Pedicle, a Complex Synapse in the Retina. *Neuron* 27, 85–95
- Haverkamp S, Wässle H, Duebel J, Kuner T, Augustine GJ, Feng G, Euler T (2005): The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. *J Neurosci* 15, 5438–5445
- Haverkamp S, Specht D, Majumdar S, Zaidi NF, Brandstätter JH, Wasco W, Wässle H, tom Dieck S (2008): Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calsenilin and contact cones as well as rods. *J Comp Neurol* 507, 1087–1101

- 
- Heuberger J, Birchmeier W (2010): Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002915
- Hinds JW, Hinds PL (1978): Early development of amacrine cells in the mouse retina: an electron microscopic, serial section analysis. *J Comp Neurol* 179, 277–300
- Hirano S, Suzuki ST, Redies C (2003): The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci* 8, d306-55
- Hirasawa H, Kaneko A (2003): pH Changes in the Invaginating Synaptic Cleft Mediate Feedback from Horizontal Cells to Cone Photoreceptors by Modulating Ca<sup>2+</sup> Channels. *J Gen Physiol* 122, 657–671
- 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
- Honig MG, Rutishauser US (1996): Changes in the segmental pattern of sensory neuron projections in the chick hindlimb under conditions of altered cell adhesion molecule function. *Dev Biol* 175, 325–337
- Honjo M, Tanihara H, Suzuki S, Tanaka T, Honda Y, Takeichi M (2000): Differential Expression of Cadherin Adhesion Receptors in Neural Retina of the Postnatal Mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 546–551
- Hulit J, Suyama K, Chung S, Keren R, Agiostratidou G, Shan W, Dong X, Williams TM, Lisanti MP, Knudsen K, Hazan RB (2007): N-Cadherin Signaling Potentiates Mammary Tumor Metastasis via Enhanced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Cancer Res* 67, 3106–3116
- Inoue A, Sanes JR (1997): Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science* 276, 1428–1431
- Jackman SL, Babai N, Chambers JJ, Thoreson WB, Kramer RH (2011): A Positive Feedback Synapse from Retinal Horizontal Cells to Cone Photoreceptors. *PLoS Biol* 9, e1001057
- Janssen-Bienhold U, Trümpler J, Hilgen G, Schultz K, De Sevilla Müller LP, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R (2009): Connexin57 is expressed in dendro-dendritic and axo-axonal gap junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. *J Comp Neurol* 513, 363–374
- Jüngling K, Eulenburg V, Moore R, Kemler R, Lessmann V, Gottmann K (2006): N-Cadherin Transsynaptically Regulates Short-Term Plasticity at Glutamatergic Synapses in Embryonic Stem Cell-Derived Neurons. *J Neurosci* 26, 6968–6978
- Kamermans M (2001): Hemichannel-Mediated Inhibition in the Outer Retina. *Science* 292, 1178–1180
- Katsamba P, Carroll K, Ahlsen G, Bahna F, Vendome J, Posy S, Rajebhosale M, Price S, Jessell TM, Ben-Shaul A, et al. (2009): Linking molecular affinity and cellular specificity in cadherin-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 11594–11599

- Keeley PW, Luna G, Fariss RN, Skyles KA, Madsen NR, Raven MA, Poche RA, Swindell EC, Jamrich M, Oh EC, et al. (2013): Development and Plasticity of Outer Retinal Circuitry Following Genetic Removal of Horizontal Cells. *J Neurosci* 33, 17847–17862
- Kemmler R, Schultz K, Dedek K, Euler T, Schubert T (2014): Differential Regulation of Cone Calcium Signals by Different Horizontal Cell Feedback Mechanisms in the Mouse Retina. *J Neurosci* 34, 11826–11843
- Kerov V, Laird JG, Joiner M, Knecht S, Soh D, Hagen J, Gardner SH, Gutierrez W, Yoshimatsu T, Bhattarai S, et al. (2018):  $\alpha_2\delta-4$  is required for the molecular and structural organization of rod and cone photoreceptor synapses. *J Neurosci* 3818–16
- Kolb H (1974): The Connections between Horizontal Cells and Photoreceptors in the Retina of the Cat: Electron Microscopy of Golgi Preparations. *J Comp Neurol* 155, 1–14
- Kolb H (2011): The Outer Plexiform Layer. Webvision. Moran Eye Center. <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/oute-plexiform/>; Zugriff am 22.01.2021
- Kolb H, Mariani A, Gallego A (1980): A second type of horizontal cell in the monkey retina. *J Comp Neurol* 189, 31–44
- Kostetskii I, Li J, Xiong Y, Zhou R, Ferrari VA, Patel VV, Molkentin JD, Radice GL (2005): Induced Deletion of the N-Cadherin Gene in the Heart Leads to Dissolution of the Intercalated Disc Structure. *Circ Res* 96, 346–354
- Kung F, Wang W, Tran TS, Townes-Anderson E (2017): Sema3A Reduces Sprouting of Adult Rod Photoreceptors In Vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58, 4318–4331
- La Vail MM, Rapaport DH, Rakic P (1991): Cytogenesis in the monkey retina. *J Comp Neurol* 309, 86–114
- Lewis GP, Charteris DG, Sethi CS, Fisher SK (2002): Animal models of retinal detachment and reattachment: identifying cellular events that may affect visual recovery. *Eye* 16, 375–387
- Li S, Mitchell J, Briggs DJ, Young JK, Long SS, Fuerst PG (2016): Morphological Diversity of the Rod Spherule: A Study of Serially Reconstructed Electron Micrographs. *PLoS ONE* 11, e0150024
- Li Z, Kljavin I, Milam A (1995): Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. *J Neurosci* 15, 5429–5438
- Li Z-Y, Wong F, Chang JH, Possin DE, Hao Y, Petters RM, Milam AH (1998): Rhodopsin Transgenic Pigs as a Model for Human Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 12
- Lin B, Masland RH, Strettoi E (2009): Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice. *Exp Eye Res* 88, 589–599

- Liu Xue, Hirano AA, Sun X, Brecha NC, Barnes S (2013): Calcium channels in rat horizontal cells regulate feedback inhibition of photoreceptors through an unconventional GABA- and pH-sensitive mechanism. *J Physiol* 591, 3309–3324
- Liu Xiaoni, Kerov V, Haeseleer F, Majumder A, Artemyev N, Baker SA, Lee A (2013): Dysregulation of Cav1.4 channels disrupts the maturation of photoreceptor synaptic ribbons in congenital stationary night blindness type 2. *Channels* 7, 514–523
- Livesey FJ, Cepko CL (2001): Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2, 109–118
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009): Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev Cell* 17, 9–26
- Mangel SC (1991): Analysis of the horizontal cell contribution to the receptive field surround of ganglion cells in the rabbit retina. *J Physiol* 442, 211–234
- Mansergh F, Orton NC, Vessey JP, Lalonde MR, Stell WK, Tremblay F, Barnes S, Rancourt DE, Bech-Hansen NT (2005): Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina. *Hum Mol Genet* 14, 3035–3046
- Manthey D, Bukauskas F, Lee CG, Kozak CA, Willecke K (1999): Molecular Cloning and Functional Expression of the Mouse Gap Junction Gene *Connexin-57* in Human HeLa Cells. *J Biol Chem* 274, 14716–14723
- Martins VC, Boehm T, Bleul CC (2008):  $\text{L}\beta\text{r}$  Signaling Does Not Regulate Aire-Dependent Transcripts in Medullary Thymic Epithelial Cells. *J Immunol* 181, 400–407
- Masai I, Lele Z, Yamaguchi M, Komori A, Nakata A, Nishiwaki Y, Wada H, Tanaka H, Nojima Y, Hammerschmidt M, et al. (2003): N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development* 130, 2479–2494
- Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, Sasaki H, Hiroi K, Nakamura Y, Shigemoto R, et al. (1995): Specific Deficit of the ON Response in Visual Transmission by Targeted Disruption of the *mGluR6* Gene. *Cell* 80, 757–765
- Mataruga A, Kremmer E, Müller F (2007): Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *J Comp Neurol* 502, 1123–1137
- Matsunaga M, Hatta K, Nagafuchi A, Takeichi M (1988): Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules. *Nature* 334, 62–64
- Matsuoka RL, Jiang Z, Samuels IS, Nguyen-Ba-Charvet KT, Sun LO, Peachey NS, Chedotal A, Yau K-W, Kolodkin AL (2012): Guidance-Cue Control of Horizontal Cell Morphology, Lamination, and Synapse Formation in the Mammalian Outer Retina. *J Neurosci* 32, 6859–6868
- Mège RM, Ishiyama N (2017): Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9, a028738

- 
- Mendez P, De Roo M, Poglia L, Klauser P, Muller D (2010): N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *J Cell Biol* 189, 589–600
- Meng W, Mushika Y, Ichii T, Takeichi M (2008): Anchorage of Microtubule Minus Ends to Adherens Junctions Regulates Epithelial Cell-Cell Contacts. *Cell* 135, 948–959
- Messersmith EK, Redburn DA (1990): Kainic acid lesioning alters development of the outer plexiform layer in neonatal rabbit retina. *Int J Dev Neurosci* 8, 447–461
- Michalakis S, Schäferhoff K, Spiwox-Becker I, Zabouri N, Koch S, Koch F, Bonin M, Biel M, Haverkamp S (2013): Characterization of neurite outgrowth and ectopic synaptogenesis in response to photoreceptor dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 70, 1831–1847
- Milam AH, Li Z-Y (1996): Clinicopathologic Effects of the Q64ter Rhodopsin Mutation in Retinitis Pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 753–765
- Miller JFAP (1962): Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc R Soc Lond B* 156, 415–28
- Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E (1995): Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem* 270, 1015–1019
- Morgan JL, Dhingra A, Vardi N, Wong ROL (2006): Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells. *Nat Neurosci* 9, 85–92
- Morgan JL, Wong ROL (2018): Development of Cell Types and Synaptic Connections in the Retina. Moran Eye Center. <https://webvision.med.utah.edu/book/part-vi-development-of-cell-types-and-synaptic-connections-in-the-retina/development-of-cell-types-and-synaptic-connections-in-the-retina/>; Zugriff am 22.01.2021
- Morgans CW (2000): Neurotransmitter release at ribbon synapses in the retina. *Immunol Cell Biol* 78, 442–446
- Morgans CW, Brown RL, Duvoisin RM (2010): TRPM1: The endpoint of the mGluR6 signal transduction cascade in retinal ON-bipolar cells. *BioEssays* 32, 609–614
- Müller F, Scholten A, Ivanova E, Haverkamp S, Kremmer E, Kaupp UB (2003): HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur J Neurosci* 17, 2084–2096
- Mysore SP, Tai C-Y, Schuman EM (2007): Effects of N-cadherin disruption on spine morphological dynamics. *Front Cell Neurosci* 1, 1
- Nakagawa S, Takeichi M (1998): Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development* 125, 2963–2971

- Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan S, Ito D, Kami K, Mori T, et al. (2004): N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 4125–4133
- Nemitz L, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2019): Rod Bipolar Cells Require Horizontal Cells for Invagination Into the Terminals of Rod Photoreceptors. *Front Cell Neurosci* 13, 423
- Nikitczuk JS, Patil SB, Matikainen-Ankney BA, Scarpa J, Shapiro ML, Benson DL, Huntley GW (2014): N-cadherin regulates molecular organization of excitatory and inhibitory synaptic circuits in adult hippocampus in vivo: Novel roles for N-cadherin at mature forebrain synapses. *Hippocampus* 24, 943–962
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002): Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64, 313–353
- Nomura A (1994): Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77, 361–369
- Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B (2000): p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* 150, 567–580
- Nuriya M, Hagan RL (2006): Regulation of AMPA receptor trafficking by N-cadherin. *J Neurochem* 97, 652–661
- Obst-Pernberg K, Redies C (1999): Cadherins and synaptic specificity. *J Neurosci Res* 58, 130–138
- O'Donnell M, Chance RK, Bashaw GJ (2009): Axon Growth and Guidance: Receptor Regulation and Signal Transduction. *Annu Rev Neurosci* 32, 383–412
- Olney JW (1968): An Electron Microscopic Study of Synapse Formation, Receptor Outer Segment Development, and other Aspects of Developing Mouse Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 7, 250–268
- Omori Y, Araki F, Chaya T, Kajimura N, Irie S, Terada K, Muranishi Y, Tsujii T, Ueno S, Koyasu T, et al. (2012): Presynaptic Dystroglycan-Pikachurin Complex Regulates the Proper Synaptic Connection between Retinal Photoreceptor and Bipolar Cells. *J Neurosci* 32, 6126–6137
- Orlandi C, Posokhova E, Masuho I, Ray TA, Hasan N, Gregg RG, Martemyanov KA (2012): GPR158/179 regulate G protein signaling by controlling localization and activity of the RGS7 complexes. *J Cell Biol* 197, 711–719
- Orlandi C, Cao Y, Martemyanov KA (2013): Orphan Receptor GPR179 Forms Macromolecular Complexes With Components of Metabotropic Signaling Cascade in Retina ON-Bipolar Neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 7153
- Orlandi C, Omori Y, Wang Y, Cao Y, Ueno A, Roux MJ, Condomitti G (2018): Transsynaptic Binding of Orphan Receptor GPR179 to Dystroglycan-Pikachurin Complex Is Essential for the Synaptic Organization of Photoreceptors. *Cell Rep* 25, 130–145

- Paradies NE, Grunwald GB (1993): Purification and characterization of NCAD90, a soluble endogenous form of N-cadherin, which is generated by proteolysis during retinal development and retains adhesive and neurite-promoting function. *J Neurosci Res* 36, 33–45
- Peachey NS, Ray TA, Florijn R, Rowe LB, Sjoerdsma T, Contreras-Alcantara S, Baba K, Tosini G, Pozdeyev N, Iuvone PM, et al. (2012): GPR179 Is Required for Depolarizing Bipolar Cell Function and Is Mutated in Autosomal-Recessive Complete Congenital Stationary Night Blindness. *Am J Hum Genet* 90, 331–339
- Peichl L, González-Soriano J (1994): Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: A comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis Neurosci* 11, 501–517
- Piven OO, Kostetskii IE, Macewicz LL, Kolomiets YM, Radice GL, Lukash LL (2011): Requirement for N-cadherin-catenin complex in heart development. *Exp Biol Med* 236, 816–822
- Pla P, Moore R, Morali OG, Grille S, Martinuzzi S, Delmas V, Larue L (2001): Cadherins in neural crest development and transformation. *J Cell Physiol* 189, 121–132
- Poche RA, Kwan KM, Raven MA, Furuta Y, Reese BE, Behringer RR (2007): Lim1 Is Essential for the Correct Laminal Positioning of Retinal Horizontal Cells. *J Neurosci* 27, 14099–14107
- Poskanzer K, Needleman LA, Bozdagi O, Huntley GW (2003): N-cadherin regulates ingrowth and laminar targeting of thalamocortical axons. *J Neurosci* 23, 2294–2305
- Pow DV, Sullivan RK (2007): Nuclear kinesis, neurite sprouting and abnormal axonal projections of cone photoreceptors in the aged and AMD-afflicted human retina. *Exp Eye Res* 84, 850–857
- Prada C, Puga J, Pérez-Méndez L, López R, Ramírez G (1991): Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* 3, 559–569
- Prokhortchouk A, Hendrich B, Jørgensen H, Ruzov A, Wilm M, Georgiev G, Bird A, Prokhortchouk E (2001): The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev* 15, 1613–1618
- Puller C, Ivanova E, Euler T, Haverkamp S, Schubert T (2013): OFF bipolar cells express distinct types of dendritic glutamate receptors in the mouse retina. *Neuroscience* 243, 136–148
- Puller C, Haverkamp S, Neitz M, Neitz J (2014): Synaptic Elements for GABAergic Feed-Forward Signaling between HII Horizontal Cells and Blue Cone Bipolar Cells Are Enriched beneath Primate S-Cones. *PLoS ONE* 9, e88963
- Puthussery T, Gayet-Primo J, Taylor WR (2010): Localization of the calcium-binding protein secretagogin in cone bipolar cells of the mammalian retina. *J Comp Neurol* 518, 513–525

- Radice GL, Rayburn H, Matsunami H, Knudsen KA, Takeichi M, Hynes RO (1997): Developmental Defects in Mouse Embryos Lacking N-Cadherin. *Dev Biol* 181, 64–78
- Ranscht B (2000): Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation. *Int J Dev Neurosci* 18
- Rao-Mirotznik R, Harkins AB, Buchsbaum G, Sterling P (1995): Mammalian rod terminal: Architecture of a binary synapse. *Neuron* 14, 561–569
- Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM (2004): Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474, 304–324
- Raven MA, Orton NC, Nassar H, Williams GA, Stell WK, Jacobs GH, Bech-Hansen NT, Reese BE (2008): Early afferent signaling in the outer plexiform layer regulates development of horizontal cell morphology. *J Comp Neurol* 506, 745–758
- Ray TA, Heath KM, Hasan N, Noel JM, Samuels IS, Martemyanov KA, Peachey NS, McCall MA, Gregg RG (2014): GPR179 Is Required for High Sensitivity of the mGluR6 Signaling Cascade in Depolarizing Bipolar Cells. *J Neurosci* 34, 6334–6343
- Redies C (2000): Cadherins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 611–648
- Redies C, Inuzuka H, Takeichi M (1992): Restricted expression of N- and R-cadherin on neurites of the developing chicken CNS. *J Neurosci* 12, 3525–3534
- Ribic A, Liu X, Crair MC, Biederer T (2014): Structural organization and function of mouse photoreceptor ribbon synapses involve the immunoglobulin protein synaptic cell adhesion molecule 1: SynCAM 1 organizes ribbon synapses. *J Comp Neurol* 522, 900–920
- Rich KA, Zhan Y, Blanks JC (1997): Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J Comp Neurol* 388, 47–63
- Riehl R, Johnson K, Grunwald GB, Cornel E, Lilienbaum A, Holt CE (1996): Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* 17, 837–848
- Röhlich P, van Veen T, Szél A (1994): Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron* 13, 1159–1166
- Saglietti L, Dequidt C, Kamieniarz K, Rousset M-C, Valnegri P, Thoumine O, Beretta F, Fagni L, Choquet D, Sala C, et al. (2007): Extracellular Interactions between GluR2 and N-Cadherin in Spine Regulation. *Neuron* 54, 461–477
- Saito M, Iwawaki T, Taya C, Yonekawa H, Noda M, Inui Y, Mekada E, Kimata Y, Tsuru A, Kohno K (2001): Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 19, 746–750
- Salinas PC, Price SR (2005): Cadherins and catenins in synapse development. *Curr Opin Neurobiol* 15, 73–80

- Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T, et al. (2008): Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci* 11, 923–931
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682
- Schmitz F, Königstorfer A, Südhof TC (2000): RIBEYE, a Component of Synaptic Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight into Synaptic Ribbon Function. *Neuron* 28, 857–872
- Schubert T, Huckfeldt RM, Parker E, Campbell JE, Wong RO (2010): Assembly of the outer retina in the absence of GABA synthesis in horizontal cells. *Neural Dev* 5, 15
- Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK, Leitner WP, Mann DL, Luthert PJ, Charteris DG (2005): Glial Remodeling and Neural Plasticity in Human Retinal Detachment with Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 329
- Shan W-S, Tanaka H, Phillips GR, Arndt K, Yoshida M, Colman DR, Shapiro L (2000): Functional Cis-Heterodimers of N- and R-Cadherins. *J Cell Biol* 148, 579–590
- Shapiro L, Colman DR (1999): The Diversity of Cadherins and Implications for a Synaptic Adhesive Code in the CNS. *Neuron* 23, 427–430
- Shekhar K, Lapan SW, Whitney IE, Tran NM, Macosko EZ, Kowalczyk M, Adiconis X, Levin JZ, Nemesh J, Goldman M, et al. (2016): Comprehensive Classification of Retinal Bipolar Neurons by Single-Cell Transcriptomics. *Cell* 166, 1308-1323.e30
- Shelley J, Dedek K, Schubert T, Feigenspan A, Schultz K, Hombach S, Willecke K, Weiler R (2006): Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. *Eur J Neurosci* 23, 3176–3186
- Sherry DM, Wang MM, Bates J, Frishman LJ (2003): Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J Comp Neurol* 465, 480–498
- Shields CR, Tran MN, Wong RO, Lukasiewicz PD (2000): Distinct ionotropic GABA receptors mediate presynaptic and postsynaptic inhibition in retinal bipolar cells. *J Neurosci* 20, 2673–2682
- Sonntag S, Dedek K, Dorgau B, Schultz K, Schmidt K-F, Cimiotti K, Weiler R, Lowel S, Willecke K, Janssen-Bienhold U (2012): Ablation of Retinal Horizontal Cells from Adult Mice Leads to Rod Degeneration and Remodeling in the Outer Retina. *J Neurosci* 32, 10713–10724
- Soto F, Watkins KL, Johnson RE, Schottler F, Kerschensteiner D (2013): NGL-2 Regulates Pathway-Specific Neurite Growth and Lamination, Synapse Formation, and Signal Transmission in the Retina. *J Neurosci* 33, 11949–11959

- Soto F, Zhao L, Kerschensteiner D (2018): Synapse maintenance and restoration in the retina by NGL2. *eLife* 7, e30388.
- Specht D, Wu S-B, Turner P, Dearden P, Koentgen F, Wolfrum U, Maw M, Brandstätter JH, tom Dieck S (2009): Effects of Presynaptic Mutations on a Postsynaptic Calcium Channel Colocalized with mGluR6 at Mouse Photoreceptor Ribbon Synapses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 505
- Stan A, Pielarski KN, Brigadski T, Wittenmayer N, Fedorchenko O, Gohla A, Lessmann V, Dresbach T, Gottmann K (2010): Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 11116–11121
- Sterling P, Matthews G (2005): Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci* 28, 20–29
- Strettoi E, Pignatelli V (2000): Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 11020–11025
- Strettoi E, Porciatti V, Falsini B, Pignatelli V, Rossi C (2002): Morphological and Functional Abnormalities in the Inner Retina of the rd/rd Mouse. *J Neurosci* 22, 5492–5504
- Ströh S, Sonntag S, Janssen-Bienhold U, Schultz K, Cimiotti K, Weiler R, Willecke K, Dedek K (2013): Cell-Specific Cre Recombinase Expression Allows Selective Ablation of Glutamate Receptors from Mouse Horizontal Cells. *PLoS ONE* 8, e83076
- Ströh S, Puller C, Swirski S, Hölzel M-B, van der Linde LIS, Segelken J, Schultz K, Block C, Monyer H, Willecke K, et al. (2018): Eliminating Glutamatergic Input onto Horizontal Cells Changes the Dynamic Range and Receptive Field Organization of Mouse Retinal Ganglion Cells. *J Neurosci* 38, 2015–2028
- Suzuki SC, Takeichi M (2008): Cadherins in neuronal morphogenesis and function: Classic cadherins in the nervous system. *Dev Growth Differ* 50, S119–S130
- 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
- Taneyhill LA (2008): To adhere or not to adhere: the role of Cadherins in neural crest development. *Cell Adh Migr* 2, 223–230
- Tatsukawa T, Hirasawa H, Kaneko A, Kaneda M (2005): GABA-mediated component in the feedback response of turtle retinal cones. *Vis Neurosci* 22, 317–324
- Thoreson WB, Mangel SC (2012): Lateral interactions in the outer retina. *Prog Retin Eye Res* 31, 407–441
- Thoreson WB, Babai N, Bartoletti TM (2008): Feedback from Horizontal Cells to Rod Photoreceptors in Vertebrate Retina. *J Neurosci* 28, 5691–5695

- Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M (2002): Cadherin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis. *Neuron* 35, 77–89
- tom Dieck S, Specht D, Strenzke N, Hida Y, Krishnamoorthy V, Schmidt K-F, Inoue E, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, et al. (2012): Deletion of the Presynaptic Scaffold CAST Reduces Active Zone Size in Rod Photoreceptors and Impairs Visual Processing. *J Neurosci* 32, 12192–12203
- Tsukamoto Y, Omi N (2017): Classification of Mouse Retinal Bipolar Cells: Type-Specific Connectivity with Special Reference to Rod-Driven AII Amacrine Pathways. *Front Neuroanat* 11, 92
- Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, Sterling P (2001): Microcircuits for Night Vision in Mouse Retina. *J Neurosci* 21, 8616–8623
- Tykocinski L-O, Sinemus A, Rezavandy E, Weiland Y, Baddeley D, Cremer C, Sonntag S, Willecke K, Derbinski J, Kyewski B (2010): Epigenetic regulation of promiscuous gene expression in thymic medullary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 19426–19431
- Vardi N, Sterling P (1994): Subcellular localization of GABAA receptor on bipolar cells in macaque and human retina. *Vision Res* 34, 1235–1246
- Vardi N, Zhang L-L, Payne JA, Sterling P (2000): Evidence That Different Cation Chloride Cotransporters in Retinal Neurons Allow Opposite Responses to GABA. *J Neurosci* 20, 7657–7663
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC (2016): Glia–neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 51, 1–40
- Vendome J, Felsovalyi K, Song H, Yang Z, Jin X, Brasch J, Harrison OJ, Ahlsen G, Bahna F, Kaczynska A, et al. (2014): Structural and energetic determinants of adhesive binding specificity in type I cadherins. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, E4175–E4184
- Vessey JP, Stratis AK, Daniels BA, Da Silva N, Jonz MG, Lalonde MR, Baldrige WH, Barnes S (2005): Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse. *J Neurosci* 25, 4108–4117
- Wang Y, Fehlhaber KE, Sarria I, Cao Y, Ingram NT, Guerrero-Given D, Throesch B, Baldwin K, Kamasawa N, Ohtsuka T, et al. (2017): The Auxiliary Calcium Channel Subunit  $\alpha 2\delta 4$  Is Required for Axonal Elaboration, Synaptic Transmission, and Wiring of Rod Photoreceptors. *Neuron* 93, 1359-1374.e6
- Wässle H (2004): Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5, 747–757
- Wong LL, Rapaport DH (2009): Defining retinal progenitor cell competence in *Xenopus laevis* by clonal analysis. *Development* 136, 1707–1715
- Wu F, Li R, Umino Y, Kaczynski TJ, Sapkota D, Li S, Xiang M, Fliesler SJ, Sherry DM, Gannon M, et al. (2013): *Onecut1* Is Essential for Horizontal Cell Genesis and Retinal Integrity. *J Neurosci* 33, 13053–13065

- Wu SM (1991): Input-output relations of the feedback synapse between horizontal cells and cones in the tiger salamander retina. *J Neurophysiol* 65, 1197–1206
- Wu SM (1992): Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. *Curr Opin Neurobiol* 2, 462–468
- Wycisk KA, Budde B, Feil S, Skosyrski S, Buzzi F, Neidhardt J, Glaus E, Nu'rnberg P, Ruether K, Berger W (2006): Structural and Functional Abnormalities of Retinal Ribbon Synapses due to *Cacna2d4* Mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 3523
- Xiang L, Chen X-J, Wu K-C, Zhang C-J, Zhou G-H, Lv J-N, Sun L-F, Cheng F-F, Cai X-B, Jin Z-B (2017): miR-183/96 plays a pivotal regulatory role in mouse photoreceptor maturation and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 6376–6381
- Xiao K, Allison DF, Buckley KM, Kottke MD, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP (2003): Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* 163, 535–545
- Xin D, Bloomfield SA (1999): Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol* 405, 75–87
- Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, Fujita Y, Reynolds AB, Anastasiadis PZ (2004): A Novel Interaction between Kinesin and p120 Modulates p120 Localization and Function. *J Biol Chem* 279, 9512–9521
- Yang XL, Wu SM (1991): Feedforward lateral inhibition in retinal bipolar cells: input-output relation of the horizontal cell-depolarizing bipolar cell synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3310–3313
- Young RW (1985): Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212, 199–205
- Yu W, Yang L, Li T, Zhang Y (2019): Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Front Oncol* 9, 989
- Yu X, Malenka RC (2003): Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci* 6, 1169–1177
- Zabouri N, Haverkamp S (2013): Calcium Channel-Dependent Molecular Maturation of Photoreceptor Synapses. *PLoS ONE* 8, e63853
- Zappalà A, Parenti R, La Delia F, Cicirata V, Cicirata F (2010): Expression of connexin57 in mouse development and in harmaline-tremor model. *Neuroscience* 171, 1–11
- Zhang C (2011): Expression of connexin 57 in the olfactory epithelium and olfactory bulb. *Neurosci Res* 71, 226–234
- Zhang N, Townes-Anderson E (2002): Regulation of Structural Plasticity by Different Channel Types in Rod and Cone Photoreceptors. *J Neurosci* 22, 7065–7079
- Zhang X, Serb JM, Greenlee MHW (2011): Mouse Retinal Development: A Dark Horse Model for Systems Biology Research. *Bioinform Biol Insights* 5, BBI.S6930

## 6 Anhang

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Mauslinien

**Tabelle 9: Verwendete Mauslinien**

Mauslinie	Quelle	Katalognummer
C57BL/6J	The Jackson Laboratory	000664
Cx57-Cre	(Ströh et al. 2013)	
Cx57-DTRfrtCre	(Sonntag et al. 2012), European Mouse Mutant Archive	EM:06024
N-cad <sup>flox</sup> / B6.129S6(SJL)-Cdh2tm1Glr/J	(Kostetskii et al. 2005), The Jackson Laboratory	007611

#### 6.1.2 Geräte

**Tabelle 10: Verwendete Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller
Analysen- und Präzisionswaage	BP211D	Sartorius
Analysen- und Präzisionswaage	TP-303	Denver Instrument
Digitales Forschungsmikroskop	Leica DM6 B	Leica Microsystems
Elektrophoresekammer	Agagel Midi-Wide	Biometra
Geldokumentationssystem	AlphaImager EP	Alpha Innotech
pH-Meter	pH 422	WTW
Inkubator	HERAcell	Heraeus
Konfokalmikroskop	Leica TCS SP8	Leica Microsystems
Kryostat	Leica CM1860	Leica Biosystems
Magnetrührer	RH basic 2	IKA
Objektiv	HC PL APO 40x/1.30 OIL CS2	Leica Microsystems
Objektiv	HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2	Leica Microsystems
Niederspannungsnetzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra
Sterilbank	Holten LaminAir 1.2	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf

Transmissionselektronenmikroskop	Zeiss EM 902A	Carl Zeiss
Ultramikrotom	Ultracut E	Reichert-Jung
Zentrifuge	5424 R	Eppendorf

### 6.1.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser Stärke 1, Durchmesser 12 mm	Thermo Fisher Scientific
Deckgläser Stärke 1, 24 x 50 mm	Carl Roth
Falcon® 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	Corning
Netzchen, Kupfer, 200 mesh, hexagonal	Plano
Mikroskop-Objektträger mit farbigem Mattrand, weiß	VWR
PASTEUR CAPILLARY PIPETTES SHORT SIZE 150 mm	WU Mainz
PCR 8er-SoftStrips 0.2 ml, farblos	Biozym
SafeSeal Gefäß 1,5ml	Sarstedt
Spritzenfilter ROTILABO® PVDF, 0,22 µm	Carl Roth
Zellkulturplatte 6-well	Sarstedt

### 6.1.4 Chemikalien, Enzyme und Kits

**Tabelle 12: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits**

Chemikalie/Enzym/Kit	Hersteller
Aceton	Merck
Agar 100 Resin Kit	Agar Scientific
Agarose	Biozym
ChemiBlocker	Millipore
Chromkaliumsulfat	Fluka
Concanavalin A from <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack bean)	Sigma-Aldrich
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	VWR
Diphtherietoxin	Sigma-Aldrich

---

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Biochrom
D(+)-Saccharose	Carl Roth
EDTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Thermo Fisher Scientific
Ethanol	Carl Roth
Fetales Kälberserum	Biochrom
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyde 25% EM Grade	Agar Scientific
Hank's Balanced Salt Solution without Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , with phenol red, with 0.35 g/l NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom
Hepes-Buffer (1M)	Merck
Kaliumchlorid	Acros
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
KAPA HotStart Mouse Genotyping Kit	Sigma-Aldrich
L-Cystein Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
L-Glutamin 200 mM	PromoCell
Natriumazid	Merck
Natriumbicarbonat	Merck
Natriumchlorid	VWR
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Fluka
Natriumtetraborat Decahydrat	Sigma-Aldrich
Normalserum (Ziege)-unkonj.	Dianova
NucleoSpin RNA XS	MACHEREY-NAGEL
Nuklease-freies Wasser	Qiagen
Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer	Promega
OmniPur, WFI Quality Water, Sterile Filtered	Calbiochem
Osmiumtetroxidlösung 4 %	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Papain, Suspension	Worthington Biochemical Corporation
Paraformaldehyd	Carl Roth
Random Primers	Promega
RiboLock RNase-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific
Roti®Mix PCR3	Carl Roth
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek

---

Toluidine Blue O zinc chloride double salt	Acros Organics
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	VWR
Triton X-100	Sigma-Aldrich
VECTASHIELD Mounting Medium	Vector Laboratories

### 6.1.5 Antikörper

**Tabelle 13: Verwendete primäre Antikörper**

<b>Antigen</b>	<b>Spezies, Typ</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller, Katalognummer, RRID</b>
Calbindin	Kaninchen, polyklonal	1:500	Swant, CB-38, AB_2721225
ChAT	Ziege, polyklonal	1:1000	Millipore, AB144P, AB_2079751
Cone arrestin	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Millipore, AB15282, AB_1163387
Calsenilin	Maus, monoklonal	1:2000	Millipore, 05-756, AB_309969
Cav1.1	Maus, monoklonal	1:500	Millipore, MAB427, AB_2069582
CtBP2	Maus, monoklonal	1:5000	BD Biosciences, 612044, AB_399431
GluK1	Maus, monoklonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology, sc-393420, AB_2716684
HCN4	Ratte, polyklonal	1:100	Frank Müller (Forschungszentrum Jülich, Jülich, Deutschland) (Müller et al. 2003)
mGluR6	Schaf, polyklonal	1:100	Kirill A. Martemyanov (The Scripps Research Institute, Jupiter, Florida, USA) (Cao et al. 2011)
N-Cadherin	Maus, monoklonal	1:200	Thermo Fisher Scientific, 33-3900, AB_2313779
PKARII $\beta$	Maus, monoklonal	1:1500	BD Biosciences, 610625, AB_397957
PKC $\alpha$	Ziege, polyklonal	1:500	R&D Systems, AF5340, AB_2168552
PKC $\alpha$	Maus, monoklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology, sc-80, AB_628141
PSD-95	Maus, monoklonal	1:5000	NeuroMab, 75-028, AB_2307331
SCGN	Schaf, polyklonal	1:1000	BioVendor Laboratory Medicine, RD184120100, AB_2034062

**Tabelle 14: Verwendete sekundäre Antikörper**

<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller, Katalognummer, RRID</b>
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:600	Thermo Fisher Scientific, A-11057, AB_142581
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:600	Thermo Fisher Scientific, A-21202, AB_141607
Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:600	Thermo Fisher Scientific, A10037, AB_2534013
Donkey anti-Sheep IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:600	Thermo Fisher Scientific, A-11015, AB_2534082
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:600	Thermo Fisher Scientific, A-11001; AB_2534069
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:600	Thermo Fisher Scientific, A-11004, AB_2534072
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:600	Thermo Fisher Scientific, A-11034, AB_2576217
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:600	Thermo Fisher Scientific, A-11011, AB_143157

### 6.1.6 Primer

**Tabelle 15: Verwendete Primer**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>Amplikon-Größe</b>
<i>Cx57 forward</i>	CAGATGATGGACGGTGTGA	451 bp
<i>Cx57 reverse</i>	CATCTCGGCATCAGGAAAAT	
<i>N-Cadherin forward</i>	AGGCTTCTGGTGAAATTGCAT	176 bp
<i>N-Cadherin reverse</i>	GTCCACCTTGAAATCTGCTGG	

### 6.1.7 Programme

**Tabelle 16: Verwendete Programme**

<b>Programm</b>	<b>Hersteller, RRID</b>
Adobe Photoshop CS6 Extended	Adobe Systems, SCR_014199
Fiji	(Schindelin et al., 2012), SCR_002285
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, SCR_002798
Huygens Software	Scientific Volume Imaging, SCR_014237
Leica Application Suite X	Leica Microsystems, SCR_013673

### 6.1.8 Lösungen und Puffer

**Tabelle 17: Verwendete Lösungen und Puffer**

<b>Lösung/ Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockierlösung	5 % (v/v) ChemiBLOCKER 0,3 % (v/v) Triton X-100 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> in 0,1 M PB sterilfiltriert
Cystein-Stocklösung	10 mM (w/v) L-Cystein in HBSS mit Zusätzen Einstellung des pH-Werts auf 7,4 mit NaOH sterilfiltriert
DNase I-Lösung	1 mg DNaseI (2840 U/mg) in 25,6 ml DMEM mit Zusätzen + 2,8 ml fetales Kälberserum (10 %) sterilfiltriert
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Zusätzen	10 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 2,7 ml Natriumbicarbonat (7,5 %) + 1 ml Penicillin/Streptomycin + 1 ml L-Glutamin (200 mM) + 1 ml Hepes (100 mM) + 83,3 ml OmniPur, WFI Quality Water, Sterile Filtered
EDTA-Stocklösung	10 mM EDTA in Hank's Balanced Salt Solution ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> sterilfiltriert
Elektrodenlösung	0,375 µl RiboLock RNase-Inhibitor + 0,75 µl 10X DNase I Reaction Buffer + 6,375 µl Nuklease-freies Wasser

---

Fixierlösung für Elektronenmikroskopie	1 % (w/v) Paraformaldehyd 3 % (w/v) Sucrose 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,05 M PB
Fixierlösung für Immunhistochemie	2 % (w/v) Paraformaldehyd 3 % (w/v) Sucrose in 0,1 M PB
Beschichtungslösung für Objektträger	1,3 % (w/v) Gelatine 0,09 % (w/v) Chromkaliumsulfat 25 % (v/v) Ethanol 6,1 % (v/v) Essigsäure in H <sub>2</sub> O
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit Zusätzen	97 ml Hank's Balanced Salt Solution ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> + 1 ml EDTA-Stocklösung + 1 ml HEPES (100 mM) + 1 ml Penicillin/Streptomycin
Papain-Lösung	884 µl HBSS mit Zusätzen + 100 µl Cystein-Stocklösung + 16 µl Papain, Suspension (1254 U/ml)
Phosphatpuffer (PB), 0,1 M	0,1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O Einstellung des pH-Werts auf 7,4 durch Zugabe von 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O
TRIS-Acetat-EDTA (TAE)- Puffer (50x)	242 g TRIS + 57 ml Essigsäure + 100 ml 0,5 M EDTA in H <sub>2</sub> O (pH 8,0) ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
TRIS-gepufferte Salzlösung mit Triton X-100 (TBSTX)	50 mM TRIS 1,5 % (w/v) NaCl 0,3 % (v/v) Triton X-100 Einstellung des pH-Werts auf 7,6 mit HCl

---

## 6.2 Publikationen

### 6.2.1 Übersicht

Die Inhalte folgender Publikationen sind Bestandteil der vorliegenden Dissertation:

1. **Nemitz L**, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2019): Rod bipolar cells require horizontal cells for invagination into the terminals of rod photoreceptors. *Front Cell Neurosci* 13, 423
2. **Nemitz L**, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2020): Synaptic remodeling in the cone pathway after early postnatal horizontal cell ablation. (*Front Cell Neurosci*, in Revision)

Weitere Publikation, deren Inhalt nicht in dieser Arbeit thematisiert wird:

3. Tetenborg S, Wang HY, **Nemitz L**, Depping A, Espejo AB, Aseervatham J, Bedford MT, Janssen-Bienhold U, O'Brien J, Dedek K (2020): Phosphorylation of connexin36 near the C-terminus switches binding affinities for PDZ-domain and 14–3–3 proteins in vitro. *Sci Rep* 10, 18379

## **6.2.2 Rod bipolar cells require horizontal cells for invagination into the terminals of rod photoreceptors**

Autoren:

Lena Nemitz<sup>1</sup>, Karin Dedek<sup>2,3</sup>, Ulrike Janssen-Bienhold<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Neurobiologie des Sehens, Department für Neurowissenschaften, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

<sup>2</sup>Neurosensorik, Institut für Biologie und Umweltwissenschaften, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

<sup>3</sup>Forschungszentrum Neurosensorik, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

Autorenbeiträge:

LN, KD und UJB konzipierten die Experimente; UJB führte die DT-Injektionen und Gewebepreparation durch; LN führte die Immunhistochemie, Bildaufnahmen, Elektronenmikroskopie, Quantifizierung und statistische Analyse durch; alle Autoren trugen zur Interpretation der Daten bei; LN erstellte die Abbildungen und schrieb einen ersten Entwurf des Manuskripts; KD und UJB überarbeiteten das Manuskript.

Veröffentlicht in:

Frontiers in Cellular Neuroscience



# Rod Bipolar Cells Require Horizontal Cells for Invagination Into the Terminals of Rod Photoreceptors

Lena Nemitz<sup>1</sup>, Karin Dedek<sup>2,3</sup> and Ulrike Janssen-Bienhold<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Visual Neuroscience, Department of Neuroscience, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany, <sup>2</sup> Animal Navigation/Neurosensorys, Institute for Biology and Environmental Sciences, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany, <sup>3</sup> Research Center Neurosensory Science, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Dirk Feldmeyer,  
Jülich Research Centre, Germany

### Reviewed by:

Frank Schmitz,  
Saarland University, Germany  
Tobias Moser,  
University Medical Center Göttingen,  
Germany

Wallace B. Thoreson,  
University of Nebraska Medical  
Center, United States

### \*Correspondence:

Ulrike Janssen-Bienhold  
ulrike.janssen.bienhold@  
uni-oldenburg.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cellular Neurophysiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular Neuroscience

**Received:** 12 June 2019

**Accepted:** 03 September 2019

**Published:** 18 September 2019

### Citation:

Nemitz L, Dedek K and  
Janssen-Bienhold U (2019) Rod  
Bipolar Cells Require Horizontal Cells  
for Invagination Into the Terminals  
of Rod Photoreceptors.  
*Front. Cell. Neurosci.* 13:423.  
doi: 10.3389/fncel.2019.00423

In the central nervous system, neuronal processing relies on the precisely orchestrated formation of synapses during development. The first synapse of the visual system is a triad synapse, comprising photoreceptors, horizontal cells and bipolar cells. During the second postnatal week, the axon terminal processes of horizontal cells invaginate rod spherules, followed by rod bipolar cell dendrites. Both elements finally oppose the synaptic ribbon (the release site of glutamate). However, it has not been fully elucidated whether horizontal cells are essential for rod bipolar cell dendrites to find their way into the rod terminal. In the present study, we investigated this question by specifically ablating horizontal cells from the early postnatal mouse retina. We monitored the formation of the rod-to-rod bipolar cell synapse during retinal maturation until postnatal day 21. Based on quantitative electron microscopy, we found that without horizontal cells, the dendrites of rod bipolar cells never entered rod terminals. Furthermore, rods displayed significantly fewer and shorter presynaptic ribbons, suggesting that glutamate release is decreased, which coincided with significantly reduced expression of postsynaptic proteins (mGluR6, GPR179) in rod bipolar cells. Collectively, our findings uncover that horizontal cells are indeed necessary guideposts for rod bipolar cells. Whether horizontal cells release diffusible guidance cues or provide structural guidance by expressing specific cell adhesion molecules remains to be seen.

**Keywords:** vision, retina, synapse formation, synaptogenesis, ribbon synapse, photoreceptors, horizontal cells, bipolar cells

## INTRODUCTION

The establishment of functional neuronal circuits is crucial for information processing in the central nervous system and requires the formation of precise synaptic connections between different neurons. However, the mechanisms by which specific synapses are assembled are not fully understood.

At the first synapse of the visual system, photoreceptors transfer light information to horizontal cells and bipolar cells. While horizontal cell processes and ON bipolar cell dendrites invaginate into the photoreceptor terminals and form so-called triad synapses, OFF bipolar cells make non-invaginating contacts at the base of the photoreceptor terminal (Haverkamp et al., 2000). In contrast to rod spherules, which are connected to the axon terminals of horizontal cells, cone pedicles are

contacted by horizontal cell dendrites (Peichl and González-Soriano, 1994). The temporal sequence of triad formation is well described in the mouse retina (Blanks et al., 1974; Rich et al., 1997; Sherry et al., 2003). Rod synaptogenesis is initiated at postnatal day 8 (P8) by the invasion of rod terminals into the outer plexiform layer (OPL). The ribbon, an electron-dense structure surrounded by tethered synaptic vesicles, is attached to the rod membrane and the terminal is contacted by a single horizontal process. Beginning at P9, a second horizontal cell process is recruited and both processes invaginate into the terminal, assuming the positions lateral to the presynaptic ribbon. One day later, one or two ON bipolar cell dendrites start to enter the terminal as the central elements of the triad. Cones synaptogenesis follows the same sequence of events but is initiated 3–4 days earlier. Triad formation is complete for rods and cones by eye opening around P14.

Several studies using knock-out mice have identified molecules that play important roles in the assembly of photoreceptor ribbon synapses. The cell adhesion protein ELFN1, which is expressed in rods, interacts transsynaptically with mGluR6, the glutamate receptor subunit of ON bipolar cells, and is essential for the selective wiring of rods and rod bipolar cells (Cao et al., 2015). Furthermore, rod photoreceptors express SynCAM1, which has also been shown to promote the invagination of ON bipolar cell dendrites (Ribic et al., 2014). Another crucial element for synapse formation between photoreceptors and ON bipolar cells is the transsynaptic interaction between the dystroglycan-pikachurin complex of photoreceptors and the orphan receptor GPR179 of ON bipolar cells (Orlandi et al., 2018). Horizontal cells have been reported to express the cell adhesion molecule NGL-2 (Soto et al., 2013, 2018) and the transmembrane semaphorin Sema6A and its receptor PlexinA4 (Matsuoka et al., 2012), which promote horizontal cell invagination into the rod terminal. Moreover, horizontal cells have been shown to help maintaining the triad synapse (Sonntag et al., 2012; Keeley et al., 2013; Wu et al., 2013; Chaya et al., 2017). Two previous studies have attempted to elucidate the role of horizontal cells in the formation of the OPL in the mouse retina. Keeley et al. (2013) revealed that horizontal cells are not essential for the initial targeting of photoreceptor terminals and bipolar cell dendrites to the OPL by using *Lim1* conditional knock-out mice, in which horizontal cells are partially mispositioned to the inner retina. In addition, Wu et al. (2013) reported that photoreceptor terminals of *Ocl* knock-out mice, that lack ~80% of horizontal cells, contained less invaginations and displayed a loss of the classic triadic organization of postsynaptic processes. These defects were already present at P16, shortly after triad formation is completed in wild-type mice, suggesting that horizontal cells might play an important role in the assembly of photoreceptor ribbon synapses. However, it still remains unclear to which extent synaptic contacts between photoreceptors and ON bipolar cells are formed in the absence of horizontal cells, as the removal of horizontal cells from the OPL has never been complete and synapse assembly has never been studied during development.

In the present study, we investigated the role of horizontal cells in the assembly of the rod-to-rod bipolar cell synapse by

specifically ablating horizontal cells from the early postnatal mouse retina via diphtheria toxin receptor (DTR)-mediated cell knock-out. We monitored the formation of the rod synapse in the absence of horizontal cells using quantitative electron microscopy and immunohistochemistry. Our analysis revealed that invaginating (rod) ON bipolar cell dendrites were completely absent from horizontal cell-deficient rod terminals. Furthermore, synaptic ribbon assembly was disrupted and the expression of the postsynaptic proteins mGluR6 and GPR179 at the dendritic tips of rod bipolar cells was strongly reduced. These findings demonstrate that horizontal cells are critical for synapse formation between rods and rod bipolar cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The generation of *Cx57-DTR<sup>fl</sup>Cre* mice has been described previously (Sonntag et al., 2012). *Cx57-DTR<sup>fl</sup>Cre* mice can be obtained from the European Mouse Mutant Archive. Animals were housed on a 12 h light/dark cycle with water and food ad libitum. For the experiments, mice of either sex were used. All procedures were performed in accordance with the law on animal protection (*Tierschutzgesetz*) issued by the German Federal Government and approved by the local animal welfare committee (*Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*).

### DT Injections

Control (*Cx57<sup>+/+</sup>*) and *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice were injected intraperitoneally with 12.5 to 20 ng diphtheria toxin (DT, Sigma) at P4 and P5.

### Tissue Preparation

Mice were killed by decapitation (P8, P11) or deeply anesthetized with CO<sub>2</sub> and killed by cervical dislocation (P15, P21). DT treatment did not affect eye opening around P14 of *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice. Eyes were enucleated and cornea, lens and vitreous body were removed in physiological phosphate buffered saline (pH 7.4). For immunohistochemistry, dissected eyecups were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) and 3% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) for 20 min at room temperature (RT). For electron microscopy, retinae were isolated from the eyecups and fixed in 1% PFA, 3% sucrose and 2.5% glutaraldehyde in 0.05 M PB overnight at 4°C, washed in 0.1 M PB (3 × 30 min) and post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M PB for 1 h at RT.

### Immunohistochemistry and Image Acquisition

After fixation, eyecups of *Cx57<sup>+/+</sup>* ( $n = 3-6$  for each developmental stage) and *Cx57<sup>+/DTR</sup>* ( $n = 3-6$  for each developmental stage) mice were washed in 0.1 M PB (3 × 10 min) and cryoprotected with 30% sucrose in 0.1 M PB overnight at 4°C. The following day, tissue was embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek) and sectioned vertically at

**TABLE 1** | List of primary antibodies used in this study.

Antibody	Host, type	Dilution	Source, Catalog #, RRID
Calbindin D-28k	Rabbit, polyclonal	1:500	Swant, CB-38, AB_2721225
Cone arrestin	Rabbit, polyclonal	1:1,000	Millipore, AB15282, AB_1163387
CtBP2	Mouse, monoclonal	1:5,000	BD Biosciences, 612044, AB_399431
Dihydropyridine-sensitive calcium channel $\alpha 1$ subunit	Mouse, monoclonal	1:500	Millipore, MAB427, AB_2069582
mGluR6	Sheep, polyclonal	1:100	Gift from Kirill A. Martemyanov (Cao et al., 2011)
PKC $\alpha$	Goat, polyclonal	1:500	R&D Systems, AF5340, AB_2168552
PKC $\alpha$	Mouse, monoclonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology, sc-80, AB_628141
PSD-95	Mouse, monoclonal	1:5,000	NeuroMab, 75-028, AB_2307331

20  $\mu\text{m}$  using a Leica CM1860 cryostat. Cryosections were blocked with 5% ChemiBLOCKER (Millipore), 0.3% Triton X-100 and 0.02%  $\text{NaN}_3$  in 0.1 M PB for 1 h at RT and incubated with primary antibodies in blocking solution overnight at 4°C. A list of primary antibodies is given in **Table 1**. After washing in 0.1 M PB (3  $\times$  10 min), sections were incubated with secondary antibodies in blocking solution for 2 h at RT, washed again in 0.1 M PB (3  $\times$  10 min) and mounted in Vectashield (Vector Laboratories). Secondary antibodies used were from donkey or goat and conjugated to either Alexa 488 or Alexa 568 (1:600, Thermo Fisher Scientific).

Images were acquired using a Leica TCS SP8 confocal laser scanning microscope. Scanning was performed with an HC PL APO CS2 63 $\times$ /1.4 oil objective at a resolution of 1024  $\times$  1024 pixels and a z-axis increment of 0.2  $\mu\text{m}$ . Maximum projections of collapsed confocal stacks are shown. Brightness and contrast were adjusted using Fiji (Schindelin et al., 2012).

## Electron Microscopy

Fixed retinæ were washed in 0.1 M PB (3  $\times$  10 min), dehydrated in a series of 50 to 100% acetone and incubated in a 1:1 mixture of acetone and Agar 100 Resin (Agar Scientific) for 1 h at RT. After incubation in pure Agar 100 Resin overnight at RT, embedding medium was hardened for 48 h at 60°C. Embedded retinæ were cut using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome. Semithin sections (0.5  $\mu\text{m}$  thickness) were collected on slides, stained with 2% toluidine blue and 0.5% sodium borate in double-distilled water and examined with a Leica DM6 microscope. Ultrathin sections (90 nm thickness) were collected on copper grids and analyzed using a Zeiss EM 902A electron microscope. Electron micrographs were adjusted in brightness and contrast using Adobe Photoshop CS6 Extended (Adobe Systems).

## Quantification and Statistical Analysis

To quantify the OPL thickness in toluidine blue-stained semithin sections of  $Cx57^{+/+}$  ( $n = 3$  for P8,  $n = 4$  for P11,  $n = 5$  for P15,  $n = 3$  for P21) and  $Cx57^{+/DTR}$  ( $n = 3$  for P8,  $n = 4$  for P11,  $n = 3$  for P15,  $n = 2$  for P21) retinæ, we measured the distance from outer nuclear layer (ONL) to inner nuclear layer (INL) somata at 10 locations per animal using the line tool in Fiji. For comparison of rod synaptogenesis in  $Cx57^{+/+}$  ( $n = 4$  for P11,  $n = 3$  for P15) and  $Cx57^{+/DTR}$  mice ( $n = 4$  for P11,  $n = 5$  for P15), we analyzed between 746 and 1177 rod terminal profiles for each genotype

and developmental stage and classified them into four categories: (1) empty terminals (profiles without invaginations), (2) monads (profiles with one invaginating horizontal cell process), (3) dyads (profiles with two invaginating horizontal cell processes) and (4) triads (profiles with at least one invaginating ON bipolar cell dendrite). Rod terminal profiles that could not be clearly assigned to one of these groups were categorized as unclassified. To compare the frequency of rod terminals with and without ribbons between genotypes, the same set of rod terminal profiles was analyzed. For the quantification of ribbon sizes in wild-type ( $n = 3$ ) and horizontal cell-ablated ( $n = 5$ ) retinæ at P15, we measured the length of 30 ribbons per animal using the line tool in Fiji. To compare mGluR6- and GPR179-positive puncta between  $Cx57^{+/+}$  ( $n = 3$ ) and  $Cx57^{+/DTR}$  ( $n = 5$ ) mice at P15, confocal stacks were deconvolved with a theoretical point spread function using Huygens Essential deconvolution software (SVI) and further processed in Fiji. Background-subtracted single scans were used for the analysis. Intensity thresholds were set manually and kept constant for both experimental groups. Number and average size of puncta were determined for 9 regions of interest (46.08  $\times$  25.25  $\mu\text{m}^2$ , covering the OPL and proximal ONL) per animal using the *Analyze particles* function in Fiji. Particles <0.81 and >22.50  $\mu\text{m}^2$  were excluded from the analysis to prevent the inclusion of noise and stained blood vessels.

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). A  $p$  value <0.05 was considered statistically significant. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

To compare OPL thickness, ribbon length and the number and average size of mGluR6- and GPR179-positive puncta between  $Cx57^{+/+}$  and  $Cx57^{+/DTR}$  mice, Wilcoxon rank sum test was used. Differences in rod synaptogenesis stages and frequencies of ribbons in rod terminals were analyzed using  $\chi^2$  test and Fisher's exact test, respectively.

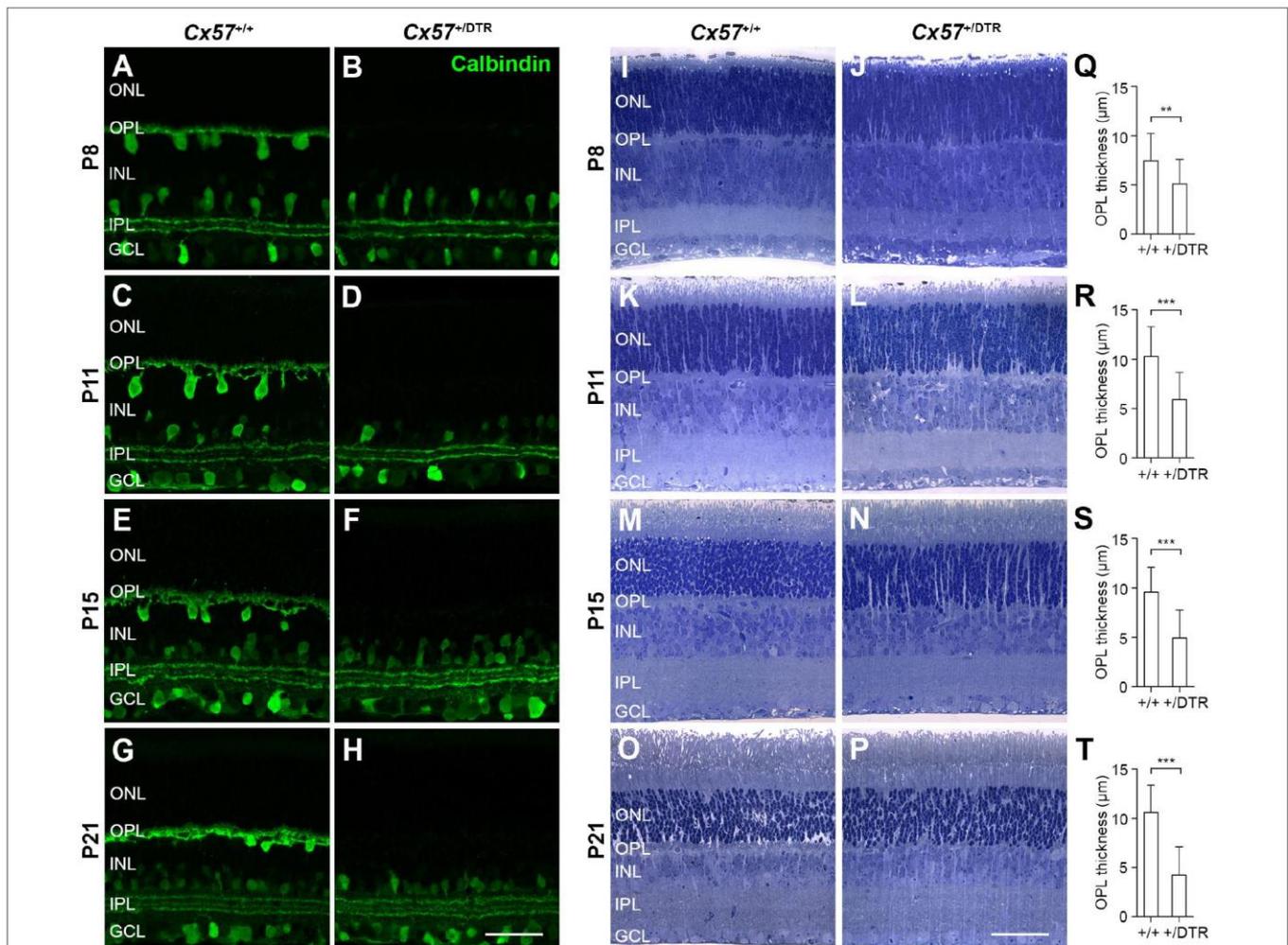
## RESULTS

### Early Postnatal Horizontal Cell Ablation Causes Defects in the Development of the OPL

Previous attempts to ablate horizontal cells during retinal development by intravitreal injection of kainic acid at the

day of birth (Messersmith and Redburn, 1990) and oncogene expression under the control of the phenylethanolamine *N*-methyltransferase promoter (Hammang et al., 1993; Peachey et al., 1997) were not cell class-specific and the elimination of horizontal cells from the OPL by knock-out of *Lim1* (Poche et al., 2007; Keeley et al., 2013) and *Oc1* (Wu et al., 2013) did not affect the whole horizontal cell population. In the rabbit retina, the ablation of horizontal cells alters the segregation of retinal cells into distinct laminae and increases the rod-to-cone ratio (Messersmith and Redburn, 1990). To minimize any potential impact of horizontal cell ablation on retinal lamination and cell differentiation, we here ablated horizontal cells after they had migrated to their final position in the distal part of the inner nuclear layer but immediately before their axon terminal processes invaginate into the rod terminal.

For the ablation, we used *Cx57-DTR<sup>fl</sup>Cre* mice (Sonntag et al., 2012) that express the primate DTR under the control of the horizontal cell-specific connexin57 (*Cx57*) promoter and intraperitoneally administered diphtheria toxin (DT) at postnatal day 4 (P4) and P5. To verify the loss of horizontal cells, we labeled retinal cryosections with an antibody against the horizontal cell marker calbindin (Haverkamp and Wässle, 2000). Calbindin immunoreactivity was drastically reduced in horizontal cells at P8 (Figure 1B) and completely absent from the outer retina from P11 onward (Figures 1D,F,H), indicating that the entire cell class was successfully ablated. The gross morphology of calbindin-positive amacrine and ganglion cells was comparable to that in the control (Figures 1A–H), demonstrating that the ablation is specific and restricted to horizontal cells.



**FIGURE 1** | Eliminating horizontal cells during early postnatal development results in defective formation of the OPL. **(A–H)** Retinal cryosections of DT-injected *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice were stained for calbindin, a horizontal cell marker. In *Cx57<sup>+/DTR</sup>* retinæ, calbindin labeling of horizontal cells was strongly reduced at P8 **(B)** and completely missing as early as P11 **(D,F,H)**. The gross morphology of calbindin-immunoreactive amacrine and ganglion cells was unaltered. **(I–P)** Toluidine blue staining of retinal semithin sections from *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice. The OPL of horizontal cell-ablated retinæ was markedly thinner from P8 to P21 compared to wild-type retinæ. The thickness of all other retinal layers was similar for both genotypes. **(Q–T)** Quantification of OPL thickness in *Cx57<sup>+/+</sup>* ( $n = 3$  for P8,  $n = 4$  for P11,  $n = 5$  for P15,  $n = 3$  for P21) and *Cx57<sup>+/DTR</sup>* ( $n = 3$  for P8,  $n = 4$  for P11,  $n = 3$  for P15,  $n = 2$  for P21) mice.  $p < 0.01$  (P8),  $p < 0.0001$  (P11, P15, P21), Wilcoxon rank sum test. Values are presented as mean  $\pm$  SD.  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ . Scale bars, 50  $\mu$ m.

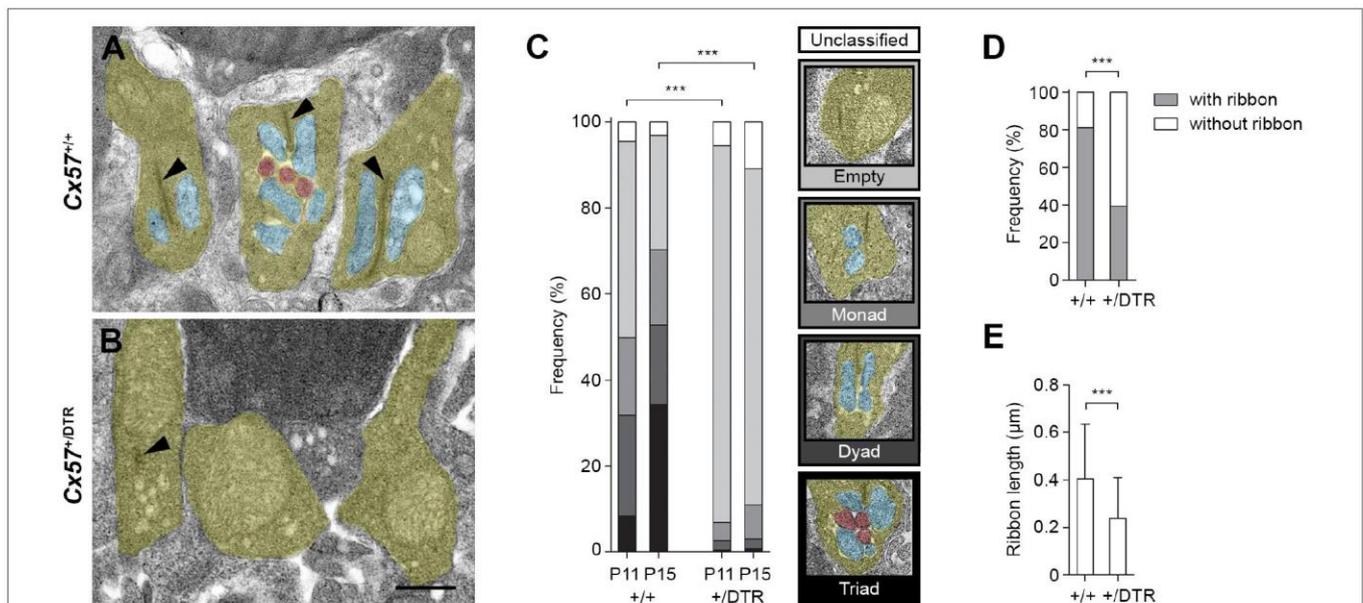
To investigate the effects of early postnatal horizontal cell ablation on the development of the overall morphology of the retina, we stained retinal semithin sections of DT-injected *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice with toluidine blue (Figures II–P). Compared with wild-type retinæ, horizontal cell-ablated retinæ showed a significant reduction in the thickness of the OPL between P8 and P21 (Figures 1Q–T; P8:  $p < 0.01$ ; P11, P15, P21:  $p < 0.0001$ , Wilcoxon rank sum test), suggesting that the assembly of this layer, which contains the synapses between photoreceptors, horizontal cells and bipolar cells, is defective. By contrast, all other retinal layers were similar in thickness (Figures II–P) and labeling for Müller cells with glutamate synthetase did not show any gross differences (Supplementary Figure S1).

## Horizontal Cells Are Required for ON Bipolar Cell Invagination in Rods

To study the role of horizontal cells in the formation of rod synapses, we examined individual rod terminal profiles in the OPL of *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice by electron microscopy and classified them according to their developmental stage into (1) empty terminals (profiles without invaginations), (2) monads (profiles with one invaginating horizontal cell process), (3) dyads (profiles with two invaginating horizontal cell processes) and (4) triads (profiles with at least one invaginating ON bipolar cell

dendrite). For the analysis, two different time points were chosen: P11 (one day after the beginning of triad formation) and P15 (one day after triad formation is complete).

The electron microscopic examination revealed that at P11, the majority of rod terminal profiles from *Cx57<sup>+/+</sup>* mice were empty. A substantial portion had invaginations from either one or two horizontal cell processes and only very few terminals already displayed the classic triad configuration at this time point (Figure 2C; 46% empty, 18% monads, 23% dyads, 8% triads, 5% unclassified, analysis of 849 rod terminal profiles from  $n = 4$  mice). By P15, most of the rod terminal profiles in controls contained triads and the percentage of empty terminals was decreased compared to P11, as expected (Figures 2A,C; 27% empty, 18% monads, 18% dyads, 34% triads, 3% unclassified, analysis of 746 rod terminal profiles from  $n = 3$  mice). In contrast, in *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice, the vast majority of rod terminal profiles did not show any invaginations at either developmental stage. Occasionally, we observed profiles containing remnants from horizontal cells. However, invaginating ON bipolar cell dendrites were found at a very low frequency and only in terminals with horizontal cell leftovers (Figures 2B,C; P11: 88% empty, 4% monads, 2% dyads, <1% triads, 6% unclassified, analysis of 824 rod terminal profiles from  $n = 4$  mice; P15: 78% empty, 8% monads, 2% dyads, <1% triads, 11% unclassified, analysis of 1177 rod terminal profiles from  $n = 5$  mice). The distribution of rod synaptogenesis stages was significantly different between



**FIGURE 2 |** Rod terminals of horizontal cell-ablated mice lack ON bipolar cell invaginations. (A,B) Representative electron micrographs of rod terminals from *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice at P15. Rod terminal profiles (yellow) in wild-type retinæ showed large presynaptic ribbons (arrowheads) and invaginations from horizontal cells (blue) and ON bipolar cells (red) (A). In contrast, rod terminal profiles in horizontal cell-ablated retinæ typically lacked any invaginations. Synaptic ribbons were absent or shorter (arrowhead) (B). (C) Quantification of rod synaptogenesis stages in *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice at P11 and P15. Between 746 and 1177 rod terminal profiles from wild-type ( $n = 4$  for P11 and  $n = 3$  for P15) and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice ( $n = 4$  for P11,  $n = 5$  for P15) were analyzed for each age. Rod terminal profiles without invaginations were designated as empty, rod terminal profiles with one or two horizontal cell process were designated as monads or dyads, respectively, and rod terminal profiles containing at least one invaginating ON bipolar cell dendrite were designated as triads.  $p < 0.0001$ ,  $\chi^2$  test. (D) Frequencies of rod terminal profiles with and without ribbons in wild-type ( $n = 3$ ) and horizontal cell-ablated ( $n = 5$ ) retinæ.  $p < 0.0001$ , Fisher's exact test. (E) Quantification of ribbon lengths in *Cx57<sup>+/+</sup>* ( $n = 3$ ) and *Cx57<sup>+DTR</sup>* ( $n = 5$ ) mice.  $p < 0.0001$ , Wilcoxon rank sum test. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p < 0.001$ . Scale bar, 500  $\mu$ m.

*Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice (P11, P15:  $p < 0.0001$ ,  $\chi^2$  test). As we never found a rod terminal profile containing only ON bipolar dendrites (but no remnants of horizontal cells) at any age, our data strongly indicates that horizontal cells are indispensable for rod bipolar cells to invaginate into rod terminals.

In addition to the lack of invaginating contacts, rod terminal profiles of horizontal cell-ablated mice displayed less presynaptic ribbons at P15 (Figures 2A,B,D; *Cx57<sup>+/+</sup>*: 81% with ribbons, 19% without ribbons, analysis of 746 rod terminal profiles from  $n = 3$  mice; *Cx57<sup>+DTR</sup>*: 39% with ribbons, 61% without ribbons, analysis of 1177 rod terminal profiles from  $n = 5$  mice;  $p < 0.0001$ , Fisher's exact test). If present, ribbons in *Cx57<sup>+DTR</sup>* retinae were significantly shorter compared to ribbons in wild-type retinae (Figures 2A,B,E; *Cx57<sup>+/+</sup>*:  $0.40 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ,  $n = 3$ ; *Cx57<sup>+DTR</sup>*:  $0.24 \pm 0.17 \mu\text{m}$ ,  $n = 5$ ;  $p < 0.0001$ , Wilcoxon rank sum test).

## Horizontal Cell-Ablated Mice Display a Retraction of Rod Terminals and Disrupted Ribbon Assembly

The low OPL thickness in *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice (Figures 1J,L,N,P) points to a reduced number of photoreceptor terminals within this layer. To examine their localization in the retina, we stained photoreceptor terminals and cone photoreceptors in *Cx57<sup>+/+</sup>* (Figures 3A–D) and *Cx57<sup>+DTR</sup>* retinae (Figures 3E–H) with antibodies specific for PSD-95 and cone arrestin, respectively, which allowed us to discriminate between rod and cone terminals. At P8, rod spherules were already present in the OPL of *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice (Figure 3E), growing in number until P11 (Figure 3F). This finding is in line with previous studies reporting that horizontal cells are not necessary for targeting of rod terminals to the OPL (Messersmith and Redburn, 1990; Keeley et al., 2013). In addition, we observed an increase in ectopic rod spherules in the ONL between P11 and P21 (Figures 3F–H, arrowheads), demonstrating that rods retract their axon terminals following early postnatal horizontal cell ablation. By contrast, cone terminals generally remained in the OPL (Figures 3E–H).

During photoreceptor synaptogenesis, ribbons are assembled from non-membranous precursor spheres (Regus-Leidig et al., 2009). Our ultrastructural analysis showed that synaptic ribbons were either absent from rod terminals in horizontal cell-ablated mice or shorter when compared to controls (Figures 2B,D,E, arrowhead). To confirm this finding, we labeled retinal sections from *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice for CtBP2, a ribbon marker, and cone arrestin, which enabled us to distinguish between ribbons of rods and cones. In wild-type retinae, CtBP2 immunolabeling was almost completely confined to the OPL (Figures 3I–L), whereas in horizontal cell-ablated retinae, we frequently found ectopic CtBP2-positive structures in the ONL (Figures 3M–P, arrowheads), in agreement with the retraction of rod terminals we observed. The typical horseshoe shape of the ribbons was clearly visible as early as P15 in the wild-type retina (Figures 3K,K',L). Consistent with the electron microscopic observations, CtBP2 labeling in horizontal cell-ablated mice was rather punctate, even at P15 and P21 (Figures 3O,O',P), suggesting that synaptic ribbon assembly is impaired after

ablation of horizontal cells. This is in line with earlier reports showing that ribbons are missing or shorter in photoreceptor terminals of horizontal cell-deficient mice (Sonntag et al., 2012; Keeley et al., 2013; Wu et al., 2013).

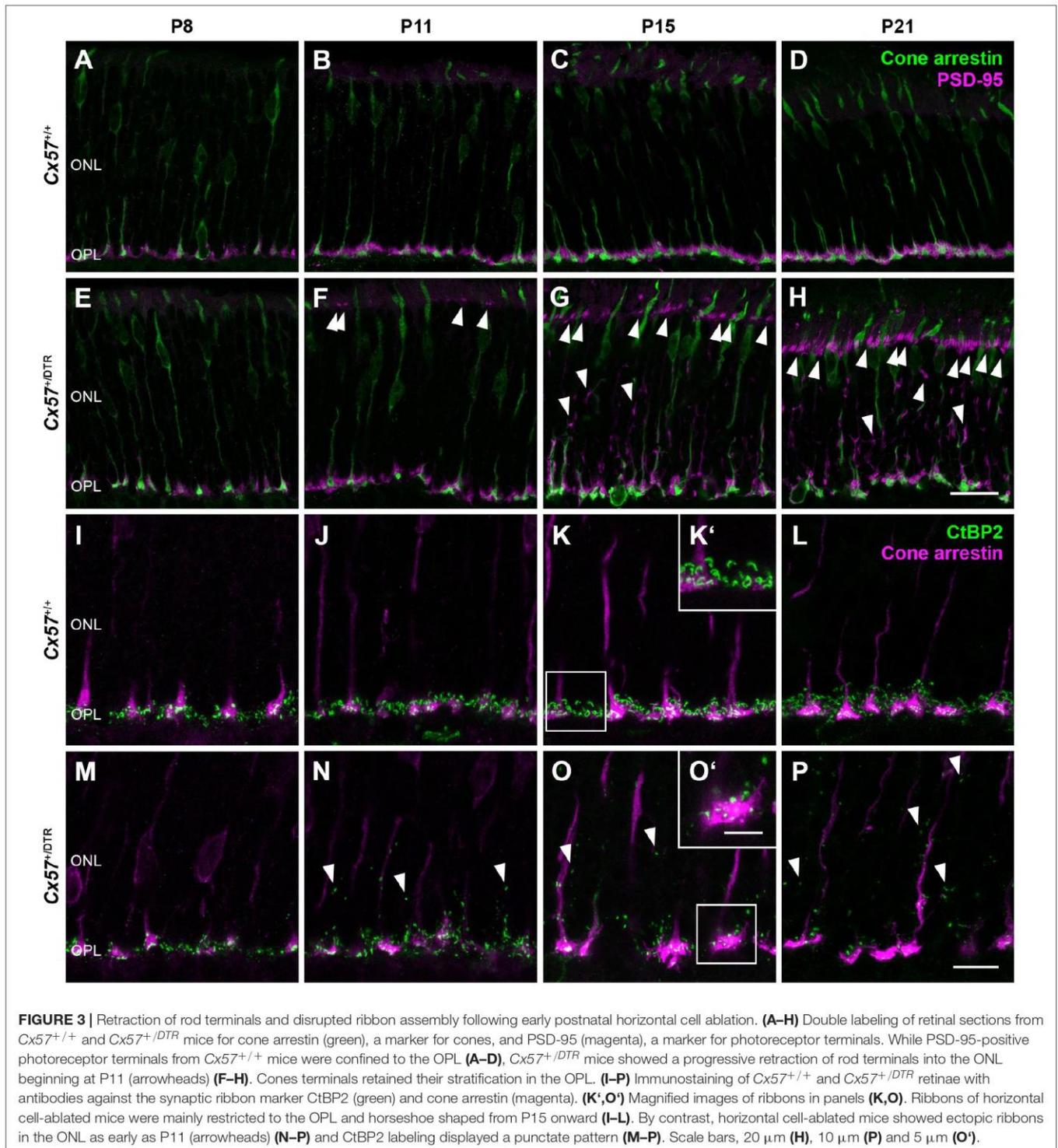
## Recruitment of mGluR6 and GPR179 to the Dendritic Tips of Rod Bipolar Cells Is Impaired in Horizontal Cell-Ablated Mice

To assess changes on the postsynaptic side, we stained rod bipolar cells with an antibody against protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ ) and components of the ON bipolar cell signaling complex with antibodies against the metabotropic glutamate receptor mGluR6 and Ca $_v$ 1.1. The latter cross-reacts with GPR179 (Hasan et al., 2016), a G protein-coupled receptor serving as a membrane anchor for regulators of G-protein signaling (Orlandi et al., 2012). During retinal development, ON bipolar cell dendrites emerge from neuroepithelial-like processes that terminate at the outer limiting membrane (Morgan et al., 2006). By P8, rod bipolar cells from wild-type mice had already established a dendritic network in the OPL and rod bipolar cell dendritic tips were decorated with some mGluR6-immunoreactive puncta (Figure 4A). The number and size of mGluR6-positive puncta increased until the retina reached maturity at P21 (Figures 4A–D). GPR179 immunoreactivity was first detectable in the developing OPL at P15 (Figures 4I–L). Compared to wild-type mice, rod bipolar cell dendrites from *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice were less branched and showed progressive sprouting into the ONL. Furthermore, the expression of mGluR6 and GPR179 in rod bipolar cell processes was greatly reduced throughout development (Figures 4E–H,M–P). We quantified this for P15 and found the number and average size of mGluR6- and GPR179-positive puncta significantly reduced in horizontal cell-ablated mice (Table 2). Thus, our data suggest that postsynaptic targeting of mGluR6 cascade-related elements to the dendritic tips of rod bipolar cells is compromised in the absence of horizontal cells, potentially because glutamatergic input from photoreceptors is impaired.

## DISCUSSION

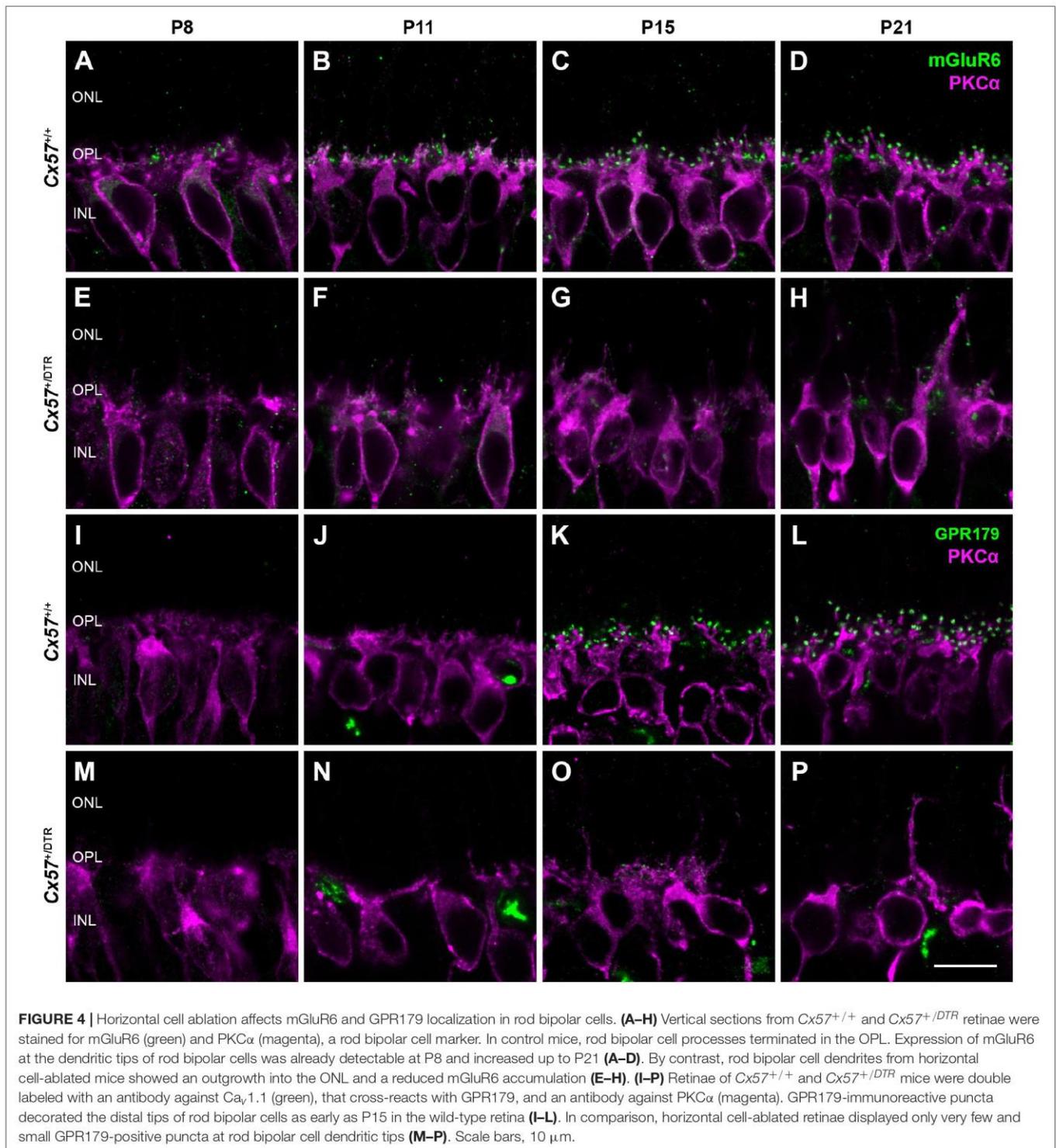
In this study, we investigated the role of horizontal cells in the formation of the rod photoreceptor synapse by ablating horizontal cells from the early postnatal mouse retina. Our immunohistochemical and electron microscopic analysis revealed that in the absence of horizontal cells (1) ON bipolar cells were not able to invaginate into rod terminals, (2) presynaptic ribbon assembly was disrupted and (3) postsynaptic accumulation of mGluR6 signaling complex components in ON bipolar cells was impaired. These results demonstrate that horizontal cells are indispensable for the assembly of the rod-to-rod bipolar cell synapse (Figure 5).

Keeley et al. (2013) investigated the role of horizontal cells in the formation and maintenance of the OPL using *Lim1* conditional knock-out mice, in which horizontal cells are partially mislocalized in the inner retina. Consistent with our results, this study revealed that horizontal cells are not necessary for the initial targeting of photoreceptor terminals and bipolar



cell dendrites to the OPL but for the maintenance of this layer. A study by Wu et al. (2013) showed that the knock-out of the homeodomain transcription factor *Oc1* results in a loss of  $\sim 80\%$  of the horizontal cell population. Comparable to *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice, *Oc1* knock-out mice displayed fewer and shorter ribbons, which were rarely recruited to the plasma membrane. Moreover,

photoreceptor terminals did not show the stereotypic triad organization at P16 and P30. However, some invaginations of postsynaptic processes were present in rod and cone terminals, likely because  $\sim 20\%$  of horizontal cells are still formed in *Oc1* knock-out mice. In addition to that, it has been shown that also long-term removal of horizontal cells from the adult retina leads

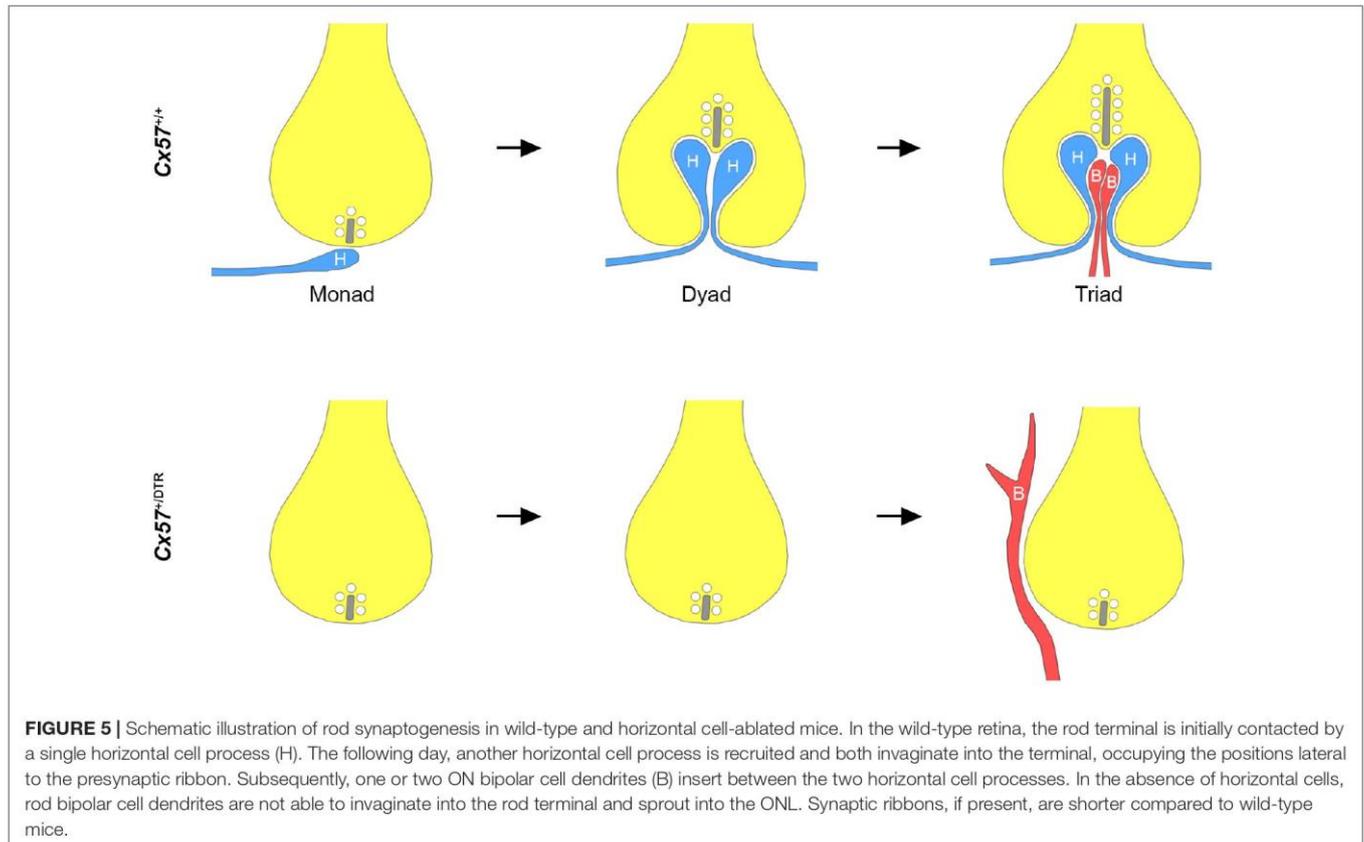


to a disruption of triad synapses and remodeling in the outer retina (Sonntag et al., 2012; Chaya et al., 2017). Thus, horizontal cells are not only essential for the formation (this study), but also for the maintenance of synaptic contacts between rods and rod bipolar cells (Sonntag et al., 2012; Keeley et al., 2013; Wu et al., 2013; Chaya et al., 2017).

But why are rod bipolar cells not able to find their way into the rod terminal in the absence of horizontal cells? We consider three mechanisms by which horizontal cells may contribute to synapse formation between rods and rod bipolar cells. First, horizontal cells may release guidance cues that direct pathfinding of rod bipolar cell dendrites. Earlier studies have shown that glial cells

**TABLE 2** | Quantification of mGluR6- and GPR179-positive puncta in *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice at P15.

	<i>Cx57<sup>+/+</sup></i> (mean ± SD)	<i>Cx57<sup>+DTR</sup></i> (mean ± SD)	<i>p</i> value
Number of mGluR6-positive puncta per 100 $\mu\text{m}$	93.7 ± 25.4	26.14 ± 16.0	<0.0001
Average size of mGluR6-positive puncta (in $\mu\text{m}^2$ )	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.02	<0.0001
Number of GPR179-positive puncta per 100 $\mu\text{m}$	82.9 ± 25.6	36.5 ± 27.5	<0.0001
Average size of GPR179-positive puncta (in $\mu\text{m}^2$ )	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.01	<0.0001



provide attractive and repellent cues and act as guidepost cells and intermediate targets for neurons (reviewed in Chotard and Salecker, 2004). As Müller cells, the most abundant retinal glial cells, are among the last cell types born during neurogenesis (Young, 1985; Rapaport et al., 2004), horizontal cells possibly take over this function of glial cells in the developing retina.

Second, horizontal cells may provide structural guidance for rod bipolar cell dendrites to invaginate into the rod terminal by expressing specific cell adhesion molecules. This hypothesis is supported by the finding that emerging bipolar cell dendrites in and outside the OPL are closely associated with processes from horizontal cells in the first postnatal week (Morgan et al., 2006). Moreover, it has been reported that rod bipolar cell dendrites grow along and co-fasciculate with sprouting horizontal cell processes in *CNGA3/CNGB1* double knock-out (Michalakakis et al., 2013) and bassoon mutant mice (Specht et al., 2009). In horizontal cells, only a few cell adhesion molecules have been identified so far. *NGL-2* localizes to horizontal cell axons, directs their laminar targeting and promotes synapse formation

between rods and horizontal cells (Soto et al., 2013, 2018). However, in *NGL-2*-deficient mice, photoreceptor terminals and bipolar cell dendrites stratify normally and photoreceptor ribbon synapses are formed, albeit at a lower frequency (Soto et al., 2013), indicating that this molecule is not responsible for the developmental defects we observed in horizontal cell-ablated mice. In addition, *N-cadherin* has been shown to be important for horizontal cell dendrite morphogenesis and synapse formation in the chicken retina (Tanabe et al., 2006) but it remains to be tested whether *N-cadherin* also plays a role in synaptogenesis in the mouse retina. Apart from that, it is possible that horizontal cells influence the expression of cell adhesion or extracellular matrix proteins in rod photoreceptors, such as *ELFN1* (Cao et al., 2015), *SynCAM1* (Ribic et al., 2014) or the dystroglycan-pikachurin complex (Sato et al., 2008; Omori et al., 2012; Orlandi et al., 2018), that promote the invagination of rod bipolar cells.

Third, disturbed neurotransmission in the outer retina may impede synapse formation between rods and rod bipolar cells in horizontal cell-ablated mice. Horizontal cells receive

glutamatergic input from photoreceptors and provide feedback signals to photoreceptors (Mangel, 1991; Wu, 1991; Thoreson et al., 2008; Jackman et al., 2011) and feedforward signals to bipolar cells (Yang and Wu, 1991; Fahey and Burkhardt, 2003). Different mechanisms have been proposed for horizontal cell feedback: hemichannel-mediated ephaptic feedback (Kamermans, 2001), pH-mediated feedback (Hirasawa and Kaneko, 2003), GABA-mediated feedback (Wu, 1992) and a combination of all three (Kemmler et al., 2014). Feedforward signaling to bipolar cells possibly involves GABA (Puller et al., 2014). Several studies have reported that neurotransmission is important for the maturation and maintenance of photoreceptor ribbon synapses. Similar to horizontal cell ablation, mutations in presynaptic proteins such as bassoon (Dick et al., 2003; Specht et al., 2009), CAST (tom Dieck et al., 2012), CaBP4 (Haeseleer et al., 2004), Ca<sub>v</sub>1.4 (Mansergh et al., 2005; Chang et al., 2006; Bayley and Morgans, 2007; Liu et al., 2013; Zabouri and Haverkamp, 2013) and CNGA3/CNGB1 (Michalakakis et al., 2013) that regulate glutamate release from photoreceptors cause a loss of synaptic contacts in the OPL, a retraction of rod terminals and sprouting of horizontal and bipolar cell processes. This may be caused by a lack of synaptic transmission and/or lack of horizontal cell signals. However, when the light-dependent modulation of feedback and feedforward signals from horizontal cells is abolished, this has no effects on the structure of the rod-to-rod bipolar cell synapse (Ströh et al., 2018). Also, the elimination of GABA synthesis in horizontal cells does not prevent the assembly of photoreceptor ribbon synapses (Schubert et al., 2010), arguing against a direct involvement of horizontal cell signaling in synapse formation or maintenance.

Whether horizontal cells are not only essential for rod synapse formation, but also for cone synapse formation remains to be seen. As cone synaptogenesis is initiated 3–4 days prior to rod synaptogenesis (Rich et al., 1997; Sherry et al., 2003) (at the same time we induced the horizontal cell ablation by DT injections), our approach is not suitable to investigate the assembly of the cone-to-ON bipolar cell synapse in the absence of horizontal cells. In contrast to rod spherules, which are invaginated by the axon terminals of horizontal cells, cone pedicles are invaginated by horizontal cell dendrites (Peichl and González-Soriano, 1994). Thus, synapse assembly might be differently regulated for both photoreceptor types. However, ribbon structures and postsynaptic recruitment of mGluR6 signaling complex components seemed equally affected in the rod and cone pathway, suggesting that horizontal cells may also be critical for cone synapse formation.

Although further investigations are needed to identify the underlying mechanism, our study demonstrates that horizontal

cells are essential for presynaptic photoreceptor maturation, invagination of rod bipolar cells into rods and postsynaptic recruitment of ON bipolar cell signaling components in the outer retina.

## DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

## ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

UJ-B performed DT injections and tissue preparation. LN performed immunohistochemistry, image acquisition, electron microscopy, quantification and statistical analysis, prepared the figures, and wrote a first draft of the manuscript. All authors designed the experiments and contributed to the interpretation of data. KD and UJ-B revised the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant DE1154/3-1 to KD and UJ-B, and Research Training Group 1885/1-2 stipend to LN).

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Bettina Kewitz for excellent technical assistance. We also thank Kirill A. Martemyanov for the kind gift of the mGluR6 antibody.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00423/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Bayley, P. R., and Morgans, C. W. (2007). Rod bipolar cells and horizontal cells form displaced synaptic contacts with rods in the outer nuclear layer of the nob2 retina. *J. Comp. Neurol.* 500, 286–298. doi: 10.1002/cne.21188
- Blanks, J. C., Adinolfi, A. M., and Lolley, R. N. (1974). Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 156, 81–93. doi: 10.1002/cne.901560107

- Cao, Y., Posokhova, E., and Martemyanov, K. A. (2011). TRPM1 forms complexes with nyctalopin in vivo and accumulates in postsynaptic compartment of on-bipolar neurons in mGluR6-dependent manner. *J. Neurosci.* 31, 11521–11526. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1682-11.2011
- Cao, Y., Sarria, I., Fehlhaber, K. E., Kamasawa, N., Orlandi, C., James, K. N., et al. (2015). Mechanism for selective synaptic wiring of rod photoreceptors into the retinal circuitry and its role in vision. *Neuron* 87, 1248–1260. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.002

- Chang, B., Heckenlively, J. R., Bayley, P. R., Brecha, N. C., Davisson, M. T., Hawes, N. L., et al. (2006). The nob2 mouse, a null mutation in *Cacna1f*: anatomical and functional abnormalities in the outer retina and their consequences on ganglion cell visual responses. *Vis. Neurosci.* 23, 11–24. doi: 10.1017/S095252380623102X
- Chaya, T., Matsumoto, A., Sugita, Y., Watanabe, S., Kuwahara, R., Tachibana, M., et al. (2017). Versatile functional roles of horizontal cells in the retinal circuit. *Sci. Rep.* 7:5540. doi: 10.1038/s41598-017-05543-2
- Chotard, C., and Salecker, I. (2004). Neurons and glia: team players in axon guidance. *Trends Neurosci.* 27, 655–661. doi: 10.1016/j.tins.2004.09.001
- Dick, O., tom Dieck, S., Altmann, W. D., Ammermüller, J., Weiler, R., Garner, C. C., et al. (2003). The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37, 775–786. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00086-2
- Fahey, P. K., and Burkhardt, D. A. (2003). Center-surround organization in bipolar cells: symmetry for opposing contrasts. *Vis. Neurosci.* 20, 1–10. doi: 10.1017/S0952523803201012
- Haeseleer, F., Imanishi, Y., Maeda, T., Possin, D. E., Maeda, A., Lee, A., et al. (2004). Essential role of Ca<sup>2+</sup>-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function. *Nat. Neurosci.* 7, 1079–1087. doi: 10.1038/nn1320
- Hammang, J. P., Behringer, R. R., Baetge, E. E., Palmiter, R. D., and Messing, A. (1993). Oncogene expression in retinal horizontal cells of transgenic mice results in a cascade of neurodegeneration. *Neuron* 10, 1197–1209. doi: 10.1016/0896-6273(93)90067-2
- Hasan, N., Ray, T. A., and Gregg, R. G. (2016). CACNA1S expression in mouse retina: novel isoforms and antibody cross-reactivity with GPR179. *Vis. Neurosci.* 33:E009. doi: 10.1017/S0952523816000055
- Haverkamp, S., Grünert, U., and Wässle, H. (2000). The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron* 27, 85–95. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00011-8
- Haverkamp, S., and Wässle, H. (2000). Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 424, 1–23. doi: 10.1002/1096-9861(20000814)424:1<1::aid-cne1>3.3.co;2-m
- Hirasawa, H., and Kaneko, A. (2003). pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* 122, 657–671. doi: 10.1085/jgp.200308863
- Jackman, S. L., Babai, N., Chambers, J. J., Thoreson, W. B., and Kramer, R. H. (2011). A positive feedback synapse from retinal horizontal cells to cone photoreceptors. *PLoS Biol.* 9:e1001057. doi: 10.1371/journal.pbio.1001057
- Kamermans, M. (2001). Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* 292, 1178–1180. doi: 10.1126/science.1060101
- Keeley, P. W., Luna, G., Fariss, R. N., Skyles, K. A., Madsen, N. R., Raven, M. A., et al. (2013). Development and plasticity of outer retinal circuitry following genetic removal of horizontal cells. *J. Neurosci.* 33, 17847–17862. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1373-13.2013
- Kemmler, R., Schultz, K., Dedek, K., Euler, T., and Schubert, T. (2014). Differential regulation of cone calcium signals by different horizontal cell feedback mechanisms in the mouse retina. *J. Neurosci.* 34, 11826–11843. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0272-14.2014
- Liu, X., Kerov, V., Haeseleer, F., Majumder, A., Artemyev, N., Baker, S. A., et al. (2013). Dysregulation of Ca<sup>v</sup> 1.4 channels disrupts the maturation of photoreceptor synaptic ribbons in congenital stationary night blindness type 2. *Channels* 7, 514–523. doi: 10.4161/chan.26376
- Mangel, S. C. (1991). Analysis of the horizontal cell contribution to the receptive field surround of ganglion cells in the rabbit retina. *J. Physiol.* 442, 211–234. doi: 10.1113/jphysiol.1991.sp018790
- Mansergh, F., Orton, N. C., Vessey, J. P., Lalonde, M. R., Stell, W. K., Tremblay, F., et al. (2005). Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic transmission and cellular organization in mouse retina. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3035–3046. doi: 10.1093/hmg/ddi336
- Matsuoka, R. L., Jiang, Z., Samuels, I. S., Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Sun, L. O., Peachey, N. S., et al. (2012). Guidance-cue control of horizontal cell morphology, lamination, and synapse formation in the mammalian outer retina. *J. Neurosci.* 32, 6859–6868. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0267-12.2012
- Messersmith, E. K., and Redburn, D. A. (1990). Kainic acid lesioning alters development of the outer plexiform layer in neonatal rabbit retina. *Int. J. Dev. Neurosci.* 8, 447–461. doi: 10.1016/0736-5748(90)90077-F
- Michalakakis, S., Schäferhoff, K., Spiwocks-Becker, I., Zabouri, N., Koch, S., Koch, F., et al. (2013). Characterization of neurite outgrowth and ectopic synaptogenesis in response to photoreceptor dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1831–1847. doi: 10.1007/s00018-012-1230-z
- Morgan, J. L., Dhingra, A., Vardi, N., and Wong, R. O. L. (2006). Axons and dendrites originate from neuroepithelial-like processes of retinal bipolar cells. *Nat. Neurosci.* 9, 85–92. doi: 10.1038/nn1615
- Omori, Y., Araki, F., Chaya, T., Kajimura, N., Irie, S., Terada, K., et al. (2012). Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J. Neurosci.* 32, 6126–6137. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0322-12.2012
- Orlandi, C., Omori, Y., Wang, Y., Cao, Y., Ueno, A., Roux, M. J., et al. (2018). Transsynaptic Binding of orphan receptor GPR179 to dystroglycan-pikachurin complex is essential for the synaptic organization of photoreceptors. *Cell Rep.* 25, 130–145. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.068
- Orlandi, C., Posokhova, E., Masuho, I., Ray, T. A., Hasan, N., Gregg, R. G., et al. (2012). GPR158/179 regulate G protein signaling by controlling localization and activity of the RGS7 complexes. *J. Cell Biol.* 197, 711–719. doi: 10.1083/jcb.201202123
- Peachey, N. S., Roveri, L., and McCall, M. A. (1997). Functional consequences of oncogen-induced horizontal cell degeneration in the retinas of transgenic mice. *Vis. Neurosci.* 144, 627–632. doi: 10.1017/s0952523800012591
- Peichl, L., and González-Soriano, J. (1994). Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Vis. Neurosci.* 11, 501–517. doi: 10.1017/s095252380000242x
- Poche, R. A., Kwan, K. M., Raven, M. A., Furuta, Y., Reese, B. E., and Behringer, R. R. (2007). Lim1 is essential for the correct laminar positioning of retinal horizontal cells. *J. Neurosci.* 27, 14099–14107. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4046-07.2007
- Puller, C., Haverkamp, S., Neitz, M., and Neitz, J. (2014). Synaptic elements for GABAergic feed-forward signaling between HII horizontal cells and blue cone bipolar cells are enriched beneath primate S-cones. *PLoS One* 9:e88963. doi: 10.1371/journal.pone.0088963
- Rapaport, D. H., Wong, L. L., Wood, E. D., Yasumura, D., and LaVail, M. M. (2004). Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 474, 304–324. doi: 10.1002/cne.20134
- Regus-Leidig, H., tom Dieck, S., Specht, D., Meyer, L., and Brandstätter, J. H. (2009). Early steps in the assembly of photoreceptor ribbon synapses in the mouse retina: the involvement of precursor spheres. *J. Comp. Neurol.* 512, 814–824. doi: 10.1002/cne.21915
- Ribic, A., Liu, X., Crair, M. C., and Biederer, T. (2014). Structural organization and function of mouse photoreceptor ribbon synapses involve the immunoglobulin protein synaptic cell adhesion molecule 1: SynCAM 1 organizes ribbon synapses. *J. Comp. Neurol.* 522, 900–920. doi: 10.1002/cne.23452
- Rich, K. A., Zhan, Y., and Blanks, J. C. (1997). Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors in the developing mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 388, 47–63. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19971110)388:1<47::aid-cne4>3.3.co;2-h
- Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., et al. (2008). Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.* 11, 923–931. doi: 10.1038/nn.2160
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schubert, T., Huckfeldt, R. M., Parker, E., Campbell, J. E., and Wong, R. O. (2010). Assembly of the outer retina in the absence of GABA synthesis in horizontal cells. *Neural Dev.* 5:15. doi: 10.1186/1749-8104-5-15
- Sherry, D. M., Wang, M. M., Bates, J., and Frishman, L. J. (2003). Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J. Comp. Neurol.* 465, 480–498. doi: 10.1002/cne.10838
- Sonntag, S., Dedek, K., Dorgau, B., Schultz, K., Schmidt, K.-F., Cimiotti, K., et al. (2012). Ablation of retinal horizontal cells from adult mice leads to rod degeneration and remodeling in the outer retina. *J. Neurosci.* 32, 10713–10724. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0442-12.2012
- Soto, F., Watkins, K. L., Johnson, R. E., Schottler, F., and Kerschensteiner, D. (2013). NGL-2 regulates pathway-specific neurite growth and lamination, synapse formation, and signal transmission in the retina. *J. Neurosci.* 33, 11949–11959. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1521-13.2013

- Soto, F., Zhao, L., and Kerschensteiner, D. (2018). Synapse maintenance and restoration in the retina by NGL2. *eLife* 7:e30388. doi: 10.7554/eLife.30388
- Specht, D., Wu, S.-B., Turner, P., Dearden, P., Koentgen, F., Wolfrum, U., et al. (2009). Effects of presynaptic mutations on a postsynaptic Cacna1s calcium channel colocalized with mGluR6 at mouse photoreceptor ribbon synapses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 505–515. doi: 10.1167/iovs.08-2758
- Ströh, S., Puller, C., Swirski, S., Hölzel, M.-B., van der Linde, L. I. S., Segelken, J., et al. (2018). Eliminating glutamatergic input onto horizontal cells changes the dynamic range and receptive field organization of mouse retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 38, 2015–2028. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0141-17.2018
- Tanabe, K., Takahashi, Y., Sato, Y., Kawakami, K., Takeichi, M., and Nakagawa, S. (2006). Cadherin is required for dendritic morphogenesis and synaptic terminal organization of retinal horizontal cells. *Development* 133, 4085–4096. doi: 10.1242/dev.02566
- Thoreson, W. B., Babai, N., and Bartoletti, T. M. (2008). Feedback from horizontal cells to rod photoreceptors in vertebrate retina. *J. Neurosci.* 28, 5691–5695. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0403-08.2008
- tom Dieck, S., Specht, D., Strenzke, N., Hida, Y., Krishnamoorthy, V., Schmidt, K.-F., et al. (2012). Deletion of the presynaptic scaffold CAST reduces active zone size in rod photoreceptors and impairs visual processing. *J. Neurosci.* 32, 12192–12203. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0752-12.2012
- Wu, F., Li, R., Umino, Y., Kaczynski, T. J., Sapkota, D., Li, S., et al. (2013). Onecut1 is essential for horizontal cell genesis and retinal integrity. *J. Neurosci.* 33, 13053–13065. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0116-13.2013
- Wu, S. M. (1991). Input-output relations of the feedback synapse between horizontal cells and cones in the tiger salamander retina. *J. Neurophysiol.* 65, 1197–1206. doi: 10.1152/jn.1991.65.5.1197
- Wu, S. M. (1992). Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 462–468. doi: 10.1016/0959-4388(92)90181-J
- Yang, X. L., and Wu, S. M. (1991). Feedforward lateral inhibition in retinal bipolar cells: input-output relation of the horizontal cell-depolarizing bipolar cell synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3310–3313. doi: 10.1073/pnas.88.8.3310
- Young, R. W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* 212, 199–205. doi: 10.1002/ar.1092120215
- Zabouri, N., and Haverkamp, S. (2013). Calcium channel-dependent molecular maturation of photoreceptor synapses. *PLoS One* 8:e63853. doi: 10.1371/journal.pone.0063853

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Nemitz, Dedek and Janssen-Bienhold. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

### **6.2.3 Synaptic remodeling in the cone pathway after early postnatal horizontal cell ablation**

Autoren:

Lena Nemitz<sup>1</sup>, Karin Dedek<sup>2,3</sup>, Ulrike Janssen-Bienhold<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Neurobiologie des Sehens, Department für Neurowissenschaften, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

<sup>2</sup>Neurosensorik, Institut für Biologie und Umweltwissenschaften, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

<sup>3</sup>Forschungszentrum Neurosensorik, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

Autorenbeiträge:

LN, KD und UJB konzipierten die Experimente und interpretierten die Daten; LN führte die Experimente, Quantifizierung und statistische Analyse durch, erstellte die Abbildungen und schrieb einen ersten Entwurf des Manuskripts; KD und UJB überarbeiteten das Manuskript.

In Revision bei:

Frontiers in Cellular Neuroscience

# Synaptic Remodeling in the Cone Pathway After Early Postnatal Horizontal Cell Ablation

1 **Lena Nemitz<sup>1</sup>, Karin Dedek<sup>2,3</sup>, Ulrike Janssen-Bienhold<sup>1,3\*</sup>**

2 <sup>1</sup>Visual Neuroscience, Department of Neuroscience, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany

3 <sup>2</sup>Animal Navigation/Neurosensorys, Institute for Biology and Environmental Sciences, University of  
4 Oldenburg, Oldenburg, Germany

5 <sup>3</sup>Research Center Neurosensory Science, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany

6 **\* Correspondence:**

7 Ulrike Janssen-Bienhold

8 [ulrike.janssen.bienhold@uni-oldenburg.de](mailto:ulrike.janssen.bienhold@uni-oldenburg.de)

9 **Keywords: vision, retina, synaptic remodeling, ribbon synapse, cones, photoreceptors,**  
10 **horizontal cells, bipolar cells**

## 11 **Abstract**

12 The first synapse of the visual pathway is formed by photoreceptors, horizontal cells and bipolar cells.  
13 While ON bipolar cells invaginate into the photoreceptor terminal and form synaptic triads together  
14 with invaginating horizontal cell processes, OFF bipolar cells make flat contacts at the base of the  
15 terminal. When horizontal cells are ablated during retina development, no invaginating synapses are  
16 formed in rod photoreceptors. However, how cone photoreceptors and their synaptic connections with  
17 bipolar cells react to this insult, is unclear so far. To answer this question, we specifically ablated  
18 horizontal cells from the developing mouse retina. Following ablation around postnatal day 4 (P4)/P5,  
19 cones initially exhibited a normal morphology and formed flat contacts with OFF bipolar cells, but  
20 only few invaginating contacts with ON bipolar cells. From P15 on, synaptic remodeling became  
21 obvious with clustering of cone terminals and mislocalized cone somata in the OPL. Adult cones (P56)  
22 finally displayed highly branched axons with numerous ribbon-containing terminals. Furthermore, type  
23 3a, 3b and 4 OFF bipolar cell dendrites sprouted into the outer nuclear layer and even expressed  
24 glutamate receptors at the base of newly formed cone terminals. These results indicate that cones are  
25 able to form new synapses with OFF bipolar cells in adult mice. In contrast, cone terminals lost their  
26 invaginating contacts with ON bipolar cells, highlighting the importance of horizontal cells for synapse  
27 maintenance. Taken together, our data demonstrate that early postnatal horizontal cell ablation leads  
28 to differential remodeling in the cone pathway: whereas synapses between cones and ON bipolar cells  
29 were lost, new synapses were established between cones and OFF bipolar cells. These results suggest  
30 that synapse formation and maintenance are regulated very differently between flat and invaginating  
31 contacts at cone terminals.

## 32 **1 Introduction**

33 At the visual system's first synapse, cone photoreceptors provide synaptic input to horizontal cells, ON  
34 bipolar cells and OFF bipolar cells, thereby splitting the light information into parallel pathways. Two  
35 different types of contacts can be distinguished at the cone terminal: Invaginating contacts with  
36 horizontal and ON bipolar cells (triads) and flat contacts with OFF bipolar cells (Haverkamp et al.,

37 2000). Previous electron microscopic studies have revealed the chronological sequence of cone  
38 synaptogenesis in the mouse retina (Olney, 1968; Blanks et al., 1974; Rich et al., 1997; Sherry et al.,  
39 2003). When cone terminals begin to invade the outer plexiform layer (OPL) at postnatal day 4 (P4)/P5,  
40 the ribbon, a specialized structure that binds synaptic vesicles and enables a rapid and graded release  
41 of glutamate, is attached to the membrane and the cone terminal makes a contact with one horizontal  
42 cell dendrite. Starting at P6, this dendrite invaginates into the cone pedicle together with a second  
43 horizontal cell dendrite and both horizontal cell processes are positioned lateral to the ribbon. Between  
44 P7 and P10, triads are completed by the addition of one or two ON bipolar cell dendrites that occupy  
45 the central position below the synaptic ribbon.

46 Although the chronological order of cone synapse formation is well-described, the molecular  
47 mechanisms that underlie this process are not fully understood. Recently, the dystroglycan-pikachurin  
48 complex of photoreceptors has been reported to interact transsynaptically with GPR179, a G protein-  
49 coupled receptor that is expressed at the dendritic tips of ON bipolar cells (Orlandi et al., 2018). The  
50 knock-out of dystroglycan (Satz et al., 2009; Omori et al., 2012) and pikachurin (Sato et al., 2008)  
51 leads to improper photoreceptor synapse formation and visual impairment. Moreover, an ablation of  
52 horizontal cells from the adult retina results in a loss of synaptic contacts between photoreceptors and  
53 ON bipolar cells (Sonntag et al., 2012; Keeley et al., 2013; Wu et al., 2013) and an elimination of  
54 horizontal cells during early postnatal development impedes the invagination of rod bipolar cells into  
55 rod terminals (Nemitz et al., 2019). However, it remains unclear how cones and cone bipolar cells react  
56 when horizontal cells are ablated during development.

57 In the present study, we analyzed the effects of an early postnatal loss of horizontal cells on the  
58 morphology of cone photoreceptors and their synaptic contacts with bipolar cells. For this purpose,  
59 horizontal cells were specifically ablated from the mouse retina around P4/P5 (at the time when  
60 horizontal cells start to make the first contacts with cone pedicles) using diphtheria toxin receptor  
61 (DTR)-mediated cell knock-out. Our immunohistochemical and electron microscopic analysis showed  
62 that cones initially displayed a normal morphology and established flat contacts with OFF bipolar cells,  
63 but only few invaginating synapses with ON bipolar cells. Beginning at P15, cone somata were partly  
64 mislocalized and cone terminals clustered in the OPL and lost all invaginating ON bipolar cell  
65 invaginations. In the adult retina, cones and their postsynaptic partners underwent even more severe  
66 structural changes, including an aberrant cone neurite sprouting and a formation of new synapses  
67 between cones and OFF bipolar cells. These findings demonstrate the potential of the adult retina for  
68 morphological plasticity and highlight again the importance of horizontal cells for the maintenance of  
69 invaginating synapses (Sonntag et al., 2012).

## 70 **2 Material and Methods**

### 71 **2.1 Animals**

72 Cx57-DTR<sup>f</sup>Cre mice (European Mouse Mutant Archive, EM:06024) have been previously described  
73 (Sonntag et al., 2012). Heterozygous Cx57<sup>+/-DTR</sup> mice and homozygous Cx57<sup>+/+</sup> (control) mice were  
74 used in this study. Animals were maintained under a 12 h light/dark cycle with food and water *ad*  
75 *libitum*. Mice of both sexes were used in the experiments. All procedures were approved by the local  
76 animal welfare committee (*Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und*  
77 *Lebensmittelsicherheit*, Az:33.19-542502-04-12/0995) and were in accordance with the law on animal  
78 protection issued by the German Federal Government (*Tierschutzgesetz*).

79

## 80 2.2 DT injections

81 Horizontal cell ablation was induced by intraperitoneal injection of 12.5 to 20 ng DT (Sigma) at P4  
82 and P5.

## 83 2.3 Tissue preparation

84 Tissue preparation was done as previously described in Nemitz et al. (2019). Briefly, mice were killed  
85 by decapitation (P8, P11) or anesthetized with CO<sub>2</sub> and killed by cervical dislocation (P15, P21, P56).  
86 Eyes were enucleated, transferred into physiological phosphate buffer saline (pH 7.4) and cornea, lens  
87 and vitreous body were removed. For immunohistochemistry of retinal cryosections, posterior eyecups  
88 were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) and 3% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) for  
89 20 min and washed in 0.1 M PB. After cryoprotection in 30% sucrose in 0.1 M PB overnight at 4°C,  
90 eyecups were embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek) and cut into vertical  
91 sections (20 μm) using a cryostat (Leica CM1860). For immunohistochemistry of whole mounts,  
92 retinae were isolated from the eyecups, mounted on filter paper ganglion cell side up and fixed with  
93 2% PFA and 3% sucrose in 0.1 M PB for 20 min. After washing in 0.1 M PB, retinae were  
94 cryoprotected in 30% sucrose in 0.1 M PB overnight at 4°C and subjected to three freeze-thaw cycles.  
95 For electron microscopy, isolated retinae were fixed in 1% PFA, 3% sucrose and 2.5% glutaraldehyde  
96 in 0.05 M PB overnight at 4°C, washed in 0.1 M PB and post-fixed with 1% OsO<sub>4</sub> in 0.1 M PB for 1  
97 h.

## 98 2.4 Immunohistochemistry and image acquisition

99 Immunostainings were performed as described earlier (Nemitz et al., 2019). Cryosections and whole  
100 mounts of *Cx57<sup>+/+</sup>* ( $n = 3-6$ ) and *Cx57<sup>+DTR</sup>* ( $n = 3-6$ ) mice were washed in 0.1 M PB and blocked with  
101 5% ChemiBLOCKER (Millipore), 0.3% Triton X-100 and 0.02% NaN<sub>3</sub> in 0.1 M PB for 1 h at room  
102 temperature (cryosections) or overnight at 4°C (whole mounts). Primary antibodies (Table 1) were  
103 diluted in blocking solution and applied overnight (cryosections) or for 5 d (whole mounts) at 4°C.  
104 After washing in 0.1 M PB, tissue was incubated with secondary antibodies (conjugated to Alexa 488,  
105 Alexa 588 or Alexa 647, Thermo Fisher Scientific, 1:600) in blocking solution for 2 h at room  
106 temperature (cryosections) or 2 d (whole mounts) at 4 °C. Finally, cryosections and whole mounts were  
107 washed in 0.1 M PB and mounted in Vectashield (Vector Laboratories).

108 Images were acquired using a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP8). Retinal sections  
109 were scanned with an HC PL APO CS2 63x/1.4 oil objective. Whole mounts were scanned with an HC  
110 PL APO CS2 40x/1.3 oil objective. Maximum projections of confocal stacks (0.2 μm single scans) are  
111 shown. Brightness and contrast were adjusted for presentation purposes using Fiji (Schindelin et al.,  
112 2012).

## 113 2.5 Electron microscopy

114 As earlier described (Nemitz et al., 2019), fixed retinae of *Cx57<sup>+/+</sup>* ( $n = 2-4$ ) and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice ( $n =$   
115  $3-5$ ) were washed in 0.1 M PB and dehydrated in increasing acetone concentrations (50 to 100%). After  
116 embedding in Agar 100 Resin (Agar Scientific), retinae were sectioned vertically (90 nm) using a  
117 Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome. Ultrathin sections were collected on copper grids and  
118 examined with a Zeiss EM 902A electron microscope. Brightness and contrast of electron micrographs  
119 were adjusted in Adobe Photoshop CS6 Extended (Adobe Systems).

120

## 121 2.6 Quantification and statistical analysis

122 For the quantification of cones, we counted the number of cone somata in cone arrestin-stained vertical  
 123 sections of *Cx57<sup>+/+</sup>* ( $n = 3$ ) and *Cx57<sup>+DTR</sup>* ( $n = 3$ ) mice. For each animal, 12 images (198.39 x 198.39  
 124  $\mu\text{m}$ ) were analyzed. Cones that had their soma within the distal 50% of the ONL were categorized as  
 125 correctly positioned cones and cones that had their soma within the proximal 50% of the ONL, the INL  
 126 or the OPL were categorized as mislocalized cones.

127 Data were analyzed in GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Numbers of cones were normally  
 128 distributed (D'Agostino-Pearson normality test). Therefore, differences between genotypes were tested  
 129 for statistical significance using an unpaired *t* test. To compare the distribution of cone somata in wild-  
 130 type and horizontal cell-ablated mice, Fisher's exact test was used. Values are given as mean  $\pm$  standard  
 131 deviation (SD).

## 132 3 Results

### 133 3.1 Ablation of horizontal cells

134 To investigate how cones and their postsynaptic partners respond to a loss of horizontal cells during  
 135 early postnatal development, we ablated horizontal cells via DTR-mediated cell knock-out. To this  
 136 end, we used *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice that selectively express the DTR from primates selectively in horizontal  
 137 cells (Sonntag et al., 2012) and induced an apoptosis of horizontal cells by the injection of DT at P4  
 138 and P5 (Nemitz et al., 2019). At that time, cone synaptogenesis has just started and cone terminals  
 139 begin to form the first contacts with horizontal cells (Sherry et al., 2003). To confirm the ablation of  
 140 horizontal cells, vertical sections of *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* retinæ were stained for calbindin, a marker  
 141 for horizontal cells. Calbindin-positive horizontal cells were present in DT-injected *Cx57<sup>+/+</sup>* mice  
 142 (Figure 1A) and absent in DT-injected *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice (Figure 1B). In contrast, calbindin-  
 143 immunoreactive inner retinal neurons were comparable in both genotypes (Figures 1A,B).

### 144 3.2 Cone neurite sprouting after early postnatal horizontal cell ablation

145 To monitor the development of cone morphology after horizontal cell ablation, we stained retinal  
 146 cryosections of *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice (P8, P15, P21 and P56) with an antibody against cone  
 147 arrestin. In wild-type mice, cones showed the typical morphology composed of an outer and inner  
 148 segment, a soma and an axon with a synaptic terminal (Figures 2A-E). During the second postnatal  
 149 week, cone photoreceptors undergo a phase of migration before they occupy their final position in the  
 150 distal ONL (Rich et al., 1997). Accordingly, cone somata were distributed over the entire ONL width  
 151 in *Cx57<sup>+/+</sup>* mice at P8 (Figure 2A) but located in the outermost part of the ONL from P15 onward  
 152 (Figures 2B-E). At P8, the morphology of cones in horizontal cell-ablated mice was undistinguishable  
 153 from that in control mice (Figures 2A,F). Beginning at P15, however, we found mislocalized cone  
 154 somata at the level of the OPL (Figures 2G,H, asterisks). Furthermore, cone terminals appeared to be  
 155 irregularly spaced and seemed to start forming clusters (Figures 2G-I). At P56, differences in the  
 156 morphology of cones in *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice became even more evident. Axons showed  
 157 branching into several collaterals with small and often more slender appearing synaptic terminals  
 158 (Figure 2J, open arrowheads). Occasionally, two or more axons emerging from one soma were  
 159 observed (Figures 2I,J, white arrowheads). Immunolabeling of retinal whole mounts for cone arrestin  
 160 confirmed that the regular mosaic of cone terminals found in the OPL of P56 control mice (Figures  
 161 2K,L) was absent in age-matched *Cx57<sup>+DTR</sup>* mice. Instead, cone pedicles were unevenly distributed  
 162 and formed clusters (Figures 2M,N). In addition, cone terminals appeared smaller and the telodendrial  
 163 network seemed to be reduced (Figures 2M,N). Despite these morphological changes, the number of

164 cones did not differ between the two genotypes at P56 (Figure 2O;  $Cx57^{+/+}$ :  $9.38 \pm 1.80$  cone somata  
 165 per 100  $\mu\text{m}$ ; mean  $\pm$  SD;  $Cx57^{+/DTR}$ :  $9.37 \pm 1.78$  cone somata per 100  $\mu\text{m}$ ,  $p = 0.9736$ ,  $t$  test), suggesting  
 166 that the abnormal cone morphology is not a sign for cone degeneration. In contrast to the number of  
 167 cones, however, the spatial distribution of cone somata was significantly different between  $Cx57^{+/+}$  and  
 168  $Cx57^{+/DTR}$  mice ( $p = 0.0309$ , Fisher's exact test). In wild-type mice, all analyzed cone somata (670/670)  
 169 were localized in the distal ONL, whereas in horizontal cell-ablated mice, 99.3% (664/669) of the cone  
 170 somata were correctly positioned and 0.7% (5/669) of the cone somata were found mispositioned in  
 171 the proximal ONL, distal INL or OPL.

### 172 3.3 New cone terminals contain ribbons

173 To check whether the newly formed cone terminals in adult  $Cx57^{+/DTR}$  mice (P56) have synaptic  
 174 ribbons, we labeled cones with antibodies specific for cone arrestin and ribbons with antibodies specific  
 175 for CtBP2, a protein that is identical to the B domain of the ribbon component RIBEYE (Schmitz et  
 176 al., 2000). Ribbons in the outer retina of control mice displayed the classical horseshoe shape and were  
 177 restricted to the OPL (Figures 3A,C). By contrast, ribbons of  $Cx57^{+/DTR}$  mice were shorter as evidenced  
 178 by a punctate CtBP2 labeling and not only present in the OPL, but predominately distributed  
 179 throughout the entire ONL (Figures 3B,D). Furthermore, the double labeling revealed that ribbons were  
 180 often present within slender ectopic cone terminals in the ONL (Figure 3D, arrowheads), indicating  
 181 that the newly formed cone terminals possess potential release sites for glutamate.

### 182 3.4 Cone terminals lose invaginations from ON bipolar cells

183 For the examination of synapses between cones and ON bipolar cells we analyzed cone terminals from  
 184 wild-type and horizontal cell-ablated mice of different ages (P11, P15, P56) by electron microscopy.  
 185 In  $Cx57^{+/+}$  mice, triads comprising horizontal and ON bipolar cell dendrites were present at all analyzed  
 186 time points (Figures 4A,E,I). Although horizontal cell ablation was already induced at P4/P5, we  
 187 occasionally found remnants from horizontal cell invaginations in  $Cx57^{+/DTR}$  mice at P11 (Figure 4B).  
 188 However, complete triads were rare (Figure 4C) and most of the cone terminals revealed a complete  
 189 lack of invaginations (Figure 4D), suggesting that horizontal cells may not only be essential for the  
 190 invagination of rod bipolar cells into rod terminals (Nemitz et al., 2019), but also for the invagination  
 191 of cone ON bipolar cells into cone terminals. At P15 and P56, cone pedicles of horizontal cell-ablated  
 192 mice did not show any invaginations (Figures 4F-H,J-L), indicating that cones have lost the remaining  
 193 contacts with ON bipolar cells. In line with the CtBP2 labeling (Figures 3B,D), synaptic ribbons in  
 194  $Cx57^{+/DTR}$  mice were often shorter and not anchored to the cell membrane (Figures 4B-D,F-H,J-L,  
 195 arrowheads). Unfortunately, we were not able to unambiguously identify newly formed cone terminals  
 196 in electron micrographs since ectopic rod terminals are also present in the ONL of horizontal cell-  
 197 ablated mice (Nemitz et al., 2019) and common criteria for the differentiation between rod and cone  
 198 terminals such as the terminal size or the number of mitochondria, ribbons and invaginations were not  
 199 applicable for ectopic rod and cone terminals in horizontal cell-ablated mice.

200 To confirm the absence of synaptic contacts between cones and ON bipolar cells in adult  $Cx57^{+/DTR}$   
 201 mice (P56), we stained the mGluR6 signaling complex with an antibody against  $\text{Ca}_v1.1$ , that cross-  
 202 reacts with GPR179 (Hasan et al., 2016). Additionally, we labeled cones with an antibody against cone  
 203 arrestin and a subset of cone bipolar cells with an antibody against secretagogin (SCGN, Puthussery et  
 204 al., 2010). While GPR179-positive puncta were found at contact points between cone terminals and  
 205 secretagogin-immunoreactive bipolar cells in  $Cx57^{+/+}$  mice (Figures 5A-D, arrowheads), GPR179  
 206 labeling was completely missing in  $Cx57^{+/DTR}$  mice (Figures 5E-H), indicating that functional synapses  
 207 between cones and ON bipolar cells are indeed absent in adult horizontal cell ablated mice.

### 208 3.5 Sprouting OFF bipolar cell dendrites form new synapses with cones

209 Cone photoreceptors provide synaptic input to five types of OFF bipolar cells (Behrens et al., 2016).  
 210 To analyze the effects of early postnatal horizontal cell ablation on OFF bipolar cell morphology, we  
 211 labeled type 3a, 3b and 4 OFF bipolar cells with antibodies against HCN4, PKARII $\beta$  and calsenilin,  
 212 respectively. In the adult (P56) wild-type retina, type 3a, 3b and 4 OFF bipolar cell dendrites  
 213 exclusively stratified in the OPL (Figures 6A-C). In the horizontal cell-ablated retina, on the contrary,  
 214 all analyzed types of OFF bipolar cells extended their dendrites into the ONL (Figures 6D-F,  
 215 arrowheads).

216 Since type 3a, 3b and 4 OFF bipolar cells not only contact cones but also rods (Mataruga et al., 2007;  
 217 Haverkamp et al., 2008) and rods have been shown to retract their terminals into the ONL after early  
 218 postnatal horizontal cell ablation (Nemitz et al., 2019), these OFF bipolar cell types may sprout into  
 219 the ONL to search for contacts with rods. To test whether outgrowing OFF bipolar cell dendrites in  
 220 horizontal cell-ablated mice are also able to form new synapses with cones, we stained vertical sections  
 221 and whole mounts for cone arrestin and GluK1, a glutamate receptor subunit that is expressed by type  
 222 3a, 3b and 4 OFF bipolar cells in the mouse retina (Puller et al., 2013). In *Cx57<sup>+/+</sup>* mice, GluK1  
 223 immunoreactivity was present at the base of cone terminals from P8 to P56 (Figures 7A-D',I),  
 224 demonstrating that flat contacts with OFF bipolar cells were existing throughout all ages. Similarly,  
 225 GluK1 staining was found at the base of cone terminals in the OPL of *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice from P8 onward  
 226 (Figures 7E-H', J), suggesting that synapses between cones and OFF bipolar cells are normally formed  
 227 and retained in horizontal cell-ablated mice. However, in addition to that, we observed several  
 228 sprouting GluK1-immunoreactive dendrites contacting newly formed cone terminals in the ONL at  
 229 P56 (Figures 7H,H',K-N), indicating that cones retain the ability to establish new synapses with OFF  
 230 bipolar cells in the adult retina.

## 231 4 Discussion

232 The present study aimed to investigate the consequences of early postnatal horizontal cell ablation on  
 233 the development of cone photoreceptors and their synaptic connections with bipolar cells.  
 234 Immunohistochemical and electron microscopical analysis revealed that cones initially displayed a  
 235 normal morphology and formed basal contacts with OFF bipolar cells, but hardly any invaginating  
 236 contacts with ON bipolar cells. Beginning in the third postnatal week, cones underwent progressive  
 237 structural and synaptic changes, starting with a loss of synaptic contacts with ON bipolar cells, a  
 238 mislocalization of cone somata and a clustering of cone terminals. The cone phenotype became even  
 239 more severe in the adult retina with aberrant neurite sprouting and the establishment of new synapses  
 240 with OFF bipolar cells. These results demonstrate the capacity of the mature retina for structural and  
 241 synaptic plasticity.

### 242 Loss of synaptic contacts between cones and ON bipolar cells

243 In this study, horizontal cell ablation was induced at the same time as the first contacts between cone  
 244 terminals and horizontal cells are formed (P4/P5). Therefore, a small number of horizontal cell  
 245 dendrites was still able to invaginate into cone terminals before horizontal cells were completely  
 246 eliminated, as evidenced by the presence of some horizontal cell remnants in cone terminals at P11.  
 247 However, invaginating ON bipolar cell dendrites were never observed without adjacent horizontal cell  
 248 invaginations at this developmental stage, indicating that cone ON bipolar cells require horizontal cells  
 249 to invaginate into the cone terminal. In line with this finding, horizontal cells have previously been  
 250 shown to be essential for the invagination of rod bipolar cells into the rod terminal (Nemitz et al.,  
 251 2019). From P15 onwards, invaginations were completely absent in cone terminals of horizontal cell-

252 ablated mice, suggesting that cones lose all remaining invaginations. This result is consistent with a  
 253 previous study showing that synaptic contacts between photoreceptors and ON bipolar cells are also  
 254 lost when horizontal cells are ablated from the adult retina (Sonntag et al., 2012), illustrating that  
 255 horizontal cells are not only important for the formation, but also for the maintenance of the  
 256 photoreceptor ribbon synapse. Nevertheless, the molecular mechanism, by which horizontal cells  
 257 contribute to the formation and maintenance of photoreceptor ribbon synapses remains unresolved.  
 258 One possibility is that horizontal cells express diffusible or membrane-bound guidance cue molecules  
 259 that direct the invagination of ON bipolar cells into photoreceptor terminals or stabilize the  
 260 photoreceptor ribbon synapse. Mouse horizontal cells have been reported to express the cell adhesion  
 261 molecule NGL-2 (Soto et al., 2013) as well as the semaphorin *Sema6a* and its receptor *PlexA4*  
 262 (Matsuoka et al., 2012), but the knock-out of *Ngl-2*, *Sema6a* or *PlexA4* does not prevent the  
 263 invagination of ON bipolar cells into the photoreceptor terminals, indicating that the absence of these  
 264 molecules is not responsible for the loss of photoreceptor ribbon synapses in horizontal cell-ablated  
 265 mice. Another possibility is that the synaptic activity of horizontal cells contributes to the formation  
 266 and maintenance of the photoreceptor ribbon synapse. Previous studies have shown that a loss of  
 267 photoreceptor proteins that control the release of glutamate leads to a degeneration of photoreceptor  
 268 ribbon synapses (Dick et al., 2003; Haeseleer et al., 2004; Mansergh et al., 2005; tom Dieck et al.,  
 269 2012; Michalakis et al., 2013). However, neither the absence of GABA synthesis (Schubert et al., 2010)  
 270 nor the elimination of the light-dependent modulation of horizontal cell feedback and feedforward  
 271 (Ströh et al., 2018) alters the ultrastructure of the photoreceptor ribbon synapse, suggesting that the  
 272 synaptic activity of horizontal cells is not necessary for the assembly and maintenance of photoreceptor  
 273 ribbon synapses.

#### 274 **Cone neurite sprouting and formation of new synapses between cones and OFF bipolar cells**

275 Aberrant sprouting of photoreceptor neurites has previously been reported for several retinal diseases  
 276 in humans and animal models of retinal degenerations. Rod photoreceptors show abnormal neurite  
 277 sprouting in humans with retinitis pigmentosa (Li et al., 1995; Milam and Li, 1996; Fariss et al., 2000),  
 278 cats with rod/cone dysplasia (Chong et al., 1999), and pigs carrying a mutation in the rhodopsin gene  
 279 (Li et al., 1998). Furthermore, rods extend beaded axons into the inner retina after retinal detachment  
 280 (Sethi et al., 2005) and reattachment (Lewis et al., 2002). Cone neurite sprouting has been described  
 281 for humans with retinitis pigmentosa (Li et al., 1995; Milam and Li, 1996) and age-related macular  
 282 degeneration (AMD) (Pow and Sullivan, 2007) as well as for two mouse models: *rd1* (Fei, 2002; Lin  
 283 et al., 2009) and *Ca<sub>v</sub>1.4* knock-out mice (Raven et al., 2008; Zabouri and Haverkamp, 2013). *Rd1* mice  
 284 carry a mutation in the rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase  $\beta$  subunit gene leading to a  
 285 primary degeneration of rod photoreceptors, followed by a secondary degeneration of cones and  
 286 morphological changes in horizontal and bipolar cells (Strettoi and Pignatelli, 2000; Strettoi et al.,  
 287 2002). In line with our findings, newly formed processes of cones in *rd1* mice often contain synaptic  
 288 ribbons (Lin et al., 2009). Mice that lack the L-type voltage-dependent calcium channel subunit *Ca<sub>v</sub>1.4*,  
 289 which is expressed by photoreceptors, display severe structural changes including a loss of  
 290 invaginations in photoreceptor terminals, abnormal ribbons and dendritic sprouting of second-order  
 291 neurons (Mansergh et al., 2005; Raven et al., 2008; Zabouri and Haverkamp, 2013). Similar to  
 292 horizontal cell-ablated mice, cones in *Ca<sub>v</sub>1.4* mutant mice exhibit an aberrant morphology, showing  
 293 branched axons and several synaptic terminals (Raven et al., 2008; Zabouri and Haverkamp, 2013).  
 294 Furthermore, ectopic cone terminals have been shown to establish new synapses with horizontal cells  
 295 (Zabouri and Haverkamp, 2013). In contrast to that, cone neurite sprouting has not been reported for  
 296 adult *Lim1* conditional knock-out mice in which horizontal cells become misplaced to the inner retina  
 297 before birth (Poche et al., 2007; Keeley et al., 2013). However, due to incomplete recombination, some  
 298 horizontal cells remain in the outer retina of *Lim1* conditional knock-out mice which might be sufficient

299 to maintain the normal cone morphology or might induce subtler effects that went undetected.  
 300 Interestingly, cones do also not display neurite sprouting when horizontal cells are ablated from the  
 301 adult retina (Sonntag et al., 2012).

302 What causes cone neurite sprouting after early postnatal horizontal cell ablation? One possibility is that  
 303 neurite sprouting is a sign for cone degeneration. In favor of this hypothesis are the data presented for  
 304 *rd1* mice, which showed that neurite sprouting of cones starts at P8 (Fei, 2002) and coincides with the  
 305 beginning of cone outer segment degeneration in this animal model (Lin et al., 2009). By contrast, in  
 306 *Ca<sub>v</sub>1.4* knock-out mice, neurite spouting precedes cone death by several month (Zabouri and  
 307 Haverkamp, 2013). Moreover, we did not find significant differences in the number of cones at P56  
 308 which speaks against this hypothesis. Nevertheless, we cannot rule out that cones die at later stages in  
 309 horizontal cell-ablated mice. Another reason for cone neurite sprouting after early postnatal horizontal  
 310 cell ablation may be, that the loss of postsynaptic contacts with horizontal cells and ON bipolar cells  
 311 triggers the neurite outgrowth and the search for new contacts. Axonal outgrowth and synapse  
 312 formation rely on extracellular molecular cues that bind to membrane receptors and thereby activate  
 313 intracellular signaling cascades which result in changes in cytoskeletal dynamics (reviewed in  
 314 O'Donnell et al., 2009). However, the exact molecular mechanism of axonal outgrowth and  
 315 synaptogenesis of cones is not yet fully understood. *In vitro* experiments with cultured salamander rod  
 316 photoreceptors have demonstrated that the guidance cue molecule semaphorin 3A inhibits sprouting of  
 317 rod photoreceptors (Kung et al., 2017). Murine horizontal cells have been reported to express  
 318 semaphorin 6A (Sema6A), but in Sema6A knock-out mice, cones do not display aberrant neurite  
 319 sprouting (Matsuoka et al., 2012), suggesting that the lack of Sema6A is not responsible for cone  
 320 neurite sprouting in horizontal cell-ablated mice. Moreover, it has been shown that blockage of cGMP-  
 321 gated channels with cobalt bromide or L-cis diltiazem inhibits neurite outgrowth and varicosity  
 322 formation whereas activation of cGMP-gated channels with the agonist 8Br-cGMP increases  
 323 varicosity formation of cones (Zhang and Townes-Anderson, 2002). Furthermore, Pow and Sullivan  
 324 (2007) observed a strong expression of microtubule associated protein 2 (MAP2), a regulator of neurite  
 325 outgrowth, in cones of humans with AMD. Whether MAP2 plays a role in cone neurite sprouting after  
 326 early postnatal horizontal cell ablation remains to be seen. Further investigations will be needed to  
 327 reveal the precise mechanisms underlying axonal outgrowth and synaptogenesis of cones in horizontal  
 328 cell-ablated mice. Nevertheless, our study underlines the potential of the mature retina for  
 329 morphological plasticity and provides the first evidence that adult cones are able to form new synapses  
 330 with OFF bipolar cells.

## 331 5 Conflict of Interest

332 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial  
 333 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## 334 6 Author Contributions

335 LN, KD and UJB designed experiments and contributed to the interpretation of data; LN and UJB  
 336 performed experiments; LN prepared the figures and wrote a first draft of the manuscript; KD and UJB  
 337 revised the manuscript.

## 338 7 Funding

339 This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant DE1154/3-1 to KD and UJ-  
 340 B, Research Training Group 1885/1-2 stipend to LN).

341 **8 Acknowledgments**

342 We thank Bettina Kewitz for excellent technical assistance and Frank Müller (FZ Jülich, Jülich,  
343 Germany) for the generous gift of the HCN4 antibody. We also acknowledge the Fluorescence  
344 Microscopy Service Unit and the Electron and Light Microscopy Service Unit (University of  
345 Oldenburg, Oldenburg, Germany) for the use of the imaging facilities.

346 **9 References**

- 347 Behrens, C., Schubert, T., Haverkamp, S., Euler, T., and Berens, P. (2016). Connectivity map of  
348 bipolar cells and photoreceptors in the mouse retina. *eLife* 5, e20041.  
349 doi:10.7554/eLife.20041.
- 350 Blanks, J. C., Adinolfi, A. M., and Lolley, R. N. (1974). Synaptogenesis in the photoreceptor  
351 terminal of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 156, 81–93. doi:10.1002/cne.901560107.
- 352 Chong, N. H., Alexander, R. A., Barnett, K. C., Bird, A. C., and Luthert, P. J. (1999). An  
353 Immunohistochemical Study of an Autosomal Dominant Feline Rod/Cone Dysplasia (Rdy  
354 Cats). *Exp. Eye Res.* 68, 51–57. doi:10.1006/exer.1998.0580.
- 355 Dick, O., tom Dieck, S., Altrock, W. D., Ammermüller, J., Weiler, R., Garner, C. C., et al. (2003).  
356 The Presynaptic Active Zone Protein Bassoon Is Essential for Photoreceptor Ribbon Synapse  
357 Formation in the Retina. *Neuron* 37, 775–786. doi:10.1016/S0896-6273(03)00086-2.
- 358 Fariss, R. N., Li, Z.-Y., and Milam, Ann H (2000). Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine  
359 cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.* 129,  
360 215–223. doi:https://doi.org/10.1016/S0002-9394(99)00401-8.
- 361 Fei, Y. (2002). Cone neurite sprouting: An early onset abnormality of the cone photoreceptors in the  
362 retinal degeneration mouse. *Molecular Vision*, 9.
- 363 Haeseleer, F., Imanishi, Y., Maeda, T., Possin, D. E., Maeda, A., Lee, A., et al. (2004). Essential role  
364 of Ca<sup>2+</sup>-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function.  
365 *Nat. Neurosci.* 7, 1079–1087. doi:10.1038/nn1320.
- 366 Hasan, N., Ray, T. A., and Gregg, R. G. (2016). CACNA1S expression in mouse retina: Novel  
367 isoforms and antibody cross-reactivity with GPR179. *Vis. Neurosci.* 33, E009.  
368 doi:10.1017/S0952523816000055.
- 369 Haverkamp, S., Grünert, U., and Wässle, H. (2000). The Cone Pedicle, a Complex Synapse in the  
370 Retina. *Neuron* 27, 85–95. doi:10.1016/S0896-6273(00)00011-8.
- 371 Haverkamp, S., Specht, D., Majumdar, S., Zaidi, N. F., Brandstätter, J. H., Wasco, W., et al. (2008).  
372 Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calsenilin and contact cones as  
373 well as rods. *The Journal of Comparative Neurology* 507, 1087–1101.  
374 doi:10.1002/cne.21612.
- 375 Keeley, P. W., Luna, G., Fariss, R. N., Skyles, K. A., Madsen, N. R., Raven, M. A., et al. (2013).  
376 Development and Plasticity of Outer Retinal Circuitry Following Genetic Removal of  
377 Horizontal Cells. *J. Neurosci.* 33, 17847–17862. doi:10.1523/JNEUROSCI.1373-13.2013.

- 378 Kung, F., Wang, W., Tran, T. S., and Townes-Anderson, E. (2017). Sema3A Reduces Sprouting of  
 379 Adult Rod Photoreceptors In Vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 4318.  
 380 doi:10.1167/iovs.16-21075.
- 381 Lewis, G. P., Charteris, D. G., Sethi, C. S., and Fisher, S. K. (2002). Animal models of retinal  
 382 detachment and reattachment: identifying cellular events that may affect visual recovery. *Eye*  
 383 16, 375–387. doi:10.1038/sj.eye.6700202.
- 384 Li, Z., Kljavin, I., and Milam, A. (1995). Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa.  
 385 *J. Neurosci.* 15, 5429–5438. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-08-05429.1995.
- 386 Li, Z.-Y., Wong, F., Chang, J. H., Possin, D. E., Hao, Y., Petters, R. M., et al. (1998). Rhodopsin  
 387 Transgenic Pigs as a Model for Human Retinitis Pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39,  
 388 12.
- 389 Lin, B., Masland, R. H., and Strettoi, E. (2009). Remodeling of cone photoreceptor cells after rod  
 390 degeneration in rd mice. *Experimental Eye Research* 88, 589–599.  
 391 doi:10.1016/j.exer.2008.11.022.
- 392 Mansergh, F., Orton, N. C., Vessey, J. P., Lalonde, M. R., Stell, W. K., Tremblay, F., et al. (2005).  
 393 Mutation of the calcium channel gene *Cacna1f* disrupts calcium signaling, synaptic  
 394 transmission and cellular organization in mouse retina. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3035–3046.  
 395 doi:10.1093/hmg/ddi336.
- 396 Mataruga, A., Kremmer, E., and Müller, F. (2007). Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells  
 397 provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *The Journal of Comparative*  
 398 *Neurology* 502, 1123–1137. doi:10.1002/cne.21367.
- 399 Matsuoka, R. L., Jiang, Z., Samuels, I. S., Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Sun, L. O., Peachey, N. S., et  
 400 al. (2012). Guidance-Cue Control of Horizontal Cell Morphology, Lamination, and Synapse  
 401 Formation in the Mammalian Outer Retina. *J. Neurosci.* 32, 6859–6868.  
 402 doi:10.1523/JNEUROSCI.0267-12.2012.
- 403 Michalakis, S., Schäferhoff, K., Spiwox-Becker, I., Zabouri, N., Koch, S., Koch, F., et al. (2013).  
 404 Characterization of neurite outgrowth and ectopic synaptogenesis in response to  
 405 photoreceptor dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1831–1847. doi:10.1007/s00018-012-  
 406 1230-z.
- 407 Milam, A. H., and Li, Z.-Y. (1996). Clinicopathologic Effects of the Q64ter Rhodopsin Mutation in  
 408 Retinitis Pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 753–765.
- 409 Nemitz, L., Dedek, K., and Janssen-Bienhold, U. (2019). Rod Bipolar Cells Require Horizontal Cells  
 410 for Invagination Into the Terminals of Rod Photoreceptors. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 423.  
 411 doi:10.3389/fncel.2019.00423.
- 412 O'Donnell, M., Chance, R. K., and Bashaw, G. J. (2009). Axon Growth and Guidance: Receptor  
 413 Regulation and Signal Transduction. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 383–412.  
 414 doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135614.

- 415 Olney, J. W. (1968). An Electron Microscopic Study of Synapse Formation, Receptor Outer Segment  
416 Development, and other Aspects of Developing Mouse Retina. *Investigative Ophthalmology*  
417 7, 19.
- 418 Omori, Y., Araki, F., Chaya, T., Kajimura, N., Irie, S., Terada, K., et al. (2012). Presynaptic  
419 Dystroglycan-Pikachurin Complex Regulates the Proper Synaptic Connection between  
420 Retinal Photoreceptor and Bipolar Cells. *J. Neurosci.* 32, 6126–6137.  
421 doi:10.1523/JNEUROSCI.0322-12.2012.
- 422 Orlandi, C., Omori, Y., Wang, Y., Cao, Y., Ueno, A., Roux, M. J., et al. (2018). Transsynaptic  
423 Binding of Orphan Receptor GPR179 to Dystroglycan-Pikachurin Complex Is Essential for  
424 the Synaptic Organization of Photoreceptors. *Cell Rep.* 25, 130–145.
- 425 Orlandi, C., Posokhova, E., Masuho, I., Ray, T. A., Hasan, N., Gregg, R. G., et al. (2012).  
426 GPR158/179 regulate G protein signaling by controlling localization and activity of the RGS7  
427 complexes. *J. Cell Biol.* 197, 711–719. doi:10.1083/jcb.201202123.
- 428 Peachey, N. S., Ray, T. A., Florijn, R., Rowe, L. B., Sjoerdsma, T., Contreras-Alcantara, S., et al.  
429 (2012). GPR179 Is Required for Depolarizing Bipolar Cell Function and Is Mutated in  
430 Autosomal-Recessive Complete Congenital Stationary Night Blindness. *The American*  
431 *Journal of Human Genetics* 90, 331–339. doi:10.1016/j.ajhg.2011.12.006.
- 432 Poche, R. A., Kwan, K. M., Raven, M. A., Furuta, Y., Reese, B. E., and Behringer, R. R. (2007).  
433 *Lim1* Is Essential for the Correct Laminar Positioning of Retinal Horizontal Cells. *J.*  
434 *Neurosci.* 27, 14099–14107. doi:10.1523/JNEUROSCI.4046-07.2007.
- 435 Pow, D. V., and Sullivan, R. K. (2007). Nuclear kinesis, neurite sprouting and abnormal axonal  
436 projections of cone photoreceptors in the aged and AMD-afflicted human retina. *Exp. Eye*  
437 *Res.* 84, 850–857. doi:10.1016/j.exer.2007.01.005.
- 438 Puller, C., Ivanova, E., Euler, T., Haverkamp, S., and Schubert, T. (2013). OFF bipolar cells express  
439 distinct types of dendritic glutamate receptors in the mouse retina. *Neuroscience* 243, 136–  
440 148. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.03.054.
- 441 Puthussery, T., Gayet-Primo, J., and Taylor, W. R. (2010). Localization of the calcium-binding  
442 protein secretagogin in cone bipolar cells of the mammalian retina. *The Journal of*  
443 *Comparative Neurology* 518, 513–525. doi:10.1002/cne.22234.
- 444 Raven, M. A., Orton, N. C., Nassar, H., Williams, G. A., Stell, W. K., Jacobs, G. H., et al. (2008).  
445 Early afferent signaling in the outer plexiform layer regulates development of horizontal cell  
446 morphology. *The Journal of Comparative Neurology* 506, 745–758. doi:10.1002/cne.21526.
- 447 Rich, K. A., Zhan, Y., and Blanks, J. C. (1997). Migration and synaptogenesis of cone photoreceptors  
448 in the developing mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 388, 47–63. doi:10.1002/(SICI)1096-  
449 9861(19971110)388:1<47::AID-CNE4>3.0.CO;2-O.
- 450 Sato, S., Omori, Y., Katoh, K., Kondo, M., Kanagawa, M., Miyata, K., et al. (2008). Pikachurin, a  
451 dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.*  
452 11, 923–931. doi:10.1038/nn.2160.

- 453 Satz, J. S., Philp, A. R., Nguyen, H., Kusano, H., Lee, J., Turk, R., et al. (2009). Visual Impairment  
454 in the Absence of Dystroglycan. *Journal of Neuroscience* 29, 13136–13146.  
455 doi:10.1523/JNEUROSCI.0474-09.2009.
- 456 Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012).  
457 Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676.
- 458 Schmitz, F., Königstorfer, A., and Südhof, T. C. (2000). RIBEYE, a Component of Synaptic  
459 Ribbons: A Protein's Journey through Evolution Provides Insight into Synaptic Ribbon  
460 Function. *Neuron* 28, 857–872. doi:10.1016/s0896-6273(00)00159-8.
- 461 Schubert, T., Huckfeldt, R. M., Parker, E., Campbell, J. E., and Wong, R. O. (2010). Assembly of the  
462 outer retina in the absence of GABA synthesis in horizontal cells. *Neural Dev.* 5, 15.  
463 doi:10.1186/1749-8104-5-15.
- 464 Sethi, C. S., Lewis, G. P., Fisher, S. K., Leitner, W. P., Mann, D. L., Luthert, P. J., et al. (2005). Glial  
465 Remodeling and Neural Plasticity in Human Retinal Detachment with Proliferative  
466 Vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 329. doi:10.1167/iovs.03-0518.
- 467 Sherry, D. M., Wang, M. M., Bates, J., and Frishman, L. J. (2003). Expression of vesicular glutamate  
468 transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone  
469 and ON vs. OFF circuits. *J. Comp. Neurol.* 465, 480–498. doi:10.1002/cne.10838.
- 470 Sonntag, S., Dedek, K., Dorgau, B., Schultz, K., Schmidt, K.-F., Cimiotti, K., et al. (2012). Ablation  
471 of Retinal Horizontal Cells from Adult Mice Leads to Rod Degeneration and Remodeling in  
472 the Outer Retina. *J. Neurosci.* 32, 10713–10724. doi:10.1523/JNEUROSCI.0442-12.2012.
- 473 Soto, F., Watkins, K. L., Johnson, R. E., Schottler, F., and Kerschensteiner, D. (2013). NGL-2  
474 Regulates Pathway-Specific Neurite Growth and Lamination, Synapse Formation, and Signal  
475 Transmission in the Retina. *J. Neurosci.* 33, 11949–11959. doi:10.1523/JNEUROSCI.1521-  
476 13.2013.
- 477 Strettoi, E., and Pignatelli, V. (2000). Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis  
478 pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11020–11025. doi:10.1073/pnas.190291097.
- 479 Strettoi, E., Porciatti, V., Falsini, B., Pignatelli, V., and Rossi, C. (2002). Morphological and  
480 Functional Abnormalities in the Inner Retina of the rd/rd Mouse. *J. Neurosci.* 22, 5492–5504.  
481 doi:10.1523/JNEUROSCI.22-13-05492.2002.
- 482 Ströh, S., Puller, C., Swirski, S., Hölzel, M.-B., van der Linde, L. I. S., Segelken, J., et al. (2018).  
483 Eliminating Glutamatergic Input onto Horizontal Cells Changes the Dynamic Range and  
484 Receptive Field Organization of Mouse Retinal Ganglion Cells. *J. Neurosci.* 38, 2015–2028.  
485 doi:10.1523/JNEUROSCI.0141-17.2018.
- 486 tom Dieck, S., Specht, D., Strenzke, N., Hida, Y., Krishnamoorthy, V., Schmidt, K.-F., et al. (2012).  
487 Deletion of the Presynaptic Scaffold CAST Reduces Active Zone Size in Rod Photoreceptors  
488 and Impairs Visual Processing. *Journal of Neuroscience* 32, 12192–12203.  
489 doi:10.1523/JNEUROSCI.0752-12.2012.

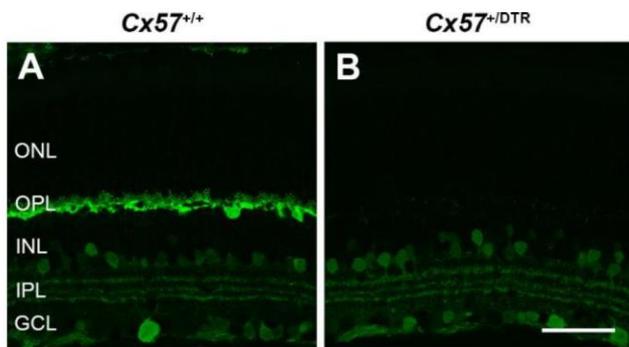
490 Wu, F., Li, R., Umino, Y., Kaczynski, T. J., Sapkota, D., Li, S., et al. (2013). Onecut1 Is Essential for  
 491 Horizontal Cell Genesis and Retinal Integrity. *J. Neurosci.* 33, 13053–13065.  
 492 doi:10.1523/JNEUROSCI.0116-13.2013.

493 Zabouri, N., and Haverkamp, S. (2013). Calcium Channel-Dependent Molecular Maturation of  
 494 Photoreceptor Synapses. *PLoS ONE* 8, e63853. doi:10.1371/journal.pone.0063853.

495 Zhang, N., and Townes-Anderson, E. (2002). Regulation of Structural Plasticity by Different  
 496 Channel Types in Rod and Cone Photoreceptors. *J. Neurosci.* 22, 7065–7079.  
 497 doi:10.1523/JNEUROSCI.22-16-07065.2002.

498

499 **10 Figure legends**



500

501 **Figure 1. Horizontal cell ablation. (A-B)** Retinal cryosections of *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice (P56)  
 502 were labeled with an antibody specific for the horizontal cell marker calbindin. In *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice,  
 503 horizontal cells were completely lost, while calbindin-positive amacrine and ganglion cells were  
 504 unaffected (**B**). Scale bar, 50  $\mu$ m.

505

506

507

508

509

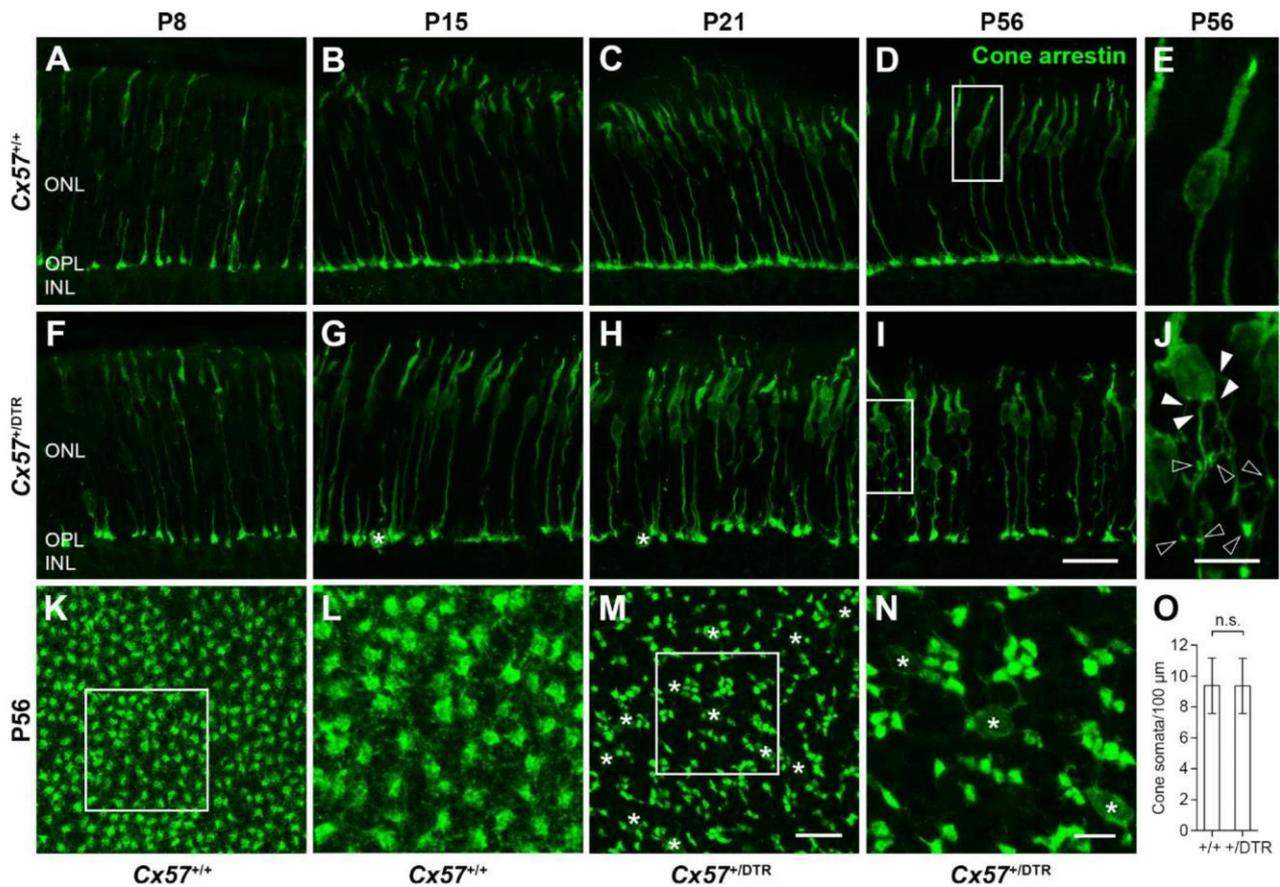
510

511

512

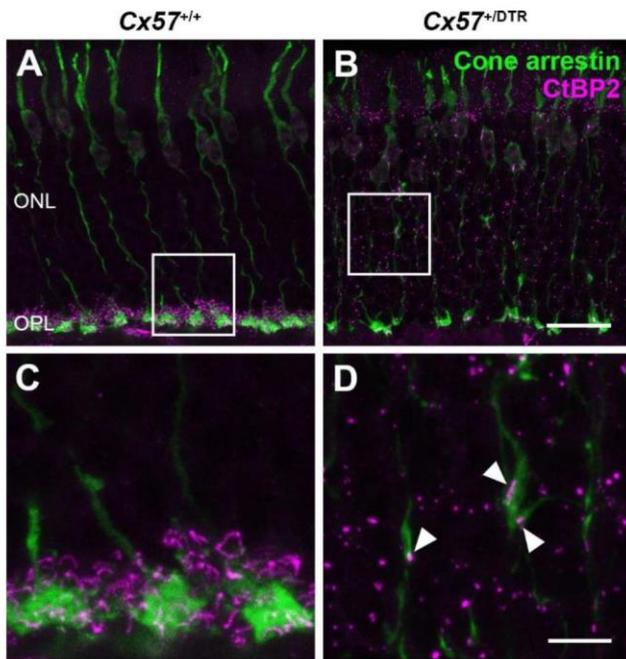
513

514



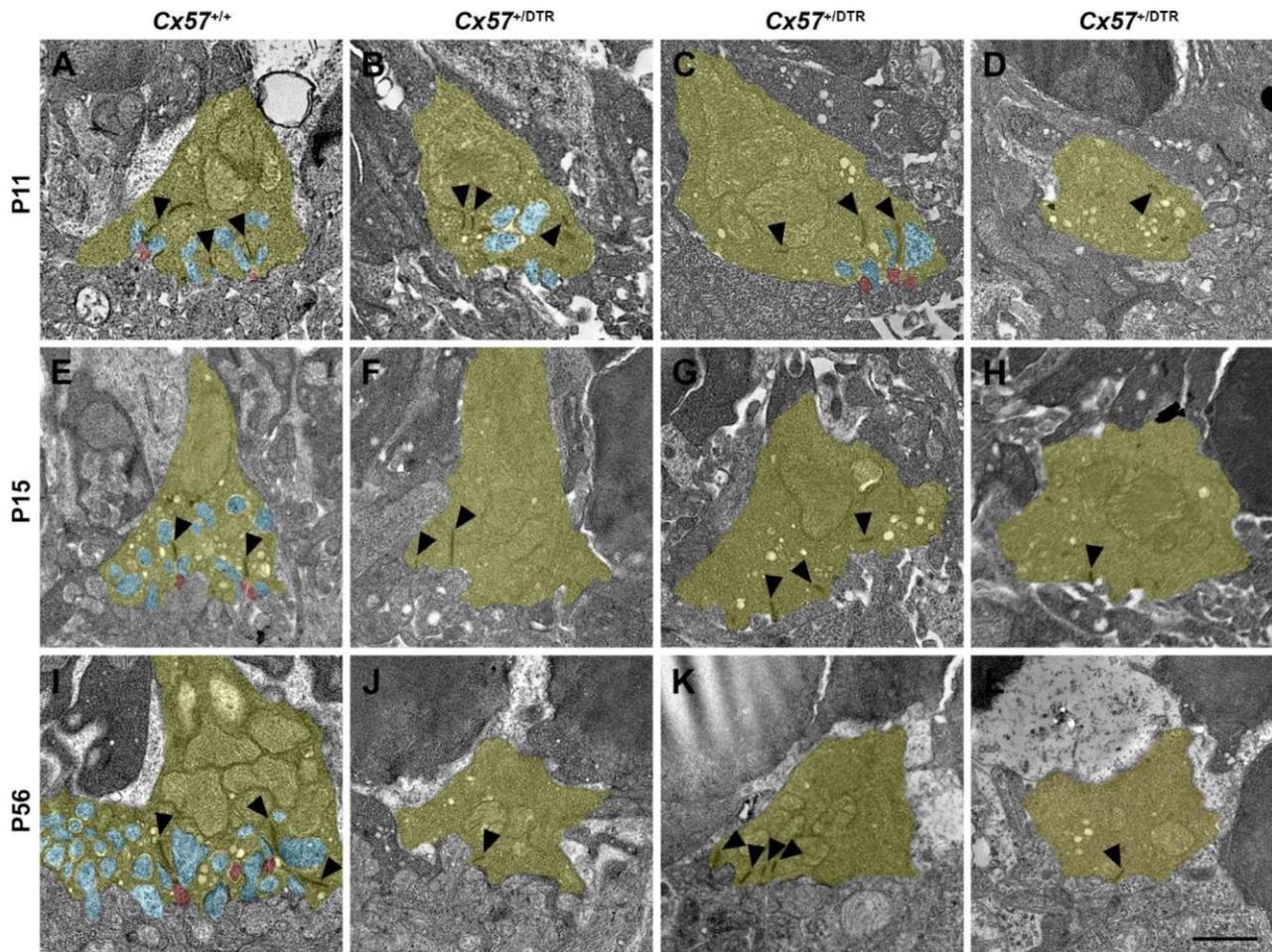
515

516 **Figure 2. Cone neurite sprouting in adult horizontal cell-ablated mice.** (A–J) Retinal cryosections  
 517 of *Cx57*<sup>+/+</sup> (A–E) and *Cx57*<sup>/DTR</sup> mice (F–J) were stained for cone arrestin, a marker for cone  
 518 photoreceptors. In wild-type mice, cones displayed the classical morphology including outer segment,  
 519 inner segment, cell body, axon and synaptic terminal (A–E). Cone somata were scattered across the  
 520 entire ONL at P8 (A) and positioned in the distal part of the ONL from P15 to P56 (B–E). In *Cx57*<sup>/DTR</sup>  
 521 mice, the cone morphology was initially comparable to that in wild-type mice (A,F). From P15 onward,  
 522 cone somata were partly mislocalized (asterisks) (G,H) and cone terminals were irregularly distributed  
 523 in the OPL (G,H,I). At P56, cones in horizontal cell-ablated mice had multiple branched axons (white  
 524 arrowheads) with numerous synaptic terminals (open arrowheads) (I,J). (K–N) Immunolabeling of  
 525 retinal whole mounts from *Cx57*<sup>+/+</sup> and *Cx57*<sup>/DTR</sup> mice (P56) with antibodies against cone arrestin. In  
 526 the OPL of wild-type mice, cone pedicles formed a regular mosaic (K,L), whereas in horizontal cell-  
 527 ablated mice, cone pedicles were unevenly spaced and several mislocalized cone somata were apparent  
 528 (asterisks) (M,N). (O) Quantification of cone somata in vertical sections of wild-type (*n* = 3) and  
 529 horizontal cell-ablated retinæ (*n* = 3) (P56). *p* = 0.9736, *t* test. Values are presented as mean ± SD.  
 530 Scale bars, 25 μm (I,M), 10 μm (J,N).



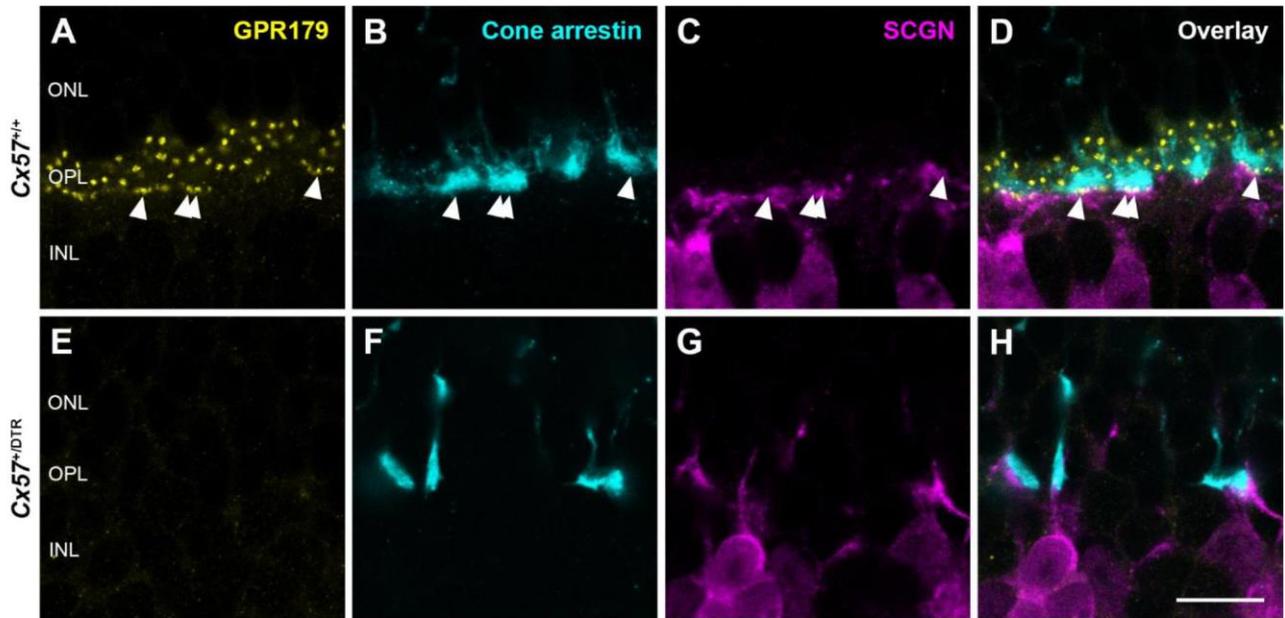
531

532 **Figure 3. Ribbons in new cone terminals.** (A-D) Double staining of vertical sections from  $Cx57^{+/+}$   
 533 and  $Cx57^{+/DTR}$  mice (P56) for cone arrestin, a cone marker (green), and CtBP2 (magenta), a synaptic  
 534 ribbon marker. In the outer retina of wild-type mice, ribbons were horseshoe shaped and confined to  
 535 the OPL (A,C). By contrast, ribbons in horizontal cell-ablated mice were smaller and distributed over  
 536 the entire ONL (B,D). In addition, CtBP2-positive structures were frequently found in ectopic cone  
 537 terminals (arrowheads) (D). Scale bars, 20  $\mu\text{m}$  (B), 5  $\mu\text{m}$  (D).



538

539 **Figure 4. Loss of ON bipolar cell invaginations in cone terminals.** (A-L) Electron microscopic  
 540 analysis of individual cone terminals from *Cx57<sup>+/+</sup>* and *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice at different ages (P11, P15,  
 541 P56). Cone terminals (yellow) in wild-type mice contained triads composed of horizontal cell dendrites  
 542 (blue) and ON bipolar cell dendrites (red) as early as P11 (A,E,I). In horizontal cell-ablated mice,  
 543 some cone terminals with horizontal cell invaginations were found at P11 (B). However, triads were rarely  
 544 observed (C) and most cone pedicles contained no invaginations (D). At P15 and P56, cone terminals  
 545 were generally lacking any invaginations in *Cx57<sup>+/DTR</sup>* mice (F-H,J-L). Ribbons were often shorter  
 546 and free-floating (arrowheads) (B-D,F-H,J-L). Scale bar, 1  $\mu$ m.



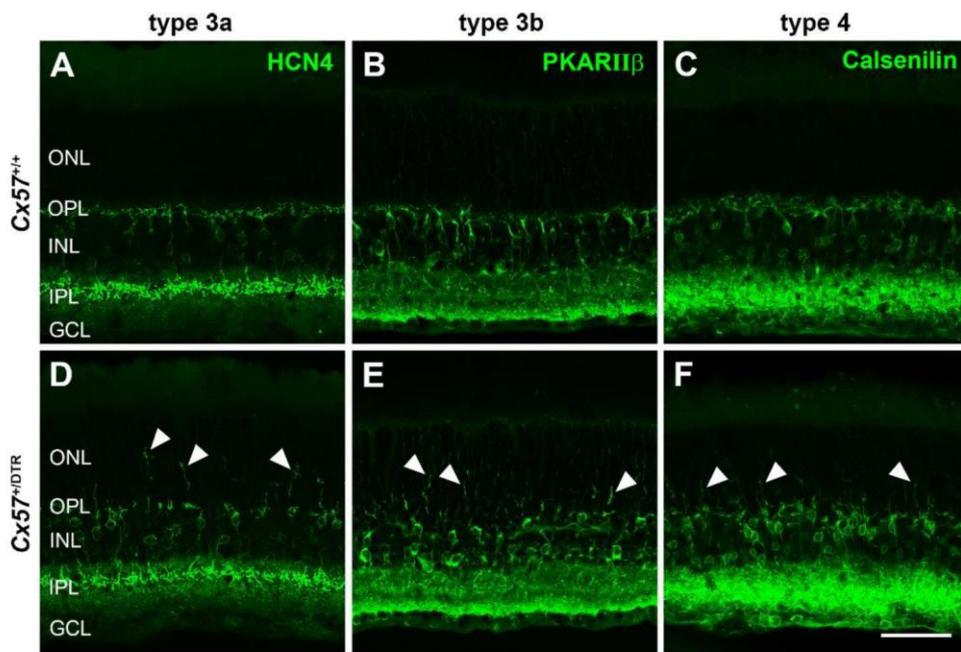
547

548 **Figure 5. Absence of functional synapses between cones and ON bipolar cells in adult horizontal**  
 549 **cell-ablated mice. (A-H)** Triple labeling of retinae from  $Cx57^{+/+}$  and  $Cx57^{+/DTR}$  mice (P56) for  
 550 GPR179 (a component of the mGluR6 macromolecular complex, yellow), cone arrestin (a marker for  
 551 cones, blue) and SCGN (a marker for a subset of ON and OFF bipolar cells, magenta). In wild-type  
 552 mice, GPR179-immunoreactive puncta were observed at contact points between cone pedicles and  
 553 bipolar cell dendrites (arrowheads) (A-D). In contrast, GPR179 labeling was completely absent in  
 554  $Cx57^{+/DTR}$  mice (E-H), suggesting that adult horizontal cell-ablated mice lack functional synapses  
 555 between cones and ON bipolar cells. Scale bar, 10  $\mu$ m.

556

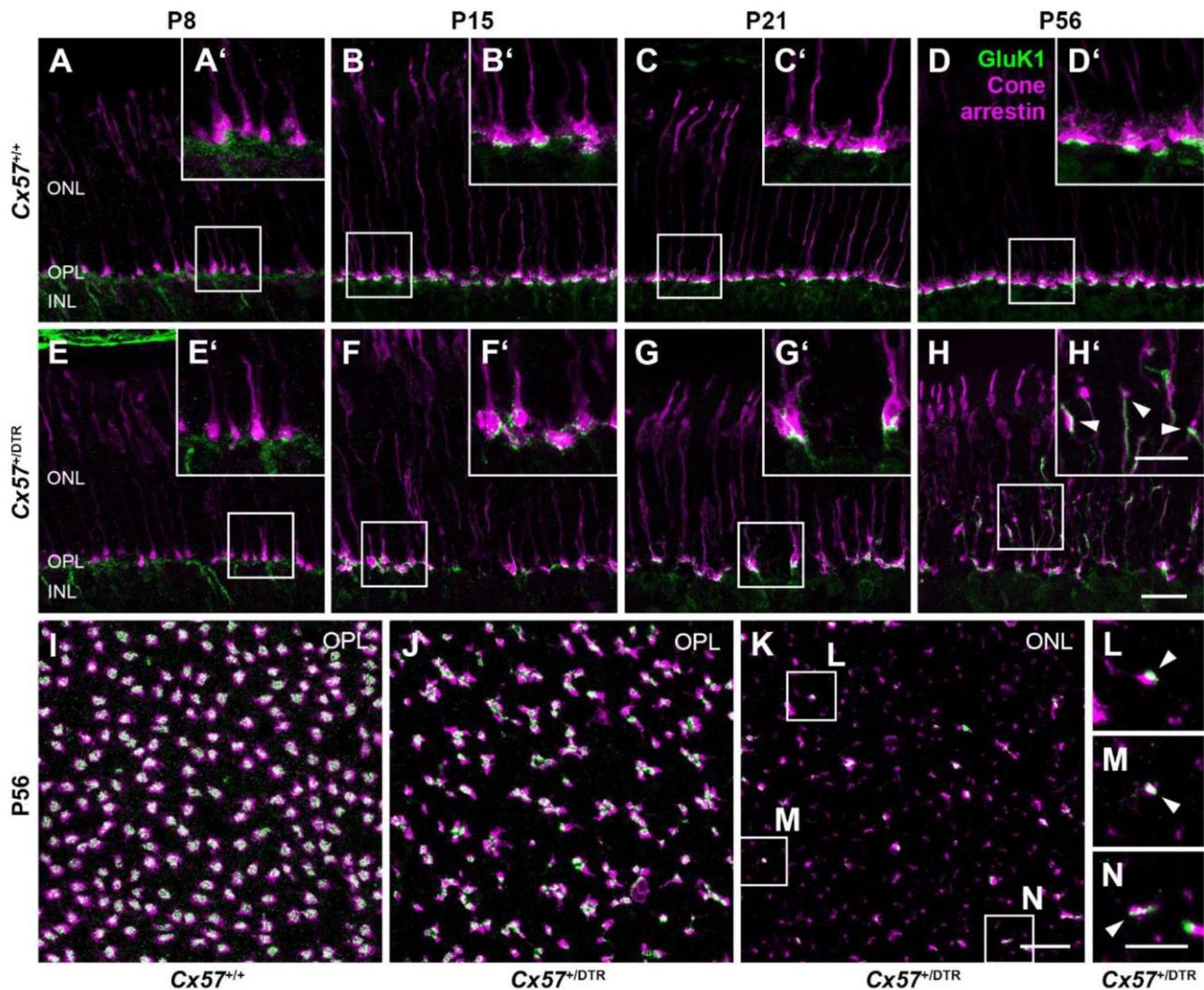
557

558



559

560 **Figure 6. OFF bipolar cells sprouted into the ONL.** (A-F) Retinal sections from *Cx57<sup>+/+</sup>* and  
 561 *Cx57<sup>+/DTR</sup>* retinae (P56) were stained for HCN4, PKARII $\beta$  and calsenilin, markers for type 3a, 3b and  
 562 4 OFF bipolar cells, respectively. While the dendrites of type 3a, 3b and 4 OFF bipolar cells terminated  
 563 in the OPL in wild-type mice (A-C), all three types showed an extensive outgrowth of dendrites into  
 564 the ONL in horizontal cell-ablated mice (arrowheads) (D-F). Scale bar, 50  $\mu$ m.



565

566 **Figure 7. Cones established new synapses with OFF bipolar cells. (A-H')** Double labeling of  
 567 vertical sections from  $Cx57^{+/+}$  and  $Cx57^{+/DTR}$  retinae for the kainate receptor subunit GluK1 and the  
 568 cone marker cone arrestin. In wild-type and horizontal cell-ablated mice, GluK1 immunoreactivity was  
 569 found below the base of the cone terminals in the OPL from P8 to P56 (A-H). In  $Cx57^{+/DTR}$  retinae, at  
 570 P56, outgrowing GluK1-positive dendrites made contacts with the newly formed cone terminals in the  
 571 ONL (arrowheads) (H'). (I-N) Double staining of retinal whole mounts from  $Cx57^{+/+}$  (K) and  
 572  $Cx57^{+/DTR}$  mice (P56) (L-N) for GluK1 and cone arrestin. At the level of the OPL, cone terminals were  
 573 associated with GluK1 staining in both genotypes (I,J). Ectopic cone terminals in the ONL of  
 574 horizontal cell-ablated mice were directly connected to GluK1-positive dendrites (arrowheads) (K-N),  
 575 suggesting the formation of new synapses. Scale bars, 20  $\mu\text{m}$  (H,K), 10  $\mu\text{m}$  (H',N).

576

577

578

579

580 11 Tables

581 **Table 1: List of primary antibodies used in this study.**

<b>Antibody</b>	<b>Host, type</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source, Catalog #, RRID</b>
Calbindin D-28k	Rabbit, polyclonal	1:500	Swant, CB-38, AB_2721225
Cone arrestin	Rabbit, polyclonal	1:1,000	Millipore, AB15282, AB_1163387
Calsenilin	Mouse, monoclonal	1:2,000	Millipore, 05-756, AB_309969
CtBP2	Mouse, monoclonal	1:5,000	BD Biosciences, 612044, AB_399431
Ca <sub>v</sub> 1.1	Mouse, monoclonal	1:500	Millipore, MAB427, AB_2069582
GluK1	Mouse, monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology, sc-393420, AB_2716684
HCN4	Rat, polyclonal	1:100	Gift from Frank Müller (FZ Jülich, Jülich, Germany)
PKARIIB	Mouse, monoclonal	1:1,500	BD Biosciences, 610625, AB_397957
SCGN	Sheep, polyclonal	1:1,000	BioVendor Laboratory Medicine, RD184120100, AB_2034062

582

---

#### 6.2.4 Phosphorylation of connexin36 near the C-terminus switches binding affinities for PDZ-domain and 14–3–3 proteins in vitro

Autoren:

Stephan Tetenborg<sup>1</sup>, Helen Y. Wang<sup>2</sup>, Lena Nemitz<sup>3</sup>, Anne Depping<sup>1</sup>, Alexandra B. Espejo<sup>4</sup>, Jaya Aseervatham<sup>2</sup>, Mark T. Bedford<sup>4</sup>, Ulrike Janssen-Bienhold<sup>3,5</sup>, John O'Brien<sup>2</sup>, Karin Dedek<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Neurosensorik, Institut für Biologie und Umweltwissenschaften, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

<sup>2</sup>Ruiz Department of Ophthalmology & Visual Science, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX 77030, USA

<sup>3</sup>Neurobiologie des Sehens, Department für Neurowissenschaften, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

<sup>4</sup>Department of Epigenetics and Molecular Carcinogenesis, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Smithville, TX78957, USA

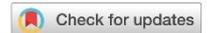
<sup>5</sup>Forschungszentrum Neurosensorik, Universität Oldenburg, Oldenburg, Deutschland

Autorenbeiträge:

ST, JO'B, MTB, UJB und KD konzipierten die Studie; ST, LN, AD, ABE, JA und HYW führten die Experimente und Datenanalyse durch; ST, HYW, MTB und JO'B erstellten die Abbildungen, die von KD bearbeitet wurden; KD schrieb mit Hilfe von ST einen ersten Entwurf des Manuskripts; der Entwurf wurde von allen Autoren überarbeitet und kommentiert; KD stellte das Manuskript fertig.

Veröffentlicht in:

Scientific Reports



OPEN

# Phosphorylation of Connexin36 near the C-terminus switches binding affinities for PDZ-domain and 14–3–3 proteins in vitro

Stephan Tetenborg<sup>1,2</sup>, Helen Y. Wang<sup>2</sup>, Lena Nemitz<sup>3</sup>, Anne Depping<sup>1</sup>, Alexandra B. Espejo<sup>4</sup>, Jaya Aseervatham<sup>2</sup>, Mark T. Bedford<sup>4</sup>, Ulrike Janssen-Bienhold<sup>3,5</sup>, John O'Brien<sup>2,6</sup> & Karin Dedek<sup>1,5,6</sup>✉

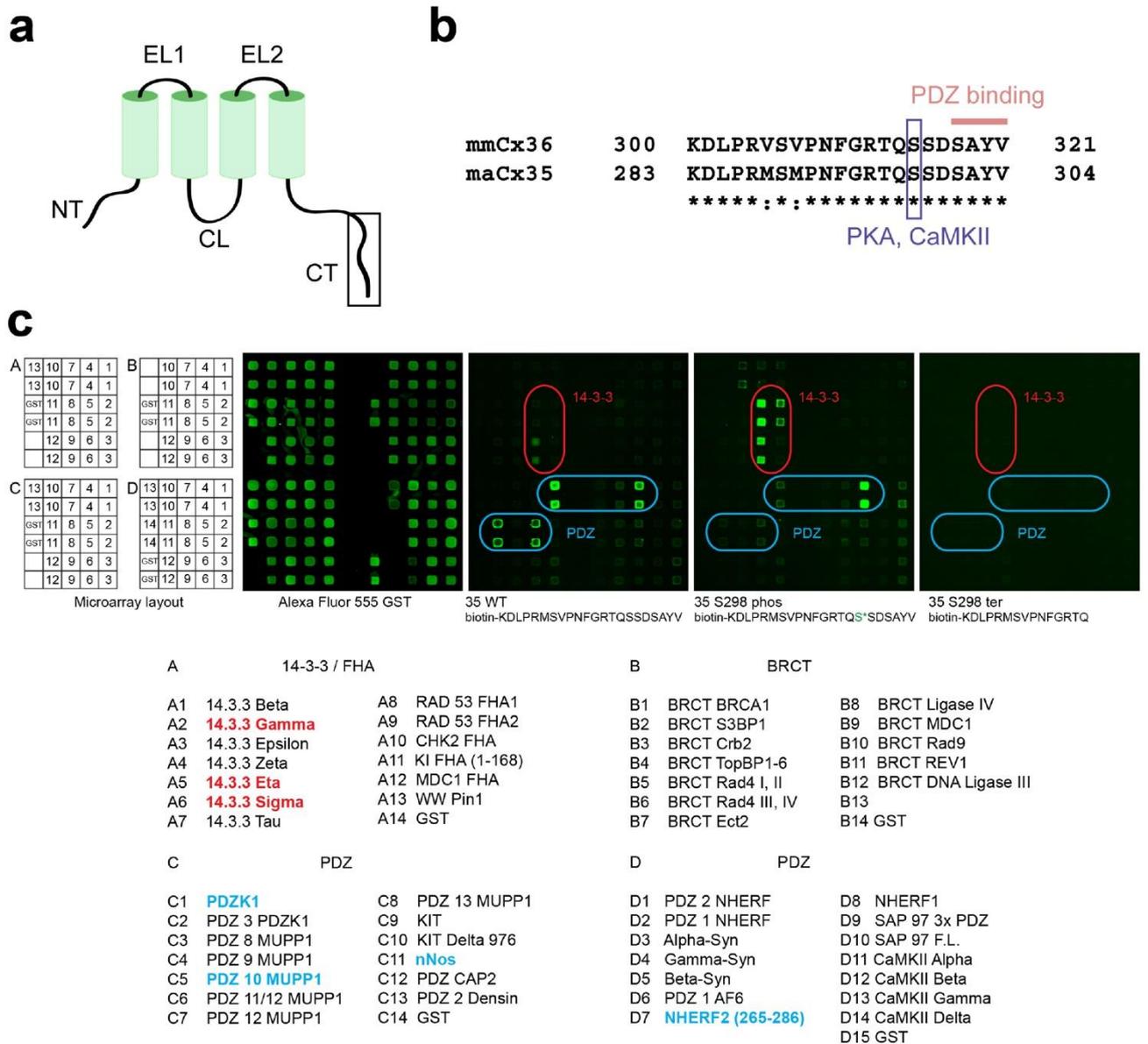
Connexin36 (Cx36) is the most abundant connexin in central nervous system neurons. It forms gap junction channels that act as electrical synapses. Similar to chemical synapses, Cx36-containing gap junctions undergo activity-dependent plasticity and complex regulation. Cx36 gap junctions represent multimolecular complexes and contain cytoskeletal, regulatory and scaffolding proteins, which regulate channel conductance, assembly and turnover. The amino acid sequence of mammalian Cx36 harbors a phosphorylation site for the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II at serine 315. This regulatory site is homologous to the serine 298 in perch Cx35 and in close vicinity to a PDZ binding domain at the very C-terminal end of the protein. We hypothesized that this phosphorylation site may serve as a molecular switch, influencing the affinity of the PDZ binding domain for its binding partners. Protein microarray and pulldown experiments revealed that this is indeed the case: phosphorylation of serine 298 decreased the binding affinity for MUPP1, a known scaffolding partner of connexin36, and increased the binding affinity for two different 14–3–3 proteins. Although we did not find the same effect in cell culture experiments, our data suggest that phosphorylation of serine 315/298 may serve to recruit different proteins to connexin36/35-containing gap junctions in an activity-dependent manner.

In the central nervous system, electrical synapses directly connect the cytoplasm of neighboring neurons and provide a means for fast signal transmission. Electrical synapses are formed by gap junctions, which are assembled from connexin molecules. Among these proteins, Connexin36 (Cx36) is the most abundant connexin isoform in neurons of the mammalian central nervous system. It is strongly expressed in the olfactory bulb<sup>1</sup>, inferior olive<sup>2</sup>, hippocampus<sup>3</sup>, and the retina<sup>3</sup> and is important for signal synchronization<sup>2,4</sup>, network oscillation<sup>4</sup>, and signal-to-noise amplification<sup>5</sup>. Moreover, Cx36 is essential for the primary and secondary rod pathways in the retina<sup>6–8</sup>.

Recent evidence shows that gap junction channels are not simple intercellular channels but undergo complex, activity-dependent regulation<sup>9–12</sup>. In the mammalian retina, for example, coupling in AII amacrine cells is increased by calcium influx through extra-synaptic NMDA receptors, subsequent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII, presumably CaMKII- $\delta^{13}$ ), and phosphorylation of Cx36<sup>9</sup>.

Similar to chemical synapses, gap junctions form microcompartments that assemble a plethora of proteins, which regulate synaptic strength in response to pH, voltage or Ca<sup>2+</sup> changes. Among these proteins, several kinases were shown to directly or indirectly modulate Cx36-containing gap junctions, e.g., protein kinase A<sup>14–16</sup> (PKA) and CaMKII<sup>9,11,17</sup>, with different CaMKII isoforms presumably regulating Cx36 in different neuronal cell types<sup>13</sup>. Accordingly, the protein sequence of mouse (*Mus musculus*, *mm*) Cx36 contains several consensus motifs for PKA, CaMKII and other kinases<sup>11,18</sup>. Serine 315 (S315) constitutes a CaMKII phosphorylation site<sup>11</sup>, which is

<sup>1</sup>Animal Navigation/Neurosensorys, Institute for Biology and Environmental Sciences, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany. <sup>2</sup>Ruiz Department of Ophthalmology & Visual Science, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, TX 77030, USA. <sup>3</sup>Visual Neuroscience, Dept. of Neuroscience, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany. <sup>4</sup>Department of Epigenetics and Molecular Carcinogenesis, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Smithville, TX 78957, USA. <sup>5</sup>Research Center Neurosensory Science, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany. <sup>6</sup>These authors contributed equally: John O'Brien and Karin Dedek. ✉email: karin.dedek@uol.de



**Figure 1.** Protein microarray data indicate that phosphorylation of S298 in maCx35 may act as a functional switch. (a) Membrane topology of connexins. N- and C-terminal tails (NT and CT, respectively) and the cytoplasmic loop (CL) reside inside the cytoplasm. The two extracellular loops (EL) are also indicated. (b) Sequence of the C-terminal end of maCx35/mmCx36, as indicated by the box in (a). Sequence identity (\*) is high for mmCx36 and maCx35 at the C-terminal end. The blue box indicates a PKA/CaMKII consensus site at position S315 and S298 for mmCx36 and maCx35, respectively. The last four amino acids represent a PDZ binding domain, present in both proteins. (c) Microarray layout (A-D); the respective baits (all fused to GST) are found below. An array probed with Alexa Fluor 555 anti-GST antibody served as positive control. Peptides fused to biotin containing the C-terminal tail of maCx35 (35 WT), phosphorylated maCx35 (35 S298 phos), and a truncated version (35 S298 ter) were used as probes and showed differential results, marked by rounded squares. 14-3-3 proteins (red) and NHERF2 aa265-288 (blue D7) showed an increased binding to the 35 S298 phospho probe compared to 35 WT. In contrast, PDZK1, PDZ10 of MUPP1, and nNOS (blue) decreased their binding to the 35 S298 phospho probe. The truncated 35 S298 ter probe showed no binding interactions.

located close to the C-terminal end of the protein and thereby in immediate vicinity of the PDZ binding domain formed by the last four amino acids (Fig. 1a,b). This PDZ binding domain seems to be important for channel assembly<sup>19</sup> and may help to recruit scaffolding proteins<sup>20</sup>. Both, the phosphorylation site and the PDZ binding domain are conserved among species, e.g., S298 in perch (*Morone americana*, *ma*) Cx35 (Fig. 1b), which points towards an essential function for these motifs in gap junction regulation.

Because of the close proximity of S315/298 to the PDZ binding domain at the C-terminal end of mmCx36/maCx35, respectively, we hypothesized that phosphorylation of S315/298 may regulate the binding of interaction partners to the PDZ binding domain. Two potential regulatory actions are conceivable: phosphorylation may either increase or decrease binding, providing a means to regulate the interaction with different partners in an

Construct	Description	Species
His PDZ-10 MUPP1	Tagged PDZ 10 domain of MUPP1	Mouse
GST-PDZK1	Tagged full length PDZK1	Mouse
GST-NHERF2	Tagged full length NHERF2	Mouse
GST-14-3-3- $\gamma$	Tagged full length GST-14-3-3- $\gamma$	Rat
GST-14-3-3- $\eta$	Tagged full length GST-14-3-3- $\eta$	Human
GST-14-3-3- $\sigma$	Tagged full length GST-14-3-3- $\sigma$	Human

**Table 1.** List of constructs tested in peptide pull-downs.

activity-dependent way. Here, we provide evidence that such a phosphorylation-mediated switch of Cx36/35 binding partners occurs *in vitro*. A protein microarray was used to identify candidate proteins whose interaction may change by phosphorylation of the serine residue. Most of these candidates were tested subsequently in pull-down assays. We found that phosphorylation of S298 in maCx35 increased the interaction with 14-3-3  $\gamma$  and  $\eta$  whereas it decreased the interaction with PDZ10 of MUPP1. Although cell culture experiments did not reveal the same effect, our data indicate that in neuronal Cx36/Cx35, phosphorylation of S315/298 may serve as a switch to recruit different scaffolding partners to the gap junction plaque.

## Results

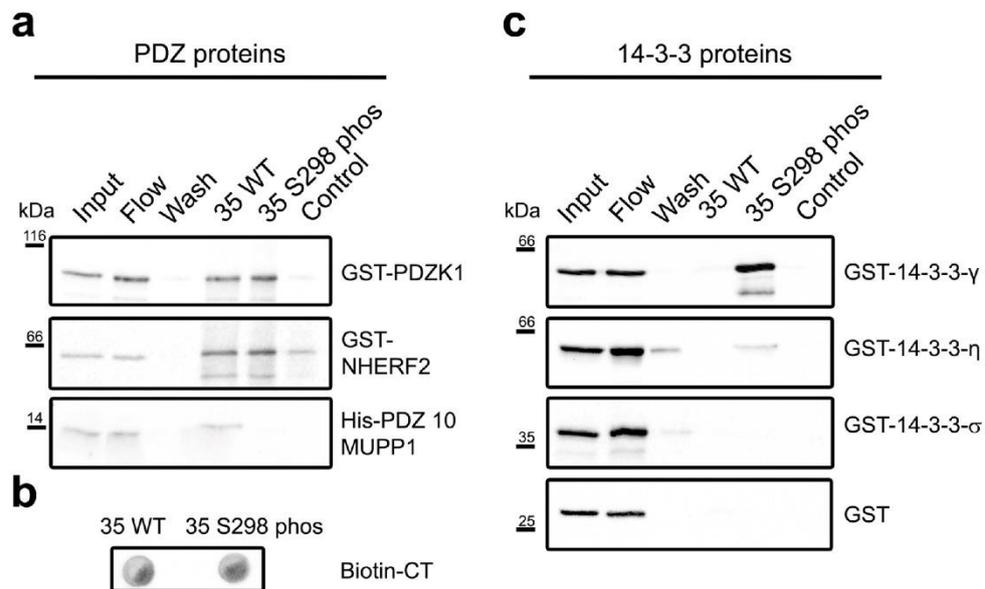
**Protein domain microarray probed with peptides of the maCx35 C-terminal.** Phosphorylation and dephosphorylation of proteins occur at serine, threonine and tyrosine residues. Both posttranslational modifications may change the protein conformation, leading to changes in protein properties, such as stability, localization and interaction with other proteins<sup>21</sup>. Here, we hypothesized that phosphorylation of residue S315/298 in mmCx36/maCx35 may alter the binding of proteins to the PDZ binding domain at the very C-terminal end of the protein.

To investigate this, we first performed a protein microarray study<sup>22</sup>. Proteins either containing PDZ domains or involved in phosphorylation detection were immobilized as GST fusion proteins on the array substrate and used as baits (Fig. 1c). The arrays were probed with three different maCx35 constructs for preys, fused to biotin and pre-conjugated to Cy3-streptavidin: (1) the wild-type C-terminus of maCx35, (2) the same sequence but with a phosphorylation at S298 (phospho-S298), and (3) the C-terminal tail truncated at S298 (S298 ter). We found that three ( $\gamma$ ,  $\eta$  and  $\sigma$ ) out of seven 14-3-3 protein isoforms and the PDZ domain of NHERF2 (aa 265–288) strongly increased their binding to the C-terminal tail of maCx35 when S298 was phosphorylated. Conversely, other PDZ domains and PDZ-containing proteins (PDZK1, PDZ10 of MUPP1, and nNOS) decreased their binding to the C-terminal tail of the phosphorylated maCx35. Control experiments with the truncated C-terminal tail of maCx35 confirmed the specificity of the interaction: none of the proteins bound to the truncated tail, in which the phosphorylation site and PDZ-binding domain were missing (Fig. 1c). Repeat experiments using mmCx36 C-terminal peptides with larger PDZ domain arrays corroborated NHERF2 results and similarly revealed phosphorylation-dependent decrease in binding to PDZ domains from Chapsyn110, PSD95 and SAP102 (Supplementary Fig. 1).

**Pull-down experiments with purified proteins.** Several of the hits in the microarray screen were then tested for interaction in pull-down experiments (see Table 1 for details on constructs). maCx35 peptides (previously used in the microarray) were coupled to streptavidin beads and incubated with individual proteins that were identified in the array. Again, we used the wild-type C-terminus and a modified version (maCx35 S298 phos) to test for phosphorylation-dependent interactions (Fig. 2; Supplementary Figs. 2 and 3). Empty beads (without conjugated peptide) served as control. We tested GST-fused PDZK1, NHERF2 and PDZ 10 of MUPP1 for interaction with the wild-type and the phosphorylated C-terminal tail of maCx35 (Fig. 2a). A drop blot was used to control for equal amounts of both maCx35 peptides (Fig. 2b). We found—consistent with the protein microarray data—that PDZ10 of MUPP1 bound strongly to the wild-type C-terminal tail of maCx35 but not to the phosphorylated form. In contrast, PDZK1 did not show differential binding to the two maCx35 constructs. NHERF2 showed a similar interaction with wild-type and phosphorylated maCx35 as PDZK1 but even bound to the empty beads so that we could not draw any conclusions about the specificity of its binding. However, our data confirmed the phosphorylation-dependent interaction of maCx35 and PDZ 10 of MUPP1.

Data from the protein microarray also suggested that 14-3-3 proteins may increase their binding to maCx35 when S298 is phosphorylated. This was confirmed by the pull-down experiments (Fig. 2c). 14-3-3  $\gamma$ ,  $\eta$  and  $\sigma$  (full-length) were fused to GST and tested in the same way as the PDZ domain-containing constructs. While GST alone and 14-3-3  $\sigma$  did not show any binding to the maCx35 constructs or the empty control beads,  $\gamma$  and  $\eta$  strongly bound to maCx35 when S298 was phosphorylated.

Thus, our data provide evidence that MUPP1 (via PDZ 10) and 14-3-3 proteins  $\gamma$  and  $\eta$  bind differentially to the C-terminal tail of maCx35: MUPP1 increases its binding when S298 is *not* phosphorylated whereas the two 14-3-3 proteins bind stronger when S298 is phosphorylated. As mentioned above, this may provide a means to differentially regulate the recruitment of proteins to the gap junction site in a phosphorylation- (i.e., activity-) dependent manner.

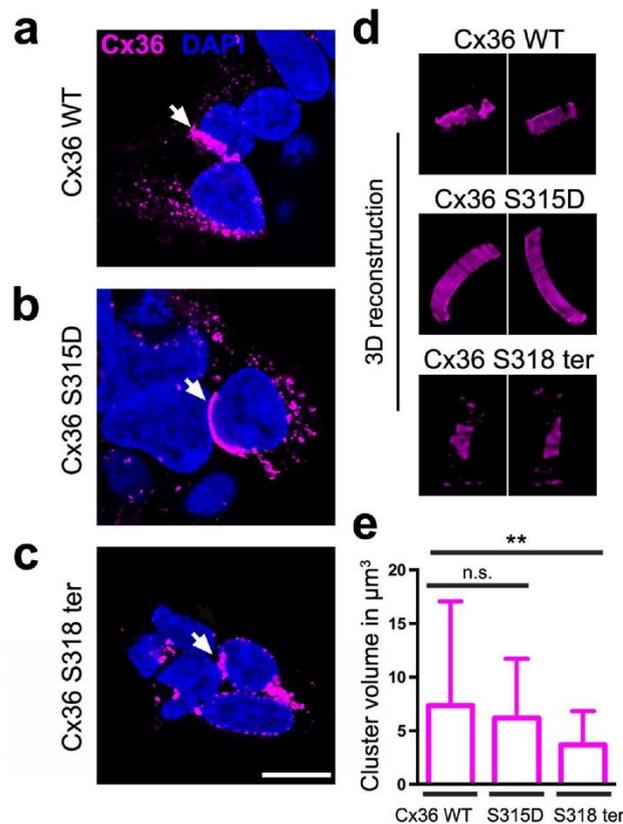


**Figure 2.** Pull-down experiments confirmed the phosphorylation-induced change in interaction of PDZ10 of MUPP1 and 14–3–3 proteins with maCx35. **(a)** Pull-down experiments using GST-coupled PDZK1, NHERF2 and the tenth PDZ domain of MUPP1 (PDZ 10 MUPP1). PDZK1 and NHERF2 bound to both WT and S298 phospho peptides, but both proteins showed residual binding to the empty beads (control). PDZ-10 MUPP1 showed decreased binding to the C-terminal tail of maCx35 when S315 was phosphorylated (35 S298 phos) compared to the non-phosphorylated form (35 WT). **(b)** Drop blot, demonstrating that phosphorylated and non-phosphorylated maCx35 constructs had similar concentrations. **(c)** GST-bound 14–3–3 proteins  $\gamma$  and  $\eta$  showed increased binding to the phosphorylated form of maCx35. 14–3–3  $\sigma$ , in contrast, did not bind to the C-terminal tail of maCx35. GST alone did not show any binding to the beads. Each pull-down was performed 2–4 times.

**Does phosphorylation of S315 in mmCx36 change the size of the gap junction?** Earlier studies<sup>23,24</sup> showed that phosphorylation of connexins may alter the internalization rate and affect gap junction size. Therefore, we tested in cultured cells whether the phosphorylation of S315 has an influence on the size of gap junctions. As we have successfully used mmCx36 in a mammalian expression system to measure gap junction volume<sup>25</sup> and sequences for mouse and perch connexins are conserved with respect to the phosphorylated serine and PDZ binding domain (Fig. 1b), we cloned an mmCx36 variant, in which S315 was mutated to aspartate (S315D) to mimic the phosphorylation of the serine residue. HEK293 cells were transfected with either wild-type mmCx36 or the phosphomimetic construct and gap junctions were 3D reconstructed and measured in volume (Fig. 3) as described<sup>25</sup>. The volume of gap junctions between adjacent cells was similar between wild-type mmCx36 and the S315D mutant (Fig. 3a,b,e; mean  $\pm$  SD cluster size in  $\mu\text{m}^3$ : Cx36 WT:  $7.4 \pm 9.7$ ; Cx36 S315D:  $6.2 \pm 5.5$ ;  $p = 0.521$ , 123/138 cell pairs from 4 transfections, Mann–Whitney test). This suggests that phosphorylation of mmCx36 S315 does not affect gap junction size in HEK293 cells. However, when we compared gap junction volume between mmCx36 and a truncated mutant (Cx36 S318 ter), we found clusters to be significantly smaller in the truncated mutant (Fig. 3c–e, Cx36 WT:  $7.4 \pm 9.7$ ; Cx36 S318 ter:  $3.7 \pm 3.2$ ;  $p = 0.0011$ , 123/138 cell pairs from 4 transfections, Mann–Whitney test), consistent with an earlier report<sup>20</sup>.

**Does phosphorylation of S315 in mmCx36 change the interaction with MUPP1 in HEK293 cells?** Next, we asked whether phosphorylation of S315 alters the interaction of mmCx36 with MUPP1 (from rat, *Rattus norvegicus*, *rn*) in HEK293 cells. Again, we used the wild-type and phosphomimetic mutant (S315D) and cotransfected it with MUPP1, which was fused to GFP (GFP-MUPP1, Fig. 4). GFP-MUPP1 strongly colocalized with both constructs (Fig. 4a,b,d) but we did not find any differences between the volume of gap junctions for wild-type mmCx36 and the phosphomimetic mutant (mean  $\pm$  SD cluster size in  $\mu\text{m}^3$ : mm Cx36 WT: Cx36:  $4.4 \pm 3.7$ ; MUPP1:  $4.8 \pm 4.6$ ;  $p = 1$ ; mmCx36 S315D: Cx36:  $5.7 \pm 5.7$ ; MUPP1:  $5.2 \pm 6.7$ ;  $p = 0.4$ ; 34–45 cell pairs from 2 transfections, Mann–Whitney test; Fig. 4e). Thus, mimicking the phosphorylation of mmCx36 at S315 did not affect the interaction with MUPP1.

As an earlier report<sup>20</sup> showed that MUPP1 binds to the very C-terminal tail of Cx36, we also cotransfected GFP-MUPP1 with a truncated version of mmCx36. As expected, GFP-MUPP1 was not detected in Cx36-containing gap junctions (Fig. 4c–e) and consequently, the volume of clusters formed by GFP-MUPP1 and mmCx36 S318 ter differed significantly (mean  $\pm$  SD cluster size in  $\mu\text{m}^3$ : mmCx36 WT: Cx36:  $4.4 \pm 3.7$ ; MUPP1:  $4.8 \pm 4.6$ ;  $p = 1$ ; S318 ter: Cx36:  $7.1 \pm 8.0$ ; MUPP1:  $0.5 \pm 1.3$ ;  $p < 0.0001$ ; 31–45 cell pairs from 2 transfections, Mann–Whitney test, Fig. 4e). This confirmed that binding of PDZ 10 of MUPP1 to mmCx36 is mediated by the PDZ binding domain at the very C-terminal end of the protein. Interestingly, while several studies<sup>19,25</sup> earlier reported that the



**Figure 3.** A phosphomimetic S315D mutation in mmCx36 did not change the size of mmCx36-containing gap junctions. HEK293 cells transfected either with mmCx36 WT (a), the S315D mutant (b), which mimics the phosphorylation of S315 in mmCx36, or a truncated Cx36 variant (c). Gap junctions were detected between adjacent cells and reconstructed (d). (e) Quantification of gap junction volume showed that the S315D mutation did not alter gap junction size in transfected HEK293 cells, in contrast to the truncation which led to significantly smaller gap junctions. Values are given as mean  $\pm$  SD; n.s., not significant; \*\* $p < 0.01$ ; Mann–Whitney test,  $n = 123/138$  cell pairs from 4 transfections. Scale: 10  $\mu$ m.

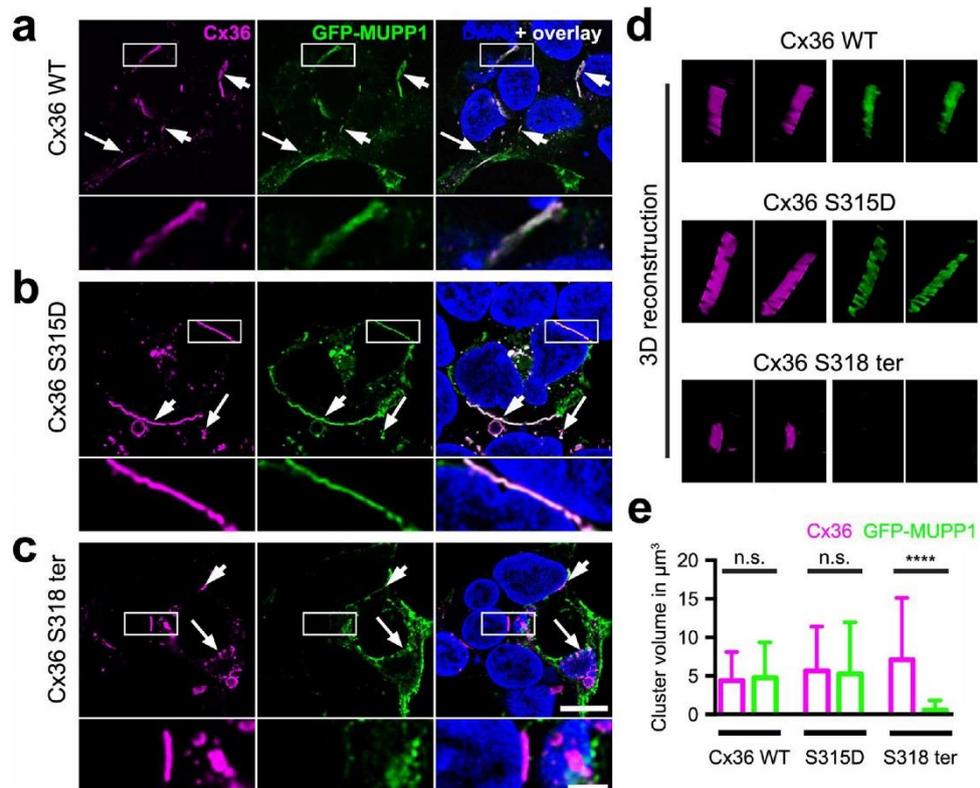
truncated protein (mmCx36 S318 ter) fails to form gap junctions in transfected HeLa cells, the same construct assembled into gap junctions in HEK293 cells, suggesting that the assembly machinery differs between cell lines.

**Does glutamate-induced activation of CaMKII change the interaction of mmCx36 and PSD95 in HeLa cells?** Our results so far suggest that the phosphomimetic mutants might not be a good substitution for phosphorylated serine residues because they differ in charge and size (see “Discussion”). We next tried to circumvent this problem and tested the association of PSD95 and mmCx36 in HeLa cells upon activation of CaMKII. PSD95 was chosen because it closely associates with Cx36-containing gap junctions in photoreceptors<sup>26</sup>. To stimulate endogenous CaMKII activity and consequently phosphorylation of mmCx36, we treated transfected HeLa cells with 100  $\mu$ M glutamate for 15 min (Fig. 5a–l) as we recently showed that this treatment increases gap junction coupling approximately two-fold via the activation of endogenous NMDA receptors and CaMKII<sup>27</sup>. However, when we compared the intensity ratio of PSD95 and Cx36 at gap junctions between adjacent HeLa cells, we did not detect any significant differences between untreated (control, Fig. 5a–f,s) and treated HeLa cells (Fig. 5g–l,s;  $p = 0.889$ , two-tailed t-test;  $n = 12$  gap junctions per condition).

We also tested binding of mmCx36 and PSD95 (PDZ domain 2) in a microarray. SAP102 was also added due to its similarity to PSD95, sharing with it three PDZ domains, an SH3 domain and a C-terminal guanylate kinase domain. For both proteins, phosphorylation of S315 in mmCx36 led to a decrease in binding of the PDZ domain (Fig. 5t,u; Supplementary Fig. 1). However, even when S315 was phosphorylated, PDZ domain binding was not abolished but only reduced. The fact that we see similar results with two closely related proteins (PSD95 and SAP102) corroborates the hypothesis of a universal phosphorylation-dependent switch. Additionally, the rather moderate effect on the binding affinity could explain the preserved association of PSD95 and Cx36 we see in transfected HeLa cells stimulated with glutamate.

To confirm that the association of mmCx36 and PSD95 is mediated via the PDZ binding domain in the C-terminal tail of Cx36, we transfected HeLa cells with the truncated Cx36 protein (mmCx36 S318 ter) and FLAG-tagged PSD95. As expected, PSD95 showed virtually no colocalization with Cx36 (Fig. 5m–r).

In summary, *in vitro* experiments using C-terminal peptides of mmCx36/maCx35, which carried a phosphorylation at S315/298, showed that phosphorylation of a serine residue close to the C-terminal PDZ binding



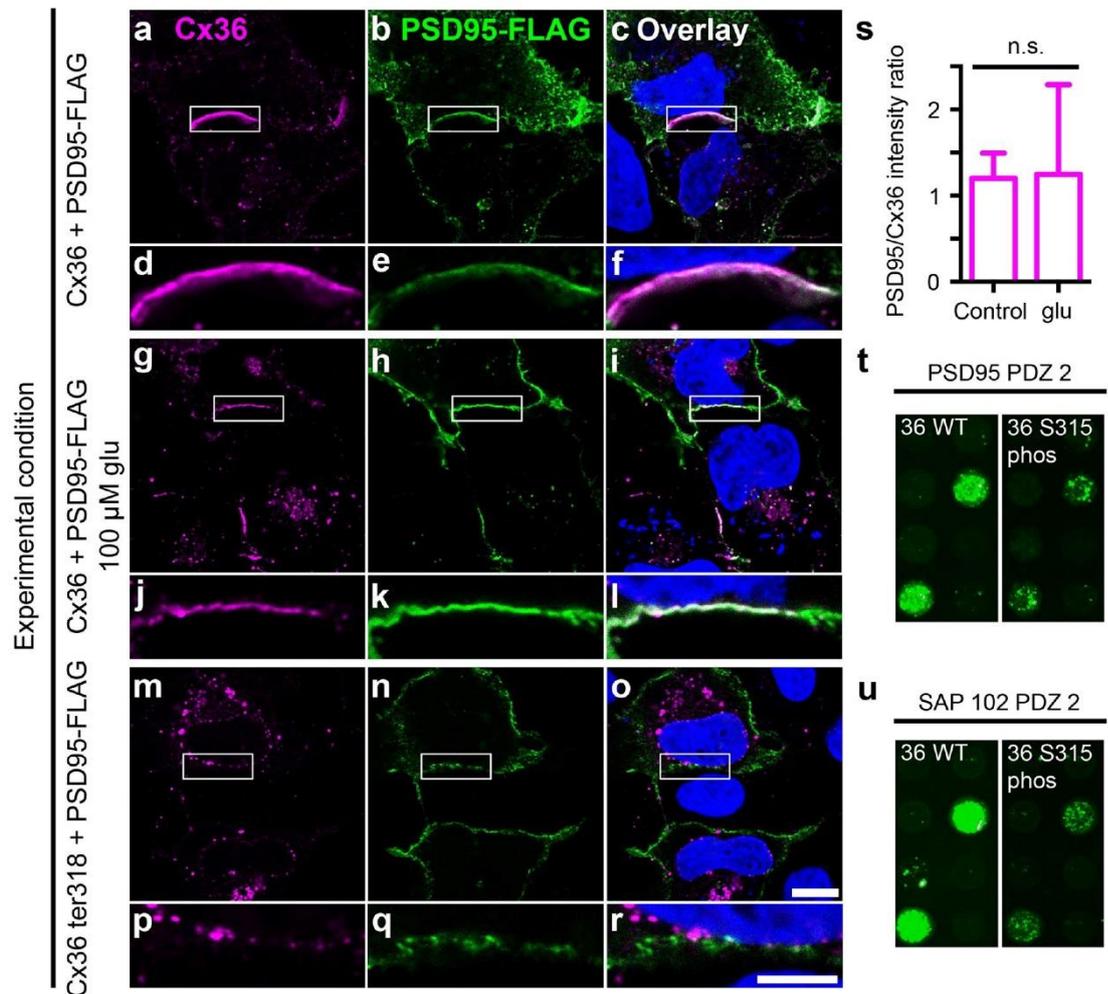
**Figure 4.** A phosphomimetic S315D mutation in mmCx36 did not alter the interaction with MUPP1-GFP in transfected HEK293 cells. (a–c) HEK293 cells co-transfected with GFP-MUPP1 and either mmCx36 WT (a), the phosphomimetic mutant Cx36 S315D (b), or a truncated mmCx36 variant (Cx36 S318 ter, c). Short arrows point to gap junction-like structures between two adjacent cells; long arrows indicate intracellular vesicles. Areas marked by the rectangles are shown in higher magnification in the lower panels. (d) 3D reconstructions of individual gap junctions. (e) Quantification of gap junction volume revealed that the phosphomimetic mutation of Cx36 (S315D) did not change the size of the gap junction and interaction with full length MUPP1. In contrast, truncation of mmCx36 at S318 (Cx36 S318 ter) abolished the interaction with MUPP1, which was consequently absent from gap junctions, while Cx36 S318 ter-containing gap junctions were still formed and normal in size. Values are given as mean  $\pm$  SD; n.s., not significant; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , Mann–Whitney test,  $n = 40$ – $44$  cell pairs from 2 transfections. Scale:  $10 \mu\text{m}$ , enlarged images:  $5 \mu\text{m}$ .

site of Cx36/35 may change the interaction with different protein partners, such as MUPP1 and 14–3–3  $\gamma/\eta$ . However, cell culture experiments with mmCx36 constructs carrying a phosphomimetic mutation (S315D) failed to reproduce this result, presumably because the aspartate residue is not a good substitution for a phosphorylated serine in this case. Also, activation of CaMKII via endogenously expressed glutamate receptors did not lead to detectable differences in the association of mmCx36 and its scaffolds.

## Discussion

Here, we provide evidence that phosphorylation of a serine residue in the C-terminal tail of Cx36/Cx35 may serve as a molecular switch to regulate the binding of different scaffolding proteins to Cx36/35. This concept connects two well-known mechanisms that were shown to regulate Cx36-containing gap junctions: phosphorylation by CaMKII<sup>9,11</sup> and the PDZ-dependent association with scaffolding proteins<sup>20</sup>. As CaMKII-mediated phosphorylation was shown to be linked to NMDA receptor activation<sup>9,11</sup>, this switch may provide a substrate for activity-driven plasticity at Cx36-containing electrical synapses.

Interestingly, the phosphorylation-induced switch seems to act in two different directions: it increases binding to 14–3–3 proteins and decreases binding to PDZ 10 of MUPP1. Most likely, two different mechanisms are at work: (1) the binding to MUPP1 is likely mediated via the PDZ binding site at the very C-terminal end of Cx36/35 and this binding affinity changes when S315/298 is phosphorylated. (2) The binding to 14–3–3 proteins may be direct, via the phosphorylated S315/298, as was reported for Cx43<sup>28</sup>. However, the Cx36/35 sequence does not contain a classical consensus 14–3–3 binding site<sup>29</sup>. Still, earlier studies reported a similar switching mechanism in viral<sup>30,31</sup> but also mammalian proteins<sup>32</sup>, such as the receptor tyrosine kinase ERBB4 and the inward rectifier potassium channel IRK1 (Kir2.1): phosphorylation of a PDZ binding motif decreases PDZ binding activity and mediates interaction with 14–3–3 proteins<sup>31</sup>. This suggests that this switch is a rather general means to regulate protein–protein interactions.



**Figure 5.** Activation of CaMKII does not cause any apparent changes in Cx36/PSD95 association. (a–f) Cx36 and PSD-95-FLAG colocalized at gap junctions in transfected HeLa cells. (g–l) Activation of CaMKII by treatment with glutamate (glu) did not affect the localization of PSD95 at gap junctions. (m–r) Expression of the Cx36 S318 ter mutant prevented PSD95 binding, indicating that this interaction requires a PDZ domain. Please note that hardly any gap junctions were formed and colocalization was absent also from intracellular vesicles, which showed colocalization when the PDZ domain of mmCx36 was still present (a–l). (s) Activation of CaMKII via glutamate (glu) did not affect the PSD95/Cx36 intensity ratio at gap junctions. 12 gap junctions in each condition were quantified. (t, u) Microarrays revealed phosphorylation-dependent reduction of mmCx36 C-terminal binding to PSD95 PDZ2 and SAP102 PDZ2. Scale: 10 μm.

Our results are based on a protein microarray approach, which resulted in several candidate proteins potentially affected by Cx36/35 S315/298 phosphorylation. Pull-down experiments were used to test some of the candidate proteins for direct interaction which confirmed the binding interactions, but only confirmed the phosphorylation-dependent switch for MUPP1 and 14–3–3 proteins ( $\gamma$  and  $\eta$  isoforms).

Co-expression studies in HEK293 cells were employed to test whether the phosphorylation-dependent interaction with MUPP1 affects the size of mmCx36-containing gap junctions. This was not the case; introduction of a phosphomimetic mutation (S315D) did not affect the volume of Cx36-containing gap junctions in HEK293 cells. This was somewhat surprising because introduction of a phosphomimetic mutation at Cx43 S373 affects gap junction formation<sup>24</sup>. However, there may be several explanations for the absence of an effect on gap junction size: First, the phosphomimetic serine-to-aspartate mutation—although also introducing a negative charge, just like phosphorylation—might not be similar enough to the real phosphorylation because phosphate groups contain an additional negatively charged oxygen atom and differ in their ionic shell from negatively charged amino acid residues<sup>33</sup>. Thus, phosphate groups create a different chemical landscape<sup>33,34</sup> and may be more potent in disrupting protein–protein interactions. In line with this, an earlier study reported that also 14–3–3 proteins do not bind to phosphomimetic threonine-to-aspartate mutations<sup>30</sup>. Lack of efficacy for the phosphomimetic mutation may also explain why binding of MUPP1 to the PDZ binding domain of Cx36 was not affected in the S315D mutants in HEK293 cells, whereas it was when maCx35 peptides were used that carried a phosphorylation at S298 (Cx35 S298 phos).

Second, phosphorylation of S315/298 may only moderately affect PDZ binding affinity: our microarray data revealed some residual binding of MUPP1–PDZ-10 to S298 phos, which might also explain the persistent

colocalization between MUPP1 and the phosphomimetic mmCx36 mutant, which we observed in the cell culture system. We obtained similar results for PDZ2 of PSD95 and SAP102: association clearly depended on the PDZ binding domain in the C-terminal tail but phosphorylation only decreased the binding and did not entirely prevent it.

Finally, phosphorylation of S315 may not affect gap junction size but channel gating<sup>17</sup>, by influencing the orientation of intracellular domains in the Cx36 protein. Here, the interaction with 14–3–3 proteins may come into play, which we found to be stronger when S298 was phosphorylated in Cx35. 14–3–3 proteins are able to bind two phosphorylated residues simultaneously<sup>35</sup>. Thus, it is tempting to speculate that 14–3–3 proteins might simultaneously interact with two phosphorylated amino acids within different domains of Cx36/35, forming an intramolecular bridge and thereby affecting Cx36/35 gating.

Our attempts to use endogenous phosphorylation of S315 also failed to demonstrate a detectable phosphorylation-driven switch in association of Cx36 with PDZ scaffolds (Fig. 5a–l). Even when we increased the amount of CaMKII by overexpressing it, we did not detect any apparent changes in the colocalization of Cx36 and PSD95 (Supplementary Fig. 4). It is important to note that while glutamate stimulation increases CaMKII phosphorylation of Cx36, and S315 is an optimal CaMKII phosphorylation site, we do not know how complete phosphorylation is *in vivo*. Work from Bukauskas et al.<sup>36</sup> showed that less than 5% of all connexons present in a gap junction plaque contribute to gap junction conductance, and only this small fraction of active channels needs to be phosphorylated to enhance coupling. Thus, it seems likely that confocal microscopy is not sensitive enough to detect these subtle changes. Furthermore, a change in the binding affinity of a small fraction of gap junction channels for PDZ scaffolds may free those channels to engage in conformational changes, including those potentially induced by 14–3–3 protein binding, that regulate coupling, while maintaining the important associations of the PDZ scaffolds with the plaque as a whole.

Phosphorylation in gap junction proteins is very common and serves different functions. Here, we provide evidence for a molecular mechanism that allows the Cx36/35 protein to recruit different interaction partners to the synapse in response to activity-related calcium entry and subsequent activation of CaMKII. This again confirms the notion that electrical synapses share many properties with their chemical counterparts when it comes to synaptic plasticity.

## Methods

**Protein microarray.** Purified GST fusion proteins (listed in Fig. 1c and Supplementary Fig. 1) were spotted onto nitrocellulose-coated glass slides with an Aushon 2470 microarray robot; each protein was spotted in duplicate. Peptides corresponding to the C-terminus tip of maCx35 and mmCx36, their phosphorylated forms, a C-terminally truncated form of maCx35 and a scrambled form of mmCx36, each with an N-terminal biotin, were synthesized by Genscript. 10 µg of peptide was pre-bound to 5 µg Cy3-streptavidin (GE Health Sciences) in 500 µl phosphate buffered saline with 0.1% Tween-20 (PBST) and unbound streptavidin was removed by clearing with biotin-agarose beads (Sigma). Array slides were probed with the labeled peptide probe at 4 °C overnight. Slides were washed with PBST and scanned with a GenePix 4200A scanner (Molecular Devices).

**Protein purification.** Recombinant proteins/protein domains (Table 1) were expressed in BL21 cells. Expression was induced with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). After expression, cells were lysed with lysozyme (1 mg/ml) and insoluble material was separated by centrifugation at 17,000 rpm for 40 min. The supernatant was applied to a glutathione sepharose column and incubated overnight on a rotating platform at 4 °C. Non-bound material was removed at the next day and the column was washed several times with binding buffer (containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, and 10 mM dithiothreitol). Proteins were eluted with binding buffer, supplemented with 10 mM reduced glutathione. For purification of His-tagged proteins, supernatants were applied to a nickel column. After flow-through of non-bound material, the column was washed with washing buffer (500 mM NaCl, 20 mM imidazole and 20 mM Tris, pH 7.5–6). Captured proteins were eluted with elution buffer (150 mM NaCl, 300 mM imidazole and 20 mM Tris, pH 7.5–6).

**Peptide pull-downs.** For peptide pull-downs (n = 2–4), 100 µl of µMACS streptavidin beads (Miltenyi Biotec) were mixed with 0.25 µg of maCx35 peptides and equal amounts of purified PDZ domains/proteins for each condition in phosphate buffered saline (PBS) with 0.05% P20 (P20 is 20% Tween). The samples were incubated on ice for an hour and applied to a magnetic column for isolation. After several washes, adsorbed proteins were eluted with pre-heated (95 °C) elution buffer, containing 50 mM Tris HCl (pH 6.8), 50 mM dithiothreitol, 1% SDS, 1 mM EDTA, 0.005% bromophenol blue, 10% glycerol. SDS-PAGE (10% gels) and western blot analysis were performed as previously described<sup>25</sup>.

**Constructs and HEK293/HeLa cell transfections.** Three different mmCx36 constructs (1. full-length mmCx36, 2. mmCx36 S315D, 3. mmCx36 S318 ter) were cloned into the pRK5 vector (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). The PDZ domain 10 of mMUPP1 was cloned into the PetM11 vector. All constructs were sequenced for accuracy. PSD95-FLAG in pcDNA5/FRT/TO was a gift from Dr. Wei-dong Yao (Addgene plasmid #15463; RRID:Addgene\_15463). This clone was initially generated by Zhang et al.<sup>37</sup>. Monomeric eGFP-CaMKIIa fusion construct was a gift of Dr. M. Neal Waxham (University of Texas Health Science Center at Houston)<sup>38</sup>. HEK293 and HeLa cells were plated at a density of  $5 \times 10^5$  cells in a Petri dish (6 cm diameter), including 12 mm coverslips, in 5 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium. Cells were transfected with 0.6–1.4 µg/ml DNA using Lipofectamine (Life Technologies), 24 h after seeding. All transfections were done as triplicates and independently performed at least twice.

Antibody	Host, type	Dilution	Source cat. (no.)
Cx36, clone: 1E5H5	Mouse, monoclonal	1:500	Thermo Fisher Scientific, 37-4600
Cx36	Rabbit, polyclonal	1:500	Thermo Fisher Scientific, 36-4600
Cx36	Goat, polyclonal	1:500	Santa Cruz, sc-14904
FLAG	Rabbit, polyclonal	1:500	Thermo Fisher Scientific, PA1-984B
GFP	Chicken, polyclonal	1:500	Sigma Aldrich, AB16901
GST	Goat, polyclonal	1:5000	GE Healthcare, 27-4577-01V
RGS-His	Mouse, monoclonal	1:500	Qiagen, 34610

**Table 2.** Primary antibodies used in this study.

To stimulate endogenous CaMKII activity, transfected HeLa cells were treated with serum-free media containing 1 mM glycine and 100  $\mu$ M glutamate for 15 min in a cell culture incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Afterwards, HeLa cells were fixed in 2% PFA in PBS for 15 min and prepared for confocal scans.

**Immunocytochemistry.** HEK293 and HeLa cells were fixed with 2% paraformaldehyde 48 h after transfection. Cells were washed with 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) and incubated in primary antibodies (Table 2) in PB at 4 °C overnight. After washing with PB, secondary antibodies conjugated to Alexa 488 and Alexa 568 (1:500, Thermo Fisher Scientific) were applied for 2 h at room temperature. Antibodies were diluted in PB containing 10% normal goat serum and 0.5% Triton-X100. After extensive washing, coverslips were mounted in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories) and sealed with nail polish.

**Confocal microscopy and image analysis.** The volume of Cx36-containing gap junctions between adjacent HEK293 cells was quantified as described<sup>25</sup>. Quantification of gap junction volume was performed blindly, i.e., persons imaging the gap junctions and determining the volume did not know the respective transfection condition as it was done by somebody else. Confocal stacks were acquired using a Leica SP8 confocal microscope equipped with a 63 $\times$  HCX PL APO oil immersion objective (NA 1.4). Stacks were deconvolved with Huygens Essential deconvolution software (using theoretical point spread functions) and further processed in Fiji (<https://fiji.sc/>, 2020<sup>39</sup>). After background subtraction and histogram normalization, stacks were thresholded using the automated Otsu threshold. Gap junction clusters were detected with the *3D Simple Segmentation* plugin and their volume was measured using the *3D Manager* plugin in Fiji. Data were tested for statistical differences using the Mann–Whitney test in Prism 6 (GraphPad Software), at an alpha level of 0.05.

The intensity ratio of mmCx36 and PSD95 located at gap junctions was calculated using the *measure* function in Fiji. A linear region of interest (2  $\mu$ m in length) was placed in a gap junction and the average intensity along this ROI was measured for each channel. The average intensity ratio of both channels in each experimental condition was used as a measure of PSD95/Cx36 association.

Images of co-transfected cells are shown as single scans. Single transfected cells are presented as a maximum intensity projections of 12 sections (z-distance: 0.2  $\mu$ m). Contrast and brightness were adjusted for presentation purposes in Fiji.

### Data availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 18 March 2020; Accepted: 12 October 2020

Published online: 27 October 2020

### References

- Christie, J. M. *et al.* Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron* **46**, 761–772 (2005).
- Long, M. A., Deans, M. R., Paul, D. L. & Connors, B. W. Rhythmicity without synchrony in the electrically uncoupled inferior olive. *J. Neurosci.* **22**, 10898–10905 (2002).
- Teubner, B. *et al.* Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J. Membr. Biol.* **176**, 249–262 (2000).
- Hormuzdi, S. G. *et al.* Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* **31**, 487–495 (2001).
- O'Brien, J. J., Chen, X., MacLeish, P. R., O'Brien, J. & Massey, S. C. Photoreceptor coupling mediated by Connexin 36 in the primate retina. *J. Neurosci.* **32**, 4675–4687 (2012).
- Trümpler, J. *et al.* Rod and cone contributions to horizontal cell light responses in the mouse retina. *J. Neurosci.* **28**, 6818–6825 (2008).
- Deans, M. R., Volgyi, B., Goodenough, D. A., Bloomfield, S. A. & Paul, D. L. Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* **36**, 703–712 (2002).
- Güldenagel, M. *et al.* Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J. Neurosci.* **21**, 6036–6044 (2001).
- Kothmann, W. W. *et al.* Nonsynaptic NMDA receptors mediate activity-dependent plasticity of gap junctional coupling in the AII amacrine cell network. *J. Neurosci.* **32**, 6747–6759 (2012).
- Haas, J. S., Greenwald, C. M. & Pereda, A. E. Activity-dependent plasticity of electrical synapses: increasing evidence for its presence and functional roles in the mammalian brain. *BMC Cell Biol.* **17**(Suppl 1), 14 (2016).

11. Alev, C. *et al.* The neuronal connexin36 interacts with and is phosphorylated by CaMKII in a way similar to CaMKII interaction with glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20964–20969 (2008).
12. Hoge, G. J. *et al.* The extent and strength of electrical coupling between inferior olivary neurons is heterogeneous. *J. Neurophysiol.* **105**, 1089–1101 (2011).
13. Tetenborg, S. *et al.* Differential distribution of retinal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) isoforms indicates CaMKII- $\beta$  and - $\delta$  as specific elements of electrical synapses made of Connexin36 (Cx36). *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 425 (2017).
14. Wang, H. Y., Lin, Y.-P., Mitchell, C. K., Ram, S. & O'Brien, J. Two-color fluorescent analysis of connexin 36 turnover: relationship to functional plasticity. *J. Cell Sci.* **128**, 3888–3897 (2015).
15. Ouyang, X. *et al.* Protein kinase A mediates regulation of gap junctions containing connexin35 through a complex pathway. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **135**, 1–11 (2005).
16. Mitropoulou, G. & Bruzzone, R. Modulation of perch connexin35 hemi-channels by cyclic AMP requires a protein kinase A phosphorylation site. *J. Neurosci. Res.* **72**, 147–157 (2003).
17. del Corosso, C., Iglesias, R., Zoidl, G., Dermietzel, R. & Spray, D. C. Calmodulin dependent protein kinase increases conductance at gap junctions formed by the neuronal gap junction protein Connexin36. *Brain Res.* **1487**, 69–77 (2012).
18. Urschel, S. *et al.* Protein kinase A-mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between AII amacrine cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 33163–33171 (2006).
19. Helbig, I. *et al.* In vivo evidence for the involvement of the carboxy terminal domain in assembling connexin 36 at the electrical synapse. *Mol. Cell. Neurosci.* **45**, 47–58 (2010).
20. Li, X., Lynn, B. D. & Nagy, J. I. The effector and scaffolding proteins AF6 and MUPP1 interact with connexin36 and localize at gap junctions that form electrical synapses in rodent brain. *Eur. J. Neurosci.* **35**, 166–181 (2012).
21. Zhang, H. & Pelech, S. Using protein microarrays to study phosphorylation-mediated signal transduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 872–882 (2012).
22. Espejo, A., Côté, J., Bednarek, A., Richard, S. & Bedford, M. T. A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions. *Biochem. J.* **367**, 697–702 (2002).
23. Thévenin, A. F., Margraf, R. A., Fisher, C. G., Kells-Andrews, R. M. & Falk, M. M. Phosphorylation regulates connexin43/ZO-1 binding and release, an important step in gap junction turnover. *Mol. Biol. Cell* **28**, 3595–3608 (2017).
24. Solan, J. L. & Lampe, P. D. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett.* **588**, 1423–1429 (2014).
25. Meyer, A. *et al.* Connexin30.2: in vitro interaction with Connexin36 in HeLa cells and expression in aii amacrine cells and intrinsically photosensitive ganglion cells in the mouse retina. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 36 (2016).
26. Li, H. *et al.* Adenosine and dopamine receptors coregulate photoreceptor coupling via gap junction phosphorylation in mouse retina. *J. Neurosci.* **33**, 3135–3150 (2013).
27. Moore, K. B. *et al.* Localized calcium signaling and the control of coupling at Cx36 gap junctions. *eNeuro* <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0445-19.2020> (2020).
28. Park, D. J. *et al.* Akt phosphorylates Connexin43 on Ser373, a “mode-1” binding site for 14–3–3. *Cell Commun. Adhes.* **14**, 211–226 (2007).
29. Park, D. J., Freitas, T. A., Wallick, C. J., Guyette, C. V. & Warn-Cramer, B. J. Molecular dynamics and in vitro analysis of Connexin43: a new 14–3–3 mode-1 interacting protein. *Protein Sci.* **15**, 2344–2355 (2006).
30. Boon, S. S. & Banks, L. High-risk human papillomavirus E6 oncoproteins interact with 14–3–3 $\zeta$  in a PDZ binding motif-dependent manner. *J. Virol.* **87**, 1586–1595 (2013).
31. Thatte, J., Massimi, P., Thomas, M., Boon, S. S. & Banks, L. The human papillomavirus E6 PDZ binding motif links DNA damage response signaling to E6 inhibition of p53 transcriptional activity. *J. Virol.* **92**, 16 (2018).
32. Espejo, A. B. *et al.* PRMT5 C-terminal phosphorylation modulates a 14–3–3/PDZ interaction switch. *J. Biol. Chem.* **292**, 2255–2265 (2017).
33. Dephoure, N., Gould, K. L., Gygi, S. P. & Kellogg, D. R. Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. *Mol. Biol. Cell* **24**, 535–542 (2013).
34. Hunter, T. Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**, 2513–2516 (2012).
35. Mackintosh, C. Dynamic interactions between 14–3–3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem. J.* **381**, 329–342 (2004).
36. Bukauskas, F. F. *et al.* Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 2556–2561 (2000).
37. Zhang, J. *et al.* Inhibition of the dopamine D1 receptor signaling by PSD-95. *J. Biol. Chem.* **282**, 15778–15789 (2007).
38. Hudmon, A. *et al.* A mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II clustering at synaptic and nonsynaptic sites based on self-association. *J. Neurosci.* **25**, 6971–6983 (2005).
39. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).

## Acknowledgements

We thank Josef Meyer, Bettina Kewitz and Irina Fomins for excellent technical assistance and Dr. Beate Grünberg for constant organizational support. We are also grateful to Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch for help with initial experiments and Dr. Xinran Zhu for providing the MUPP1 expression vector. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DE1154/5-1 to KD, JA854/3-1 to UJB, RTG 1885/1+2 to KD and UJB, RTG 1885/2 startup funding to ST), the US National Institutes of Health (EY012857 to JO'B) and the Cancer Prevention and Research Institute of Texas (PAAC CPRIT Grant RP180804 to MTB).

## Author contributions

S.T., J.O'B., M.T.B., U.J.B., and K.D. conceived the study; S.T., L.N., A.D., A.B.E., J.A. and H.Y.W. performed experiments and data analysis; S.T., H.Y.W., M.T.B. and J.O'B. prepared figures which were edited by K.D.; K.D. wrote a draft of the manuscript with the help of S.T.; the draft was edited and commented on by all authors; K.D. finalized the manuscript.

## Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75375-0>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to K.D.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name	Lena Nemitz
Geburtsdatum und -ort	26.05.1991 in Goch
Familienstand	Ledig
Nationalität	Deutsch
Anschrift	Drögen-Hasen-Weg 32 26129 Oldenburg
E-Mail	l.nemitz@web.de
Telefon	+49 (0) 441 77069264 +49 (0) 173 4753679

### Berufserfahrung

---

11/2016 - 05/2020	<b>Promotionsstipendiatin/wissenschaftliche Mitarbeiterin</b> Graduiertenkolleg 1885 „Molekulare Basis sensorischer Systeme“ Abteilung Neurobiologie des Sehens Department für Neurowissenschaften Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Oldenburg
04/2016 - 03/2018	<b>Studentische/wissenschaftliche Hilfskraft</b> Abteilung Neurobiologie des Sehens Department für Neurowissenschaften Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Oldenburg

### Hochschulstudium

---

seit 10/2017	<b>Strukturierte Promotion Neurosensory Science and Systems</b> Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Oldenburg
seit 04/2017	<b>Promotion Biologie</b> Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Oldenburg Doktorarbeit: Die Rolle von Horizontalzellen und N-Cadherin in der Entwicklung der Photorezeptor-Bandsynapse Betreuung: Apl. Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold

- 
- 04/2014 - 01/2017      **Master Biologie**  
 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg, Oldenburg  
 Masterarbeit: Auswirkungen einer DT-induzierten Horizontalzell-  
 Ablation auf die Morphologie der *Cx57<sup>+DTR</sup>*-Mausretina während  
 der frühen postnatalen Entwicklung  
 Betreuung: Apl. Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold
- 02/2013 - 06/2013      **Auslandssemester Food and Flower Management**  
 Fontys University of Applied Sciences, Venlo, Niederlande
- 09/2010 - 04/2014      **Bachelor Bio Science and Health**  
 Hochschule Rhein-Waal, Kleve  
 Bachelorarbeit: Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität von  
 oberflächenaktiven Substanzen  
 Betreuung: Prof. Dr. Dirk Bockmühl

### Schulbildung

---

- 08/2001 bis 06/2010      Städtisches Gymnasium Goch, Goch  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 08/1997 bis 08/2001      Grundschule, St.-Georg-Schule, Goch

### Sprachen

---

- |          |                              |
|----------|------------------------------|
| Deutsch  | Muttersprache                |
| Englisch | Fließend in Wort und Schrift |
| Latein   | Latinum                      |

### Konferenzbeiträge

---

#### **Vorträge**

**Nemitz L**, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2018): Horizontal cells are essential for rod photoreceptor ribbon synapse formation in the mouse retina. Sensory Systems in Health and Disease, Verona, Italien

**Nemitz L**, Segelken J, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2017): Development of the photoreceptor ribbon synapse in the absence of horizontal cells. European Retina Meeting 2017, Paris, Frankreich

**Posterpräsentationen**

**Nemitz L**, Segelken J, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2019): Synaptic remodeling in the cone pathway after early postnatal horizontal cell ablation. European Retina Meeting 2019, Helsinki, Finnland

**Nemitz L**, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2018): Horizontal Cells are Essential for Rod Photoreceptor Ribbon Synapse Formation in the Mouse Retina. 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin, Deutschland

**Nemitz L**, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2018): Horizontal cells are essential for rod photoreceptor ribbon synapse formation in the mouse retina. FASEB Retinal Neurobiology and Visual Processing, Olean, NY, USA

**Nemitz L**, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2017): Horizontal cells are essential for rod photoreceptor ribbon synapse formation in the mouse retina. Young Researcher Vision Camp 2017, Leibertingen, Deutschland

Eckert A, Booten Y, Jarchow M, Lucassen R, **Nemitz L**, Bockmühl DP (2012): Reduction of microorganisms by ironing. 59th SEPAWA Congress and 8th European Detergents Conference, Fulda, Deutschland

**Publikationen**

---

**Nemitz L**, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2020): Synaptic remodeling in the cone pathway after early postnatal horizontal cell ablation. (Front Cell Neurosci, in Revision)

Tetenborg S, Wang HY, **Nemitz L**, Depping A, Janssen-Bienhold U, O'Brien J, Dedek K (2020): Phosphorylation of Connexin36 near the C-terminus switches binding affinities for PDZ-domain and 14-3-3 proteins in vitro. Sci Rep 10, 18379

**Nemitz L**, Dedek K, Janssen-Bienhold U (2019): Rod bipolar cells require horizontal cells for invagination into the terminals of rod photoreceptors. Front Cell Neurosci 13, 423

Eckert A, Booten Y, Jarchow M, Lucassen R, **Nemitz L**, Bockmühl DP (2014): Reduction of microorganisms by ironing. H&PC Today 9, 34-35

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt apl. Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold für die Möglichkeit, nach meiner Masterarbeit an diesem spannenden Thema weiterzuarbeiten. Vielen Dank für Deine Unterstützung, Dein Vertrauen in mich und die Freiheit, meine eigenen Ideen zu entwickeln und umzusetzen!

Des Weiteren bedanke ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Silke Haverkamp für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt auch apl. Prof. Dr. Karin Dedek für die ständige Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Ratschläge und die große Unterstützung bei den Vorbereitungen der Publikationen und Vorträge.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Bettina und Konrad bedanken, die mir meine Arbeit durch ihre technische Assistenz erleichtert haben.

Ein großes Dankeschön geht auch an Anne, Jan und Sandra für die tatkräftige Unterstützung im N-Cadherin-Projekt.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Mitgliedern der Abteilung Neurobiologie des Sehens (vor allem bei Patrick, Stephan, Sabrina, Jasmin und Hoto) für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die unvergesslichen Spargel- und Kohltouren bedanken. Vielen Dank für die schöne Zeit!

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie. Danke, dass Ihr mich während meiner Promotion in jeglicher Hinsicht unterstützt habt!

---

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat und dass ich die Leitlinien guter wissenschaftlicher Praxis der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg befolgt habe. Weiterhin versichere ich, dass im Zusammenhang mit dem Promotionsvorhaben keine kommerziellen Vermittlungs- oder Beratungsdienste (Promotionsberatung) in Anspruch genommen worden sind.

Oldenburg, 31.03.2021 (Ort, Datum) \_\_\_\_\_ (Lena Nemitz)