

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Abteilung Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar**

**Morphologische Untersuchungen zur Entwicklung von
Ribbonsynapsen in der äußereren plexiformen Schicht der
Rattenretina**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Universität Des Saarlandes
2007*

vorgelegt von: Matthias Kirchhoff
 geb. am: 16.01.1974
 in Meiningen

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatter:

Inhaltsverzeichnis

1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Summary	3
2.	Einleitung	5
2.1	Die Retina	5
2.2	Synapsentypen	7
2.2.1	<i>Elektrische Synapsen</i>	8
2.2.2	<i>Chemische Synapsen</i>	9
2.3	Chemische Synapsen der Retina	11
2.3.1	<i>Konventionelle chemische Synapsen der Retina</i>	12
2.3.2	<i>Die Ribbonsynapse</i>	13
2.4.	Zielstellung dieser Arbeit	19
3.	Material und Methoden	20
3.1	Untersuchungsmaterialien/ Versuchstiere	20
3.2	Präparation der Augen und der Netzhäute	21
3.3	Präparationsmethodik für die Elektronenmikroskopie	21
3.4	Herstellung der Semi- und Ultradünnsschnitte	23
3.5	Mikroskopische Analyse	24
3.6	Chemikalien und Bezugsquellen	26
3.7	Verwendete Lösungen	27
3.8	Geräte und sonstige Hilfsmittel	28

4.	Ergebnisse	29
4.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen der sich entwickelnden Retina	29
4.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	35
4.2.1	<i>Elektronenmikroskopische Auswertung P0- P3</i>	35
4.2.2	<i>Elektronenmikroskopische Auswertung P4- P6</i>	41
4.2.3	<i>Elektronenmikroskopische Auswertung P7- P9</i>	47
4.2.4	<i>Elektronenmikroskopische Auswertung P10- P16</i>	52
5.	Diskussion	59
5.1	Entwicklung der Photorezeptor- Ribbonsynapsen	62
5.2	Entwicklung der synaptischen Ribbons in den Photorezeptor- Ribbonsynapsen	66
6.	Literatur	73
7.	Danksagung	88
8.	Lebenslauf	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung a	Radialschnitt durch die adulte Affenretina aus: „The synaptic organization of the brain“, G. Shepherd, ed. 1998;	7
Abbildung b	Elektrische Synapse nach Kandel et al., 1996;	9
Abbildung c	Schema der Signaltransduktion an chemischen Synapsen nach Kandel et al., 1996;	11
Abbildung d	konventionelle chemische Synapse aus „The retina“, J.E. Dowling, 1987;	12
Abbildung e	A: Zapfenterminale, Querschnitt; B: Stäbchenterminale, schematisch; aus: „The synaptic organization of the brain“, G. Shepherd, ed. 1998;	18
Abbildung 1	Lichtmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P0- P3	32
Abbildung 2	Lichtmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P4- P7	33
Abbildung 3	Lichtmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P8- P21	34
Abbildung 4	Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P0	37
Abbildung 5	Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P1	38

Abbildung 6 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P2	39
Abbildung 7 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P3	40
Abbildung 8 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P4	44
Abbildung 9 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P5	45
Abbildung 10 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P6	46
Abbildung 11 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P7	50
Abbildung 12 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P9	51
Abbildung 13 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P10	54
Abbildung 14 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P12	55
Abbildung 15 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P14	56
Abbildung 16 Elektronenmikroskopische Abbildungen der Rattenretina vom postnatalen Tag P16	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammenfassende Darstellung der untersuchten postnatalen Entwicklungsstadien P0- P21	20
Tabelle 2 Chemikalien und Bezugsquellen	26
Tabelle 3 Verwendete Lösungen	27
Tabelle 4 Geräte und sonstige Hilfsmittel	28
Tabelle 5 Quantitative Zusammenstellung der Dichte von synaptischen Ribbons in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium in der OPL	58

Abkürzungsverzeichnis

A	Amakrinzelle
aD	arciform Density
Aqua dest.	Aqua destillata
B	Bipolarzelle
Ch	Pigmentepithelzellschicht (engl.: choroid layer)
D	Dendriten, Membranausstülpungen
eR	endoplasmatisches Retikulum
GCL	Ganglienzellschicht (engl.: ganglion cell layer)
gM	granuläres Material
H	Horizontalzelle
ILM	innere Grenzmembran (engl.: inner limiting membrane)
iNBL	innere Neuroblastenschicht (engl.: inner neuroblast layer)
INL	innere Körnerzellschicht (engl.: inner nuclear layer)
IPL	innere plexiforme Schicht (engl.: inner plexiform layer)
IS	Innensegmente der Photorezeptoren (engl.: inner segments)
IZR	Interzellularraum
kDa	kilo Dalton
M	Mitochondrium
Mz	Müllerzelle
N	Nucleus
N. Opt.	Nervus opticus

oNBL	äußere Neuroblastenschicht (engl.: outer neuroblastblast layer)
OLM	äußere Grenzmembran (engl.: outer limiting membrane)
ONL	äußere Körnerzellschicht (engl.: outer nuclear layer)
OPL	äußere plexiforme Schicht (engl.: outer plexiform layer)
OS	Außensegmente der Photorezeptoren (engl.: outer segments)
po	postsynaptische Terminale
poV	postsynaptische Verdichtung
pr	präsynaptische Terminale
prV	präsynaptische Verdichtung
Rf	Ribbonfeld
RT, CT	Stäbchen-, Zapfenterminalen (engl.: rod and cone terminals)
sV	synaptische Vesikel
sR	synaptischer Ribbon
sS	synaptic Spheres
Za	Zonulae adhaerentes
ZNS	Zentrales Nervensystem

1.1 Zusammenfassung

Morphologische Untersuchungen zur Entwicklung von Ribbonsynapsen in der äußereren plexiformen Schicht der Rattenretina.

Nervenzellen übertragen Informationen an distinkten Kontaktstellen, den Synapsen. An chemischen Synapsen erfolgt die interzelluläre Signalübertragung via Exozytose von neurotransmitterhaltigen synaptischen Vesikeln. Die Ribbonsynapse ist eine spezialisierte chemische Synapse, die für eine besonders schnelle und ausdauernde Freisetzung von Neurotransmitter optimiert ist. Ribbonsynapsen, die eine große Bandbreite an Stimulusintensitäten über abgestufte Potentialänderungen an die nachgeschalteten sekundären Neurone übertragen, finden sich z.B. in den Sinneszellen der Netzhaut und des Innenohres. Ein charakteristisches Merkmal von Ribbonsynapsen sind große präsynaptische, elektronenmikroskopisch sichtbare Strukturen, die man als synaptische Ribbons bezeichnet (Sjöstrand, 1958; Dowling, 1987; Sterling, 1998). Diese im Elektronenmikroskop stab- bzw. bandförmig erscheinenden Strukturen, die mit einer großen Anzahl synaptischer Vesikel assoziiert sind, macht man für die besonderen physiologischen Eigenschaften der Ribbonsynapse verantwortlich. Hauptprotein der synaptischen Ribbons ist das Protein Ribeye (Schmitz et al., 2000; Wan et al., 2005).

Die Ribbonsynapsen der Photorezeptorzellen entwickeln sich nach der Geburt (postnatal). Ziel der vorliegenden Dissertationarbeit war es, die postnatale Bildung der Ribbonsynapsen der Photorezeptoren von Sprague- Dawley Ratten zeitlich engmaschig im Elektronenmikroskop zu untersuchen, um ultrastrukturelle Hinweise über die Bildung von synaptischen Ribbons während der postnatalen Synaptogenese zu erhalten.

Die Bildung der Photorezeptor- Ribbonsynapse zeigt sich im Elektronenmikroskop mit der Ausbildung einer primitiven präsynaptischen Terminale, die bereits synaptische Vesikel, aber noch keine synaptische Ribbons enthält. An diese primitive präsynaptische Terminale „docken“ zunächst zwei Horizontalzellfortsätze sowie nachfolgend ein bzw. zwei Bipolarzellfortsätze an. Die Bildung stabförmiger Ribbons beginnt elektronenmikroskopisch sichtbar am 3. postnatalen Tag.

Die Bildung der synaptischen Ribbons erreicht ihr quantitatives Maximum am 10. bis 12. postnatalen Tag. Im weiteren Verlauf der Netzhautentwicklung kommt es zu einer Verringerung der Ribbondichte (Ribbons pro $220 \mu\text{m}^2$ OPL). Diese Reduktion ist wahrscheinlich Resultat der Volumenvergrößerung und Ausdifferenzierung der Synapse, die möglicherweise einhergeht mit der Verringerung einer „Überschussproduktion“ von synaptischen Ribbons.

Die synaptischen Ribbons nehmen im Verlauf der postnatalen Entwicklung kontinuierlich an Länge (bis $1 \mu\text{m}$) zu. Neben den stabförmigen Ribbons wurden relativ große globuläre elektronendichte Strukturen, die sog. synaptischen „Spheres“ beobachtet, die bereits in früheren Untersuchungen als mögliche Vorstufen bzw. Abbaustufen von Ribbons diskutiert wurden (Spiwoks- Becker et al., 2004). Weiterhin wurden wesentlich kleinere granuläre elektronendichte Strukturen in der präsynaptischen Terminale von Ribbonsynapsen beobachtet, die sich manchmal zu elektronenmikroskopisch- sichtbaren Aggregaten zusammenlagerten.

Aufgrund der auf elektronenmikroskopischem Wege gewonnenen Erkenntnisse sowie weiteren von der Arbeitsgruppe erzielten biochemischen Daten vermuten wir, dass synaptische Ribbons sich in einem Mehrstufenprozess ausbilden. Unsere Arbeitshypothese lautet daher, dass in diesem mehrstufigen Prozess die Bildung der synaptischen Ribbons von den beobachteten granulären Strukturen ausgeht und über die synaptischen Spheres zur Ausbildung von reifen stabförmigen synaptischen Ribbons führt. Diese Hypothese gilt es in zukünftigen Versuchen durch immunelektronenmikroskopische Verfahren mit Antikörpern gegen das Ribbonprotein Ribeye weiter zu untersuchen.

1.1 Summary

Ultrastructural analyses of the development of ribbon synapses in the outer plexiform layer of the rat retina.

Nerve cells communicate at distinct intercellular contact sites, the synapses. At chemical synapses signal transduction occurs via exocytosis of neurotransmitter-containing synaptic vesicles with the presynaptic plasma membrane. The ribbon synapse is a specialized chemical synapse which is optimized for very rapid and sustained neurotransmitter release. Ribbon synapses are found e.g. in the sensory neurons of the retina and inner ear and typically transmit a broad bandwidth of sensory informations using graded potential differences. Characteristic feature of ribbon synapses are large bar-/plate- shaped presynaptic structures, the so called synaptic ribbons (Sjöstrand, 1958; Dowling, 1987; Sterling, 1998). Synaptic ribbons are associated with large numbers of synaptic vesicles and are believed to be responsible for the unique physiological properties of ribbon synapses. The protein Ribeye is the main component of synaptic ribbons (Schmitz et al., 2000; Wan et al., 2005).

Ribbon synapses of photoreceptor cells develop after birth (postnatally). Goal of the present thesis work was the detailed ultrastructural analysis of the postnatal formation of ribbon synapses in the outer plexiform layer (OPL) of Sprague-Dawley rats in order to get ultrastructural hints how synaptic ribbons are formed in photoreceptor ribbon synapses during postnatal development.

The biogenesis of ribbon synapses started at the ultrastructural level with the formation of primitive presynaptic terminals that contained synaptic vesicles but no synaptic ribbons. These primitive photoreceptor presynaptic terminals were first contacted by two horizontal cell processes and subsequently by one or two processes of bipolar cells. Bar-shaped synaptic ribbons could be first observed at the ultrastructural level on postnatal day 3. The formation of bar-shaped synaptic ribbons reached its maximum between postnatal day 10-12. Subsequently, the density of ribbons in the OPL decreased.

This reduction of synaptic ribbon density (ribbons per $220 \mu\text{m}^2$ OPL) is probably due to an enlargement and further differentiation of the ribbon synapse or result of a correction of an „overshoot“ of ribbon production during early postnatal development. The length of synaptic ribbons continuously increased during postnatal development (length up to $1\mu\text{m}$).

Beside bar-shaped ribbons we also observed relatively large spherical structures, the synaptic spheres, which already have been previously speculated to represent possible precursors or disassembly products of synaptic ribbons (Spiwoks- Becker et al., 2004). Additionally, we observed relatively small granular, electron-dense structures in presynaptic ribbon terminals that sometimes assembled into larger aggregates. Based on the electron microscopic data and on other data we propose that the assembly of ribbons is a multistep process. We suggest that the small granular, electron- dense structures are part of early assembly steps of synaptic ribbons. Formation of synaptic ribbons subsequently proceeds via the spherical synaptic spheres to the bar-shaped ribbons. This working hypothesis can further analyzed by future experiments using immunogold electron microscopy with antibodies directed against the synaptic ribbon protein Ribeye.

2. Einleitung

2.1 Die Retina

Lebewesen stehen in ständigem Kontakt und Informationsaustausch mit ihrer Umwelt. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, müssen Sinneseindrücke (Informationen) aufgenommen, weitergeleitet, und in höheren Zentren verarbeitet werden, damit Organismen sich optimal ihrem Lebensraum anpassen und sich in ihm etablieren können.

Der mit Abstand wichtigste Sinn bei Säugetieren ist der Sehsinn, da er mehr Informationen an das Gehirn liefert als andere Sinnessysteme. Das Auge nimmt das Licht verschiedener Wellenlängen wahr, die für die diversen Spezies jeweils unterschiedlich sind. Das „sichtbare Spektrum“ des menschlichen Auges umfasst Wellenlängen von etwa 380 nm (violett/ blau) bis etwa 760 nm (rot) (Luo, 2000). Das einfallende Licht wird an der Hinterwand des Auges von der Netzhaut detektiert. Die Netzhaut (Retina) kann man evolutionär als einen vorgeschobenen Teil des Zwischenhirns betrachten, der mit Lichtsinneszellen (Photorezeptoren) ausgestattet ist.

Beim Wirbeltierauge liegt die Schicht der Photorezeptoren auf der dem Glaskörper abgewandten Seite. Die Photorezeptoren stehen in engem Kontakt zum Pigmentepithel. Die auf der Bruch` schen Membran sitzenden Pigmentepithelzellen und die Aderhaut (Choroidea) sind für die Ernährung der Photorezeptoren und die Ernährung der äußeren Netzhautschichten wichtig. Das Licht muss zunächst die 9 vorgeschalteten Schichten der Retina durchlaufen, bevor es auf die Photorezeptoren trifft. Die menschliche Retina besitzt etwa 120 Millionen dämmerungsempfindliche Stäbchenrezeptoren und etwa sechs Millionen tageslichtempfindliche Zapfenrezeptoren, von denen es drei Subtypen gibt, die ihr jeweiliges Absorptionsmaximum im blauen (440 nm), grünen (535 nm) und roten (565 nm) Spektralbereich haben.

In den Photorezeptoren werden die Lichtreize durch bestimmte Proteine (Sehpigmente) in elektrische Signale umgewandelt (Fu und Yan, 2007). Diesen Vorgang bezeichnet man als Phototransduktion. Er läuft in den Außengliedern der Photorezeptoren ab. Auf dem aus verschiedenen Zelltypen bestehenden Abschnitt zwischen Photorezeptoren und den Axonen der Ganglienzellen, die den Nervus opticus bilden, finden wichtige neuronale Verarbeitungen/ Verschaltungen statt (Übersicht siehe Dowling, 1987).

Die Retina stellt ein Netzwerk unterschiedlicher Nervenzellen dar, die die Informationen der Sinneszellen vorverarbeiten und über den Nervus opticus an die höheren visuellen Zentren im ZNS weiterleiten. Das retinale Netzwerk ist klar in verschiedene Schichten strukturiert und besteht aus (stark vereinfacht) folgenden fünf Grundnervenzelltypen: Photorezeptorzellen, Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen. Die Signalverarbeitung in der Netzhaut erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen: vertikal und horizontal. Der vertikale Signalweg verläuft von den Rezeptorzellen über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen, deren gebündelte Axone den N. opticus bilden, der die Informationen via Thalamus (Corpus geniculatum laterale) dem visuellen Cortex zuleitet. Die horizontale Verschaltung wird in der äußeren plexiformen Schicht (OPL; Outer Plexiform Layer) von den Horizontalzellen und in der inneren plexiformen Schicht (IPL; Inner Plexiform Layer) von den Amakrinzellen realisiert (Wässle und Boycott, 1991; Peichl, 1992). Jede der fünf Hauptnervenzellen wird ihrer besonderen Anatomie und Physiologie entsprechend weiter in Subtypen unterteilt. So übernehmen 10-15 verschiedene Ganglienzelltypen die Signale von den Bipolarzellen (Masland, 2001a). Eine noch größere Vielfalt mit über 30 verschiedenen Subtypen findet man bei den Amakrinzellen. So gibt es keinen Neurotransmitter im ZNS, den man nicht in den Amakrinzellen schon gefunden hat (Wässle und Boycott, 1991; Masland, 2001a, b).

Diese Diversität an Nervenzellen mit ihren unterschiedlichen Morphologien und Funktionen sowie die komplexen Verschaltungen unter- bzw. miteinander bildet die Grundlage für die vielfältigen und hochkomplexen Leistungen der Netzhaut (Wässle und Boycott, 1991; Peichl, 1992; Brandstätter et al., 1998).

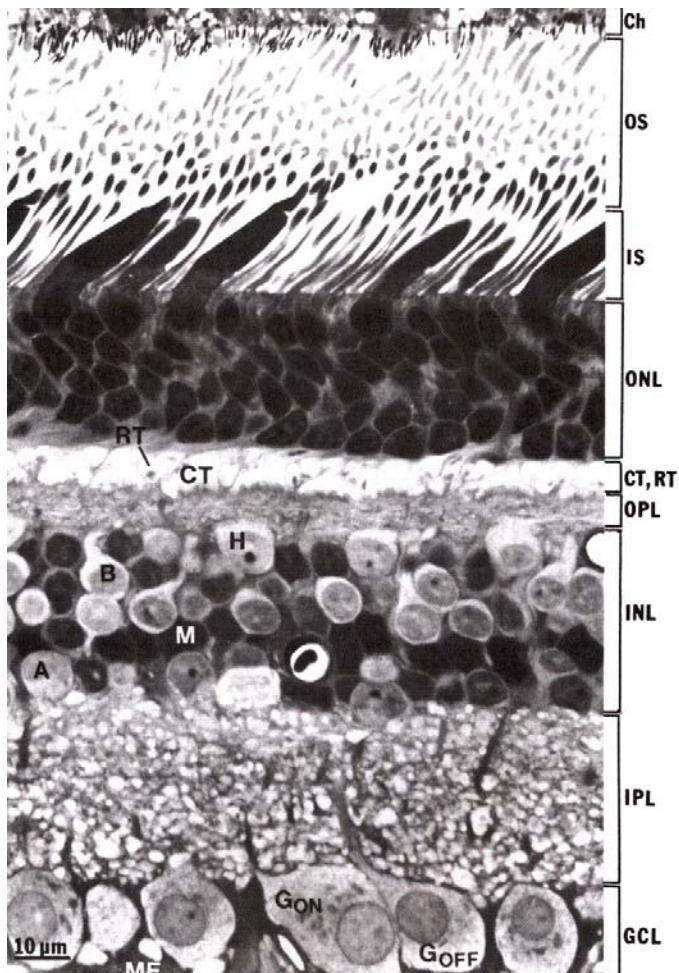


Abbildung a: Radialschnitt durch die adulte Affenretina ca. 5 mm von der Fovea centralis entfernt. Aus: „The synaptic organization of the brain“, Sterling, P. Fourth edition, 1998.

- CH : Pigmentepithel
- OS, IS : Außen-, Innensegmente der Photorezeptoren
- ONL : äußere Körnerzellschicht
- OPL : äußere plexiforme Schicht mit CT, RT;
- CT, RT : Zapfen-, Stäbchenterminale
- INL : innere Körnerzellschicht
- H : Horizontalzelle
- B : Bipolarzelle
- A : Amakrinzelle
- M : Müllerzelle
- IPL : innere plexiforme Schicht
- GCL : Ganglienzellschicht mit ON- und Off Zellen
- ME : Müllerendfüßchen

Nicht abgebildet sind die Nervenfaserschicht (Axone) des N. opticus und die innere Grenzmembran, die den Netzhautabschluss zum Glaskörper darstellen. Die äußere Grenzmembran ist zwischen den Innengliedern (IS) der Photorezeptoren und der äußeren Körnerzellschicht (ONL) gelegen.

2.2 Synapsentypen

Um die von Nervenzellen ausgehenden elektrischen Impulse auf andere übertragen zu können, bedarf es spezifischer interzellulärer Kontaktstellen, so genannter Synapsen. Prinzipiell gibt es zwei unterschiedliche Arten von Synapsen. Bei den elektrischen Synapsen (gap junctions) bestehen zwischen aneinander liegenden Nervenzellen direkte zytoplasmatische Kontakte.

Bei der chemischen Synapse fehlt der direkte zytoplasmatische Kontakt, da prä- und postsynaptische Zelle durch den synaptischen Spalt voneinander getrennt sind.

Die Signalübertragung erfolgt durch die Exozytose von neurotransmitterhaltigen synaptischen Vesikeln. Alle Synapsen bestehen aus einem präsynaptischen Anteil, der die Informationen der Nervenzelle bereitstellt. Der postsynaptische Anteil nimmt die Informationen mittels spezifischer Rezeptoren auf und leitet sie weiter. Bei den elektrischen Synapsen sind die prä- und postsynaptischen Anteile je nach Signalfluss variabel, sodass die Informationsübertragung in beide Richtungen erfolgen kann. Die chemischen Synapsen dagegen besitzen einen unidirektionalen Signalweg von prä- nach postsynaptisch.

2.2.1 Elektrische Synapse

Bei diesem Synapsentypus sind die in zytoplasmatischem Kontakt stehenden prä- und postsynaptischen Anteile über bestimmte Proteinstrukturen (sog. Connexone) direkt miteinander verbunden (Kandel et al., 1996; Sohl et al., 2005; Meier und Dermietzel, 2006). Die Connexone bilden tunnelartige, etwa 1,5 nm im Durchmesser starke „Verbindungskanäle“ (gap junctions), durch die Ionen und niedermolekulare Substanzen von einer Zelle in die andere gelangen. Die Erregungsübertragung erfolgt durch elektrotonische Ströme, die das Signal der präsynaptischen Zelle auf die postsynaptische Zelle durch Potentialänderung übertragen.

Die Leitfähigkeit der Kanäle ist von der Zusammensetzung der Connexone abhängig und zusätzlich durch pH-Wert-Änderungen und Phosphorylierungen von Kanalproteinen (Connexine) modulierbar. Aufgrund der direkten kurzen Verbindung (2-4 nm) ist die Signalübertragung mit weniger als 0,1 ms sehr schnell. Es können infolge des relativ großen Kanaldurchmessers nicht nur Ionen, sondern auch kleinere Moleküle wie Glycin bzw. Botenmoleküle wie IP₃ in die Nachbarzelle gelangen (Kandel et al., 1996; Vaney et al., 1998).

Nachteilig ist jedoch, dass das präsynaptische Erregungspotenzial stark genug sein muss, um einen postsynaptisch gerichteten Ionenstrom auslösen zu können, da bei dieser Synapsenart nur geringe Modulations- und Verstärkungsmechanismen vorhanden sind. In der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Netzhaut sind elektrische Synapsen zu finden.

In der OPL sind die Zapfenphotorezeptoren untereinander über gap junctions verbunden. In der IPL sind Stäbchenbipolarzellen mit Amakrinzellen über elektrische Synapsen untereinander verschaltet (Wässle und Boycott, 1991; Veruki und Hartveit, 2002).

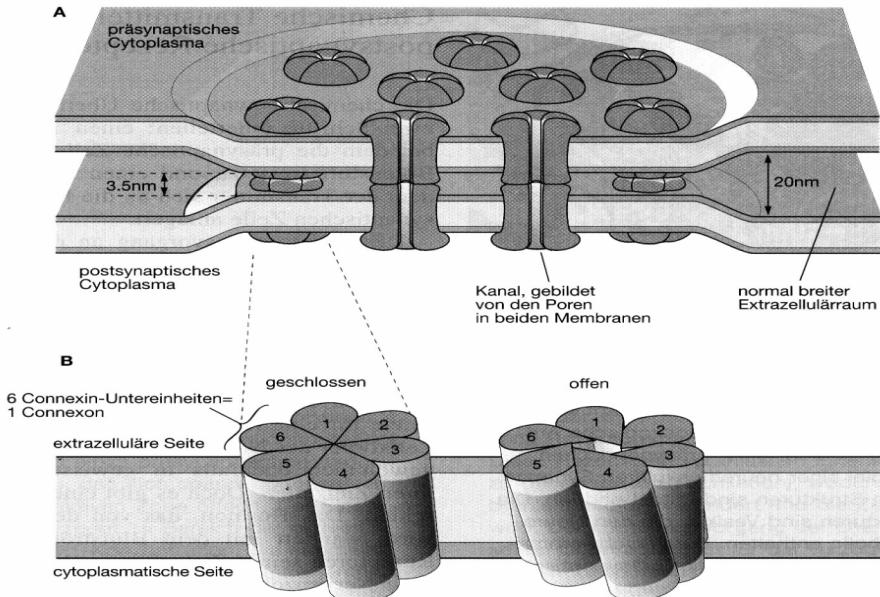


Abb. b: Elektrische Synapse nach Kandel et al., 1996.

Dreidimensionales Modell einer elektrischen Synapse mit zwei angeschnittenen gap junctions, die sich aus zwei Hemikanälén zusammensetzen. Diese wiederum sind aus den sog. Connexonen aufgebaut. Durch den von ihnen geöffneten Kanal wird eine zytoplasmatische Verbindung benachbarter Zellen hergestellt.

2.2.2 Chemische Synapsen

Hier sind prä- und postsynaptische Membranen durch einen etwa 10-100 nm breiten Spalt voneinander getrennt und stehen nicht in direktem zytoplasmatischen Kontakt. Die Erregungsübertragung erfolgt indirekt über chemische Botenstoffe, so genannte Transmitter. Der auf der präsynaptischen Seite in synaptischen Vesikeln gespeicherte Transmitter wird bei Erregung über einen als Exozytose bezeichneten Vorgang in den synaptischen Spalt abgegeben, diffundiert zu den Transmitterrezeptoren der postsynaptischen Membran und löst dort durch direkte oder indirekte Mechanismen eine Potentialänderung aus.

Wird die Präsynapse von einem Spannungsimpuls erreicht und über einen Schwellenwert depolarisiert, strömt über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle Kalzium aus der Extrazellularflüssigkeit in das Zytosol ein. Der resultierende intrazelluläre Ca^{2+} - Anstieg führt zur Fusion der synaptischen Vesikel mit der Plasmamembran und somit zur Freisetzung des Transmitters in den synaptischen Spalt (Abb. c). Der Transmitter erreicht via diffusionem die postsynaptische Membran. In dieser befinden sich spezielle Proteinstrukturen, die Rezeptoren, die den Transmitter spezifisch erkennen. Bindet ein Transmittermolekül an den Rezeptor, führt dies beispielsweise zur Öffnung bzw. Schließung von Ionenkanälen (ionotrope Rezeptoren) in der postsynaptischen Zelle. Die Aktivierung metabotroper Rezeptoren führt dagegen zu einer Aktivierung/ Hemmung intrazellulärer Signaltransduktionsketten. Dadurch erfolgt die Depolarisation und somit die Signalübertragung auf die postsynaptische Zelle. Ein entscheidendes Merkmal von chemischen Synapsen ist, dass die Übersetzung der präsynaptischen Erregung in die Freisetzung eines Botenstoffes mündet, dessen Wirkung an der postsynaptischen Zelle die Möglichkeit der Signalverstärkung und Signalmodulation bietet. So kann die Menge an freigesetztem Transmitter durch die Anzahl der fusionierten synaptischen Vesikel moduliert werden. Die Affinität der postsynaptischen Rezeptoren zum Transmitter ist ebenso veränderlich. Die Latenzzeit der chemischen Synapse ist aufgrund der komplexen Übersetzung von elektrischen in chemische Signale im Vergleich zur elektrischen Synapse wesentlich länger. Sie liegt zwischen 0,3 und mehreren Millisekunden.

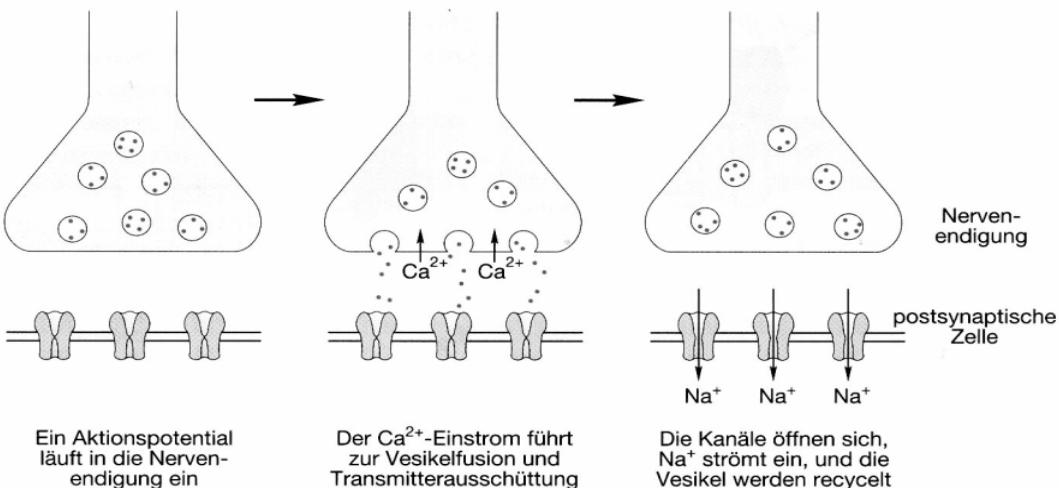


Abbildung c: Schema der Signaltransduktion an chemischen Synapsen, nach Kandel et al., 1996

Wenn ein Aktionspotential die präsynaptische Terminale erreicht, wird in der aktiven Zone die Verschmelzung von fusionskompetenten Vesikeln durch den Ca^{2+} -Einstrom (spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Ionenkanäle) induziert. Der ausgeschüttete Transmitter diffundiert zu den an der postsynaptischen Membran gelegenen Rezeptoren und bindet an diese. Daraufhin öffnen sich z.B. Na^+ -Ionenkanäle, die eine Depolarisation in der postsynaptischen Zelle auslösen.

2.3 Chemische Synapsen der Retina

In der Retina findet man neben den beschriebenen konventionellen chemischen Synapsen auch besonders spezialisierte chemische Synapsen. Diese nennt man Ribbonsynapsen (Sterling, 1998; Dowling, 1987). Dieser spezielle Typus chemischer Synapsen kommt noch in weiteren sensorischen Organen vor: in der Pinealdrüse (Hopsu und Arstila, 1964), den Haarzellen der Cochlea (Smith und Sjöstrand, 1961) und dem Vestibularorgan (Flock, 1964).

2.3.1 Konventionelle chemische Synapsen der Retina

Konventionelle chemische Synapsen, deren Kennzeichen neben den oben beschriebenen allgemeinen Merkmalen chemischer Synapsen (prä- und postsynaptische Terminalia, synaptische Vesikel, synaptischer Spalt) präsynaptische Verdichtungen (engl. „presynaptic densities“) darstellen, sind in der Retina beispielsweise an den Fortsätzen der Amakrinzellen in der inneren plexiformen Schicht (IPL) zu finden (Kidd, 1962; Dowling und Boycott, 1966). Ultrastrukturell charakteristisch ist die Anhäufung synaptischer Vesikel an der aktiven Zone der Präsynapse. In der Postsynapse erkennt man meist einen an der Plasmamembran gelegenen elektronendichten Bereich. Dabei handelt es sich um einen Komplex unterschiedlicher Proteine, die die postsynaptischen Transmitterrezeptoren sowie verschiedene Verankerungs- und Signaltransduktionsproteine enthalten.

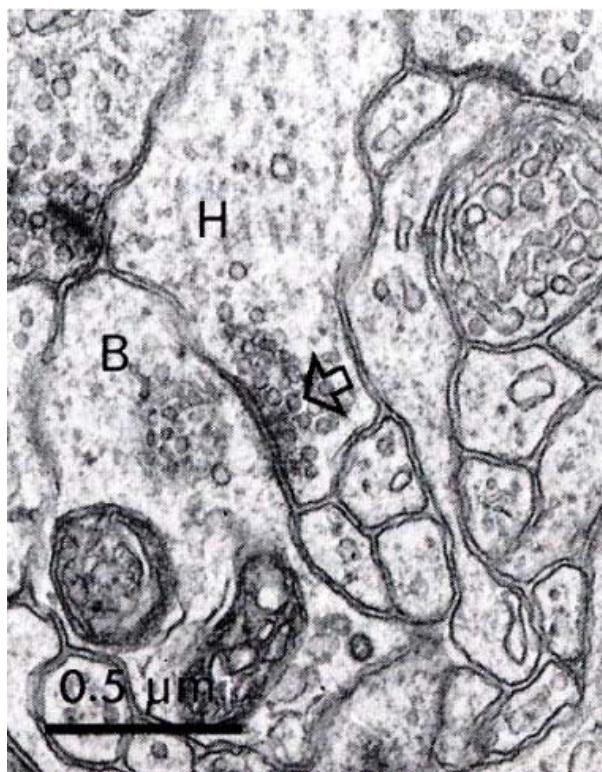


Abbildung d: Aus: „The Retina“, Dowling, 1987.

Man kann hier eine konventionelle Synapse erkennen, die von einer präsynaptischen Horizontalzelle (H) und einer postsynaptischen Bipolarzelle (B) gebildet wird. Der Pfeil zeigt die um die aktive Zone angereicherten Vesikel.

2.3.2 Die Ribbonsynapse

Ribbonsynapsen findet man in der Retina in Photorezeptorzellen und Bipolarzellen, an den Haarzellen der Cochlea im Innenohr sowie in Melatonin- sezernierenden Zellen der Epiphyse (Sjöstrand und Smith, 1961; Dowling, 1987; Sterling, 1998; Lenzi et al., 1999). In der Vertebratennetz haut sind sie in der äußeren plexiformen (Terminalen von Stäbchen- und Zapfenrezeptorzellen) und der inneren plexiformen Schicht (Terminalen von Bipolarzellen) zu finden. Bei diesen scharf begrenzten Synapsenschichten (OPL, IPL siehe Abb. a) handelt es sich um Ansammlungszentren synaptischer Verbindungen, die der Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen, die von den Rezeptorzellen stammen, dienen. Dabei zeigt die Photorezeptorribbonsynapse der OPL folgenden grundsätzlichen Aufbau. Eine große präsynaptische Rezeptorterminal (Abb. e) kontaktiert zwei dendritische Fortsätze von Horizontalzellen sowie einen bzw. zwei dendritische Bipolarzellfortsätze, die die postsynaptischen Elemente darstellen (Boycott und Kolb, 1973; Gray und Pease, 1971; Rao- Mirotznik et al., 1995). Die typische Anordnung der postsynaptischen Dendriten wird in der OPL bei Stäbchenphotorezeptorsynapsen als Tetrade (vier postsynaptische Elemente) bezeichnet, da die Stäbchenphotorezeptorpostsynapse von vier Dendriten gebildet wird (Rao- Mirotznik et al., 1995). Die früher vermutete Triadenkonstellation ist streng genommen nur für die Postsynapse von Zapfenrezeptoren zutreffend, da hier nur drei Dendriten (zwei von den Horizontalzellen und ein Bipolarzellfortsatz) postsynaptisch vorliegen. Die postsynaptischen Dendriten liegen in der Invagination (Einbuchtung) der präsynaptischen Terminale.

Ein typisches Merkmal der Ribbonsynapsen sind die elektronenmikroskopisch erkennbaren, meist an der präsynaptischen Membran gelegenen, elektronendichten bandförmigen Strukturen, die synaptische Ribbons genannt werden (Sjöstrand, 1958; Dowling, 1987; Sterling, 1998).

Rekonstruktionen von Ultradünnsschnitten zufolge sind synaptische Ribbons nicht einfach stabförmige Profile, sondern plattenartige lamellenförmige Strukturen, die sich der Kurvatur der präsynaptischen Membran anpassen und ihr u- bzw. hufeisenförmig anliegen (Sjöstrand, 1958; McCartney und Dickson, 1985; Rao-Miroznik et al., 1995). Das Vorhandensein von runden, mit Vesikeln umgebenen Ribbons (bis 0,3 µm großen), so genannten synaptic Spheres oder synaptic Bodies, ist über die Retina beschrieben worden (Vollrath et al., 1989). Jeder Ribbon ist von mit Transmitter gefüllten synaptischen Vesikeln umgeben (Wagner, 1997), die über dünne Filamente mit dem Ribbon verbunden sind (Rao- Miroznik et al., 1995). Stäbchenzellen besitzen gewöhnlich nur einen synaptischen Ribbon, wohingegen die größeren Zapfenterminalen mehrere synaptische Ribbons beinhalten können (Gray und Pease, 1971; Sterling, 1983). Synaptische Ribbons in Bipolarzellen der IPL sind viel kleiner als in den Rezeptorzellen der OPL (Dowling, 1987). Ribbons sind im Allgemeinen dynamische Strukturen, deren Anzahl, Größe, Lage und Form in der Terminale vom circadianen (Hell/ Dunkel) Rhythmus abhängig sind, und sich bei vielen Spezies unterscheiden - siehe Diskussion (McNulty, 1981; Schmitz et al., 1989; Schmitz und Drenckhahn, 1993; Spiwoks- Becker et al., 2004).

Die Ribbons sind, über bogenförmige Verdichtungen (engl. „arciform Densities“ (aD)) vermittelt, an der aktiven Zone der präsynaptischen Membran verankert (Abb. e). Die arciform Density ist eine rinnenförmige Proteinstruktur, die das Kopplungselement von synaptischem Ribbon zur präsynaptischen Membran darstellt. Die arciform Density kann Bogenlängen bis zu 2 µm aufweisen und folgt ohne Unterbrechung über mindestens 70% dem membrannahen Verlauf des synaptischen Ribbons (D. B. Gustavus, H. Jastrow, L. Vollrath; unveröff. Daten; Quelle: Homepage Universität Mainz).

Während ein „Ende“ des Ribbon an der Plasmamembran verankert ist, weist das andere „freie Ende“ ins Zytoplasma der präsynaptischen Terminale. Ribbons sind in Stäbchenterminalen länger (mehr als 700 nm) als in Zapfenterminalen (Sparado et al., 1978). Die aktive Zone einer Synapse markiert den Bereich, an dem synaptische Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusionieren, um ihren Neurotransmitter per Exocytose in den synaptischen Spalt abzugeben. Der Transmitter der Photorezeptorribbonsynapse ist Glutamat.

Die aktiven Zonen von konventionellen- und Ribbonsynapsen sind durch die an der präsynaptischen Membran angedockten Vesikel gekennzeichnet. Die aktiven Zonen in Ribbonsynapsen, die sich am basalen Ende des membranverankerten Ribbon befinden, sind größer und kapazitätsreicher als in konventionellen Synapsen. Die Exocytose der Vesikel geschieht in Plasmamembranbereichen, die in engem Kontakt zum membranverankerten Ribbon stehen (Raviola, 1976; Schaeffer und Raviola, 1978; Schaeffer et al., 1982; Burns und Augustine, 1995; Zenisek et al., 2000). Deshalb erscheint der membranverankerte synaptische Ribbon essenziell für die Nachlieferung von im Zytoplasma flottierenden Vesikeln, hin zur aktiven Zone zu sein (Burns und Augustine, 1995; Rao- Mirotznik, 1995). Die Terminalen von Zapfenrezeptoren enthalten mehrere aktive Zonen mit jeweils einem zentralen Ribbon (Ahnelt et al., 1990). Die Stäbchenterminale hat gewöhnlich nur eine aktive Zone mit einem Ribbon (Rao- Mirotznik et al., 1995) und ist damit das einzige bekannte Säugetierneuron, dessen Transmitterquanten an singulärer Stelle abgegeben werden. Eine Zapfenterminale beim Menschen kann mehr als 20 aktive Zonen beinhalten (Ahnelt et al., 1990; Missotten, 1965).

In Stäbchenbipolarterminalen von Katzen fanden McGuire et al. (1984) ca. 30 aktive Zonen. In der Zapfenbipolarterminale der Katzenretina konnten Cohen und Sterling (1990) bis zu 105 aktive Zonen entdecken. Die aktive Zone von Stäbchenterminalen ist die Größte im zentralen Nervensystem. Sie besitzt mit ungefähr 130 Andockplätzen für synaptische Vesikel mehr als doppelt so viele wie die Größte in konventionellen Synapsen (Rao- Mirotznik et al., 1995).

Die Fusion der angedockten Vesikel mit der Plasmamembran erfolgt allgemein in chemischen Synapsen an den sog. „Hot Spots“ (aktive Zonen) nach dem „Alles- oder Nichts- Gesetz“. Der fusionskompetente Anteil synaptischer Vesikel an der Gesamtvesikelmenge konnte durch Membrankapazitätssmessungen an der Goldfischbipolarzelle auf weniger als 1% beziffert werden (Lenzi und von Gersdorff, 2001). Die Zeit zur kompletten Exocytose aller fusionskompetenten Vesikel beträgt ca. 200 ms, deren Endocytose wird in etwa 1 s durchgeführt (Lenzi und von Gersdorff, 2001; Paillard et al., 2003).

Ribbonsynapsen retinaler Bipolaren zeigen eine kompensatorische Endozytose, die an der kompletten Wiederherstellung der Membranoberfläche nach der Exozytose innerhalb von 1-2 s erkennbar ist (von Gersdorff et al., 1994a; Heidelberger, 2001). Die endocytierten Vesikel werden in wenigen Minuten mit Transmitter wiederbefüllt und der aktiven Zone erneut zur Freisetzung zugeführt (Betz und Bewick, 1992; Ryan et al., 1993). Eine typische Vertebratenstäbchenphotorezeptorsynapse enthält den basal verankerten Ribbon, an dessen Oberfläche ca. 600 synaptische Vesikel gebunden werden können, wovon etwa 130 der aktiven Zone anhaften (Rao-Miroznik et al., 1995). Die Menge der Transmitterfreisetzung (Glutamat) an Ribbonsynapsen ist von der Stärke der Depolarisation der Photorezeptoren bzw. Bipolarzellen abhängig (De Vries und Baylor, 1993). Die Exozytose der Vesikel wird über die Ca^{2+} -Freisetzung stimuliert. Pro Ribbon induziert ein moderater Ca^{2+} -Spiegel eine Freisetzung von ca. 50 Vesikel/ s, wohingegen bei maximaler Ca^{2+} -Konzentration bis zu 500 Vesikel/ s freigesetzt werden können (Parson et al., 1994; Rieke und Schwarz, 1996; von Gersdorff et al., 1996). Diese hohe Vesikelfreisetzung pro Ribbon ist im Vergleich zur maximalen Exozytose von nur 20 Vesikel/ s in hippocampalen Synapsen bemerkenswert (Stevens und Tsujimoto, 1995).

Das binäre Signal (0- kein Photon; 1- Photon) ist dabei über einen ungewöhnlichen Mechanismus verschlüsselt. Null wird über tonische Exozytose, eins durch eine Pause der Sekretion codiert (Dowling, 1991). Von einem Modell ausgehend, kalkulierten Rao et al., (1994), dass mindestens 40 Vesikel/ s für die tonische Transmitterfreisetzung notwendig sind, um die binäre Signalcodierung aufrechtzuerhalten. Dies erfordert eine ausreichend hohe Menge fusionsfähiger Vesikel, die, ohne aus dem „Reserve Pool“ (ungebundene zytoplasmatische Vesikel) aufgefüllt werden zu müssen, für eine aktive Zone ca. 3 s reicht (130 Vesikel/ 40 pro s). Da der Ribbon einer Stäbchensynapse ungefähr 600 Vesikel bindet, kann er bis zu 15 s lang Vesikelfreisetzungsvorgänge aufrechterhalten, ohne auf den zytoplasmatischen Reserve Pool synaptischer Vesikel zugreifen zu müssen. So vermutete Berg (1983), dass die Vesikelbindungsrate eines Ribbon proportional zu seinem Radius ist und damit ein 30igfach effizienteres Bindungssystem als eine einzelne Plasmamembranbindungsstelle darstellt.

Da Ribbons neueren Untersuchungen zufolge nicht einfach stab-, sondern plattenförmig sind, trifft diese radiusabhängige Bindungstheorie nur noch bedingt zu. Es kann aber weiterhin eine Abhängigkeit zwischen Ribbonoberfläche und der Bindungsrate synaptischer Vesikel vermutet werden. Da das basale Ende eines Ribbon an der aktiven Zone verankert ist, erfolgt die Wiederauffüllung nach Exocytose unbesetzt gewordener Vesikelbindungsstellen vermutlich durch Vesikeltranslokation entlang des synaptischen Ribbon um etwa 48 nm (Rao-Miroznik, 1995). Diese kurzen Strecken werden vermutlich via diffusionem zurückgelegt. Ribbonsynapsen sind physiologisch durch eine hohe tonische Glutamat Neurotransmitterfreisetzung charakterisiert (Dowling, 1987; Sterling, 1998). Dies wird wahrscheinlich durch den „förderbandartigen“ Aufbau der Ribbons gewährleistet, die dadurch in der Lage sind, viele synaptische Vesikel zu binden, um sie der aktiven Zone bereitzustellen (Bunt, 1971; Gray und Pease, 1971). Die Ribbons sind wahrscheinlich eine Art Transportvehikel (Förderband) für transmitterbeladene Vesikel zwischen Zytoplasma und aktiver Zone der präsynaptischen Membran. Sie ermöglichen dadurch hoch entwickelten Sinnesorganen eine schnelle, effektive und kapazitätsreiche Erregungsübertragung (Vollrath et al., 1996; von Gersdorff et al., 1996). Die in Vertebraten vorkommende Form von Ribbonsynapsen unterscheidet sich von der bei Invertebraten gefundenen. So wurden z.B. bei Drosophila dem Ribbon ähnliche Strukturen, so genannte T-bars, in präsynaptischen Terminalen gefunden (Trujillo- Cenoz, 1972; Wan et al., 2000). Sie unterscheiden sich sowohl in der Form (T-förmig) als auch in der direkten Anheftung an der aktiven Zone der präsynaptischen Membran (Schmitz et al., 2000). Die allgemeinen Proteinbestandteile von Ribbonsynapsen und konventionellen Synapsen sind ähnlich (Brandstätter et al., 1996; von Kriegstein et al., 1999), trotz zahlreicher Unterschiede in Form und Funktion. Das bisher einzige entdeckte spezifische Protein synaptischer Ribbons ist Ribeye, das nur in Ribbonsynapsen, nicht aber in konventionellen Synapsen vorhanden ist (Schmitz et al., 2000). Ribeye ist das Hauptprotein der Ribbons (Schmitz et al., 2000; Wan et al., 2005) und besteht aus zwei Domänen (A, B). Es ist wahrscheinlich in der Lage, über Oligomerisierungen (aufgrund seiner geringen Größe- 120 kDa) das Grundgerüst der synaptischen Ribbons aufzubauen (unveröff. Befunde AG Schmitz).

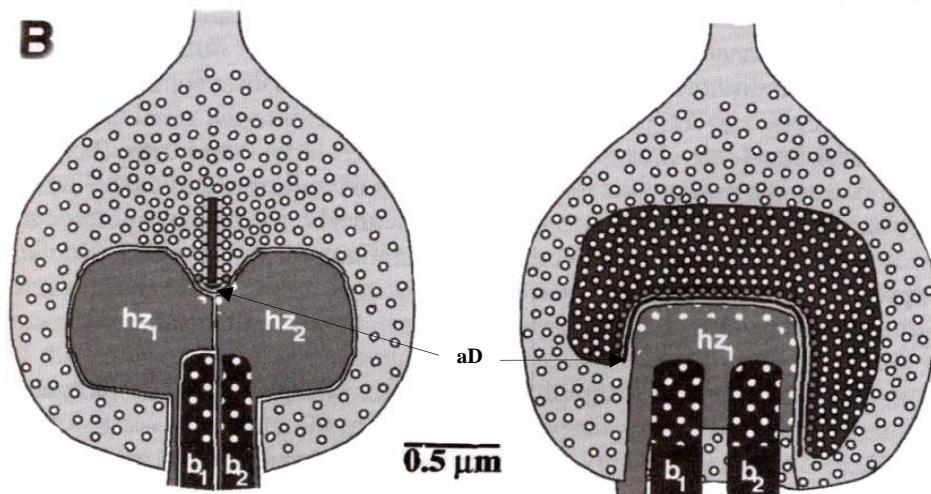
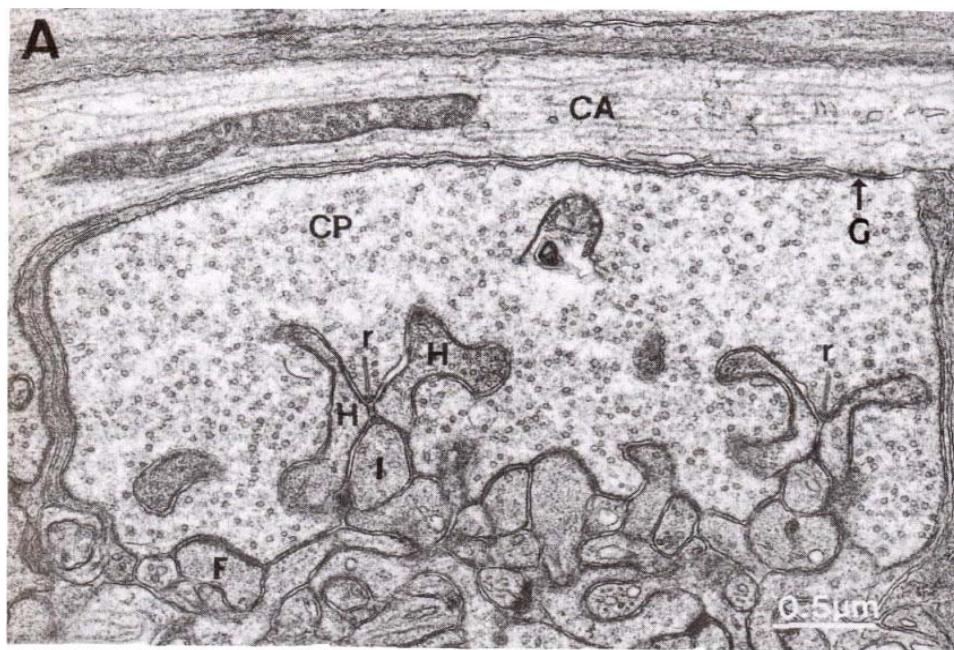


Abbildung e: Aus: „The synaptic organization of the brain“, Shepherd, G., 1998 (Herausgeber)

A: Zapfenterminale im Querschnitt (Fovea centralis eines Makaken)

Man erkennt zwei synaptische Triaden einer Zapfen- Ribbonsynapse, die von Ribbons (r), Horizontalzellen (H) und invaginierenden Bipolaren (I) gebildet werden.

CP : Zapfenterminale

G : Gap junction

CA : Axon eines Zapfenphotorezeptors

F : flache Bipolare (flat)

B: Stäbchenterminale in schematischer Darstellung um 90 Grad rotiert

Die Abbildung zeigt eine Tetradenkonfiguration einer Stäbchen- Ribbonsynapse mit einem Ribbon, der zwischen zwei Horizontalfortsätzen (hz) und zwei Bipolarzellfortsätzen (b) liegt. Beachte, dass die postsynaptischen Bipolarzelldendriten einige 100 nm entfernt von den ribbonebundenen Vesikeln liegen. aD: arciform Density;

2.4 Zielstellung dieser Arbeit

Anliegen der vorliegenden Dissertationsarbeit war die Untersuchung der zeitlichen Einordnung der morphologischen Entwicklung der Ribbonsynapse, speziell die der synaptischen Ribbons in der äußeren plexiformen Schicht, in der sich vorwiegend postnatal entwickelnden Rattenretina. Das erste Auftreten synaptischer elektronendichter Strukturen in der Ribbonsynapse sollte elektronenmikroskopisch in Verbindung zu ausgereiften funktionsfähigen Ribbons gestellt und deren weitere Entwicklung im Zusammenhang mit der Reifung der äußeren plexiformen Schicht betrachtet werden. Am Ende sollten quantitative Ergebnisse über die Ribbonreifung in der Präsynapse erzielt werden. Die Untersuchungen erstreckten sich über die postnatale Phase -vom Tag der Geburt bis zum 21. Tag nach der Geburt- und wurden auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene durchgeführt. Insbesondere sollte systematisch untersucht werden, wo und wann Ribbons oder deren mögliche Vorstufen erstmalig in der postnatalen Entwicklung der Photorezeptorribbonsynapse elektronenmikroskopisch nachzuweisen sind. So sollte u. a. geklärt werden, ob die Vorstufen bzw. erste synaptische Ribbons in den Somata/ Innengliedern (Olney, 1968) der Photorezeptorzellen oder in den sich entwickelnden präsynaptischen Rezeptorterminalen entstehen.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial – Versuchstiere

Für die Untersuchung der postnatalen Entwicklung der Ribbonsynapsen in der OPL der Retina verwendeten wir Ratten des Auszuchtstammes Spraque- Dawley (Albinoratten). Wir wählten für die zu untersuchenden Zeitpunkte jeweils 4 Tiere (beiden Geschlechts). Folgende Alters- und Entwicklungsstadien wurden untersucht.

(Tabelle 1)

P 0	Tag der Geburt
P 1	1. postnataler Tag
P 2	2. postnataler Tag
P 3	3. postnataler Tag
P 4	4. postnataler Tag
P 5	5. postnataler Tag
P 6	6. postnataler Tag
P 7	7. postnataler Tag
P 9	9. postnataler Tag
P 10	10. postnataler Tag
P 12	12. postnataler Tag
P 14	14. postnataler Tag
P 16	16. postnataler Tag
P 21	21. postnataler Tag

Die Tiere wurden aus dem Medizinisch- Experimentellen- Zentrum der Universität Leipzig bezogen und in das Anatomische Institut (Abteilung Elektronenmikroskopie) der Universität Leipzig gebracht. Die Tiere wurden immer in einem konstanten 12 Stunden hell/ 12 Stunden dunkel Zyklus gehalten und am Morgen (ca. 10.00 Uhr) präpariert.

3.2 Präparation der Augen und der Netzhäute

Die Tiere wurden mittels Äthernarkose betäubt und bei Eintritt vollständiger Areflexie mit einem Scherenschnitt decapitiert. Sodann wurden zügig und bei größter Vorsicht die Bulbi von frontal aus der Augenhöhle in toto enukleiert. Es folgte eine Stichinzision in die Cornea, um den gallertartigen Glaskörper vorsichtig zu entfernen und damit eine effiziente Permeation der nachfolgenden Lösungen zur Netzhaut zu ermöglichen. Die Netzhaut wurde nicht vom Augenbecher abgelöst, um eine mechanische Traumatisierung zu vermeiden. Die so gespaltenen Bulbi wurden sofort in die Fixierlösung (2,5% Glutaraldehyd, 2% frisch depolymerisiertes Paraformaldehyd in PBS) gegeben. Die genaue Aufarbeitung wird im nachfolgenden Text beschrieben.

3.3 Präparationsmethodik für die Elektronenmikroskopie

Die Methodik der konventionellen Präparation für die Elektronenmikroskopie gliedert sich in folgende, nacheinander ablaufende Schritte:

- A: **Proteinfixierung**
- B: **Lipidfixierung**
- C: **Entwässerung und Proteinkontrastierung**
- D: **Entwässerung**
- E: **Einbettung in Epoxydharz (Epon)**

Der gesamte Einbettungsprozess erfolgte in Szintillationsröhrchen. Jedes Röhrchen beinhaltete einen Augenbecher und wurde entsprechend beschriftet, sodass pro Altersstadium 8 Augenbecher (4 Tiere/ 8 Bulbi) prozessiert wurden. Ein wichtiges Kriterium dieser Einbettungstechnik ist die genaue Einhaltung der vorgegebenen Prozesszeiten und -temperaturen, um vergleichbar gute Schnittqualitäten zu erhalten.

A : Proteinfixierung

- Zuerst erfolgte die Primärfixierung der Bulbi in 2 ml Aldehydfixans (2,5% Glutaraldehyd; 2% Paraformaldehyd in PBS) für mindestens 4 Stunden bei 4 °C.
- Danach wurden die Proben 3 mal 10 Minuten mit PBS gespült.

B : Lipidfixierung

- Die Lipidfixierung wurde in 1% OSO₄ in Aqua dest. für eine Stunde bei 4-8 °C durchgeführt.
- Anschließend erfolgte die Spülung mit Aqua dest. für 5 mal 10 Minuten.

C : Entwässerung und Proteinfixierung

- Die erste Teilentwässerung bei 4-8 °C wurde mit der aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70% C₂H₅OH) für jeweils 20 Minuten durchgeführt.
- Die Proteinkontrastierung erfolgte mit 2% Uranylacetat in 70% Alkohol für 3 Stunden bei 4-8 °C.

D : Entwässerung

- Weitere Entwässerung mit aufsteigender Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 2 mal 100%) für jeweils 20 Minuten bei Raumtemperatur.
- Schlussentwässerung mit 100% Propylenoxid für 15 Minuten unter dem Abzug bei Raumtemperatur.

E : Einbettung in Epoxydharz

- Auf die mit Propylenoxid infiltrierten hinteren Augenbecher wurde eine Mischung Epoxydharz : Propylenoxid (Volumenverhältnis 1:3; ca. 6-7 ml) gegeben.
- Die so beschickten Augenbecher blieben unter dem Abzug bei Raumtemperatur offen stehen (mindestens 12 Stunden), um das Propylenoxid verdampfen zu lassen und die Probe vollständig mit Epoxydharz zu infiltrieren.
- Danach wurde für jeweils 2-3 Stunden 2 mal reines Einbettungsmedium pipettiert und die Bulbi danach in die Einbettungsform gegeben.
- Diese wiederum blieb für mindestens 36-48 Stunden im 60 °C Wärmeschrank, um das Epoxydharz vollständig aushärten zu lassen.

3.4 Herstellung der Semi- und Ultradünnschnitte

Da die Augenbecher um 90° versetzt (Abgang des N. opticus) zur Längsrichtung der Probenblöckchen eingebettet wurden, konnten reproduzierbare Schnittlagen an den Augen angefertigt werden. Zuerst wurden die ausgehärteten Probenblöckchen der Augen eines Altersstadiums bis auf die Austrittsstelle des N. opticus abgetrimmt. Es folgte die Herstellung der ca. 1 µm dicken Semidünnschnitte mit dem Ultramikrotom, Ultracut E (Reichert-Jung). Diese wurden mit einem Pinsel auf die Objektträger transferiert und auf der 60 °C heißen Wärmeplatte getrocknet. Anschließend wurde die Wärmeplatte auf 85 °C geheizt und Toluidinblau- Lösung auf die Objektträger getropft (3-4 Tropfen). Nach ein bis zwei Minuten wurden die Schnitte mehrfach mit Aqua dest. gespült, bei 60 °C getrocknet und abschließend mit Entellan eingedeckt.

Nach Begutachtung der Qualität der Retinaschichten der Augen eines Altersstadiums unter dem Lichtmikroskop wurden die Stellen ausgewählt, auf denen die OPL nahe dem N. opticus gelegen und möglichst frei von Traumatisierungen bzw. Artefakten war.

Von diesen Stellen wurden pro Auge ca. 10 Ultradünnschnitte (50-60 nm) mit dem Ultramikrotom angefertigt. Jeder Schnitt wurde auf ein Dünnstegkupfernetz (200 mesh) transferiert und getrocknet.

Nun folgte die „modifizierte Kontrastierung nach Reynolds“ nach dem in Tabelle 3 beschriebenen Ansatz. Dieser blieb dann ca. 3 h stehen bis eine milchig- gelbliche Flüssigkeit entstand. Dazu wurden dann 9 ml NaOH geben und die Lösung kurz aufgeschüttelt. Die Ultradünnschnitte wurden für 20 Minuten in eine Petrischale mit der „modifizierten Kontrastierlösung nach Reynolds“ gegeben. Es musste darauf geachtet werden, dass die Ultradünnschnitte vollständig von der Kontrastierlösung bedeckt waren. Danach wurde jeder Ultradünnschnitt dreimal mit destilliertem Wasser gespült, um die überschüssige Kontrastierlösung restlos zu entfernen. Abschließend erfolgten die Trocknung (auf Filterpapier) und die sorgfältige Aufbewahrung jedes einzelnen Ultradünnschnittes in Spezialboxen mit exakter Beschriftung.

3.5 Mikroskopische Analyse

Die lichtmikroskopische Analyse der Semidünnschnitte erfolgte mit einem Axioplan 2 Mikroskop. Ausgewählte, repräsentative Stellen wurden digital aufgenommen. Die elektronenmikroskopische Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte am Elektronenmikroskop Zeiss EM 10, wobei jeweils die Stellen der OPL bzw. der Ribbonsynapsen fotografiert wurden, die das repräsentative Charakteristikum der eingebetteten Präparate in den jeweiligen Entwicklungsstadien widerspiegeln. Es erfolgten qualitative und quantitative Auswertungen des jeweiligen Entwicklungsstadiums der OPL bzw. der Photorezeptorribbonsynapse.

Die qualitative Analyse sollte den charakteristischen Entwicklungszustand der verschiedenen Altersstadien und die Lokalisation von synaptischen Ribbons und deren Vorstufen dokumentieren. Die quantitative Untersuchung sollte Aufschluss über das erste Auftreten, die Anzahl und die Größenentwicklung der Ribbons geben.

Bei den frühen Entwicklungsstadien (bis P5) wurden die Außenglieder und die Innenglieder zusätzlich zu der sich ausdifferenzierenden OPL untersucht und fotografiert, um umfassende Aufschlüsse über den Ort der Bildung der synaptischen Ribbons zu erhalten. Die umfassende Untersuchung von Innen-, Außengliedern wurde parallel zur Analyse der Synapsenregionen durchgeführt, da Olney (1968) von einer sporadischen Ribbonbildung in den Innengliedern bzw. Zellsomata berichtete.

Ab dem ersten postnatalen Tag erfolgte zudem die quantitative Sichtanalyse der in 50 Feldern bei 20000facher Vergrößerung gesichteten Synapsen in der OPL und den darin befindlichen Ribbons. Jedes Feld entsprach dabei einer Fläche von ca. 7,7 mal 7,7 cm auf dem Fluoreszenzschirm des Elektronenmikroskops. Dies ergibt eine zu quantifizierende Fläche der äußeren plexiformen Schicht von ca. $220 \mu\text{m}^2$. Die Aufnahmen wurden mit der im Elektronenmikroskop integrierten analogen Fotokamera dokumentiert. Von den Negativen wurden Fotopapierabzüge gewonnen, die wiederum mit einem Flachbrettscanner digitalisiert wurden. Kontrast, Helligkeit und Bildausschnitt sind mit Adobe Photoshop optimiert worden. Mit Windows Powerpoint wurden die Bilder beschriftet und arrangiert.

3.6 Chemikalien und Bezugsquellen (Tabelle 2)

Chemikalien	Bezugsquelle
Diethylether	Universitätsapotheke, Leipzig
Bleiacetat	Serva Feinbiochemie
Bleicitrat	Serva Feinbiochemie
Bleininitrat	Serva Feinbiochemie
Borax	Serva Feinbiochemie
Einbettungsmedium- Epoxydharzbasis	Fluka Chemie
Fotoentwickler	Tetenal Photowerk
Fotofixierer	Tetenal Photowerk
Entellan- Schnelleindeckmittel	Merck
Glutaraldehyd	Serva Feinbiochemie
Kaliumchlorid	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumcitrat	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Osmiumtetroxid	Carl Pinnow
Paraformaldehyd	Merck
Propylenoxyd	Carl Roth
Toluidinblau	Merck
Uranylacetat	Serva Feinbiochemie

3.7 Verwendete Lösungen (Tabelle 3)

	Lösung	Rezept
1	phosphatgepufferte Salzlösung 5 x PBS (fünffach konzentriert)	40 g Natriumchlorid (NaCl) 1 g Kaliumchlorid (KCl) 7,2g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 1,2g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) auf 1 Liter Aqua dest. auffüllen Arbeitslösung wurde 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und auf pH 7,4 eingestellt.
2	Aldehydfixanz: Paraformaldehyd 2%, Glutaraldehyd 2,5% in PBS pH 7,4	Im Verhältnis 1:1 2g Paraformaldehyd, 2,5ml Glutaraldehyd (25% Stammlösung) mit PBS auf 100 ml auffüllen (unter ständigem Rühren auf 65°C erwärmen und abfiltrieren).
3	Boraxlösung (1%)	1 g Borax (Dinatriumtetraborat) in 100 ml Aqua dest.
4	Toluidinblaulösung (0,1 %)	0,1 g Toluidinblau in 100 ml Boraxlösung
5	Osmiumtetroxidlösung 1%	0,1 g Osmiumtetroxid in 10 ml Aqua dest. vollständig auflösen (ca. 12 h)
6	Uranylacetat 2% in 70% Ethanol	1 g Uranylacetat in 50 ml 70 % Ethanol (vollständig gelöst)
7	modifizierte Kontrastierlösung nach Reynolds	0,20 g Bleicitrat 0,15 g Bleinitrat 0,15 g Bleiacetat 1 g Natriumcitrat in 41 ml Aqua dest. lösen (schütteln) nach ca. 3 h 9 ml 1n NaOH zugeben
8	Einbettungsmedium- Epoxyharzbasis	26 g Epoxy- Einbettungsmittel 15 g MNA - Härter (Methylnadicanhydrid) 11 g DDSA - Härter (Dodecenylsuccinicanhydrid) 0,4 g DMP30 - Beschleuniger (2,4,6,tri (dimethylaminomethyl) phenol)

3.8 Geräte und sonstige Hilfsmittel (Tabelle 4)

Geräte/ Hilfsmittel	Bezugsfirma
Adobe Photoshop 5.0	Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA
Digitalkamera Progress 3008	Kontron Elektronik, D
Dünnsteg- Kupfernetzchen (200 mesh)	W. Plannet GmbH, Wetzlar, D
Elektronenmikroskop Zeiss EM 900	Zeiss, Oberkochem, D
Flachbrettscanner Epson-9500 GT	Epson, D
Fluka- Agenzien, siehe Tabelle 2	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Fotopapier, Härte 2, 13 cm mal 9 cm	Tetenal Photowerk, Norderstedt, D
Elektronenmikroskopiefilme Typ 4489, 9 mal 6,5 cm	Kodak Company, New York, USA
Lichtmikroskop Axioplan 2	Zeiss, Oberkochem, D
Merck- Agenzien	Merck KgaA, Darmstadt, D
Objektträger (Glas)	Menzel-Gläser, D
Osmiumtetroxid	Carl Pinnow, Berlin-Schöneberg, D
Roth- Agenzien	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, D
Serva- Agenzien	Serva Feinbiochemie, Heidelberg, D
Szintillationsröhrchen	Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe, D
Trimmer TM 60	C. Reichert, Austria
Ultramikrotom Ultracut E	Reichert-Jung, Bensheim, D

4. Ergebnisse

4.1 Lichtmikroskopische Untersuchung der sich entwickelnden Retina

Die Untersuchung der morphologischen, lichtmikroskopisch erkennbaren Verhältnisse von Rattenretinae erstreckt sich über die postnatale Phase vom Tag der Geburt bis zum 21. Tag. Die Auswertung der mit Toluidinblau gefärbten Semidünnabschnitte der Neugeborenenretina zeigt das unreife, wenig ausdifferenzierte Vorliegen von drei Zellschichten (Ganglienzellschicht, innere plexiforme Schicht, äußere Neuroblastenschicht) am Tag der Geburt P0 (siehe Abb. 1). Zunächst beobachtet man von vitread nach sclerad die 1-3 Zelllagen dicke Ganglienzellschicht, die nach vitread durch die sog. innere Grenzmembran vom Glaskörper getrennt wird (Abb. 1). Ihr schließt sich nach sclerad die locker gepackte, netzartig strukturierte innere plexiforme Schicht (IPL) an. Als dritte deutlich zu differenzierende Schicht folgt die äußere Neuroblastenschicht (oNBL), die mehr als 50% der gesamten Retinadicke einnimmt und aus einer großen Menge undifferenzierter Zellen besteht. Die Zellkörper sind spindelförmig. Die Neuroblastenschicht besteht aus den Vorläuferzellen der künftigen Müller-, Horizontal-, Bipolar-, Rezeptor- und Amakrinzellen. Ab dem zweiten postnatalen Tag sind Ansätze sich sclerad entwickelnder Innensegmente der Photorezeptorzellen (Abb. 1, 2) zu beobachten. Es findet eine lichtmikroskopisch zunehmend klarere Strukturierung der Zellen statt. Die Innensegmente nehmen in der Längenausdehnung Richtung Pigmentepithel durch Zytoplasmavermehrung zu. Der Entwicklungsbeginn der Außensegmente aus den Innensegmenten der Rezeptorzellen scheint lichtmikroskopisch um den 5., 6. Tag zu liegen (Abb. 1, 2). Eine klare lichtmikroskopische Trennung zwischen Außen- und Innensegmenten der Photorezeptoren kann erst um den 8., 9. Tag beobachtet werden (Abb. 2, 3).

Am dritten postnatalen Tag beginnen sich zwischen dem äußeren Drittel und den verbleibenden 2/3 der inneren Neuroblastenschicht inselförmige Aufhellungen zu bilden, die den Beginn der Entwicklung der OPL einleiten (Abb. 1). Diese Aufhellungen beinhalten sich entwickelnde Horizontalzellen, Vorstufen synaptischer Rezeptorterminalen und wenig gefärbte helle Areale.

Ab P4 erscheint zwischen den gelegentlichen Aufhellungen ein schmales Band, das sich im Entwicklungsverlauf verbreitert. Im weiteren Verlauf konfluieren die inselförmigen Aufhellungen, und erst vom 5., 6. Tag an ist eine schmale durchgängige OPL erkennbar (Abb. 1, 2). Bei der Betrachtung der OPL mehrerer Semidünnschnitte der Entwicklungsstadien P3-P7 fällt die von zentral der Retina (Fovea centralis) nach peripher gerichtete Entwicklung auf. So sind bei P3 erste unregelmäßige, inselförmige Aufhellungen im äußeren Drittel der Nukleoblastenschicht zu sehen, wohingegen sie in Richtung Ora serrata noch kompakt und dicht erscheint (Abb. 1). Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei den vertikalen Durchmessern der zellreichen Schichten, die in der Nähe der Austrittsstelle des N. opticus vom Beginn der postnatalen Entwicklung an deutlich kräftiger ausgebildet sind. Je weiter peripher von der Fovea centralis entfernt die OPL zu liegen kommt, desto später beginnt und endet deren Entwicklung. Die großen hellen Horizontalzellen begrenzen die OPL in Richtung Bipolarzellen (INL) und geben der OPL dadurch bis zum 8. Tag ein perl schnurartiges Erscheinungsbild. Die Neuroblastenschicht wird ab dem 6., 7. postnatalen Tag in eine äußere und innere unterteilt, sodass scleread der OPL die äußere Nukleoblastenschicht als Schicht der Rezeptorenzellen und vitread die innere Nukleoblastenschicht als Schicht der Vorläuferzellen der Bipolar- und Amakrinzellen zu liegen kommt.

Unreife Amakrinzellen sind ab dem 1. postnatalen Tag im inneren Drittel der Neuroblastenschicht an der Grenze zur inneren plexiformen Schicht sichtbar. Sie haben ebenfalls große, sehr helle Zellkerne, die in der Zellmitte liegen und von einem lichtmikroskopisch erkennbaren Zytoplasmasmaum umgeben sind. Die Bipolarzellen nehmen neben den Amakrinzellen den größten Teil der inneren Neuroblastenschicht ein. Die Zellen und Zellkerne der Bipolarzellen sind nur ca. halb so groß wie die der vitread liegenden Amakrinzellen.

Die vollständige Separation der Neuroblastenschicht durch die OPL in eine äußere und innere Körnerzellschicht dauert ungefähr bis zum 6., 7. postnatalen Tag (Abb. 2, 3). Die Nervenfaserschicht des N. opticus wird durch die Axone der Ganglienzellen gebildet und nimmt vom 10. bis 21. Tag besonders stark an Volumen zu (Abb. 3). Ab dem 6., 7. Tag sind alle Hauptzelltypen differenzierbar, und die Retina erscheint in typischer Schichtung, die man von der adulten Netzhaut kennt.

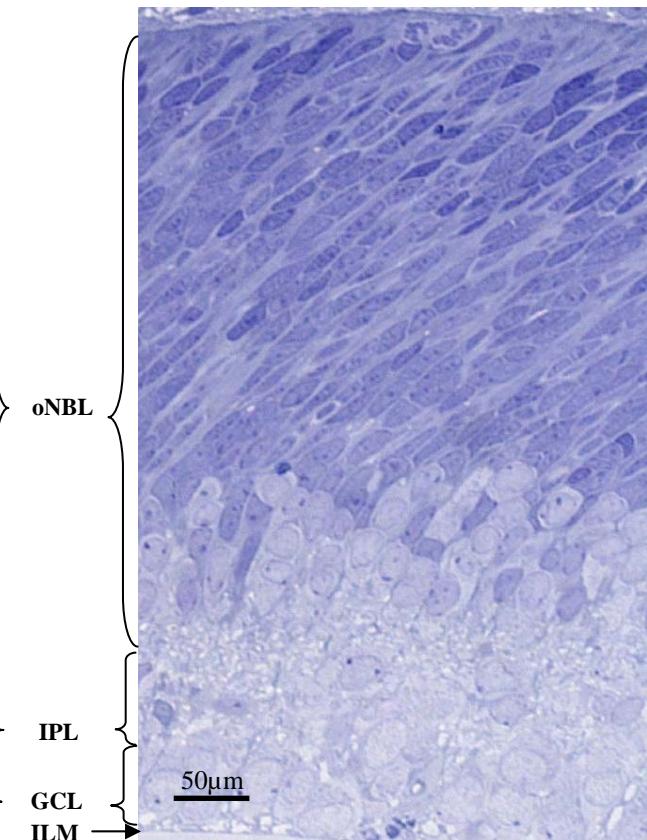
Es finden aber im weiteren Verlauf noch Wachstums-, Differenzierungs- und Umstrukturierungsvorgänge in allen Zellschichten statt, zu deren genaueren Beurteilung andere Untersuchungsmethoden (molekularbiochemische; immunzytochemische; elektronenmikroskopische) hinzugezogen werden müssen. Während die innere plexiforme Schicht post partum schon vorhanden ist und im Entwicklungsverlauf noch an Volumen zunimmt, ist die OPL am Ende der ersten Woche ausgebildet und differenziert sich bis P21. Die vertikale Ausdehnung der adulten inneren plexiformen Schicht übersteigt um mehr als das 5fache die der OPL. In der OPL wird die synaptische Verschaltung von Rezeptorzelle (erstes Neuron) und nachfolgendem zweitem Neuron (Horizontal-, Bipolarzelle) vollzogen, während in der inneren plexiformen Schicht hauptsächlich die Axone des 2. Neurons mit dem 3. (Ganglion) verschaltet werden. Es ist als sichtbares Zeichen der „Spätentwicklungsphase“ eine starke Dickenzunahme der Photorezeptorensegmente zwischen dem 10. und 21. Tag festzustellen (Abb. 3). Ab dem 21. Tag (Abb. 3) erscheint die Retina von Ratten in ihrer Schichtung und auf zellulärer Entwicklungsebene lichtmikroskopisch vollständig ausgereift.

Abbildung 1

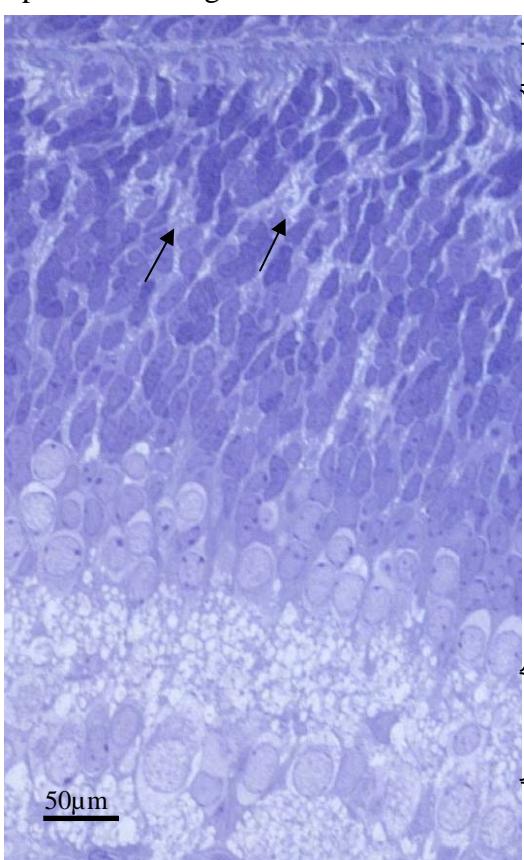
Tag der Geburt P 0



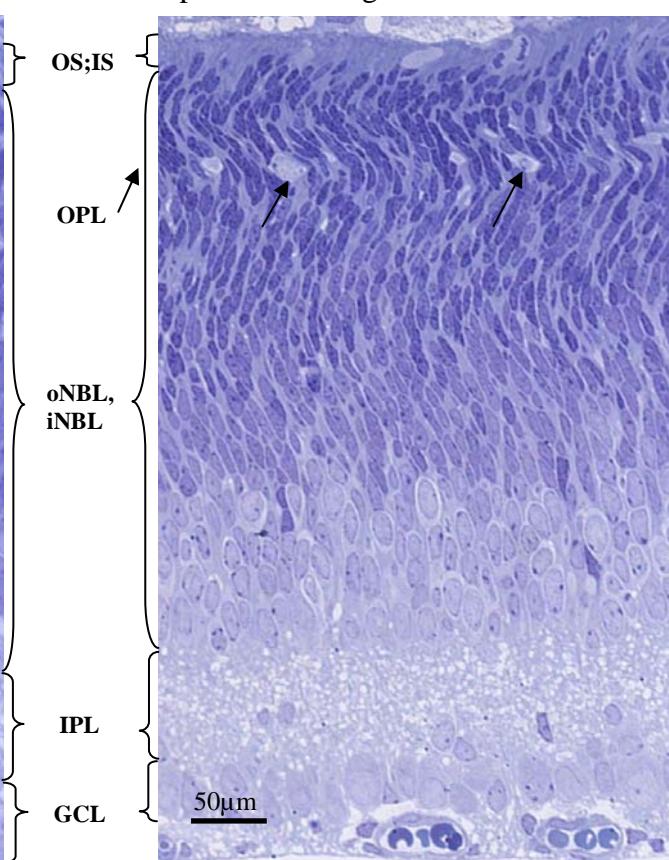
postnataler Tag P 1



postnataler Tag P 2



postnataler Tag P 3



GCL: Ganglienzellschicht; **ILM:** innere Grenzmembran; **IPL:** innere plexiforme Schicht; **o/iNBL:** äußere/ innere Neuroblastenschicht; **OPL:** äußere plexiforme Schicht; **OS/ IS:** Außen- bzw. Innensegmente der Rezeptorzellen;

Abbildungslegende zu Abbildung 1

Tag der Geburt P0

P0 : Man erkennt die breite, undifferenzierte äußere Neuroblastenschicht (oNBL), an die sich die weitgehend somafreie innere plexiforme Schicht (IPL) und die Ganglienzellschicht (GCL) anschließen.

postnataler Tag P1

P1 : Die zunehmende Spindelform der Zellkerne der NBL mit heterochromatischem Chromatin sowie die Amakrinzellen am Übergang der IPL zur oNBL werden differenzierbar. Es bilden sich helle somafreie Inseln in der zunächst mit Somata gepackten oNBL.

postnataler Tag P2

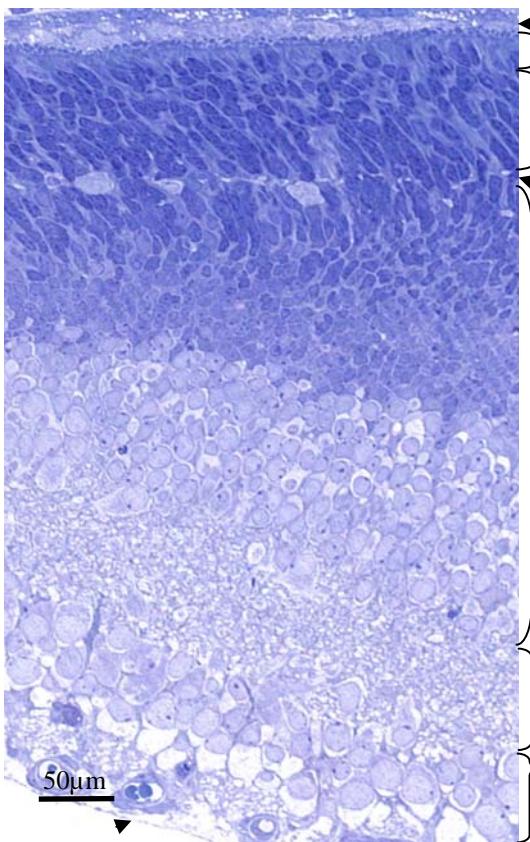
P2 : Frühe Außen- und Innenglieder der Rezeptorzellen werden sichtbar. Die somafreien hellen Inseln in der sich formierenden OPL nehmen an Größe und Ausdehnung zu. Durch die Bildung „somafreier Inseln“ (Pfeile) findet die zunehmende Separation der NBL statt.

postnataler Tag P3

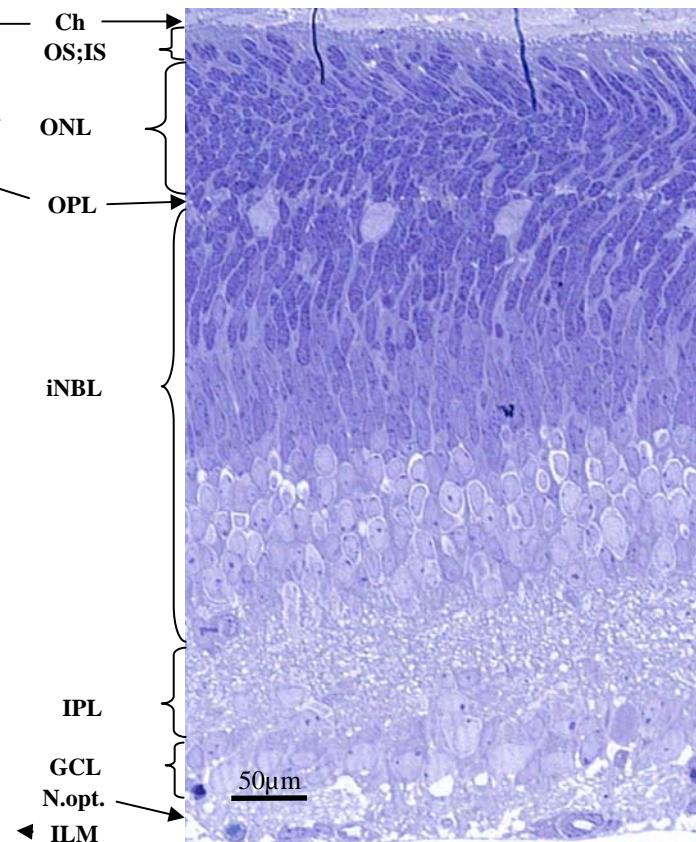
P3 : Die Pfeile zeigen die sich formierende OPL. Die Bipolarzellen liegen im mittleren Drittel der NBL und haben hellere Zellkerne. Vitread schließen sich die von einem schmalen Zytoplasmasaum umgebenen Amakrinzellen an.

Abbildung 2

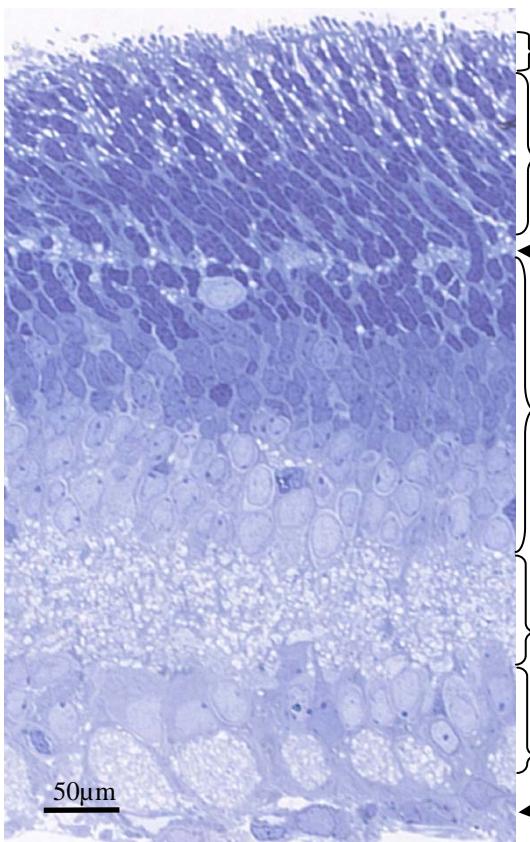
postnataler Tag P 4



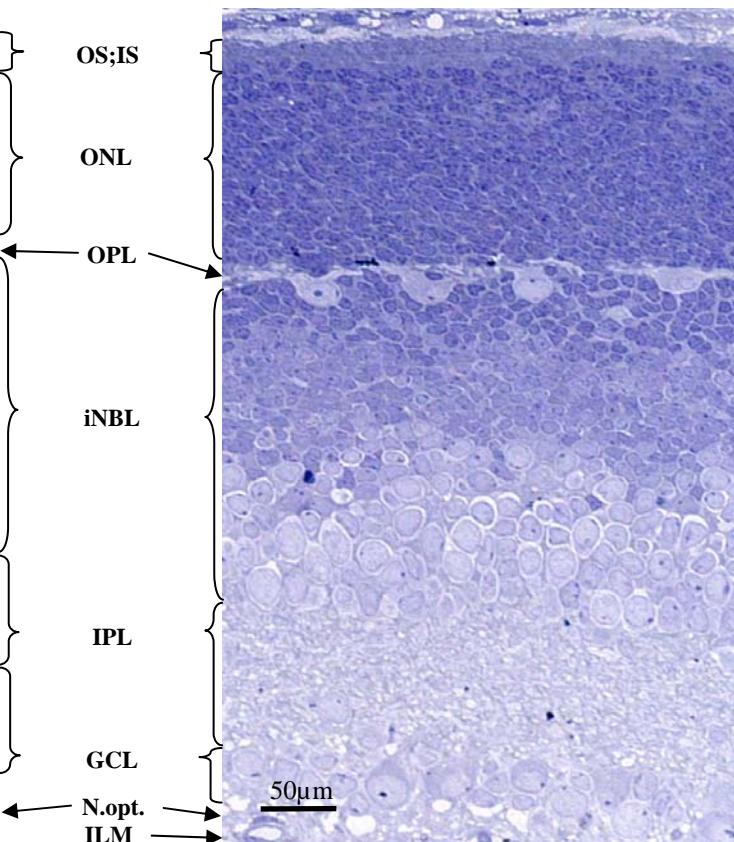
postnataler Tag P 5



postnataler Tag P 6



postnataler Tag P 7



Ch: Pigmentepithel; **GCL:** Ganglienzellschicht; **ILM:** innere Grenzmembran; **IPL:** innere plexiforme Schicht; **iNBL:** innere Neuroblastenschicht; **ONL:** äußere Körnerzellschicht; **OPL:** äußere plexiforme Schicht; **OS/ IS:** Außen/ Innensegmente der Rezeptorzellen; **N.opt.:** Nervus opticus;

Abbildungslegende zu Abbildung 2

postnatale Tage P4/ 5

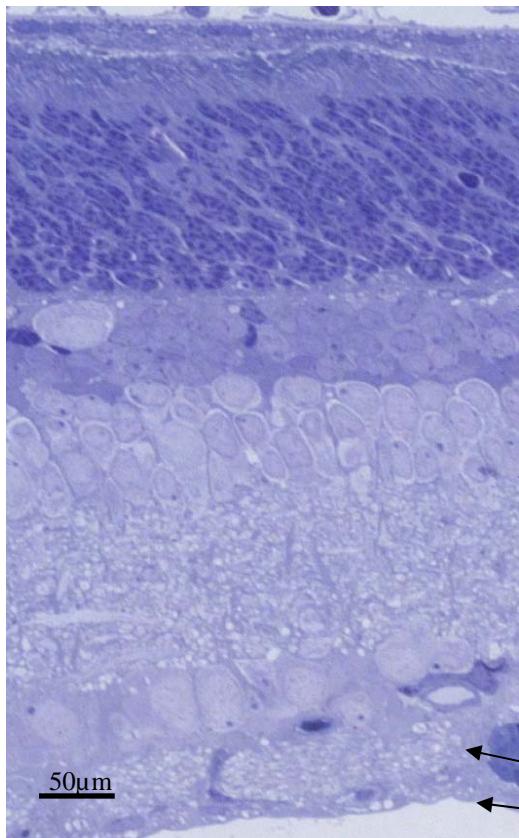
P4/ 5 : Die OPL beginnt zu einer homogenen Schicht zu konfluieren.

postnatale Tage P6/ 7

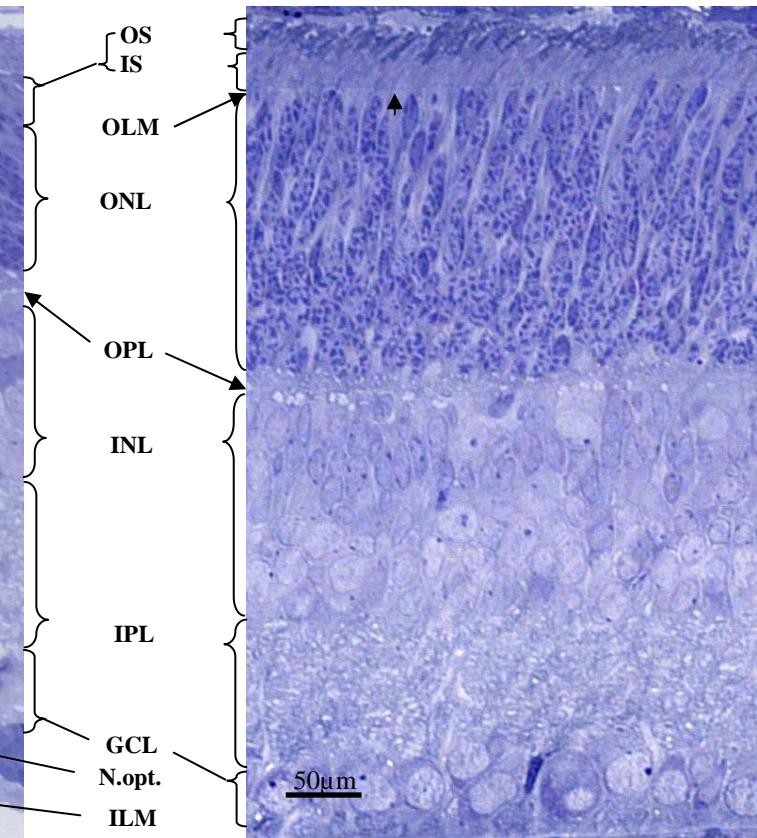
P6/ 7 : Eine zusammenhängende OPL ist erkennbar. Die großen Zellkerne, die von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben sind und direkt am Übergang zur iNBL liegen, sind Horizontalzellkerne, die der OPL ein perlschnurartiges Aussehen verleihen. Die Innen- und Außensegmente der Rezeptorzellen sind deutlich erkennbar.

Abbildung 3

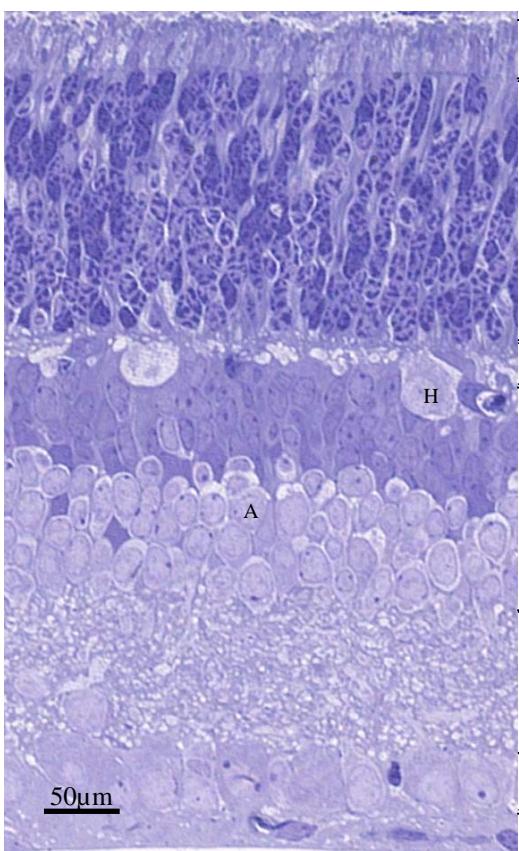
postnataler Tag P 8



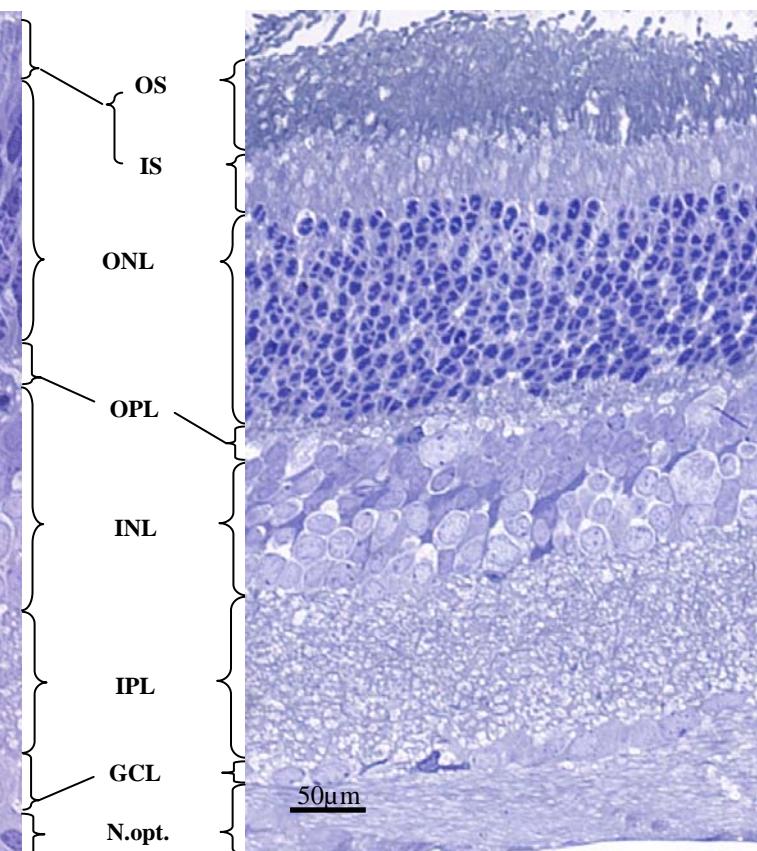
postnataler Tag P 9



postnataler Tag P 10



postnataler Tag P 21



A: Amakrinzelle; **GCL:** Ganglienzellschicht; **H:** Horizontalzelle; **ILM:** innere Grenzmembran; **IPL:** innere plexiforme Schicht; **INL:** innere Körnerzellschicht; **N.opt.:** Nervus opticus; **OLM:** äußere Grenzmembran; **OPL:** äußere plexiforme Schicht; **ONL:** äußere Körnerzellschicht; **OS/ IS:** Außen/ Innenglieder der Rezeptorzellen;

Abbildungslegende zu Abbildung 3

postnatale Tage P8/ P9

P8/ P9 : Die einzelnen Retinaschichten werden kompakter und homogener strukturiert und damit sehr deutlich voneinander abgrenzbar. Die OPL nimmt weiter im Querdurchmesser an Ausdehnung zu.

postnataler Tag P10

P10 : Die Bildung der retinalen Zellschichten ist abgeschlossen und die zellulären Hauptvertreter sowie die OPL sind unterscheidbar.

postnataler Tag P21

P21 : Die OS und IS Rezeptorzellen nehmen nochmals an Länge zu. Die kernreichen Schichten der Retina mit ihren kleinen kompakten Zellkernen werden durch die diffusen plexiformen Schichten getrennt.

4.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

4.2.1 Elektronenmikroskopische Auswertung P0-P3

Bis zum Stadium P3 zeigt sich die Retina von Spraque- Dawley Ratten elektronenmikroskopisch insgesamt unreif, da nur die drei sich entwickelnden Zellkomplexe (Ganglienzell-, Nukleoblasten- und innere plexiforme Schicht) eindeutig nachzuweisen sind.

Die in P1 (Abb. 5) noch relativ dicht aneinander liegenden Zellkörper der Nukleoblastenschicht lockern zunehmend auf und bilden besonders im Bereich der potentiellen OPL an manchen Stellen weite Maschen. Der extrazelluläre Raum (Abb. 4d; 5e; 6f; 7a, f) ist aufgelockert und vergrößert. Dieses Geflecht aus vielen weniger kompakt gefüllten, optisch leerer erscheinenden Stellen wird im Verlauf von P1-P7 mit Dendriten und fingerförmigen Membranfortsätzen ausgefüllt, die aufgrund der zahlreichen uniformen Vesikel als Vorläufergebilde (Abb. 5a; 6b) sich entwickelnder Photorezeptorterminalen angesehen werden können. In manchen dieser präsynaptischen Vorläuferterminalen konnten elektronendichte granuläre Verdichtungen (Abb. 7b) beobachtet werden. Am postnatalen Tag P3 konnten vereinzelt erste kurze, frei in der Rezeptorterminalen flottierende Ribbons beobachtet werden. Sie waren ca. 60-70 nm lang, kompakt und bereits vollständig von synaptischen Vesikeln umgeben. In den Innengliedern (Somata) der Rezeptorzellen konnten keine synaptischen Ribbons bzw. deren Vorstufen beobachtet werden.

Die ersten unreifen präsynaptischen Terminalen waren bereits mit Vesikeln gefüllt, die aber nur teilweise den für synaptische Vesikel typischen Durchmesser von 30-50 nm aufwiesen. Die in den Vesikeln befindliche Flüssigkeit hatte eine geringere Transluzenz als das sie umgebende Zytosol. Um die frühen Terminalen konnten einige Dendriten beobachtet werden. Elektronendichter erscheinende Plasmamembranverdichtungen sind bereits gelegentlich erkennbar. Am scleread gelegenen Teil der Photorezeptorzelle differenziert das Innensegment, das zugleich Entwicklungsursprung (Zilium) für die nachfolgende Entstehung des Außensegmentes darstellt.

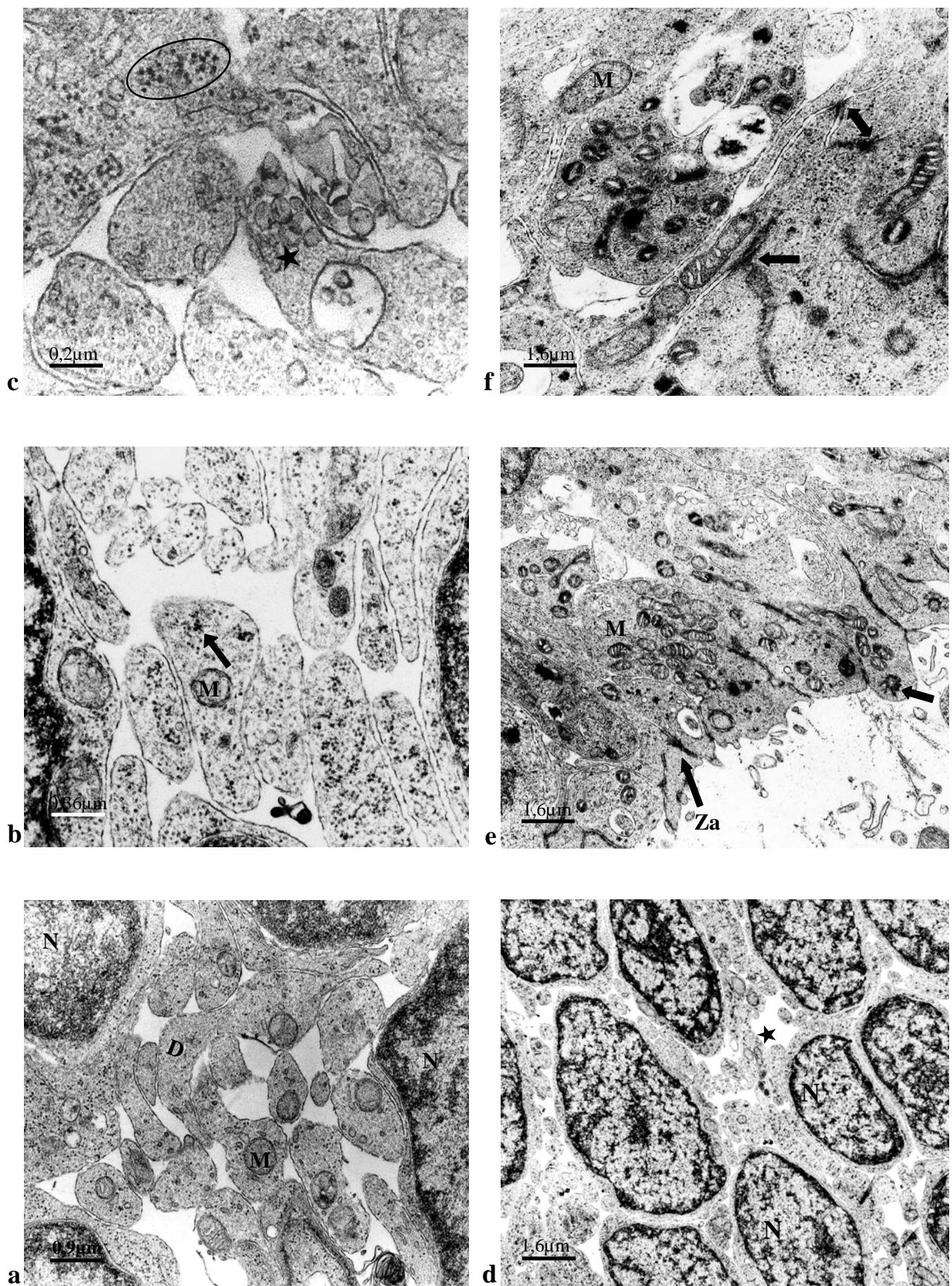
Die vitread liegenden Enden der Photorezeptoren bilden Fortsätze, die sich im Verlauf der Entwicklung zu den präsynaptischen Terminalen differenzieren. Schon ab P1 (Abb. 5) sind im äußeren Drittel der Nukleoblastenschicht interzelluläre Membranausstülpungen zu sehen, die reich an 30-40 nm großen, meist unregelmäßig geformten vesikulären Gebilden sind. In den frühen Terminalen der sich entwickelnden OPL werden vereinzelt granuläre Strukturen beobachtet (Abb. 7b). Ab dem Stadium P0 finden sich in manchen Terminalen unregelmäßig geformte elektronendichte Strukturen (wenige Nanometer im Durchmesser- siehe Abb. 4b, c).

Anhand der Schnittbilder kann man in der äußeren Nukleoblastenschicht zahlreiche Prozesse dendritischen Wachstums (Abb. 4a; 5a; 6b) im Bereich der äußeren Retina feststellen. Die von den Zellkernen der äußeren Nukleoblastenschicht scleread bzw. pigmentepithelwärts befindlichen unreifen Innensegmente besitzen Mitochondrien (Abb. 4e; 6e; 7d), zahlreiche Ribosomen und werden von Mikrotubuli durchzogen.

Am scleread gelegenen Ende der Innensegmente der Rezeptorzellen sind dichte flächige Zellkontakte im Sinne von Zonulae adhaerentes, - occludentes (Abb. 4e, f; Abb. 5f) erkennbar, die die äußere Grenzmembran (Abb. 4e) bilden. Die Zellen der äußeren Nukleoblastenschicht sind fast vollständig durch die großen Nuclei ausgefüllt, die von einem schmalen Zytoplasmasmaum umgeben sind. Die Zellkerne sind reich an heterochromatischem Chromatin (Abb. 4d). Gelegentlich kann man Golgiefelder (Abb. 5c) mit Zisternen, Vakuolen und Vesiculae sowie glattes endoplasmatisches Retikulum erkennen.

Es bestätigt sich die lichtmikroskopische Beobachtung des centro- peripheren Entwicklungsverlaufes der OPL Reifung, da in den peripheren Regionen die Nukleoblastenschicht (Abb. 8f) noch als dichter lückenloser Zellverband vorliegt. Das erste postnatale Entwicklungsstadium der äußeren Retina ist hauptsächlich durch zelluläre Differenzierungsvorgänge der Nukleoblastenschicht gekennzeichnet. Der interzelluläre Raum vergrößert sich stellenweise sehr stark, um möglicherweise Raum für die synaptische Entwicklung in der OPL zu schaffen.

Abbildung 4 postnataler Tag P0

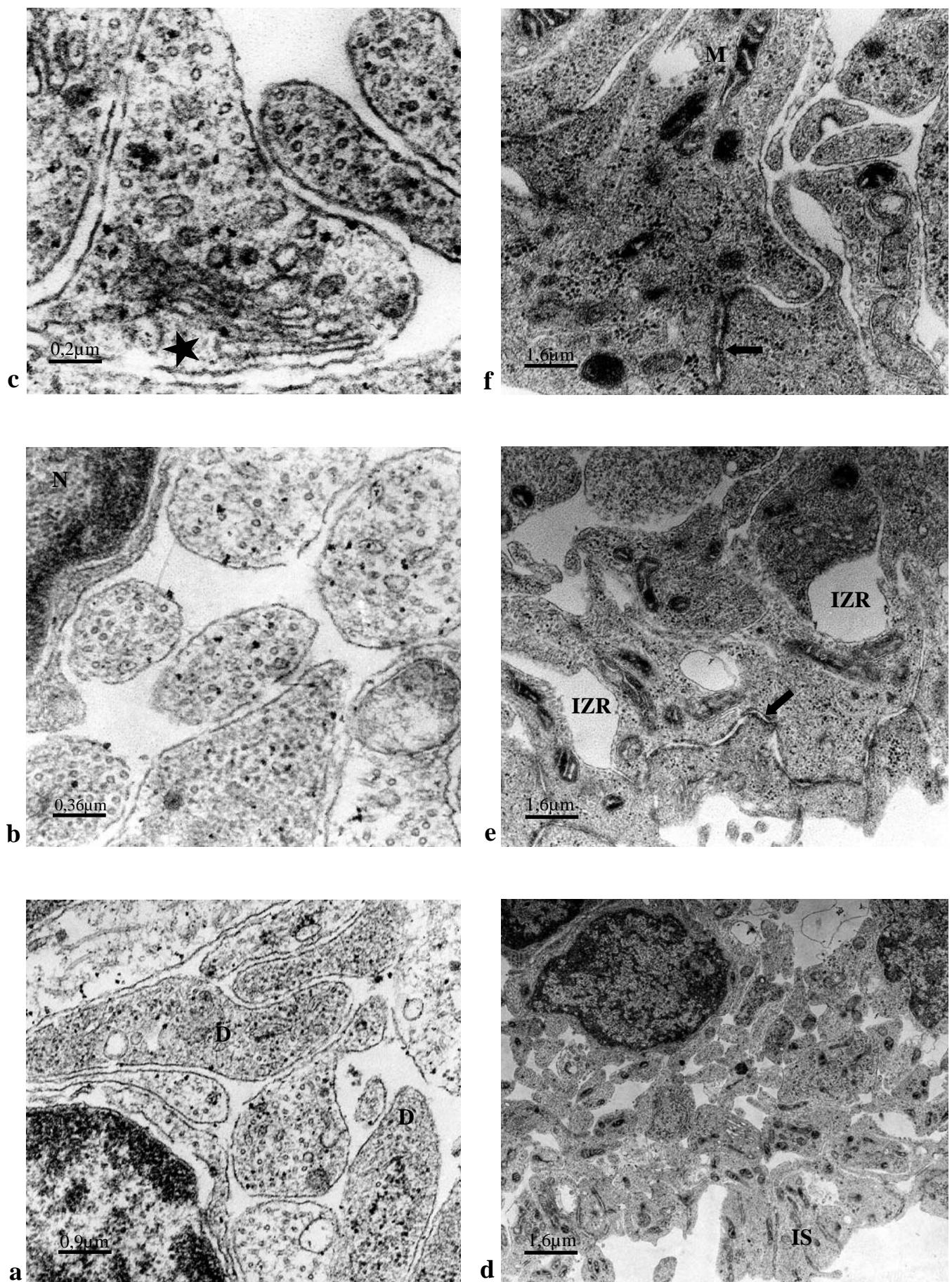


Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 4

- a) Ausschnitt aus der äußeren Neuroblastenschicht (oNBL):
Zahlreiche Membranausläufer (**D**), die teilweise Mitochondrien (**M**) enthalten, können in der sich entwickelnden OPL beobachtet werden. Zwischen den Ausläufern sind optisch leere Lücken zu finden. **N**: Nucleus;
- b) Die Abbildung zeigt 10-20 nm große Ribosomen bzw. Aggregationen granulärer Substanzen (Pfeil) im Zytoplasma der Dendriten. **M**: Mitochondrium;
- c) Zahlreiche verschiedengroße, vesikelartige Strukturen (Stern) sind in den somafreien Arealen der oNBL zu beobachten. Die Ellipse zeigt Anhäufungen von ca. 20-40 nm großen elektronendichten Strukturen neben dem glatten endoplasmatischen Retikulum.
- d) Übersichtsaufnahme im Bereich der sich entwickelnden OPL mit Zellkernen (**N**), die heterochromatisches Chromatin enthalten. Der Stern zeigt vergrößerte (aufgelockerte) Interzellularräume. **N**: Nucleus;
- e) Zeigt den Anschnitt im Bereich der Innensegmente an der äußeren Grenzmembran. Der Pfeil markiert ein Centriol- die basale Verankerung des sich entwickelnden Außensegments. Die Zonulae adhaerentes (**Za**) bauen in ihrer Gesamtheit die äußere Grenzmembran auf. **M**: Mitochondrien;
- f) Die Innensegmentdetailansicht mit zahlreichen horizontal und vertikal angeschnittenen Mitochondrien (**M**) und Zellkontakte- Zonulae adhaerentes (Pfeil). Ribbons sind nicht zu erkennen.

Abbildung 5 postnataler Tag P1

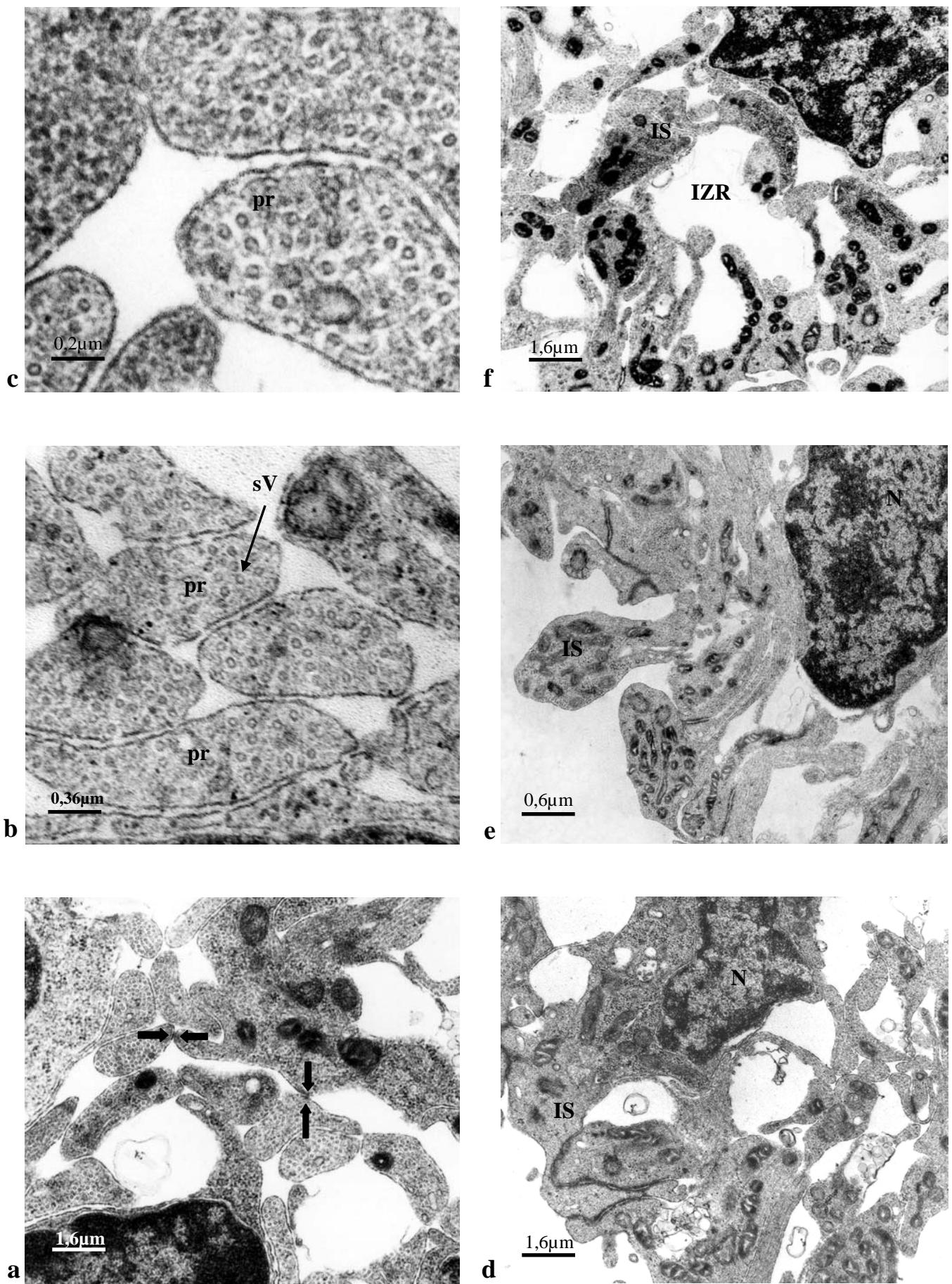


Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 5

- a) Ausschnitt aus der sich entwickelnden OPL. Es sind zahlreiche Fortsätze (**D**) zu beobachten, die weitgehend uniforme Vesikel enthalten. Die Größe dieser Vesikel entspricht der synaptischer Vesikel. Es sind zusätzlich auch größere intrazelluläre Membranprofile zu beobachten.
- b) Detailaufnahme von unreifen, sich entwickelnden synaptischen Terminalen.
N: Nucleus;
- c) Ein Golgi Apparat (Stern) mit vielen Zisternen und Vakuolen neben uniformen „synaptischen“ Vesikeln im Bereich der prospektiven OPL.
- d) Übersichtsaufnahme der Innensegmente (**IS**) mit lockermaschigen Interzellularlücken.
- e) Vergrößerung des Interzellularraumes (**IZR**) auch im Bereich der äußeren Grenzmembran (Pfeil).
- f) Der Pfeil zeigt Interzellulkontakte (Zonulae adhaerentes). Viele Ribosomen und Mitochondrien (**M**) sind zu beobachten.

Abbildung 6 postnataler Tag P2

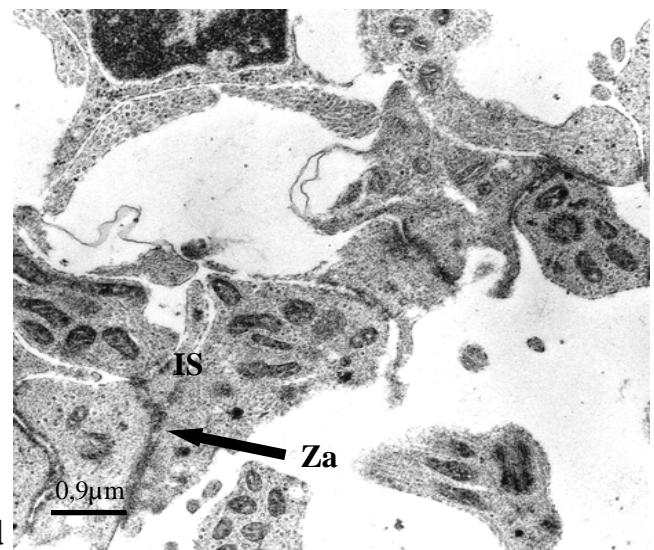
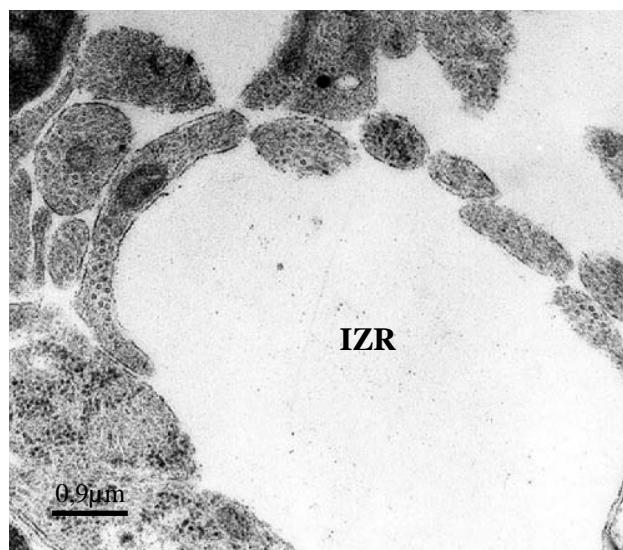
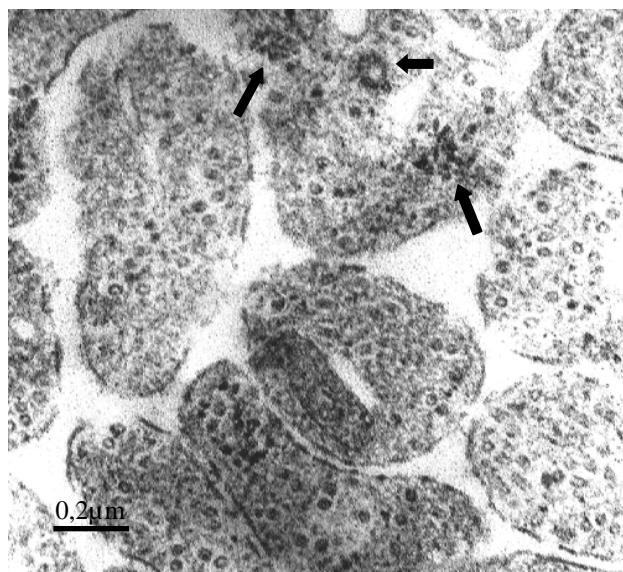
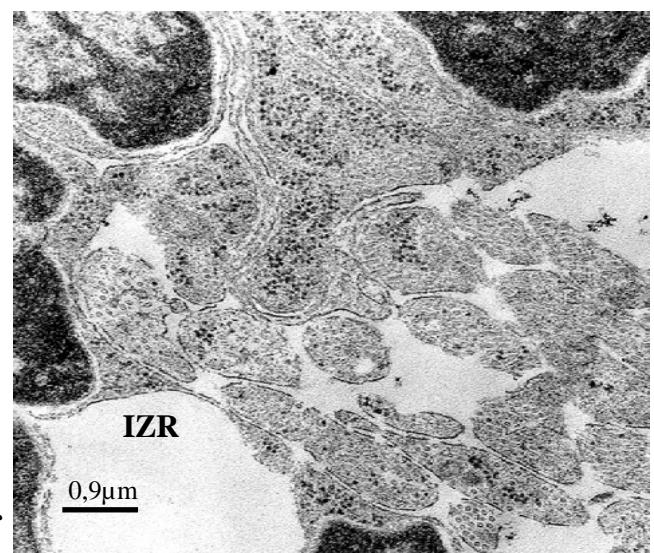
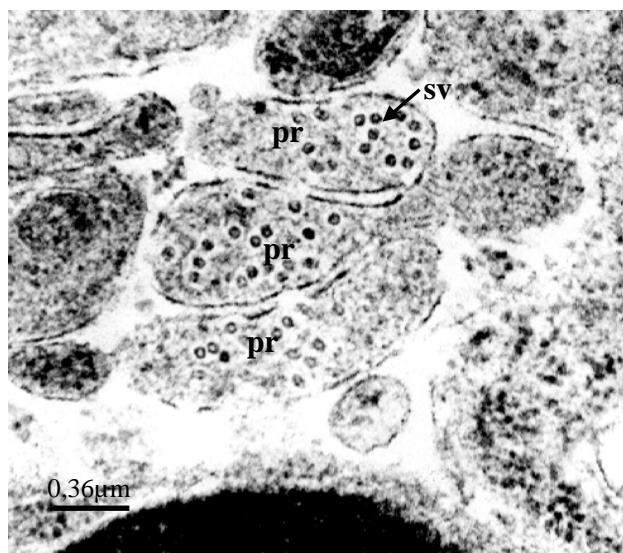


Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 6

- a) Erste direkte Interzellularkontakte und Membranverdichtungen sind im Bereich der sich entwickelnden OPL erkennbar (Pfeile).
- b) Präsynaptische Terminalen (**pr**) im Bereich der sich entwickelnden OPL mit homogen verteilten, gleichförmig großen synaptischen Vesikeln (**sV**).
- c) Detailaufnahme von unreifen präsynaptischen Terminalen (**pr**), die homogen mit Zytoplasma gefüllt sind.
- d) Innensegmente (**IS**) im Bereich der äußeren Grenzmembran. **N:** Nucleus;
- e) Man erkennt die Ausdifferenzierung und Größenzunahme der Innensegmente (**IS**) und eine hohe Anreicherung mit Mitochondrien. **N:** Nucleus;
- f) Die Zunahme des Interzellularrandes (**IZR**) im Bereich der zukünftigen OPL.
IS: Innensegment

Abbildung 7 postnataler Tag P3



Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 7

- a) Weite, optisch leere Interzellularräume (**IZR**- mehrere μm) sind in diesem Stadium der sich entwickelnden OPL zu beobachten.
- b) Elektronendichte, unregelmäßig geformte, globuläre Strukturen können in der primitiven präsynaptischen Terminalen beobachtet werden (Pfeile).
- c) Aneinander liegende präsynaptische Terminalen (**pr**). In den Terminalen sind synaptische Vesikel (**sV**) erkennbar.
- d) Innensegmente (**IS**) differenzieren sich im Bereich der äußeren Grenzmembran (**Za**).
- e) Gelegentlich sichtbare Zellmembranveränderungen (Stern) im Bereich der Innensegmente. Man erkennt zahlreiche Mitochondrien (**M**).
- f) Weite Interzellularräume (**IZR**) im Bereich der äußeren Grenzmembran, die von Dendriten durchzogen werden.

4.2.2 Elektronenmikroskopische Auswertung P4-P6

Ab dem vierten/ fünften postnatalen Tag kann man im Bereich der zentralen Retina (Fovea centralis) eine schmale und durchgängige OPL beobachten (Abb. 2).

Im Stadium P4-P6 zeigen sich erste elektronendichte, mit der Plasmamembran assoziierte elektronendichte Verdichtungen (Abb. 8a, b, c; siehe Diskussion). Man findet vesikelgefüllte präsynaptische Terminalen, die teilweise Invaginationen (Horizontalzelldendriten) aufweisen. Zusätzlich beobachtet man häufig elektronendichte globuläre Strukturen, die möglicherweise Vorstufen von sich entwickelnden synaptischen Ribbons darstellen (Abb. 8a; 9a-e; siehe Diskussion). Diese Vorstufen sind von körniger Konsistenz (ca. 5-10 nm Durchmesser) und besitzen meist eine enge räumliche Beziehung zu den teilweise vorhandenen synaptischen Ribbons (Abb. 9c, d, e). Die Vorstufen (Diskussion) verdichten sich zu größeren Komplexen (Abb. 9a, b, d, e, 10c, f) und bilden dadurch möglicherweise kleinere Ribbonsegmente (Abb. 9e, 10c), die im Entwicklungsverlauf zu Ribbons polymerisieren. Teilweise sind sie durch filamentäre Strukturen („Stiele“- Abb. 9a, b, c,) miteinander verbunden und können gelegentlich in der Nähe von größeren vesikulären Strukturen beobachtet werden. Am 5. postnatalen Tag werden erstmals synaptic Spheres (Abb. 9e, 10c) neben elektronendichtem granulärem Material in der Rezeptorterminale beobachtet. Die synaptic Spheres liegen nah beieinander und sind bereits vollständig von synaptischen Vesikeln (Abb. 9e) umgeben. Die meisten Ribbons flottieren noch frei im Zytoplasma, wohingegen manche schon über eine elektronendichte bogenförmige Aufhellung, der sog. arciform Density (Abb. 10d), annähernd senkrecht mit der präsynaptischen Membran verbunden sind. Die beobachteten Ribbons haben bereits konstante Querdurchmesser von ca. 30-50 nm (wie in der adulten Netzhaut), sind in ihrer Länge und Lage aber äußerst variabel. Die im Zytoplasma schwimmenden synaptischen Ribbons wurden in einiger Entfernung zur Plasmamembran gefunden. Ein enger Bezug zu bestimmten Zellorganellen ist nicht erkennbar. Die am Nächsten zum synaptischen Ribbon liegenden größeren Zellbestandteile sind in den meisten Fällen das glatte endoplasmatische Retikulum bzw. der Golgi Apparat. Die Anzahl der in den dendritischen Endigungen (primitive präsynaptische Terminale) der Rezeptorzellen gefundenen Ribbons steigt kontinuierlich an und beträgt am 6. Tag 9 Ribbons pro $220 \mu\text{m}^2$ OPL (Tabelle 5).

In einigen dieser Endigungen wurden mehrere frei im Zytosplasma flottierende synaptische Ribbons gefunden. Bei diesen Anhäufungen von Ribbons handelt es sich um sog. Ribbonfelder (Abb. 10c), die auf eine sich entwickelnde Zapfenterminale schließen lassen. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle wurde pro präsynaptischer Terminale ein synaptischer Ribbon gefunden. Hier handelt es sich vermutlich um sich entwickelnde Stäbchenterminalen. Das gleichzeitige Auftreten von Stäbchen- und Zapfenterminalen in dieser frühen Entwicklungsphase kennzeichnet ihren gemeinsamen Entwicklungsbeginn in der OPL.

Bei der Untersuchung der präsynaptischen Rezeptorendigungen fällt besonders das Verteilungsmuster der mit in Form und Inhalt homogen erscheinenden Vesikel (Abb. 8b, e, 9e) auf. Die synaptischen Vesikel liegen dicht gedrängt an den Ribbons und bilden regelrechte „Vesikelwolken“ (Abb. 10c, f). Bei sehr hohen Vergrößerungen sind ultrastrukturell-filamentäre Strukturen (Abb. 10e) erkennbar, die die Vesikel mit den Ribbons verbinden. Der Abstand von synaptischem Ribbon zum Vesikel ist mit ungefähr 30- 40 nm bereits weitgehend konstant.

Ab dem 5.-6. Tag kann man von primitiven präsynaptischen Terminalen sprechen, die eine variable Menge uniformer Vesikel, glattes endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen und manchmal auch noch Mitochondrien enthalten. Die Entwicklung der synaptischen Ribbons aus granulären Vorstufen ist in diesem Stadium der Entwicklung anhand der Abbildungen zu vermuten (P5, 6, 7). Ab dem 6. Tag sind erste einfache Dyadenkonfigurationen (Abb. 10d, e) zu erkennen, die durch das Aufeinandertreffen von zwei Horizontalzellfortsätzen und der ribbonbesetzten Plasmamembranausstülpung der Rezeptorterminalen gebildet werden. Die prä- und postsynaptischen Elemente lagern sich aneinander an, sodass man von einer appositionellen (Kontaktaufnahme) Phase (Abb. 8b, e) sprechen kann. An den Kontaktstellen fallen Membranveränderungen wie Verdichtungen (Abb. 8c) und Verbreiterungen auf.

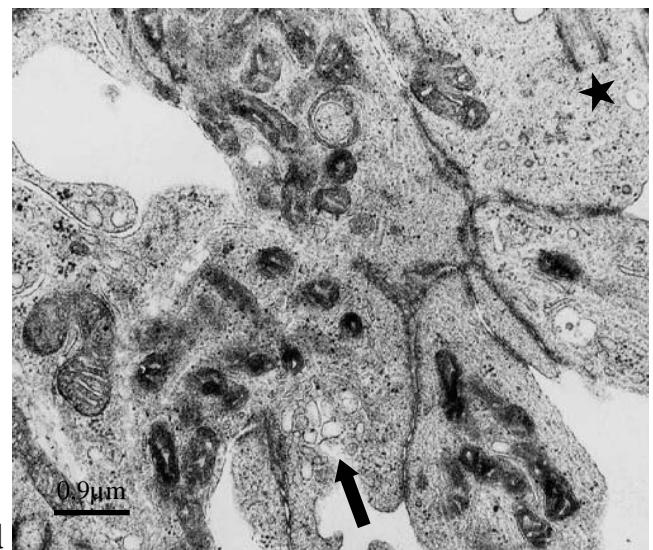
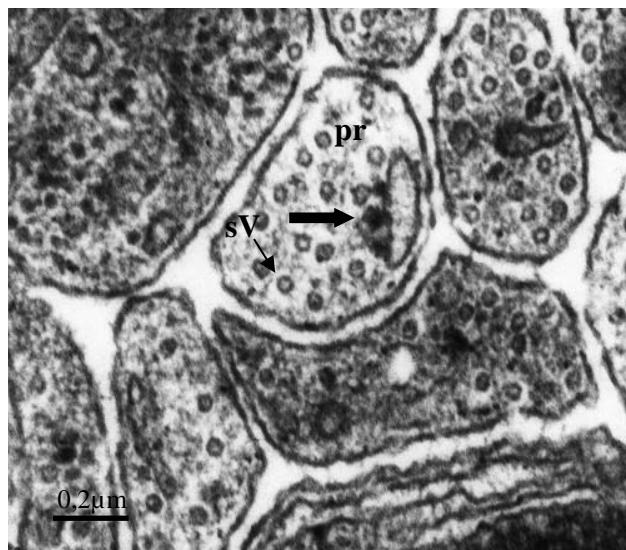
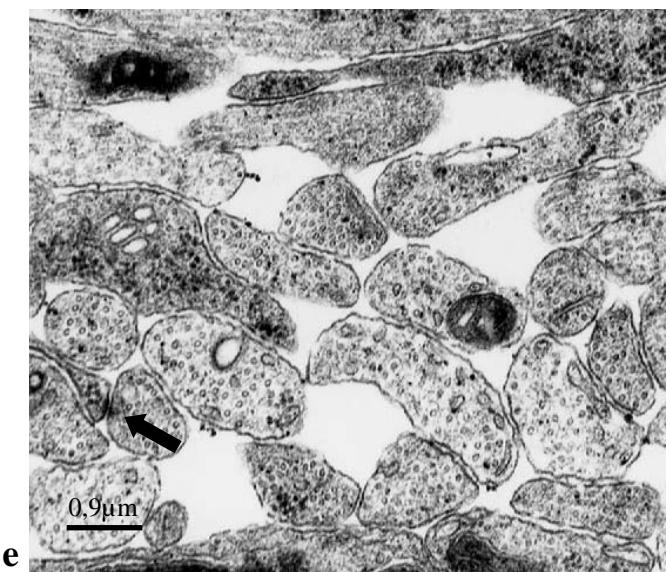
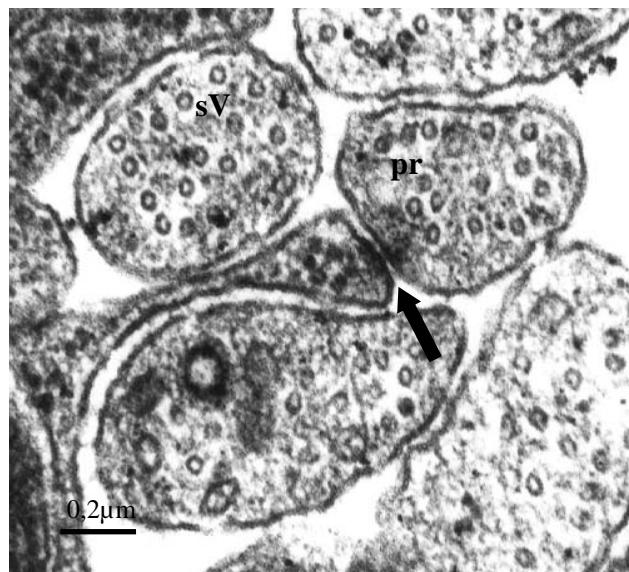
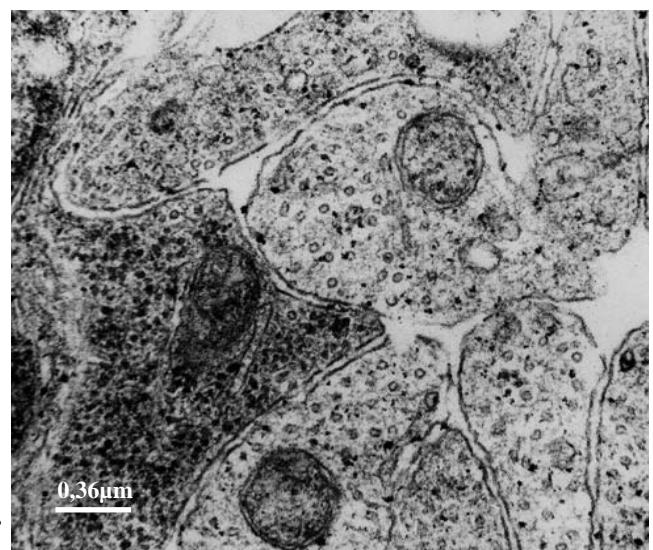
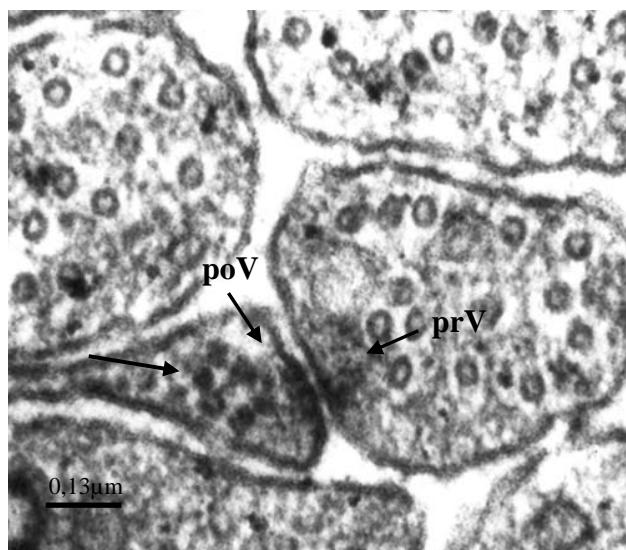
Bei der Betrachtung weiter peripher gelegener Bereiche fallen deutliche Entwicklungsverzögerungen auf, die die centro- periphere Entwicklungsrichtung (Abb. 8f) der OPL bekräftigen. Die Interzellularräume in der sich differenzierenden OPL sind teilweise noch (Abb. 8e) lückig und ohne zelluläre Bestandteile.

Die, die OPL begrenzenden Zellkernschichten lassen sich nun durch die unterschiedliche Färbung, Form und Lage ihrer Zellkerne gut differenzieren. Die Zellkerne der äußeren Nukleoblastenschicht sind oval, elektronendicht und reich an kompaktem heterochromatischem Chromatin. Das Karyoplasma der Horizontalzellen, die die OPL in Richtung innere Nukleoblastenschicht begrenzen, ist ebenfalls heterochrom, aber mit einem höheren Anteil an Euchromatin (elektronenmikroskopisch transluzenter).

Die nach scleread liegenden Außensegmente vergrößern (Zytoplasmavolumen steigt) sich weiter und zeigen ab dem 5., 6. Tag erste Formationen und später auch Augmentationen von Membranscheiben, die sich in der unmittelbaren Nähe der Zilien ausbilden.

Dieses Entwicklungsstadium der Synaptogenese zeigt die Ausbildung primitiver Photorezeptorterminalen mit synaptischen Ribbons bzw. deren möglichen Vorstufen sowie das weitere Ausdifferenzieren der prä- und postsynaptischen Komponenten in der OPL.

Abbildung 8 postnataler Tag P4



Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 8

- a) Der Pfeil markiert drei membranassoziierte Verdichtungen (engl. „presynaptic densities“), die Vorstufen aktiver Zonen von Synapsen darstellen könnten.

pr: präsynaptische Membran; **sV:** synaptische Vesikel;

- b) Gut sichtbar sind hier die prä- und postsynaptischen Membranverdichtungen (Pfeil) sowie der dazwischen liegende synaptische Spalt. Im Zytosol der Präsynapsen (**pr**) sind einige synaptische Vesikel (**sV**).

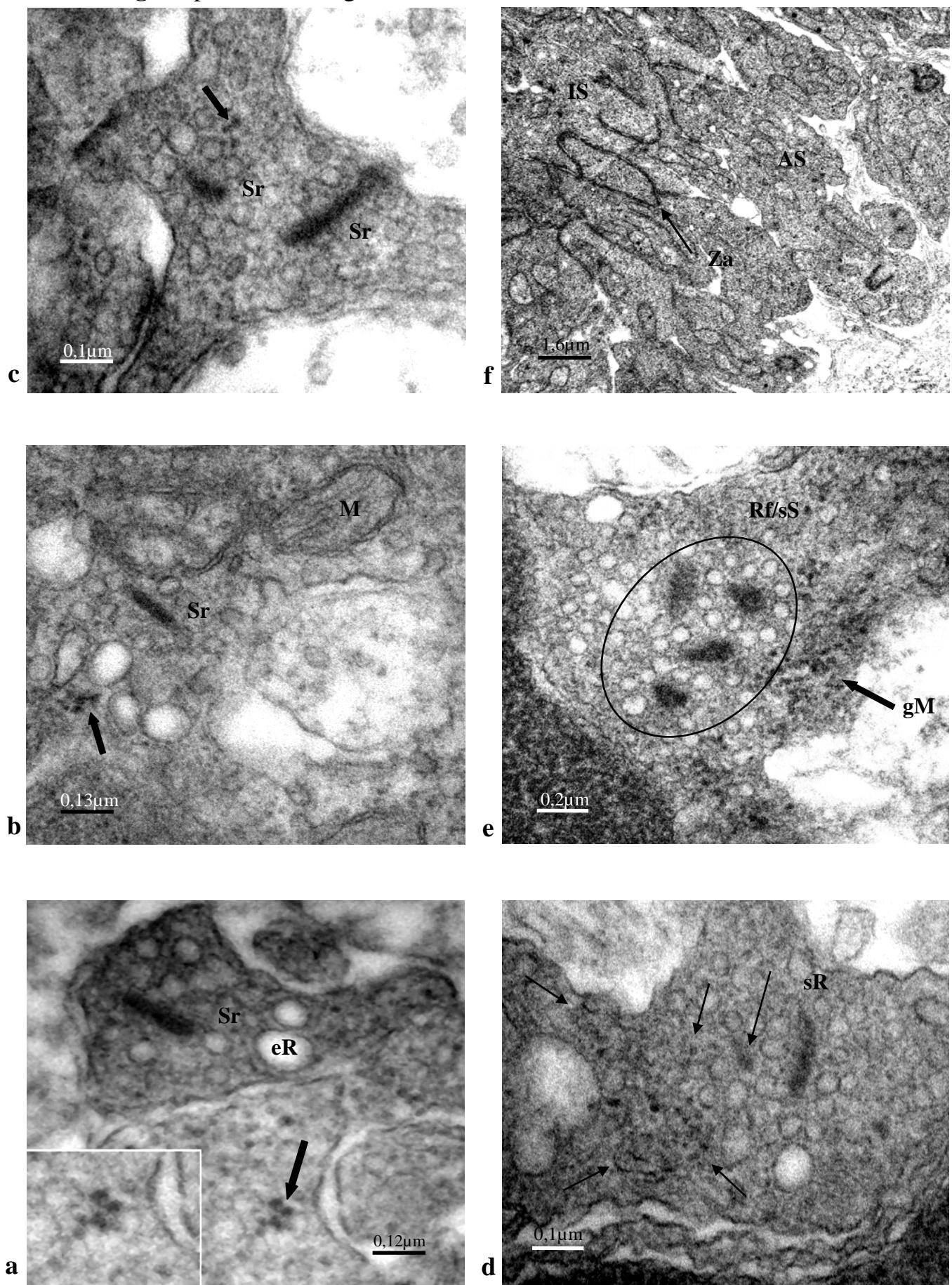
- c) Detailvergrößerung von e: Im unteren Bildteil ist die präsynaptische Verdichtung (**prV**), gegenüberliegend der schmale Zellfortsatz einer Horizontalzelle mit der postsynaptischen Verdichtung (**poV**) zu erkennen. Im Zytoplasma sind granuläre elektronendichte Strukturen zu beobachten (Pfeil).

- d) Die Centriolen (Stern) dienen als „Ankerbasis“ der Außensegmente. Möglicherweise sind Zellmembranumbauvorgänge (Pfeil) erkennbar.

- e) Zahlreiche Dendriten, die mit synaptischen Vesikeln gut gefüllt sind, zeigen zunehmend Membranspezialisierungen (Pfeil) innerhalb der sich entwickelnden OPL.

- f) Die Abbildung zeigt einen prospektiven Ausschnitt der OPL der peripheren Retina, die in ihrer Entwicklung den zentralen Anteilen zeitverzögert folgt.

Abbildung 9 postnataler Tag P5

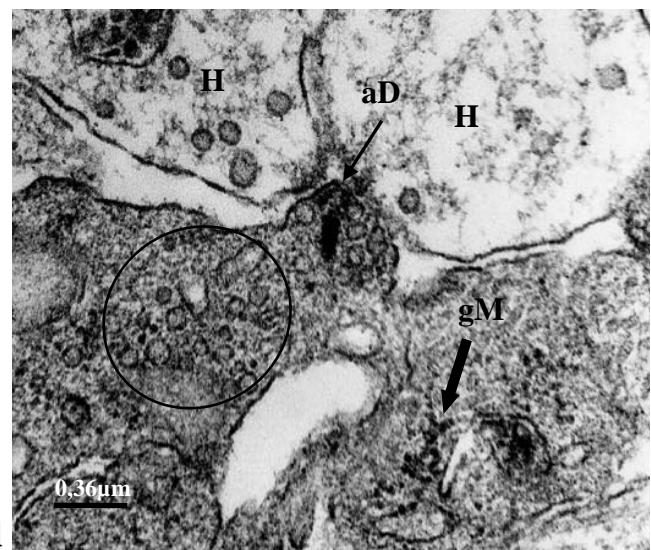
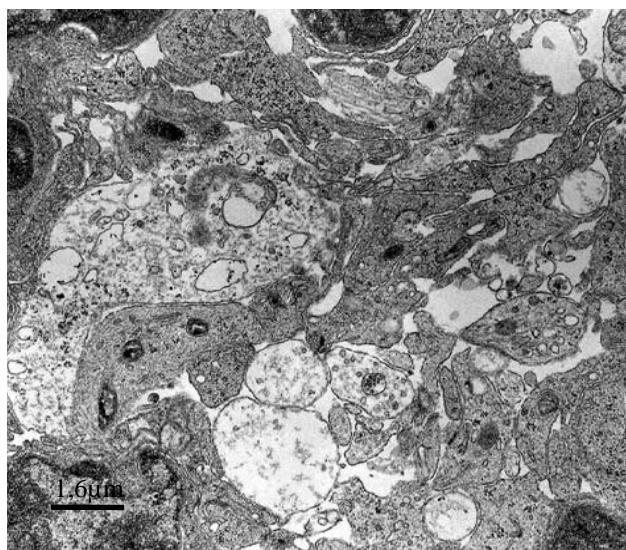
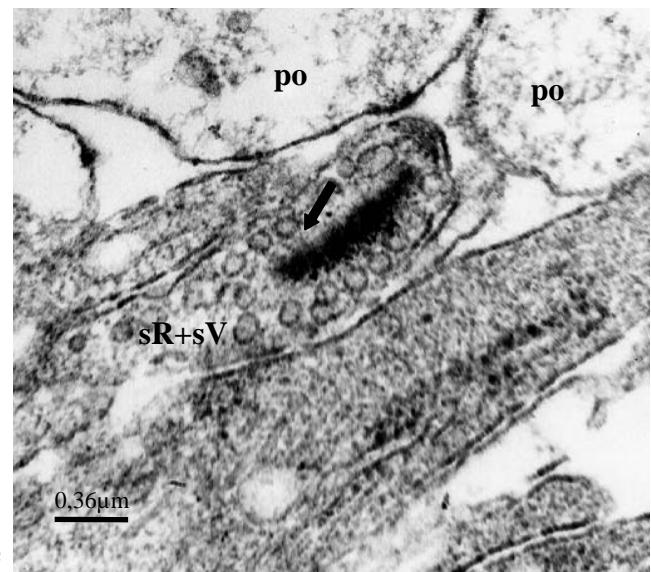
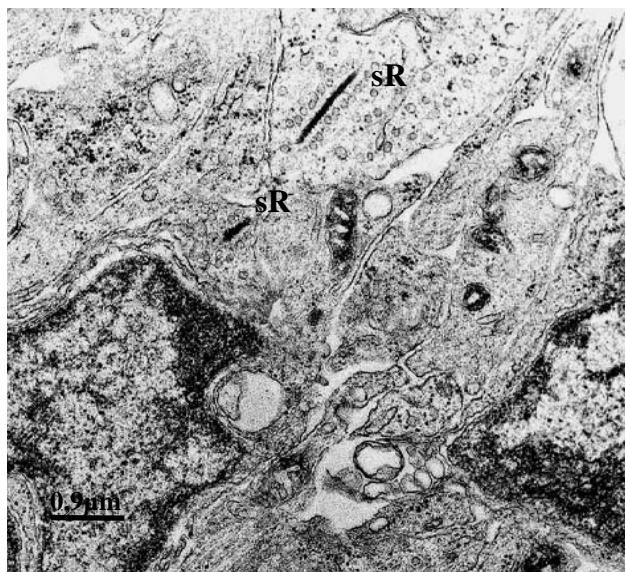
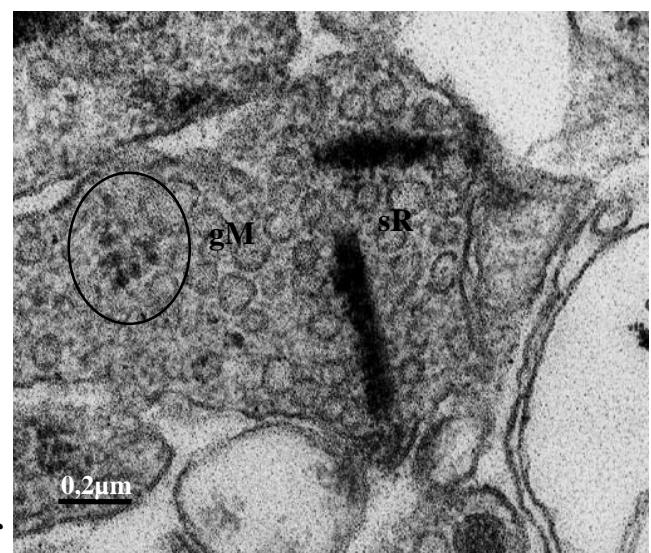
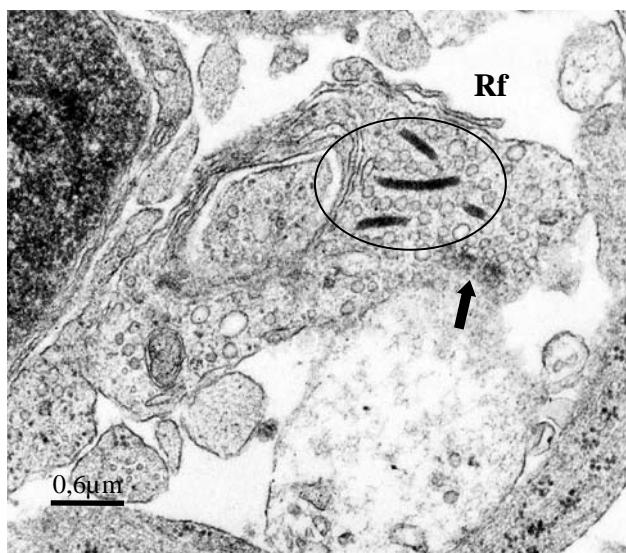


Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 9

- a) Der synaptische Ribbon (**sR**) ist von synaptischen Vesikeln umgeben.
Der Pfeil kennzeichnet wahrscheinlich potentielle Vorstufen (Detailausschnitt) synaptischer Ribbons. **eR:** endoplasmatisches Retikulum bzw. größere vesikuläre Strukturen;
- b) Der Pfeil markiert elektronendichthes granuläres Material im Bereich von vesikulären Strukturen. Man beachte die filamentären Strukturen zwischen den Granula. **sR:** synaptischer Ribbon; **M:** Mitochondrium;
- c) In unmittelbarer Nähe zu dem kürzeren Ribbon (**sR**) befindet sich granuläres Material (Pfeil- mögliche Ribbonvorstufen).
- d) Die Pfeile deuten auf unregelmäßige, sich aggregierende elektronendichte Strukturen. **sR:** vesikelbesetzter synaptischer Ribbon ;
- e) Die Ellipse markiert ein Ribbonfeld bzw. Synaptic Spheres (**Rf/sS**) in einer vesikelgefüllten synaptischen Terminale. Das granuläre Material (**gM**) könnte Ribbonvorstufen (wahrscheinlich aufgrund unregelmäßiger Struktur) bzw. Ribosomen darstellen. **N:** Nucleus;
- f) Die durchgehende äußere Grenzmembran, durch Zonulae adhaerentes (**Za**) gebildet, trennt die Innensegmente (**IS**) von den Außensegmenten (**AS**) der Photorezeptoren.

Abbildung 10 postnataler Tag P6



Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 10

- a) Weites maschenartiges Geflecht von Fortsätzen in der OPL.
- b) Hier erkennt man zwei gegenüberliegende synaptische Ribbons (**sR**), die bereits vollständig von Vesikeln umgeben sind. Beide Ribbons sind nicht an der Plasmamembran verankert und flottieren im Zytoplasma.
- c) Dieser Ausschnitt zeigt ein Ribbonfeld (Ellipse- **Rf**) in der präsynaptischen Terminale einer möglichen Zapfenrezeptorzelle. Er zeigt vier nebeneinander, in ähnlich- räumlicher Ausrichtung liegende Ribbons, in deren Nähe sich zwei diffuse elektronendichte Gebilde (Pfeil) befinden, die möglicherweise Polymerisationszentren synaptischer Ribbons darstellen.
- d) Dyadenkonfiguration aus präsynaptischer Terminale und postsynaptischen Horizontalzellfortsätzen (**H**). Der Ribbon ankert über die arciform Density (**aD**) an der Membran, der mit Zellbestandteilen gut gefüllten Präsynapse. Im Bereich der Invagination sind Zellmembranverdichtungen erkennbar. Die Ellipse kennzeichnet unregelmäßig geformtes granuläres Material in Ribbonnähe.
gM: granuläres elektronendichtetes Material;
- e) Detailfoto der Dyadenbildung: Der präsynaptische Anteil der Synapse (**sR**- Ribbon; **sV**- synaptische Vesikel) schiebt sich zwischen die postsynaptischen Elemente (**po**). Der Pfeil zeigt die Verbindung zwischen Vesikel und Ribbon.
- f) Primitive, stark vesikelgefüllte Zapfenrezeptorterminale mit zwei getrennt voneinander existierenden Ribbons (**sR**). Das granuläre Material ist mit **gM** gekennzeichnet.

4.2.3 Elektronenmikroskopische Auswertung P7-P9

Bei Übersichtsvergrößerungen kann man die OPL nun als eine in sich homogene Schicht erkennen (Abb. 2, 3; 11a; 12a). Detailbetrachtungen des Ausdifferenzierungsgrades der synaptischen Terminalen (Triaden, Tetraden) der OPL dieses Stadiums bestätigen noch Reifeunterschiede im Vergleich zu adulten Rattenretinae auf. Stellen mit diffusem Inhalt und ohne klare Plasmamembranabgrenzung sind möglicherweise Artefakte, die durch mechanische und chemische Gewebetraumatisierungen (Quetschungen, Zerreißungen) während des Einbettungsprozesses entstanden sein könnten. Die Dendriten der Horizontalzellen werden zunehmend von den Photorezeptorterminalen umgeben (Abb. 11d), sodass die postsynaptischen Fortsätze zentral in die Terminalia ragen. Es sind nun nicht mehr nur einfache Appositionen der prä- und postsynaptischen Kontaktstellen sichtbar, sondern die postsynaptischen Elemente (in dieser Phase meist nur Horizontalzellaxone) invaginieren in die Terminalia der Sinneszellen und bilden zahlreiche Dyaden (Abb. 11b, c). Dadurch entsteht das typische invaginale Erscheinungsbild der Photorezeptorribbonsynapse. So kann man horizontal angeschnittene Terminalen sehen, in die jeweils zwei Horizontalzellen invaginieren und an deren synaptischen Kontaktflächen zwei getrennte Dyaden (Abb. 12b; 15c) sichtbar sind. Diese Anordnung von Ribbons bestätigt aufgrund der zueinander identischen Achsenausrichtung die Feststellung, dass die beiden kurzen Ribbons in der dreidimensionalen Rekonstruktion eigentlich Querschnitte eines sich hufeisenförmig an der präsynaptischen Membran angehefteten großen synaptischen Ribbons sind, der zwischen den beiden Horizontalzellen zu liegen kommt.

Ab dem 8., 9. Tag kommt ein neuer in Richtung OPL bzw. Dyaden wachsender dendritischer Zellfortsatz, von den Bipolaren stammend, als weiteres postsynaptisches Element zu dem „synaptischen Komplex“ hinzu. Die Annäherung erfolgt so, dass sich der kleine Bipolarzellfortsatz von „unten“ zwischen die jeweils lateral liegenden Horizontalzellfortsätze in Richtung Rezeptorterminalia (Abb. 11d) schiebt. Der entstehende Komplex zeigt erstmalig die Anfänge der räumlich- engen Beziehung der Rezeptor- Horizontalzell- Bipolarzell- Synapse (afferent).

Die präsynaptischen Terminalen nehmen Ausmaße von bis zu mehreren μm Durchmesser an und weisen einen hohen Füllungsgrad mit synaptischen Vesikeln auf.

Die Anzahl potentieller Zapfenterminalen ist im Vergleich zu den Stäbchenterminalen gering. Sie sind möglicherweise in dieser Entwicklungsphase schon an ihrer stärkeren Größenausdehnung und dem Auffinden mehrerer synaptischer Ribbons pro Terminale (Ribbonfelder) gekennzeichnet. Die Dendriten von Horizontal- und Bipolarzellen erscheinen „optisch leerer“ (Abb. 12e, f) als im adulten Zustand. Sie enthalten etwas Zytoplasma, einige Vesikel bzw. Komponenten des glatten endoplasmatischen Retikulums und selten auch granuläre Strukturen, die Ribosomen gleichen. In den Terminalen der Rezeptorzellen ist ein sprunghafter Anstieg an synaptischen Ribbons im Verlauf von P7 (14 Ribbon/ $220 \mu\text{m}^2$ OPL) über P8 (47/ $220 \mu\text{m}^2$ OPL) zum 9. postnatalen Tag (60/ $220 \mu\text{m}^2$ OPL) erkennbar (Tabelle 5). Dieser starke Anstieg an synaptischen Ribbons markiert wahrscheinlich die Hauptbildungsphase während der postnatalen Entwicklung. Es konnten jedoch keine eindeutig sichtbaren Strukturveränderungen im Bereich der Terminalen bzw. der schon entstandenen Ribbons beobachtet werden, die eine suffiziente Beziehung zur Ribbongenese zulassen. Nur die schon im Entwicklungsstadium P3-P6 erwähnten diffus verteilten granulären und globulären (synaptic Spheres) Strukturen in der synaptischen Terminalen lassen Vermutungen (Polymerisation- siehe Diskussion) über deren Entstehung aufkommen.

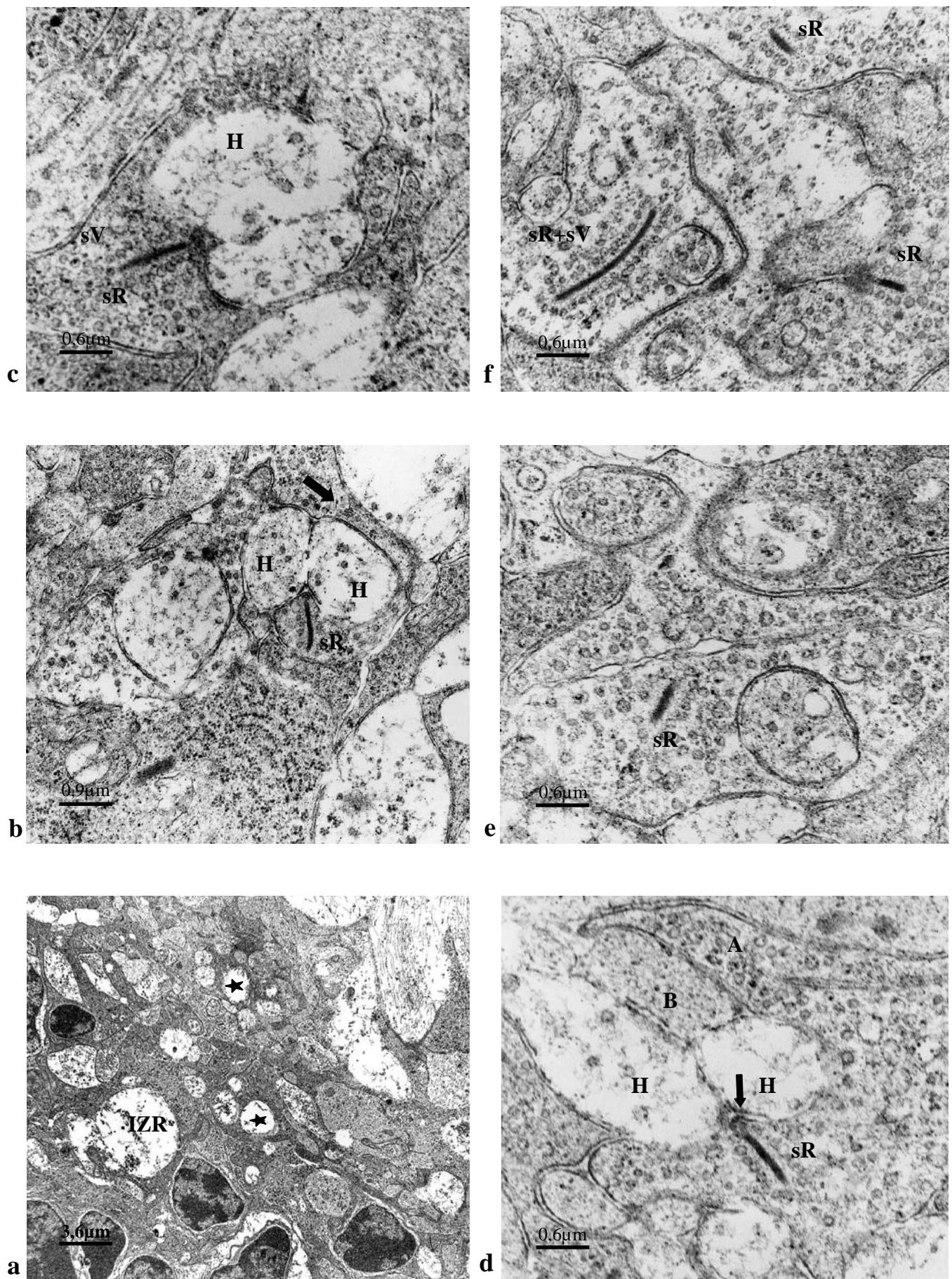
Die Längenausdehnung der Ribbons variiert noch stark (von weniger als 100 nm bis zu mehreren 100 nm), vermehrt wurden jedoch längere Ribbons beobachtet (Abb. 11f). Die Lage der Ribbons in der Terminalen verschiebt sich zunehmend von vormals frei im Plasma schwimmenden hin zu plasmamembranassoziierten Ribbons (P4-P16). Beim Anschnitt entsprechend vertikaler, direkt an der präsynaptischen Membran gelegener synaptischer Ribbons ist der für die Membranheftung verantwortliche bogenförmige Proteinkomplex (arciform Density- Abb. 14d) in einigen Fällen (P7) sichtbar.

Erste unreife Triadenkonfigurationen konnten beobachtet werden und deuten darauf hin, dass die zellulären Elemente einer adulten, typischen afferenten Rezeptor-Horizontalzell- Bipolarzell- Synapse der OPL bereits vorhanden sind.

Die Triade einer Zapfenterminale (Abb. 11d; 12c) erscheint, wenn ein Ribbonende vertikal mit der präsynaptischen Plasmamembran verbunden ist und sich die postsynaptischen Elemente (zwei Horizontalzellfortsätze und ein Bipolarzellfortsatz) um die präsynaptische Terminale (mit synaptischem Ribbon) gruppieren. Es sind ebenfalls sich entwickelnde Tetradenkonfigurationen (Abb. 12f) erkennbar, deren Kennzeichen das zweifache Vorliegen der Bipolarzellfortsätze als postsynaptische Elemente neben den beiden Horizontalzellen ist. Dabei liegen die Bipolarzellfortsätze zwischen den jeweils lateral liegenden Horizontalzellfortsätzen. Die präsynaptische Plasmamembran mit dem anhaftenden Ribbon schiebt sich keilförmig zwischen die Horizontalzellfortsätze, die dadurch in direktem flächigem Membrankontakt (Abstand ca. 10-20 nm) mit der Präsynapse stehen. Während sich die Lagebeziehungen der Horizontalzellfortsätze zur synaptischen Terminale kaum noch ändert, erscheint der kleinere Bipolarzellfortsatz in diesem Stadium durchschnittlich noch weit von der Präsynapse entfernt (bis ca. 0,5 µm). Diese unreifen Triaden/ Tetraden sind wiederum nur in den zentralen Abschnitten der Retina zu finden, wohingegen peripher nur Dyaden oder deren Entwicklungsformen sichtbar werden. Die Anzahl und Dichte der Vesikel in der Terminale nimmt weiter zu. Gelegentlich sind „randgefüllte“ Terminalen zu beobachten. Die OPL wird von den Horizontalzelldendriten (Abb. 14a, b), die u. a. an den längsverlaufenden Mikrotubuli erkennbar sind, durchzogen. Die Zellkörper von vertikal verlaufenden Müller'schen Stützzellen (Abb. 13b) separieren gelegentlich die OPL, da sie die gesamte Retina in vertikaler Richtung durchziehen.

Dieses Entwicklungsstadium ist durch den quantitativ starken Anstieg synaptischer Komponenten (besonders Ribbons) und deren weitere Differenzierung gekennzeichnet. Es finden sich zahlreiche Anzeichen für das invaginierende Wachstum der Fortsätze von Horizontal- und Bipolarzellen. Daraus entstehen die typischen morphologischen Beziehungen einer adulten, afferenten Sinneszellsynapse in der OPL. Die Anzahl und Länge der Synapsenbänder nimmt stark zu und sog. Tri-Tetradenkomplexe sind erkennbar. Gebilde wie synaptic Spheres sind sichtbar und stellen möglicherweise Entwicklungsformen der Ribbons bzw. eigenständige Zellorganellen dar (siehe Diskussion).

Abbildung 11 postnataler Tag P7

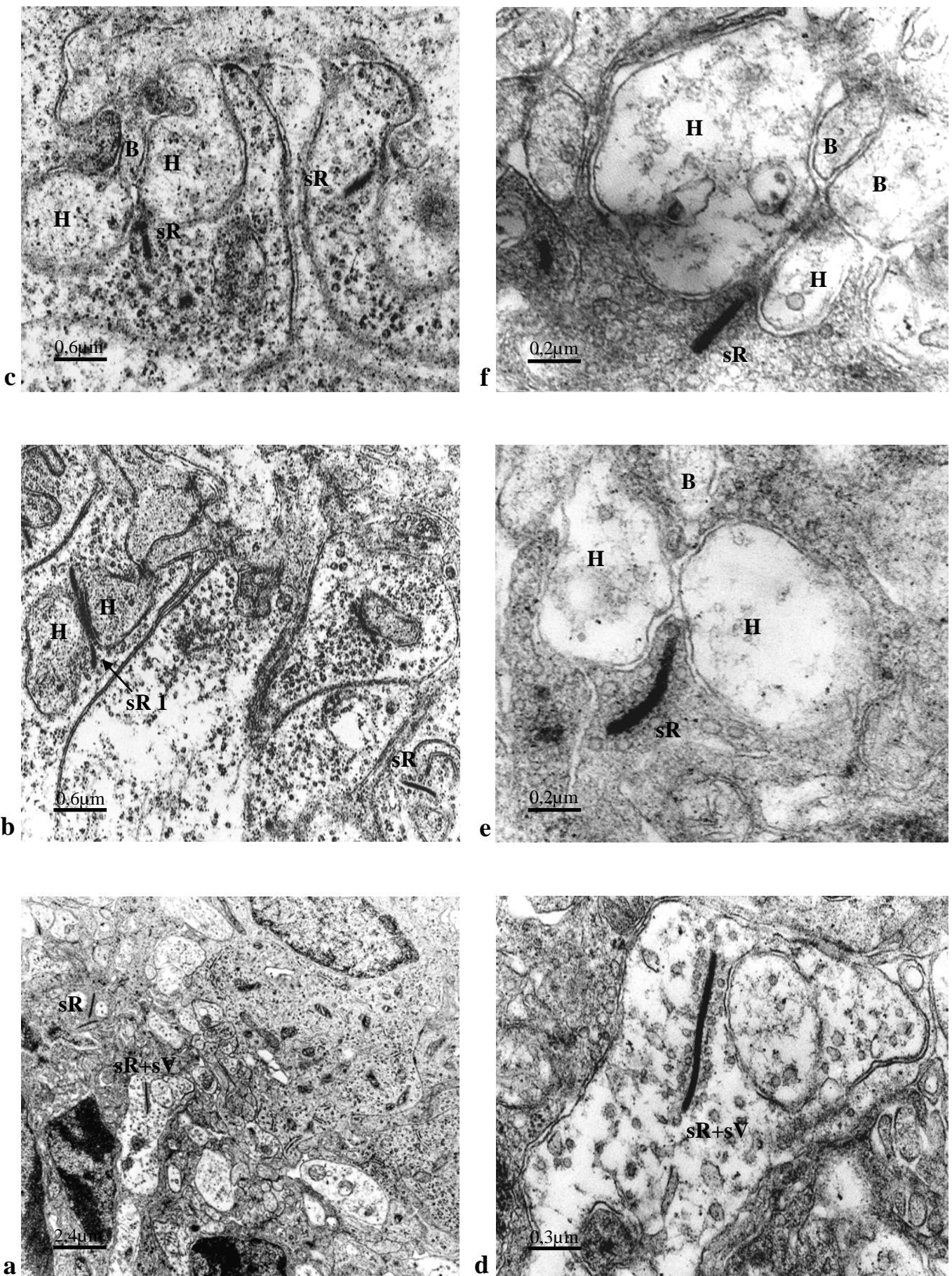


Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 11

- a) Die OPL weist stellenweise noch interzelluläre Lücken (Sterne) auf.
IZR: Interzellularraum;
- b) Dyadenbildung: Die ribbonbesetzte Terminale (**sR**) „umfließt“ (Pfeil) die postsynaptischen Horizontalzellen (**H**). Der Fortsatz der invaginierenden Bipolarzelle ist noch nicht in der Rezeptorterminale sichtbar.
- c) Die Präsynapse (**sR**- synaptischer Ribbon) enthält bereits viele synaptische Vesikel (**sV**), während die postsynaptische Horizontalzelle (**H**) nur wenige Vesikel enthält.
- d) Ein vesikelbeladener, membranverankerter Ribbon (**sr**) in der präsynaptischen Terminale. Zellmembranverdichtungen sind erkennbar (Pfeil). Die Horizontalzellendriten (**H**) sowie der Bipolarzelldendrit (**B**) werden von einem Ausläufer (**A**) der präsynaptischen Terminale umhüllt. Die typische Triadenkonstellation einer Photorezeptorribbonsynapse deutet sich an.
- e) Ein Ribbon (**sR**) liegt frei in der Terminale.
- f) Ein großer vesikelbesetzter (**sV**) Ribbon (**sR**- ca. 1,8 µm) in einer Stäbchenterminale.

Abbildung 12 postnataler Tag P9



Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 12

- a) Übersichtsaufnahme der schon geordnet und in sich kompakt wirkenden OPL.
sR+sV kennzeichnet einen vesikelbeladenen Ribbon. **sR:** synaptischer Ribbon;
- b) Horizontalanschnitt im Bereich der präsynaptischen Membran zwischen den Horizontalzellen (**H**). Die beiden kurzen Ribbonfragmente (**sR**) bilden in der Dreidimensionalen Ebene einen Ribbon, der sich der präsynaptischen Membran (**sR 1**) anpasst.
- c) Der Bipolarzellfortsatz (**B**) schiebt sich zwischen die Horizontalzellen (**H**). Die Abbildung zeigt vermutlich eine sich entwickelnde Stäbchensynapse.
sR: synaptischer Ribbon;
- d) Ein freier, vesikelbesetzter (**sR**) ungebundener Ribbon (**sR**) in der Nähe der präsynaptischen Membran. Es handelt sich um einen langen Ribbon in einer Stäbchenterminale (ca. 900 nm).
- e) Stäbchensynapse: Man erkennt die rechts und links der ribbonbesetzten Terminale (**sR**) liegenden großen, optisch leeren Postsynapsen der Horizontalzellen (**H**). Gegenüberliegend schiebt sich der Bipolarzellfortsatz (**B**) zwischen die Dyadenkonstellation.
- f) Entwicklung der Tetrade einer typischen Stäbchenrezeptorterminale. Gut erkennbar sind hier die vier postsynaptischen Zellfortsätze. Dabei handelt es sich jeweils um zwei von den Horizontalzellen (**H**) bzw. den Bipolaren (**B**) stammende Fortsätze. **sR:** synaptischer Ribbon;

4.2.4 Elektronenmikroskopische Auswertung P10-P16

Die OPL zeigt nun eine homogene Schichtstärke (Abb. 15a; 16a) im zentralen Bereich und ist klar in ihrem Aufbau gegliedert. Die Terminalen liegen vitread von den Somata der Rezeptorzellen und zeigen bei vertikalem Anschnitt eine zylindrische (Abb. 15a) Grundform, die sich nach scleread konisch verjüngt.

Die Entwicklung der Synapse in der OPL zeigt nun das häufige Auftreten von triadischen/ tetradischen Komplexen. Die invaginierenden Bipolarzellfortsätze erreichen nun Abstände zu den präsynaptischen Terminalen von weniger als 100 nm. Die Lage der Horizontalzellfortsätze bleibt unverändert konstant. Die Vesikeldichte in der Rezeptorterminalen von Stäbchenzellen scheint im Bereich der präsynaptischen Membran um die Ribbons noch weiter zuzunehmen. In den größeren Zapfenterminalen ist die Vesikeldichte geringer. Es ist jedoch möglich, dass sich in etwa die gleiche Anzahl synaptischer Vesikel auf ein viel größeres Volumen verteilt.

Die Ribbons sind größtenteils an der präsynaptischen Plasmamembran verankert. Die frei im Zytoplasma schwimmenden Ribbons nehmen weiter ab. Die Gesamtzahl der Ribbons in der Terminalen pegelt sich bei ca. 30-40 Ribbons/ $220 \mu\text{m}^2$ OPL (16., 21. Tag) ein. Damit scheint die Ribbongenese abgeschlossen. Ribbonfelder werden weiterhin gelegentlich beobachtet (Abb. 13c, d).

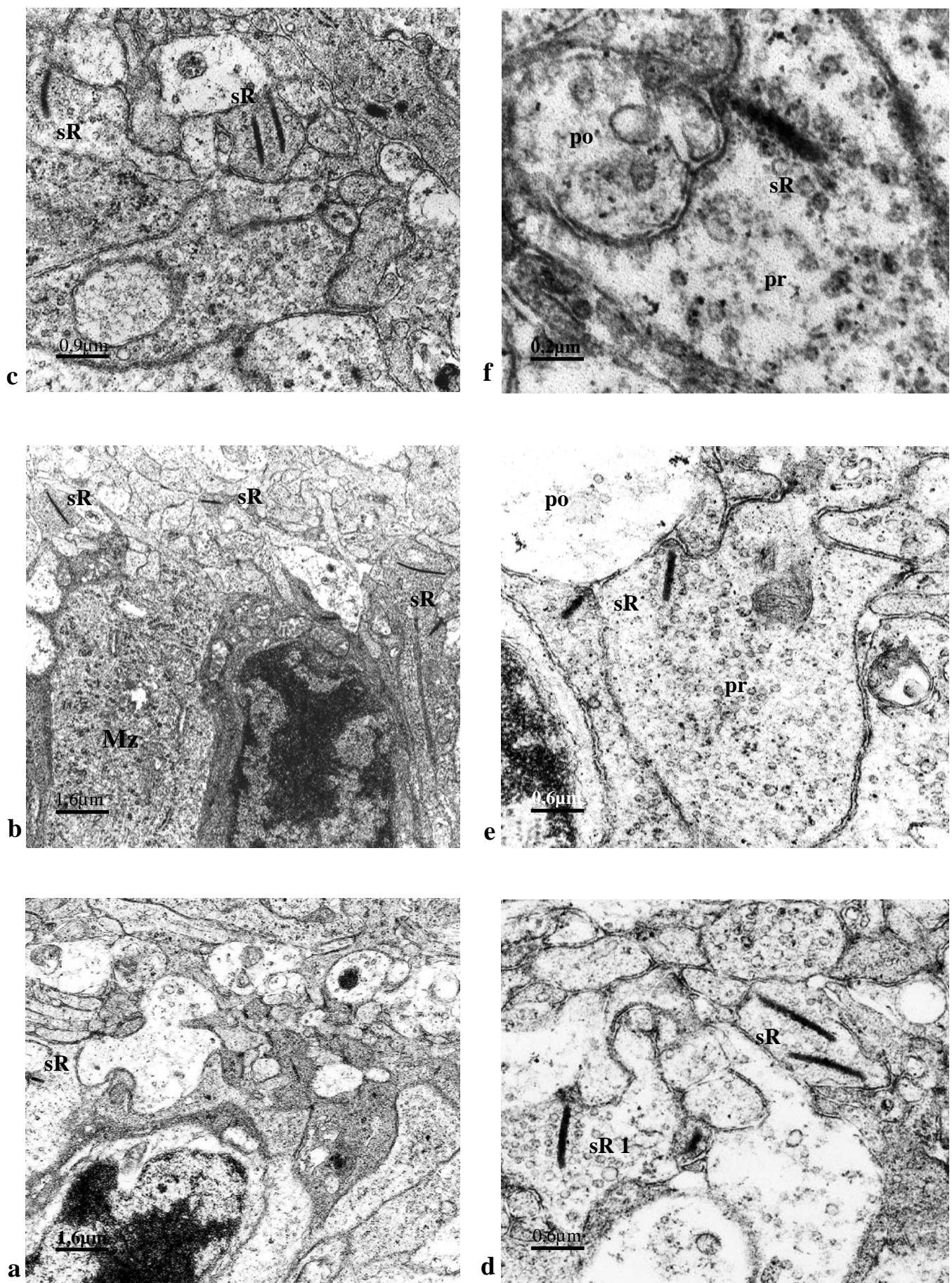
Am 16. postnatalen Tag wurde als seltenes Ereignis ein kurzer synaptischer Ribbon neben zwei synaptic Spheres (Abb. 16c) beobachtet. Die Rezeptorterminalen nehmen bis zum 16. Tag und darüber hinaus noch weiter an Größe zu. Direkte Plasmamembrankontakte von synaptic Spheres konnten zu keinem Entwicklungszeitpunkt beobachtet werden. Die Durchmesser der synaptic Spheres sind nicht so konstant (Abb. 14f, 16c) wie die der synaptischen Ribbons. Selten wurden wesentlich größere synaptic Spheres (Abb. 16c, ca. 100 nm) beobachtet. Diese großen synaptic Spheres stellen allerdings Ausnahmen dar und sind möglicherweise morphologisch- sichtbare Zeichen von gerade ablaufenden Polymerisationsprozessen am synaptischen Ribbon. Die Entwicklung der Ribbons aus den synaptic Spheres bzw. granulärem Material kann elektronenmikroskopisch nicht direkt beobachtet werden.

Die beobachteten Zapfenterminalen besitzen stets mehrere Ribbons die wesentlich kürzer (100-500 nm) sind und eine geringere Vesikeldichte besitzen. So ergeben sich in Zapfenterminalen mehrere „Ankerstellen“ (Abb. 16e), während Stäbchenterminalen gewöhnlich nur eine besitzen.

Ab dem 12., 14. Tag bilden sich um die membranverankerten Ribbons sog. aktive Zonen (Abb. 16f). Während Stäbchenterminalen nur eine größere aktive Zone ausbilden, können in Zapfenterminalen entsprechend der höheren Anzahl von Ribbons auch mehrere kleine aktive Zonen gefunden werden. So kann man in einigen synaptischen Spalten im Bereich von Triaden/ Tetraden diffus- homogenes Material (Abb. 14d, 16f) erkennen. Die postsynaptischen Membranen erscheinen hier verdickt. Von ihnen wird in das Zytosol diffus- schlieriges Material abgegeben, das sich an den Innenseiten der postsynaptischen Membranen (Abb. 16f) darstellt.

Das letzte Entwicklungsstadium der Sinneszellsynapse in der Retina ist hauptsächlich durch Wachstumsvorgänge der Rezeptorterminalen und der Etablierung der triadischen/ tetradischen Synapsenkonfiguration gekennzeichnet. Es findet eine Verminderung der Anzahl von Ribbons pro $220 \mu\text{m}^2$ OPL (Tabelle 5) statt, die vermutlich aus der Vergrößerung der Rezeptorterminalen und der Einstellung der Ribbonanzahl (Katabolismus) unter physiologisch aktiven Konditionen (Augenöffnung 12.-14. Tag) resultiert.

Abbildung 13 postnataler Tag P10

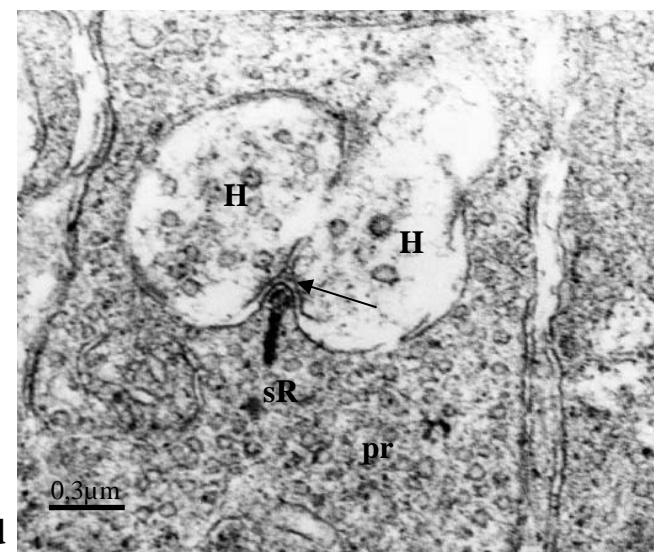
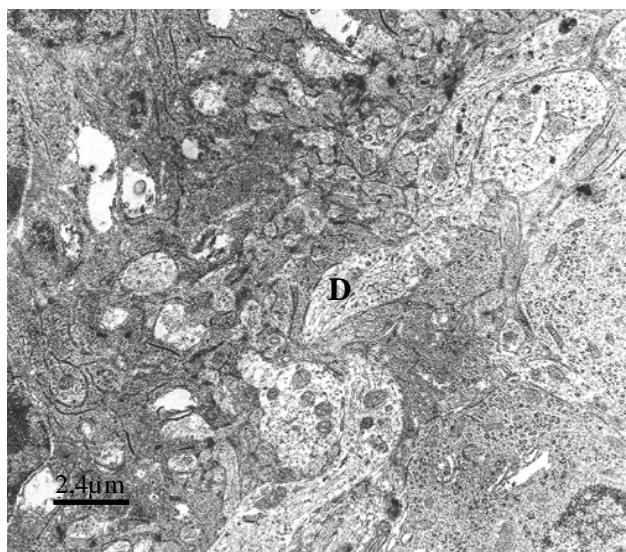
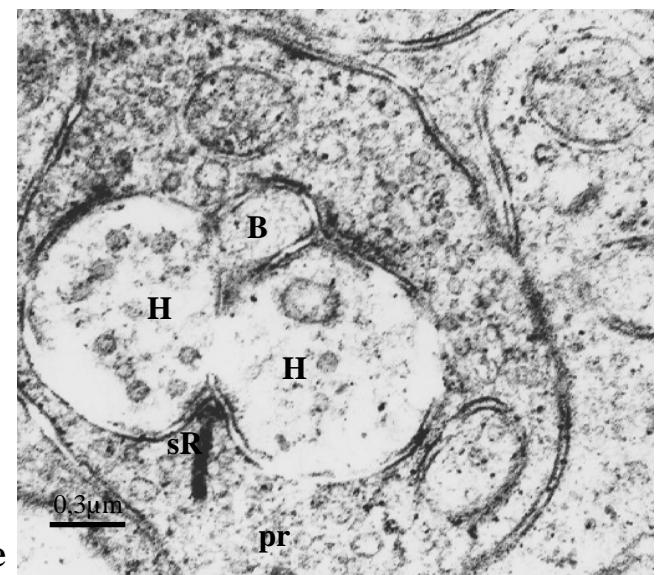
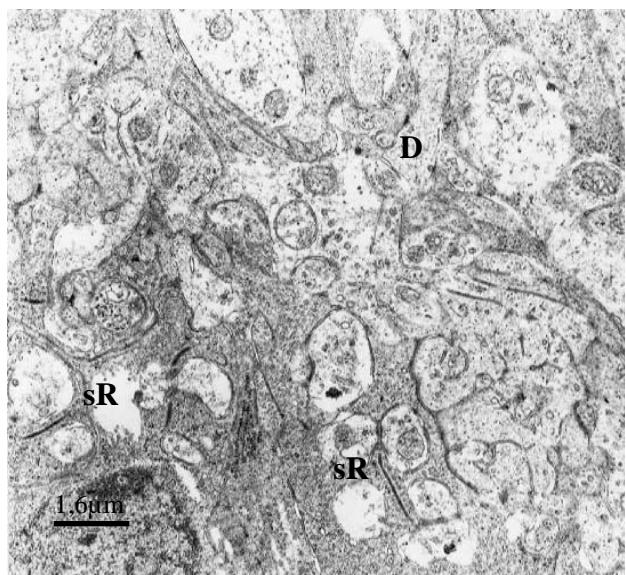
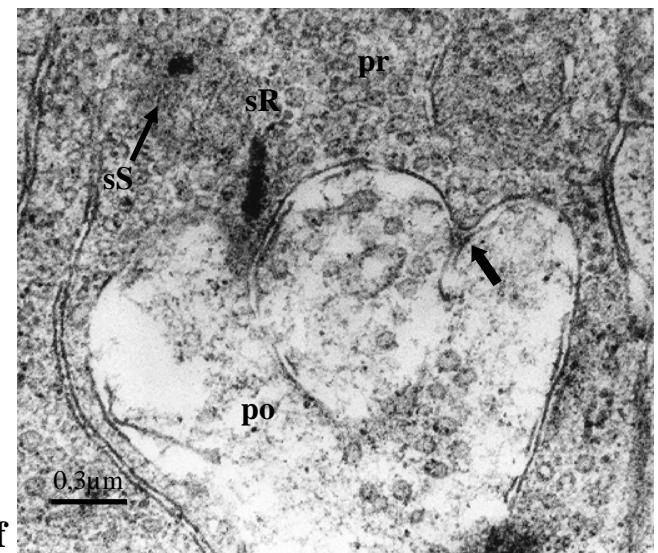
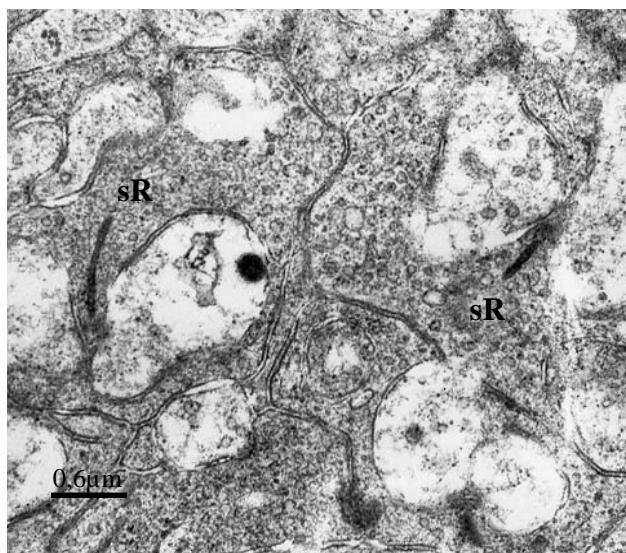


Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 13

- a) Übersichtsaufnahme der OPL mit zahlreichen prä- und postsynaptischen Fortsätzen. **sR:** synaptischer Ribbon;
- b) Man erkennt eine Müllerzelle (**Mz**) im Bereich der OPL. Einige Ribbons (**sR**) sind präsynaptisch zu sehen.
- c) Zwei parallel liegende, annähernd gleich lange (450 nm) synaptische Ribbons (**sR**).
- d) ähnlicher Bildausschnitt wie in c: Zwei Ribbons (**sR**) in einer gemeinsamen Terminale. Der Ribbon (**sR 1**) erscheint membranverankert und ist von Vesikeln umgeben.
- e) Zwei Rezeptorterminalen mit jeweils einem Ribbon (**sR**), die eine gemeinsame Postsynapse kontaktieren. **Pr** kennzeichnet den präsynaptischen und **po** den postsynaptischen Anteil (Horizontalzelldendrit) der Synapsen.
- f) An der Ribbonankerstelle ist sowohl die präsynaptische- als auch die postsynaptische Membran verdickt. **sR:** synaptischer Ribbon; **pr:** präsynaptisch; **po:** postsynaptisch;

Abbildung 14 postnataler Tag P12

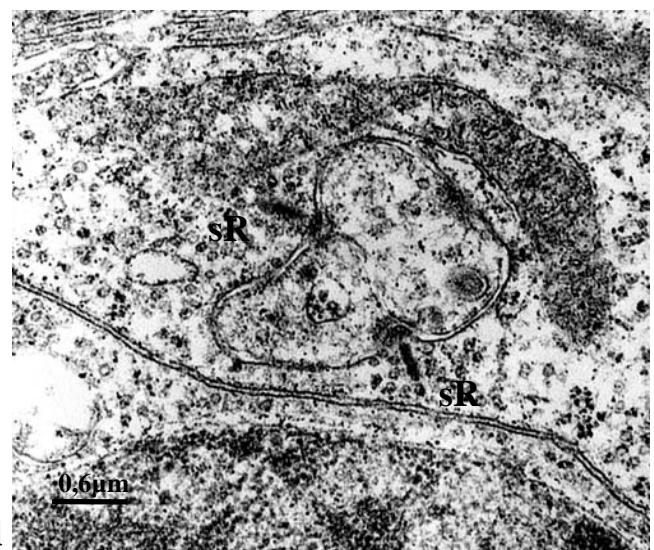
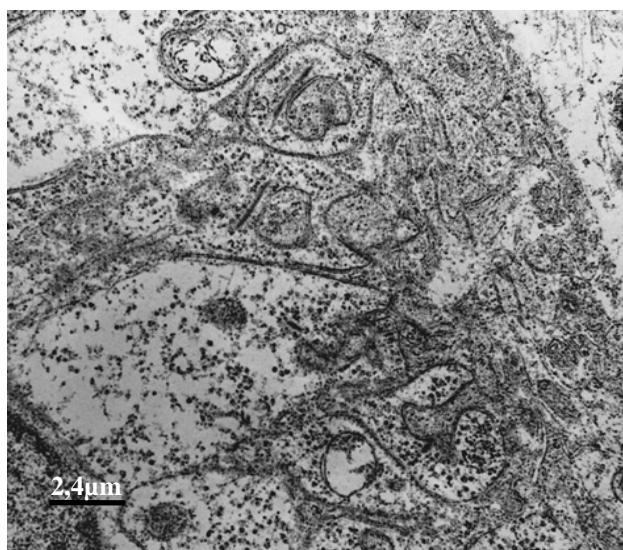
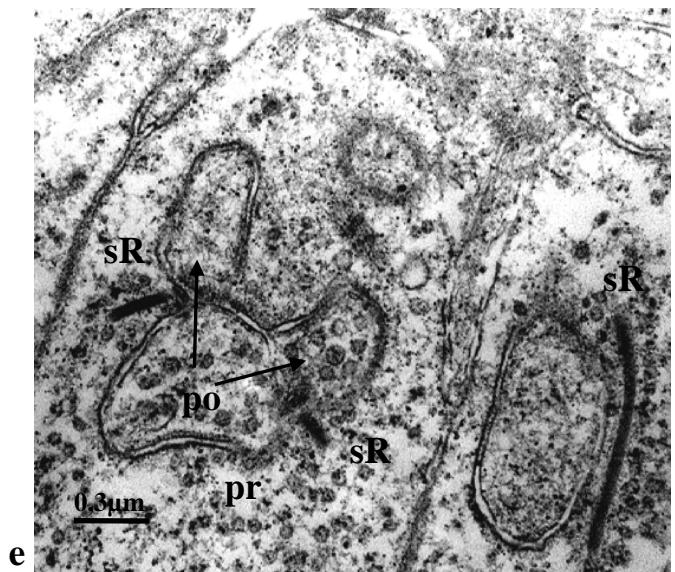
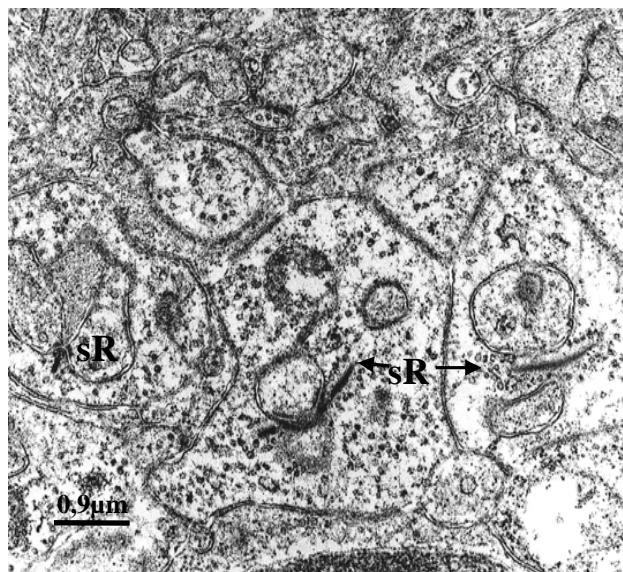
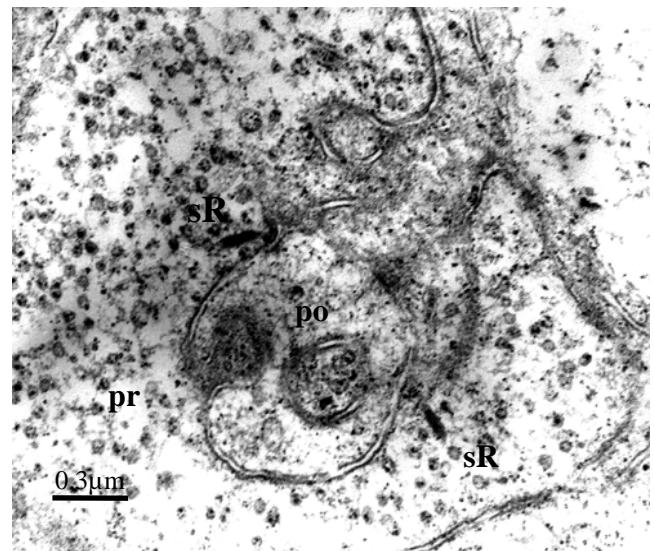
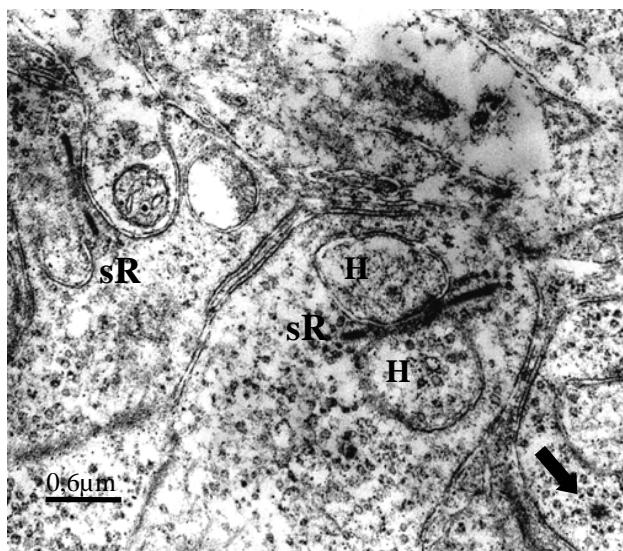


Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 14

- a) OPL mit den vitread liegenden, horizontal verlaufenden Fortsätzen von Horizontalzellen (**D**).
- b) OPL- Ausschnitt mit mehreren synaptischen Terminalen, die synaptische Ribbons (**sR**) enthalten. **D:** Horizontal- und Bipolarzelldendriten;
- c) Mit einer Vielzahl von synaptischen Vesikeln gefüllte präsynaptische Terminale, als Zeichen zunehmender synaptischer Adoleszenz. **sR:** synaptischer Ribbon;
- d) Der senkrecht ausgerichtete Ribbon (**sR**) ist über die arciform Density membranverankert. Im synaptischen Spalt ist elektronendichthes Material (Pfeil) zu finden. **pr:** präsynaptisch; **H:** Horizontalzellfortsätze;
- e) Vertikalschnitt einer Triade. Die postsynaptischen Elemente (**H, B**) sind vollständig von der präsynaptischen Terminalen (**pr**) umschlossen.
sR: synaptischer Ribbon;
- f) Man beachte den synaptic Sphere neben einem Ribbon (Pfeil). Der dicke Pfeil zeigt auf die Invagination der Präsynapse (**pr**) ohne Ribbonbeteiligung und deren Membranverdichtungen (Pfeil). **po:** postsynaptisch; **sR:** synaptischer Ribbon;

Abbildung 15 postnataler Tag P14



Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 15

a) Große präsynaptische Terminalen mit zahlreichen synaptischen Vesikeln.

b) Mehrere Ribbonsynapsen in der OPL in verschiedenen Anschnittslagen.

sR: synaptische Ribbons;

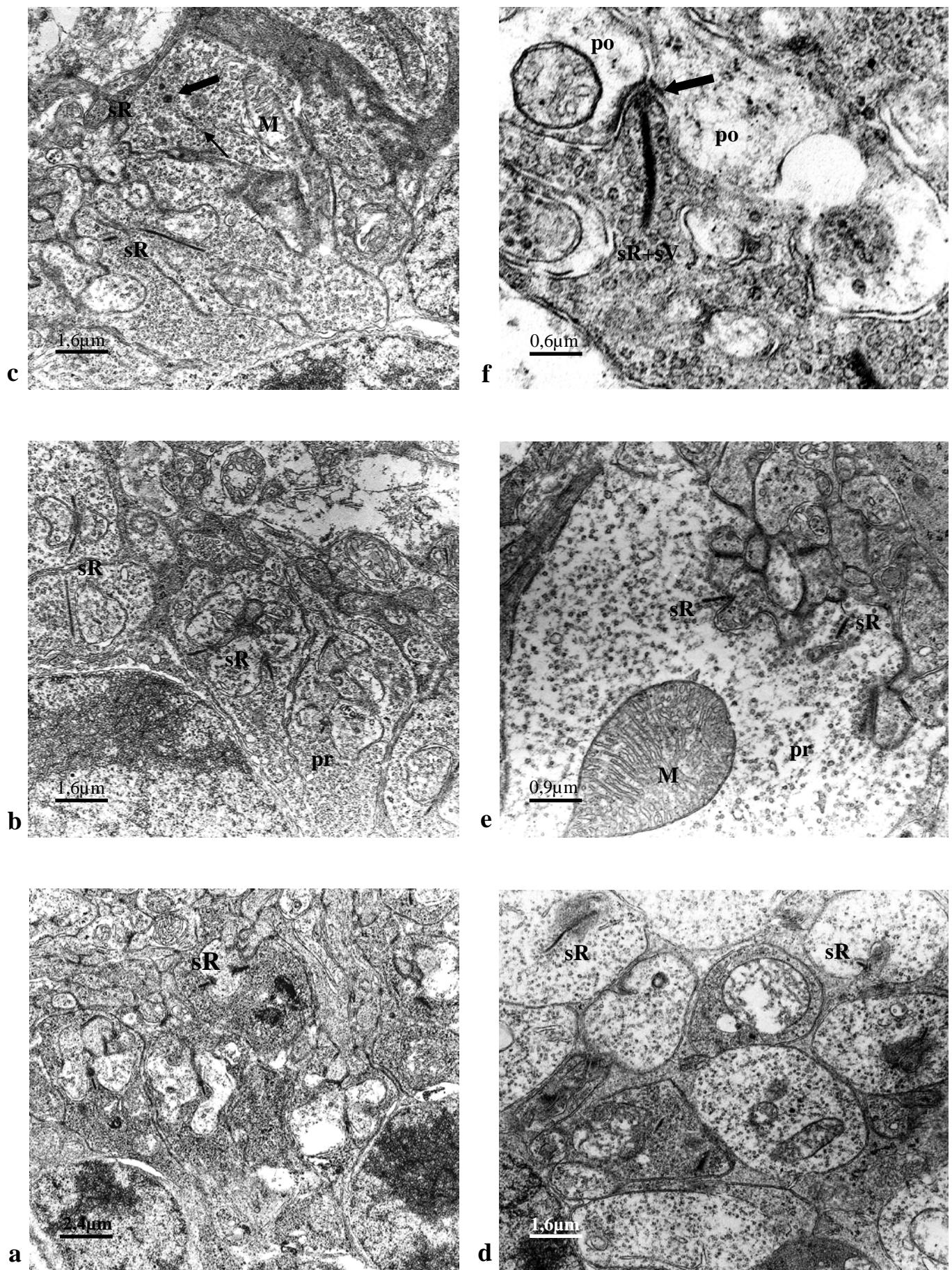
c) Die gegenüberliegenden Ribbonfragmente (**sR**) deuten auf einen einzigen gebogenen Ribbon hin, der sich um die invaginierten Horizontalzellfortsätze (**H**) der präsynaptischen Membran krümmt und doppelt angeschnitten ist. In der unteren linken Bildecke ist ein vesikelbeladener synaptic Sphere (Pfeil) sichtbar.

d) Trotz unterschiedlicher Achsenausrichtungen der beiden Ribbonfragmente handelt es sich wahrscheinlich um einen gekrümmten, membranverankerten Ribbon (**sR**).

e) Die postsynaptischen Elemente (**po**) enthalten einige Vesikel. **pr:** präsynaptisch; **sR:** synaptische Ribbons;

f) Eine Zapfenterminale und die invaginierten postsynaptischen (**po**) Zellfortsätze. **pr:** präsynaptisch; **sR:** synaptische Ribbons;

Abbildung 16 postnataler Tag P16

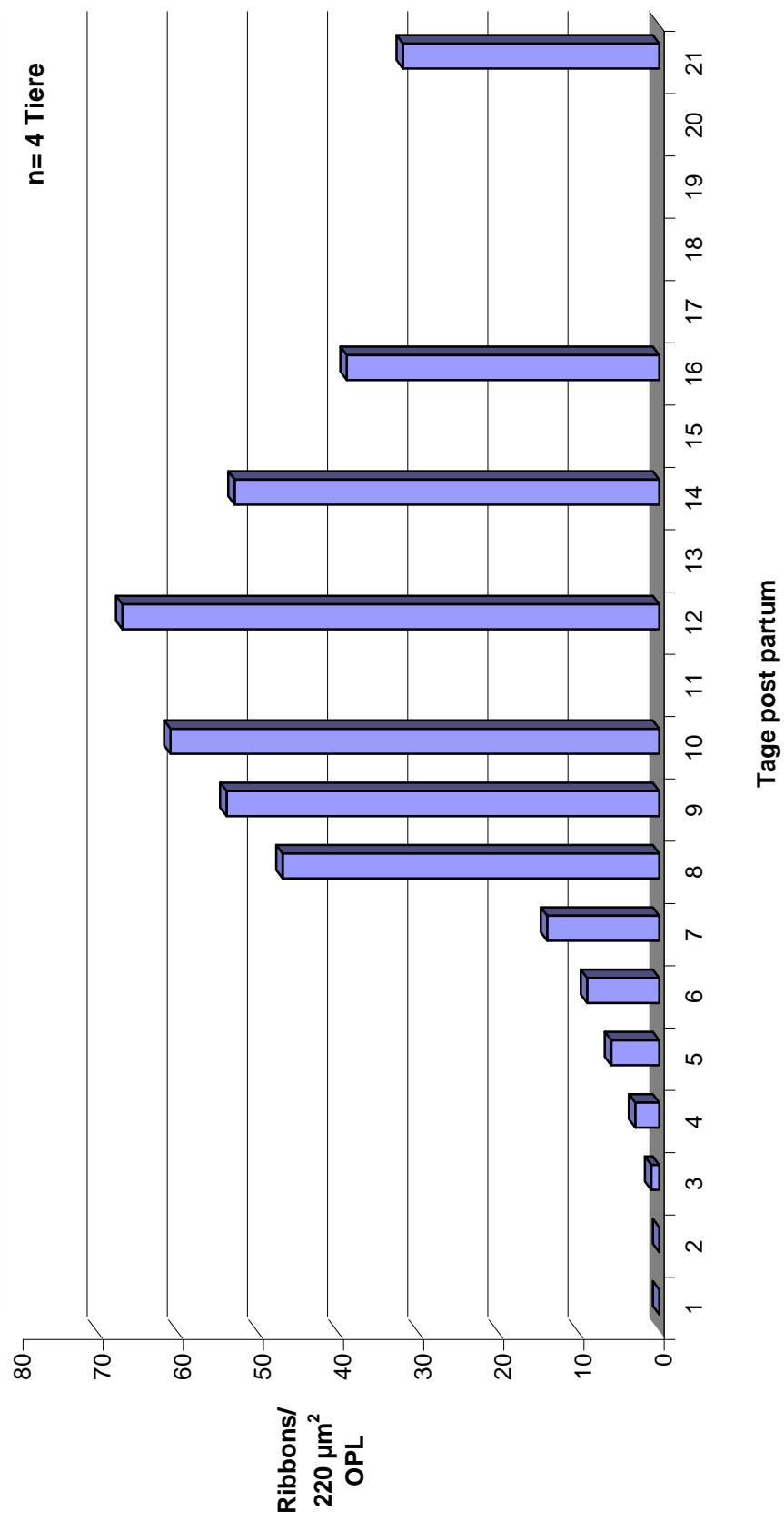


Abbildungslegende siehe nächste Seite

Abbildungslegende zu Abbildung 16

- a) Kompakte OPL mit zahlreichen Synapsen und synaptischen Ribbons (**sR**).
- b) Die präsynaptischen Terminalen (**pr**) der dargestellten Stäbchenphotorezeptoren weisen eine hohe Vesikeldichte auf. **sR**: synaptische Ribbons;
- c) Zwei synaptic Spheres (Pfeil) mit unterschiedlichen Durchmessern in einer präsynaptischen Terminale. **M**: Mitochondrium **sR**: synaptische Ribbons;
- d) Viele, dicht nebeneinander angeordnete synaptische Terminalen von Stäbchenphotorezeptorzellen. **sR**: synaptische Ribbons;
- e) Große, mäßig vesikelgefüllte Zapfenterminale (**pr**), deren kurze Ribbons (**sR**, ca. 400 nm) in triadische Konstellationen eingebunden sind. **M**: Mitochondrium;
- f) Die aktive Zone (Pfeil) einer Synapse wird durch den transmittergefüllten synaptischen Spalt sowie die elektronendichten zytoplasmatischen Membranverdichtungen (postsynaptisch- **po**) gekennzeichnet. **sR**: synaptischer Ribbon; **sV**: synaptische Vesikel;

Anzahl synaptischer Ribbons pro $220 \mu\text{m}^2$ OPL während der postnatalen Entwicklung (Tabelle 5)



5. Diskussion

Die Terminalen von Photorezeptorzellen der Retina enthalten Organellen, die in Ultradünnsschnitten als elektronendichte stäbchen- plattenförmige Strukturen, sog. synaptische Ribbons, erscheinen (Sjöstrand, 1958). Die licht- und elektronenmikroskopischen Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit untersuchen die zeitliche Einordnung der synaptischen Entwicklung von Ribbonsynapsen und Ribbons in der OPL von Spraque- Dawley Ratten über die Zeitspanne der ersten 21 Lebenstage nach der Geburt.

Die Entwicklung der OPL beginnt im Bereich der Fossa centralis und dehnt sich mit zunehmender Verzögerung auf die in Richtung Ora serrata liegenden Retinaabschnitte aus. Schon bei der lichtmikroskopischen Untersuchung von Semidünnsschnitten im Abgangsbereich des N. opticus zeigen sich erste Differenzierungsvorgänge der OPL am 3. Tag primär im zentralen Bereich, wohingegen peripher noch eine undifferenzierte kompakte Nukleoblastenschicht vorliegt. Der Gradient der centroperipheren Reifungsverzögerung, bezogen auf die Synaptogenese, beträgt in der Vertebratenretina bei Katzen ca. 6-8 Tage (Rapaport, 1982, 1989; Maslim und Stone, 1986). Das centro- periphere Reifungsmuster der OPL erscheint aus physiologischer Sicht sinnvoll, da der zentrale Retinabereich -als Ort des schärfsten Sehens- zum Zeitpunkt der Augenöffnung von Ratten (ca. 14. Tag) bereits erste visuelle Eindrücke erhält und diese verarbeitet.

Die Netzhautzellen bilden die Synapsen in charakteristischer Reihenfolge. Zuerst bilden die Amakrinzellen untereinander Synapsen in lateraler Ausrichtung. Dann entwickeln sich die Synapsen der Dyadenkomplexe von Photorezeptorzellen und Horizontalzellen in der OPL (Maslim und Stone, 1986). Zum Abschluss erreichen die Dendriten der Bipolarzellen die Synapsen in beiden plexiformen Schichten und es entstehen an den Rezeptorterminalen Triaden bzw. Tetraden (Maslim und Stone, 1986; Rao- Mirotznik et al., 1995). Dabei erscheinen die Zapfensynapsen vor den Stäbchensynapsen (Smelser et al., 1974).

Ähnlich erfolgt die zentrifugale Reifungsmorphologie der zellkernreichen Schichten von innen nach außen, mit der Ganglienzellschicht beginnend (Walls, 1963). Damit haben die plexiformen und kernreichen Schichten der Retina in vertikaler Orientierung die gleiche Entwicklungsrichtung.

Die Differenzierung retinaler Zellen in der Netzhaut von Ratten folgt dem typischen Reifungsmuster von Wirbeltieren. Dieses ist gekennzeichnet durch die vitreosclerale Entwicklungsrichtung, also von innen nach außen, bezogen auf den Bulbus oculi (Grün, 1980). Die Entwicklung der synaptischen Verschaltung beginnt zunächst auf horizontaler Ebene (Horizontalzellen), bevor durch die Bipolarzellfortsätze der vertikale Signalflussweg vernetzt wird (Maslim und Stone, 1986).

Die spezielle Entwicklung der OPL beginnt mit der Auflockerung der Interzellularräume innerhalb der Nukleoblastenschicht um den 1., 2. postnatalen Tag. Diese Aufweitungen finden sich am Übergang des scleral gelegenen Drittels innerhalb der Nukleoblastenschicht. Ursache der vergrößerten interzellulären Räume könnte der bekannte apoptotische Zelltod von retinalen Zellen sein (Hahn et al., 2003). Übereinstimmend mit diesem Befund wies Cragg (1975) nach, dass der interzelluläre Raum in der sich entwickelnden OPL 25% beträgt, wohingegen in weiter ausgereiften OPL Bereichen der interzelluläre Raum nur ungefähr 8% des OPL Gesamtvolumens einnimmt. Diese Umbauprozesse in der undifferenzierten Nukleoblastenschicht finden statt, um eine räumliche Grundlage für die nachfolgende synaptische Entwicklung der OPL zu schaffen. In dieses weitmaschige Netz der sich differenzierenden äußeren Synapsenschicht beginnen die Fortsätze der Rezeptorzellen, und später die der Horizontal- bzw. Bipolarzellen zu wachsen.

Die primitiven präsynaptischen Terminalen der Rezeptorzellen sind von Beginn ihres Auftretens an mit einigen synaptischen Vesikeln, die durch Uniformität gekennzeichnet sind, gefüllt. Neben den synaptischen Vesikeln beobachtet man in frühen Stadien auch vermehrt größere, unregelmäßig geformte Vesikeln in den Terminalen (z.B. von Endosomen). Erste kurze kompakte Ribbons wurden am 3., 4. Tag gefunden, die bereits vollständig von synaptischen Vesikeln umgeben waren und noch frei im Zytoplasma flottierten.

Ab dem 4. Tag beginnen sich primitive Membrankontakte zwischen den Rezeptorterminalen und den Horizontalzellfortsätzen auszubilden. Die präsynaptischen Terminalen und Horizontalzellfortsätze besaßen bereits erste plasmamembranassoziierte Verdichtungen. Ab dem 4., 5. Tag entsteht eine dünne, aber homogene OPL.

Auch in Mäuseretinae beobachteten Blanks et al. (1974) die OPL ab dem 4. postnatalen Tag. In der Retina von Katzenembryos ist die OPL bereits 50 Tage nach der Befruchtung im Bereich der Fovea centralis vorhanden (Greiner et al., 1980). Die OPL separiert nun die vormals kompakte Nukleoblastenschicht in eine äußere und innere Schicht von Neuroblastenzellen. Am Übergang der OPL zur inneren Nukleoblastenschicht erscheinen ab dem 4. Tag die großen, hell gefleckten Perikaryen der Horizontalzellen, die im weiteren Entwicklungsverlauf noch an Größe zunehmen. Die Dendriten der Horizontalzellen verzweigen sich in horizontaler Ausrichtung innerhalb der OPL und bilden schon bei P4, P5 erste einfache Membrankontakte mit den Photorezeptorterminalen.

Die OPL im Stadium P6 zeigt neben horizontal verlaufenden Dendriten, Rezeptorterminalen mit gelegentlich vorhandenen Ribbons sowie erste Dyadenkonfigurationen der afferenten Sinneszellsynapse. Daneben finden sich auch verstärkt optisch leer erscheinende weite Interzellularräume innerhalb der OPL. Die vertikale Ausdehnung der OPL zwischen den beiden kernreichen Schichten nimmt weiter zu. So betrug die durchschnittliche Breite der OPL am 7. postnatalen Tag ca. 10 µm und am 14. postnatalen Tag ca. 16 µm. Caley et al. (1972) berichtete, dass die äußere Synapsenschicht in der Mäuseretina am 7. Tag 5 µm, am 15. Tag 9 µm und im adulten Stadium ungefähr 11 µm im Durchmesser maß. Die Verbreiterung der OPL erfolgt hauptsächlich durch die Volumenzunahme der prä- und postsynaptischen Dendriten, die um den 21. postnatalen Tag abgeschlossen scheint.

Im Mittelpunkt jeder Synapsenkonfiguration steht der invagierte Ribbon, um den sich die verschiedenen postsynaptischen Elemente von Horizontal- und Bipolarzelle in bekannter Formation in der OPL gruppieren.

5.1 Entwicklung der Photorezeptor- Ribbonsynapsen

Nach der Erweiterung der Interzellularräume in der sich entwickelnden OPL, die wahrscheinlich durch Apoptose retinaler Neurone geschaffen wurde (Hahn et al., 2003), beginnen die axonalen fingerförmigen Fortsätze der Rezeptorzellen in diese Räume zu expandieren.

Der programmierte Zelltod (Apoptose) als regulierendes Element von Umbauprozessen stellt ein weit verbreitetes Entwicklungsphänomen im Nervensystem dar (Purves et al., 1985; Williams und Herrup, 1988). Derartige Vorgänge sind in den beteiligten Neuronen intrazellulär ab dem Stadium P2, P3 wahrscheinlich in Form von Zellmembranaufreibungen und Anhäufungen unregelmäßig großer Vesikel zu erkennen. Die einwachsenden primitiven Terminalen enthalten bereits sporadisch verteilte, einheitlich große synaptische Vesikel. Die Membranfortsätze enthalten neben synaptischen Vesikeln noch andere Vesikel (mit größeren und kleineren Durchmessern), häufig Mitochondrien, glattes endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen, Teile des Golgi Apparates sowie transluzentes Zytoplasma.

Während sich die primitiven Rezeptorterminalen in der OPL positionieren, lagern sich von Seiten der inneren Nukleoblastenschicht die Membranausläufer der primitiven Horizontalzellen von lateral an und bilden Appositionskontakte. Damit ist die frühe, räumlich enge Nachbarschaft von prä- und postsynaptischen Elementen vorhanden. Die meisten dieser Appositionen sind nicht mit dem gleichzeitigen Vorliegen synaptischer Ribbons assoziiert.

Zunächst erfolgt die Apposition der Horizontalzellfortsätze an die primitiven Rezeptorterminalen. Dann folgt die Invagination der postsynaptischen Horizontalzellfortsätze. Durch diesen Vorgang erscheint beim Anschnitt der Terminalen im Bereich des Ribbon das Bild der Dyadenkonfiguration. Die ein bzw. zwei hinzukommenden, von den Bipolaren stammenden Fortsätze komplettieren schließlich die Photorezeptorsynapse (Maslim und Stone, 1986). Die Ribbonsynapsen der OPL erscheinen eher als die der inneren plexiformen Schicht (Olney, 1968; Weidmann und Kuwabara, 1968; Cragg, 1975).

Die späte Beteiligung der Bipolaren an der Synaptogenese in der inneren plexiformen Schicht und der OPL scheint ein allgemeines Merkmal der Säugetier-Netzhautentwicklung zu sein und ist auch bei Mäusen (Olney, 1968; Blanks und Adolfino, 1974), Hasen (McArdle, 1977) und Katzen (Morrison, 1982) nachgewiesen worden. Die Rezeptorterminalen von Stäbchen und Zapfen reifen chronologisch leicht versetzt in gleicher Weise heran. Dabei differenzieren primär die Zapfenterminalen, die meist durch einige im Zytoplasma flottierende Ribbons und ihre zunehmende Größendifferenz zu den Stäbchenterminalen unterschieden werden können (Smelser et al., 1974). Unseren Beobachtungen zufolge beginnt die Differenzierung von Stäbchen- und Zapfenterminalen zu annähernd identischen Zeitpunkten.

Freie, im Zytoplasma schwimmende Ribbons sind ein allgemeines Entwicklungsmerkmal in Zellen von sensorischen Organen (Whitehead und Morest, 1985). Erste Zapfenterminalen mit Ribbonfeldern fanden wir am 5., 6. Tag im Stadium der Apposition mit den Horizontalzellendendriten. Stäbchenterminalen mit einem synaptischen Ribbon wurden ebenfalls zeitgleich beobachtet.

Am synaptischen Terminal von Zapfenrezeptoren gibt es drei Arten synaptischer Spezialisierung. Es sind zum einen „gap junctions“ als elektrische Synapsen zu benachbarten Stäbchen- und Zapfenterminalen (Cohen, 1965; Baylor et al., 1971; Raviola und Gilula, 1973). Zum anderen sog. Basalkontakte (flat) mit putative OFF-Bipolarzellen, die an der Zapfenterminalbasis zu finden sind (Missotten, 1965; Dowling und Boycott, 1966; Kolb, 1970). Und schließlich die invaginierenden Kontakte, die üblicherweise aus einer zentralen präsynaptischen Terminale und zwei bis vier postsynaptischen Axonen, die sich in bestimmter Anordnung gruppieren, bestehen (Missotten, 1965; Rao- Mirotznik, 1995).

Der Schaffung von einfachen, kleinflächigen Membrankontakten im Sinne von Appositionen zwischen Rezeptorterminalen und Horizontalzelle folgt nun deren Invagination. Wahrscheinlich wird die synaptische Kontaktfläche durch fortgesetzte Vergrößerung der präsynaptischen Terminale ins Innere verlagert. Die Rezeptorterminalen umwächst die Horizontalzellaxone durch „seitlich gerichtetes Wachstum“, d.h., die präsynaptischen Rezeptorzellendendriten umwachsen sukzessive die postsynaptischen Elemente.

Die Membrankontaktfläche erhöht sich durch die Invagination um ein Vielfaches. Ab dem 6., 7. Tag schiebt sich die präsynaptische Terminale mit dem plasmamembranständigen synaptischen Ribbon keilförmig zwischen die invaginierenden Axone der Horizontalzellen und separiert diese. Der Ribbon wird über die arciform Density an der präsynaptischen Terminalmembran verankert. Die arciform Density stellt eine Art proteinähnliches Kopplungselement dar, um synaptische Ribbons membranständig zu verankern (Ladman, 1958).

Ab dem 8., 9. Tag erscheinen die Fortsätze der Bipolarzellen und vervollkommen die Dyaden- zu Triaden/ Tetradenkonfigurationen. Die Synapsen bestehen somit bei Stäbchenrezeptoren aus vier postsynaptischen Elementen. Dabei haben die Horizontalzellfortsätze Rezeptoren mit geringer, die Bipolarzellen hingegen Rezeptoren mit hoher Glutamataffinität (Rao- Mirotznik, 1995). Die Bipolarzellfortsätze kommen zwischen den Horizontalzellaxonen in einer variablen Entfernung von 130-640 nm von der präsynaptischen Terminal zu liegen (Rao- Mirotznik, 1995). Die Entfernung der Horizontalzellfortsätze von der präsynaptischen Transmitterfreisetzungszone liegt bei ca. 16 nm. So muss der Transmitter die 10-40fache Strecke per diffusionem zurücklegen, um die hochaffinen Glutamatrezeptoren der Bipolarzellen zu erreichen. Möglicherweise stellen sich die Bipolarzellfortsätze als regulatives postsynaptisches Element, entsprechend der Transmitterexocytose, auf ein bestimmtes Entfernungs niveau ein. Am 14. bzw. 16. postnatalen Tag kann im synaptischen Spalt zwischen Prä- und Postsynapse elektronendichthes Material (vermutlich Transmitter- Abb. 16f) erkannt werden, und ist damit ein Zeichen der funktionellen Reife von Ribbonsynapsen. Das Vorliegen von morphologisch- ausgereiften aktiven Zonen an den Ankerstellen von Ribbons erscheint in dieser Entwicklungsphase und korreliert mit dem Zeitpunkt der ersten Augenöffnung junger Ratten. Vorstufen aktiver Zonen in Form von präsynaptischen Densities (Abb. 8a) an der präsynaptischen Plasmamembran existieren bereits in früheren Stadien.

Unseren Untersuchungen zufolge kann das singuläre Vorkommen von Ribbons in Stäbchen- und das Auftreten mehrerer Ribbons in Zapfenterminalen bestätigt werden. Die in Zapfenterminalen gefundenen Ribbons bleiben bis in das Erwachsenenstadium kürzer (bis 500 nm) als in Stäbchenterminalen.

Neben den synaptischen Ribbons wurden häufig granuläre Strukturen, vermutlich Ribbonvorstufen, sowie synaptic Spheres in sich entwickelnden Rezeptorterminalen gefunden (siehe Abschnitt 4.2).

Die relative Anzahl synaptischer Vesikel steigt mit zunehmender Größenentwicklung der Rezeptorterminalen an. Die Terminalen von Zapfenrezeptoren sind jedoch weniger dicht gefüllt (wahrscheinlich aufgrund des größeren Volumens), es finden sich intervesikuläre Abstände von teilweise mehr als 100 nm. Die Freisetzungsmenge synaptischer Vesikel wird durch die Konzentration der Ca^{2+} - Ionen in der Präsynapse abgestimmt und erlaubt sensorischen Organen eine schnelle und fein abgestufte Transmission der Erregungsimpulse (Juusola et al., 1996). So kann vermutet werden, dass die präsynaptischen Strukturen der Aufrechterhaltung der hohen Transmitterfreisetzung dienen, während die Anordnung der 3-4 postsynaptischen Fortsätze so angelegt ist, dass präsynaptisch emittierte Signal in Form der Glutamatquanten maximal auszuschöpfen und zu verarbeiten. Dabei kann der Transmitter jedes präsynaptisch exocytierten Vesikels theoretisch alle drei/ vier postsynaptischen Elemente beeinflussen.

Die generelle morphologische Entwicklung der Rattenretina scheint identisch zu der der Mäuseretina (Blanks et al., 1974) zu sein, da die zeitliche Abfolge der einzelnen Stadien ähnlich ist. Die Differenzierung der Ribbonsynapse beginnt vermutlich mit der Apposition von primitiven Rezeptorzell- und Horizontalzellfortsätzen. Die postsynaptischen Elemente werden nachfolgend in die präsynaptische Terminalia invaginiert, wodurch erste Dyaden entstehen. Die scleread wachsenden Bipolarzellfortsätze treffen im Entwicklungsverlauf auf die Dyaden und vervollständigen diese zu Tri/ Tetraden um den 10.-12. Tag. Ab diesem Zeitpunkt sind alle morphologischen Elemente der afferenten Sinneszellsynapse in der OPL elektronenmikroskopisch vorhanden. Zum Zeitpunkt der ersten Augenöffnung sollte ein annähernd identisches Entwicklungs niveau von Rezeptorzellen und ihren Synapsen erreicht sein, um den Informationsfluss in Richtung ZNS zu bahnen. So könnte das geöffnete Rattenauge in der Lage sein, neben einer Hell-, Dunkel- auch eine gewisse primitive Farbdifferenzierung zu ermöglichen.

5.2 Entwicklung der synaptischen Ribbons in den Photorezeptor-Ribbonsynapsen

Die Bildung synaptischer Ribbons in der OPL ergibt sich aus unseren Beobachtungen wie folgt:

Unseren Ergebnissen zufolge entwickeln sich die ersten stabförmigen synaptischen Ribbons um den 3. postnatalen Tag. Der erste im Zytoplasma flottierende (nicht plasmamembranverankerte) Ribbon lag frei in der primitiven Terminalen ohne Kontakt zu anderen zellulären Organellen. Außer den frühen, ungebundenen synaptischen Ribbons konnten granuläre Substanzen in den prospektiven Terminalen beobachtet werden. Wir vermuten, dass dieses granuläre elektronendichte Material möglicherweise Vorstufen sich entwickelnder Ribbons darstellt. Diese Vermutung beruht auf morphologischen Beobachtungen, bei denen sich die granulären Strukturen zu Komplexen zusammenlagern können (siehe Abb. 9a-e, 10c, f). Das unregelmäßige granuläre Material ist noch nicht mit Vesikeln assoziiert, hat aber eine ähnliche Konsistenz wie die synaptischen Ribbons. Aufgrund der unregelmäßigen Dimensionen und der filamentären Verbindungen (Abb. 9) des granulären Materials untereinander, kann eine Verwechslung mit Ribosomen ausgeschlossen werden. Der Beweis, dass dieses granuläre Material Ribbonvorstufen darstellt, kann mit Immunogoldelektronenmikroskopie (z.B. mit Antikörpern gegen Ribeye) durchgeführt werden. Diese Granula, bei denen es sich um Proteinoligomere handeln könnte, stellen möglicherweise Aggregationen des Proteins Ribeye dar. Ribeye ist das Hauptprotein der Ribbons (Schmitz et al., 2000; Wan et al., 2005) und wahrscheinlich in der Lage über Oligomerisierungen das Grundgerüst der Ribbons aufzubauen. Die Aminosäuresequenzen, aus denen das 120 kDa Protein Ribeye besteht, werden vermutlich an zytosolischen Ribosomen gebildet und in das Zytoplasma der Terminalen gegeben. Olney (1968) vermutete den Bildungsort der Vorstufen synaptischer Ribbons in der paranukleären Region der Innenglieder von Rezeptorzellen.

Die im Zytoplasma vorhandenen Ribeyekomplexe oligomerisieren möglicherweise zu größeren globulären Strukturen (z.B. synaptic Spheres), die wir am 5. postnatalen Tag in der Terminalen beobachteten.

Die ultrastrukturellen Aufnahmen legen nahe, dass die synaptic Spheres wahrscheinlich größere Aggregationseinheiten kleinerer Untereinheiten (Oligomere) sind. Aus diesen wiederum polymerisieren vermutlich die synaptischen Ribbons, ähnlich wie Mikrotubuli, die aus α - und β - Tubulindimeren bestehen.

Die Querdurchmesser der möglichen globulären Vorstufen -synaptic Spheres- waren nicht so konstant wie die der synaptischen Ribbons in Zapfen- und Stäbchenterminalen (30-40 nm). So konnte am 16. Tag neben einem Ribbon ein ca. 100 nm (Durchmesser) großes Gebilde (synaptic Sphere) gefunden werden. Aufgrund der atypischen Größe des synaptic Sphere könnte hier das Proteingefüge aufgelockert sein. Hier laufen vermutlich Polymerisationsvorgänge ab. Unseren Untersuchungen zufolge konnte die Koexistenz von synaptic Spheres (aggregierende granuläre Substanzen) und synaptischen Ribbons am 6. Tag beobachtet werden. Aufgrund der Nähe zueinander und der Übereinstimmung morphologischer Details von synaptic Spheres und Ribbons kann eine morphologische Verwandtschaft vermutet werden. Da die Ribbons zunächst nur 50-150 nm lang waren und im weiteren Verlauf stark an Länge zunahmen (500 nm-1 μ m), müssen Auf- bzw. Umbauvorgänge stattfinden. Die oben angeführten Vermutungen bekräftigen die Annahme der Hypothese, dass Ribbons durch die Polymerisation von Ribeyeoligomeren entstehen.

Synaptic Spheres sowie die keulenähnliche Form synaptischer Ribbons können vermutlich Abbau- als auch Aufbaustrukturen von Ribbons sein. Die keulenähnliche Form synaptischer Ribbons -als Abbaustufe von Ribbons diskutiert (s. u.)- wurde in unseren Präparaten nicht beobachtet, da in den von uns untersuchten Entwicklungsstadien vermutlich noch kein größerer Ribbonabbau (siehe S. 66) stattfindet.

Die Profile der Ribbons erscheinen elektronenmikroskopisch meist homogen strukturiert. Gelegentlich wurden auch längsgestreifte Ribbons (lamellenartige Organisation) beobachtet, deren Ursache möglicherweise eine Auflockerung des Proteingefüges für ablaufende Polymerisationsvorgänge ist. Sterling (1998) schloss aufgrund ähnlicher Beobachtungen auf ein Zytoskelett von Ribbons.

Sowohl Ribbons als auch synaptic Spheres waren von Beginn an vollständig mit annähernd gleich großen synaptischen Vesikeln umgeben. Die in der Terminale vorhandenen synaptischen Vesikel werden vermutlich sofort mittels Filamenten in 20-25 nm Entfernung angehängt, so dass zu keinem Zeitpunkt „nackte“ Ribbons oder deren größere Aggregationsvorstufen existieren. Manche Autoren beobachteten frühe synaptische Ribbons ohne Vesikelbesatz (Smelser et al., 1974; Weidman und Kuwabara, 1968). Chen und Witkowsky (1978) vermuteten, dass die Vesikelbindung direkt mit dem Wachstumsprozess des Ribbon einhergeht. Möglicherweise findet eine Interaktion zwischen den Proteinen der Vesikel und den Oligomeren der synaptic Spheres bzw. Ribbons statt, deren Folge die Vesikelbindung ist. So nehmen Schmitz et al., (2000) an, dass die B- Domäne von Ribeye an der Oberfläche der Ribbons gebunden ist und mit den Proteinen synaptischer Vesikel interagiert (Vesikelbindung).

Der Beginn der Bildung synaptischer Ribbons beginnt um den 3. postnatalen Tag und setzt sich kontinuierlich bis zum 7. Tag fort. Vom 7.-8. Tag findet eine mehr als Verdreifachung der Anzahl synaptischer Ribbons in der präsynaptischen Terminale statt. Die stetige Zunahme der synaptischen Ribbons folgt bis zum 12. Tag, wo sie mit 67 Ribbons pro $220 \mu\text{m}^2$ OPL den quantitativen Höhepunkt erreicht. Danach fällt die Ribbonanzahl stetig ab und pegelt sich bei etwa 30 Ribbons pro $220 \mu\text{m}^2$ OPL am 21. postnatalen Tag ein. Das Absinken der Ribbonanzahl pro $220 \mu\text{m}^2$ OPL ist vermutlich eine Folge der Volumenzunahme der OPL (Hewing, 1979) oder es ist Resultat (Abbau von Ribbons) der Nivellierung unter physiologischen Konditionen (Augenöffnung ca. 13.- 14. Tag).

Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Kalzium die Dynamik von Ribbons in Zapfensynapsen reguliert. So zeigten isolierte *Carassius carassius* Retinae, dass eine abfallende Ca^{2+} - Konzentration eine steigende Anzahl synaptischer Ribbons zur Folge hat und umgekehrt (Schmitz et al., 1989; Schmitz und Drenckhahn, 1993). Bei niedrigem Ca^{2+} - Spiegel entkoppeln sich die Ribbons von der präsynaptischen Membran und legen sich parallel zu dieser (Schmitz und Drenckhahn, 1993). Eine andere interessante Beobachtung wurde bei der Inkubation mit einer 10 mM Lithiumlösung für 15-45 Minuten gemacht: Die Ribbons verschwanden komplett und waren nach 45-90 Minuten wieder präsent, wobei sie ihr Ausgangsniveau wiedererreichten (Schmitz und Drenckhahn, 1993).

Die keulenförmige Art von Ribbons, deren distales Ende eine bulbusförmige Aufweitung zeigt, wird als Zeichen der Zerlegung synaptischer Ribbons gedeutet (Schmitz und Drenckhahn, 1993). Schließlich führt die Verabreichung des Neurotoxins Quisqualate (Sattayasai und Ehrlich, 1987) zur Verkürzung synaptischer Ribbons sowie zum Erscheinen der keulenförmigen Ribbons und der synaptic Spheres. Diesen Erscheinungen folgt das Auftreten sog. paranukleärer Granula, die von Lysosomen aufgenommen werden können (Sattayasai und Ehrlich, 1987). Spiwoks-Becker et al (2004) zeigten bei 9 Wochen alten Albinomäusen, dass sich unter zeitlich kontrolliertem Lichteinfluss von ca. 30-60 Minuten nach vorangegangener Dunkelheit vermehrt synaptic Spheres und keulenförmige Ribbons in der präsynaptischen Terminale bilden. Bei erneuter Dunkelheit von ca. 30 Minuten verschwanden die synaptic Spheres in der Terminale wieder. Dies bestätigt die Hypothese, dass die Strukturwechsel- Veränderungen von synaptischen Ribbons hauptsächlich licht- und nicht tageszeitabhängig sind (Spiwoks- Becker et al., 2004).

Diese Ergebnisse anderer Autoren zeigen, dass es regulative Elemente bzw. Substanzen gibt, die eine De- bzw. (Re-) Polymerisation der Ribbons zur Folge haben, die eine Steuerung dieser Prozesse in der Präsynapse ermöglichen. Der endgültige Beweis dieser Hypothesen steht noch bis heute aus.

Eine weitere Feststellung unserer Untersuchungen ist, dass die Anzahl der unverankerten, frei im Zytoplasma flottierenden Ribbons sich mit zunehmendem Entwicklungsverlauf zugunsten der Plasmamembrangebundenen verschiebt (Hermes et al., 1992, 1993). Bei einigen Autoren wurden frei flottierende Ribbons sogar in der unmittelbaren Nachbarschaft zum Nucleus gefunden (Olney, 1968; Mc Ardle et al., 1977; Spira, 1975; Rapaport, 1989). Auch bei adulten Tieren wurden frei flottierende (nicht plasmamembranverankert) Ribbons in Stäbchenterminalen der Retina gefunden (Case und Plummer, 1993; Vollrath et al., 1989), wobei die Anschnittrichtung des Ribbon in der Synapse eine wichtige Bedeutung für diese Art der Beurteilung hat. So kann beispielsweise ein plattenförmig membrangebundener Ribbon, der in der Synapsenmitte horizontal angeschnitten wurde, einen frei flottierenden Ribbon vortäuschen.

Das sich Ribbons von ihrem Membranankerplatz entfernen können wurde u. a. beim Winterschlaf abhaltenden Eichhörnchen entdeckt, wo sich Anhäufungen von kurzen vesikelbedeckten Ribbons in einer durchschnittlichen Entfernung von ca. 5,5 µm zur präsynaptischen Membran bildeten. Nach Beendigung des Winterschlafs nahmen die meisten Ribbons ihren ursprünglichen Funktionsort innerhalb von 3-5 Tagen wieder ein (Remé und Young, 1977). Die Bewegung von Ribbons ist möglicherweise verantwortlich für die von Vollrath et al. (1989) beobachtete Fluktuation dieser Strukturen bei Spraque- Dawley Ratten an der präsynaptischen Membran in Stäbchensynapsen. Ein klare Erkenntnis über den Ortswechsel von synaptischen Ribbons wurde in der Goldfischzirbeldrüse von McNulty (1981) geliefert. Hier sind Ribbons am Tage wesentlich näher (0,068 µm) an der präsynaptischen Membran als in der Nacht (0,132 µm).

Um generell zu ihrem Funktionsort an der präsynaptischen Membran zu gelangen wären für Ribbons aktive/ passive Transportmechanismen notwendig (Crook und Morrison, 1989; Hermes et al., 1992; Mc Ardle et al., 1977). So fand McArdle (1977), dass sich Ribbons in Bipolarzellen nah an der präsynaptischen Membran entwickeln, während sie sich in Rezeptorzellen entfernt davon formieren. Diese Vermutungen, bezogen auf die Ribbons in Rezeptorzellen, entsprechen unseren Beobachtungen.

In den dreidimensionalen Darstellungen sind Ribbons flache, plattenförmige Gebilde („stabförmig“) mit variablem Profil. So erstreckt sich das Formenspektrum über gebogene bis hin zu keulenförmigen (Vollrath; 1989). Die Grundform wird manchmal durch Verdrehungen um die Achse (McCartney und Dickson, 1985) sowie durch Ausläufer des membranabgewandten distalen Teils (Sanyal et al., 1992) verkompliziert. Rekonstruktionen von Ribbons in Zapfensynapsen ließen den Pleomorphismus dieser Zellorganelle erkennen (McCartney und Dickson, 1985). Darüber hinaus wurden auch rechteckige Formen beschrieben (Pierantoni und McCann, 1984). Neben diesen stabförmigen bzw. flächigen Ribbongrundformen existieren auch elektronendichte, leicht ovale bis runde synaptische Ribbons in den Terminalen, die synaptic Spheres oder synaptic Bodies genannt werden. Deren Durchmesser ist ca. 0,3 µm (Holmberg und Öhman, 1976; Vollrath et al., 1989), und nicht selten liegt eine Koexistenz zu synaptischen Ribbons vor. Sie werden als Vorstufen bzw. Abbaustrukturen diskutiert.

Das Verhältnis von Ribbons zu synaptic Spheres reicht von 2-6:1 bei Lewis, Wistar und Dark Agusti Ratten, wohingegen in Long Evans und Brown Norway Ratten Verhältnisse von 15-22:1 beobachtet wurden (Hermes et al., 1993).

Es konnte bis jetzt noch nicht definitiv geklärt werden, ob synaptic Spheres eigenständige Organellen darstellen, obwohl sie zweifelsohne eine enge morphologische Beziehung zu den Ribbons aufweisen. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass in den Haarzellen des Vestibularorgans von Säugetieren synaptische Ribbons präsent sind, wohingegen an identischer Stelle bei niederen Vertebraten synaptic Spheres anzutreffen sind (Wersäll und Bagger- Sjöbäck, 1974). Ebenso konnte in der Retina von *Lampetra fluviatilis* gezeigt werden, dass in den Synapsen der Photorezeptorzellen jeweils eine Synapse einen Ribbon enthält, während die andere einen synaptic Sphere beinhaltet (Holmberg und Öhman, 1976). Diese Beobachtungen sind mit unseren identisch. Aber auch das gemeinsame Vorkommen von synaptic Spheres und Ribbons in einer Terminale, was bereits von Vollrath et al., (1989) nachgewiesen wurde, kann in unseren Aufnahmen gesehen werden.

Die Proteinausstattung der Ribbonpräsynapsen ist generell die gleiche wie die konventioneller Synapsen (Ullrich und Südhof, 1994; Brandstätter et al., 1996a, b; von Kriegsstein et al., 1999). Ein elementarer Baustein ist das sog. Ribeye, eines der am häufigsten und ausschließlich in Ribbonsynapsen vorkommenden Proteine. So zeigten Schmitz et al. (2000), dass die Ribbons eine Komposition von stapelförmigen Proteinaggregationen sind, deren Hauptkomponente Ribeye ist. Ribeye besteht aus zwei Domänen, wobei die A- Domäne inhomogen zu allen bekannten Proteinen ist. Die B- Domäne ist identisch zum Transkriptionsfaktor CtBP2. Schmitz et al. erklärten ein Modell, bei dem die A- Domäne als Aggregationseinheit fungiert, während die B- Domäne als Enzym- und NAD-Bindungsfaktor agiert. Die Vesikel werden möglicherweise über die B- Domäne an den Ribbon gebunden und über unbekannte Translokationsvorgänge dem präsynaptischen Spalt zugeführt.

So ist eine Kinesin Untereinheit (KIF3A) in Photorezeptor- und Bipolarzellribbons lokalisiert worden, die zum gesteuerten Vesikelfluss in Form eines „Vesikelmotors“ beiträgt (Muresan et al., 1999). Da Kinesin aktiv Bewegungen bis zu 1 $\mu\text{m}/\text{s}$ ermöglicht, könnten die Vesikel eines 150 nm langen Bipolarzellribbons in ca. 150 ms von oben nach unten translokalisiert werden (Howard J., 1996).

Aber auch Bewegungen entlang des Ribbon durch passive Diffusion wären möglich. Die genauen Abläufe der Vesikelbindung und Translokation am Ribbon in Richtung präsynaptischer Membran sind noch nicht endgültig geklärt.

Es existieren bis jetzt noch keine verlässlichen Daten über die durchschnittliche „Lebensdauer“ von Ribbons. Aufgrund der Menge an keulenförmigen Ribbons und synaptic Spheres von ca. 2,5% in der Stäbchenterminale und der Annahme, dass diese den Katabolismus entwickelter Ribbons darstellen, kommt man zu einer Lebenserwartung von ungefähr 40 Tagen (Spiwoks- Becker und Vollrath, unveröff. Ergebnisse; Homepage Universität Mainz). Pro Tag werden demzufolge 2,5% der Ribbons abgebaut. Nach 40 Tagen müssten demzufolge 100% der Ribbons ersetzt worden sein.

Die anatomischen und physiologischen Voraussetzungen der Ribbons bekräftigen die Vermutung, dass sie die Aufgabe der Bahnung synaptischer Vesikel vom Zellinneren zur aktiven Zone am präsynaptischen Spalt übernommen haben.

Es zeigte sich bei Spraque- Dawley Ratten, dass erste Ribbons am 3.- 4. postnatalen Tag in der Synapse von Photorezeptoren zu finden waren und deren Genese um den 12.-14. Tag beendet erscheint. Die gesamten Prozesse der Genese sowie das „Wachstum“ von synaptischen Ribbons und deren Vorstufen (synaptic Spheres, elektronendichthes granuläres Material) laufen unseren Ergebnissen zufolge im Zytosol der präsynaptischen Terminale ab.

Viele Fragen zur genauen Funktionsweise dieser Strukturen bleiben noch unbeantwortet. Es gibt noch keinen direkten Beweis für die Vesikelmobilität am Ribbon und den dynamischen Wechsel von ungebundenen zytoplasmatischen, hin zu ribbongebundenen synaptischen Vesikeln. Auch die große Varianz in Form und Größe von Ribbons und deren Ursache müssen noch näher betrachtet werden. Das Verhalten von Ribbons über längere Zeiträume hilft möglicherweise bei der Aufklärung des Verschwindens und Wiederauftauchens in manchen Geweben und hilft, die Formationsprozesse während der Genese und der Funktionsperiode näher zu beleuchten. Weitere Fortschritte durch die Kombinationen verschiedener Ansätze (z.B. Molekularbiologie mit neuen Imagetechniken etc.) werden helfen, diese herausfordernden Fragen in Zukunft zu beantworten.

6. Literatur

1. Ahnelt, P., Keri, C., Kolb, H. (1990)

Identification of pedicles of putative blue-sensitive cones in the human retina.
Journal of Comparative Neurology, **293**, 39-53.

2. Baylor, D.A., Fuortes, M.G.F., o`Bryan, P.M., (1971)

Receptive fields of cones in the retina of the turtle.
Journal of Physiology (London), **214**, 265-294.

3. Berg, H.C. (1983)

Random walks in biology.
Princeton University Press.

4. Betz, W.J., Bewick, G.S. (1992)

Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction.
Science, **255**, 200-203.

5. Blanks, J.C., Adolfi, A.M., Lolley, R.N. (1974)

Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retina.
Journal of Comparative Neurology, **156**, 81-93.

6. Boycott, B.B., Kolb, H. (1973)

The connections between bipolar cells and photoreceptors in the retina of the domestic cat.
Journal of Comparative Neurology, **148**, 91-114.

7. Boycott, B.B., Wässle, H. (1991)

Morphological classification of bipolar cells of the primate retina.
European Journal of Neuroscience, **3**, 1069-1088.

8. Brandstätter, H., Wässle, H., Betz, H., Morgans, C.W. (1996)

The plasmamembrane protein SNAP-25, but not syntaxin, is present at photoreceptor and bipolar cell synapses in the rat retina.

European Journal of Neuroscience, **8**, 823-828.

9. Brandstätter, H., Koulen, J., Wässle, H. (1998)

Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina.

Vision Research, **38**, 1385-1397.

10. Bruns, D., Riedel, D., Klingauf, J., Jahn, R. (2000)

Quantal release of serotonin.

Neuron, **28**, 205-220.

11. Bunt, A.H. (1971)

Enzymatic digestion of synaptic ribbons in amphibian retinal photoreceptors.

Brain Research, **25**, 571-577.

12. Burns, M.E., Augustine, G.J. (1995)

Synaptic structure and function.

Cell, **83**, 187-194.

13. Caley, D., Johnson,W., Liebelt, R.A. (1972)

The postnatal development of the retina in the normal and rodless CBA mouse:

A light and electron microscopic study.

American Journal of Anatomy, **133**, 179-212.

14. Case, C.P., Plummer ,C.J. (1963)

Changing the light intensity of the visual environment results in large differences in numbers of synapses and in photoreceptor size in the retina of the young adult rat.

Neuroscience, **55**, 653-666.

15. Chen, F., Witkovsky, P. (1978)

Formation of photoreceptor synapses in the retina of larval xenopus.

Journal of Neurocytology, **7**, 721-740.

16. Cohen, A.I. (1965)

Some electron microscopic observations on interreceptor contacts in the human and macaque retina.

Journal of Anatomy, **99**, 595-610.

17. Cohen, E., Sterling, P. (1990)

Demonstrations of cell types among cone bipolar neurons of cat retina.

Philos.Trans.Roy.Soc.London(B), **330**, 305-321.

18. Cragg, B.G. (1975)

The development of synapses in the visual system of the cat.

Journal of comparative Neurology, **160**, 147-166.

19. Crooks, J., Morrison, J.D. (1989)

Synapses of the inner plexiform layer of the area centralis of kitten retina during postnatal development: A quantitative study.

Journal of Anatomy, **163**, 33-47.

20. DeVries, S.H. und Baylor, D.A. (1993)

Synaptic circuitry of the retina and the olfactory bulb.

Cell, **72 Suppl**, 139-149.

21. Dowling, J.E. (1987)

The retina: an approachable part of the brain.

Cambridge, MA: Harvard University Press.

22. Dowling, J.E. (1991)

The retina in encyclopedia of human biology.

New York: Academic Press, 615-631.

23. Dowling, J.E., Boycott, B.B. (1966)

Organisation of the primate retina: Electron microscopy.

Proceedings of the Royal Science of London (B), **166**, 80-111.

24. Fu, Y., Yan K.W. (2007)

Phototransduktion in mouse rods and cones.
Pflugers Arch, Jan. 17, Epub ahead of print.

25. Flock, A. (1964)

Structure of the macula utriculi with special reference to the directional interplay of sensory responses as revealed by morphological polarisation.
Journal of Cell Biology, **22**, 413-431.

26. Gray, E.G., Pease, H.L. (1971)

On understanding the organisation of the retinal receptor synapses.
Brain Research, **35**, 1-15.

27. Greiner, J.V., Weidman, T.A. (1980)

Histogenesis of the cat retina.
Exp. eye research, **30**, 81-93.

28. Grün, G. (1980)

Developmental dynamic in synaptic ribbons of retinal receptor cells (Tilapia, Xenopus).
Cell Tissue Research, **207**, 331-339.

29. Hahn, P., Lindsten, T., Ying, G.S., Bennett, J., Milam, A.H., Thompson, C.B., Dunaief, J.C. (2003)

Proapoptotic bcl-2 family members, Bax and Bak, are essential for developmental photoreceptor apoptosis.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **44** (8), 3598- 3605.

30. Heidelberger, R. (2001)

ATP is required at an early step in compensatory endocytosis in synaptic terminals.
Journal of Neuroscience, **21**, 6467-6474.

31. Hermes, B., Reuss, S., Vollrath, L. (1992)

Synaptic ribbons, spheres and intermediate structures in the developing rat retina.

International J. Dev. Neurosci., **10**, 215-223.

32. Hermes, B., Reuss, S., Vollrath, L. (1993)

Strain differences in the ratio of synaptic body types in photoreceptors of the rat retina.

Vision Research, **33**, 2427-2430.

33. Hewing, M. (1979)

Synaptic ribbons during postnatal development of pineal gland in the golden hamster.

Cell Tissue Res., **199**, 473-482.

34. Holmberg, K., Öhmann, P. (1976)

Fine structure of retinal synaptic organelles in lamprey and hagfish photoreceptors.

Vision Research, **16**, 237-239.

35. Hopsu, V.K. und Arstila ,A.U. (1965)

An apparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of the rat.

Expl. Cell Res., **37**, 484-487.

36. Howard, J., (1996)

The movement of kinesin along microtubules.

Ann.Rev.Physiol., **58**, 703-729.

37. Juusola, M., French, A.S., Uusitalo, R.O., Weckstrom, M. (1996)

Information processing by graded potential transmission through tonically active synapses.

Trends Neuroscience, **19**, 292-297.

38. Kandel, E.R.H., Schwartz, J.H., Jessel, T.M. (1996)

Neurowissenschaften: eine Einführung.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

39. Kidd, M. (1962)

Electron microscopy of the inner plexiform layer of the retina in the cat and the pigeon.

Journal of Anatomy, **96**, 179-188.

40. Kolb, H. (1970)

Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi- impregnated cells.

Phil. Transactions of the Royal Society of London B, **258**, 261-283.

41. Ladman, A.J. (1958)

The fine structure of the rod-bipolar cell synapse in the retina of albino rats.

Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, **4**, 459-465.

42. Lenzi, D., Runyeon, J.W., Crum, J., Ellisman, M.H., Roberts, W.M. (1999)

Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography.

J. Neuroscience, **19**, 119-132.

43. Lenzi, D., von Gersdorff, H. (2001)

Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines.

Bio Essays, **23**, 831-840.

44. Luo, Y.R. (2000)

Why is the human visual system sensitive only to light of wavelengths from approximately 760 to 380 nm. An answer from thermochemistry and chemical kinetics.

Biophysical Chemistry, **83**, 179-184.

45. Masland, R.H. (2001a)

The fundamental plan of the retina.

Nature Neuroscience, **4**, 877-886.

46. Masland, R.H. (2001b)

Neuronal diversity in the retina.

Current Opinion in Neurobiology, **11**, 431-436.

47. Maslim, J., Stone, J. (1986)

Synaptogenesis in the retina of the cat

Brain Research, **373**, 35-48.

48. McArdle, C.B., Dowling, J.E., Masland, R.H. (1977)

Development of outer segments and synapses in the rabbit retina.

Journal of Comparative Neurology, **175**, 253-274.

49. McCartney, M.D., Dickson, D.H. (1985)

Photoreceptor synaptic ribbons: three-dimensional shape, orientation and diurnal (non) variation.

Exp. Eye Research, **41**, 313-321.

50. McGuire, B.A., Stevens, J.K., Sterling, P. (1984)

Microcircuitry of bipolar cells in the cat retina.

Journal of Neuroscience, **4**, 2920-2938.

51. McNulty, J.A. (1981)

Synaptic ribbon in the pineal organ of the goldfish: circadian rhythmicity and the effects of constant light and constant darkness.

Cell Tissue Research, **215**, 491-497.

52. Meier, C., Dermietzel, R. (2006)

Electrical synapses- gap junctions in the brain.

Results Probl. Cell Diff., **43**, 99-128.

53. Missotten, L. (1965)

The ultrastructure of human retina.

Arscia Uitgaven, Brussels.

54. Morrison, J.D. (1982)

Postnatal development of the area centralis of the kitten retina: an electron microscopic study.

J. Anat., **135**, 255-271.

55. Muresan, V., Lyass, A., Schnapp,B.J. (1999)

The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate Photoreceptors

Journal of Neuroscience, **19**, 1027-1037.

56. Olney, J.W. (1968)

An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina.

Investigative Ophthalmology, **7**, 250-268.

57. Paillart, Ch., Jian, Li., Matthews, G., Sterling, P., 2003

Endocytosis and vesicle recycling at a ribbon synapse.

Journal of Neuroscience, **23**, 4092-4099.

58. Parsons, T.D., Lenzi, D., Ahners, W., Roberts, W.M. (1994)

Calcium triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell: capacitance measurements in saccular hair cells.

Neuron, **13**, 875-883.

59. Peichl, L. (1992)

Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina der Säugetiere.

Biologie in unserer Zeit, **1**, 45-53.

60. Pierantoni, R.L., McCann, G.D. (1984)

A quantitative study on synaptic ribbons in the photoreceptor of turtle and frog. In: *Photoreceptors*, A. Borsellino and L. Cervetto, Plenum Press, N. York, 237-239.

61. Purves, D., Rubin, E., Snider, W.D., Lichtman, J. (1985)

Relation of animal size to convergence, divergence, and neuronal number in peripheral sympathetic pathways.
Journal of Neuroscience, **6**, 1-5.

63. Rao, R., Buchsbaum, G., Sterling, P. (1994)

Rate of quantal transmitter release at the mammalian rod synapse.
Biophys. J., **67**, 57-63.

64. Rao- Mirotznik, R., Harkin, A.B., Buchsbaum, G., Sterling, P. (1995)

Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse.
Neuron, **14**, 561-569.

65. Rapaport, D.H., Stone, J. (1982)

The site of commencement of maturation in mammalian retina: observations in the cat.

Brain Res., **5**, 273-279.

66. Rapaport, D.H. (1989)

Quantitative aspects of synaptic ribbon formation in the outer plexiform layer of the developing cat retina.
Vis. Neuroscience., **3**, 21-32.

67. Raviola, E. (1976)

Intercellular junctions in the outer plexiform layer of the retina.
Invest. Ophthalmol., **15**, 881-895.

68. Raviola, E., Gilula, N.B. (1973)

Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 1677-1681.

69. Remé, C.E., Young, R.W. (1977)

The effects of hibernation on cone visual cells in the ground squirrel.
Invest. Ophthalmol. Vis. Res., **16**, 815-840.

70. Rieke, F., Schwartz, E.A. (1996)

Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse.
Journal of Physiology, **493**, 1-8.

71. Ryan, T.A., Reuter, H., Wendland, B., Schweizer, F.E., Tsien, R.W., Smith, S.J. (1993)

The kinetics of synaptic recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron*, **11**, 713-724.

72. Sanyal, S., Hawkins, R.K., Jansen, H.G., Zeilmacher, H.G. (1992)

Compensatory synaptic growth in the rod terminals as a sequel to partial photoreceptor cell loss in the retina of chimaeric mice.
Development, **114**, 797-803.

73. Sattayasai, J., Ehrlich, D. (1987)

Morphology of quisqualate-induced neurotoxicity in the chicken retina.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **28**, 106-117.

74. Schaeffer, S.F., Raviola, E. (1978)

Membrane recycling in the cone cell endings of the turtle retina.
J. Cell. Biol., **79**, 802-825.

75. Schaeffer, S.F., Raviola, E., Heuser, J.E. (1982)

Membrane specialisations in the outer plexiform layer of the turtle retina.
J. Comp. Neurol., **204**, 253-270.

76. Schmitz, F., Drenckhahn, D. (1993)

Intermediate stages in the disassembly of synaptic ribbons in cone photoreceptors of the crucian carp. *carassius carassius*.
Cell Tissue Research, **272**, 487-490.

77. Schmitz, F., Kirsch, M., Wagner, H- J. (1989)

Calcium- modulated synaptic ribbon dynamics in cone photoreceptors: a pharmacological and electron spectroscopic study.
Eur. J. Cell Biol., **49**, 207-212.

78. Schmitz, F., Königstorfer, A., Südhof, T.C. (2000)

Ribeye, a component of synaptic ribbons: a proteins journey through evolution provides insight into synaptic ribbons function.
Neuron, **28**, 857-872.

79. Sjöstrand, F.S. (1958)

Ultrastructure of retinal synapses of the guinea pig as revealed by three dimensional reconstructions from serial sections.

J. Ultrastruct. Res., **2**, 122-170.

80. Sjöstrand, F.S. (1974)

A search for circuitry of directional selectivity and neuronal adaptation through three-dimensional analysis of the outer plexiform of the rabbit retina.
J. Ultrastr. Res., **49**, 60-156.

81. Smelser, G.K., Ozanics, V., Rayborn, M., Sagun, D. (1974)

Retinal synaptogenesis in the primate.
Investigative Ophthalmology and Visual Science, **13**, 340-361.

82. Smith, C. A. und Sjöstrand, F.S. (1961)

A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea.
Journal of Ultrastructural Research, **5**, 523-556.

83. Sohl, G., Maxeiner, S., Willecke, K. (2005)

Expression and function of neuronal gap junctions.
Nature Rev. Neurosci., **3**, 191-200.

84. Sparado, A., de Simonis, I., Puzzulo, D. (1978)

Ultrastructural data and chronobiological patterns of the synaptic ribbons in the outer plexiform layer in the retina of albino rats.

Acta Anatomica, **102**, 365-373.

85. Spira, A.W. (1975)

In utero development and maturation of the retina of a non-primate mammal:

A light and electron microscopic study of the guinea pig.

Anat. Embryol., **146**, 279-300.

86. Spiwoks- Becker, I., Glas, M., Lasarzik, I., Vollrath, L. (2004)

Mouse photoreceptor synaptic ribbons lose and regain material in response to illumination changes.

Europ. Journal of Neuroscience, Vol. **19**, 1559-1571.

87. Sterling, P. (1998)

The Retina. In: The synaptic organization of the brain.

Fourth edition, G. Shepherd, ed.

New York: Oxford University Press, 205-253.

88. Stevens, C.F., Tsujimoto, T. (1995)

Estimates for the pool size of releasable quanta at a single central synapse and for the time required to refill the pool.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 846-849.

89. Trujillo- Cenoz, O. (1972)

The structural organization of the compound eye in insects.

In Handbook of sensory Physiology, Volume 7/2, Physiology of Photoreceptor Organs.

M.G.F. Fuortes, ed.(New York: Springer Verlag), 5-62.

90. Ullrich, B., Südhof, T.C. (1994)

Distribution of synaptic markers in the retina: Implications for synaptic vesicle traffic in ribbon synapses.

J. Physiol.(Paris), **88**, 249-257.

91. Vaney, D.I., Nelson, J.C., Pow, D.V. (1998)

Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina.

Journal of Neuroscience, **18**, 10594-10602.

92. Veruki, M.L. und Hartveit, E. (2002)

All (rod) amacrine cells from a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina.

Neuron, **33**, 935-946.

93. Vollrath, L., Seidel, A. (1989)

The plasticity of synaptic ribbons.

Biomed. Res., **10**, 207-212.

94. Vollrath, L., Spiwoks- Becker, I. (1996)

Plasticity of retinal synapses.

Microsc. Res. And Techn., **35**, 472-487.

95. von Kriegstein, K., Schmitz, F., Link, E., Südhof, T.C. (1999)

Distribution of synaptic vesicle proteins in the mammalian retina identifies obligatory and facultative components of ribbon synapses.

Eur. J. Neurosci. **11**, 1335-1348.

96. von Gersdorff, H., Matthews, G. (1994a)

Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals.

Nature, **367**, 735-739.

98. von Gersdorff, H., Vardi, E., Matthews, G., Sterling, P. (1996)

Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released.

Neuron **16**, 1221-1227.

99. Wagner, H.J. (1997)

Presynaptic bodies (“ribbons”): from ultrastructural observations to molecular perspectives.

Cell Tissue Res., **287**, 435-446.

100. Walls, G.L., (1963)

The vertebrate eye and its radiation.

Hafner Publishing Company Inc., New York.

101. Wan, H.I., DiAntonio, A., Fetter, R.D., Bergstrom, K., Strauss, R.,

Goodman, C.S. (2000)

Highwire regulates synaptic growth in Drosophila.

Neuron, **26**, 313-329.

102. Wan, L., Almers, W., Chen, W., (2005)

Two ribeye genes in teleost: the role of ribeye in ribbon formation and bipolar cell development.

J. of Neuroscience, **25**, 941-949.

103. Weidman, T.A., Kuwabara, T. (1968)

Postnatal development of the rat retina: An electron microscopic study.

Arch. Ophthalmol., **79**, 470-484.

104. Wersäll, J., Bagger- Sjöbäck, D. (1974)

Morphology of the vestibular sense organ.

In: Handbook of sensory physiology; vestibular system part 1; H.H. Kornhuber
Ed. Springer- Verlag, New York, 124-170.

105. Whitehead, M.C., Morest, D.K. (1985)

The growth of cochlear fibres and the formation of their synaptic endings in the avian inner ear: A study with the electron microscope.

Neuroscience, **14**, 277-300.

106. Williams, R.W. Herrup, K. (1988)

The control of neuron number.

Annual review of Neuroscience, **11**, 423-453.

107. Zenisek, D., Steyer, J.A., Almers, W. (2000)

Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones.

Nature, **406**, 849-854.

7. Danksagung

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Univ.- Prof. Dr. med. Frank Schmitz in der Abteilung Elektronenmikroskopie am Institut für Anatomie der Universität Leipzig angefertigt.

Für die Überlassung des interessanten Themas, die Hilfestellungen und die wertvollen Kommentare auf meine manchmal kuriosen Fragen danke ich im Besonderen, Herrn Prof. Dr. med. Frank Schmitz. Danke Frank!

Judith Craatz danke ich ganz herzlich für die Zeit und Arbeit, die sie zubrachte, um meine „Schnittchen“ anzufertigen. Sie gab ihnen den nötigen Feinschliff und schließlich wurden schöne Fotos daraus.

Viel Dank geht natürlich ebenso an MTA Conny Franke, die mir bei der Herstellung verschiedenster Agenzien immer mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Herrn Dr. Fitzl möchte ich meinen Dank für die geduldige Behebung der von mir verursachten Fehleinstellungen und den damit gelegentlich verbundenen Reparaturen des Elektronenmikroskops herzlich danken.

Allen anderen nicht namentlich erwähnten Kollegen des anatomischen Institutes und des Tierstalles des Medizinisch- Experimentellen- Zentrums Leipzig sei für die freundliche Unterstützung und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt.

Ein riesengroßer Kuss geht an meine kleine Familie, der ich oft fernbleiben musste und deren Geduld gelegentlich am Ende war. Und niemals zu vergessen sind natürlich meine Eltern, die mich nicht nur wirtschaftlich, sondern generell bei allen Problemen herzlich unterstützten.

Danke, dass Ihr alle mich auf diesem langen Weg so herzlich und intensiv unterstützt habt. Vielen Dank!

8. Lebenslauf

Name Kirchhoff, Matthias

Geburtsdatum 16.01.1974

Geburtsort Meiningen

Anschrift Nachtigallenstraße 15
98617 Meiningen

Eltern Mutter : Ingeburg Johanna Kirchhoff, geb. am 05.04.1951
Lehrerin, jetzt Mitarbeiterin in der
Stadtbibliothek Meiningen
Vater : Swen Karl Feodor Kirchhoff, geb. am 29.06.1944
Zahnarzt in Meiningen

Geschwister Dorothée Henriette Kirchhoff, geb. am 05.12.1979
Fremdsprachenkorrespondentin in Frankfurt/ Main

Schulbildung 1980 – 1990 Polytechnische Oberschule
„Theodor Neubauer“

Berufsausbildung 1990 – 1993 Ausbildung zum Krankenpfleger an der
Medizinischen Fachschule Meiningen
Abschluss: staatlich examinierter Krankenpfleger

1. Arbeitstätigkeit 1993 – 1994 Krankenpfleger in den Meiningen
Kliniken

Zivildienst 1994 – 1995 Zivildienst beim DRK Meiningen

Abitur 1993 – 1996 Abendkolleg Meiningen
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

- Studium**
- 1996 – 1999 Studium der Zahnheilkunde an der FSU Jena
 - 1999 – 2002 Studium der Zahnheilkunde an der Universität Leipzig
- Abschluss: Staatsexamen der Zahnmedizin
- Beruf**
- Ausbildungsassistentenzeit von 2003 – 2005 in der Zahnarztpraxis Dres. G. Palaske und U. Woytinas
 - seit 2005 in der väterlichen Praxis als angestellter Zahnarzt beschäftigt